

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
LABORATÓRIO DE ZOOFISIOLOGIA E BIOQUÍMICA COMPARATIVA

**TOXICIDADE E ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS EM PACU  
(*Piaractus mesopotamicus*) EXPOSTO AO HERBICIDA ROUNDUP®  
READY**

NATÁLIA SAYURI SHIOGIRI

São Carlos - SP  
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
LABORATÓRIO DE ZOOFISIOLOGIA E BIOQUÍMICA COMPARATIVA

**TOXICIDADE E ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS EM PACU  
(*Piaractus mesopotamicus*) EXPOSTO AO HERBICIDA ROUNDUP®  
READY**

Orientada: Natália Sayuri Shiogiri  
Orientadora: Dra. Marisa Narciso Fernandes  
Co-orientador: Dr. Claudinei da Cruz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde- Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

São Carlos - SP  
2011

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

S556ta

Shiogiri, Natália Sayuri.

Toxicidade e alterações morfofuncionais em pacu  
(*Piaractus mesopotamicus*) exposto ao herbicida Roundup®  
ready / Natália Sayuri Shiogiri. -- São Carlos : UFSCar,  
2011.  
67 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2011.

1. Toxicologia. 2. Ecotoxicologia. 3. Peixe. 4. Glifosato. 5.  
Histologia. I. Título.

CDD: 615.9 (20ª)

Natália Sayuri Shiogiri

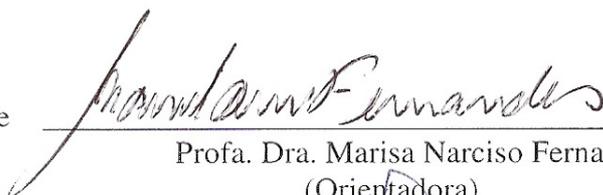
**TOXICIDADE E ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS EM PACU (*Piaractus mesopotamicus*) EXPOSTO AO HERBICIDA ROUNDUP® READY**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

**Aprovada** em 01 de abril de 2011

BANCA EXAMINADORA

Presidente



Prof. Dra. Marisa Narciso Fernandes  
(Orientadora)

1º Examinador

  
Prof. Dr. Gilberto Moraes  
PPGEV/UFSCar

2º Examinador

  
Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini  
UNESP/Bauri-SP

*Aos meus pais, Helio e Cida e à minha irmã Priscila,  
pela confiança, apoio, estímulo e carinho.*

## **Agradecimentos**

À Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes, pela orientação, ensinamentos, paciência e oportunidade de trabalhar no LZBC

Ao Prof Dr. Claudinei da Cruz, pela co-orientação, parceria, amizade e por estar presente em mais uma etapa dessa jornada científica.

À banca examinadora pela contribuição para melhoria deste trabalho.

Aos meus pais, Helio e Cida, pela educação, apoio e exemplo e à minha irmã Priscila pela amizade incondicional.

Aos amigos do laboratório Iara, Eliane, Larissa, Tayrine, Naiara, Jackeline, Bianca, Marise, Dona Vera, Sr. Ângelo, em especial o Marcelo, a Flávia, a Natieli e a Débora, pela amizade compartilhada e ajuda sempre que precisei.

À Karla por todo o apoio, amizade, paciência e abraços.

À Juliana e Vivian pela amizade e companheirismo durante os longos dias de trabalho.

Ao Prof. Dr. Robinson A. Pitelli, por ceder o local para a realização dos experimentos.

À todos do NEPEAM, amigos e funcionários, por toda ajuda, idéias e força durante realização dos experimentos e também pelas risadas e momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Gilberto Moraes pelo espaço cedido e ajuda na execução das análises enzimáticas.

À Priscila Rossi pela ajuda na execução do trabalho e amizade.

À Francine pelo companheirismo e alegria proporcionada em nosso lar, e também apoio e idéias espetaculares no trabalho.

À Jaqueline pela acolhida em São Carlos e pela amizade e companheirismo que sempre foram tão importantes para mim.

Às amigas européias e ex-européias pela amizade, em especial à Aruana, por essa amizade eterna, ainda que recente.

À FAPESP, pelo apoio financeiro ao processo nº 2009/04508-3.

**Muito obrigada!**

## Resumo

A contaminação dos corpos hídricos por resíduos de agrotóxicos é uma das principais preocupações na preservação da biota aquática. O glifosato é um dos herbicidas mais utilizados e, a formulação Roundup® Ready (RR), foi recentemente introduzida no mercado e necessita de avaliações em relação aos possíveis efeitos para a biota aquática. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda (CL(I)50;48h) do herbicida glifosato na formulação Roundup® Ready e os efeitos da exposição aguda e crônica sobre as variáveis hematológicas, as alterações morfofuncionais em brânquias e fígado e as respostas do sistema de defesa antioxidantes no fígado de pacu, *Piaractus mesopotamicus*. A CL(I)50;48h do glifosato foi estimada em 3,74 mg.L<sup>-1</sup>, com limite inferior de 3,54 mg.L<sup>-1</sup> e limite superior de 3,95 mg.L<sup>-1</sup>. A partir dessa CL (I) 50;48h, foram definidos os quocientes estipulando concentrações de trabalho para a realização do teste de toxicidade crônica. As alterações analisadas no fígado do pacu permitiram o cálculo do Índice de Alterações Histopatológicas (IAH), que no ensaio agudo variaram entre 1,69 a 135,84 e no crônico foram calculados entre 2,07 a 55,43. Nas brânquias dos peixes submetidos aos dois testes, o agudo e o crônico não ocorreram alterações severas. Os IAH nas brânquias variaram de 0,29 a 2,07 e indicaram que não ocorreu alteração no funcionamento do órgão. A atividade da NKA dos peixes submetidos aos dois testes apresentou aumento médio não significativo. Os peixes apresentaram diminuição do número total de eritrócitos (RBC) em relação ao controle. A concentração de hemoglobina, o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) aumentaram significativamente nos peixes submetidos ao glifosato em relação ao controle (p<0,05). A atividade das enzimas antioxidantes dos peixes submetidos ao teste de toxicidade crônica mostrou diminuição da atividade específica da superóxido dismutase e da catalase e não ocorreu alteração na atividade da glutathione peroxidase. A peroxidação lipídica hepática aumentou após exposição ao glifosato. A atividade específica da acetilcolinesterase diminuiu no cérebro, mas não no músculo. Não foram observadas alterações da concentração de íons plasmáticos. Em conclusão, os resultados evidenciam toxicidade do glifosato, na formulação Roundup® Ready, para *P. mesopotamicus*, e as alterações podem comprometer o processo de desintoxicação e reparo do tecido e levar o animal à morte.

## Abstract

The water body contamination by agrochemical residues is one of the main concerns on the preservation of aquatic biota. The glyphosate is one of the most used herbicides and the Roundup<sup>®</sup> Ready (RR) formulation has been recently introduced in the market and needs to be evaluated in relation to the possible effects to the aquatic biota. Thus, the aim of this study was to evaluate the toxicity of the herbicide glyphosate in the Roundup<sup>®</sup> Ready formulation, determining the LC 50;48h and the effects of acute and chronic exposure over the hematologic variables, morphofunctional alterations in gills and liver and responses of the antioxidant defense system in the liver of pacu, *Piaractus mesopotamicus*. The LC 50;48h of glyphosate in this formulation was estimated in 3,74 mg.L<sup>-1</sup>, with inferior limit of 3,54 mg.L<sup>-1</sup> and superior limit of 3,95 mg.L<sup>-1</sup>. According to LC 50;48h values, it were defined the quotients stipulating concentrations to be used in the chronic toxicity test. The analyzed alterations in liver of pacus allowed the estimation of the Index of histopathological alterations (IAH), wich ranged between 1,69 to 135,84 in acute test; and between 2,07 to 55,43 in chronic test. In the fishes' gills submitted to both tests, acute and chronic, there were no severe alterations. The IAH on gills ranged between 0,29 to 2,07 and no changes were observed in the normal function of the organ. The NKA activity of fishes submitted to both tests presented a medium increase, however it was not significant. Fishes presented a decrease of total number of erythrocytes (RBC) in relation to control, however, hemoglobin concentration, mean cell volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) increased significantly on fishes submitted to glyphosate exposure in relation to control (p<0,05). The antioxidant enzyme activity of fishes submitted to chronic toxicity test showed a decrease in the specific activity of liver superoxide dismutase and catalase and there was no change in the activity of liver glutathione peroxidase. An increase in the liver lipidic peroxidation was observed after glyphosate exposure. The specific activity of acetylcholinesterase decreased in the brain, but not in the muscle. It was not observed changes in plasma ions concentration. In conclusion, the results of this study shows toxicity of the glyphosate, in the Roundup<sup>®</sup> Ready formulation, to *P. mesopotamicus*, which alterations in the animal can compromise the process of detoxification and tissue repair, which may lead the animal to death.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	1
1.1. O ambiente aquático e sua contaminação.....	1
1.2. Ação de xenobióticos em peixes.....	5
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	9
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	10
3.1. Características e importância da espécie, <i>Piaractus mesopotamicus</i> .....	10
3.2. Controle de sensibilidade e testes de toxicidade .....	11
3.2.1. Controle de sensibilidade.....	11
3.2.2. Testes de toxicidade preliminares.....	11
3.2.3. Testes de toxicidade definitivos.....	12
3.2.4. Teste de toxicidade crônica.....	14
3.3. Coleta do material para análise bioquímica e histológica.....	15
3.4. Análises morfofuncionais.....	16
3.4.1. Análises histopatológicas .....	16
3.5. Análise bioquímica.....	19
3.5.1. Atividade da Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase branquial.....	19
3.5.2. Acetilcolinesterase (AChE) .....	20
3.5.3. Proteína dos homogeneizados de tecidos.....	20
3.5.4. Superóxido Dismutase total - SOD.....	21
3.5.5. Catalase - CAT.....	21
3.5.6. Glutathiona Peroxidase - GPx.....	22
3.6. Peroxidação lipídica - LPO.....	22
3.7. Variáveis hematológicas .....	23
3.7.1. Hematócrito .....	23
3.7.2. Dosagem de Hemoglobina total ([Hb]) .....	23
3.7.3. Contagem de eritrócitos (RBC).....	23
3.7.4. Volume corpuscular médio (VCM) .....	24
3.7.5. Hemoglobina corpuscular média (HCM) .....	24
3.7.6. Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).....	24
3.8. Análise estatística.....	24
<b>4. Resultados</b> .....	25
4.1. Toxicidade aguda.....	25
4.1.1. Toxicidade aguda do glifosato na formulação Roundup <sup>®</sup> Ready para o pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> .....	25
4.1.2. Histopatologia, imunohistoquímica e atividade da NKA das brânquias.....	25

4.1.3. Histologia do fígado .....	30
4.2. Toxicidade crônica.....	36
4.2.1. Variáveis hematológicas e plasmáticas.....	36
4.2.2. Alterações morfofuncionais em brânquias, fígado e rins.....	38
4.2.3. Atividade enzimática.....	45
4.2.3.1. Acetilcolinesterase (AChE) .....	45
4.2.3.2. Enzimas antioxidantes hepáticas.....	47
4.2.4. Lipoperoxidação hepática.....	50
<b>5. Discussão.....</b>	<b>51</b>
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>59</b>
<b>7. Referências bibliográficas.....</b>	<b>60</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Exemplar de pacu ( <i>P.mesopotamicus</i> ).....	11
<b>FIGURA 2.</b> Procedimento experimental do ensaio de toxicidade aguda do glifosato, na formulação Roundup® Ready para o pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> )....	13
<b>FIGURA 3.</b> Testes de toxicidade crônica.....	15
<b>FIGURA 4.</b> Fotomicrografia das brânquias de pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) expostos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready durante - CL(I)50;48h.....	28
<b>FIGURA 5.</b> Imunohistoquímica contra a enzima Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase para identificação das células de cloreto (CC) nos filamentos e lamelas de pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) expostos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready, em teste de toxicidade aguda - CL(I)50;48h.....	30
<b>FIGURA 6.</b> Fotomicrografia de fígado de pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) expostos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready em teste de toxicidade aguda.....	32
<b>FIGURA 7.</b> Hepatócitos PAS-positivo para o glicogênio em fígado de pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) expostos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready em testes de toxicidade aguda – CL(I)50;48h e crônica (14 dias).....	35
<b>FIGURA 8.</b> Fotomicrografia das brânquias de pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) expostos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready durante 14 dias.....	38
<b>FIGURA 9.</b> Células cloreto/mm <sup>3</sup> de pacu, expostos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready, em teste de toxicidade crônica – 14 dias, imunocoradas contra a enzima Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase. Atividade da enzima Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase em brânquias de pacu.....	39
<b>FIGURA 10.</b> Fotomicrografia de fígado de pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) expostos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready em teste de toxicidade crônica – 14 dias.....	41
<b>FIGURA 11.</b> Hepatócitos PAS-positivo para o glicogênio mostrando intensidade de coloração (unidades arbitrárias) em fígado de pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) expostos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready em testes de toxicidade crônica – 14 dias.....	43
<b>FIGURA 12.</b> Atividade específica da acetilcolinesterase cerebral de pacu exposto ao glifosato durante teste de toxicidade crônica (14 dias).....	44
<b>FIGURA 13.</b> Atividade específica da acetilcolinesterase muscular de pacu exposto ao glifosato durante teste de toxicidade crônica (14 dias).....	45
<b>FIGURA 14.</b> Atividade específica da superóxido dismutase hepática de pacu exposto ao glifosato durante teste de toxicidade crônica (14 dias).....	46

<b>FIGURA 15.</b> Atividade específica da catalase hepática de pacu exposto ao glifosato durante teste de toxicidade crônica (14 dias).....	47
<b>FIGURA 16.</b> Atividade específica da glutathione peroxidase hepática de pacu exposto ao glifosato durante teste de toxicidade crônica (14 dias).....	48
<b>FIGURA 17.</b> Concentração de hidroperóxido de cumeno no fígado de pacu exposto ao glifosato durante teste de toxicidade crônica (14 dias).....	49

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Alterações Histopatológicas em fígado, brânquias e rins e respectivos estágios baseados no grau de possibilidade de restauração das lesões.....	18
<b>TABELA 2.</b> Sinais de intoxicação de <i>P. mesopotamicus</i> submetidos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready, em ensaio de toxicidade aguda.....	27
<b>TABELA 3.</b> Frequências de alterações encontradas nas brânquias de pacu ( <i>P.mesopotamicus</i> ) submetidos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready, em ensaio de toxicidade aguda.....	29
<b>TABELA 4.</b> Frequência de alterações encontradas nos fígados de pacu ( <i>P.mesopotamicus</i> ) submetidos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready, em teste de toxicidade aguda (CL 50-48h).....	33
<b>TABELA 5.</b> Índice de alterações histopatológicas (IAH) de brânquias e fígado de pacu ( <i>P.mesopotamicus</i> ) submetido ao glifosato em teste de toxicidade aguda.....	34
<b>TABELA 6.</b> Médias e desvios-padrão das variáveis hematológicas e dos índices hematimétricos de pacu ( <i>P.mesopotamicus</i> ) submetido ao glifosato em teste de toxicidade crônica.....	36
<b>TABELA 7.</b> Médias e desvios-padrão da concentração de íons plasmáticos Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> e Cl <sup>-</sup> e osmolalidade plasmática de pacu ( <i>P.mesopotamicus</i> ) submetido ao glifosato em teste de toxicidade crônica.....	37
<b>TABELA 8.</b> Frequências de alterações encontradas nas brânquias de pacu ( <i>P.mesopotamicus</i> ) submetidos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready, em teste de toxicidade crônica.....	39
<b>TABELA 9.</b> Frequências de alterações encontradas nos fígados de pacu ( <i>P.mesopotamicus</i> ) submetidos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready, em teste de toxicidade crônica.....	42
<b>TABELA 10.</b> Índice de alterações histopatológicas (IAH) de brânquias e fígado de pacu ( <i>P.mesopotamicus</i> ) submetido ao glifosato em teste de toxicidade aguda e crônica.....	43

## **1- INTRODUÇÃO**

### **1.1 O ambiente aquático e sua contaminação**

A água constitui uma das substâncias essenciais à vida. Apenas 0,8% da água do planeta é de água doce e seu múltiplo uso, tais como abastecimento público, uso em indústrias e agropecuária, recreação e transporte o que tem contribuído para a contaminação dos corpos d'água, e põem em risco a diversidade de plantas e animais no meio aquático. A fração de água doce com alguma forma de contaminação é ainda desconhecida. Nestes ambientes, a quantidade de sólidos dissolvidos assim como sua composição varia com sua localização, estação do ano, geologia local e atividade antrópica. Um fator importante que influencia na dinâmica dos sistemas aquáticos é a precipitação pluvial; durante os períodos de chuva grandes quantidades de partículas são carregadas pelas águas, resultando na alteração da turbidez e quantidade de sólidos suspensos e, principalmente, na entrada de poluentes nos corpos d'água (GOUVÊA, 2004). Assim, a contaminação dos corpos d'água com resíduos de agrotóxicos é uma das principais preocupações na preservação dos ecossistemas aquáticos. O conhecimento básico dos possíveis efeitos que esta classe de xenobiótico pode causar no ambiente aquático é de grande importância como subsídio para ações de políticas públicas e futuros programas de monitoramento ambiental.

Nas últimas décadas os desmatamentos, os usos inadequados do solo e a utilização de agentes altamente tóxicos na agricultura devido ao aumento das áreas de cultivo têm contribuído de forma sistemática para a contaminação dos ambientes aquáticos lentamente, porém contínua, via lixiviação e/ou dispersão aérea (GUERESCHI, 2004). Além disso, a contaminação direta das águas superficiais tem ocorrido também devido ao uso de metais e/ou pesticidas que são utilizados em sistemas de cultivo de peixes para o controle de algas e parasitos (ROMÃO et al., 2006) e herbicidas que tem sido utilizado, em lagos e reservatórios, para controle de plantas aquáticas (PITELLI, 1998).

Assim, produtos a base de glifosato estão entre os herbicidas de amplo espectro mais usados (GIESY et al., 2000). As propriedades herbicidas do glifosato foram descobertas em 1970 e as formulações comerciais para controle não seletivo de plantas daninhas foram introduzidas pela primeira vez em 1974 (FRANZ et al., 1997). Atualmente, o glifosato representa 60% do mercado mundial de herbicidas não-seletivos. Este herbicida atua como inibidor da atividade da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) que catalisa uma das reações de

síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano inibindo a síntese desses aminoácidos (CONNERS e BLACK 2004; RELYEA 2005; KOLPIN et al. 2006). O glifosato tem sido empregado para eliminar plantas daninhas anuais ou perenes, sendo muito utilizado pela eficácia, baixo custo e baixa toxicidade (AMARANTE Jr et al., 2002) e, atualmente, tem sido frequentemente aplicado em sistemas aquáticos para controle de macrófitas.

As formulações de glifosato têm sido extensivamente investigadas pelo seu potencial de produzir efeitos adversos em organismos não alvos (GIESY et al., 2000), entretanto, há poucos estudos sobre a toxicidade aguda e crônica das formulações deste herbicida na biota aquática. Assim, os testes ecotoxicológicos em peixes e outros organismos não alvos, além da avaliação da qualidade da água, são importantes para a determinação de efeitos deletérios deste herbicida em organismos aquáticos e na avaliação da eficácia de controle das macrófitas alvos (FERREIRA, 2002).

Nos últimos anos, o interesse sobre os efeitos que as substâncias tóxicas provocam na saúde dos peixes e de outros organismos aquáticos tem aumentado devido, principalmente, ao desenvolvimento da aquicultura em regiões próximas aos corpos d'água e regiões de intensa atividade agrícola (PARMA de CROUX et al., 2002). Estudos sobre a toxicidade de herbicidas em organismos aquáticos foram realizados em *Oreochromis niloticus* expostas ao paraquat (BABATUNDE et al., 2001); em *Tinca tinca* exposta ao 2,4-D (GÓMEZ et al., 1998) e em *Daphnia magna*, *Hyaella azteca*, *Chironomus riparius* e *Nepheleopsis obscura* (HENRY et al., 1994), *Ceriodaphnia dubia* (TSUI e CHU, 2003) expostas ao glifosato. Em algumas espécies de peixes neotropicais como o curimatá (*Prochilodus lineatus*) (LANGIANO e MARTINEZ, 2007), alevinos de jundiás (*Rhamdia quelen*) (KREUTZ et al., 2008), o guaru (*Phallocerus caudimaculatus*) (SHIOGIRI et al., 2010) a toxicidade do glifosato também foi avaliada.

Considerando que a resposta biológica a um xenobiótico ocorre em função da concentração e do tempo de exposição (RAND e PETROCELLI, 1985), a avaliação da toxicidade aguda e crônica é importante para poder determinar os efeitos letais a organismos expostos a altas doses de xenobióticos em curto período de tempo e os efeitos subletais à exposição em concentrações baixas, mas durante um longo período de tempo (OMOREGIE et al., 1994). Alguns produtos químicos mostram diferentes modos de ação a curto e a longo prazo, o que pode interferir no nível de toxicidade aos organismos e nas alterações fisiológicas (AHLERS et al., 2006). O estresse agudo e crônico causado por xenobióticos pode reduzir a

resistência dos peixes a patógenos e favorecer o aparecimento de doenças provocando alterações quantitativas nos leucócitos do sangue (WEDELAAR BONGA, 1997), além de alterar as variáveis sanguíneas comprometendo o desenvolvimento e a sobrevivência dos peixes.

Assim, a padronização destes testes forneceu um meio eficiente e de custo moderado para o monitoramento dos efeitos potencialmente adversos de algumas substâncias químicas (RAND e PETROCELLI, 1985). Além disso, os testes de toxicidade aguda ou crônica devem utilizar preferencialmente espécies nativas da ictiofauna brasileira e águas semelhantes as que essas espécies vivem. Assim, testes com água reconstituída (padrão internacional) que tem concentrações de sais mais altas que a maioria das águas continentais do Brasil (ZAGATTO e BERTOLLETI, 2006), não representa com fidelidade as águas encontradas nos ambientes aquáticos brasileiros. Resultado disso é que, em geral, os testes realizados com água reconstituída mostram serem menos tóxicos do que quando são utilizadas águas moles e pobres em íons, como as do Brasil (CERQUEIRA e FERNANDES, 2002; FERNANDES e MAZON, 2003; MONTEIRO et al., 2006; BARRETO, 2006).

