

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM
***Lophiosilurus alexandri* EXPOSTOS AO GLIFOSATO**

STELLA RUBIM DE SOUSA

Belo Horizonte

2017

STELLA RUBIM DE SOUSA

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM
***Lophiosilurus alexandri* EXPOSTOS AO GLIFOSATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Ambiência e etologia na Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Kleber Campos Miranda Filho

Coorientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Rodrigues

Belo Horizonte

2017

DISSERTAÇÃO defendida e aprovada em 17 de fevereiro de 2017 pela Comissão Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Kleber Campos Miranda Filho
(Orientador)

Prof^a. Dr^a. Gisele Cristina Favero

Prof. Dr. Benito Soto Blanco

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, irmãos e demais familiares, por todo o apoio e incentivo à vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo quem tem me proporcionado, e por sempre me mostrar os melhores caminhos a seguir.

À minha família, por todo amor, incentivo, compreensão, e conselhos.

Ao professor Dr. Kleber Campos Miranda Filho, pela orientação, confiança, paciência, incentivo e auxílio em todos os momentos em que precisei para realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Luciano dos Santos Rodrigues, pela coorientação, amizade, e por toda a sua disposição a ajudar sempre no que for preciso.

À equipe do laboratório de maricultura, pela amizade e trabalho em conjunto.

Aos alunos Franklin, Renata e Ricardo, pela participação direta no trabalho, disposição, responsabilidade e dedicação nos períodos de execução dos experimentos.

Ao professor Ronald Kennedy Luz, pela colaboração e conselhos.

Ao professor Hélio Chiarini, pelo auxílio e repasse de técnicas da microscopia eletrônica de varredura.

Aos professores Marília e Benito, pelos auxílios e troca de informações importantes de toxicologia.

Ao Fabiano Aurélio, pelas análises realizadas no Laboratório de Pesticidas (LANAGRO).

Aos técnicos de Laboratório do LAQUA e da histologia do Hospital Veterinário, por toda ajuda.

Ao José Antônio e Luanna Neves, pela amizade e troca de conhecimento.

A todos os amigos do LAQUA, por proporcionar momentos felizes, mesmo em períodos difíceis.

À FAPEMIG pela concessão de bolsa de mestrado.

Muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|--|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. | REVISÃO DE LITERATURA | 14 |
| 2.1. | Herbicidas na prática agrícola..... | 14 |
| 2.2. | Persistência do glifosato no meio ambiente e formas de contaminação em corpos aquáticos..... | 17 |
| 2.3. | Testes de toxicidade..... | 19 |
| 2.4. | Fígado e brânquias de peixe como biomarcadores histológicos..... | 20 |
| 2.5. | Pacamã (<i>Lophiosilurus alexandri</i>)..... | 26 |
| 3. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 28 |
| 4. | OBJETIVO | 38 |
| 4.1. | Objetivo geral..... | 38 |
| 4.2. | Objetivos específicos..... | 38 |
| 5. | ARTIGO: Alterações histológicas em <i>Lophiosilurus alexandri</i> expostos ao glifosato | 38 |
| | RESUMO..... | 38 |
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 39 |
| 2. | MATERIAL E MÉTODOS..... | 41 |
| 2.1. | Produto Químico..... | 41 |
| 2.2. | Local de experimento e animais-teste..... | 41 |
| 2.3. | Qualidade da água..... | 41 |
| 2.4. | Testes de toxicidade aguda..... | 42 |
| 2.5. | Teste de toxicidade subcrônica..... | 43 |
| 2.6. | Histologia..... | 43 |
| 2.7. | Análise estatística e tratamento de dados..... | 45 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3. | RESULTADOS..... | 46 |
| 3.1. | Qualidade de água..... | 46 |
| 3.2. | Toxicidade aguda de glifosato para formas jovens de pacamã e estudo histológico..... | 47 |
| 3.3. | Toxicidade subcrônica de glifosato em juvenis (20 g) histologia de brânquias e fígado..... | 53 |
| 4. | DISCUSSÃO..... | 58 |
| 5. | CONCLUSÃO..... | 67 |
| 6. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 68 |
| 6. | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 75 |

LISTA DE TABELAS

- Artigo: Alterações histológicas em *Lophiosilurus alexandri* expostos ao glifosato**
- Tabela 1 – Lesões do tecido branquial e seus respectivos estágios quanto ao grau de lesões..... 44
- Tabela 2 – Lesões do tecido hepático e seus respectivos estágios quanto ao grau de lesões..... 45
- Tabela 3 – Valores médios (\pm desvio padrão) de variáveis de qualidade de água durante o período de 96 h de exposição de juvenis de *Lophiosilurus alexandri* (0,05 g) a diferentes concentrações de Glifosato (Roundup®)..... 46
- Tabela 4 – Valores médios (\pm desvio padrão) de variáveis de qualidade de água durante o período de 96 h de exposição de juvenis de *Lophiosilurus alexandri* (4,0 g) a diferentes concentrações de Glifosato (Roundup®)..... 47
- Tabela 5 – Valores médios (\pm desvio padrão) de variáveis de qualidade de água durante o período de 96 h de exposição de juvenis de *Lophiosilurus alexandri* (20,0 g) a diferentes concentrações de Glifosato (Roundup®)..... 47
- Tabela 6 – Valores estimados das concentrações letais medianas (CL₅₀) e nível de segurança do teste de toxicidade aguda para juvenis (0,05 g) de *Lophiosilurus alexandri* expostos ao glifosato..... 48
- Tabela 7 – Valores médios de DTC (\pm desvio padrão) calculados para brânquias de juvenis (0,05 g) expostos ao glifosato em testes de toxicidade aguda..... 48
- Tabela 8 – Valores estimados das concentrações letais medianas (CL₅₀) e nível de segurança do teste de toxicidade aguda para juvenis (4,0 g) de *Lophiosilurus alexandri* expostos ao glifosato..... 50
- Tabela 9 – Valores médios de DTC (\pm desvio padrão) calculados para brânquia e fígado de juvenis (4,00 g) expostos ao glifosato em teste de toxicidade aguda..... 53
- Tabela 10 – Valores médios de DTC (\pm desvio padrão) calculados para brânquia e fígado de juvenis (20,0 g) expostos ao glifosato em teste de toxicidade subcrônica..... 54

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Estrutura molecular química do glifosato..... | 15 |
| Figura 2 - Rotas para degradação microbiana do glifosato..... | 17 |
| Figura 3 – Imagem representativa de lamelas branquiais de uma espécie de peixe Teleósteo (<i>Lophiosilurus alexandri</i>)..... | 22 |
| Figura 4 – Imagem representativa de células pavimentosas do epitélio branquial de um peixe teleósteo (<i>Lophiosilurus alexandri</i>), delimitadas pelas microrredes..... | 23 |
| Figura 5 – Desenho esquemático de lesões branquiais comuns induzidas por tóxicos. | 25 |
| Figura 6 – Juvenil de Pacamã (<i>Lophiosilurus alexandri</i>)..... | 26 |
| Artigo: Alterações histológicas em <i>Lophiosilurus alexandri</i> expostos ao glifosato | |
| Figura 1 – Fotomicrografias de juvenis (0,05 g) de <i>Lophiosilurus alexandri</i> expostos a concentrações agudas de glifosato em teste de toxicidade aguda (96 h). Coloração com hematoxilina e eosina..... | 49 |
| Figura 2 – Resultado cumulativo da mortalidade de juvenis (4,0 g) <i>Lophiosilurus alexandri</i> expostos a diferentes concentrações de glifosato em um período de 96 h..... | 50 |
| Figura 3 – Fotomicrografias de juvenis (4,0 g) de <i>Lophiosilurus alexandri</i> expostos a concentrações agudas de glifosato em teste de 96 h. Coloração com hematoxilina e eosina..... | 51 |
| Figura 4 – Fotomicrografias de juvenis (4,0 g) de <i>Lophiosilurus alexandri</i> expostos a concentrações agudas de glifosato em teste de 96 h. Coloração com hematoxilina e eosina..... | 52 |
| Figura 5 – Eletromicrografias de brânquias de juvenis (20 g) de <i>Lophiosilurus alexandri</i> expostos a concentrações subletais de glifosato durante 19 dias..... | 55 |
| Figura 6 – Fotomicrografias de brânquias de juvenis (20 g) de <i>Lophiosilurus alexandri</i> expostos a concentrações subletais de glifosato durante 19 dias. Coloração com hematoxilina e eosina..... | 56 |

Figura 7 – Fotomicrografias de seções de cortes do fígado de juvenis (20 g) de *Lophiosilurus alexandri* submetidos ao teste subcrônico de exposição ao glifosato durante período de 19 dias. Coloração com hematoxilina e eosina..... 57

RESUMO

O Roundup® Original é um herbicida que contém em sua formulação o ingrediente ativo glifosato. Esta formulação comercial é amplamente utilizada a nível global, e sua principal função é combater ervas daninhas na agricultura. Devido às grandes aplicações deste herbicida, o glifosato e seus principais metabólitos têm sido detectados em águas superficiais e subterrâneas, gerando preocupações quanto aos seus efeitos em organismos não-alvos, principalmente animais aquáticos. O objetivo central deste estudo foi avaliar os efeitos deletérios do Roundup® Original (N-(fosfonometil) glicina, Monsanto do Brasil Ltda) em formas jovens do peixe pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). Para isto, foram realizados testes de toxicidade aguda (96 h) e teste subcrônico (19 dias) de exposição ao herbicida. No primeiro teste de toxicidade aguda, foram testadas as concentrações de 0,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0 mg L⁻¹ de glifosato diluído em água, em animais de 0,05 ± 0,01 g; 1,80 ± 0,10 cm. A Concentração letal mediana (CL₅₀; 96h) estimada foi de 2,71 mg L⁻¹ de glifosato. O estudo histológico possibilitou a observação de alterações branquiais, tais como: descolamento do epitélio lamelar, aneurisma, hiperplasia e fusão lamelar em animais mantidos na presença do agente tóxico. Para o segundo teste de toxicidade aguda, foram utilizados animais de 4,03 ± 1,26 g; 6,97 ± 0,65 cm. As concentrações de glifosato testadas foram de 0,0; 3,0; 6,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mg L⁻¹. A CL₅₀; 96 h e o nível de segurança estimados foram de 4,21 mg L⁻¹, e 0,42 mg L⁻¹ de glifosato, respectivamente. Brânquias e fígados avaliados neste experimento demonstraram alterações teciduais como: descolamento do epitélio lamelar com edema intersticial, hiperplasia das lamelas secundárias, hipertrofia de células de cloreto, desarranjo do formato das células hepáticas com presença de algumas áreas necróticas e com núcleos picnóticos. O terceiro experimento, caracterizado pela exposição de juvenis (21,69 ± 3,89 g; 11,45 ± 0,79 cm) às concentrações subletais de glifosato (0,0; 0,42 e 0,21 mg L⁻¹), ocasionou a mortalidade de 25% dos animais expostos à maior concentração de glifosato, além da presença de animais letárgicos nas concentrações testadas, com exceção do grupo controle. A histologia aplicada para fígado e brânquias dos juvenis do teste subcrônico, também demonstraram alterações teciduais, porém em menor proporção em relação aos testes de exposição aguda. Desta forma, podemos sugerir que o glifosato é potencialmente tóxico para *L. alexandri*, visto que concentrações baixas de glifosato provocaram mortalidade, além de alterações histológicas e comportamentais.

Palavras-chave: “Pacamã”; Roundup; contaminação; toxicidade; histologia.

ABSTRACT

Roundup® Original is an herbicide that contains in its formulation the active ingredient glyphosate. This commercial formulation is widely used globally, and its main function is to combat weeds in agriculture. Due to the great applications of this herbicide, glyphosate and its main metabolites have been detected in surface water and groundwater, raising concerns about its effects on non-target organisms, mainly aquatic animals. The main objective of this study was to evaluate the deleterious effects of Roundup® Original (N- (phosphonomethyl) glycine, Monsanto of Brazil Ltda.) on juveniles of the pacamã fish (*Lophiosilurus alexandri*). For this, tests of acute toxicity (96 h) and subchronic (19 days) of exposure to the herbicide were performed. In the first acute toxicity test, were tested the concentrations of 0,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 and 5,0 mg L⁻¹ of glyphosate diluted in water, in animals of 0,05 ± 0,01 g; 1,80 ± 0,10 cm. The median lethal concentration (LC₅₀; 96h) estimated was 2,71 mg L⁻¹ of glyphosate. Histological studies allowed the observation of branchial alterations, such as: detachment of the lamellar epithelium, aneurysm, hyperplasia and lamellar fusion in animals kept in the presence of the toxic agent. For the second acute toxicity test, were used animals of 4,03 ± 1,26 g; 6,97 ± 0,65 cm. The concentrations of glyphosate tested were 0,0; 3,0; 6,0; 10,0; 15,0 and 20,0 mg L⁻¹. The LC₅₀; 96 h and the safety level estimated were 4,21 mg L⁻¹, and 0,42 mg L⁻¹ of glyphosate, respectively. Gills and livers evaluated in this experiment demonstrated tissue changes such as: detachment of lamellar epithelium with interstitial edema, hyperplasia of secondary lamellae, hypertrophy of chloride cells, and derangement of hepatic cell shape with the presence of some necrotic areas with pycnotic nuclei. The third experiment, characterized by exposure of the juveniles (21,69 ± 3,89 g, 11,45 ± 0,79 cm) to sublethal concentrations of herbicide (0,0; 0,42 and 0,21 mg L⁻¹), caused mortality of 25% of the animals exposed to the highest concentration of glyphosate, in addition to the presence of lethargic animals in the tested concentrations, except for the control group. The histology applied to the liver and gills of juveniles of the subchronic test also showed tissue changes, but to a lesser extent in relation to the acute exposure tests. In this way, we can suggest that glyphosate is potentially toxic to *L. alexandri*, since low concentrations of glyphosate caused mortality, as well as histological and behavioral changes.

Keywords: "Pacamã"; Roundup; contamination; toxicity; histology.

1. INTRODUÇÃO

Os pesticidas vêm sendo empregados na agricultura como uma forma de combater pragas que prejudicam a produtividade de produtos agrícolas. Dentre os pesticidas empregados no meio rural, os herbicidas são considerados os mais aplicados em práticas rurais (Woodburn, 2000; Thompson e Pitt, 2003; Lanctôt et al., 2013; Prosser et al., 2016).

Os herbicidas contendo o glifosato como ingrediente ativo, são amplamente utilizados devido à sua eficácia. Seu principal objetivo é combater ervas daninhas, que competem por espaço e nutrientes, em culturas de alimentos de interesse. O glifosato é considerado de amplo espectro, não seletivo e sistêmico. Em outras palavras, são capazes de erradicar uma variedade de espécies de plantas, e atingem todo o sistema vegetal provocando a sua morte (Junior et al., 2002; Borggarad e Gimsing, 2008; Duke e Powles, 2008; Gomes et al., 2014; Prosser et al., 2016).

O glifosato, inicialmente, foi criado e patenteado na formulação comercial Roundup[®] pela empresa americana Monsanto. Após alguns anos, outras empresas também começaram a fabricar e a comercializar o glifosato como herbicida, com nomes comerciais diferentes. Ao longo dos anos, o uso do glifosato tem sido crescente, principalmente após a introdução de transgênicos resistentes ao glifosato na agricultura (Franz et al., 1997; Duke e Powles, 2008; Dill et al., 2010).

O uso intensivo do herbicida em todo o mundo tem gerado preocupações quanto aos seus resíduos no meio ambiente, principalmente em sistemas aquáticos. Sabe-se que o glifosato pode ser transportado ao meio aquático por meio de escoamento, evaporação e precipitação, drenagem e lixiviação (WHO, 2005). Apesar de alguns autores considerarem que o glifosato seja degradado por microrganismos e possuir a característica de ser adsorvido pelo solo, o glifosato e o seu principal metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), vêm sendo frequentemente detectados em águas superficiais próximas a práticas agrícolas (Franz et al., 1997; Giesy et al., 2000; Busse et al., 2001; Vereecken, 2005; Duke e Powles, 2008; Coupe et al., 2011; Helander et al., 2012; Delmonico et al., 2014). A presença de agentes tóxicos nos corpos hídricos receptores pode prejudicar a saúde, sobrevivência e o bem-estar de organismos aquáticos, possibilitando a redução da biodiversidade (Williams e Semlitsch, 2010; Volpato, 2014).

Entre as mais diversificadas formulações comerciais contendo o glifosato, o Roundup® Original (Monsanto) ainda é um dos mais utilizados. Embora este composto pertença à classe toxicológica III (medianamente tóxico), alguns trabalhos utilizando esta mesma formulação em testes de toxicidade têm demonstrado efeitos deletérios em organismos aquáticos. Entretanto, os efeitos sobre variadas espécies aquáticas ainda não são totalmente conhecidas (Lushchak et al., 2009; Helander et al., 2012; Hued et al., 2012; Shiogiri et al., 2012; Sinhorin et al., 2014a; Sinhorin et al., 2014b; Currie et al., 2015; Ma e Li, 2015).

Além da preocupação de danos causados por resíduos de glifosato em animais selvagens, ainda existe um grande potencial da dissipação do glifosato em áreas com atividades aquícolas (tanques e reservatórios) nas proximidades de regiões agrícolas (Williams e Semlitsch, 2010).

Neste sentido, o presente trabalho tem o objetivo de avaliar os efeitos do glifosato na formulação Roundup® Original (Monsanto do Brasil) em juvenis de pacamã, peixe representativo da Bacia de São Francisco (Brasil), de alto valor comercial, considerado espécie com risco de extinção e candidato para ser introduzido na aquicultura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Herbicidas na prática agrícola

Herbicidas são substâncias muito utilizadas na agricultura para controlar ervas daninhas e maximizar a produção (Prosser et al., 2016). Todavia, desempenham também importante papel para o controle de vegetação de áreas não agrícolas, como locais industriais, áreas de conservação, reservas naturais e estradas (Radosevich et al., 2007).

Assim como vários pesticidas, os herbicidas possuem em sua formulação, além dos ingredientes ativos, numerosos outros compostos nomeados adjuvantes (Chan et al., 2007). Conforme Krogh et al. (2003), adjuvantes são adicionados à formulação de pesticidas com intuito de aumentar a eficácia do pesticida, seja ele aumentando a solubilidade, adsorção, penetração e translocação dos ingredientes ativos no alvo, como também para aumentar a resistência do ingrediente ativo à chuva, ou alterar a seletividade para diferentes plantas. Os adjuvantes podem ser classificados em:

adjuvantes de formulação e adjuvantes de pulverização. O primeiro, conhecido também como aditivo ou ingredientes inertes, consiste em adjuvantes que participam da formulação, enquanto que na segunda forma, os adjuvantes são adicionados junto do produto formulado e água, no tanque do equipamento pulverizador (Hochberg, 1996; Krogh et al., 2003).

Atualmente, os herbicidas à base de glifosato são os mais usados no manejo florestal e na agricultura em todo mundo (Woodburn, 2000; Thompson e Pitt, 2003; Lanctôt et al., 2013). Entretanto, o uso excessivo de pesticidas para ganhos de produtividade podem gerar impactos nocivos ao meio ambiente, uma vez que podem causar impacto adverso à estrutura genética dos seres vivos e até mesmo a redução da biodiversidade (Ghimire e Woodward, 2013).

O glifosato pertence à classe dos organofosfonados que possuem uma ligação direta carbono-fósforo (C-P) resistente aos impactos físico-químicos (Shushkova et al., 2010). Conhecido também como N-(fosfonometil) glicina, o glifosato é um derivado fosfonometil do aminoácido glicina, contendo característica física sólida cristalina, branca e inodora e é constituído por uma função amino básica e três sítios ácidos ionizáveis (Dill et al., 2010) (Fig. 1). Segundo Junior et al. (2002), em condições ambientais, o glifosato é muito solúvel em água, e se apresenta bastante estável na presença de luz, inclusive em temperaturas superiores a 60°C.

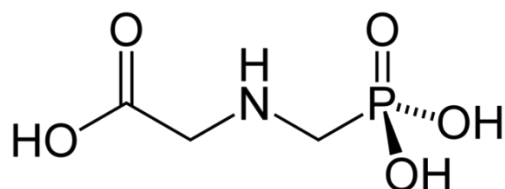


Figura 1: Estrutura molecular química do glifosato. Fonte: Dill et al. (2010).