As informações científicas sobre o efeito de xenobióticos em espécies nativas e, em condições mais realísticas (utilização de água local) são importantes para, experimentalmente, estabelecer o grau de interferência em determinados órgãos e sistemas do organismo e seu mecanismo de ação, além de aperfeiçoar os estudos de avaliação de risco e para prevenir efeitos irreversíveis nas populações.

O estudo em nível de indivíduos é importante para avaliar possíveis inferências na população e estabelecer os possíveis impactos negativos das moléculas dos herbicidas no ambiente aquático em nosso país. O conhecimento das alterações dos padrões enzimáticos e as alterações da morfologia de brânquias e fígado, órgãos essenciais no metabolismo energético, podem subsidiar propostas e programas de monitoramento ambiental.

Neste estudo, foi utilizado o herbicida glifosato (*N*-phosphonomethyl glycine) que tem amplo espectro de ação, baixa seletividade, aplicação em pós-emergência e ação sistêmica (NEDELKOSKA e LOW, 2004) e, além disso, é uma molécula estável em água e não sofre degradação fotoquímica (FAO/WHO, 1986). Apesar de ser citado como pouco tóxico, há evidência de efeitos deletérios no ambiente após seu uso prolongado, principalmente devido à resistência adquirida por algumas espécies de ervas (AMARANTE Jr. et al., 2002).

O glifosato na formulação “Roundup Ready” (RR) tem sido utilizado nos Estados Unidos, Canadá, Argentina e China, entre outros e tem especificidade para culturas Roundup resistentes (RR), modificadas geneticamente. Em 2004, aproximadamente 13% da produção de milho, 85% da soja e 60% do algodão dos EUA foram realizadas com variedades RR (DEYNZE et al. 2004) e nos últimos anos tem sido aplicado em plantas geneticamente modificadas (GM) no Brasil.

No Brasil, o cultivo dessas plantas somente foi autorizado, em 2008, para cultivo em estações experimentais (CTNBio, 2008). A principal justificativa para utilização de cultivares RR é a otimização da produção, melhor controle de plantas daninhas, redução do número de herbicidas aplicados e eliminação das restrições para a rotação de culturas. Apesar de o glifosato adsorver ao solo e ser considerado de baixo risco para ecossistemas aquáticos, ele pode atingir corpos d’água por deriva da dispersão aérea, escoamento superficial e lixiviação e a sua liberação pode ser aumentada na presença de fertilizantes de fósforo inorgânico (PEREZ et al. 2007; SIEMERING et al. 2008).

Além disso, de acordo com a Monsanto (2005), a utilização de algodão, soja e canola RR incluem o componente ambiental, pois o glifosato pode ser utilizado sem causar efeitos adversos aos organismos não-alvos devido a sua não acumulação em mamíferos, aves e organismos aquáticos. Entretanto, há alguns questionamentos sobre os sistemas RR de produção, incluindo seleção de flora infestante e desenvolvimento de populações resistentes ao glifosato, além dos possíveis efeitos sobre o ambiente aquático. A generalização do uso do glifosato em grandes áreas e em intensidades maiores que as praticadas até então em plantas não geneticamente modificadas aumenta o risco de o glifosato atingir corpos hídricos e afetar os organismos aquáticos.

Esse herbicida, na formulação Roundup<sup>®</sup> Ready, pertence à classe toxicológica II, sendo considerado altamente tóxico e à classe ambiental III, produto perigoso (AGROFIT, 2008). Parte do mercado do glifosato refere-se às culturas vegetais resistentes a este herbicida como milho, soja e algodão. As contaminações dos sistemas aquáticos por produtos químicos provenientes da agricultura têm sido demonstradas por vários autores e, de uma forma geral, os herbicidas que são utilizados para o controle de plantas daninhas, atingem e contaminam os corpos hídricos em pequenas concentrações (FARGASOVA, 1994; WONG, 2000).

## 1.2. Ação de xenobióticos em peixes

Os peixes são especialmente susceptíveis às variações ambientais e apresenta resposta mais sensível aos poluentes do que muitos mamíferos (MUNSHI e DUTTA, 1996). O contato de um tóxico com um organismo acarreta várias respostas fisiológicas e bioquímicas que podem ser adaptativas ou levar à toxicidade (BEGUM, 2004). Em peixes, as brânquias e o fígado são os primeiros órgãos a sofrer a ação dos xenobióticos e a metabolizá-los para posterior excreção. As brânquias atuam como a interface entre o animal e o seu ambiente, são os principais órgãos para a respiração na maioria dos peixes, têm importante papel na regulação iônica e osmótica e na manutenção do equilíbrio ácido-base, os quais são continuamente ajustados em função de oscilações do meio interno e externo e constituem o sítio de tomada e depuração de contaminantes. O fígado é um modelo interessante para o estudo de efeitos de fatores ambientais nas funções e estruturas hepáticas (MUNSHI e DUTTA, 1996). Este pode ser alvo de muitas substâncias tóxicas, pois é o principal órgão de detoxificação e possui intensa atividade metabólica. O sangue, como parte do sistema vascular, é o principal fluido que transporta tanto nutrientes e os gases respiratórios quanto xenobióticos e metabólitos a todos os tecidos e órgãos.

As brânquias, sendo os primeiros órgãos em contato com xenobióticos, são também os primeiros órgãos a responder, direta ou indiretamente, à presença dessas substâncias na água. O epitélio respiratório, constituído pelas lamelas secundárias, representa a maior parte (96%) da superfície das brânquias (HUGHES, 1972) e tem a espessura de 1-8  $\mu\text{m}$ , dependendo da espécie, o que favorece a difusão de poluentes do meio aquático para o sangue (FERNANDES e MAZON, 2003, COSTA et al., 2007). As células-cloreto (CC), células mucosas (CM) e células pavimentosas (CPV) que revestem o filamento branquial, representam a superfície do epitélio não respiratório (aproximadamente 4% da área total e tem papel na regulação iônica, osmótica e ácido-base (LAURENT e DUNEL-HERB, 1980, MORON et al, 2003, FERNANDES et al., 2007). O número e a distribuição destas células variam dependendo das características químicas e físicas do meio aquático, incluindo os poluentes, e têm sido consideradas como uma resposta morfológica em função das alterações bioquímicas e fisiológicas do organismo (MAZON et al., 2002, MORON et al., 2003, SAKURAGUI et al., 2003).

A avaliação das alterações morfológicas em tecidos de peixes tem se mostrado ferramenta sensível para detectar os efeitos tóxicos diretos de compostos químicos em órgãos alvos e são

indicadores potentes da exposição à xenobióticos. Dentre as histopatologias nos diferentes tecidos, estudos efetuados com glifosato têm evidenciado hiperplasia epitelial, edema, infiltração de leucócitos, hipertrofia das células-cloreto nas brânquias e focos de fibrose no fígado de carpa (*Cyprinus carpio*) (NESKOVIC et al. 1996), proliferação do epitélio do filamento, hipertrofia e fusão lamelar e aneurisma nas brânquias, vacuolização e picnose nuclear no fígado e dilatação do espaço de Bowman's nos glomérulos dos rins de tilápia (*Oreochromis niloticus*) (JIRAUNGKOORSKUL et al. 2002). Dependendo da extensão dessas alterações nos tecidos, a função do órgão pode ficar comprometida.

O fígado é o principal órgão onde ocorre o metabolismo dos xenobióticos. O aporte excessivo de xenobióticos pode alterar suas diferentes funções metabólicas (metabolismo de carboidratos e lipídios) e conseqüentemente na sua morfologia. Indiretamente essas alterações podem interferir na atividade dos demais órgãos do animal como gônadas (alteração na produção de vitelogenina), músculos (suprimento de glicose durante atividade intensa), etc. (RUAS et al., 2008).

A avaliação dessas alterações fisiológicas, atualmente, é muito utilizada para documentar e quantificar a exposição e os efeitos de poluentes ambientais podendo até ser utilizados como biomarcadores de exposição. Os biomarcadores de efeitos podem integrar efeitos de múltiplos estressores e auxiliar na elucidação dos mecanismos de ação (ADAMS, 1990).

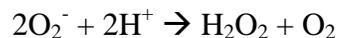
Os processos bioquímicos representam os eventos mais precoces e mais sensíveis dos danos causados por xenobióticos. Suas alterações então precedem as alterações morfológicas e estão associadas ao mecanismo de ação dos xenobióticos ou aos processos de defesa do organismo, como por exemplo, as defesas antioxidantes (MONTEIRO et al., 2006, RUAS et al., 2008). A perturbação do balanço pró-oxidante/antioxidante em favor dos pró-oxidantes é chamada de estresse oxidativo, o qual pode induzir maiores taxas de peroxidação lipídica em tecidos e danos celulares (SOUTHORN e POWIS, 1988) e têm sido propostas como indicadoras de estresse oxidativo mediado por poluentes (AHMAD et al., 2000, VAN DER OOST et al., 2003). Assim, é importante determinar os efeitos desses produtos químicos e interpretá-los em termos bioquímicos, para delinear seus mecanismos de ação, e possíveis vias de tornar os efeitos adversos menos severos (BEGUM, 2004). Esses eventos são os chamados biomarcadores bioquímicos. Dentre os biomarcadores bioquímicos, os mais extensivamente investigados são as enzimas envolvidas na detoxificação de xenobióticos e de seus metabólitos,

ou seja, as enzimas de biotransformação de fase 1 como a P450 (medida pelo ensaio EROD) e de fase 2, como a Glutathione S Transferase (GST), além das enzimas envolvidas nas defesas antioxidantes.

A biotransformação consiste na transformação de um composto lipofílico em um outro hidrofílico, mais polar, tornando assim mais fácil a sua excreção do que o composto original (VERMEULEN, 1996). Este processo reduz a afinidade do xenobiótico por proteínas do plasma e dos tecidos, pois compostos hidrofílicos tendem a ser menos permeáveis nas membranas biológicas, sendo mais facilmente eliminados (HEATH, 1995). A consequência desse processo é a diminuição do tempo de permanência de um xenobiótico no organismo e de sua toxicidade (LIVINGSTONE, 1998).

Durante a biotransformação dos xenobióticos pelo citocromo P450 pode ocorrer a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e se ocorrer um desequilíbrio entre a produção de ERO e as enzimas antioxidantes pode ocorrer a peroxidação e morte celular. As ERO originam-se quando o processo de respiração aeróbia é incompleto, por razões fisiológicas, patológicas e/ou como resultado da ação das enzimas de fase 1. Regularmente, as ERO atuam como moléculas de sinalização, porém, em altas concentrações, tais moléculas podem ocasionar o estresse oxidativo. As ERO podem ser inativadas pelos sistemas de defesa antioxidante celulares cujas enzimas chave são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx); todas elas abundantes nos tecidos de peixes (LACKNER, 1998).

A superóxido dismutase é considerada a primeira linha de defesa contra a toxicidade do radical superóxido e encontra-se distribuída por todos os eucariotos (LEITCH et al., 2009). A sua atividade catalítica consiste na reação de dismutação do radical superóxido ( $O_2^-$ ) em  $H_2O$  e  $H_2O_2$ :



A catalase pode ser encontrada em uma grande variedade de seres vivos sendo que nas células animais ela se localiza nos peroxissomos. Ela é responsável pela degradação do  $H_2O_2$  à  $H_2O$  e  $O_2$  e essa reação se dá rapidamente, aproximadamente  $10^{-7}$  minutos. A enzima é considerada um passo evolutivo extremamente importante, pois permitiu aos organismos viverem em ambientes aeróbicos (SCANDALIOS, 2005). Sua reação é a seguinte:



A glutationa peroxidase também degrada o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), utilizando a glutationa reduzida (GSH) como doadora de elétrons para o processo.



ou



Essa enzima é uma alternativa eficiente para manter níveis baixos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uma vez que baixa atividade de catalase é encontrada no citosol (CORTELLA, 2010).

Os danos teciduais promovidos pelas ERO podem ser considerados proporcionais aos níveis de lipoperoxidação tecidual (WILHELM FILHO, 1996) e diversos estudos já evidenciaram o aumento do nível de lipoperoxidação em vários tecidos de peixes expostos a uma variedade de contaminantes (VAN DER OOST et al., 2003).

O sangue é o meio condutor de xenobióticos até os demais tecidos e órgãos. Alterações no número de células sanguíneas e plasma podem indicar a condição fisiológica do peixe quando em determinada situação ambiental (BANERJIE e HOMECHAUDHURI, 1990) tais como temperatura (ANTHONY, 1961); concentração de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> (EDDY e MORGAN, 1969; SOLVIO e WESTMAN, 1973), poluentes (ENOMOTO, 1969; GARDNER e YEVICH, 1970; MAC KIN et. al., 1970; HOUSTON, 1971; PICKFORD et. al., 1971) e/ou do meio interno como hipóxia tecidual, infecções, etc. Além disto, distúrbios hematológicos e no equilíbrio hidroeletrolítico constituem sinais característicos de danos à saúde dos peixes em virtude do comprometimento da qualidade da água.

O glifosato, seja como sal de amônio ou sódio, é um organofosfato, com uma glicina substituindo um grupamento fosfato que, em geral, caracteriza os inseticidas inibidores da enzima acetilcolinesterase (AMARANTE Jr, et al., 2002). A acetilcolina é um importante neurotransmissor presente nos neurônios colinérgicos e a enzima acetilcolinesterase (AChE), é responsável pela hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético, limitando o tempo de ação desse transmissor na condução do impulso nervoso (HUGGET et al., 1992). Esta enzima é um biomarcador para inseticidas organofosforados e carbamatos, mas além destes pesticidas ela responde também a uma série de outros contaminantes, apresentando um grande potencial para a avaliação e monitoramento ambiental (PAYNE et al., 1996).

## 2- OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- 1) Estimar a toxicidade aguda CL(I)50;48h do herbicida glifosato na formulação Roundup® Ready para jovens de pacu (*Piaractus mesopotamicus*);
- 2) Avaliar efeitos fisiológicos e bioquímicos crônicos através da atividade da enzima acetilcolinesterase em cérebro e músculo, variáveis hematológicas e ocorrência de estresse oxidativo em fígado de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) quando submetidos ao herbicida glifosato na formulação Roundup® Ready, em testes de toxicidade crônica;
- 3) Avaliar a ocorrência de alterações morfofuncionais no fígado e brânquias dos peixes expostos ao glifosato na formulação Roundup® Ready, quando submetidos a testes de toxicidade aguda e crônica;
- 4) Avaliar o efeito de glifosato na formulação Roundup® Ready sobre a atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasica de brânquias.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização dos experimentos, foram utilizados exemplares jovens de pacu (*P. mesopotamicus*), com peso entre 40 e 60 g e comprimento entre 10 e 15 cm, provenientes do Laboratório de Nutrição do Centro de Aquicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, foram aclimatados por 10 dias, de acordo com as recomendações da ABNT (2006), em tanques com 250 L, fluxo de água e aeração constante a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12:12h. Os peixes foram alimentados à vontade, uma vez ao dia, com ração comercial.

Os experimentos de toxicidade aguda e crônica foram conduzidos no Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal, devido à disponibilidade de salas de bioensaio para a realização dos testes de toxicidade aguda e um setor de mesocosmos com possibilidade de simulação de condições ambientais, onde foram realizados os testes de toxicidade crônica.

O produto testado foi o glifosato, na formulação Roundup<sup>®</sup> Ready, na concentração de 480 g glifosato.L<sup>-1</sup> fornecido pela Monsanto do Brasil.

#### 3.1. Características e importância da espécie (*Piaractus mesopotamicus*).

De acordo com (HOLMBERG, 1887), a espécie *Piaractus mesopotamicus* apresenta a seguinte classificação sistemática:

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinopterygii

Infraclasse: Teleostei

Superordem: Ostariophysi

Ordem: Characiformes

Família: Serrasalminidae

Subfamília: Serrasalminae

Gênero: *Piaractus*

Espécie: *mesopotamicus*

O *P. mesopotamicus* (Figura 1) é uma espécie endêmica da bacia do Tietê-Paraná e Paraná-Paraguai com importância comercial e ornamental. A espécie é onívora, rústica e precoce,

tem carne saborosa e ótima taxa de crescimento destacando-se como excelente para o cultivo em sistemas intensivos (SILVA, 1985).



**Figura 1.** Exemplar de pacu (*P. mesopotamicus*)

### **3.2. Controle de sensibilidade e testes de toxicidade**

#### **3.2.1. Controle de sensibilidade**

Para avaliação da sensibilidade dos animais foram realizados periodicamente ensaios de toxicidade aguda com cloreto de potássio (KCl) G.A. 99,9% (ABNT, 2006).

Os organismos foram expostos a cinco concentrações (1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 g.L<sup>-1</sup>) e um controle, com três repetições (ABNT, 2006). Os testes foram conduzidos em sistema estático, sem substituição e sifonagem de água. O período de exposição foi de 48 horas e os animais não foram alimentados. A avaliação da mortalidade foi diária, com a retirada dos peixes mortos dos recipientes. A CL (50;48h) do cloreto de potássio para o pacu foi estimada em 3,06 g.L<sup>-1</sup> com limite inferior de 2,42 g.L<sup>-1</sup> e limite superior de 3,88 g.L<sup>-1</sup>, valores estes semelhantes aos obtidos em todos os testes de sensibilidade realizados no laboratório (carta controle-Nepeam).

#### **3.2.2. Testes de toxicidade preliminares**

Os testes de toxicidade preliminares de toxicidade aguda com o glifosato na formulação Roundup<sup>®</sup> Ready foram utilizados para determinar os intervalos de concentração em que

ocorrem zero e 100% de mortalidade e, posteriormente esse intervalo foi utilizado nos testes definitivos (ABNT, 2006).

Os ensaios foram conduzidos em sistema estático, sem substituição e sifonagem de água durante o período de exposição dos peixes ao produto (48 horas). Os animais foram mantidos sem alimentação e a avaliação da mortalidade foi diária e com a retirada dos peixes mortos dos recipientes.

A água utilizada nos ensaios foi a mesma na qual os peixes foram aclimatados, e seus parâmetros foram mantidos inicialmente de acordo com as recomendações da ABNT (2006) com temperatura de  $26 \pm 2$  °C; pH  $7,00 \pm 0,5$ ; oxigênio dissolvido superior a  $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ; condutividade elétrica da água em torno de  $0,180 \text{ }\mu\text{S.cm}^{-1}$  e dureza variando entre 48 a 58 mg de  $\text{CaCO}_3.\text{L}^{-1}$ .

### 3.2.3. Testes de toxicidade definitivos

Os ensaios de toxicidade definitivos (Figura 2A, B, C e D) foram conduzidos para a determinação da toxicidade aguda CL(I)50-48h do glifosato na formulação Roundup® Ready, para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Para tanto, foram utilizados exemplares ( $n = 30$ ) com peso entre 49 e 55 gramas.

Os organismos foram expostos a quatro concentrações (3,0; 3,5; 4,0; 4,5  $\text{mg.L}^{-1}$ ) e um controle (ausência de glifosato na água), em triplicata. A água utilizada nos ensaios foi da rede de abastecimento local, proveniente de um poço semi-artesiano, mantendo a mesma água utilizada para a aclimação dos peixes. Os testes foram conduzidos em sistema estático, sem substituição e sifonagem de água. O período de exposição foi de 48 horas e os animais não foram alimentados. A avaliação da mortalidade foi diária, com a retirada dos peixes mortos dos recipientes.

As variáveis de qualidade de água se mantiveram praticamente constantes durante toda a realização do teste. O pH foi  $7,24 \pm 0,25$  no grupo controle e  $7,29 \pm 0,14$  na maior concentração testada, que foi de 4,5 mg de glifosato. $\text{L}^{-1}$ ; o oxigênio dissolvido foi  $9,76 \pm 0,69 \text{ mg.L}^{-1}$  no controle e  $8,99 \pm 0,43 \text{ mg.L}^{-1}$  na concentração de 4,5  $\text{mg.L}^{-1}$  e a condutividade elétrica foi  $0,194 \pm 0,006 \text{ }\mu\text{S.cm}^{-1}$  no controle e  $0,200 \pm 0,022 \text{ }\mu\text{S.cm}^{-1}$  na de 4,5  $\text{mg.L}^{-1}$ , de acordo com as recomendações da ABNT (2006).

Os sinais clínicos de intoxicação dos peixes foram avaliados em 3, 6, 24 e 48 horas após o início da exposição ao glifosato considerando-se os seguintes aspectos: capacidade de arfagem, ou manutenção na coluna d'água, natação errática, nível de agressividade e agitação e posição ocupada pelo peixe na coluna d'água (MURTY, 1988).

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de regressão linear para a verificação da relação concentração-mortalidade e os valores da CL (I) 50-96h foram calculados pelo método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977).



**Figura 2.** Procedimento experimental do ensaio de toxicidade aguda do glifosato, na formulação Roundup® Ready para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **A)** Caixa de aclimação dos animais em condição de bioensaio, com temperatura ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e períodos de luminosidade (12:12h) controlada **B)** Vista geral do experimento de toxicidade aguda na sala de bioensaio. **C)** Detalhe do experimento de toxicidade aguda. **D)** Detalhe de um peixe em ensaio de exposição aguda

### 3.2.4. Teste de toxicidade crônica

A partir da CL(I)50;48h estimada para o pacu (*P. mesopotamicus*) foram determinadas as concentrações para a realização do teste de toxicidade crônica, que foram 37; 75 e 750  $\mu\text{g.L}^{-1}$  seguindo os quocientes: CL50/100, CL50/50 e CL50/5, como recomendado por Lombardi (2004). Os testes foram conduzidos em mesocosmos (Figura 3A) com capacidade de 400 L em condição de campo. A água utilizada nos testes foi da rede de abastecimento local, proveniente de um poço semi-artesiano.