Segundo relatos de Franz et al. (1997), a molécula de glifosato foi sintetizada primeiramente por Henri Martin, químico de uma pequena empresa farmacêutica suíça (Cilag) no ano de 1950. Entretanto, o produto não tinha aplicabilidade farmacêutica e não foi patenteado. Em 1970, John E. Franz, pesquisador da Monsanto (EUA), testou o glifosato como herbicida e, no ano de 1974, patenteou o composto para o uso como herbicida, um ‘sal de isopropilamina de glifosato’, introduzindo a formulação comercial com o nome de Roundup[®] (Franz et al., 1997; Duke e Powles, 2008; Dill et al., 2010).

De acordo com Duke et al. (2012), uma vez que o N-(fosfometil) glicina foi comercializado em 1975, tornou-se o herbicida mais utilizado, principalmente devido à adoção em grande escala de culturas resistentes ao glifosato (GR) após sua introdução em 1996. Seu uso chegou a ser limitado por ser considerado um herbicida não seletivo, porém, após a adoção generalizada das culturas GR, o glifosato voltou a ser disseminado mundialmente.

Conforme Baylis (2000), desde a introdução do primeiro herbicida glifosato na formulação Roundup[®] pela Monsanto, este composto químico, nas mais variadas formulações, transformou a agricultura global, auxiliando na redução de mão-de-obra no controle manual de ervas daninhas.

Em diversos tipos de cultura, o glifosato geralmente é pulverizado, sendo absorvido pelas folhas (Junior et al., 2002). A sua principal função é evitar que a planta produza aminoácidos aromáticos essenciais, tais como a fenilalanina, triptofano e tirosina (Borggarad e Gimsing, 2008), ou seja, atua inibindo a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPs), da via do chiquimato, via de metabolismo secundário presente nas plantas (Duke e Powles, 2008). O glifosato é considerado não-seletivo, sistêmico e de amplo espectro (Gomes et al., 2014).

O glifosato possui como seus principais metabólitos, o AMPA e a Sarcosina, sendo os microrganismos presentes no solo, os principais responsáveis pela sua degradação (Mattos et al., 2002). A degradação do glifosato no solo pode seguir duas rotas, conforme ilustrado na figura 2. Uma delas consiste na clivagem da molécula produzindo o AMPA, e a outra rota seria pela clivagem da ligação C-P do composto, através da enzima C-P liase, gerando a sarcosina (Liu et al., 1991).

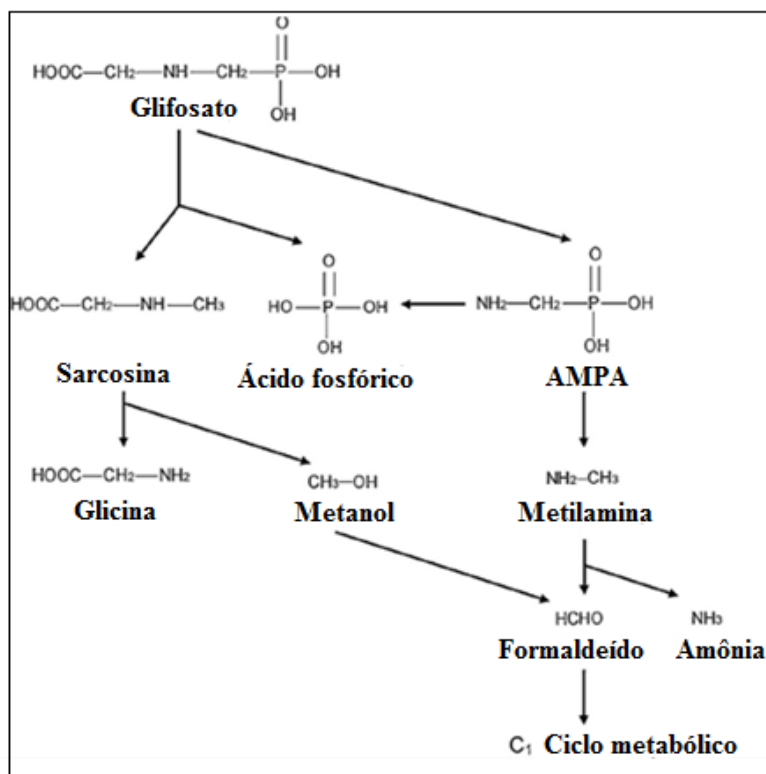


Figura. 2. Rotas para degradação microbiana do glifosato. Fonte: Kryuchkova et al. (2014) adaptado.

Tendo em vista que o glifosato é um dos herbicidas mais utilizados e possui diversas aplicações, reiteramos a necessidade de conscientização do seu uso, a quantificação dos impactos ambientais e o conhecimento dos seus efeitos ecotoxicológicos à biota.

2.2. Persistência do glifosato no meio ambiente e formas de contaminação em corpos aquáticos

A molécula de um herbicida, ao atingir o solo, pode sofrer os processos de degradação ou adsorção (Toni et al., 2006). Conforme Duke (1988), o glifosato apresenta uma meia-vida relativamente curta no solo, variando de alguns dias a meses, devido à degradação microbiana. Conforme já descrito e corroborado por Borggaard e Gimsing (2008), a principal degradação do glifosato é promovida por vários microrganismos, no entanto, fatores relacionados ao solo podem afetar a taxa de degradação microbiana.

A inativação do glifosato pode ser facilitada pela sua adsorção na matriz do solo (Ermakova et al., 2010). A adsorção é o fenômeno pelo qual ocorre atração ou repulsão

entre uma superfície sólida e um vapor ou uma solução. Esta atração ou repulsão ocorrem devido interações entre os campos de força que emanam da superfície do adsorvente, e das moléculas ou íons do adsorvato (Bailey e White, 1964). Segundo Junior et al. (2002), o mecanismo de adsorção do glifosato no solo não é inteiramente compreendido. Acredita-se que a adsorção do glifosato em solos parece ser mediada por troca de ligações iônicas por meio do grupo fosfato da molécula do herbicida, da mesma forma como se dá a adsorção de fosfatos (Bott et al., 2011). Geralmente, substâncias com maiores tendências a serem adsorvidas no solo possuem a sua mobilidade reduzida (Vereecken, 2005).

Um dos primeiros relatos sobre a adsorção de glifosato em solos foram relatados por Sprankle et al. (1975). Os referidos autores observaram sorção mais forte do glifosato em solos argilosos do que em solos arenosos, sugerindo que os minerais de argila foram os promotores da sorção. Para Shushkova et al. (2010), a capacidade de adsorção do solo contribui para a acumulação de herbicidas, e o fenômeno ocorre principalmente por meio de interações com minerais presentes, como hidróxidos de alumínio e óxidos férricos.

O glifosato pode ser acumulado na camada de solo arável e por meio das raízes das plantas. O herbicida pode entrar em contato também com as folhas, frutos e frutas, atingindo os mamíferos através de cadeias alimentares (Roy et al., 1989; Shushkova et al., 2010). Independentemente das altas capacidades de sorção do glifosato, ele pode ser facilmente movimentado e, dependendo do tipo de solo, podem atingir até as camadas mais profundas (Shushkova et al., 2010).

O uso contínuo e prolongado do herbicida pode resultar no seu transporte para ambientes aquáticos. Ecossistemas de água doce podem ser contaminados com agroquímicos por meio da lixiviação, escoamento ou pelo transporte por ação do vento no momento da pulverização (WHO, 2005).

Borggaard e Gimsing (2008) relatam que o glifosato pode sofrer transporte coloidal, ligado à colóides do solo, ou ser transportado como soluto. Ambas as formas podem se mover por meio de escoamento superficial e sub-superficial, podendo atingir águas abertas e subterrâneas. Estudos tem demonstrado a detecção do glifosato e de AMPA em águas superficiais e subterrâneas de proximidade a áreas agrícolas cultiváveis e até mesmo em áreas protegidas de atividades agrícolas (Vereecken, 2005; Coupe et al., 2011; Delmonico et al., 2014; Ruiz-Toledo et al., 2014). Estes estudos realçam que o glifosato e o seu metabólito AMPA estão presentes em ambientes

aquáticos, e mesmo que presente em doses baixas, essas doses podem ser significativas, gerando preocupações com relação a possíveis efeitos adversos desta contaminação, principalmente em populações aquáticas (Evrard et al., 2010).

Alguns estudos de toxicidade utilizando herbicidas à base de glifosato têm sido realizados em animais aquáticos a fim de verificar seus efeitos nos organismos não-alvos (Lushchak et al., 2009; Hued et al., 2012; Shiogiri et al., 2012; Sinhorin et al., 2014a; Sinhorin et al., 2014b; Currie et al., 2015; Ma e Li, 2015).

2.3. Testes de toxicidade

Testes de toxicidade aquática são de grande relevância e são rotineiramente utilizados, visto que os ecossistemas aquáticos são considerados grandes receptores de contaminantes (Costa et al., 2008). Para exemplificar, podemos citar as áreas agrícolas, locais onde os herbicidas podem contaminar os recursos hídricos adjacentes, onde as águas superficiais são consideradas as mais vulneráveis e, uma vez contaminada, ameaça a saúde humana e as vidas selvagens (Williams e Semlitsch, 2010). Desta forma, os chamados ‘testes de toxicidade’ são considerados instrumentos úteis na avaliação de danos ocasionados por contaminantes ambientais. Os testes de toxicidade são desenvolvidos por órgãos de monitoramento ambiental de muitos países e por diversas instituições de pesquisas. Geralmente estes testes envolvem experimentos realizados com metais, efluentes industriais, defensivos agrícolas, amostras de águas e sedimento, dentre outras substâncias (Meletti et al., 2003).

Conforme Williams e Semlitsch (2010), os efeitos da contaminação por herbicidas têm gerado preocupação e, conseqüentemente, tem desencadeado diversos estudos toxicológicos focados principalmente nos efeitos de exposições a doses elevadas, que se supõe terem um maior potencial para causar efeitos negativos. Entretanto, os efeitos da exposição crônica (em baixas doses ou concentrações) sobre a fauna aquática, têm sido pouco explorados, apesar da compreensão destes efeitos serem grandes desafios no campo da ecotoxicologia (Eggen et al., 2004; Williams e Semlitsch, 2010).

Os testes de toxicidade são classificados de acordo com a duração (curto prazo, médio ou longo prazo), com o método de adição do agente tóxico (sistema estático, semi-estático, ou recirculação) e com o tipo de teste (*in vitro* ou *in vivo*) (Metcalf, e Eddy, 2015).

Os estudos de toxicidade aguda determinam os efeitos tóxicos de uma substância-teste quando administrada, geralmente, em múltiplas doses, em um curto período (tipicamente entre 48 ou 96 h). Neste tipo de teste, as doses são aumentadas, com a finalidade de se encontrar a quantidade mais alta da substância testada que não produza efeito tóxico, e os níveis onde a toxicidade intermediária e grave ocorrem (Allen et al., 2013; Metcalf e Eddy, 2015). Os resultados do teste de toxicidade aguda podem ser expressos em concentração letal mediana (CL_{50}), onde os critérios de avaliação dos efeitos tóxicos podem ser: a inibição do crescimento de uma população, inibição de reprodução, inibição de desenvolvimento embrionário, imobilidade e letalidade (Bertolleti, 2001).

Os testes de toxicidade crônica, em contrapartida, avaliam exposição dos organismos-teste às concentrações de poluentes consideradas subletais e por um intervalo de tempo mais significativo, ou seja, de dias a meses. Nesses testes são avaliados efeitos mais sutis, como por exemplo, o crescimento, fisiologia, bioquímica, reprodução, comportamento, além da morte dos organismos expostos, ainda que ocorra de uma maneira mais lenta em relação ao teste de toxicidade aguda (Arezon, 2011).

A exposição de organismos aquáticos à formulações de herbicidas contendo o glifosato causa preocupação para ecotoxicologistas devido à sua elevada solubilidade em água e sua extensa aplicação (Tsui e Chu, 2003; Mensah et al., 2011). Neste contexto, alguns estudos de toxicidade aguda e crônica envolvendo herbicidas à base de glifosato já foram realizados para algumas espécies de microcrustáceos (Zalizniak e Nugegoda, 2006; Deepananda et al., 2011), crustáceos decápodes (Deepananda et al., 2011; Mensah et al., 2011), anfíbios (Fuentes et al., 2011) e peixes (Jiraungkoorskull et al., 2002; Jiraungkoorskull et al., 2003; Kreutz et al., 2011; Guilherme et al., 2012).

2.4. Fígado e brânquias de peixe como biomarcadores histológicos

Biomarcadores podem ser definidos como alterações ocasionadas como uma resposta biológica, sejam elas alterações comportamentais, fisiológicas, celulares ou moleculares. Estas alterações podem estar relacionadas com a exposição aos chamados ‘biomarcadores’ a efeitos de substâncias químicas presentes no ambiente (Peakall, 1994).

As brânquias de peixes são órgãos que possuem contato direto com o agente tóxico quando presente na água e, o fígado, é o órgão que participa do metabolismo de

compostos xenobióticos. Estes dois órgãos são considerados importantes para indicar alterações de ação tóxica aguda ou crônica de substâncias estressoras em tecidos animais (Lins et al., 2010).

A presença de agentes tóxicos no fígado podem alterar o metabolismo de carboidratos e lipídeos, afetando indiretamente a função de outros órgãos (Shiogiri et al., 2012). Quando os compostos químicos excedem o nível de desintoxicação do fígado, elevadas concentrações de tóxicos induzem a atividade biotransformadora hepática, provocando modificações da estrutura hepática normal (Hued et al., 2012).

Segundo Hued et al. (2012), a exposição de peixes em formulações comerciais de glifosato, demonstrou alterações histológicas no fígado, como degeneração gordurosa (ou acúmulo de lipídeos) nos hepatócitos, necrose multifocal, dilatação sinusoidal com congestão sanguínea e infiltração de leucócitos.

As brânquias são consideradas o principal órgão respiratório da maioria dos peixes e possui uma grande área de superfície de contato com o meio aquático (Shiogiri et al., 2012). Elas são formadas por estruturas chamadas de filamentos, que constituem um conjunto de lamelas (Fig. 3), onde passam as redes de capilares sanguíneos (Park et al., 2014).

De acordo com Machado (1999), durante o processo respiratório nos peixes, os opérculos do animal se fecham, aumentando o volume da cavidade bucal, permitindo a entrada da água do meio externo pela boca. Ao mesmo tempo, as câmaras branquiais também aumentam de volume, que faz com que ocorra uma pressão negativa, onde a água passa sobre as brânquias. Posteriormente, a cavidade bucal se fecha, promovendo a contração das câmaras branquias, forçando a água a seguir o caminho pelas aberturas operculares, favorecendo o contato da água com as brânquias em um fluxo contínuo. A direção do fluxo de água nas lamelas ocorre de maneira contrária ao fluxo da corrente sanguínea, chamado de mecanismo contra-corrente. Este processo facilita as trocas gasosas, onde o sangue rico em CO_2 e com pouca presença de O_2 , é suprido pelo O_2 presente nas águas.

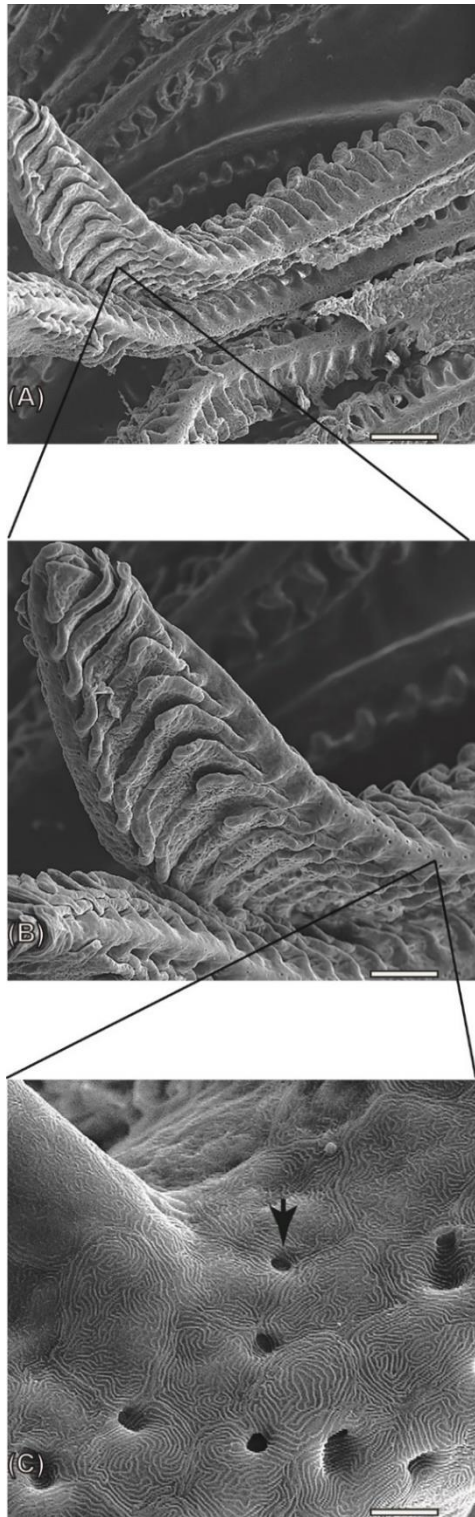


Figura 3. Imagem representativa de lamelas branquiais de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). (A-B: filamentos branquiais compostos por lamelas; C: epitélio lamelar - Barras: 175,5 μm ; 64 μm ; 6,4 μm , respectivamente. Imagens captadas em aumentos de 100x; 200x e 2000x). Microscopia Eletrônica de Varredura. Fonte: Arquivo Pessoal.

A grande maioria de peixes teleósteos utilizam o bombeamento branquial e a compressão do músculo faringeano, auxiliando o fluxo de água nas brânquias. Conforme Park et al. (2014), em peixes pelágicos, o movimento natatório do animal também auxilia o fluxo de água em direção às brânquias

Outras funções das brânquias importantes para os peixes, além das trocas de oxigênio e dióxido de carbono com o meio aquático, são: osmorregulação, equilíbrio ácido-base, balanço hídrico, excreção de amônia e defesa imunológica (Roumbough, 2007; Brauner e Roumbough, 2012).

A pressão osmótica é determinada pela concentração total de solutos, principalmente eletrólitos inorgânicos que estão presentes no fluido corporal. Sendo o Na^+ e Cl^- os principais eletrólitos do fluido corporal.

Considera-se que as regulações destes íons acabam sendo críticas para o processo de osmorregulação. As brânquias são permeáveis aos íons mencionados e, a movimentação de Na^+ e Cl^- ocorre de acordo com o gradiente osmótico e a concentração entre o ambiente aquático externo e o fluido corporal, respectivamente (Kaneko et al., 2008). Teleósteos de água doce possuem a concentração osmótica plasmática bastante superior em relação à água do meio externo, e, portanto, são considerados hiperosmóticos

comparados ao ambiente em que vivem. Sendo assim, há uma tendência em ganhar água por osmose e perder íons através do processo de difusão pelas brânquias. Desta forma, os peixes tendem a reabsorver íons monovalentes através dos rins, bexiga urinária, membrana operculares e células de cloreto (Kirsch et al., 1984; Moreira et al., 1998). Em contrapartida, teleósteos marinhos possuem sangue hiposmótico em relação ao meio e a tendência de perder água ocorre por osmose através das brânquias e excreção, ganhando íons por difusão nas brânquias (Moreira et al., 1998).

O epitélio branquial é composto por duas superfícies epiteliais diferentes: o epitélio filamentososo e o epitélio lamelar, também denominados: filamentos ou lamelas primárias e lamelas secundárias (Ruales e Torres, 2010).

Conforme Evans (1987), o epitélio filamentososo é composto por algumas células importantes, onde estão inclusas as células pavimentosas, que possui a característica de conter microrredes ou micropregas em formato digitiforme (Fig. 4), células mucosas, células acessórias não diferenciadas (podendo ser precursoras das células de cloreto) e as células de cloreto. Sugere-se que as microrredes das células pavimentosas estejam relacionadas com a adesão de muco sobre o epitélio lamelar, protegendo-o de alterações do meio aquático (Mallatt, 1985).

O epitélio das lamelas secundárias é mais simples e menos espesso em relação ao epitélio filamentososo e possuem dois tipos principais de células: as células superficiais e as células basais (Evans, 1987).

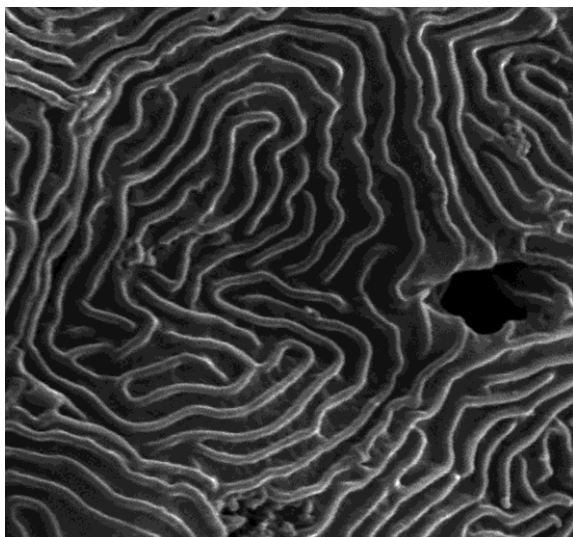


Figura 4. Imagem representativa de células pavimentosas do epitélio branquial de um peixe teleósteo (*Lophiosilurus alexandri*), delimitadas pelas microrredes. (Imagem captada em aumento de 10.000x) Fonte: Arquivo pessoal.

Os peixes teleósteos enfrentam cargas iônicas e a perda de sal através da superfície corporal permeável, geralmente ocupado pelo epitélio branquial (Kaneko et al., 2008). As células de cloreto, ou células ricas em mitocôndrias, são os principais locais de secreção e absorção de íons. Estas células também estão envolvidas na

regulação ácido-base e captação de Ca^{2+} , essencial para adaptação dos organismos a vários ambientes (Kaneko et al., 2008).

Conforme Brauner et al. (2012), a morfologia e a função das brânquias para algumas espécies pode ser bastante plástica e ser alterada de forma drástica, atendendo às mudanças nas demandas colocadas sobre as brânquias por meio das condições ambientais alteradas. Segundo Machado (1999), pesticidas orgânicos podem provocar alterações nos epitélios branquiais.

De acordo com Nogueira et al. (2008), modificações nos diferentes níveis biológicos, sejam eles teciduais, sistêmicos ou celulares, são indicativos dos danos que os contaminantes podem promover. Algumas das principais alterações teciduais e celulares das brânquias podem ser observadas na figura 5. As respostas morfológicas frente aos agentes tóxicos, como o descolamento epitelial, hipertofia e hiperplasia, são maneiras compensatórias do tecido branquial diminuir o contato indireto e direto com os xenobióticos presente no meio aquático circundante.

De uma maneira geral, a exposição dos peixes a compostos tóxicos prejudicam a função respiratória das brânquias, pelo fato de estas reduzirem o consumo de oxigênio, ao passo que a demanda por oxigênio para manter os processos celulares vitais é aumentada (Nowak, 1992). As alterações histológicas, causadas para que ocorra a redução do contato xenobiótico/brânquias, podem resultar em barreira para passagem de sangue e de água nas lamelas branquiais, causando, conseqüentemente, distúrbios respiratórios e iônicos nos animais de água doce (Hughes et al., 1979; Takashima e Hibia, 1995; Braz-Mota et al., 2015). Conforme Jiraungkoorskul et al. (2002), a proliferação celular filamentar e hipertrofia de células filamentosas reduzem o espaço interlamelar, podendo resultar em fusão lamelar total ou parcial, reduzindo a área total de superfície para o processo de troca gasosa. Além disto, a elevação epitelial juntamente com a secreção de muco, em alguns casos, reduz os níveis de oxigênio e, se o agente irritante não for removido, haverá grandes chances de ocorrer ruptura de vasos sanguíneos com focos de hemorragia.

De acordo com Castro et al. (2014), alterações observadas nas brânquias podem servir como uma ferramenta de monitoramento ambiental, e podem ser utilizadas também como um meio de identificação da ação de compostos químicos em peixes.

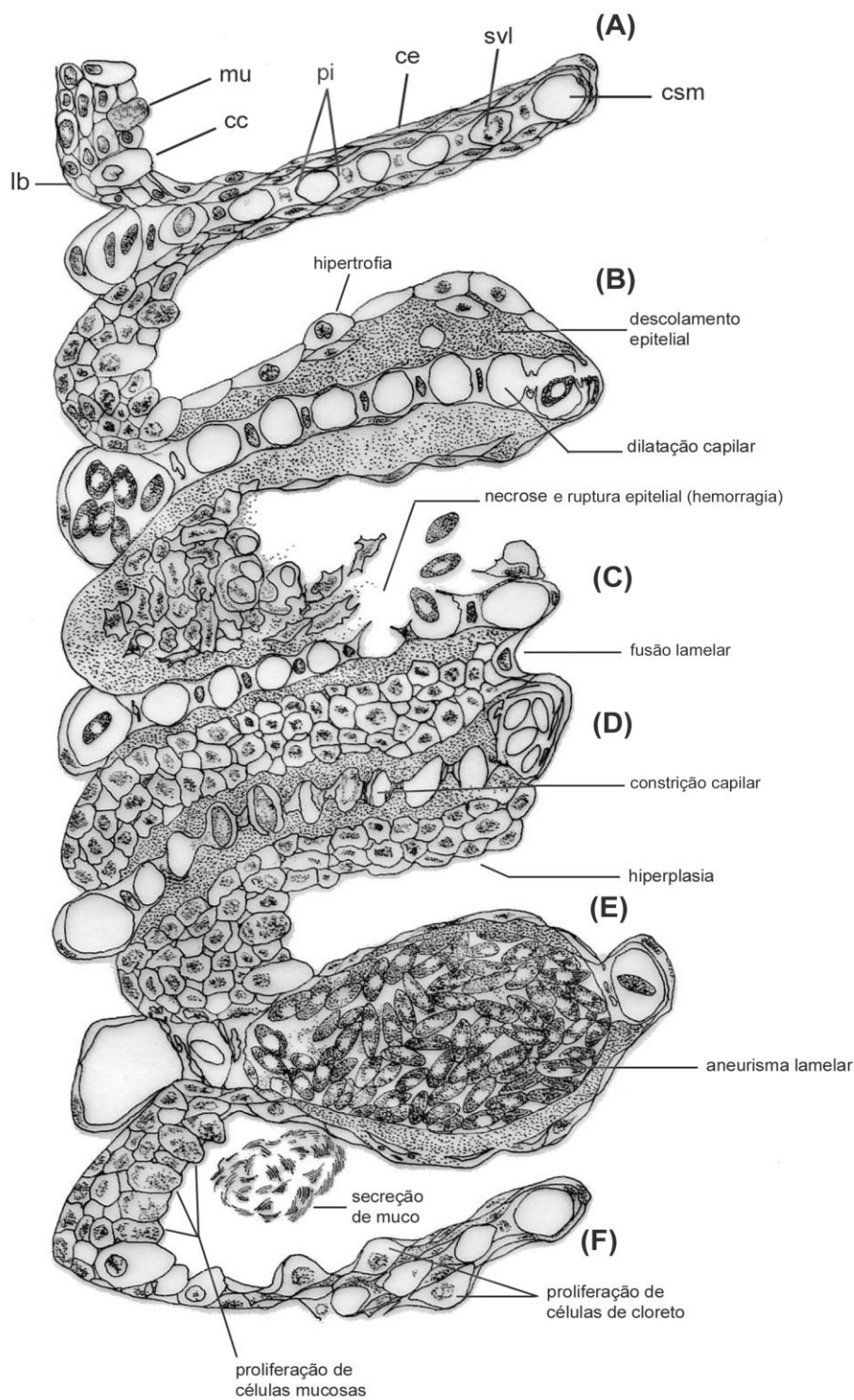


Figura 5. Desenho esquemático de lesões branquiais comuns induzidas por compostos tóxicos. (A: estado normal; B, C, D, E e F: alterados). Abreviações: lb: lâmina basal; cc: célula de cloreto; mu: célula mucosa; pi: célula pilar; ce: célula epitelial lamelar; svl: seio venoso lamelar; csm: canal sanguíneo marginal. Fonte: Machado et al. (1999).

2.5. Pacamã (*Lophiosilurus alexandri*)

O animal conhecido popularmente como pacamã (*L. alexandri*) é um peixe siluriforme, pertencente à família *Pseudopimelodidae*, e nativo da bacia do rio São Francisco (Travassos, 1960; Shibata, 2003). Considerado um peixe carnívoro e de água doce (Ribeiro et al., 2015), o pacamã apresenta desova parcelada, comportamento sedentário (Travassos, 1959) e noturno, tendo preferência por ambientes bentônicos (Shibata, 2003; Tenório et al., 2006; Costa et al., 2015) (Fig. 6).



Figura 6. Juvenil de Pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). Fonte: Arquivo pessoal.

O pacamã *L. alexandri* é um peixe oriundo da bacia do rio São Francisco. O seu elevado valor comercial e qualidade de carne (devido ao sabor e ausência de mioespinhos) são atributos que levaram ao aumento da sua captura, o que resultou na drástica redução da sua comercialização na região do São Francisco (Tenório et al., 2006; Luz e Santos, 2008a; Costa et al., 2015). Recentemente, o pacamã foi considerado como espécie ameaçada de extinção (Brasil, 2014).

Como forma paliativa, o pacamã vem sendo utilizado em estudos de reprodução em ambientes artificiais para futuros repovoamentos nos reservatórios de hidroelétricas do rio São Francisco, na Estação de Piscicultura de Paulo Afonso, da Companhia Hidroelétrica do São Francisco (EPPA/CHESF) e também na região de Três Marias-MG, pelo Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura de Três Marias da Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba (CODEVASF) (Sato e Sampaio, 2005; Luz e Santos, 2008b; Luz e Santos, 2015).

Apesar de grande parte da produção do pacamã ser destinada aos repovoamentos, este organismo aquático apresenta grande potencial para cultivo em

cativeiro (Cardoso et al., 1996), não só como peixe de corte, mas também como animal para ornamentação (Santos e Luz, 2009; Kitagawa et al., 2015., Filho et al., 2016). Recentemente, diversos estudos vêm sendo realizados com *L. alexandri*, com o intuito de se criar um pacote tecnológico para a sua produção comercial. Já foram avaliados para esta espécie os efeitos da salinidade e concentrações de presas na larvicultura (Santos e Luz, 2009); a influência do tempo de transporte para juvenis de pacamã (Luz et al., 2013); os efeitos do anestésico eugenol em juvenis de pacamã (Ribeiro et al., 2013); desova induzida e variáveis reprodutivas (Santos et al., 2013); incubação de ovos com florfenicol (Batista et al., 2014); relação proteína:carboidrato no desempenho e metabolismo de juvenis de pacamã (Figueredo et al., 2014); sistema de drenagem e taxa de alimentação durante o desenvolvimento inicial do pacamã (Filho et al., 2014); o crescimento larval alométrico (Guimarães-Cruz et al., 2014); os efeitos da temperatura da água e das concentrações de presas no seu desenvolvimento inicial (Takata et al., 2014); a captura, adaptação e controle artificial da reprodução (Costa et al., 2015); o comportamento alimentar e efeito do fotoperíodo sobre o desempenho e parâmetros hematológicos (Kitagawa et al., 2015); a digestibilidade de ingredientes em dietas para juvenis de pacamã (Melo et al., 2015); tricaína como anestésico para larvas e juvenis de pacamã (Ribeiro et al., 2015); gelatina em substituição do coração bovino no treinamento alimentar (Salaro et al., 2015); os efeitos das concentrações diárias de náuplios de artêmia durante a produção de juvenis (Santos et al., 2015); efeitos da farinha de resíduos de manga na relação proteína:carboidratos no desempenho e composição corporal do pacamã (Souza et al., 2015); a morfologia externa durante as etapas precoce de desenvolvimento (Assega et al., 2016); a elevada densidade populacional durante a larvicultura e efeito do tamanho da dieta na produção de juvenis (Cordeiro et al., 2016); os efeitos da cor ambiental sobre o crescimento, metabolismo, fisiologia e pigmentação do pacamã (Costa et al., 2016a); efeitos da temperatura no crescimento, sobrevivência e parâmetros fisiológicos em juvenis (Costa et al., 2016b); técnicas de sexagem precoce (Filho et al., 2016); digestibilidade de ingredientes em dietas para juvenis de pacamã (Melo et al., 2016), dentre outros experimentos já realizados.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN JR, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. Desenvolvimento e processo de aprovação de novos medicamentos: toxicologia. In:____. *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. Santa Catarina: Caroline Vieira, 2013. 28-66p.

AREZON, A. *Manual sobre toxicidade em efluentes industriais*: Tipos de ensaios de toxicidade. Porto Alegre: CEP SENAI de Artes Gráficas Henrique d'Ávila Bertaso, 2011, 40p.

ASSEGA, F.M.; BIRINDELLI, J.L.O.; BIALETZKI, A.; SHIBATTA, O.A. External morphology of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 during early stages of development, and its implications for the evolution of Pseudopimelodidae (Siluriformes). *PLoS ONE.*, v.11., 2016. Disponibilidade e acesso: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0153123> Acesso em: 15 dez. 2016.

BAILEY, G.W.; WHITE, J.L. Review of adsorption and desorption of organic pesticides by soil colloids with implications concerning pesticide bioactivity. *J. Agric. Food Chem.*, v.12, p.324-332, 1964.

BATISTA, A.L.D.; FILHO, R.M.; TAKATA, R. *et al.* Incubação de ovos de pacamã com florfenicol. *Pesqui. Agropec. Bras.*, v.49, p.911-914, 2014.

BAYLIS, A.D. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest. Manag. Sci.*, v.56, p.299-308, 2000.

BERTOLLETI, E. Ecotoxicologia aquática. In: MAIA, N.B., MARTOS, HL., BARRELA, W. *Indicadores ambientais: conceitos e aplicações*. São Paulo: EDUC, 2001. 219-228p.

BORGGGAARD, O.K.; GIMSING, A.L. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surfasse Waters: a review. *Pest. Manag. Sci.*, v.64, p.441-456, 2008.

BOTT, S.; TEFAMARIAM, T.; KANIA, A. *et al.* Phytotoxicity of glyphosate soil residues re-mobilised by phosphate fertilisation. *Plant Soil.*, v.342, p.249-263, 2011.

BRAUNER, C.J.; ROMBOUGH, P.J. Review Ontogeny and paleophysiology of the gill: New insights from larval and air-breathing fish. *IPCS. Joint. Ser.*, v.184, p.293-300, 2012.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente, Portaria MMA nº 445, de 17 de dezembro de 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção - Peixes e Invertebrados Aquáticos.

BRAZ-MOTA, S.; SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; DUARTE, R.M. et al. Roundup exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. *Chemosphere.*, v.135, p.53-60, 2015.

BUSSE, M.D.; RATCLIFF, A.W.; SHESTAK, C.J. POWERS, R.B. Glyphosate toxicity and effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.*, v.33, p.1777-1789, 2001.

CARDOSO, E.L.; CHIARINI-GARCIA, H.; FERREIRA, R.M.A.; POLI, C.R. Morphological changes in the gills of *Lophiosilurus alexandri* exposed to un-ionized ammonia. *J. Fish. Biol.*, v.49, p.778-787, 1996.

CASTRO, J.S.; SILVA, J.S.; FREITAS, L.C.; CARVALHO-NETA, R.N.F. Biomarcadores histopatológicos na espécie *Hoplias malabaricus* (Pisces, Osteichthyes, Erythrinidae) em uma Unidade de Conservação de São Luís (MA). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, p.1687-1694, 2014.

CHAN, Y.C.; CHANG, S.C.; HSUAN, S.L. et al. Cardiovascular effects of herbicides and formulated adjuvants on isolated rat aorta and heart. *Toxicol. in Vitro.*, v.21, p.595-603, 2007.

CORDEIRO, N.I.S.; COSTA, D.C.; SILVA, W.S. et al. High stocking density during larviculture and effect of size and diet on production of juvenile *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae). *J. Appl. Ichthyol.*, v.32, p.61-66, 2016.

COSTA, C.R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.; ESPINDOLA, E.L.G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quim. Nova.*, v.31, p.1820-1830, 2008.

COSTA, D.C.; MATTIOLI, C.C.; SILVA, W.S. et al. The effect of environmental colour on the growth, metabolism, physiology and skin pigmentation of the carnivorous freshwater catfish *Lophiosilurus alexandri*. *J. Fish Biol.*, doi:10.1111/jfb.13208. 2016.a.

COSTA, D.C.; SILVA, W.S.; FILHO, R.M. et al. Capture, adaptation, and artificial control of reproduction of *Lophiosilurus alexandri*: A carnivorous freshwater species. *Anim. Reprod. Sci.*, v.159, p.148-154, 2015.

COSTA, P.C.; LEME, F.O.P.; TAKATA, R. et al. Effects of temperature on growth, survival and physiological parameters in juveniles of *Lophiosilurus alexandri*, a carnivorous neotropical catfish. *Aquac. Res.*, v.47, p.1706, 1715, 2016b.

COUPE, R.H.; KALKHOFF, S.J.; CAPELC, P.D.; GREGOIRE, C. Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. *Pest. Manag. Sci.*, v.68, p.16-30, 2011.

CURRIE, Z.; PROSSER, R.S.; RODRIGUEZ-GIL, J.K. *et al.* Toxicity of Cúspide 480SL[®] spray mixture formulation of glyphosate to aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.34, p.1178-1184, 2015.

DEEPANANDA, K.H.M.; GAJAMANGE, D.; SILVA, W.A.J.P.; WEGIRIYA, H.C.E. Acute toxicity of a glyphosate herbicide, Roundup[®], to two freshwater crustaceans. *J. Natn. Sci. Foundation. Sri. Lanka.*, v.39, p.169-173, 2011.

DELMONICO, E.L.; BERTOZZI, J.; SOUZA, N.E. *et al.* Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid for assessing the quality tap water using SPE and HPLC. *Acta Sci-Techol.*, v.36, p.513-519, 2014.

DILL, G.M.; SAMMONS, D.; FENG, C.C. *et al.* Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. In: NANDULA, V.K. *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management*. New Jersey: Wiley, 2010. p.1-33.

DUKE, S.O. Glyphosate. In: *Herbicides - Chemistry, Degradation and Mode of Action*; KEARNEY, P. C.; KAUFMAN, D. D. New York: Dekker, 1988; p.1-70.

DUKE, S.; POWLES, S. Mini-review. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest. Manag. Sci.*, v.64, p.319-325, 2008.

DUKE, S.O.; LYDON, J.; KOSKINEN, W.C. *et al.* Glyphosate effects on plant mineral nutrition, crop rhizosphere microbiota, and plant disease in glyphosate-resistant crops. *J. Agric. Food. Chem.*, v.60, p.10375-10397, 2012.

EGGEN, R.; BEHRA, R.; BURKHARDT-HOLM, P. *et al.* Challenges in ecotoxicology. *Environ. Sci. Technol.*, v.38, p.58-64, 2004.

ERMAKOVA, I.T.; KISELEVA, N.I.; SHUSHKOVA, T. *et al.* Bioremediation of glyphosate-contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.88, p.585-594, 2010.

EVANS, D.H. The Fish Gill: Site of Action and Model for Toxic Effects of Environmental Pollutants. *Environ. Health Persp.*, v.71, p.47-58, 1987.

EVRARD, E.; MARCHAND, J.; THERON, M. *et al.* Impacts of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder *Platichthys flesus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.152, p.321-331, 2010.

FIGUEIREDO, R.A.C.R.; SOUZA, R.C.; BEZERRA, K.S. *et al.* Relação proteína: carboidrato no desempenho e metabolismo de juvenis de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, p.1567-1576, 2014.

FILHO, R.M.; GHELLER, V.A.; CHAVES, G.V. Early sexing techniques in *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1876) a freshwater carnivorous catfish. *Theriogenology.*, v.86, p.1523-1529, 2016.

FILHO, R.M.; TAKATA, R.; SANTOS, A.E. H. *et al.* Draining system and feeding rate during the initial development of *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1877), a carnivorous freshwater fish. *Aquac. Res.*, v.45, p.1913-1920, 2014.