As avaliações de qualidade de água ocorreram nos dias 1, 3, 5, 7, 11 e 14 de exposição aos herbicidas. As mensurações das variáveis de qualidade de água foram a concentração de oxigênio dissolvido ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), pH, temperatura da água ( $^{\circ}\text{C}$ ) e condutividade elétrica ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ ) utilizando um sistema YSI 556 MPS da YellowSpring Co<sup>®</sup> e a avaliação do comportamento foi realizada de acordo com Murty (1988). As variáveis praticamente não se alteraram ao longo do período experimental: pH =  $7,13 \pm 0,38$  no controle, e  $7,27 \pm 0,52$  na concentração de glifosato de  $0,75 \text{ mg.L}^{-1}$  (Q/5), o oxigênio dissolvido foi  $8,41 \pm 0,75 \text{ mg.L}^{-1}$  no controle, e  $8,11 \pm 0,65 \text{ mg.L}^{-1}$  na concentração de  $0,75 \text{ mg.L}^{-1}$  (Q/5), a condutividade elétrica foi  $0,168 \pm 0,02 \mu\text{S.cm}^{-1}$  no controle, e  $0,180 \pm 0,01$  na de  $0,75 \text{ mg.L}^{-1}$  (Q/5) e a temperatura foi  $26,41 \pm 3,09 \text{ }^{\circ}\text{C}$  no controle, e  $27,13 \pm 3,47 \text{ }^{\circ}\text{C}$  na concentração de  $0,75 \text{ mg.L}^{-1}$  (Q/5). Os teores de amônia no início do teste eram de  $132,45 \pm 44,22 \mu\text{g.L}^{-1}$ , diminuindo para  $43,35 \pm 18,53 \mu\text{g.L}^{-1}$  no final do teste.



**Figura 3.** Testes de toxicidade crônica. **A)** Vista geral dos mesocosmos controle e experimentais. **B)** Aplicação do glifosato nas unidades experimentais. **C, D, E)** Coleta de tecido para análises histológicas e bioquímicas. **F)** Coleta de sangue para análises hematológicas.

### 3.3. Coleta do material para análise bioquímica e histológica

Ao final do teste de toxicidade aguda os peixes foram mortos por secção da medula e as brânquias e o fígado foram removidos. Fragmentos destes tecidos foram imediatamente congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para análises bioquímicas a ser efetuada posteriormente e outras sub-

amostras foram fixadas em solução de Bouin e glutaraldeído 2,5% e posteriormente em glutaraldeído 0,5% no tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3 para a análise histopatológicas e densidade de células de cloreto nas brânquias.

Ao final do teste de toxicidade crônica, uma amostra de sangue foi coletada dos peixes, via punção caudal, armazenados em tubos de ensaio de 2 mL, tipo eppendorf, heparinizados, para determinação das variáveis sanguíneas. Posteriormente, os peixes foram mortos por secção da medula e as brânquias, o fígado, o cérebro e músculo foram removidos. Amostras destes tecidos foram imediatamente congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análises bioquímicas a ser efetuada posteriormente e outras sub-amostras de brânquias e fígado foram fixadas em Bouin e glutaraldeído 2,5% e posteriormente em glutaraldeído 0,5% no tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3 para a análise histopatológicas e densidade de células de cloreto nas brânquias.

### **3.4. Análises morfofuncionais**

#### **3.4.1. Análises histopatológicas**

As amostras fixadas em solução Bouin foram lavadas em água para a remoção do excesso de fixador e armazenadas em álcool 70% e posteriormente foram desidratadas em série crescentes de álcool, permanecendo por 1h em cada álcool (70, 80, 90 e 100%) perfazendo um total de 4 horas, diafanizadas em xilol por 2 horas e embebidas e incluídas em parafina plástica Histosec<sup>®</sup> (Merck) para imunohistoquímica. As amostras de brânquias e fígado fixadas em solução aquosa glutaraldeído 2,5% (pH 7,3; 0,1M) e posteriormente em glutaraldeído 0,5% foram desidratadas em série crescentes de álcool, permanecendo por 1h em cada álcool (70, 80, 90 e 95%) perfazendo um total de 4 horas, após isso, imersas em álcool 95% com methacrilato (Historesina Leica) por 4 horas e deixadas overnight somente em methacrilato (Historesina Leica) e posteriormente incluídas em methacrilato. A seguir, foram efetuados cortes histológicos das amostras incluídas em historesina com 3  $\mu\text{m}$  (Histopatologia) ou com 6-8  $\mu\text{m}$  das amostras incluídas em parafina (imunohistoquímica), em sequência semi-seriada de um corte para 100  $\mu\text{m}$  de descarte, em um micrótomo automático (Microm HM 360) com auxílio de navalhas descartáveis. As secções para análise histopatológica foram coradas com azul de Toluidina (brânquias) e azul de Toluidina e fucsina básica (fígado).

As análises histopatológicas do fígado e brânquias dos peixes expostos ao glifosato em teste de toxicidade aguda e crônica foram efetuadas de acordo com Cerqueira e Fernandes

(2002). Para tanto, foram avaliados 10 campos aleatórios para cada amostra sob microscópio óptico (Olympus BX51) em aumento de 400x. As imagens foram fotodocumentadas com câmara de vídeo acoplada para registro digital utilizando-se o software Motic Images Plus 2.0.

O tipo e a frequência de alterações histopatológicas foram registrados e os Índices de Alterações Histopatológicas (IAH) foram calculados para cada órgão e condição experimental. As alterações foram classificadas em três estágios progressivos baseados no grau de possibilidade de restauração das lesões: estágio I, lesões não muito severas e que não afetam o funcionamento do órgão, reversíveis e pontuais; estágio II, lesões moderadamente severas e que podem afetar o funcionamento do órgão, podem ser irreversíveis, porém, em geral são pontuais; e estágio III, lesões muito severas e normalmente irreversíveis onde o funcionamento do órgão fica muito prejudicado (Tabela 1). O IAH é o resultado da somatória dos pesos dos diferentes estágios (CERQUEIRA e FERNANDES, 2002).

$$I = 10^0 \sum_{i=1}^a a_i + 10^1 \sum_{i=1}^b b_i + 10^2 \sum_{i=1}^c c_i,$$

Onde a = alterações de estágio I, b = alterações de estágio II e c = alterações de estágio III e o valor de I é dividido em categorias: 0-10 funcionamento normal do órgão, 11-20 danos leves a moderado, 21-50 alterações moderadas a severas no órgão, 51-100 alterações severas no órgão e >100 danos irreparáveis no órgão.

**Tabela 1.** Alterações Histopatológicas em fígado e brônquias e respectivos estágios baseados no grau de possibilidade de restauração das lesões.

<b>ALTERAÇÕES</b>			
	<b>Estágio I</b>	<b>Estágio II</b>	<b>Estágio III</b>
<b>FÍGADO</b>	Hipertrofia nuclear / celular	Vacuolização nuclear	
	Atrofia nuclear / celular	Degeneração nuclear / citoplasmática	
	Aumento da frequência do número de vasos	Núcleos Picnóticos	
	Deformação do contorno nuclear / celular	Ausência de nucléolo / núcleo	Necrose Focal
	Núcleos na periferia da célula	Rompimento celular	Necrose Total
	Desarranjo dos cordões hepáticos	Estagnação biliar	
	Presença de melanomacrófagos	Ruptura de vasos	
	Vacuolização citoplasmática	Congestão	
	Grânulos Eosinófilos		
<b>BRÂNQUIAS</b>	Hipertrofia do epitélio lamelar		
	Hiperplasia do epitélio lamelar		
	Congestão vascular		
	Dilatação capilar		
	Descolamento epitelial	Aneurisma lamelar	Necrose Focal
	Constricção capilar	Ruptura Epitelial (hemorragia)	Necrose Total
	Proliferação de células cloreto		
	Proliferação de células mucosas		
	Fusão das lamelas		
	Edema		

Para a determinação do número de células cloreto nas brânquias foi utilizada a técnica de imunohistoquímica específica para a enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ . Os cortes histológicos de 6  $\mu\text{m}$  de espessura foram montados em lâminas. Após o processo de desidratação no xilol e hidratação até água, as lâminas foram lavadas duas vezes por 10 minutos em solução 0,1% TBS-T (TBS 0,1% e 1 mL de triton.  $\text{pH}=7,3-7,4$ ). Para o bloqueio de ligações não-específicas, as lâminas foram incubadas durante 20 minutos em 20% de soro normal de cabra diluído em TBS-T. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o primeiro anti-corpo (alfa 5) -  $\text{Na ATPase}$  diluído em 0,1% TBS-T “overnight” em câmara de incubação úmida. Logo após, as lâminas foram lavadas duas vezes, durante 10 minutos em TBS-T diluído, e incubadas com o segundo anticorpo, Goat Antimouse (GAM), durante 1 hora em câmara úmida. O processo de lavagem das lâminas foi repetido para a incubação com peroxidase anti-peroxidase (PAP)/mouse, onde foram incubadas durante 1 hora em câmara úmida. As lâminas foram lavadas duas vezes por 10 minutos em solução 0,1% de TB para a coloração com 3-3'- diaminobenzidina (DAB-Ni e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Para interromper a reação, as lâminas foram lavadas em água destilada duas vezes por 10 minutos em cuba de vidro sobre agitador magnético. Logo após, seguiu-se o processo de desidratação do material até xilol e as mesmas foram montadas para observação em microscópio óptico. Após a montagem, as lâminas foram analisadas e o número de células-cloreto estimado utilizando um microscópio de luz Olympus BX51 acoplado a um sistema de análise de imagem, e o software MOTIC Images Plus 2.0.

A avaliação de glicogênio no fígado foi efetuada por histoquímica para carboidratos utilizando ácido periódico e reativo de Schiff (PAS) e quantificado de acordo com a intensidade de coloração: 0, células não coradas; 1, células pouco coradas; 2, células razoavelmente coradas e 3, células muito coradas.

### **3.5. Análise bioquímica**

#### **3.5.1. Atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ branquial**

Após lavagem em solução salina 0,9% alguns filamentos branquiais foram separados dos arcos branquiais e congelados ( $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ) em tampão SEI (Sacarose-EDTA-Imidazol,  $\text{pH } 7,4$ ) para posterior análise. Após serem descongelados, os filamentos branquiais foram homogeneizados em tampão SEI com triton 0,1% e centrifugados a 11.200 g por 5 min a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi

utilizado como fonte de enzimas e o conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Bradford (KRUGER, 1994) e da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.

A atividade específica de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase foi determinada em alíquotas de homogeneizados segundo Quabius (1997) e adaptado para leitora de microplaca. Em cada poço da microplaca era colocado 7  $\mu\text{L}$  do sobrenadante da amostra e 100  $\mu\text{L}$  de tampão Imidazol pH 7,4 contendo 3 mM de  $\text{Na}_2\text{ATP}$  (*Vanadium free*). Em 3 poços de cada amostra eram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de tampão contendo KCl (1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e nos outros 3 poços, tampão contendo oubaína (1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). As amostras com o tampão foram incubadas durante 60 minutos a 25 °C, no escuro. Após a incubação a reação era interrompida pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de uma mistura 1:1 de TCA 8,6% e reagente de cor (0,66 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + 9,2 mM de molibdato de amônia + 0,33 mM de  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) em todos os poços, inclusive os brancos. A leitura foi feita em 595 nm em uma leitora de microplacas MRX-HD (DYNEX TECHNOLOGIES, INC.) e a atividade da enzima foi expressa em  $\mu\text{M Pi}/\text{mg proteínas}/\text{h}$ .

### 3.5.2. Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade de AChE cerebral foi determinada de acordo com o método modificado de Ellman e colaboradores (1961). A mistura de reação consistiu de: acetiltiocolina 3,73 mM e ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) 6,4 mM, como cromogênio (diluído com 100 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,5). As amostras de cérebro foram homogeneizadas em tampão fosfato 10 mM pH 7,0 em 50% de glicerina anidra (v/v) e centrifugadas a 21000 x g a 4 °C por três minutos, sendo o sobrenadante usado como fonte de enzima. O produto de reação foi lido em 412 nm por um minuto, a 25 °C, e a atividade expressa em unidades de acetilcolina hidrolisada por miligrama de proteína. O coeficiente de extinção molar ( $\epsilon_{412}=16,950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) utilizado foi previamente determinado. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para transformar  $\mu\text{M}$  de substrato por minuto.

### 3.5.3. Proteína nos homogeneizados de tecidos

A concentração de proteína total nos homogeneizados de tecidos utilizados nas determinações enzimáticas foi realizada segundo o método descrito por Kruger (1994) com leitura em 595 nm em uma leitora de microplacas MRX-HD (DYNEX TECHNOLOGIES, INC.).

### 3.5.4. Superóxido Dismutase total – SOD

A determinação da atividade de SOD é baseada na auto-oxidação do pirogalol, que é inibido na presença de SOD. Alíquotas de tecido foram homogeneizadas em tampão de homogeneização, fosfato 10 mM pH 7,0 em 50% de glicerina (v/v) e diluídas apropriadamente no mesmo tampão.

A determinação da superóxido dismutase era realizada em uma cubeta de 3 mL, onde eram adicionados 200  $\mu$ L de Tris HCL-EDTA 1M, pH 7,5 e um gradiente de volumes do homogeneizado diluído, completando-se o volume para 1960  $\mu$ L com água destilada. As amostras eram então pré-incubadas a 25°C por 2 minutos. Em seguida, eram adicionados 40  $\mu$ L de pirogalol 10 mM (em HCl 10 mM). A variação da densidade óptica foi determinada em 420 nm, em reações cinéticas de 2 minutos, com registros a cada 10 segundos. O cálculo da atividade da SOD foi feito sabendo-se que uma unidade (U) de SOD inibe 50% da auto-oxidação do pirogalol.

### 3.5.5. Catalase – CAT

Amostras dos tecidos foram homogeneizadas em tampão de homogeneização tampão fosfato 10 mM pH 7,0 em 50% de glicerina (v/v) e diluídas apropriadamente, quando necessário, no mesmo tampão. Eram adicionados 20  $\mu$ L de etanol (95%) aos homogeneizados diluídos para impedir a reversão da atividade da enzima. Para ser feita a solução de peróxido de hidrogênio foi necessária à determinação da concentração exata do estoque.

Para isso foi adicionado em uma cubeta de passo óptico de 1 cm: 1,8 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 e realizada uma leitura óptica em 230 nm, chamada de DO<sub>1</sub>. Após essa leitura foi adicionado à mesma cubeta 200  $\mu$ L da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estoque, diluído 100 vezes, e uma nova leitura óptica foi feita e chamada de DO<sub>2</sub>. O cálculo da concentração se baseou na subtração DO<sub>2</sub>-DO<sub>1</sub> e multiplicando-se por 141, dado que o  $\epsilon$  da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é 0,071 e o volume final na cubeta era de 2 mL.

A atividade específica da catalase era então determinada adicionando-se em uma cubeta de passo óptico de 1 cm: 100 $\mu$ L de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0; 900  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 mM e água destilada para completar 1950  $\mu$ L. A mistura foi incubada por 2 minutos com um volume apropriado de homogeneizado, em reação cinética, registrando-se os decréscimos de

DO<sub>230</sub> a cada 10 segundos. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para os cálculos foi  $\epsilon_0 = 0,071/\text{mM.cm}$ .

### 3.5.6. Glutathione Peroxidase – GPx

A atividade específica da glutathione peroxidase foi determinada através da reação da glutathione redutase e da oxidação do NADPH, utilizando-se o hidroperóxido como substrato.

Amostras dos tecidos foram homogeneizadas em tampão de homogeneização (tampão fosfato 10 mM pH 7,0 em 50% de glicerina (v/v), e em seguida, os homogeneizados foram devidamente diluídos no mesmo tampão. Para a determinação enzimática foram adicionados a cubeta de passo óptico de 1 cm: 100  $\mu\text{L}$  de Tris-EDTA 1 M pH 8,0; 20  $\mu\text{L}$  GSH 0,1 M; 100  $\mu\text{L}$  glutathione redutase 10 U/mL; 100  $\mu\text{L}$  de NADPH 2 mM; 380  $\mu\text{L}$  de azida sódica 2,6  $\mu\text{M}$ ; volume apropriado de homogeneizado diluído e um volume de água destilada para completar 970  $\mu\text{L}$ . Esta amostra foi pré-incubada por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  e t-butil hidroperóxido 7 mM.

A oxidação do NADPH foi determinada por 2 minutos com registros de 15 em 15 segundos. O decréscimo da densidade óptica foi determinado contra um branco a 340 nm. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para os cálculos é  $\epsilon_0 = 6,20/\text{mM.cm}$ .

### 3.6. Peroxidação lipídica - LPO

Os níveis de lipoperoxidação tecidual foram quantificados utilizando o método FOX (“Ferrous Oxidation-Xylenol Orange”), descrito por Jiang et al. (1992). Esse método consiste na oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  (sulfato ferroso amoniacal) a  $\text{Fe}^{+3}$  pelos hidroperóxidos em meio ácido na presença de xilenol laranja. Alíquotas das amostras foram tratadas com TCA 10% e foram incubadas durante 30 minutos, à temperatura ambiente, com 900  $\mu\text{L}$  de mistura reativa contendo 100  $\mu\text{M}$  de alaranjado de xilenol, 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4$ , 25 mM de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e 4 mM de butil hidroxitolueno diluídos em metanol 90% (v/v). As leituras de absorvância foram feitas em 560 nm. Os níveis de LPO foram expressos em  $\mu\text{mol}$  hidroperóxido de lipídio por mg de proteína.

### **3.7. Variáveis hematológicas**

As amostras de sangue foram divididas e processadas de acordo com as análises subsequentes. As variáveis hematológicas analisadas foram: número de eritrócitos (RBC), hematócrito (Hct), hemoglobina (Hb) e, posteriormente foram calculados os índices hematimétricos. O RBC foi estimado utilizando uma câmara de Neubauer; a determinação do hematócrito foi feita de acordo com a técnica de tubo capilar ou microhematócrito e a concentração de hemoglobina total foi determinada utilizando o método colorimétrico da cianometahemoglobina utilizando o reagente de Drabkin. Com os valores de RBC, Hct e Hb, foram calculados os índices volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

#### **3.7.1. Hematócrito**

O hematócrito foi determinado aplicando o método de microhematócrito com tubo capilar heparinizado de 75  $\mu\text{m}$ , que depois de preenchidos com amostra de sangue foram vedados com massa de modelar e centrifugados a 16128g por cinco minutos em uma centrífuga de microhematócrito FANEN, mod. 207/N para que os eritrócitos contidos no sangue total fossem firmemente concentrados sem hemólise. Um cartão de leitura de hematócrito foi utilizado para a determinação do seu valor, em porcentagem.

#### **3.7.2. Dosagem de Hemoglobina total ([Hb])**

A concentração de hemoglobina total ( $[\text{Hb}] = \text{g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ ) foi determinada a partir de amostras de 10  $\mu\text{L}$  de sangue total segundo o método de formação de cianometahemoglobina (reagente de Drabkin) através da adição de ferrocianeto de potássio para a conversão de  $\text{Hb}^{-}\text{-CN}^{-}$ . Após agitação, a solução diluída permaneceu em repouso por 15 minutos para que ocorresse a hemólise. O conteúdo do tubo foi colocado em uma cubeta de acrílico. A leitura foi efetuada em 540 nm em um espectrofotômetro SPECTRONIC GENESYS 5.

#### **3.7.3. Contagem de eritrócitos (RBC)**

Para a contagem de eritrócitos foram utilizados 10  $\mu\text{L}$  de sangue da amostra em 2 mL de solução de citrato formol, e transferido volume adequado para câmara de Neubauer. Os eritrócitos foram contados em cinco grupos de quadrados. O cálculo se dá somando o valor

obtido nessa contagem dos cinco grupos de quadrados multiplicando por 10.000, que resultará em número de eritrócitos por milímetro cúbico.

#### 3.7.4. Volume corpuscular médio (VCM)

O cálculo do volume corpuscular médio foi feito através da seguinte expressão:

$$\text{VCM} = \frac{\text{Hct (\%)} \times 10}{\text{RBC (M/mL)}} = \text{um}^3 \text{ ou fL} \quad \text{M = milhões}$$

#### 3.7.5. Hemoglobina corpuscular média (HCM)

O cálculo da hemoglobina corpuscular média foi feito através da seguinte expressão:

$$\text{HCM} = \frac{\text{Hb (g/dL)} \times 10}{\text{RBC (n/mL)}} = \text{pg/cel}$$

#### 3.7.6. Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

O cálculo da concentração de hemoglobina corpuscular média foi feito através da seguinte expressão:

$$\text{CHCM} = \frac{\text{HCM (pg)}}{\text{VCM (fL)}} \text{ ou } \frac{\text{Hb (g/dL)}}{\text{Hct (\%)}} = \text{pg/fL ou g/dL ou \%}$$

### 3.8. Análise estatística

Os dados de mortalidade dos peixes expostos às concentrações de glifosato no teste de toxicidade aguda foram submetidos à análise de regressão linear  $y = ax \pm b$  e o valor da concentração letal 50% (CL (I) 50-48h) foi estimada pelo método Trimmed Spearman-Kärber Hamilton et al. (1977). Os resultados obtidos da análise da enzima NKA, das enzimas do estresse oxidativo e das variáveis hematológicas foram expressos como a média  $\pm$  o desvio padrão da média (SEM).

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), para avaliar a distribuição normal dos dados e as diferenças significativas entre médias dos grupos experimentais. Para o teste de comparação de médias foi aplicado o teste de comparações múltiplas de DUNNET. O nível de significância aceito foi de 5% ( $P < 0,05$ ) nos testes e as análises foram efetuadas utilizando o programa GraphPad InStat Versão 3.0.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. TOXICIDADE AGUDA

#### 4.1.1. Toxicidade aguda do glifosato na formulação Roundup® Ready para o pacu *Piaractus mesopotamicus*

A relação concentração-mortalidade utilizada na determinação da concentração letal 50% (CL(I) 50;48h) do glifosato (formulação Roundup® Ready) em *P. mesopotamicus* foi estimada em 3,74 mg.L<sup>-1</sup>, com limite inferior de 3,54 mg.L<sup>-1</sup> e limite superior de 3,95 mg.L<sup>-1</sup>. Durante o período de exposição não ocorreu mortalidade no controle. Após 48 horas de exposição, em 3,0 mg.L<sup>-1</sup> não ocorreu mortalidade, em 3,5 mg.L<sup>-1</sup> ocorreu 16,67% de mortalidade, em 4,0 mg.L<sup>-1</sup> ocorreu 56% de mortalidade e em 4,5 mg.L<sup>-1</sup> ocorreu 100% de mortalidade.