FRANZ, J.E., MAO, M.K., SIKORSKI, J.A. *Glyphosate: a unique global herbicide*. Washington: ACS, 1997.

FUENTES, L.; MOORE, L.J.; RODGERS, J.H. *et al.* Comparative toxicity of two glyphosate formulations (original formulation of Roundup and Roundup Weathermax) to six north american larval anurans. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.30, p.2756-2761, 2011.

GHIMIRE, N.; WOODWARD, R.T. Under and over use of pesticides: An international analysis. *Ecol. Econ.*, v.89, p.73-81, 2013.

GIESY, J.P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K.R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, v.167, p.35-120, 2000.

GOMES, M.P.; SMEDBOL, E.; CHALIFOUR, A. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *J. Exp. Bot.*, v.65, p.469-4703, 2014.

GUILHERME, S.; GAIVÃO, I.; SANTOS, M.A.; PACHECO, M. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide-elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. *Mutat. Res.*, v.743, p.1-9, 2012.

GUIMARÃES-CRUZ, R.J.; VELOSO-JUNIOR, V.C.; SALES, N.G. *et al.* Allometric larval growth of the bottom-dwelling catfish *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, p.284-288, 2014.

HELANDER, M.; SALONIEMI, I.; SAIKKONEN, K. Glyphosate in northern ecosystems. *Trends Plant. Sci.*, v.17, p.569-574, 2012.

HOCHBERG, E.G. The market for agricultural pesticide inert ingredients and adjuvants. In: FOY, C.L., PRITCHARD, D.W. *Pesticide Formulation and Adjuvant Technology*. Boca Raton: CRC Press, 1996. p.203-208.

HUED, A.C.; OBERHOEFER, S.; BISTONI, M.L.A. Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup) alters normal gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v.62, p.107-117, 2012.

HUGHES, G.M.; PERRY, S.F.; BROWN, V.M. A morphometric study of effects of nickel, chromium and cadmium on the secondary lamellae of rainbow trout gills. *Water Res.*, v.13, p.665-679, 1979.

JIRAUNGKOORSKULL, W.; UPATHAM, E.S.; KRUATRACHUE, M. *et al.* Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *ScienceAsia.*, v.28, p.121-127, 2002.

JIRAUNGKOORSKULL, W.; UPATHAM, E.S.; KRUATRACHUE, M. *et al.* Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ. Toxicol.*, v.18, p.260-267, 2003.

JUNIOR, O.P.A.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M. *et al.* Gifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quim. Nova.*, v.25, p.589-593, 2002.

KANEKO, T.; WATANABE, S.; LEE, K.M. Functional morphology of mitochondrion-rich cells in euryhaline and stenohaline teleosts. *Aqua-BioSci. Monogr.*, v.1, p.1-62, 2008.

KIRSCH, R.; HUMBERT, W.; RODEAU, L. Control of the blood osmolarity in fishes with reference to the functional anatomy of the gut, In: A. PEQUEUX., R.R. GILLES., L. BOLIS. *Osmoregulation in estuarine and marine animals*. Berlin: Springer, 1984. p.68-93.

KITAGAWA, A.T.; COSTA, L.S.; PAULINO, R.R. *et al.* Feeding behavior and the effect of photoperiod on the performance and hematological parameters of the pacamã catfish (*Lophiosilurus alexandri*). *Appl. Anim. Behav. Sci.*, v. 171, p.211-218, 2015.

KREUTZ, C.K.; BARCELLOS, L.J.; VALLE, S.F. *et al.* Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. *Fish. Shellfish Immun.*, v.30, p.51-57, 2011.

KROGH, K.A.; HALLING-SØRENSEN, B.; MOGENSEN, B.B. *et al.* Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere.*, v.50, p.871-901, 2003.

KRYUCHKOVA, Y.V.; BURYGINA, G.L.; GOGOLEVAB, N.E. *et al.* Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, *Enterobacter cloacae* K7. *Microbiol. Res.*, v.169, p.99-105, 2014.

LANCTÔT, C.; ROBERTSON, C.; NAVARRO-MARTÍN, L. Effects of the glyphosate-based herbicide Roundup WeatherMax[®] on metamorphosis of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) in natural wetlands. *Aquat. Toxicol.*, v.140-141, p.48-57, 2013.

LINS, J.A.P.N.; KIRSCHNIK, P.G.; QUEIROZ, V.S.; CIRIO, S.M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. *Rev. Acad. Ciênc. Agrár. Ambient.*, v.8, p.469-484, 2010.

LIU, C.M.; MCLEAN, P.A.; SOOKDEO, C.C.; CANNON, F.C. Degradation of the Herbicide Glyphosate by Members of the Family *Rhizobiaceae*. *Appl. Environ. Microb.*, v.57, p.1799-1804, 1991.

LUSHCHAK, O.V.; KUBRAK, O.I.; STOREY, J.M. *et al.* Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere.*, v.76, p.932-937, 2009.

LUZ, R.K.; COSTA, L.S.; RIBEIRO, P.A.P. *et al.* Influência do tempo de transporte para juvenis de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, p.1895-1898, 2013.

LUZ, R.K.; SANTOS, J.C.E. Densidade de estocagem e salinidade da água na larvicultura do pacamã. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.43, p.903-909, 2008a.

LUZ, R.K.; SANTOS, J.C.E. Avaliação da tolerância de larvas do pacamã *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1877 (Pisces: Siluriformes) a diferentes salinidades. *Acta Sci. Biol. Sci.*, v.30, p.345-350, 2008b.

LUZ, R.K.; SANTOS, J.C.E. Reprodução e larvicultura do pacamã *Lophiosilurus alexandri*. In: TAVARES-DIAS, M. & MARIANO, W.S. *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. São Carlos: Editora Perdo & João, 2015. p.473- 491.

MA, J.; LI, X. Alteration in the cytokine levels and histopathological damage in common carp induced by glyphosate. *Chemosphere.*, v.128, p.293-298, 2015.

MACHADO, M.R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. *Ciênc. Biol. Saúde.*, v.1, p 63-76, 1999.

MALLATT, 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.

MATTOS, M.L.T.; PERALBA, M.C.R.; DIAS, S.L.P. *et al.* Monitoramento ambiental do glifosato e do seu metabólito (ácido aminometilfosfônico) na água de lavoura de arroz irrigado. *R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente*, Curitiba., v.12, p. 145-154, 2002.

MELETTI, P.C.; ROCHA, O.; MARTINEZ, C.B.R. Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. In: BRIGANTE, J., ESPÍNDOLA, E.L.G. *Limnologia Fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçú*. São Paulo: São Carlos, 2003. p.149-180.

MELLO, G.C.G.; SANTOS, J.E.S.; GUIMARÃES-CRUZ. *et al.* Allometric larval growth of the bottom-dwelling catfish *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae). *Neotrop. Ichthyol.*, v.13, p.677-684, 2015.

MELO, K.D.M.; OLIVEIRA, G.R.; BRITO, T.S. *et al.* Digestibilidade de ingredientes em dietas para juvenis de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). *Pesq. Agropec. Bras.*, v.51, p.785-788, 2016.

MENSAH, P.K.; MULLER, W.J. Acute toxicity of Roundup herbicide to three life stages of the freshwater shrimp *Caridina nilotica* (Decapoda: Atyidae). *Phys. Chem. Earth.*, v.36, p.905-909, 2011.

METCALF, L.; EDDY, H.P. Características do esgoto: Toxicidade. In: _____. *Tratamento de efluentes e recuperação de recursos*. São Paulo: MCGRAW-HILL BRASIL, 2015. 158-165p.

MOREIRA, R.G.; MIMURA, O.M.; LIMA, R.I.V.A.; BERNARDINO, G. Concentração iônica plasmática e biliar do “curimbatá” *Prochilodus scrofa* STEINDACHER (OSTEICHTHYES, CHARACIFORME) em relação aos estádios de repouso e maduro do ciclo reprodutivo. *Revta Bras. Zoo.*, v.15, p.211-217, 1998.

NOGUEIRA, D.J.; CASTRO, S.C.; RIGOLIN-SÁ, O. Utilização das brânquias de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) (Teleostei, Characidae) como biomarcador de poluição ambiental no reservatório UHE Furnas-MG. *Rev. Bras. Zoocienc.*, v.11, p.227-232, 2008.

NOWAK, B. Histological changes in gills induced by residues of endosulfan. *Aquatic. Toxicol.*, v.23, p.65-84, 1992.

PARK, K.; KIM, W.; KIM, H.Y. Optimal lamellar arrangement in fish gills. *P. Natl. A. Sci. USA.*, v.111, p.8067-8070, 2014.

PEAKALL, D.W.; WALKER, C.H. *et al.* The role of biomarkers in environmental assessment. *Ecotoxicology.*, v.3, p.173-179, 1994.

PROSSER, R.S.; ANDERSON, J.C.; HANSON, M.L. *et al.* Indirect effects of herbicides on biota in terrestrial edge-of-field habitats: A critical review of the literature. *Arg. Ecosyst. Environ.*, v.232, p.59-72, 2016.

RADOSEVICH, S.; HOLT, J.; GHERSA, C. *Ecology of Weeds and Invasive Plants: Relationship to Agriculture and Natural Resource Management*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2007. 472p.

RIBEIRO, P.A.P.; MIRANDA-FILHO, K.C.; MELILLO, R. *et al.* Efeito do anestésico eugenol em juvenis de pacamã. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.48, p.1136-1139, 2013.

RIBEIRO, P.A.P.; MELO, D.C.; SANTO, A.H.E. *et al.* Tricaine as na anaesthetic for larvae and juveniles of *Lophiosilurus alexandri*, a carnivorous freshwater fish. *Aquac. Res.*, v.46, p.1788-1792, 2015.

ROMBOUGH, P. The functional ontogeny of the teleost gill: which comes first, gas or ion exchange? *Comp. Biochem. Physiol.*, v.148, p.732-742, 2007.

ROY, D.; KONER, S.; BANERJEE, S. *et al.* Persistence, movement and degradation of glyphosate in selected Canadian boreal forest soils. *J. Agr. Food Chem.*, v.37, p.551-559, 1989.

RUALES, C.A.D.; TORRES, W.V. Transporte iónico en el epitelio branquial de peces de agua Dulce. *Rev. Lasallista. Investig.*, v.7, p.85-99, 2010.

RUIZ-TOLEDO, J.; CASTRO, R.; RIVERO-PÉREZ, N. *et al.* Occurrence of Glyphosate in Water Bodies Derived from Intensive Agriculture in a Tropical Region of Southern Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.93, p.289-293, 2014.

SALARO, A.L.; JUNIOR, J.C.; LIMA, F.W. *et al.* Gelatin in replacement of bovine heart in feed training of *Lophiosilurus alexandri* in diferente water salinities. *Anais Acad. Bras. Cienc.*, v.87. p. 2281, 2287, 2015.

SANTOS, H.B.; SAMPAIO, E.V.; ARANTES, F.P.; SATO, Y. Induced spawning and reproductive variables of the catsfish *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae). *Neotrop. Ichthyol.*, v.11, p.607-614, 2013.

SANTOS, J.C.E.; CORREA, E.D.; LUZ, R.K. Effect of daily artemia nauplii concentrations during juvenile production of *Lophiosilurus alexandri*. *Bol. Inst. Pesca.*, v.41, p771-776, 2015.

SANTOS, J.C.E.; LUZ, R.K. Effect of salinity and prey concentrations of *Pseudoplatystoma corruscans*, *Prochilodus costatus* and *Lophiosilurus alexandri* larviculture. *Aquaculture*, v.287, p. 324-328, 2009.

SATO, Y.; SAMPAIO, E.V. A ictiofauna na região do alto São Francisco, com ênfase no reservatório de Três Marias, Minas Gerais. In: NOGUEIRA, M.G.; HENRY, R.; JORCIN, A. Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata. São Carlos: RiMa, 2005. p.251-274.

SHIBATA, O.A. Family Pseudopimelodidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JÚNIOR, C.J. *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p.401-405.

SHIOGIRI, N.S.; PAULINO, M.G.; CARRASCHI, S.P. *et al.* Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Environ. Toxicol. Phar.*, v.34, p.388-396, 2012.

SHUSHKOVA, T.; ERMAKOVA, I.; LEONTIEVSKY, A. Glyphosate bioavailability in soil. *Biodegradation.*, v.21, p.403-410, 2010.

SINHORIN, V.D.G.; SINHORIN, A.P.; TEIXEIRA, J.M.S. *et al.* Metabolic and behavior changes in surubim acutely exposed to a glyphosate-based herbicide. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v.67, p.659-667, 2014a.

SINHORIN, V.D.G.; SINHORIN, A.D.P.; TEIXEIRA, J.M.S. *et al.* Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp). *Ecotox. Environ. Safe.*, v.106, p.181-187, 2014b.

SOUZA, A.M.; MELO, J.F.B.; MOREIRA, E.M.S.; SOUZA, E.M. The effect of mango waste meal in the protein: carbohydrate ratio on performance and body composition of pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.67, p.527-534, 2015.

SPRANKLE, P.; MEGGITT, W.F.; PENNER, D. Adsorption, mobility and microbial degradation of glyphosate in the soil. *Weed Sci.*, v.23, p.229-234, 1975.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. An atlas of fish histology: normal and pathological features. Tokyo: Kodansha, 1995. 864p.

TAKATA, R.; SILVA, W.S.; COSTA, D.C. *et al.* Effect of water temperature and prey concentrations on initial development of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae), a freshwater fish. *Netrop. Ichthyol.*, v.12, p.853-859, 2014.

TENORIO, R.A.; SANTOS, A.J.G.; LOPES, J.P. *et al.* Crescimento do niquim (*Lophosilurus alexandri* Steindachner 1876), em diferentes condições de luminosidade e tipos de alimento. *Acta. Anim. Sci.*, v.28, p.305-309, 2006.

THOMPSON, D.G.; PITT, D.G. A review of Canadian forest vegetation management research and practice. *Ann. For. Sci.*, v.60, p.559-572, 2003.

TONI, L.R.M.; SANTANA, H.; ZAIA, S.A.M. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. *Quim. Nova.*, v.29, p.829-833, 2006.

TRAVASSOS, H. Nótula sobre o pacamã. *Lophosilurus alexandri* Steindachner, 1876. *Atas Soc. Biol.*, v.4, p.1-2, 1959.

TRAVASSOS, H. Catálogo dos peixes do vale do Rio São Francisco. *Bol. Soc. Cearense Agron.*, v.1, p.36, 1960.

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.

VERECKEN, H. Review. Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest. Manag. Sci.*, v.61, p.1139-1151, 2005.

VOLPATO, G.L. Comportamento e bem-estar. In: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J.C.E.P.; URBINATI, E.C. *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce*. Jaboticabal: FUNEP, 2014. p.59-82.

WILLIAMS, B.K.; SEMLITSCH, R.D. Larval responses of three midwestern anurans to chronic, low-dose exposures of four herbicides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v.58, p.819-827, 2010.

WHO - World Health Organization. Glyphosate and AMPA in drinking-water. Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. Geneva: WHO, 2005.

WOODBURN, A.T. Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest Manag. Sci.*, v.56, p.309-312, 2000.

ZALIZNIAK, L.; NUGEGODA, D. Roundup biactive modifies cadmium toxicity to *Daphnia carinata*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.77, p.748-754, 2006.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar efeitos da exposição do glifosato em juvenis de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*).

4.2. Objetivos específicos

- Estimar a concentração letal mediana (CL₅₀;96h) do glifosato para juvenis de pacamã, por meio de teste de toxicidade aguda e os respectivos níveis de segurança;
- Realizar exposição de juvenis em concentrações subletais do glifosato em teste de toxicidade crônica;
- Avaliar alterações histológicas no fígado e nas brânquias dos juvenis de pacamã expostos ao glifosato.

5. ARTIGO – Alterações histológicas em *Lophiosilurus alexandri* expostos ao glifosato

Stella Rubim de Sousa^{a-1}, Marilia Martins Melo^b, Benito Soto Blanco^b, Renata Rodrigues Sampaio^a, Franklin Fernando Batista da Costa^a, Luciano dos Santos Rodrigues^c, Ricardo Marcelo Geraldi^a, Ronald Kennedy Luz^a, Kleber Campos Miranda Filho^a.

^a Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

^b Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

^c Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

RESUMO

O Roundup[®] Original é um herbicida que contém em sua formulação o ingrediente ativo glifosato. Esta formulação comercial é amplamente utilizada em nível global e sua principal função é combater ervas daninhas na agricultura. Devido à grandes aplicações deste herbicida, o glifosato e seus principais metabólitos têm sido detectados em águas superficiais e subterrâneas, gerando preocupações quanto aos seus efeitos em

organismos não-alvos, principalmente animais aquáticos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos deletérios do Roundup® Original (N-(fosfometil) glicina) em juvenis do peixe pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). Para isto, foram realizados testes de toxicidade aguda (96 h) e teste subcrônico (19 dias) de exposição ao herbicida. No primeiro teste de toxicidade aguda, foram testadas as concentrações de 0,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0 mg L⁻¹ de glifosato diluído em água, em animais de 0,05±0,01 g; 1,80±0,10 cm. A concentração letal mediana (CL₅₀-96h) estimada foi de 2,71 mg L⁻¹ de glifosato e o nível de segurança em 0,27 mg L⁻¹ de glifosato. Estudos histológicos possibilitaram a observação de alterações branquiais, tais como: descolamento do epitélio lamelar, aneurisma, hiperplasia e fusão lamelar em animais mantidos na presença do agente tóxico. Para o segundo teste de toxicidade aguda, foram utilizados animais de 4,03±1,26 g; 6,97±0,65 cm. As concentrações de glifosato testadas foram 0,0; 3,0; 6,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mg L⁻¹. A CL₅₀-96 h e o nível de segurança estimados foram de 4,21 e 0,42 mg L⁻¹ de glifosato, respectivamente. Brânquias e fígados avaliados neste experimento demonstraram alterações teciduais como: descolamento do epitélio lamelar com edema intersticial, hiperplasia das lamelas secundárias, hipertrofia de células de cloreto, desarranjo do formato das células hepáticas com presença de algumas áreas necróticas e com núcleos picnóticos. O último experimento, caracterizado pela exposição de juvenis (21,69±3,89 g; 11,45±0,79 cm) às concentrações subletais de 0,0; 0,42 e 0,21 mg L⁻¹ de glifosato, ocasionou mortalidade de 25% dos animais expostos à maior concentração, além da presença animais letárgicos nas concentrações testadas, com exceção do grupo controle. A histologia aplicada para fígado e brânquias dos juvenis do teste subcrônico, também demonstrou alterações teciduais, porém em menor proporção em relação aos testes de exposição aguda. Desta forma, podemos sugerir que o Roundup® Original seja potencialmente tóxico para *L. alexandri*, visto que concentrações baixas de glifosato provocaram mortalidade, além de alterações histológicas e comportamentais.

Palavras-chave: “Pacamã”; glifosato; contaminação; toxicidade; histologia.

1. INTRODUÇÃO

O Glifosato [N- (fosfometil) glicina] é um herbicida não-seletivo, sistêmico e de amplo espectro. Desde a sua introdução e comercialização no mercado, no ano 1974, este composto tornou-se o herbicida mais utilizado mundialmente (Franz et al., 1997;

Duke e Powles, 2008; Dill et al., 2010). Atualmente, o glifosato ainda é considerado o principal herbicida aplicado para o combate de uma grande variedade de ervas daninhas em culturas de plantas de interesse econômico, e o seu uso aumentou ainda mais com a introdução de plantas modificadas geneticamente e resistentes a este herbicida (Helander et al., 2012; Székács e Darvas, 2012). O glifosato também possui popularidade na silvicultura, uso doméstico e gramados de jardins (Annett et al., 2014). No Brasil, este herbicida tem sido amplamente utilizado em cultivos como arroz, soja, café, cana-de-açúcar, milho e trigo (Braz-Mota et al., 2015).

O glifosato atua inibindo a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPs), da via do chiquimato, presente em plantas, fungos e alguns microrganismos. Esta enzima catalisa a condensação do fosfato piruvato e ácido chiquímico, que por sua vez sintetizam três aminoácidos essenciais: fenilalanina, triptofano e tirosina (Sternensen, 2004; Duke et al., 2012; Helander et al., 2012). Apesar do herbicida em questão ser considerado relativamente não tóxico para animais e ambientalmente seguro, algumas preocupações com relação a resíduos nos solos e o seu transporte para águas superficiais e subterrâneas vêm sendo apontadas (Duke et al., 2003; Koskinen, 2016).

Sabe-se que uma parcela de glifosato aplicada em campo pode sofrer degradação biológica por microrganismos e ser adsorvida formando complexos de moléculas de glifosato com as superfícies dos colóides do solo (Duke et al., 2012). Entretanto, grandes aplicações do herbicida podem resultar no seu transporte para ambientes aquáticos. O composto glifosato pode sofrer transporte coloidal, ligado à colóides do solo, ou ser transportado como soluto. Ambas as formas podem se mover por meio de escoamento superficial e sub-superficial, podendo atingir águas abertas e subterrâneas (Borggaard e Gimsing, 2008).

Estudos de toxicidade aguda e crônica utilizando herbicidas à base de glifosato têm sido realizados em animais aquáticos a fim de verificar seus efeitos nos organismos não-alvos (Lushchak et al., 2009; Hued et al., 2012; Shiogiri et al., 2012; Sinhorin et al., 2014a; Sinhorin et al., 2014b; Currie et al., 2015; Ma e Li, 2015).

O Pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) é um peixe carnívoro, pertencente à família Pseudopimelodidae e nativo da bacia do rio São Francisco, Brasil. Este animal é considerado de alto valor comercial, possuindo carne muito apreciada. Como a espécie é alvo da pesca extrativista, a mesma vem sofrendo drástica redução na sua comercialização e, recentemente, foi apontada como espécie ameaçada de extinção

(Travassos, 1960; Shibata, 2003; Tenório et al., 2006; Luz e Santos, 2008; MMA, 2014; Costa et al., 2015). Por essas razões, o pacamã vem sendo estudado visando a sua criação em cativeiro.

Considerando a grande utilização de herbicidas à base de glifosato no setor agrário e à possibilidade de ocorrência de contaminação em corpos hídricos, este trabalho visa estimar a toxicidade aguda do Roundup Original (Roundup[®], N-(fosfometil) glicina, Monsanto, Brasil) em formas jovens de pacamã e avaliar os efeitos sub-letais por meio de teste subcrônico, aplicando-se a histologia como biomarcador.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Produto Químico

A formulação comercial de glifosato, Roundup[®] Original, produzida pela Monsanto do Brasil Ltda, foi utilizada para os testes de toxicidade aguda e crônica. O composto possui como ingrediente ativo 480 g L⁻¹ de sal de Isopropilamina de N - (fosfometil) glicina (equivalente a 360 g L⁻¹ de glifosato).

2.2. Local de experimento e animais-teste

Os peixes da espécie *L. alexandri* utilizados no presente trabalho foram adquiridos do Laboratório de Aquacultura da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), onde também foram realizados os ensaios experimentais.

2.3. Qualidade da Água

A água utilizada nos testes de toxicidade aguda e subcrônica foi proveniente de poço artesiano, sendo previamente armazenada e mantida a uma temperatura em torno de 28°C, com aeração constante. Durante os experimentos, foram monitoradas diariamente, as seguintes variáveis: temperatura, pH, salinidade e condutividade elétrica, mensuradas empregando-se o aparelho multiparâmetros portátil (Hanna, modelo HI 98130); oxigênio dissolvido, medido com uso de oxímetro portátil (Hanna, modelo HI 9146) e as análises de alcalinidade, amônia, nitrito, nitrato e fosfatos foram realizadas de acordo com as metodologias descritas em APHA (1998).

2.4. Testes de toxicidade aguda

Toxicidade aguda em formas jovens de Pacamã

Para os testes de toxicidade foi utilizada a formulação comercial Roundup® diluída em água. Antecedendo-se aos testes de toxicidade aguda, foram realizados testes preliminares para a definição das concentrações definitivas a serem testadas.

Para o primeiro teste de toxicidade aguda com juvenis de Pacamã ($0,05 \pm 0,01$ g e $1,80 \pm 0,10$ cm), seis concentrações de glifosato foram testadas (2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e $5,0 \text{ mg L}^{-1}$) e um grupo controle foi mantido em água sem adição do herbicida ($0,0 \text{ mg L}^{-1}$). O experimento foi realizado em duplicata e os animais foram mantidos em béqueres de 1 L, alocados em câmaras incubadoras tipo DBO a uma temperatura de aproximadamente $28 \text{ }^\circ\text{C}$, e fotoperíodo controlado de 12 horas de luz. Em todos os béqueres foi fornecida aeração constante com difusores de ar. Para cada repetição, 15 juvenis de pacamã foram avaliados, totalizando 210 animais. Os animais submetidos ao período de 96 h de exposição ao glifosato foram mantidos em jejum. A cada 24 h houve renovação de 50% dos meios experimentais. Os animais foram observados diariamente e aqueles que estavam mortos (não apresentando mobilidade quando tocados com pipeta Pasteur) foram retirados dos béqueres, identificados e contabilizados. Seis animais de cada tratamento foram selecionados aleatoriamente para análise histológica das brânquias e, para isso, foram fixados inteiros em solução de Bouin. O fígado dos animais deste experimento não foi avaliado devido ao pequeno tamanho dos indivíduos. Ao final do período experimental, foram estimadas as concentrações letais medianas (CL_{50}) de 24, 48, 72 e 96 h para juvenis de pacamã empregando-se o software Trimmed Spearman Karber method.

Para o segundo teste de toxicidade aguda de 96 h utilizando juvenis ($4,03 \pm 1,26$ g e $6,97 \pm 0,65$ cm) foram avaliadas cinco concentrações de glifosato (3,0; 6,0; 10,0; 15,0 e $20,0 \text{ mg L}^{-1}$), somadas ao grupo controle ($0,0 \text{ mg L}^{-1}$). O teste foi realizado em duplicata e os animais foram mantidos com privação de alimento, em recipientes de polipropileno (20 L) em banho termostatizado para manter a temperatura em aproximadamente 28°C . Em todos os meios testados foram fornecidos aeração constante. Em cada recipiente foram colocados 10 juvenis de pacamã, totalizando 120 animais. A cada 24 h, houve renovação total dos meios experimentais. Diariamente foi observado o comportamento dos pacamãs e os animais mortos ou sem mobilidade foram retirados do sistema. Os

animais moribundos foram insensibilizados com gelo, sacrificados por sangria e contabilizados. Em seis animais de cada grupo foram coletadas amostras de fígado e brânquias para estudo histológico. Ao final do experimento foram estimadas as CL_{50-24} , -48, -72 e -96h.

2.5. Teste de toxicidade subcrônica

O teste subcrônico teve duração de 19 dias. Juvenis ($21,69 \pm 3,89$ g; $11,45 \pm 0,79$ cm) foram expostos a duas concentrações de glifosato (0,42 e 0,21 mg L⁻¹), a primeira como sendo o nível de segurança para juvenis de 4,0 g, obtida a partir da fração 1/10 da CL_{50-96h} , conforme proposto por Sprague (1971). A segunda concentração foi definida atendendo a metade do nível de segurança para juvenis de 4,00 g e o nível de segurança para juvenis de 0,05 g. O grupo controle permaneceu em água sem adição do herbicida (0,0 mg L⁻¹).

O experimento subcrônico foi realizado em duplicata e os animais permaneceram confinados em caixas de PVC de 100 L. Em cada caixa foram distribuídos 18 juvenis de pacamã, perfazendo 36 animais por tratamento. Durante o experimento, os animais foram alimentados com dieta extrusada comercial (45% proteína bruta, 4% fibra bruta, 15% material mineral, 8% extrato etéreo, 2% cálcio, 1% fósforo), duas vezes ao dia (08:00 e 16:00 h), até saciedade aparente. Todo o sistema foi mantido com fotoperíodo de 12 h. Diariamente 50% dos meios experimentais foram renovados com as respectivas concentrações de glifosato. Ao final do experimento, seis animais de cada tratamento foram amostrados aleatoriamente, insensibilizados em gelo e sacrificados para retirada de amostras de fígado e brânquias para estudo histológico.

2.6. Histologia

As brânquias e o fígado, dos animais provenientes dos testes de toxicidade aguda e subcrônica, foram colocados em cassetes histológicos e fixados em solução de Bouin durante 12 h, e posteriormente mantidas em álcool 70%. Em seguida, as peças foram desidratadas em banhos sucessivos de etanol, diafanizados em xilol e incluídas em parafina. Para a montagem das lâminas, foram realizados cortes de 5 µm do material biológico previamente emblocado. Posteriormente, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e as observações teciduais e celulares foram realizadas em microscopia ótica. Para avaliação das brânquias, sempre foram avaliados o segundo arco branquial do lado direito dos animais.

Ao final do teste de toxicidade subcrônica, o segundo arco branquial do lado direito dos animais experimentais foi fixado em solução Karnovsky modificado (Glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em tampão fosfato) por um período de 24 h, em temperatura de 4°C. A pós-fixação do material foi realizada em tetróxido de ósmio 1% (OsO₄) durante 1 hora e a desidratação realizada com banhos duplos e gradativos de etanol. As amostras sofreram secagem final através da câmara de ponto crítico de CO₂ e após serem metalizadas com ouro, foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (DMS 950, Zeiss), equipamento de onde também foram extraídas as eletromicrografias.

As alterações histológicas para cada órgão foram avaliadas de maneira semi-quantitativa pelo grau de alteração tecidual (DTC), baseando-se na gravidade das lesões. A metodologia empregada foi adaptada de Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994), Bernet et al. (1999) e Abdel-Moneim et al. (2012). Para o DTC, as alterações em cada órgão foram classificadas quanto ao estágio progressivo de lesão tecidual, tais como: alterações de Fase I, que não alteram o funcionamento normal do tecido; alterações de Fase II, que são graves e prejudicam o funcionamento normal do tecido; e de Fase III, que são muito graves e causam danos irreparáveis. Para a brânquia, os tipos de lesões e seus respectivos estágios estão notados na tabela 1 e, para o fígado, as informações das lesões são demonstradas na tabela 2.

Para cada animal, o valor de DTC foi calculado através da fórmula:

$$DTC = (1 \times EI) + (10 \times EII) + (100 \times EIII),$$

onde, EI, EII e EIII correspondem ao número de alterações observadas nos estágios I, II e III, respectivamente.

Tabela 1. Lesões do tecido branquial e seus respectivos estágios quanto ao grau de lesões.

| Lesão do tecido branquial | Estágio |
|------------------------------------|----------------|
| Hiperplasia do epitélio lamelar | I |
| Desprendimento do epitélio lamelar | I |
| Fusão incompleta de várias lamelas | I |
| Hipertrofia de células de cloreto | I |
| Desorganização lamelar | I |
| Fusão completa de todas as lamelas | II |
| Aneurisma lamelar | II |
| Necrose | III |

* Adaptado de Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994), Bernet et al. (1999), e Abdel-Moneim et al. (2012).

Tabela 2. Lesões do tecido hepático e seus respectivos estágios quanto ao grau de lesões.

| Lesão do tecido hepático | Estágio |
|---------------------------------|----------------|
| Núcleo na periferia da célula | I |
| Deformação do contorno celular | I |
| Deformação do contorno nuclear | I |
| Hipertrofia celular | I |
| Hipertrofia nuclear | I |
| Vacuolização citoplasmática | I |
| Degeneração citoplasmática | II |
| Núcleo picnótico | II |
| Necrose focal | III |

* Adaptado de Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994), Bernet et al. (1999) e Abdel-Moneim et al. (2012).

Os valores obtidos para cada peixe foi utilizado para cálculo das médias dos animais de cada tratamento. Valores de DTC entre 0 e 10 indicaram funcionamento normal do órgão; valores entre 11 e 20 indicaram ligeiro dano ao órgão; valores entre 21 a 50 indicaram lesões moderadas; valores entre 51 e 100 indicaram graves lesões e, DTC acima de 100, indicaram danos irreparáveis ao órgão (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994).

2.7. Análise estatística e tratamento de dados

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste estatístico de Shapiro-Wilk ($\alpha=5\%$). Atendidos os pré-requisitos da estatística paramétrica, os dados médios foram submetidos ao teste one-way ANOVA e quando verificada diferença significativa, empregou-se o teste *a posteriori* de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Para a análise estatística foi utilizado o programa estatístico ASSISTAT (versão 7.7).

Para os resultados histopatológicos semi-quantitativos foi empregada a análise de variância por meio do teste de Kruskal-Wallis. Quando verificada diferenças significativas, a comparação entre os diferentes grupos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

As concentrações letais medianas (CL_{50}) e os respectivos intervalos de confiança (95%) foram estimados, a partir dos dados de mortalidade ao longo das 96 h de teste de toxicidade aguda, por meio do programa “Trimmed Spearman Karber method” (Hamilton et al., 1977).

3. RESULTADOS

3.1. Qualidade de água

Os resultados obtidos dos parâmetros de qualidade de água do primeiro teste de toxicidade aguda (pacamãs de aproximadamente 0,05 g), descritas na tabela 3, demonstraram que os valores médios das variáveis analisadas não divergiram entre os tratamentos, com exceção do parâmetro de condutividade, que apresentou valor médio estatisticamente superior no tratamento de 5 mg L⁻¹ de glifosato em relação aos demais tratamentos.

Tabela 3. Valores médios (\pm desvio padrão) de variáveis de qualidade de água durante o período de 96 h de exposição de juvenis de *Lophiosilurus alexandri* (0,05 g) a diferentes concentrações de Glifosato (Roundup®).

| Variáveis | Concentração de Glifosato (mg L ⁻¹) | | | | | | |
|--|---|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| | 0 | 2,5 | 3 | 3,5 | 4 | 4,5 | 5 |
| OD (mg.L ⁻¹) | 4,87 \pm 0,20a | 4,68 \pm 0,64a | 4,76 \pm 0,44a | 4,65 \pm 0,22a | 4,98 \pm 0,77a | 4,85 \pm 0,55a | 4,75 \pm 0,42a |
| Temperatura (°C) | 27,51 \pm 0,48a | 27,65 \pm 0,77a | 27,5 \pm 0,38a | 27,65 \pm 0,23a | 27,55 \pm 0,37a | 27,70 \pm 0,66a | 27,67 \pm 0,39a |
| pH | 7,60 \pm 0,50a | 7,67 \pm 0,59a | 7,62 \pm 0,41a | 7,68 \pm 0,24a | 7,66 \pm 0,44a | 7,79 \pm 0,28a | 7,65 \pm 0,44a |
| Salinidade (‰) | 0,078 \pm 0,0064a | 0,078 \pm 0,0063a | 0,076 \pm 0,0051a | 0,078,65 \pm 0,25a | 0,075 \pm 0,0054a | 0,075 \pm 0,01a | 0,072 \pm 0,0095a |
| Condutividade (μ S cm ⁻¹) | 0,017 \pm 0,064b | 0,173 \pm 0,063b | 0,171 \pm 0,005b | 0,177 \pm 0,01b | 0,173 \pm 0,005b | 0,175 \pm 0,01b | 0,525 \pm 0,095a |
| Alcalinidade (mg.L ⁻¹) | 57,50 \pm 8,66a | 57,50 \pm 6,89a | 57,5 \pm 8,66a | 57,5 \pm 3,53a | 57,5 \pm 8,66a | 58,75 \pm 10,3a | 58,75 \pm 7,5a |
| Amônia (mg.L ⁻¹) | 0,078 \pm 0,042a | 0,088 \pm 0,084a | 0,078 \pm 0,006a | 0,077 \pm 0,08a | 0,076 \pm 0,009a | 0,076 \pm 0,001a | 0,080 \pm 0,007a |
| Nitrito (mg.L ⁻¹) | 0,005 \pm 0,003a | 0,005 \pm 0,003a | 0,005 \pm 0,003a | 0,005 \pm 0,001a | 0,005 \pm 0,003a | 0,005 \pm 0,002a | 0,005 \pm 0,002a |
| Nitrato (mg.L ⁻¹) | 0,9468 \pm 0,016a | 0,933 \pm 0,038a | 0,950 \pm 0,010a | 0,959 \pm 0,011a | 0,945 \pm 0,019a | 0,955 \pm 0,08a | 0,955 \pm 0,08a |
| Fosfatos (mg.L ⁻¹) | 3,31 \pm 0,058a | 3,29 \pm 0,120a | 3,28 \pm 0,119a | 3,33 \pm 0,037a | 3,389 \pm 0,032a | 3,444 \pm 0,096a | 3,444 \pm 0,08a |

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (P>0,05).

Para o segundo teste de toxicidade aguda, envolvendo animais de aproximadamente 4,0 g, os valores médios obtidos dos parâmetros avaliados (Tab. 4) apresentaram diferenças apenas nas variáveis de pH, fosfatos e salinidade, ambas apresentando maiores valores nas concentrações mais elevadas de glifosato.

Os resultados obtidos dos parâmetros de qualidade de água, mensurados no teste de toxicidade crônica (pacamãs com cerca de 20,0 g), estão listados na tabela 5. Não houve diferença significativa das variáveis analisadas nos diferentes tratamentos.

Tabela 4. Valores médios (\pm desvio padrão) de variáveis de qualidade de água durante o período de 96 h de exposição de juvenis de *Lophiosilurus alexandri* (4,0 g) a concentrações de Glifosato (Roundup®).

| Variáveis | Concentração de Glifosato (mg L ⁻¹) | | | | | |
|--|---|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| | 0 | 3 | 6 | 10 | 15 | 20 |
| OD (mg.L ⁻¹) | 7,01 \pm 0,35a | 6,97 \pm 0,40a | 6,91 \pm 1,31a | 6,90 \pm 0,53a | 6,95 \pm 0,21a | 7,0 \pm 0,28a |
| Temperatura (°C) | 27,95 \pm 0,33a | 27,95 \pm 0,51a | 27,95 \pm 0,55a | 27,95 \pm 0,55a | 28,30 \pm 0,65a | 27,95 \pm 0,62a |
| pH | 7,35 \pm 0,17a | 7,29 \pm 0,17a | 7,28 \pm 0,23ab | 7,12 \pm 0,10c | 7,15 \pm 0,01bc | 7,105 \pm 0,07c |
| Salinidade ‰ | 0,076 \pm 0,004b | 0,079 \pm 0,003b | 0,079 \pm 0,004b | 0,081 \pm 0,004b | 0,090 \pm 0,001c | 0,092 \pm 0,001c |
| Condutividade (μ S cm ⁻¹) | 0,157 \pm 0,07a | 0,156 \pm 0,01a | 0,166 \pm 0,05a | 0,175 \pm 0,05a | 0,175 \pm 0,07a | 0,175 \pm 0,07a |
| Alcalinidade (mg.L ⁻¹) | 90,62 \pm 9,42a | 90,62 \pm 6,78a | 90,83 \pm 8,61a | 90,00 \pm 7,07a | 90,00 \pm 7,07a | 90,00 \pm 7,07a |
| Amônia (mg.L ⁻¹) | 0,234 \pm 0,07a | 0,246 \pm 0,14a | 0,240 \pm 0,10a | 0,257 \pm 0,09a | 0,242 \pm 0,07a | 0,241 \pm 0,06a |
| Nitrito (mg.L ⁻¹) | 0,052 \pm 0,01a | 0,053 \pm 0,02a | 0,055 \pm 0,01a | 0,054 \pm 0,03a | 0,052 \pm 0,04a | 0,055 \pm 0,04a |
| Nitrato (mg.L ⁻¹) | 0,945 \pm 0,01a | 0,939 \pm 0,01a | 0,939 \pm 0,01a | 0,936 \pm 0,03a | 0,943 \pm 0,02a | 0,937 \pm 0,025a |
| Fosfatos (mg.L ⁻¹) | 0,111 \pm 0,09b | 0,120 \pm 0,01b | 0,188 \pm 0,072b | 0,327 \pm 0,073ab | 0,373 \pm 0,198ab | 0,649 \pm 0,062a |

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (P>0,05).