Durante a exposição ao glifosato, os sinais de intoxicação mais frequentes apresentados pelos peixes foram agitação e hiperventilação (aumento do batimento opercular) principalmente no início dos testes, mostrando irritabilidade durante a administração do xenobiótico (Tabela 2).

Segundo a classificação de toxicidade aguda para organismos aquáticos de Zucker (1985) o glifosato, na formulação Roundup® Ready, pode ser considerado moderadamente tóxico para o pacu (*P. mesopotamicus*), pois apresentou concentração letal 50% entre 1 e 10 mg.L<sup>-1</sup> (CL 50-48h = 3,74 mg.L<sup>-1</sup>).

#### 4.1.2. Histopatologia, imunohistoquímica e atividade da NKA das brânquias

As brânquias dos animais controle apresentam organização estrutural semelhante à de outros teleósteos. O epitélio do filamento branquial é constituído de 7 a 10 camadas de células, sendo que a mais externa é constituída por células pavimentosas, células de cloreto e mucosas. O epitélio das lamelas é constituído por uma camada de células pavimentosas em contato com o meio aquático e uma camada de células indiferenciadas apoiada na membrana basal e no sistema de células pilares por onde passa o sangue para as troca de gases (Figs. 4A, B e 8A)

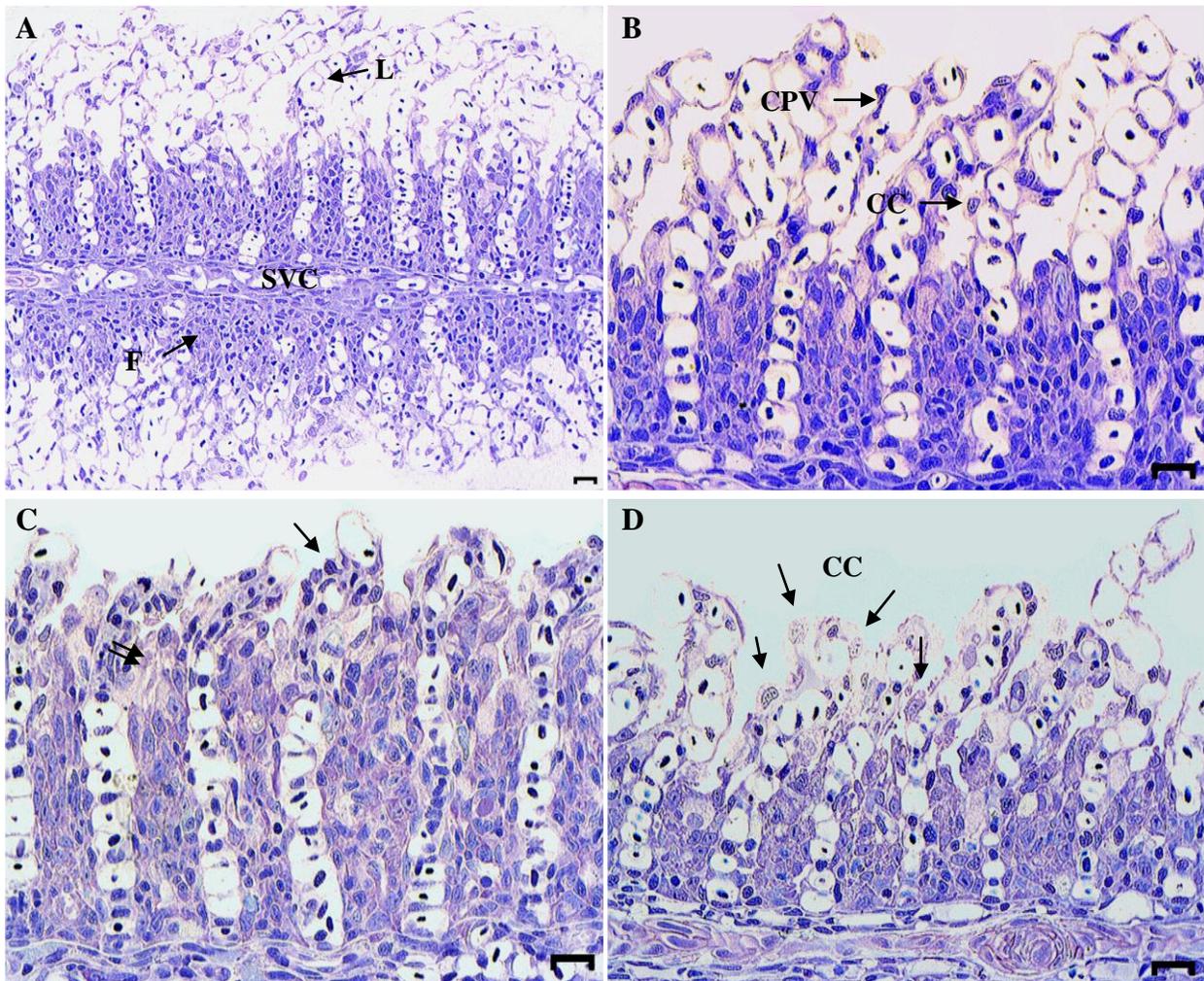
A exposição aguda ao glifosato na formulação Roundup® não causou alterações severas no tecido branquial de *P. mesopotamicus* (Figs. 4C, D). As alterações branquiais mais frequentes foram dilatação do sistema de células pilares e edema em animais expostos a 3,0 mg.L<sup>-1</sup>, hiperplasia do epitélio lamelar e proliferação de células mucosas (CM) em animais expostos a 3,0 e 3,5 mg.L<sup>-1</sup> e hipertrofia do epitélio lamelar em animais expostos a 3,5 e 4,5 mg.L<sup>-1</sup>. Com base na frequência das alterações nas brânquias de pacus submetidos ao ensaio agudo de

toxicidade foi calculado o índice de alterações histopatológicas (IAH), no qual: 0-10: lesões que ainda não afetaram o funcionamento normal do tecido, 11-20: danos leves a moderados do tecido, 21-50: danos moderados a severos no tecido, > 100: danos irreparáveis no tecido. Os índices de alterações histopatológicas (IAH) nas brânquias foram calculados entre 0,29 a 1,06 (Tabela 5) o que indica funcionamento normal do órgão.

As células de cloreto (CC) com imunorreatividade positiva para  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase apareceram distribuídas no epitélio das lamelas e filamentos das brânquias de *P. mesopotamicus* e são mostradas nas Figura 5 A, B. A densidade média de CCs variou de 134 a 1299 nas lamelas e de 41 a 554 nos filamentos dos peixes do controle e não foi alterada significativamente em nenhum tratamento experimental, variando de 664 a 1518 nas lamelas e de 195 a 295 nos filamentos, após exposição ao glifosato (Figura 5 C). A atividade de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial apresentou um aumento médio de 225% nos tratamentos em relação ao controle, porém este aumento não foi significativo (Fig. 6 D).

**Tabela 2.** Sinais de intoxicação de *P. mesopotamicus* submetidos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready, em ensaio de toxicidade aguda.

Sinais de intoxicação	TESTE DE TOXICIDADE AGUDA																								
	3,0 mg.L <sup>-1</sup>						3,5 mg.L <sup>-1</sup>						4,0 mg.L <sup>-1</sup>						4,5 mg.L <sup>-1</sup>						
	Horas de Exposição																								
	3	6	12	24	36	48	3	6	12	24	36	48	3	6	12	24	36	48	3	6	12	24	36	48	
Fundo do aquário	X			X						X							X								
Batimento opercular lento	X			X						X					X										
Agitação	X	X		X	X	X		X	X	X	X									X					
Hiperventilação						X	X		X		X	X	X						X	X					X
Superfície (interface água/ar)																	X			X					
Meio da coluna							X		X						X								X		
Coloração escura															X	X							X	X	
Prolapso labial			X						X														X		
Natação errática										X					X										
Dificuldade de se manter na coluna d'água			X				X		X																
Espasmos							X																		
Perda da capacidade de arfagem																X									
Comportamento letárgico																									

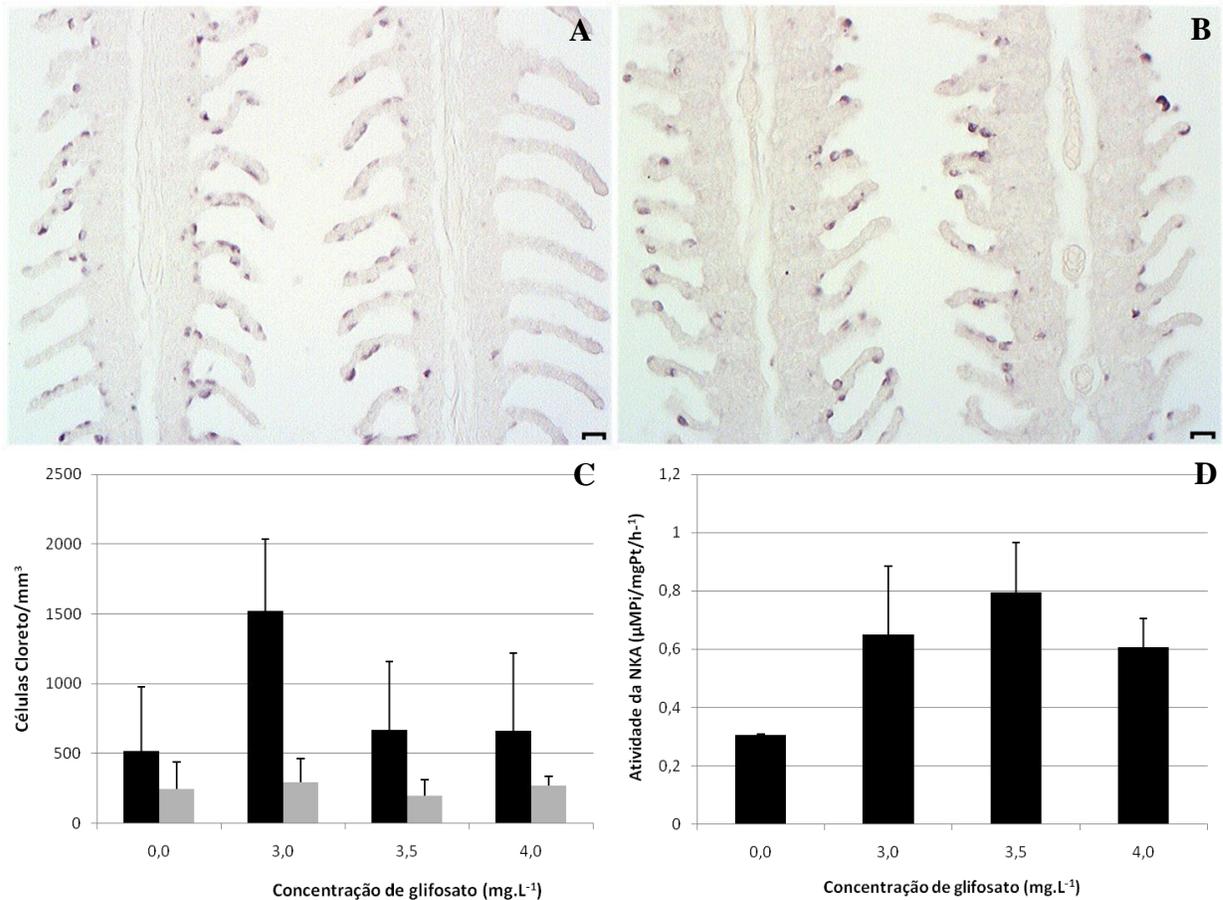


**Figura 4.** Fotomicrografia das brânquias de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) expostos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready durante - CL(I)50;48h. **A)** Controle. Visão panorâmica do filamento branquial (F), lamelas (L) e seio venoso central (SVC). **B)** Controle. Detalhe do epitélio do filamento e lamela mostrando células pavimentosas (CPV), de cloreto (CC). **C e D)** Exposição a  $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$  durante 48h. Note hipertrofia de células pavimentosas (Seta simples) e Hiperplasia do epitélio do filamento (Seta dupla) e **(C)** proliferação de células cloreto em **(D)**. Escala:  $20 \mu\text{m}$ . Coloração: azul de toluidina.

**Tabela 3.** Frequências de alterações encontradas nas brânquias de pacu (*P.mesopotamicus*) submetidos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready, em ensaio de toxicidade aguda.

ESTÁGIO DAS ALTERAÇÕES	LESÕES	Concentração de Glifosato (mg.L <sup>-1</sup> )			
		0	3,0	3,5	4,0
ESTÁGIO I	Hipertrofia do epitélio lamelar	0	0	++	++
	Hiperplasia do epitélio lamelar	0	++	+	0
	Congestão vascular	0	0	0	0
	Dilatação capilar	0	++	0	0
	Descolamento epitelial	0	0	0	0
	Constricção capilar	0	0	0	0
	Proliferação de células cloreto	0	+	+	+
	Proliferação de células mucosas	0	+	+	0
	Fusão das lamelas	0	0	0	0
	Edema	0	+	0	0
ESTÁGIO II	Aneurisma lamelar	0	0	0	0
	Ruptura Epitelial (hemorragia)	0	0	0	0
ESTÁGIO III	Necrose Focal	0	0	0	0
	Necrose Total	0	0	0	0

0 = ausente, + = pouco frequente, ++ = frequente, +++ = muito frequente



**Figura 5. A e B.** Imunohistoquímica contra a enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase para identificação das células de cloreto (CC) nos filamentos e lamelas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) expostos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready, em teste de toxicidade aguda - CL(I)50;48h. **A)** Tratamento controle. **B)** Tratamento exposto ao glifosato. Escala: 20  $\mu\text{m}$ . **C)** Células cloreto/ $\text{mm}^3$  de pacu imunocoradas contra a enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. (barra preta: filamento, barra cinza: lamela); **D)** Atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase em brânquias de pacu [Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média].

#### 4.1.3. Histologia do fígado

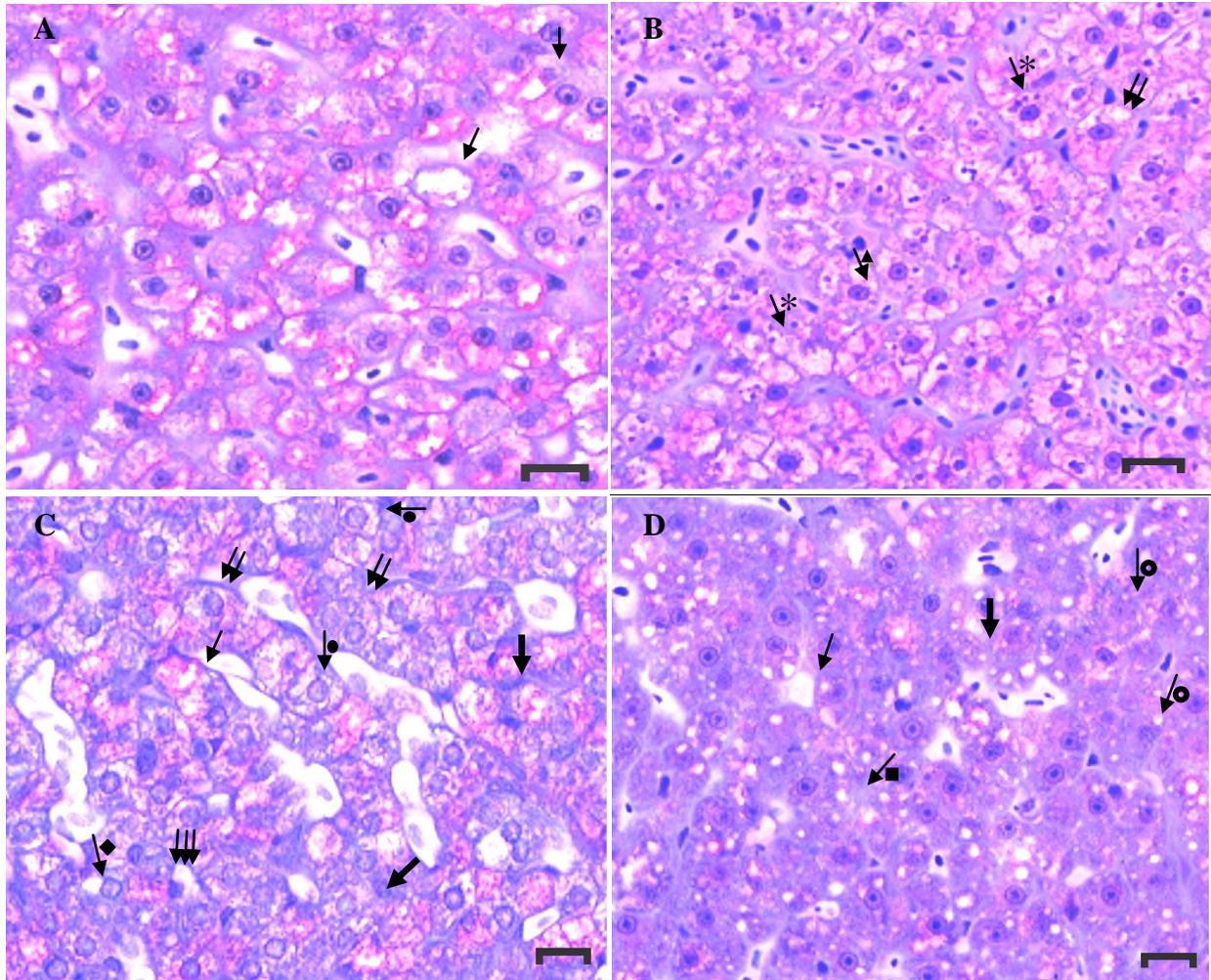
O fígado de peixes é um órgão denso localizado ventralmente na região cranial da cavidade geral. Seu tamanho, forma e volume são adaptados ao espaço disponível entre outros órgãos viscerais (esôfago, estômago, baço e intestino). Ele é constituído por túbulos altamente anastomosados, seu parênquima é homogêneo e os hepatócitos são células com formato hexagonal, o núcleo é esférico, com um nucléolo central e único (MUNSHI e DUTTA, 1996).

O fígado dos peixes controle apresentou organização em arranjo cordonal ao longo dos capilares sinusóides. Os hepatócitos de forma hexagonal, levemente arredondado, com núcleo central. (Figura 6A e 10A).

As alterações histopatológicas no fígado dos peixes do controle do ensaio agudo foram raras, sendo observada apenas vacuolização citoplasmática e grânulos tipo eosinófilos (Fig. 6A). A exposição ao glifosato na formulação Roundup® Ready causou numerosas alterações no tecido hepático que aumentaram em tipo de alterações e frequência com o aumento da concentração de glifosato (Tabela 4, Figura 6). As alterações mais frequentes foram vacuolização citoplasmática (fig. 6A, B, C, D), grânulos citoplasmáticos, hipertrofia celular (Fig. 6B, C), deformação do contorno celular e degeneração celular (Fig. 6C, D), inclusões de lipídios e focos de necrose (Fig. 6D); além de alterações nucleares como deslocamento do núcleo para a periferia da célula (Fig. 6B), deformação do contorno nuclear e ausência de nucléolo e deformação do contorno nuclear (Fig. 6C, D). A ocorrência de lise da membrana celular não permitiu evidenciar a presença da membrana celular em algumas preparações.

As lesões histopatológicas nos peixes expostos às concentrações de 3,5 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> incluíram, ainda, desarranjo dos cordões hepáticos, hipertrofia e atrofia nuclear (Tabela 4, Fig. 6D). A ausência de núcleo ocorreu apenas em animais expostos ao glifosato na concentração de 4,0 mg.L<sup>-1</sup>. Os índices de alterações histopatológicas (IAH) calculados para o fígado em peixes do grupo controle indicou funcionamento normal do órgão (Tabela 5), danos severos a moderados em animais expostos a 3,0 mg L<sup>-1</sup> e severos e irreversíveis em peixes expostos a 3,5 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>.

A Tabela 4 apresenta as frequências das alterações encontradas no fígado dos *P. mesopotamicus* submetidos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready, em testes de toxicidade aguda (CL50-48h).



**Figura 6.** Fotomicrografia de fígado de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) expostos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready em teste de toxicidade aguda. **A)** Controle, hepatócitos hexagonais em arranjo cordonal. **B)** Tratamento 3,0 mg.L<sup>-1</sup>. **C)** Tratamento 3,5 mg.L<sup>-1</sup>. **D)** Tratamento 4,0 mg.L<sup>-1</sup>. Pode se observar a ausência de membrana celular do hepatócito no tratamento com 4,0 mg.L<sup>-1</sup>. Seta simples: vacuolização citoplasmática. Seta com asterisco: grânulos eosinófilos. Seta com triângulo: deslocamento nuclear. Seta dupla: hipertrofia celular. Seta com círculo: hipertrofia nuclear. Seta com quadrado: gordura. Seta longa: degeneração celular. Seta com losango: deformação da parede nuclear. Seta tripla: deformação da parede celular. Seta círculo vazado: foco de necrose. Escala: 20 µm. Coloração: azul de toluidina e fucsina básica.

**Tabela 4.** Frequência de alterações encontradas nos fígados de pacu (*P.mesopotamicus*) submetidos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready, em teste de toxicidade aguda (CL 50-48h).