Tabela 5. Valores médios (\pm desvio padrão) de variáveis de qualidade de água durante o período de 96 h de exposição de juvenis de *Lophiosilurus alexandri* (20,0 g) a diferentes concentrações de Glifosato (Roundup®).

| Variáveis | Concentração de Glifosato (mg L ⁻¹) | | |
|--|---|-------------------|------------------|
| | 0 | 0,21 | 0,42 |
| OD (mg.L ⁻¹) ^{ns} | 6,79 \pm 0,63 | 6,85 \pm 0,63 | 6,79 \pm 0,48 |
| Temperatura (°C) ^{ns} | 27,27 \pm 0,40 | 27,19 \pm 0,49 | 27,24 \pm 0,40 |
| pH ^{ns} | 7,33 \pm 0,26 | 7,26 \pm 0,40 | 7,31 \pm 0,27 |
| Salinidade ‰ ^{ns} | 0,080 \pm 0,01 | 0,080 \pm 0,01 | 0,080 \pm 0,01 |
| Condutividade (μ S cm ⁻¹) ^{ns} | 0,151 \pm 0,01 | 0,158 \pm 0,01 | 0,159 \pm 0,03 |
| Alcalinidade (mg.L ⁻¹) ^{ns} | 90,12 \pm 9,14 | 89,73 \pm 8,57 | 90,61 \pm 7,21 |
| Amônia (mg.L ⁻¹) ^{ns} | 0,210 \pm 0,08 | 0,221 \pm 0,07 | 0,213 \pm 0,05 |
| Nitrito (mg.L ⁻¹) ^{ns} | 0,049 \pm 0,04 | 0,051 \pm 0,02 | 0,048 \pm 0,03 |
| Nitrato (mg.L ⁻¹) ^{ns} | 0,938 \pm 0,02 | 0,935 \pm 0,01 | 0,937 \pm 0,03 |
| Fosfatos (mg.L ⁻¹) ^{ns} | 0,101 \pm 0,01 | 0,100 \pm 0,002 | 0,099 \pm 0,07 |

*ns = diferença não significativa (P>0,05).

3.2. Toxicidade aguda de glifosato para juvenis de pacamã e estudo histológico

A CL₅₀-96h estimada para *L. alexandri* (0,05 \pm 0,01 g e 1,80 \pm 0,10 cm) foi de 2,71 mg L⁻¹. As demais CL₅₀ (-24h, -48h e -72h) estão descritas na tabela 6. Não houve mortalidade no grupo controle. Análises histológicas das brânquias dos animais do grupo controle não demonstraram alterações teciduais críticas (Fig. 1A). Em contrapartida, alterações danosas foram observadas no tecido branquial de pacamãs

mantidos nos diferentes tratamentos contendo glifosato (Fig. 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G). Os valores médios de DTC calculados para brânquias estão descritos na tabela 7.

Tabela 6. Valores estimados das concentrações letais medianas (CL_{50}) e nível de segurança do teste de toxicidade aguda para juvenis (0,05 g) de *Lophiosilurus alexandri* expostos ao glifosato.

| Tempo de exposição (h) | CL_{50} Glifosato (Intervalo de confiança 95%) (mg L ⁻¹) | Nível de segurança (mg L ⁻¹) |
|------------------------|---|---|
| 24 | 3,74 (2,82-4,76) | |
| 48 | 2,97 (2,87-3,07) | |
| 72 | 2,96 (2,86-3,07) | |
| 96 | 2,71 (2,36-3,08) | 0,27 |

Tabela 7. Valores médios de DTC (\pm desvio padrão) calculados para brânquia de juvenis (0,05 g) expostos ao glifosato em teste de toxicidade aguda.

| Concentração de Glifosato (mg.L ⁻¹) | DTC Brânquias |
|---|-------------------|
| 0,0 | 1,33 \pm 0,57a |
| 2,5 | 2,00 \pm 1,00ab |
| 3,0 | 3,00 \pm 1,00b |
| 3,5 | 7,00 \pm 6,08c |
| 4,0 | 3,66 \pm 0,57b |
| 4,5 | 10,66 \pm 2,77c |
| 5,0 | 13,66 \pm 0,57d |

*Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Na tabela 8 são mostradas as CL_{50} estimadas para juvenis de pacamã de 4,03 \pm 1,26 g e 6,97 \pm 0,65 cm expostos às concentrações agudas de glifosato. Neste teste, todos os animais expostos às concentrações de 15,0 e 20,0 mg L⁻¹ morreram dentro de 24 h, conforme demonstrado na figura 2. Não houve mortalidade em animais no grupo controle e no tratamento de 3,0 mg L⁻¹ de glifosato.

O monitoramento diário dos animais também permitiu constatar alterações comportamentais dos pacamãs. Inicialmente, quando foi adicionado o agente tóxico às unidades experimentais, notou-se agitação dos animais por alguns minutos, principalmente quando expostos às maiores concentrações (10,0, 15,0 e 20,0 mg L⁻¹ de glifosato). Com o passar do tempo, a mobilidade dos animais foi reduzida (nas concentrações de 6,0, 10,0, 15,0 e 20,0 mg L⁻¹ de glifosato) em comparação com a condição controle e estes permaneceram junto ao fundo dos baldes com baixa atividade de natação e redução dos batimentos operculares.

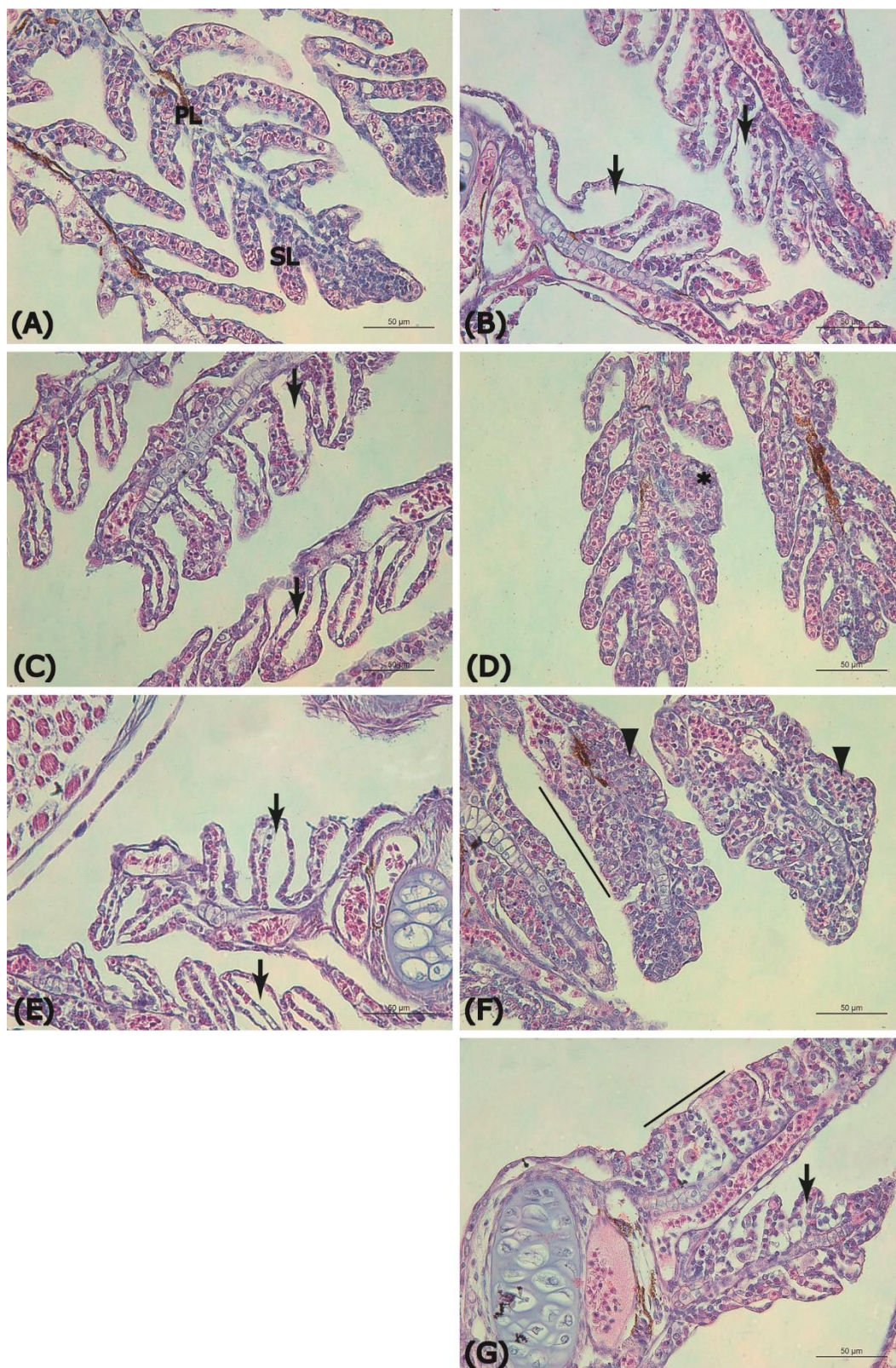


Figura 1. Fotomicrografias de juvenis (0,05 g) de *Lophiosilurus alexandri* expostos às concentrações agudas de glifosato em teste de toxicidade aguda (96 h). Coloração com hematoxilina e eosina. (A) Brânquia de peixe do grupo controle exibindo lamelas primárias (PL) e lamelas secundárias (SL) sem alterações. (B, C, D, E, F, G) brânquias de animais expostos a concentrações de 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0 mg L⁻¹, respectivamente. Descolamento do epitélio lamelar (setas), aneurisma (*), hiperplasia (ponta de seta), fusão lamelar total (linha). Barras: 50 µm.

Tabela 8. Valores estimados das concentrações letais medianas (CL_{50}) e nível de segurança do teste de toxicidade aguda para juvenis (4,0 g) de *Lophiosilurus alexandri* expostos ao glifosato.

| Tempo de exposição (h) | CL_{50} Glifosato | | Nível de segurança ($mg L^{-1}$) |
|------------------------|---|--|------------------------------------|
| | (Intervalo de confiança 95%) ($mg L^{-1}$) | | |
| 24 | 9,52 (8,60 - 10,54) | | |
| 48 | 5,73 (5,01 - 6,56) | | |
| 72 | 4,51 (4,16 - 4,88) | | |
| 96 | 4,21 (4,12 - 4,64) | | 0,42 |

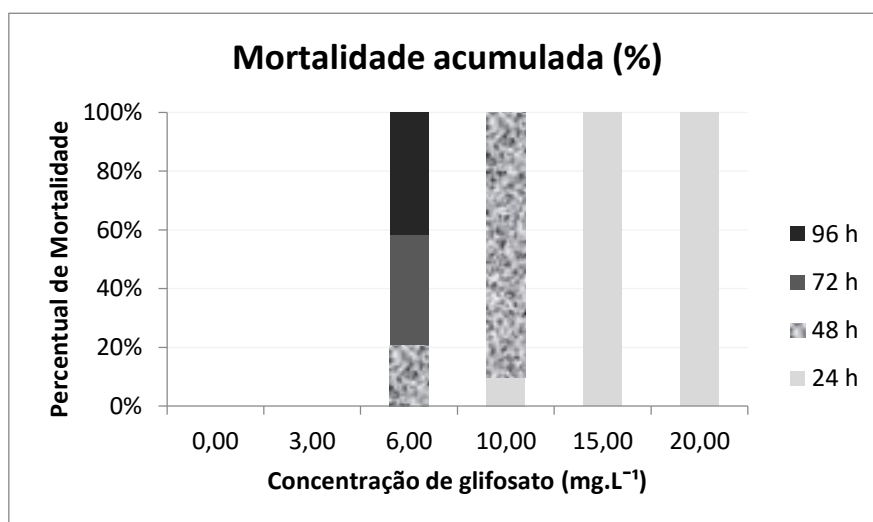


Figura 2. Resultado cumulativo da mortalidade de juvenis (4,0 g) *Lophiosilurus alexandri* expostos às diferentes concentrações de glifosato em um período de 96 h.

Alguns dos animais considerados mortos apresentaram nadadeira caudal hiperêmica. Análises histológicas realizadas nos animais expostos ao glifosato demonstraram alterações branquiais quando comparados ao grupo controle (Fig. 3). A histologia observada para o fígado dos animais expostos ao herbicida (Fig. 4), evidenciou alterações no formato dos hepatócitos, onde pode ser verificado vacuolização no interior das células, presença de núcleos aumentados e picnóticos, e áreas necróticas. Os valores de DTC calculados para brânquias e fígado são demonstrados na tabela 9.

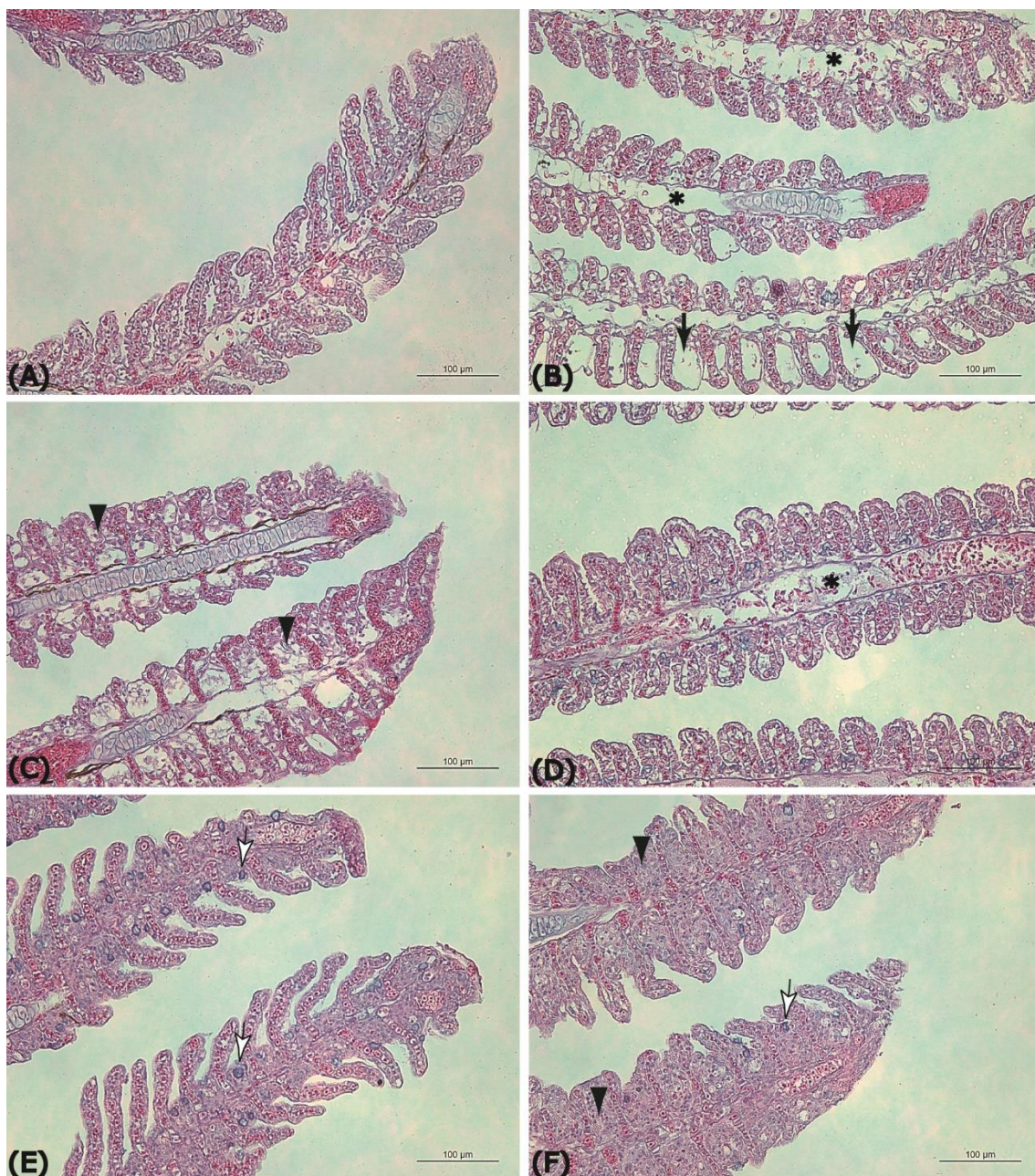


Figura 3. Fotomicrografias de juvenis (4,0 g) de *Lophiosilurus alexandri* expostos a concentrações agudas de glifosato em teste de 96 h. Coloração com hematoxilina e eosina. (A) Brânquia de peixe do grupo controle em condições normais. (B, C, D, E, F) Brânquias de animais expostos a concentrações de 3,0; 6,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mg L⁻¹, respectivamente. Alterações encontradas nos tecidos branquiais: Dilatação capilar (*), descolamento do epitélio lamelar com edema intersticial (setas pretas), hiperplasia das lamelas secundárias (cabeças de setas), hipertrofia de células de cloreto (setas brancas). Barras: 100 µm. Imagens captadas em aumentos de 20x.

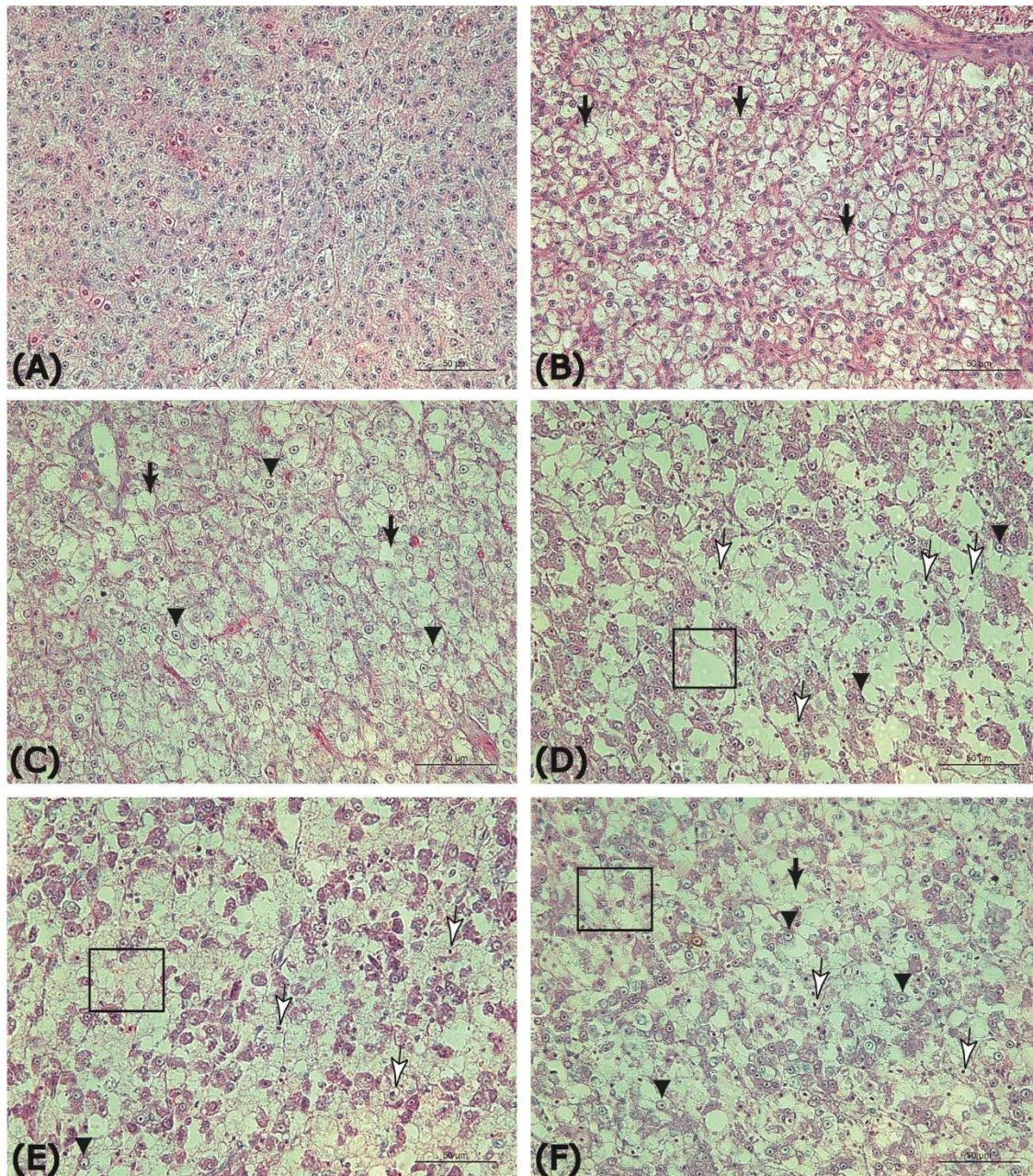


Figura 4. Fotomicrografias de juvenis (4,0 g) de *Lophiosilurus alexandri* expostos a concentrações agudas de glifosato em teste de 96 h. Coloração com hematoxilina e eosina. (A) Fígado de peixe do grupo controle em condições normais, apresentando hepatócitos com formato poligonal e núcleo central. (B, C, D, E, F) Fígado de animais expostos a concentrações de 3,0; 6,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mg L⁻¹, respectivamente. (B) Hepatócitos vacuolizados (setas). (C) Hepatócitos vacuolizados (setas) e núcleos alterados quanto ao seu tamanho (ponta de seta). (D) Núcleos com volume aumentados (ponta de seta), núcleos picnóticos (seta branca), áreas necróticas (quadrado). (E) Núcleos picnóticos (setas brancas), hepatócitos necróticos já perdendo a sua forma (quadrado) e hepatócitos com núcleo inchado (ponta de seta). (F) Presença de vários núcleos picnóticos (setas brancas), ocorrência moderada de núcleos com volume aumentado (ponta de seta) e áreas necróticas. É possível notar o desarranjo do formato das células hepáticas em comparação com o tratamento controle (A). Imagens captadas em aumentos de 40x.