ESTÁGIO DAS ALTERAÇÕES	LESÕES	Concentração de Glifosato (mg.L <sup>-1</sup> )			
		0	3,0	3,5	4,0
ESTÁGIO I	Hipertrofia nuclear	0	0	+	++
	Hipertrofia celular	0	+	++	+++
	Atrofia nuclear	0	0	+	+
	Atrofia celular	0	0	0	0
	Aumento da frequência do número de vasos	0	0	0	0
	Deformação do contorno nuclear	0	+	++	++
	Deformação do contorno celular	0	+	+++	+++
	Núcleos na periferia da célula	0	+	++	++
	Desarranjo dos cordões hepáticos	0	0	+++	+++
	Presença de melanomacrófagos	0	0	0	0
	Vacuolização citoplasmática	++	+++	++	+++
	Grânulos Eosinófilos	++	+	+	+
	Gordura	+	++	++	+++
ESTÁGIO II	Vacuolização nuclear	0	+	0	+
	Degeneração nuclear	0	+	++	+++
	Degeneração citoplasmática	0	+	+++	+++
	Núcleos Picnóticos	0	0	0	0
	Ausência de nucléolo	0	+	++	+
	Ausência de núcleo	0	0	0	+
	Rompimento celular	0	+	++	+
	Ausência de Membrana Celular	0	++	+++	+++
	Estagnação biliar	0	0	0	0
	Ruptura de vasos	0	0	0	0
Congestão	0	0	0	0	
ESTÁGIO III	Necrose Focal	0	0	+	+
	Necrose Total	0	0	0	0

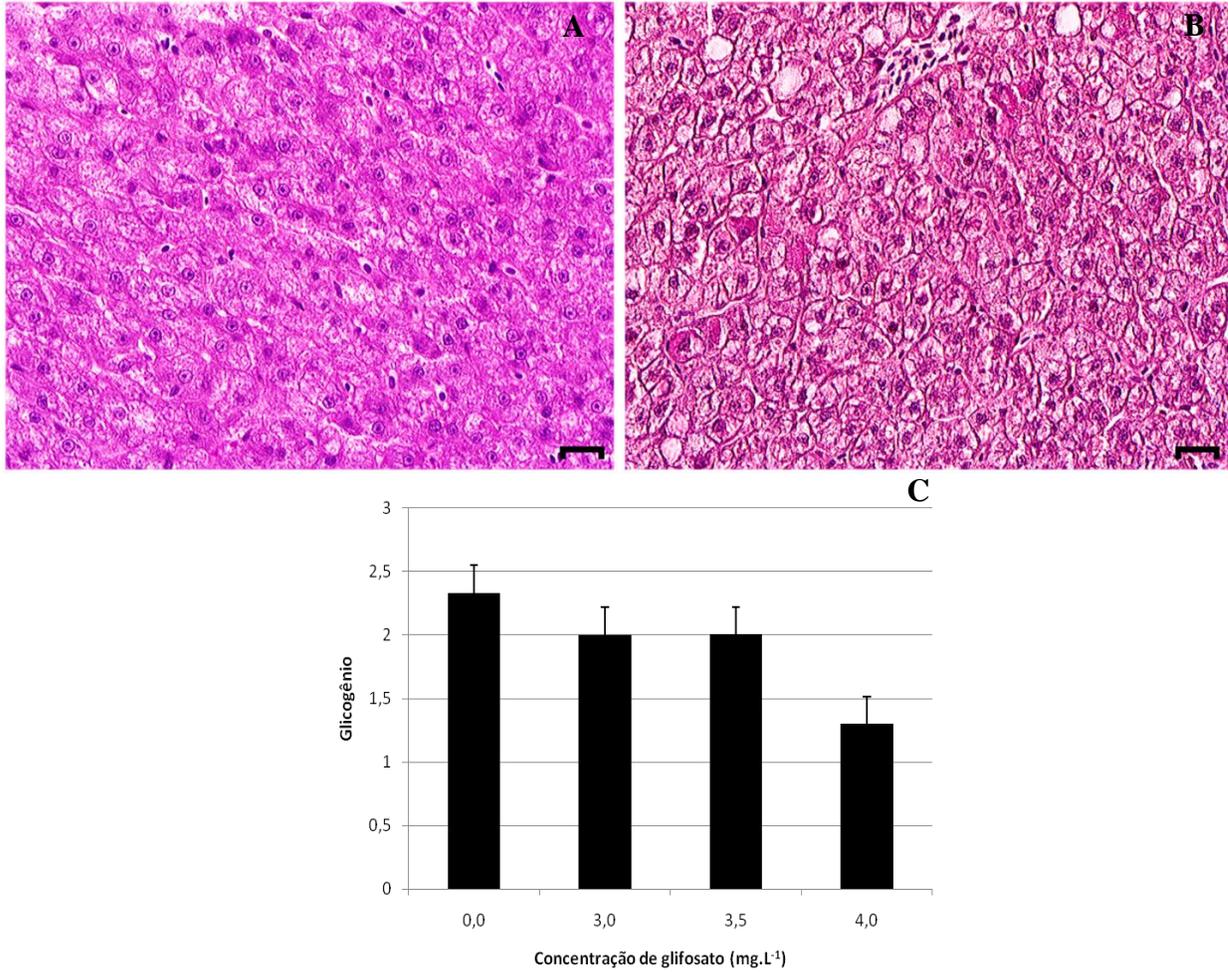
0 = ausente, + = pouco frequente, ++ = frequente, +++ = muito frequente.

Com base na frequência das alterações nos fígados de pacu submetidos ao teste agudo foi calculado o índice de alterações histopatológicas (IAH), no qual: 0-10: lesões que ainda não afetaram o funcionamento normal do tecido, 11-20: danos leves a moderados do tecido, 21-50: danos moderados a severos no tecido, > 100: danos irreparáveis no tecido. Assim, o fígado dos peixes expostos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready, na concentração de 3,0 mg.L<sup>-1</sup> apresentaram danos moderados a severos no tecido e na concentração de 3,5 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> apresentaram danos irreparáveis no tecido (Tabela 5).

**Tabela 5.** Índice de alterações histopatológicas (IAH) de brânquias e fígado de pacu (*P.mesopotamicus*) submetido ao glifosato em teste de toxicidade aguda.

	Concentrações	IAH	
		Brânquias	Fígado
Agudo	Controle	0,29	1,69
	3,0 mg.L <sup>-1</sup>	0,77	22,67
	3,5 mg.L <sup>-1</sup>	1,30	118,34
	4,0 mg.L <sup>-1</sup>	1,06	135,84

A Figura 7 apresenta duas fotos de fígado do pacu, com reação de PAS, representativas do controle (Figura 7A), e um exposto ao glifosato. No teste de toxicidade aguda (CL 50;48h) ocorre uma diminuição da concentração de glicogênio nos animais expostos ao glifosato na formulação Roundup® Ready em relação aos peixes controles.

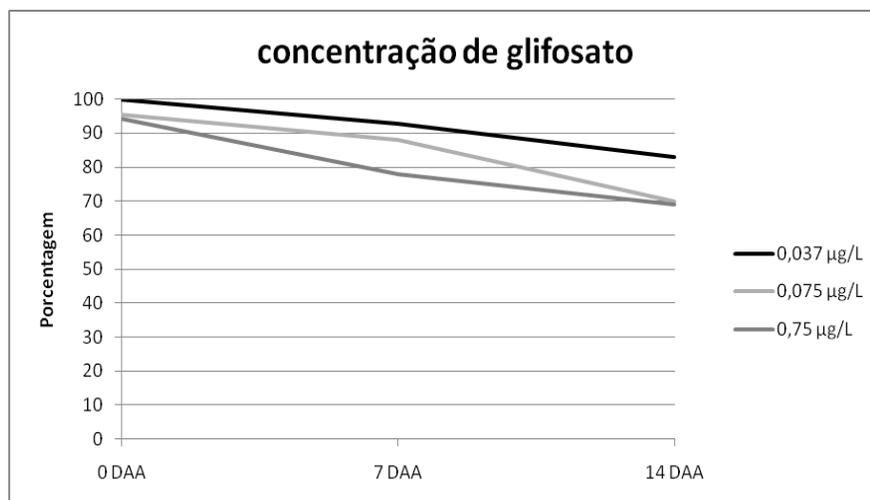


**Figura 7.** Hepatócitos PAS-positivo para o glicogênio em fígado de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) expostos ao glifosato, na formulação Roundup<sup>®</sup> Ready em testes de toxicidade aguda – CL(I)50;48h e crônica (14 dias). **A)** Tratamento controle. **B)** Tratamento exposto ao glifosato. Escala: 20  $\mu$ m. **C).** Hepatócitos PAS-positivo para o glicogênio mostrando intensidade de coloração (unidades arbitrárias) em fígado de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) expostos ao glifosato, na formulação Roundup<sup>®</sup> Ready em testes de toxicidade aguda – CL(I)50;48h.

## 4.2. TOXICIDADE CRÔNICA

### 4.2.1. Degradação do glifosato

Com a finalidade de verificar se a concentração de glifosato foi mantida durante todo o período experimental, foi coletado amostras de água das unidades experimentais ao longo do ensaio de toxicidade crônica. As amostras foram acondicionadas em frascos plásticos e submetidas à análise cromatográfica. Os resultados (Figura 8) comprovam que a concentração de glifosato manteve-se praticamente constante até o término do experimento.



**Figura 8.** Concentração de glifosato durante o período experimental crônico.

### 4.2.2. Variáveis hematológicas e plasmáticas

As variáveis hematológicas de pacu (*P. mesopotamicus*) expostos a concentrações subletais de glifosato durante 14 dias são mostradas na Tabela 6. Os valores de hematócrito (Hct) não variaram significativamente em relação ao controle. A concentração de hemoglobina [Hb] o VCM, HCM e CHCM aumentaram e o RBC diminuiu nos peixes submetidos ao glifosato nas concentrações de 75 µg.L<sup>-1</sup> e 750 µg.L<sup>-1</sup> em relação ao grupo controle.

**Tabela 6.** Médias e desvios-padrão das variáveis hematológicas e dos índices hematimétricos de pacu (*P.mesopotamicus*) submetido ao glifosato em teste de toxicidade crônica.

Variável	Controle	37 µg.L <sup>-1</sup>	75 µg.L <sup>-1</sup>	750 µg.L <sup>-1</sup>
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	7,07 ± 1,12	8,21 ± 1,16	9,07 ± 2,33 *	8,75 ± 0,98
<b>Hematócrito (%)</b>	27,45 ± 2,98	28,25 ± 2,58	29,35 ± 1,35	29,4 ± 1,52
<b>RBC (erit./mm<sup>3</sup>)</b>	124,4 ± 15,20	113,8 ± 16,91	93,65 ± 12,13 *	70,61 ± 19,84 *
<b>VCM (µm<sup>3</sup>)</b>	222,32 ± 24,18	252,59 ± 40,66	318,37 ± 45,1	469,22 ± 219,4 *
<b>HCM (pg.cel<sup>-1</sup>)</b>	57,12 ± 7,98	72,94 ± 11,06	99,66 ± 36,95 *	133,72 ± 40,68 *
<b>CHCM (%)</b>	25,74 ± 2,81	29,08 ± 3,22	30,83 ± 7,31	29,67 ± 3,05 *

O (\*) indica que houve diferença significativa quando comparado ao controle (p<0,05).

As concentrações de íons plasmáticos Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> e osmolalidade plasmática do pacu (Tabela 7) não apresentaram diferença entre os tratamentos, indicando que não houve alteração do equilíbrio iônico dos animais expostos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready, em testes de toxicidade crônica.

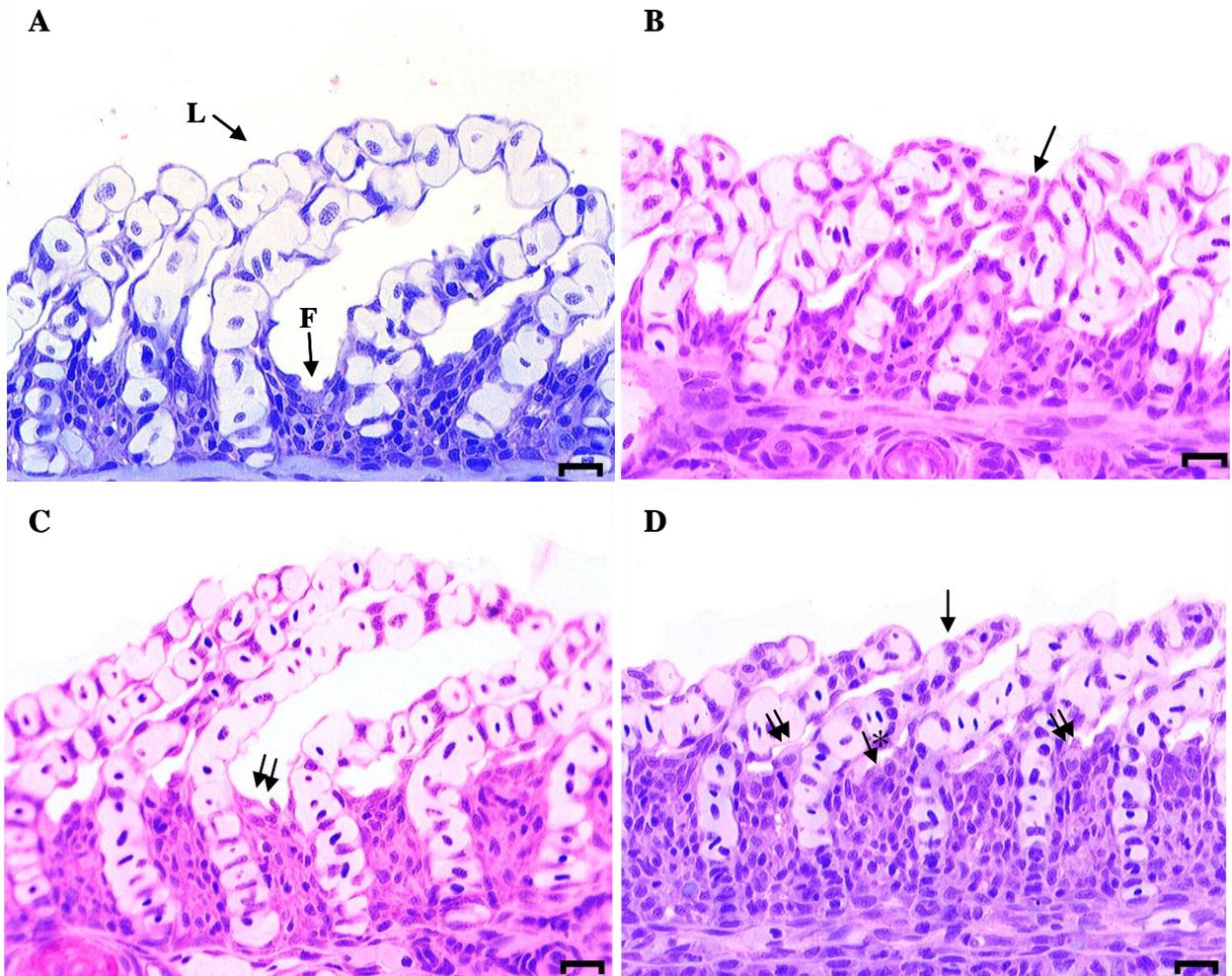
**Tabela 7.** Médias e desvios-padrão da concentração de íons plasmáticos Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> e osmolalidade plasmática de pacu (*P.mesopotamicus*) submetido ao glifosato em teste de toxicidade crônica.

Variável	Controle	37 µg.L <sup>-1</sup>	75 µg.L <sup>-1</sup>	750 µg.L <sup>-1</sup>
<b>Na<sup>+</sup> (mEq/L)</b>	183,1 ± 23,88	204,1 ± 56,09	189,2 ± 42,74	179,33 ± 28,00
<b>K<sup>+</sup> (mEq/L)</b>	4,46 ± 0,74	4,57 ± 1,29	4,38 ± 0,81	4,72 ± 1,08
<b>Cl<sup>-</sup> (mEq/L)</b>	166,6 ± 5,74	159,63 ± 6,76	151,36 ± 14,76	155,42 ± 9,77
<b>Osmolalidade (µOsmol/Kg)</b>	269,22 ± 12,08	265,2 ± 3,08	273 ± 3,08	274,37 ± 10,15

#### 4.2.2. Alterações morfofuncionais em brânquias e fígado

A exposição ao glifosato na formulação Roundup<sup>®</sup> Ready em testes de toxicidade crônica (14 dias) também não causou alterações severas no tecido branquial de *P. mesopotamicus* (Figs. 9 B, C e D). As alterações mais frequentes foram hipertrofia do epitélio lamelar em todas as concentrações utilizadas e hiperplasia do epitélio lamelar nas concentrações de 0,0; 37 e 75  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Também foram observadas dilatação capilar (75  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), descolamento epitelial (75  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e um leve aumento na quantidade de células cloreto (0,0; 75 e 750  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e células mucosas (750  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), porém foram alterações pontuais as quais não danificaram o tecido. Os índices de alterações histopatológicas (IAH) nas brânquias foram calculados entre 0,6 a 2,07 (Tabela 10), o que indica funcionamento normal do órgão.

A densidade média das células de cloreto (CC) com imunorreatividade positiva para  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase variou de 222 a 3575 nas lamelas e de 2970 a 19370 nos filamentos do controle e não foi alterada significativamente em nenhum tratamento, variando de 1328 a 4857 nas lamelas e de 6750 a 9639 nos filamentos após exposição ao glifosato na formulação Roundup<sup>®</sup> Ready durante 14 dias (Figura 10 A). A atividade da NKA dos peixes expostos ao glifosato, em relação ao controle, aumentou em até 135% com o aumento da concentração de glifosato (Figura 10 B). Apesar da correlação ser positiva entre atividade da NKA e concentração de glifosato os valores médios não foram significativos.

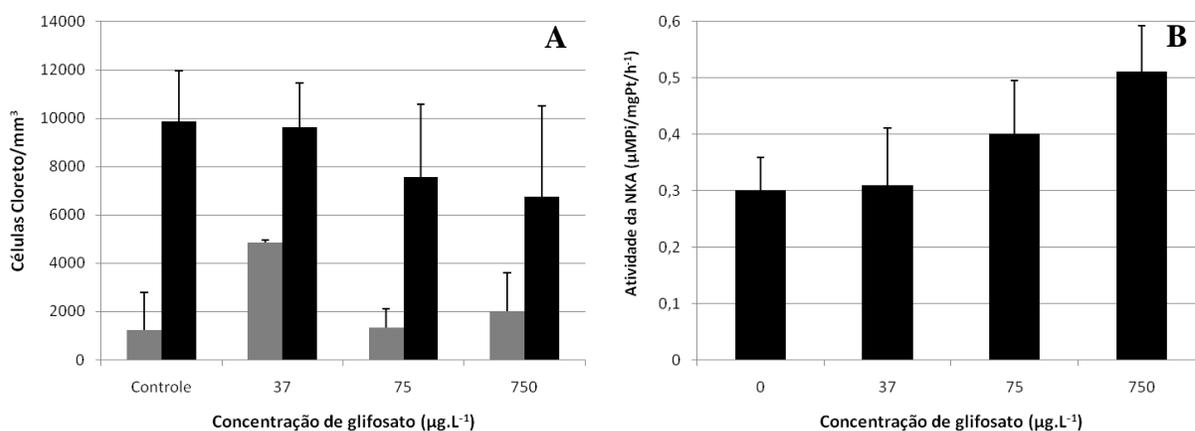


**Figura 9.** Fotomicrografia das brânquias de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) expostos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready durante 14 dias. **A)** Controle. Visão panorâmica do filamento branquial (F) e lamelas (L). **B)** Exposição a  $37 \mu\text{g.L}^{-1}$  (CL 50/100). **C)** Exposição a  $75 \mu\text{g.L}^{-1}$  (CL 50/50). **D)** Exposição a  $750 \mu\text{g.L}^{-1}$  (CL 50/5). Seta simples: hipertrofia de células pavimentosas. Seta com asterisco: hiperplasia do epitélio do filamento. Seta dupla: células cloreto. Escala: 20  $\mu\text{m}$ . Coloração: azul de toluidina.

**Tabela 8.** Frequências de alterações encontradas nas brânquias de pacu (*P.mesopotamicus*) submetidos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready, em teste de toxicidade crônica.

ESTÁGIO DAS ALTERAÇÕES	LESÕES	Concentração de Glifosato ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )			
		0	37	75	750
ESTÁGIO I	Hipertrofia do epitélio lamelar	+	+	+	+++
	Hiperplasia do epitélio lamelar	+	+	+	0
	Congestão vascular	0	0	0	0
	Dilatação capilar	0	0	+	0
	Descolamento epitelial	0	0	+	0
	Constricção capilar	0	0	0	0
	Proliferação de células cloreto	+	0	+	+
	Proliferação de células mucosas	0	0	0	+
	Fusão das lamelas	0	0	0	0
	Edema	0	0	0	0
ESTÁGIO II	Aneurisma lamelar	0	0	0	0
	Ruptura Epitelial (hemorragia)	0	0	0	0
ESTÁGIO III	Necrose Focal	0	0	0	0
	Necrose Total	0	0	0	0

0 = ausente, + = pouco frequente, ++ = frequente, +++ = muito frequente.

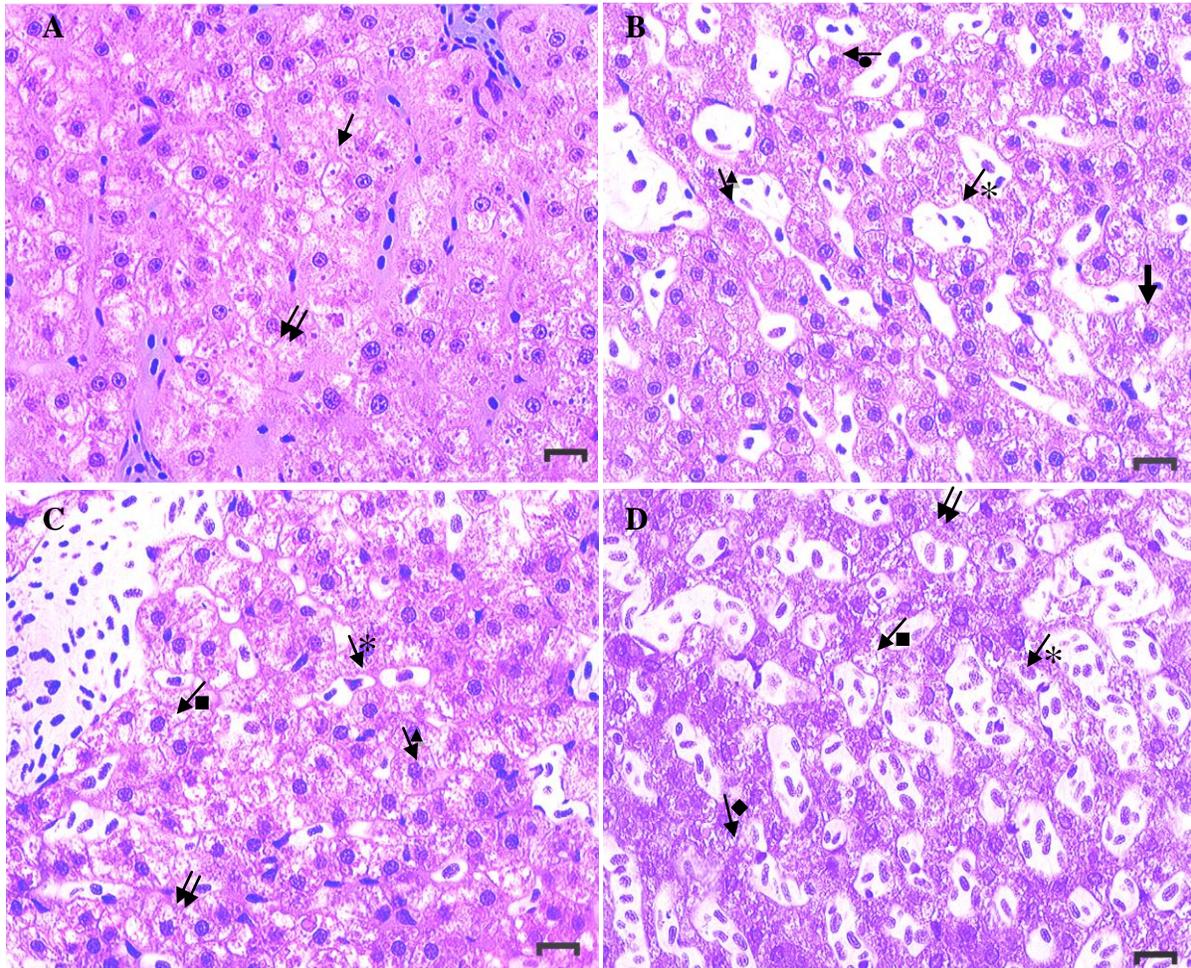


**Figura 10.** A) Células cloreto/mm<sup>3</sup> de pacu, expostos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready, em teste de toxicidade crônica – 14 dias, imunocoradas contra a enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. (barra preta: filamento, barra cinza: lamela); B) Atividade da enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase em brânquias de pacu [Resultados expressos em média  $\pm$  o desvio padrão].

Os fígados dos pacus expostos ao glifosato no ensaio de toxicidade crônica (Figura 11) apresentaram com uma maior representatividade hipertrofia celular e nuclear, aumento da frequência de vasos sanguíneos, deformações de contornos de membranas, núcleos na periferia da célula, vacuolização citoplasmática, grânulos eosinófilos e gordura. As frequências com que apareceram estão representadas na Tabela 9.

As alterações observadas são pouco prejudiciais para o funcionamento do órgão. Outras alterações observadas também foram atrofia celular, desarranjo dos cordões hepáticos, vacuolização nuclear, degeneração nuclear e celular, rompimento celular e em alguns casos não era possível visualizar a delimitação celular. Os índices de alterações histopatológicas (IAH) no fígado foram calculados entre 2,07 a 55,43 (Tabela 10), acarretando, na maior concentração, em danos moderados a severos no tecido.

Não ocorreu diferença na concentração de glicogênio no fígado dos animais expostos ao glifosato por 14 dias (Figura 12).



**Figura 11.** Fotomicrografia de fígado de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) expostos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready em teste de toxicidade crônica – 14 dias. **A)** Controle, hepatócitos hexagonais em arranjo cordonal. **B)** Tratamento 37  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . **C)** Tratamento 75  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . **D)** Tratamento 750  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Seta simples: grânulos eosinófilos. Seta dupla: deformação do contorno celular. Seta com asterisco: Aumento da frequência do número de vasos. Seta com triângulo: hipertrofia celular. Seta longa: deslocamento nuclear. Seta com quadrado: gordura. Seta com círculo: vacuolização citoplasmática. Seta com losango: degeneração citoplasmática. Coloração: azul de toluidina e fucsina básica.

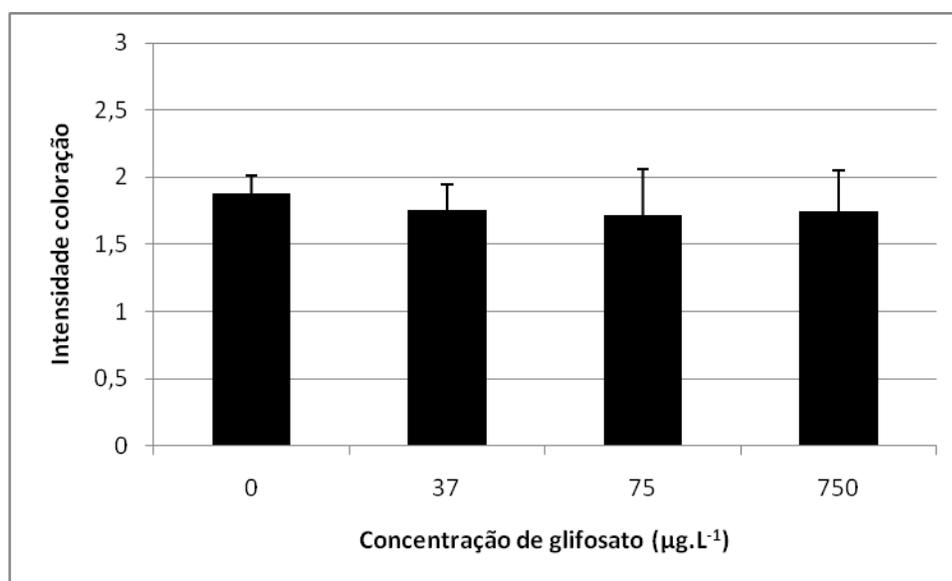
**Tabela 9.** Frequências de alterações encontradas nos fígados de pacu (*P.mesopotamicus*) submetidos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready, em teste de toxicidade crônica.

ESTÁGIO DAS ALTERAÇÕES	LESÕES	Concentração de Glifosato ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )			
		0	37	75	750
ESTÁGIO I	Hipertrofia nuclear	0	+	+	+
	Hipertrofia celular	0	+	++	++
	Atrofia nuclear	0	0	0	0
	Atrofia celular	0	+	0	0
	Aumento da frequência do número de vasos	0	+	++	+++
	Deformação do contorno nuclear	+	0	++	+++
	Deformação do contorno celular	0	0	++	+++
	Núcleos na periferia da célula	0	+	++	++
	Desarranjo dos cordões hepáticos	0	0	+	++
	Presença de melanomacrófagos	0	0	0	0
	Vacuolização citoplasmática	+	+	++	+++
	Grânulos Eosinófilos	+	+	+	+
	Gordura	+	+	++	+++
ESTÁGIO II	Vacuolização nuclear	0	0	+	+
	Degeneração nuclear	0	+	+	++
	Degeneração citoplasmática	0	+	+	+
	Núcleos Picnóticos	0	0	0	0
	Ausência de nucléolo	0	0	0	0
	Ausência de núcleo	0	0	0	0
	Rompimento celular	0	+	+	+
	Ausência de Membrana Celular	0	+	+	+++
	Estagnação biliar	0	0	0	0
	Ruptura de vasos	0	0	0	0
Congestão	0	0	0	0	
ESTÁGIO III	Necrose Focal	0	0	0	0
	Necrose Total	0	0	0	0

0 = ausente, + = pouco frequente, ++ = frequente, +++ = muito frequente.

**Tabela 10.** Índice de alterações histopatológicas (IAH) de brânquias e fígado de pacu (*P.mesopotamicus*) submetido ao glifosato em teste de toxicidade aguda e crônica.

Concentrações	IAH	
	Brânquias	Fígado
Crônico		
Controle	0,95	2,07
37 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,6	16,06
75 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,82	41,64
750 $\mu\text{g.L}^{-1}$	2,07	55,43

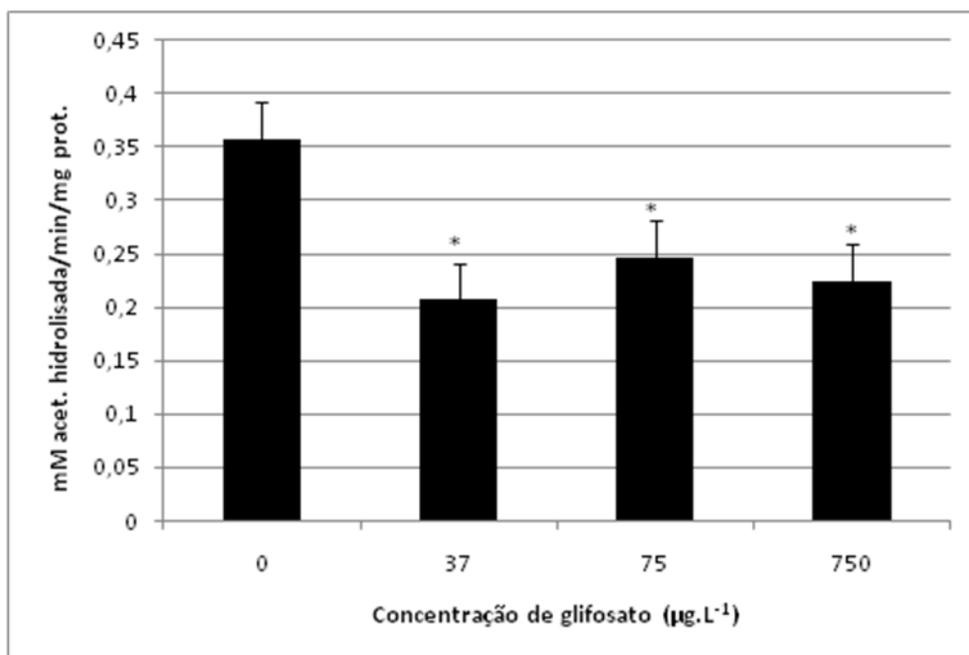


**Figura 12.** Hepatócitos PAS-positivo para o glicogênio mostrando intensidade de coloração (unidades arbitrárias) em fígado de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) expostos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready em testes de toxicidade crônica – 14 dias.

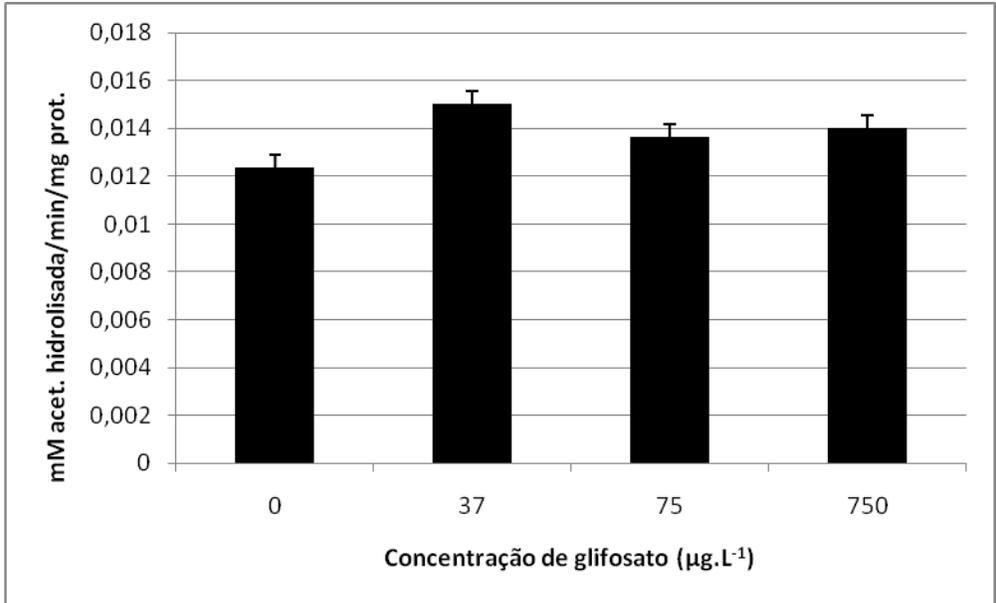
### 4.2.3 Atividade Enzimática

#### 4.2.3.1. Acetilcolinesterase - AChE

Os pacus submetidos ao teste de toxicidade crônica do glifosato, na formulação Roundup<sup>®</sup> Ready, apresentaram redução na atividade específica da AchE cerebral de 42, 31 e 37% , respectivamente nas concentração de 37, 75 e 750  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . A atividade da AchE no músculo branco de pacu não apresentou diferença significativa. As médias e os desvios padrões da atividade específica estão representados nas Figuras 13 e 14.



**Figura 13.** Atividade específica da acetilcolinesterase cerebral de pacu exposto ao glifosato durante teste de toxicidade crônica (14 dias). O (\*) indica diferença significativa quando compara com o controle ( $P < 0,05$ ).

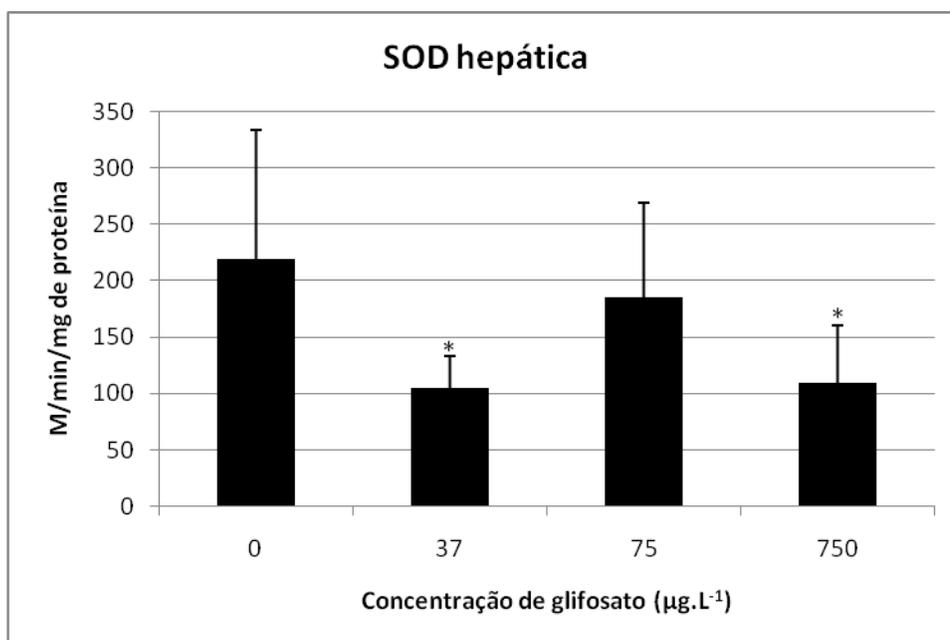


**Figura 14.** Atividade específica da acetilcolinesterase muscular de pacu exposto ao glifosato durante teste de toxicidade crônica (14 dias). O (\*) indica diferença significativa quando compara com o controle ( $P < 0,05$ ).

#### 4.2.3.2. Enzimas antioxidantes hepáticas

##### SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

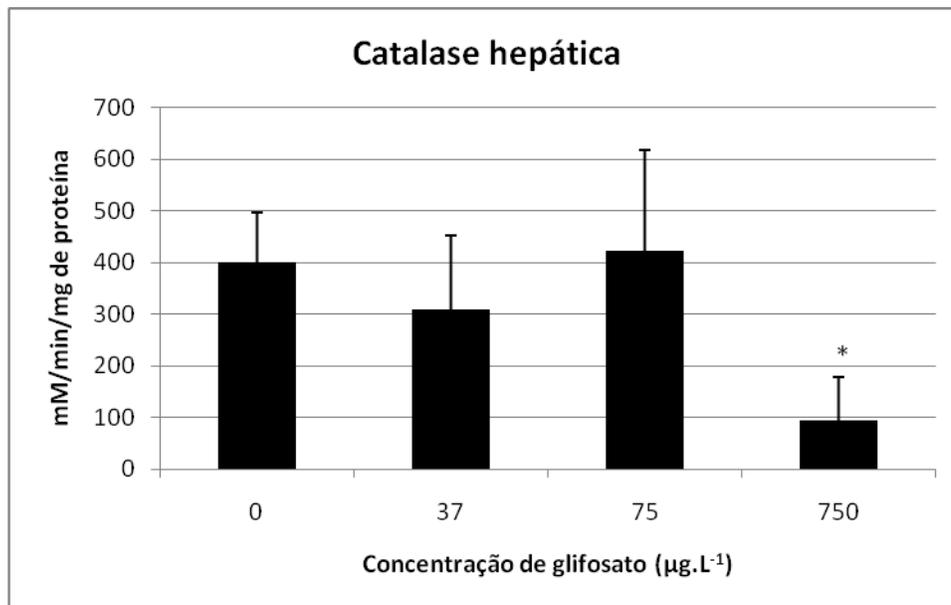
Os tratamentos de 37  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e de 750  $\mu\text{g.L}^{-1}$  apresentaram uma diminuição na atividade específica de SOD hepática de 52% e 50% respectivamente, em relação ao controle. As médias e os desvios padrões da atividade específica estão na Figura 15.



**Figura 15.** Atividade específica da superóxido dismutase hepática de pacu exposto ao glifosato durante teste de toxicidade crônica (14 dias). O (\*) indica diferença significativa quando compara com o controle ( $P < 0,05$ ).

## CATALASE

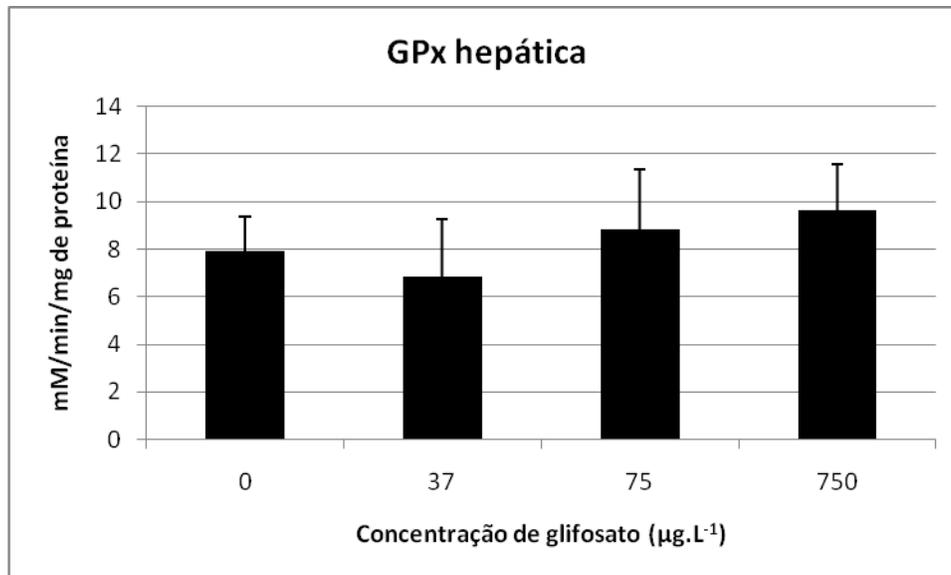
Apenas o tratamento de  $750 \mu\text{g.L}^{-1}$  apresentou uma diminuição significativa na atividade específica da catalase hepática do pacu de 76% em relação ao controle. As médias e os desvios padrões da atividade específica da catalase hepática estão na Figura 16.



**Figura 16.** Atividade específica da catalase hepática de pacu exposto ao glifosato durante teste de toxicidade crônica (14 dias). O (\*) indica diferença significativa quando compara com o controle ( $P < 0,05$ ).

## GLUTATIONA PEROXIDASE

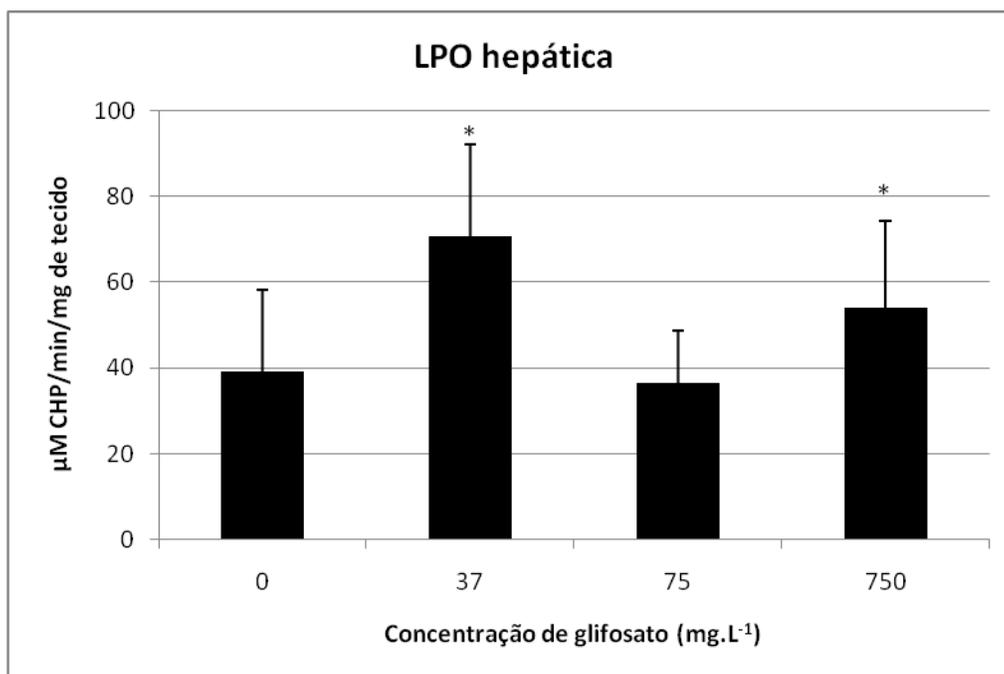
Os valores da atividade específica da glutathiona peroxidase hepática não variou nos pacus expostos ao glifosato no teste de toxicidade crônica. As médias e os desvios padrões da atividade específica da glutathiona peroxidase hepática estão na Figura 17.



**Figura 17.** Atividade específica da glutathiona peroxidase hepática de pacu exposto ao glifosato durante teste de toxicidade crônica (14 dias). O (\*) indica diferença significativa quando compara com o controle ( $P < 0,05$ ).

#### 4.2.2. Lipoperoxidação hepática

Houve um aumento significativo de peroxidação lipídica no fígado de 81% na concentração de  $37\mu\text{g.L}^{-1}$  e de 39% na concentração de  $750\mu\text{g.L}^{-1}$  nos pacus expostos ao glifosato no teste de toxicidade crônica. As médias e os desvios padrões estão apresentados na Figura 18.



**Figura 18.** Concentração de hidroperóxido de cumeno no fígado de pacu exposto ao glifosato durante teste de toxicidade crônica (14 dias). O (\*) indica diferença significativa quando compara com o controle ( $P < 0,05$ ).