Tabela 9. Valores médios de DTC (\pm desvio padrão) calculados para brânquia e fígado de juvenis (4,00 g) expostos ao glifosato em teste de toxicidade aguda.

| Concentração de Glifosato (mg L ⁻¹) | DTC (Brânquias) | DTC (Fígado) |
|---|---------------------|--------------------|
| 0,0 | 1,00 \pm 1,00a | 0,333 \pm 0,573a |
| 3,0 | 3,66 \pm 1,52b | 1,66 \pm 0,57b |
| 6,0 | 14,33 \pm 10,01c | 5,33 \pm 0,57c |
| 10,0 | 18,33 \pm 11,54cd | 92,66 \pm 57,73d |
| 15,0 | 18,00 \pm 12,12cd | 92,66 \pm 57,73d |
| 20,0 | 24,66 \pm 0,57e | 126,00e |

*Letras diferentes, dentro das colunas, indicam diferenças significativas (p < 0,05).

3.3. Toxicidade subcrônica de glifosato em juvenis (20 g) de pacamã e histopatologia de brânquias e fígado

O teste de toxicidade subcrônica com juvenis de *Lophiosilurus alexandri* (21,69 \pm 3,89 g; 11,45 \pm 0,79 cm) expostos ao glifosato foi inicialmente proposto para ter uma duração de 3 meses. Entretanto, no 19^o dia de experimento, 25% dos animais expostos à concentração de 0,42 mg L⁻¹ morreram, havendo também presença de animais moribundos e animais letárgicos na concentração de 0,21 mg L⁻¹. Conseqüentemente, o experimento foi encerrado e os animais de ambas concentrações e do grupo controle foram amostrados visando o estudo histológico. Não houve mortalidade nos animais do tratamento controle.

A figura 5 mostra os resultados obtidos da microscopia eletrônica de varredura realizada neste experimento. As eletromicrografias dos filamentos branquiais de animais do grupo controle e das demais concentrações testadas, quando observadas de maneira panorâmica, parecem não demonstrar alterações morfológicas (Fig. 5A, 5C, 5E). Todavia, as mesmas amostras quando observadas em maior aumento (2000x), demonstraram alterações da superfície epitelial branquial (Fig. 5B, 5D, 5F). É possível notar as células pavimentosas bem delimitadas pelas microrredes dos pacamãs do grupo controle e dos animais expostos à menor concentração de 0,21 mg L⁻¹ de glifosato (Fig. 5B, 5D). Na maior concentração são verificados vários pontos onde há o desarranjo das microrredes, dificultando a visualização do limite das células pavimentosas, que perderam a sua forma poligonal (Fig. 5F).

Poucas alterações foram observadas pela microscopia ótica nas brânquias dos juvenis expostos em concentração de 0,21 mg L⁻¹ de glifosato (nível de segurança para juvenis de 0,05 g). As brânquias analisadas demonstraram baixa frequência de

hiperplasia das lamelas secundárias (Fig. 6C). Os pacamãs mantidos na concentração determinada como nível de segurança para juvenis de 4,0 g (0,42 mg L⁻¹), apresentaram fusão das lamelas secundárias provocadas pela proliferação de células do tecido epitelial das brânquias e destacamento do epitélio lamelar (Fig. 6E). As alterações ocasionadas pelo herbicida em relação ao grupo controle são vistas com maior detalhamento nas imagens capturadas em microscópio em maior aumento (20x) (Fig. 6B, 6D, 6F).

Cortes histológicos do fígado do pacamã demonstraram que os hepatócitos dos animais do grupo controle (Fig. 7A, 7B) apresentaram-se com arranjo normal, em forma poligonal e com núcleo central proeminente. Entretanto, peixes do tratamento de 0,21 mg L⁻¹ demonstraram alguns dos hepatócitos vacuolizados e com presença de núcleos periféricos (Fig. 7D). Já os animais expostos à concentração de 0,42 mg L⁻¹ demonstraram grande quantidade de hepatócitos com vacuolização acentuada e hepatócitos apresentando núcleos picnóticos (Fig. 7F). Estas alterações podem ser notadas claramente quando observadas em aumento de 20x (Fig. 7A, 7C, 7E). Os valores de DTC calculados para brânquia e fígado estão notados na tabela 10.

Tabela 10. Valores médios de DTC (\pm desvio padrão) calculados para brânquia e fígado de juvenis (20,0 g) expostos ao glifosato em teste de toxicidade subcrônica.

| Concentração de Glifosato (mg L ⁻¹) | DTC - Brânquias | DTC - Fígado |
|---|-------------------|-------------------|
| 0,00 | 1,00 \pm 1,00a | 0,33 \pm 0,57a |
| 0,21 | 2,00 \pm 1,00ab | 2,66 \pm 0,57b |
| 0,42 | 3,33 \pm 0,57b | 15,00 \pm 1,00c |

*Letras diferentes, dentro das colunas, indicam diferenças significativas (p <0,05).

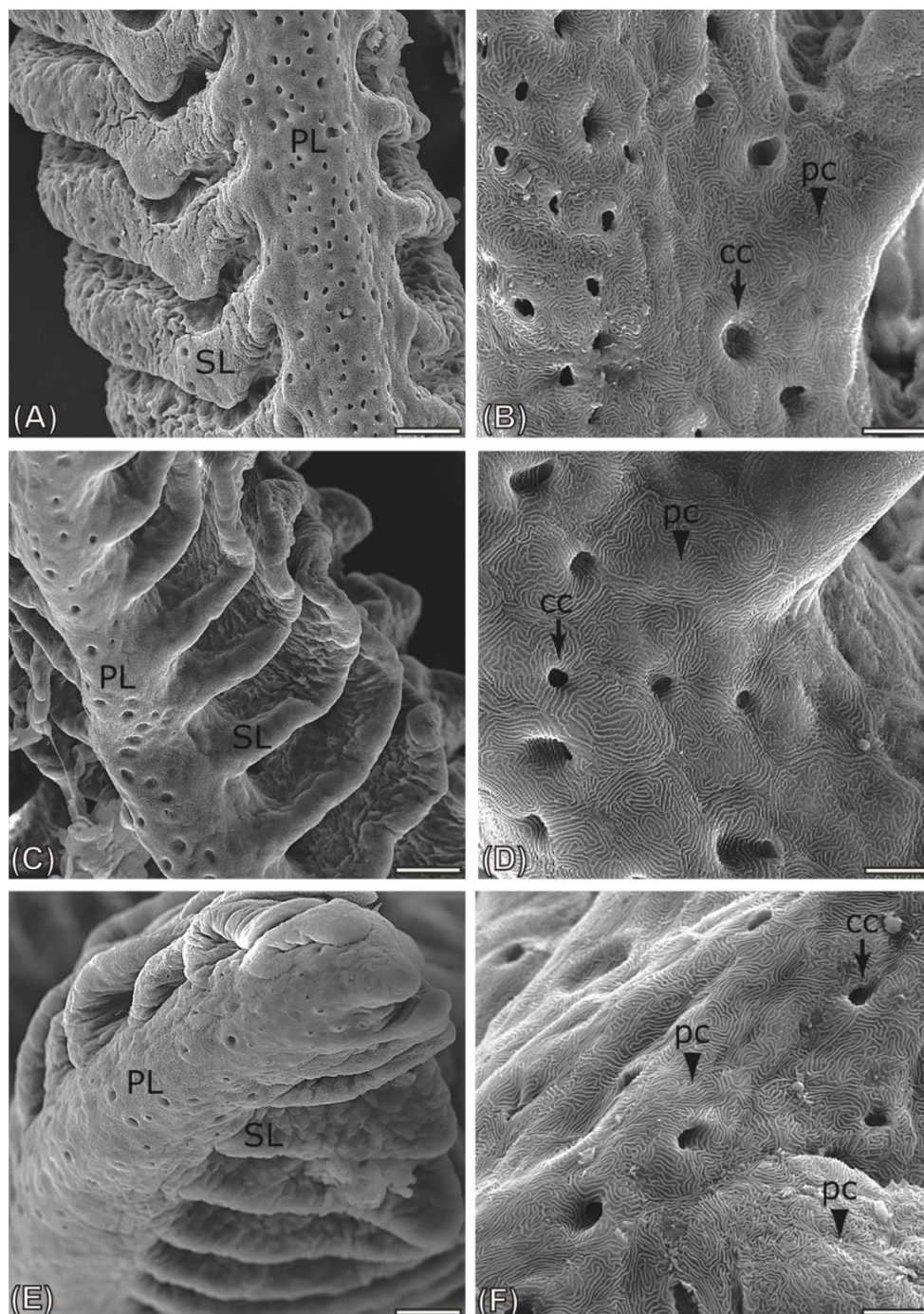


Figura 5. Eletromicrografias de brânquias de juvenis (20 g) de *Lophiosilurus alexandri* expostos a concentrações subletais de glifosato durante 19 dias. (A-B) Brânquia de animais do grupo controle. (C-D) Brânquias de animais mantidos em concentração de 0,21 mg.L⁻¹ de glifosato. (E-F) Brânquias de pacamãs expostos a concentração de 0,42 mg.L⁻¹ de glifosato. Os filamentos branquiais quando observados de maneira panorâmica, aparentemente, não demonstram alterações (A, C, E – Barras: 26 µm). Entretanto, as eletromicrografias captadas das mesmas amostras em maior aumento (B, D, F – Barras: 6 µm), mostram alterações no arranjo das células pavimentosas (pc) em brânquia de animal exposto à maior concentração de glifosato (F). Lamelas primárias (pl), lamelas secundárias (sl), células de cloreto (cc), células pavimentosas (pc). (A, C, E – imagens captadas em aumento de 500x; B, D, F – imagens captadas em aumento de 2000x).

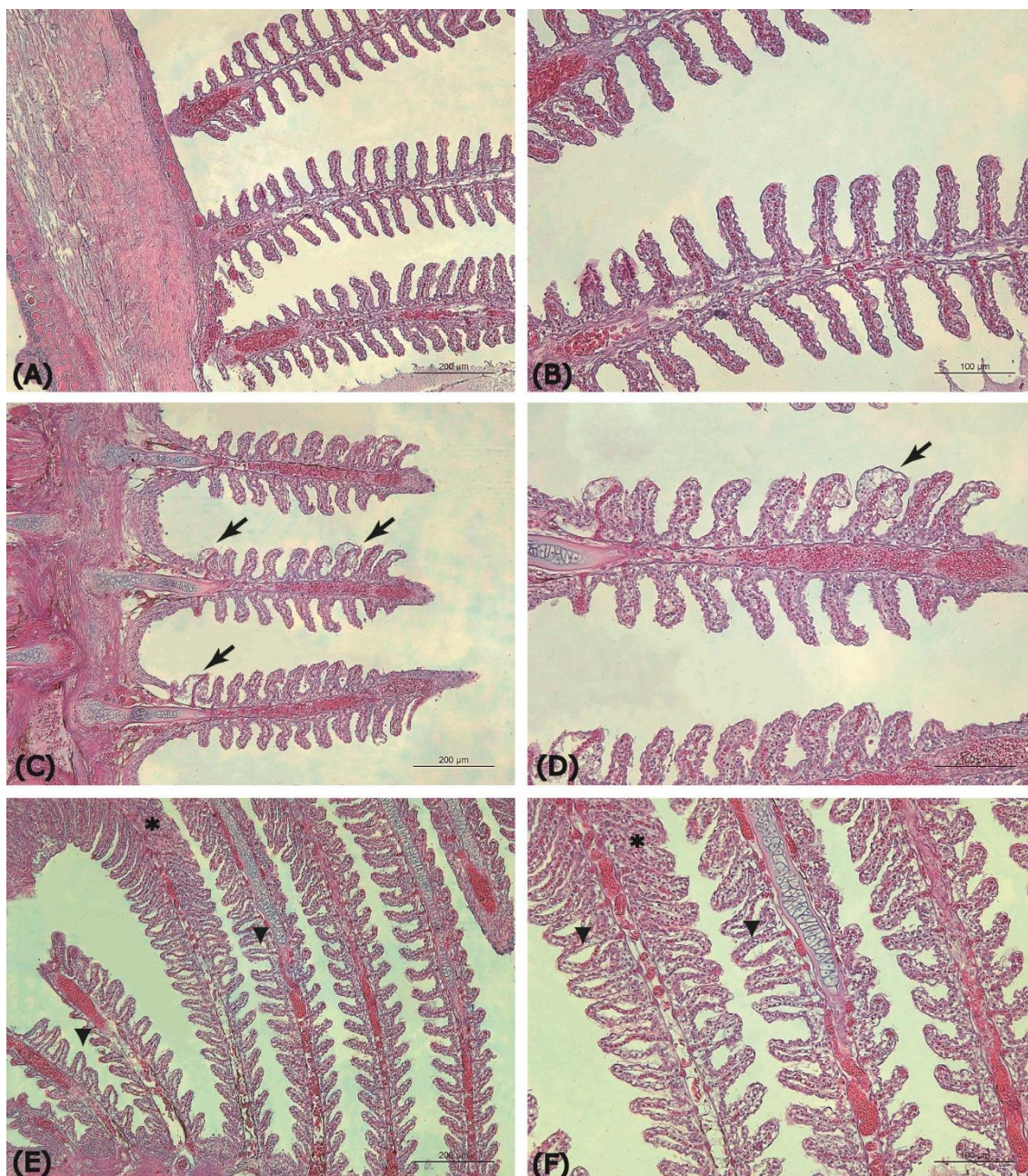


Figura 6. Fotomicrografias de brânquias de juvenis (20 g) de *Lophiosilurus alexandri* expostos a concentrações subletais de glifosato durante 19 dias. Coloração com hematoxilina e eosina. (A-B) Brânquia de animal do grupo controle. (C-D) Brânquia de animal submetido à concentração de $0,21 \text{ mg L}^{-1}$ de glifosato. (E-F) Brânquia de animal mantido em concentração de $0,42 \text{ mg L}^{-1}$. (A, C, E) Imagem panorâmica dos filamentos branquiais (imagens captadas em aumento de 10x; barras: $200 \mu\text{m}$). (B, D, F) Imagens de filamentos captadas em aumento de 20x. Barras $100 \mu\text{m}$. Alterações encontradas: Hiperplasia no ápice das lamelas secundárias (setas), hiperplasia de lamelas secundárias provocando fusão lamelar (*), descolamento do epitélio lamelar (ponta de seta).

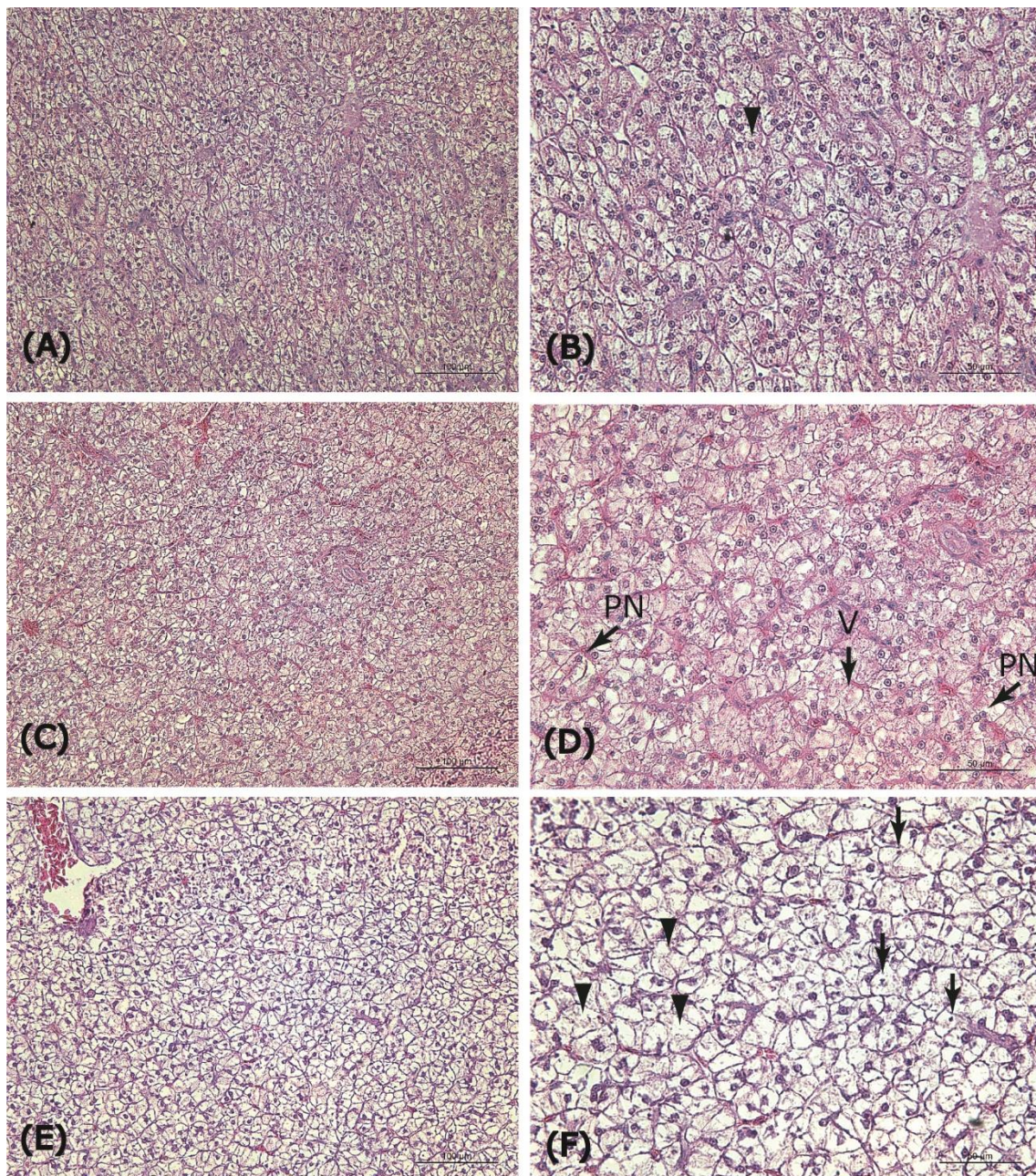


Figura 7. Fotomicrografias de seções de cortes do fígado de juvenis (20 g) de *Lophiosilurus alexandri* submetidos ao teste subcrônico de exposição ao glifosato durante período de 19 dias. Coloração com hematoxilina e eosina. (A-B) Tecido hepático do grupo controle - barras: 100 μm / 50 μm . (C-D) Corte de fígado de animais expostos à concentração de 0,21 mg L^{-1} de glifosato. (D) Hepatócitos vacuolizados (v) células com núcleos periféricos (pn) – barras: 100 μm / 50 μm . (E-F) Imagens do tecido hepático de animais expostos à concentração de 0,42 mg.L^{-1} de glifosato, indicando células vacuolizadas em maior quantidade (cabeça de seta) e células com núcleos picnóticos (seta) - barras: 100 μm / 50 μm . (A, C, E – imagens captadas em aumento de 20x; B, D, F – imagens captadas em aumento de 40x).