## 5. Discussão

A toxicidade do glifosato na formulação Roundup® Ready para o pacu (*P. mesopotamicus*), com concentração letal 50 em 3,74 mg.L<sup>-1</sup>, pode ser considerada moderadamente tóxica (toxicidade entre 1 e 10 mg.L<sup>-1</sup>), segundo a classificação de Zucker (1985), que estabelece classes de toxicidade aguda para organismos aquáticos.

O glifosato na formulação Roundup® Ready é mais tóxico para o pacu que outras formulações comerciais. A CL50 estimada para carpa comum, *Cyprinus carpio* (CL50;48h = 645 mg.L<sup>-1</sup> e CL50;96h = 620 mg.L<sup>-1</sup>) (NESKOVIC et al., 1996), para a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (CL50;96h = 16,8 mg L<sup>-1</sup>; (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2002), para o peixe mosquito, *Gambusia yucatana* (CL50;96h = 17,79 mg.L<sup>-1</sup>) (OSTEN et al., 2005), para o piaçu, *Leporinus macrocephalus* (CL50;96h = 15,18 mg.L<sup>-1</sup>) (ALBINATI et al., 2007) e para o curimatá, *Prochilodus lineatus* (CL50;96h = 13,69 mg.L<sup>-1</sup>) (LANGIANO e MARTINEZ, 2008) expostas a formulação Roundup®; e para o guaru, *Phallocerus caudimaculatus* (CL50;96h > 975 mg.L<sup>-1</sup>) expostos a formulação Rodeo® (SHIOGIRI et al., 2010).

Embora a toxicidade do glifosato deva-se à sensibilidade das diferentes espécies a essa molécula, parte dessa toxicidade pode ser atribuída aos compostos associados (surfactantes) utilizados para aumentar a disponibilidade do herbicida no controle de plantas daninhas (DIAMOND e DURKIN, 1997; AMARANTE et al., 2002; PEIXOTO, 2005), e que podem ser mais tóxicos para outros organismos que o próprio herbicida (GIESY et al., 2000; TSUI e CHU, 2003).

O surfactante polietoxilato de taloamine (POEA) em Roundup® pode ser mais tóxico para peixes que o glifosato (GIESY et al., 2000), o que torna ecologicamente relevante a determinação da toxicidade do glifosato nas diferentes formulações comerciais. O surfactante ou compostos presentes na formulação Roundup® Ready não é ainda divulgado e a autorização para o uso do glifosato nessa formulação, no Brasil, aumenta o risco de contaminação do ambiente aquático em regiões em que a espécie *P. mesopotamicus* é endêmica, uma vez que a concentração letal 50% estimada para essa espécie na formulação Roundup® Ready encontra-se próxima a concentrações ambientalmente realística (3,7 mg glifosato L<sup>-1</sup>) de acordo Giesy et al., (2000) considerando-se a frequência usual de aplicação.

Para Mazon et al. (2002); Cerqueira e Fernandes (2002), Crestani et al. (2007), Mela et al. (2007) a exposição à xenobióticos em geral, causa alterações histopatológicas em brânquias e

fígado que podem afetar a função desses órgãos dependendo da frequência e intensidade das lesões (BERNET et al., 1999).

Absorção de químicos tóxicos pelas brânquias é rápida e, por esse motivo, a resposta tóxica nas brânquias também é rápida (MALLATT, 1985; EVANS, 1987 *apud* PANDEY et al., 2008). Brânquias têm sido frequentemente utilizadas na avaliação de impacto de poluentes aquáticos marinhos bem como habitats de água doce (ATHIKESAVAN et al., 2006; FERNANDES et al., 2007 *apud* PANDEY et al., 2008).

O pacu, *P. mesopotamicus*, expostos ao organofosforado (OP) trichlorfon apresenta hiperplasia, congestão sanguínea e edema (MATAQUEIRO et al. 2009) e quando exposto a outro OP, o Azodrin<sup>®</sup> 400, apresenta descolamento epitelial, deformações e degeneração de células pilares nas lamelas respiratórias levando à formação de espaços sanguíneos irregulares e congestão sanguínea, hiperplasia e fusão lamelar (RUDNICKI et al., 2009).

Estudos efetuados com glifosato têm evidenciado hiperplasia epitelial, edema, infiltração de leucócitos, hipertrofia das células-cloreto nas brânquias de carpa (*Cyprinus carpio*) (NESKOVIC et al. 1996) e proliferação do epitélio do filamento, hipertrofia e fusão lamelar e aneurisma nas brânquias de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (JIRAUNGKOORSKUL et al. 2002), porém neste estudo o glifosato causou apenas alterações que não comprometem o funcionamento do órgão, como hiperplasia e hipertrofia, indicando que o Roundup<sup>®</sup> Ready, nas concentrações utilizadas afetam pouco as brânquias.

Considerando-se que as concentrações do teste agudo as quais os pacus foram expostos ao Roundup<sup>®</sup> Ready são próximas a CL50;48h, as brânquias exibiram poucas alterações histopatológicas sugerindo que essa espécie apresenta uma capacidade de adaptação frente ao glifosato e compostos associados na formulação estudada. As alterações mais frequentes encontradas nas brânquias de *P. mesopotamicus* expostos as diferentes concentrações de glifosato (3,0, 3,5, e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>) evidenciaram as denominadas respostas de defesa caracterizadas por hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar, edema e proliferação de células mucosas conforme o descrito por Mallat, (1985) e Cerqueira e Fernandes, (2002). Pois a hiperplasia e a hipertrofia das lamelas aumentam a barreira água-sangue e conseqüentemente, a distância de difusão até o sangue, dificultando a absorção dos agentes tóxicos. A proliferação de células mucosas pode resultar em aumento na produção e liberação de muco, o qual também auxilia na prevenção da absorção do tóxico pelas brânquias. No entanto, essas alterações dificultam as trocas gasosas.

As alterações, após exposição crônica, em que predominou a hiperplasia e hipertrofia do epitélio lamelar evidencia também respostas de defesa. O fato das brânquias desses animais apresentarem menor número de alterações e também menos severas que a dos animais submetidos aos testes de toxicidade aguda é devido às menores concentrações utilizadas nos ensaios crônicos e também o período de exposição mais longo (14 dias) pode possibilitar recuperação das estruturas branquiais.

As brânquias de bagre quando expostas ao inseticida organoclorado endosulfan apresentaram edema com levantamento do epitélio lamelar e hiperplasia do epitélio lamelar. Estas alterações resultaram em aumento estatisticamente significativo da distância de difusão respiratória (NOWAK, 1992).

A exposição de *P. mesopotamicus* ao glifosato na formulação Roundup® Ready, nos ensaios de toxicidade aguda e crônica não alterou a atividade da NKA evidenciando que o glifosato não compromete essa enzima. A concentração dos íons plasmáticos também não foi alterada, sugerindo que a homeostasia iônica e osmótica foi mantida durante o período experimental. O mesmo foi observado em *Prochilodus lineatus* quando exposto ao Roundup® (LANGIANO e MARTINEZ, 2008).

As células de cloreto estão diretamente relacionadas à absorção de íons em peixes de água doce (PERRY, 1997) e muitos herbicidas afetam a atividade dessas células. A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NKA) é uma enzima de membrana altamente conservada, essencial para a homeostase iônica a níveis de célula e organismo (DANG et al., 2000). Essa enzima está diretamente relacionada ao transporte ativo de eletrólitos através das brânquias (PARVEZ et al., 2006). Os xenobióticos podem alterar a atividade da NKA devido a interrupção de energia produzida pelas vias metálicas ou interagindo diretamente com a enzima (WATSON e BEAMISH, 1980). Redução da atividade da enzima NKA foi observada nas brânquias de salmão (*Salmo salar*) exposto a concentrações de 2,0; 5,0 e 10,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de atrazina (WARING e MOORE, 2004). Ünner et al. (2005) observaram aumento da atividade da NKA em brânquias de tilápia (*Oreochromis niloticus*) quando expostas ao organofluorado etoxazole.

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima do processo de transmissão do impulso nervoso, hidrolisando a acetilcolina em acetato e colina. Vários contaminantes podem acarretar alterações na atividade da AChE (FERRARI et al., 2007). Estudos mostraram que formulações contendo glifosato podem inibir a atividade da AChE em peixes (GLUCZAK et al., 2006;

MODESTO e MARTINEZ, 2010). A determinação da AChE é normalmente feita nos tecidos de cérebro e músculo porque o sistema neuromuscular de peixes é principalmente colinérgico e sua atividade é essencial para o seu funcionamento normal (PAYNE et al., 1996). Inibição da AChE em cérebro produz alterações no comportamento e na hiperestimulação das fibras de músculo, o que pode causar tetania, paralisia e morte (KIRBY et al., 2000). A AChE cerebral em peixes tem sido estudada em maior profundidade do que a AChE muscular (FERRARI et al., 2007).

Neste estudo, os pacus submetidos ao glifosato, na formulação Roundup® Ready, em teste de toxicidade crônica, apresentaram redução significativa da atividade de AChE cerebral. Tal diferença não foi observada no músculo branco. Modesto e Martinez (2010), observaram inibição da atividade da AChE cerebral e muscular em *Prochilodus lineatus* quando expostos ao glifosato, na formulação Roundup® Transorb. Rao (2006) também observou uma inibição da atividade da AChE cerebral, branquial e muscular em tilápia (*Oreochromis mossambicus*) expostas ao inseticida organofosforado RPR-II (2-butenóico ácido-3-(dióxido de fosfina tioil) metil éster). Silva et al. (1993) também observaram inibição da atividade da AChE em *Callichthys callichthys* expostos a doses sub-letais de metil paration (Folidol 600).

A exposição de organismos a xenobióticos pode levar a um desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e pró-oxidantes, com o predomínio destes últimos (SIES, 1991). Esse processo ou situação pode dar início ao estresse oxidativo nos sistemas biológicos, representado por peroxidação de lipídeos insaturados das membranas celulares, danos a proteínas e DNA, que podem levar a alteração da expressão gênica e alterações nas atividades de enzimas antioxidantes, receptores e transportadores de membrana. Todos estes processos, quando não reparados ou evitados, alteram a funcionalidade das células, tecidos e órgãos, e podem culminar em danos irreparáveis que podem levar o organismo à morte (SALVI et al., 2001; VALAVANIDIS, 2006; CORTELLA, 2010).

O fígado é o principal órgão de desintoxicação do organismo e apresenta alta atividade enzimática. Este recebe um alto aporte de sangue e é um dos primeiros órgãos a ser afetados pelos contaminantes na água. Ele realiza várias funções associadas ao metabolismo de xenobióticos em peixes (JIMENEZ e STEGMAN, 1990).

A catalase é responsável pela remoção do hidróxido de hidrogênio, o qual é metabolizado em O<sub>2</sub> e água (VAN DER OOST et al., 2003). Essa remoção é importante para evitar o aparecimento do radical altamente reativo OH•, que pode causar sérios danos ao DNA, enzimas e

membranas (CORTELLA, 2010). A CAT e a SOD hepática, neste estudo, apresentaram uma diminuição da atividade quando comparados com o controle. Essa inibição pode ter sido devido a um possível aumento na concentração de radicais superóxido na célula, pois tais radicais são capazes de inibir estas enzimas e também a glutathiona peroxidase (KONO e FRIDOVICH, 1982) e, em consequência, pode gerar uma alta quantidade de peróxido de hidrogênio. Langiano e Martinez (2008) não observaram alterações da atividade da CAT em fígado de *Prochilodus lineatus* ao final da exposição de 96 h ao Roundup<sup>®</sup>. O mesmo foi observado para *Rhamdia quelen* também exposta ao Roundup<sup>®</sup>, em exposição de 96 h (GLUSCZAK, 2007) e igualmente em outro estudo, também utilizando a *R. quelen* e o Roundup<sup>®</sup>, em exposição de 8 dias (MENEZES, 2010).

A glutathiona peroxidase é uma das enzimas chave para a manutenção do equilíbrio redox do organismo. Sendo assim, uma alta atividade desta enzima pode conferir uma proteção mais eficaz contra peróxidos gerados em condições oxidantes (DANTAS, 2010). Neste estudo, o pacu exposto ao glifosato durante o teste crônico não apresentou diferença significativa na atividade da GPx, quando comparado ao grupo controle o que pode sugerir novamente que, essa espécie apresenta uma capacidade de adaptação frente ao glifosato, concordando com Moes (2010) o pacu possui alta atividade de GPx sobre o peróxido de hidrogênio nas frações mitocondriais e microsossomais hepáticas sugerindo que essa espécie adquiriu ao longo de sua história evolutiva adaptações bioquímicas que o tornaram capaz de suportar o estresse oxidativo.

Modesto e Martinez (2010), estudando o Roundup<sup>®</sup> observaram uma redução da atividade da SOD e GPx e a atividade da CAT permaneceu sem alteração em fígado de *Prochilodus lineatus*. O mesmo peixe quando exposto ao Roundup<sup>®</sup> Transorb, apresentou uma redução da atividade da SOD da CAT e um aumento da atividade da GPx.

O fígado é o principal órgão de desintoxicação de xenobióticos e apresentou inúmeras alterações durante a exposição aguda resultando em danos moderados a severos e irreparáveis que podem comprometer a função do órgão. A hipertrofia dos hepatócitos e hipertrofia nuclear, em geral, indicam aumento da atividade celular, enquanto que, vacuolização citoplasmática e acúmulo de lipídios sugerem alterações na função hepática (TAKASHIMA e HIBYIA, 1995). Deformação da parede celular e nuclear, ausência de nucléolo e de parede celular, frequentemente observadas em *P. mesopotamicus*, indicam início de processo de necrose que também alteram a função metabólica dos hepatócitos por efeito direto do poluente (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2002).

Os danos moderados a severos, mas sem a ocorrência de danos irreparáveis no tecido hepático após exposição a concentrações mais baixas por longo período sugere que nessas concentrações possivelmente o fígado metaboliza o xenobiótico e reduz os danos teciduais. A principal alteração observada e que diferencia da exposição aguda foi o aumento da frequência do número e dilatação de vasos sanguíneos observado no fígado sugere uma resposta associada a uma maior metabolização do xenobiótico, uma vez que ele é transportado pelo sangue e permite uma adaptação àquelas condições ao longo dos 14 dias de exposição.

As alterações histopatológicas também são observadas no fígado de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2002, 2003) e de *Prochilodus lineatus* (LANGIANO e MARTINEZ, 2008) após exposição aguda e crônica a concentrações sub-letais de Roundup<sup>®</sup>, além de alterações ultraestruturais no fígado de *C. carpio* (SZAREK et al., 2000). Em outro estudo sobre o glifosato, com bagre africano (*Clarias gariepinus*) em teste de toxicidade aguda, foi relatado degeneração lipídica, vacuolização lipídica severa, necrose hepática difusa e necrose nuclear caracterizada por pequenos pontos escurecidos no núcleo, além de infiltração por leucócitos (AYOOLA, 2008). O fígado de pacu, quando exposto ao trichlorfon em teste de toxicidade aguda, apresenta perda da forma normal, deslocamento nuclear, fusão celular, núcleos picnóticos, células necróticas e células hipertrofiadas (Mataqueiro et al., 2009). *Cyprinus caprio*, quando exposto ao glifosato em teste de toxicidade crônica (14 dias), apresentou alterações focais no fígado (NESKOVIC et al., 1996).

Rodrigues e Fanta (1998) sugerem ainda que exista uma sequência temporal das alterações morfológicas em fígado que começam com a descentralização de alguns núcleos de hepatócitos e o aumento da granulação de seu citoplasma, seguido por vacuolização, pigmentação intensa do citoplasma, necrose, invasão de macrófagos e aumento dos canalículos.

A diminuição do glicogênio nos animais expostos ao Roundup<sup>®</sup> Ready, durante o teste de toxicidade aguda, em relação ao tratamento controle evidencia a ocorrência do consumo de glicogênio possivelmente devido à mobilização de energia pelo animal para o processo de desintoxicação e/ou restauração de tecidos lesados enquanto que após exposição crônica a não diferença quanto à concentração de glicogênio no fígado pode estar relacionada ao fato deles terem sido alimentados durante a exposição e/ou uma menor demanda energética associada à desintoxificação e restauração dos tecidos. Além do fato dos efeitos dos herbicidas sobre os peixes

variarem de acordo com a espécie, estágio de crescimento, com o produto, concentração do produto e tempo de exposição (GLUSCZAK et al., 2007).

Em um estudo sobre o organofosforado Dimethoate 500 utilizando o *Danio rerio* observou-se que esses peixes apresentaram mudanças morfológicas nos hepatócitos quando expostos durante 24 horas à dose subletal de  $0,025\mu\text{l.L}^{-1}$  do xenobiótico, em testes agudos. Oito horas depois da exposição, foi observada uma alta densidade de células com granulação do citoplasma, assim como necrose focal. A principal mudança que ocorreu nas primeiras 24 horas de exposição foi a perda do típico formato poligonal da célula e da detecção dos limites celulares, migração lateral do núcleo, forma e tamanho nuclear, condensação da cromatina e picnose, aumento da granulação citoplasmática seguida por vacuolização (RODRIGUES e FANTA, 1998).

Mudanças no fígado afetam diretamente o metabolismo do peixe diminuindo assim sua capacidade de sobrevivência. Assim, com a saúde debilitada eles podem ser facilmente predados, terão menor capacidade reprodutiva e podem perder a competição por espaço e alimento (RODRIGUES e FANTA, 1998).

As avaliações hematológicas em peixes ajudam a estimar os efeitos de produtos tóxicos na água e demais alterações ambientais. Estas avaliações podem, da mesma forma, ser úteis para monitorar a saúde do peixe (CLAUSS et al., 2008). Como as alterações hematológicas provocadas por estressores já estão bem documentadas em peixes (SWIFT, 1981; ROCHE e BOCHÉ, 2000), a hematologia tornou-se uma ferramenta útil no diagnóstico de perturbações homeostáticas (FELDMAN et al., 2000).

Nesse experimento, foi observado um aumento no VCM que pode ser devido à entrada de água nos eritrócitos. Apesar da diminuição no RBC, o Hct não se alterou apresentando apenas um ligeiro aumento. Apesar da água não apresentar teores baixos de oxigênio, o peixe apresentou quadro de hipoxemia, observado pelo aumento da concentração de hemoglobina, que pode aumentar a captura dessa molécula pelo eritrócito e também pelo comportamento do animal em que alguns apresentaram prolapso labial e muitas vezes, busca de oxigênio na interface água/ar. Embora tenham ocorrido alterações hematológicas, o mesmo não foi observado nos íons plasmáticos, alterações estas que também não foram observadas em *Prochilodus lineatus* quando exposto ao Roundup® (LANGIANO e MARTINEZ, 2008). Também em *Prochilodus lineatus*, o diflubenzuron causou a redução do número de eritrócitos e conteúdo de hemoglobina após 96 horas de exposição, provavelmente devido à hemólise (MADUENHO e MARTINEZ, 2008).

Diferentemente do observado nesse estudo, Gluszczak et al., 2006 observaram uma diminuição no hematócrito, número de eritrócitos e hemoglobina de *Leporinus obtusidens* expostos ao Roundup<sup>®</sup> Original por 96 h. E *Prochilodus lineatus* quando expostos ao glifosato, na formulação Roundup<sup>®</sup> Transorb apresentou um aumento no hematócrito e no número de eritrócitos (MODESTO e MARTINEZ, 2010).

## 6. Conclusão

Em conclusão, os resultados do presente trabalho evidenciam que o glifosato na formulação Roundup® Ready para *P. mesopotamicus* é moderadamente tóxico.

A indução de alterações histopatológicas no fígado, durante a exposição aguda, indica alterações na função hepática as quais podem comprometer o processo de desintoxicação e reparo do tecido, podendo levar o animal à morte.

As alterações branquiais evidenciaram uma adaptação do organismo para evitar a entrada do xenobiótico no animal.

O Roundup® Ready reduz a atividade da AChE em *P. mesopotamicus*. As alterações enzimáticas observadas nos peixes submetidos ao teste de toxicidade crônica não comprometem a sobrevivência do animal, porém em situações ambientais, na qual existem outros xenobióticos e patógenos, ele está mais propenso a lesões e danos referente a contaminações, pois seu mecanismo de defesa pode estar comprometido.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088** Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes, 2006. 19p.
- ADAMS, S.M.; SHUGART, L.R.; SOUTHWORTH, G.R.; HINTON, D.E. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: MCCARTHY, J.F. & SHUGART, L.R. (eds.) **Biomarkers of environmental contamination**, Boca Raton, Lewis Publishers, p. 333-353, 1990.
- AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 19 dez 2008.
- AHLERS, J. RIEDHAMMER, C. VOGLIANO, M. EBERT, R.U. KUHNE, R. SCHUURMANN, G. Acute to chronic ratios in aquatic toxicity - Variation across trophic levels and relationship with chemical structure. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 25, n. 11, p. 2937-2945, 2006.
- AHMAD, I. HAMID, T. FATIMA, M. CHAND, H.S. JAIN, S.K. ATHAR M., RAISUDDIN, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure, **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1523, pp. 37-48, 2000.
- 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*). **Ver. Bras. Saúde Pro. An.** v. 8, p. 184-192, 2007.
- AMARANTE Jr, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quim. Nova.** v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.
- ANTHONY, E. H. The oxygen capacity of goldfish (*Canrassius auratus* L.) blood in relation to thermal environment. **J.exp.Biol.**, 38: 93-107, 1961.
- ATHIKESAVAN, S., VINCENT, S., AMBROSE, T., VELMURUGAN, B. Nickel induced histopathological changes in the different tissues of freshwater fish, *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes), **J. Environ. Biol.** v. 27, p. 391-395, 2006.
- AYOOLA, S.O. Histopathological Effects of Glyphosate on Juvenile African Catfish (*Clarias gariepinus*). **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.**, 4 (3): 362-367, 2008
- BABATUNDE, M.M.; OLADIMEJJ, A.A.; BALOGUN, J.K. Acute toxicity of gramoxone to *Oreochromis niloticus* (Trewavas) in Nigeria. **Water. Air. Soil. Pollut.** v. 131, p. 1-10, 2001.
- BANERJEE, S., HOMECHAUDHRI, S., Hematological monitoring of a bioindicator fish, *Heteropneustes fossilis*, on exposure to copper toxicity. **Israel J. Aquacult, Bamiggeh**, 46-51, 1990.
- BARRETO, T.R. Alterações morfofuncionais e metabólicas no teleósteo de água doce matrinxã, *Brycon cephalus* (GÜNTHER, 1869) exposto ao organofosforado metil paration (Folisuper 600 BR®). DISSERTAÇÃO (MESTRADO). UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, 79p. 2006.
- BEGUM, G. Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (linn) and recovery response. **Aquat. Toxicol.** n. 66, p. 83-92, 2004.
- BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P., WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **J. of Fish Diseases**, 22, 25-34, 1999.
- CARVALHO, W. F. (1994). Técnicas médicas de hematologia e Imunohematologia. **COOPMED**. 6. ed., p. 140.

- CERQUEIRA, C.C.C., FERNANDES, M.N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish, *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, 52: 83-91, 2002.
- CLAUSS, T.M., DOVE, A.D.M., ARNOLD, J.E. Hematologic disorders of fish. **Vet. Clin. Exot. Anim.**, v.11, p. 445-462, 2008.
- CONNERS, D.E. & BLACK, M.C. Evaluation of lethality and genotoxicity in the freshwater mussel *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae) exposed singly and in combination to chemicals used in lawn care. **Arch. of Environ. Contam. and Toxicol.** 46, 362–371, 2004.
- CORTELLA, L.R.X.C. (2010) Estresse oxidativo em matrinxã, (*Brycon amazonicus*, Spix & Agassiz, 1829, Characidae) exposto ao inseticida piretroide Keshet®. São Carlos. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, 98p.
- COSTA, O.T.F., PEDRETTI, A.C.E., SCHMITZ, A., PERRY, S.F., FERNANDES, M.N. Stereological estimation of surface area and barrier thickness of fish gills in vertical sections. **J. Microscopy**. v. 225, p. 1-9, 2007.
- CRESTANI, M., MENEZES, C., GLUSCZAK, L., MIRON, D.S., SPANEVELLO, R., SILVEIRA, A., GONÇALVES, F.F., ZANELLA, R., LORO, V.L. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. **Chemosphere**. v. 67, p. 2305-231, 2007.
- CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Disponível em < <http://www.ctnbio.gov.br/>> .Acesso em: 19 dez 2008.
- DANG, Z., LOCK, R.A.C., FLICK, G., WENDELAAR BONGA, S. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase immunoreactivity in branchial chloride of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. **J. Exp. Biol.** v. 20, p. 370–387, 2000.
- DANTAS, R.F. (2010) Glutathione peroxidase e estresse oxidante em pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). Rio de Janeiro. Tese (Doutorado) – Universidade do estado do Rio de Janeiro, 101p.
- DEYNZE, A.V., PUTNAM, D.H., ORLOFF, S., LANINI, T., CANEVARI, M., VARGAS, R., HEMBREE, K., MUELLER, S., TEUBER, L. Roundup Ready alfa: An emerging technology. UC, Peer, Reviewed. p. 12, 2004.
- DIAMOND, G. L.; DURKIN, P. R. Effects of surfactants on the toxicity of Glyphosate, with specific reference to Rodeo. RUBIN, L. **Syrac. Environ. Res. Assoc.**, Inc. Riverdale. Sera. p. 32, 1997.
- EDDY, F.B.; MORGAN, R.I.G. Some effects of carbon dioxide on the blood of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. **J. Fish. Biol.** v. 1, p. 361-72, 1969.
- ENOMOTO, Y.. On some notes about the fluctuations of the blood leucocyte numbers of culture fish. **Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.** p. 137-77, 1969.
- EVANS, D.H. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants, **Environ. Health Perspect.** v.71, p.47–58, 1987.
- FAO/WHO. **Pesticide residues in food – 1986. Evaluations. Part I – residues.** Food and Agriculture Organization of the United Nations, Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. Rome, 1986.
- FARGASOVA, A. Comparative study of plant growth hormone (herbicide) toxicity in various biological subjects. **Ecotoxicol. Environ. Safety**. v. 29, p. 359-364, 1994.
- FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, N.C. SHALM, O.W. (eds) **Shalm's veterinary hematology**. 5ª edição ed: Wiley-Blackwell, cap. 174: Hematology of fish, p. 1120-1125, 2000.

- FERNANDES, M.N. & MAZON, A.F. Environmental Pollution and Fish Gill Morphology, p. 203-231. In **Fish Adaptations** (Val. A. L., Kapoor, B. G. ,eds.) Science Publishers, Inc. Enfield, USA, p.422, 2003.
- FERNANDES, M.N., MORON, S.E., SAKURAGUI, M.M. Gill morphological adjustments to environment and the gas exchange function, p. 93-120. In: Fish Respiration and Environment (Fernandes, M.N., Glass, M.L., Rantin, F.T., Kapoor, B.G., eds.). **Science Publishers**, Enfield, USA, p. 392, 2007.
- FERRARI, A., VENTURINO, A., PÉCHEN de D'ANGELO, A. Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus Mykiss*. **Comp. Biochem. Physiol.** 146C, p. 308-313, 2007.
- FERREIRA, C.M. Avaliação da toxicidade do cobre e do uso de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) como animais sentinelas. São Paulo: 2002. 109p. [Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Univ. São Paulo].
- FRANZ, J.E MAO, M.K. SIKORSKI, J.A. GLYPHOSATE: A unique global herbicide. ACS monograph 189. **American Chem. Soc.** Washington, DC. p.163-175, 1997.
- GARDNER, G.R.; YEVICH, P.P., Histological and hematological responses of an stuarine teleost to Cadmiun. **J.Fish.Res.Bd.Can.** p. 2185-96.1970
- GIESY, J.P., DOBSON, S., SOLOMON, K. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.** v. 167, p. 35-120, 70p, 2000.
- GLUSCZAK, L., MIRON, D.S., CRESTANI, M., FONSECA, M.B., PEDRON, F.A., DUARTE, M.F., VIEIRA, V.L.P., Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and embolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 2006.
- GLUSCZAK, L., MIRON, D.S., MORAES, B.S., SIMÕES, R.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*) **Comp. Biochem. and Physiol.** Part C, v. 146, p. 519–524, 2007.
- GÓMEZ, L., MASOT, J., MARTINEZ, S., DURÁN, E., SOLER, F., RONCERO, V. Acute 2,4-D poisoning in tech (*Tinca tinca* L.): Lesions in hamotopoietic portion of the kigney. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v. 35, p. 479-483, 1998.
- GOUVÊA, S. P. (2004) O papel dos polissacarídeos algais extracelulares na dinâmica de metais no reservatório de Barra Bonita. São Carlos. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, 97p.
- GUERESCHI, R. M. (2004) Macroinvertebrados bentônicos em córregos da Estação Ecológica de Jataí, Luiz Antônio, SP: subsídios para monitoramento ambiental. São Carlos. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, 82p.
- HAMILTON, M.A. RUSSO, R.C. THURSTON, V. Trimed Sperman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicology bioassays. **Environ. Scien. Technol.**, v. 7, p.714-719, 1977.
- HENRY, C.J., HIGGINS, K.F., BUHL, K.J. Acute toxicity and hazard assessment of rodeo®, X-77 spreader® and chem-trol® to aquatic invertebrates. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v. 27, p. 392-399, 1994.
- HEATH, A.G. **Water Pollution and Fish Physiology**, 2nd ed. Lewis Publishers, Boca Raton, 1995.

- HOUSTON, A. H. Variations in the blood and tissues chemistry of brook trout, *Salvelinus fontinalis*, subsequent to handling, anesthesia and surgery. **J.Fish.Res.Bd. Can.** p. 635-42, 1971.
- HUGGET, R.J., KIMERLE, R.A., MEHRLE Jr., P.M. et al. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of antropogenic stress. p. 155-209, 1992.
- HUGHES ,G.M. Morphometrics of gills. **Respir. Physiol.**v.14, p. 1- 25, 1972.
- JIANG, Z.Y., WOOLLARD, A.C.S., WOLF, S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange – Comparison with TBA assay and on iodometric method. *Lipids*, v. 26, p. 853-856, 1992.
- JIMENEZ, B.D., STEGMAN, J Detoxification enzymes as indicators of environmental stress on fish. In: Biological indicators of stress in fish. **Am. Fish Symp.** v. 8, p. 67–79, 1990.
- 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.** v. 28, p. 121-127, 2002.
- JIRAUNGKOORSKUL, W., UPATHAM, E.S., KRUATRACHUE, M., SHAPHONG, S., VICHASRI-GRAMS, S., POKETHITIYOOK, P. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environ. Toxicol.** v. 18, p. 260–267, 2003.
- KIRBY, M.F., MORRIS, S., HURST, M., KIRBY, S.J., NEALL, P., TYLOR, T., FAGG, A. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. **Mar. Poll. Bull.** v. 40, p. 780–791, 2000.
- KOLPIN, D.W., THURMAN, E.M., LEE, E.A., MEYER, M.T., FRLONG, E.T. & GLASSMEYER, S.T. Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. **Sci. of the Total Environ.** v. 354, p. 191–197, 2006.
- KONO, Y., FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. **J. Biol. Chem.** v. 257, p. 5751–5754, 1982.
- KREUTZ, L.C., BARCELLOS, L.J.G., SILVA, T.O., ANZILIERO, D., MARTINS, D., LORENSEN, M., MARTENINGHE, A., SILVA, L.B., Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. **Ciê. Rural**, v.38, n.4, p.1050-1055, 2008.
- KRUGER, N.J The Bradford method of protein quantification. **Meth. Mol. Biol.**, v. 32, p. 9-15, 1994
- LACKNER, R. “Oxidative stress” in fish by environmental pollutants. In: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (Eds), **Fish Ecotoxicol.** Basel: Birkhäuser Verlag. p. 203-224, 1998
- LANGIANO, V.C., MARTINEZ, C.B.R., Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comp. Biochem. and Physiol.** Part C, v. 147, p. 222–231, 2008.
- LAURENT, P., DUNEL-ERB, S. Morphology of gill epithelia in fish. **Am. Physiol. Soc.** v. 7, p. 147-159, 1980.
- LEITCH, J.M., YICK, P.J., CULOTTA, V.C. The right to choose: multiple pathways for activating copper, zinc superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.** v. 284 (37), p. 24679-83, 2009.
- LIVINGSTONE, D.R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 120A, p. 43-49, 1998.
- LOMBARDI, J.V. Fundamentos de toxicologia aquática. In: **Sanidade de organismos aquáticos.** Org. RANZANI-PAIVA, M.J.T. TAKEMOTO, R.M., 2004.

- MAC KIN, J.M.;CHRISTENSE, G.M.; HUNT, E.P. Changes in the blood of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) after short-term and long-term exposure to copper. **J. Fish.Res.Bd.Can.**, 1883-9, 1970.
- MALLAT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. **Can. J. Fish Aquat. Sci.** v. 42, p. 630- 648, 1985.
- MATAQUEIRO, M.I., NAKAGHI, L.S.O., SOUZA, J.P., CRUZ, C., OLIVEIRA, G.H., URBINATI, E.C. Histopathological changes in the gill, liver and kidney of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) exposed to various concentrations of trichlorfon. **J. Appl. Ichthyol.** v. 25, p. 124–127, 2009.
- MAZON, A.F., CERQUEIRA, C.C.C. & FERNANDES, M.N. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fishg, *Prochilodus scrofa*. **Environ. Res.** **88A**, 52-63, 2002.
- MELA, M., RANDI, M.A.F., VENTURA, D.F., CARVALHO, C.E.V., PELLETIER, E., OLIVEIRA RIBEIRO C.A. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicol. and Environ. Saf.** v.68, p.426–435, 2007.
- MENEZES, C.C. (2010) Parâmentos de estresse oxidativo em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a formulações comerciais dos herbicidas glifosato e clomazone. Santa Maria. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, 86p.
- MODESTO, K.A.; MARTINEZ, C.B.R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in musche and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, p. 294-299, 2010.
- MOES, A.P.C. (2010) Atividade de glutationa peroxidase em frações mitocondriais e microsossomais hepáticas de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). Rio de Janeiro. Tese (Mestrado) – Universidade do estado do Rio de Janeiro, 41p.
- MONSANTO **Roundup Ready soybeans: Food & feed safety**. 2005. www.farmsourse.com
- MONTEIRO, D.A., ALMEIDA, J.A., RANTIN, F.T., KALININ, A.L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorous insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 143, p. 141-149, 2006.
- MORON, S.E., OBA, E. T., ANDRADE, C.A., FERNANDES, M.N. Chloride cells responses to ion chanlenge in two tropical freshwater fish, the erythrinids *Hoplias malabaricus* and *Hoplerythrinus unitaeniatus*. **J. Exp. Zool.** v. 278A, p. 93-104, 2003.
- MURTY, A.S. **Toxicology of pesticide to fish**. Boca Raton, Editora: CRC Press. v. 1, 129p, 1988.
- NEDELKOSKA, T.V., LOW, G.K.C. High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. **Analyt. Chim. Acta.** v. 511, p. 145-153, 2004.
- NESKOVIC, N.K., POLEKSIC, V., ELEZOVIC, I., KARAN, V., BUDIMIR, M. Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v. 56, p. 295-302, 1996.
- NOWAK, B. Histological changes in gills induced by residues of endossulfan. **Aquat. Toxicol.** v. 23, p. 65–84, 1992.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., SCHATZMANN, M., SILVA DE ASSIS, H.C., SILVA, P.H., PELLETIER, E., AKAISHI, F.M. Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 51, p. 161–167, 2002.

- OMOREGIE , E. ESEYIN, T.G. OFOJEKWU, P.C. Chronic effects of formalin on erythrocyte counts and plasma glucose of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Asian Fish. Sci.**, v. 7, p. 1-6, 1994.
- OSTEN, J.R.; ORTÍZ-ARANA, A.; GUILHERMINO, L.; SOARES, A.M.V.M. *In vivo* evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides. **Chemosphere**, v. 58, p. 627-636, 2005.
- PAYNE, J.F., MATHIEU, A., MELVIN, W., FANCEY, L.L. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Mar. Pollut. Bull.** v. 32, p. 225–231, 1996.
- PARMA de CROUX, M.J.; LOTESE, A.; CAZENAVE, J. Inhibition of plasma cholinesterase and acute toxicity of monocrotophos in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 69, p. 356-363, 2002.
- PARVEZ, S., SAYEED, I., RAISUDDIN, S. Decreased gill ATPase activities in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to diluted paper mill effluent. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 65, p. 62–66, 2006.
- PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere**. v. 61, p. 1115–1122, 2005.
- PEREZ, G.L., TORREMORELL, A., MUGNI, H., RODRIGUEZ, P., SOLANGE VERA, M., DO NASCIMENTO, M., ALLENDE, L., BUSTINGORRY, J., ESCARAY, R., FERRARO, M., IZAGUIRRE, I. Effects of the herbicide roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. **Ecol. Applicat.** v. 17, p. 2310–2322, 2007.
- PERRY, S. F. The chloride cell: Structure and Function in the Gills of Freshwater Fishes. **Annu. Rev. Physiol.** v. 59, p. 325–47, 1997.
- PICKFORD, G. E.; SRIVASTAVA, A. K.; SLICHER, A. M.; PANG, P.K.T. The stress response in the abundance of circulating leucocytes in the killifish *Fundulus heteroclitus*. I. the cold-shock sequence and the effects of hypophysectomy. **J.exp. Zool.** p. 89-96, 1971
- PITELLI, R.A. Macrófitas aquáticas no Brasil na condição de problemáticas. In: BRASIL (MMA/IBAMA), **Workshop sobre Controle de Plantas Aquáticas**, Brasília, Anais. p. 12-15, 1998.
- POLEKSIC, V., MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish* (R. MuKiller and R. Lloyd, Eds.). **Cambridge Univ. Press**, Cambridge, UK. pp. 339-352, 1994.
- QUABIUS, E. S., BALM, P. H. M., WENDELAAR BONGA, S. E. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 108, p. 472 – 482, 1997.
- RAO, J.V. Sublethal effects of an organophosphorus insecticide (RPR-II) on biochemical parameters of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Comp. Biochem. and Physiol.** Part C, v. 143, p. 492–498, 2006.
- RAND, G. M. and PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and Applications**. Washington, Hemisphere Publishing, 666p, 1985.
- RELYEA, R.A. The lethal impacts of roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. **Arch. of Environ. Toxicol. and Chem.** v. 48, p. 351–357, 2005b.
- ROCHE, H., BOGÉ, G. *In vivo* effects of phenolic compounds on blood parameters of a marine fish (*Dicentrarchus labrax*). **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 125, p. 345-353, 2000.

- RODRIGUES, E.L., FANTA, E., Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimetoato 500. **Rev. Bras. Zool.** v. 15, p. 441-450, 1998.
- ROMÃO, S.; DONATTI, L.; FREITAS, O.M.; TEIXEIRA, J. & KUSMA, J. Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of *Hoplias malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*. **Braz. Arch. of Biol. and Technol.** v. 49, p. 441-448, 2006.
- RUAS, C.B.G., CARVALHO, C.S., ARAÚJO, H.S.S., ESPÍNDOLA, E.L.G., FERNANDES, M.N. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a polluted river. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 71, p. 86-93, 2008.
- RUDNICKI, C.A.M., MELO, G.C., DONATTI, L., KAWALL, H.G, FANTA, E. Gills of Juvenile Fish *Piaractus mesopotamicus* as Histological Biomarkers for Experimental Sub-lethal Contamination with the Organophosphorus Azodrin®400. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 52, n. 6, p. 1431-1441, 2009.
- SAKURAGUI, M.M., SANCHES, J.R., FERNANDES, M.N. Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias malabaricus*. **J. Comp. Physiol. B**, **173** (4): 309-317, 2003.
- SALVI, A., CARRUPT, P.A., TILLEMENT, J.P., TESTA, B. Structural damage to proteins caused by free radicals: assessment, protection by antioxidants and influence of protein binding. **Biochem. Pharmacol.** v. 61, p. 1237-1242, 2000.
- SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Braz. J. of Med. and Biol. Res.** v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.
- SHIOGIRI, N.S., CARRASCHI, S.P., CUBO, P., SCHIAVETTI, B.L., CRUZ, C., PITELLI, R.A. Ecotoxicity of glyphosate and aterbane® br surfactant on guaru (*Phalloceros caudimaculatus*). **Acta Sci. Biological Sci.** v. 32, n. 3, p. 285-289, 2010.
- SIEMERING, G.S., HAYWORTH, J.D. & GREENFIELD, B.K. Assessment of potential aquatic herbicide impacts to California aquatic ecosystems. **Arch. of Environ. Contam. and Toxicol.** p. 55, v. 415-431, 2008.
- SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **Am. J. of Med.** v. 91, n. 3, p. 213-219, 1993.
- SILVA, A.J. (1985) Aspectos da alimentação do pacu adulto, *Colossoma mitrei* (Berg, 1895) (Pisces, Characidae) no pantanal de Mato Grosso. Rio de Janeiro. Dissertação (UFRJ-Mestrado-Zoologia). 92p.
- SILVA, H.C., MEDINA, H.G.S., FANTA, E., BACILA, M. Sub-lethal effects of the organophosphate Folidol 600 (methyl parathion) on *Callichthys callichthys* (Pisces, Teleostei). **Comp. Biochem. Physiol. C** 105, p. 197-201, 1993.
- SOLVIO, A.; WESTMAN, K. Notes on hematocrit determinations on rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Aquacult.**, Amsterdam, v. 2, p. 31-5, 1973.
- SOUTHORN, P.; POWIS, G. Free radicals in medicine. **I. Chemical nature and biological reactions**, Mayo Clin. Proc. 63, pp. 390-408, 1988.
- ROCHE, H., BOGÉ, G. In vivo effects of phenolic compounds on blood parameters of a marine fish (*Dicentrarchus labrax*). **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 125, p. 345-353, 2000.
- SZAREK, J., SIWICK, A., ANDRZEJEWSKA, A., TERECH-MAJEWSKA, E., BANASZKIEWICS, T. Effects of the herbicide Roundup™ on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). **Mar. Environ. Res.** v. 50, p. 236-266.
- TAKASHIMA, F., HIBIYA, T. An Atlas of Fish Histology. **Normal and Pathol. Feat.** second ed. Kodansha Ltd., Tokyo, 1995.

- TSUI, M.T.K., CHU, L.M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere.**, v. 52, p. 1189–1197, 2003.
- ÜNER, N.; ORUÇ, E.; SEVGILER, Y. Oxidative stress-related and ATPase effects of etoxazole in different tissues of *Oreochromis niloticus*. **Environ Toxicol Pharm**, v. 20, p. 99-106, 2005.
- VALAVANIDIS, A., VLAHOGIANNI, T., DASSENAKIS, M., SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicol. and Environ. Saf.** v. 64, p. 178-189, 2006.
- VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxicol. and Pharmacol.** v. 13, p. 57-149, 2003.
- VERMEULEN, N.P.E. Role of metabolism in chemical toxicity. In: Ioannides, C. (Ed.), Cytochromes P450: Metabolical and toxicological aspects. **CRC Press**, Boca Raton, FL, USA, p. 29-53, 1996.
- WARING, C.P., MOORE, A., 2004. The effect of atrazine on Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in fresh water and after sea water transfer. **Aqua. Toxicol.** v. 66, n. 1, p. 93-104
- WATSON, T.A., BEAMISH, F.W.H. Effects of zinc on branchial ATPase activity in vivo in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 66, p. 77–82, 1980.
- WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiol.Ver.** p. 591-625, 1997.
- WILHELM FILHO, D. Fish antioxidant defenses – A comparative approach. **Braz. J. of Med. and Biol. Res.** v. 29, p. 1735-1742, 1996.
- WONG, P.K. Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. **Chemosphere.** v. 41, p. 177-182, 2000.
- ZAGATTO, P.A. e BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. São Carlos: Editora Rima. 464 p, 2006.
- ZUCKER, E. Hazard evaluation division. Standard evaluation procedure. Acute toxicity test for freshwater fish. USEPA publication 540/9-85-006, Washington, 17p. 1985. Disponível em:<[www.epa.gov](http://www.epa.gov)>. Acesso em: 18 de março de 2005.