4. DISCUSSÃO

A utilização crescente de pesticidas na agricultura é considerada um problema mundial (Cerejeira et al., 2003; Guilherme et al., 2012). Neste contexto, o glifosato tem gerado preocupações para a preservação da biota aquática e para as atividades aquícolas, visto que ele tem sido amplamente detectado em corpos d'água (Kolpin et al., 2006). As dosagens e taxas de aplicações de glifosato para o controle não seletivo de plantas infestantes em áreas cultivadas variam conforme a formulação comercial a ser aplicada, com a espécie da planta cultivada e com o seu estágio de desenvolvimento. As dosagens a serem pulverizadas nas regiões agrícolas geralmente vêm descritas na bula do agrotóxico, podendo variar de 240 até 2400 g/ha para o Roundup[®] fabricado pela Monsanto do Brasil. De acordo com Gomes et al. (2014), o glifosato é pulverizado em campos agrícolas sobre as folhagens das plantas, havendo possibilidade de uma parcela do produto ser depositada na superfície do solo e ser transportado pelo vento para áreas vizinhas. Além disso, o referido herbicida pode atingir os corpos d'água através da pulverização direta em culturas próximas a corpos hídricos, bem como pela lixiviação e drenagem após intensas chuvas após a sua aplicação (Fiori et al., 2012).

A principal função do glifosato é evitar que a planta produza aminoácidos aromáticos essenciais, tais como a fenilalanina, triptofano e tirosina (Borggarad e Gimsing, 2008), ou seja, atua inibindo a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfatossintase (EPSPs), da via do chiquimato (via do metabolismo secundário presente nas plantas) (Duke e Powles, 2008) e em algumas espécies de fungos e microrganismos (Sternensen, 2004; Duke et al., 2012; Helander et al., 2012). Como a referida via é específica para plantas e microrganismos, muitos pesquisadores consideram que o glifosato seja pouco tóxico para os animais (Smith e Oehme, 1992; Pelfrène, 2003; Solomon e Thompson, 2003; Evrard et al., 2010). Além disto, muitos ainda acreditam que o glifosato seja rapidamente degradado pela atividade microbiana e inativado nos solos através de uma sorção forte entre o glifosato e partículas do solo, sendo considerado desta forma, ambientalmente seguro (Franz et al., 1997; Giesy et al., 2000; Busse et al., 2001; Vereecken, 2005; Duke e Powles, 2008; Helander et al., 2012).

De acordo com Helander et al. (2012), a persistência e o transporte do glifosato no solo dependem de alguns fatores, tais como a composição do solo, atividade microbiana e condições climáticas. Em outras palavras, microrganismos do solo, apesar de serem poucos conhecidos, tem sua atividade afetada pela temperatura, umidade e

acidez, e o glifosato não degradado, por sua vez, pode ser inativado por sorção de partículas do solo reduzindo o seu transporte na matriz do solo, ou ser lixiviado na sua forma solúvel. Desta forma, é bastante relativa a afirmação de que o glifosato seja ambientalmente seguro, sendo necessário diversos estudos envolvendo componentes dos solos e fatores ambientais que contribuem para a ocorrência da sua biodegradação e inativação pelo solo.

Sabe-se que herbicidas possuem grande potencial em causar mudanças drásticas em comunidades naturais, todavia os efeitos de pesticidas na biota ainda são limitados (Relyea, 2005). Ruiz-Toledo et al. (2014) realizaram coleta de água em corpos de água de vinte e três locais de áreas agrícolas e áreas protegidas no Sul do México em períodos de estiagem e de chuva, e detectaram a presença do herbicida glifosato em todas as amostras. Coupe et al. (2011) também relataram a presença de glifosato e seu metabólito AMPA (ácido aminometilfosfônico) em águas superficiais próximas às áreas agrícolas nos Estados Unidos da América. Delmonico et al. (2014) relataram a detecção de glifosato e AMPA em águas superficiais e em água para consumo humano mesmo após tratamento por empresa de Saneamento no Estado do Paraná (Brasil). Levando em consideração que o Brasil possui grande participação na atividade agrícola, e que também tem adotado o controle de ervas daninhas via aplicação de herbicidas (Braz-Mota et al., 2015), é de grande importância o estudo de toxicidade do glifosato para organismos aquáticos, e seus possíveis efeitos deletérios aos animais.

O presente estudo estimou as CL_{50} para duas idades nas fases iniciais de desenvolvimento de *L. alexandri*, demonstrando que os animais mais jovens são mais sensíveis ao glifosato. O uso do herbicida Roundup[®] nos testes de toxicidade aguda, contendo o glifosato como ingrediente ativo, nas unidades experimentais induziu mudanças nos órgãos branquiais dos peixes de ambos experimentos e alterações no tecido hepático para os animais de 4,0 g. O teste de toxicidade subcrônico, também demonstrou alterações nas brânquias e fígado, porém em menor grau.

Jiraungkoorskula et al. (2002) avaliaram a toxicidade aguda do glifosato na formulação Roundup[®] para juvenis de tilápia (*O. niloticus*) de $1,69 \pm 0,31$ g e $4,5 \pm 0,18$ cm; e de $16,87 \pm 3,87$ g e $9,60 \pm 0,91$ cm, observando possíveis alterações histopatológicas em brânquias, fígado e rins a cada 24 h de exposição ao agente tóxico. As CL_{50} para 24, 48, 72 e 96 h foram estimadas em 17,5, 17,1, 16,9 e 16,8 $mg L^{-1}$ e 46,9, 44,4, 40,0 e 36,8 $mg L^{-1}$, respectivamente. Segundo os autores, os resultados das CL_{50} também indicaram que tilápias mais desenvolvidas são mais tolerantes ao glifosato. Além disto,

foram notadas alterações histológicas em animais após exposição de 96 h ao glifosato, tais como, proliferação de células do filamento branquial, hiperplasia de células lamelar, fusão lamelar, elevação epitelial e aneurisma. No fígado, notou-se vacuolização dos hepatócitos e picnose nuclear, e nos rins, as lesões verificadas consistiram em dilatação do espaço de Bowman e acumulação de gotas hialinas nas células epiteliais tubulares. Todas alterações supracitadas foram bastante semelhantes aos resultados obtidos na histologia de brânquias e fígado para o pacamã.

Em experimento posterior, Jiraungkoorskul et al. (2003) realizaram teste de toxicidade crônica (3 meses de exposição) na formulação Roundup® Original com juvenis de *O. niloticus* (15-20 g e 8-10 cm), com exposição a 5 e 15 mg L⁻¹, consideradas inferiores às concentrações utilizadas em práticas agrícolas. Os autores demonstraram por meio de estudo histológico várias alterações hepáticas, tais como: células inchadas, hepatócitos com presença de vacúolos lipídicos, núcleos picnóticos, células com infiltração de leucócitos e algumas células com áreas necróticas focais. Além disso, estudos de bioquímica sanguínea também foram realizados e foi demonstrado o aumento significativo da atividade de algumas enzimas como: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (AIT), que pode estar relacionado a danos hepáticos. Os resultados obtidos no teste de toxicidade subcrônica com o pacamã também demonstraram a presença de vacúolos lipídicos, e núcleos picnóticos no fígado dos animais quando expostos a 0,21 e 0,42 mg L⁻¹, respectivamente. No entanto, não foi observada necrose no tecido hepático. Áreas necróticas foram observadas somente em animais de 4,0 g submetidos às concentrações agudas de glifosato (10,0, 15,0 e 20,0 mg L⁻¹).

Gholami-Seyedkolaei et al. (2013) estimaram a CL₅₀-96h de glifosato (Roundup®) para carpa comum (*Cyprinus carpio*), (41,03±0,15 g; 10,12±2,01 cm), em 22,19 mg L⁻¹. A partir da CL₅₀-96h estimada, os pesquisadores submeteram carpas a 3 concentrações subletais (3,5; 7,0 e 14 mg L⁻¹), valores correspondentes a 15%, 30% e 60% da CL₅₀-96h, por um período de 16 dias. Ao longo do experimento, os peixes foram selecionados para avaliação bioquímica e hematológica e foram constatadas: redução da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) nos tecidos muscular, cerebral e hepático e; aumento das atividades de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e lactato desidrogenase (LDH). Além disto, os pesquisadores observaram também redução significativa na concentração de hemoglobina, no hematócrito, e na concentração de eritrócitos e leucócitos.

Testes de toxicidade aguda com Roundup[®] também foram realizados a outras espécies de peixes e as CL₅₀-96h estimadas foram: “catfish” *Ictalurus punctatus* (14,5 mg L⁻¹) (Abdelghani et al., 1997), “bluegill” *Lepomis macrochirus* (13,0 mg L⁻¹) (Abdelghani et al., 1997), “piaçu” *Leporinus macrocephalus* (15,8 mg L⁻¹) (Albinati et al., 2007), “curimatá” *Prochilodus lineatus* (13,69 mg L⁻¹) (Langiano e Martinez, 2008). As CL₅₀-96h estimadas para juvenis de pacamã, têm se mostrado inferiores em relação às concentrações estimadas para outras espécies de peixes estudadas. As variações dos resultados observados para as diferentes espécies de peixes podem estar relacionadas a diversos fatores, tais como, a espécie de peixe testada, fase de desenvolvimento, tamanho dos animais, manejo recebido, qualidade da água e concentrações testadas. Contudo, a hipótese de que o pacamã possa ser mais sensível que as espécies já mencionadas, não pode ser descartada. Para os testes de toxicidade aguda e crônica de pacamã, foram utilizados apenas avaliações histológicas para indicar respostas patológicas. A histologia aplicada permitiu a observação de diversas alterações nas brânquias e no fígado dos animais expostos ao herbicida, todavia, testes envolvendo outros tipos de biomarcadores poderão ser estudados futuramente para uma melhor avaliação da resposta de *L. alexandri* frente a este contaminante. De acordo com Volpato (2014) avaliações comportamentais contribuem para o melhor entendimento do bem-estar dos peixes. Os testes de toxicidade aplicados para *L. alexandri* demonstraram animais com baixa mobilidade ao longo do experimento nos tratamentos contendo o glifosato. De acordo com o mesmo autor, peixes expostos a substâncias alarmes podem provocar reações de fuga e imobilidade por períodos longos.

O experimento de exposição subcrônica de pacamãs ao glifosato, permitiu a observação de algumas alterações nas brânquias e no tecido hepático por meio de microscopia ótica. As alterações mais frequentes observadas nas brânquias foram hiperplasia do tecido lamelar e descolamento da membrana lamelar. As imagens de tecido hepático demonstraram o inchaço dos hepatócitos, células com núcleos periféricos na menor concentração testada (0,21 mg L⁻¹), hepatócitos bastante vacuolizados e presença de núcleos condensados na maior concentração testada (0,42 mg L⁻¹). O princípio de um microscópio eletrônico de varredura consiste em utilizar feixes de elétrons para explorar a superfície das amostras, ponto a ponto, para obtenção de imagens de alta resolução, com aspecto tridimensional, fornecendo informações sobre a sua morfologia (Dedavid et al., 2007). A microscopia eletrônica de varredura aplicada demonstrou a deformação das microrredes da superfície epitelial em animais

da concentração de $0,42 \text{ mg L}^{-1}$ e alteração da forma das células pavimentosas. Estas alterações da superfície epitelial também foram relatadas por Cardoso et al. (1996), que realizaram testes de toxicidade em pacamã, porém com outro agente contaminante. A mortalidade dos animais no 19º dia de experimento, e a presença de animais letárgicos nos grupos experimentais podem estar relacionadas com alterações fisiológicas já relatadas para outras espécies, como por exemplo, alterações histológicas de órgãos vitais e a redução da atividade de acetilcolinesterase, enzima importante para o pleno funcionamento de impulsos nervosos. A inibição da acetilcolinesterase é considerada perigosa para peixes, principalmente por afetar a atividade natatória, comprometendo a alimentação e a fuga de seus predadores (Bálint et al., 1995; Guiloski et al., 2010). O grau de alteração do tecido calculado (DTC) demonstrou que as alterações observadas nas brânquias dos animais expostos ao Roundup®, no teste subcrônico, não prejudicaram o funcionamento normal do órgão ($\text{DTC} < 10$). Entretanto, o DTC calculado para animais expostos à concentração de $0,42 \text{ mg L}^{-1}$, indica lesões hepáticas ($11 < \text{DTC} < 20$).

Braz Mota et al. (2015) relataram alterações branquiais em tambaqui *Colossoma macropomum* ($34,16 \pm 1,84 \text{ g}$; $10,98 \pm 0,21 \text{ cm}$) expostos a concentrações subletais (10 e 15 mg L^{-1}) de glifosato. Embora a exposição ao agente tóxico tenha sido de apenas 96 horas e as concentrações escolhidas pelos pesquisadores corresponderem a 50% e 80% da $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ estimada anteriormente em $19,94 \text{ mg L}^{-1}$ por Miyazaki et al. (2004), foi possível observar por meio de estudo histopatológico, a presença de hiperplasia e hipertrofia do epitélio filamentososo, elevação do epitélio lamelar, aneurisma, ruptura do epitélio e proliferação das células de cloreto. De acordo com Braz-Mota et al. (2015), apesar das alterações verificadas, não houve mortalidade dos animais durante todo o período de exposição ao Roundup®.

As brânquias, na maioria das espécies de peixes, são o órgão principal para o processo de trocas gasosas. A respiração branquial ocorre por meio de difusão, onde o oxigênio dissolvido no ambiente entra em contato com as lamelas branquiais dos peixes através de um sistema contracorrente (Fernandes e Moron, 2014; Cruz e Fernandes, 2016). As brânquias possuem uma grande superfície de tecido epitelial altamente vascularizado, que facilita o processo de troca gasosa entre o sangue e a água. Este órgão também exerce outras funções fundamentais, como regulação de pH do fluido corporal, excreção de resíduos nitrogenados e osmorregulação (Evans et al., 2005).

O epitélio branquial é composto por diversas células, mas consiste basicamente em células de cloreto ou células ricas em mitocôndrias (MRC) e células pavimentosas. Cerca de 90% das células do epitélio branquial que fazem contato com a água são células pavimentosas (Wilson e Laurent, 2002; Evans et al., 2005). As células pavimentosas do epitélio lamelar formam arranjos elaborados, formados pelas microrredes, que podem variar de formato entre as espécies de peixes (Evans et al., 2005). As microrredes podem facilitar o processo de difusão dos gases entre a água e o sangue, podendo contribuir também para adesão de muco produzido pelas células mucosas. O muco nas brânquias pode servir de proteção das brânquias a fatores externos (Carmona et al., 2004). As alterações das microrredes verificadas na maior concentração de glifosato em animais do teste subcrônico com pacamã pode ter prejudicado o processo de troca gasosa, e possivelmente, ter causado a mortalidade dos animais por asfixia. As células de cloreto, por sua vez, são responsáveis pela secreção e absorção iônica, além de estarem envolvidas também na regulação ácido-base e captação de Ca^{2+} . A membrana apical das células de cloreto está localizada na fronteira das células epiteliais pavimentosas (Kaneko et al., 2008). A membrana apical das células de cloreto podem apresentar microvilosidades, possuindo forma de esponja ou lisa. Entretanto, para algumas espécies de peixes, as células de cloreto podem estar enterradas no epitélio (Becker e Baldisseroto, 2014).

Conforme Inokuchi et al. (2009), peixes de água doce possuem membrana apical das células de cloreto ligeiramente saliente e peixes de água salina possuem as células de cloreto aprofundadas ao epitélio. No caso do pacamã, as células de cloreto apresentaram-se aprofundadas, entre as células pavimentosas do epitélio das brânquias, observadas na microscopia eletrônica de varredura. Inokuchi et al. (2009) ainda ressaltam que estas células podem alterar sua morfologia, principalmente quando os animais são expostos a ambientes com salinidade alterada. O Roundup[®] utilizado no teste de toxicidade para o pacamã, apesar de conter um sal em sua composição (sal de isopropilamina de glifosato), não causou alteração da qualidade de água para o teste subcrônico. Portanto, podemos sugerir que a característica das células de cloreto para o pacamã, se difere da maioria dos peixes de água doce, visto que todos os animais observados, incluindo do grupo controle, apresentaram a membrana apical aprofundada.

As alterações histológicas frequentes verificadas em brânquias de pacamãs nos testes de toxicidade aguda, como hiperplasia, fusão das lamelas secundárias, e desprendimento do epitélio lamelar com edema intersticial, podem ser consideradas

como uma resposta defensiva do animal frente ao estresse do meio. Segundo Abalaka et al. (2015), as referidas alterações aumentam a distância do sangue do animal e do ambiente externo, servindo como uma barreira para a entrada de agentes tóxicos. Entretanto, alterações descontroladas podem resultar em perda da eficiência morfológica e funcional das brânquias, provocando distúrbios de trocas gasosa e iônicas (Ramirez-Duarte et al., 2008; Abalaka et al., 2015; Braz-Mota et al., 2015).

O segundo teste de toxicidade aguda aplicado neste estudo, utilizando juvenis maiores de pacamã, demonstrou hipertrofia da célula de cloreto em alguns dos animais expostos ao Roundup®. Alguns autores acreditam que a hipertrofia dessas células possa estar relacionada com a exposição a pesticidas aquosos, bem como uma resposta do peixe exposto ao ambiente com a salinidade alterada. Pode-se inferir que essas alterações celulares possam ter provocado um desequilíbrio na regulação osmótica dos animais (Karnaky et al., 1976; Foskett et al., 1981; Mazon et al., 2002; Fanta et al., 2003; Costa et al., 2009). O DTC calculado para brânquias de pacamãs (0,05 g) no primeiro teste de toxicidade aguda, indica que houve ligeira alteração no tecido branquial na maior concentração de glifosato testada de 5 mg L^{-1} ($11 < \text{DTC} < 20$), não indicando alterações danosas para os animais mantidos nos demais tratamentos ($\text{DTC} < 10$). Já no segundo teste de toxicidade aguda para pacamãs com juvenis de aproximadamente 4,0 g, o DTC calculado demonstrou danos ligeiros ($11 < \text{DTC} < 20$) no tecido branquial dos animais expostos às concentrações de 6,0, 10,0 e 15 mg L^{-1} de glifosato, e lesões moderadas ($21 < \text{DTC} < 50$) nos animais mantidos na concentração de 20 mg L^{-1} .

Em relação às alterações hepáticas verificadas em *L. alexandri* expostos ao Roundup®, o acúmulo de lipídios no interior das células hepáticas, processo nomeado como esteatose, foi uma das alterações mais frequentes observadas.

De acordo com Van der Oost et al. (2003), existem duas formas principais para a eliminação de um agente químico no organismo, que podem ocorrer através da excreção na sua forma original, ou pela biotransformação e, neste caso, o órgão que está mais comumente envolvido na biotransformação é o fígado. O fígado é um dos órgãos que são mais afetados por contaminantes presentes na água, servindo como um importante biomarcador (Rodrigues e Fanta, 1998; Dane et al., 2014). Segundo Hued et al. (2012), quando os compostos tóxicos excedem o nível de desintoxicação do fígado, altas concentrações de um tóxico induzem a atividade do biotransformador hepático e

provocam modificação da estrutura hepática normal. Muitas alterações persistem mesmo após a exposição a um tóxico ter cessado (Van der Oost et al., 2003).

Conforme Braunbeck et al. (1989), alterações do tamanho e da forma do núcleo dos hepatócitos, podem ser sinais de aumento de atividade metabólica, podendo ser de origem patológica. Para Takashima e Hiba (1995), tanto o aumento do volume celular quanto nuclear de hepatócitos indicam a ativação das funções hepáticas frente ao agente estressor. A intensificação da atividade metabólica em alguns casos não interferem no desempenho hepático. Todavia, alterações elevadas, como a degeneração citoplasmática e nuclear, representam lesões graves, uma vez que é reduzida a área do tecido metabolicamente ativo (Figueredo-Fernandes et al., 2007).

De acordo com Carmago e Martinez (2007), vacúolos no citoplasma dos hepatócitos podem conter glicogênio e lipídeos, que estão relacionados com a função metabólica normal do fígado. Contudo, vacuolização aumentada sugere um processo degenerativo e danos metabólicos, possivelmente relacionados à exposição a água contaminada (Pacheco e Santos, 2002).

A presença de núcleos picnóticos nos hepatócitos deve-se à dissociação de ácidos nucleicos e nucleoproteínas, que podem induzir à morte celular (Dos-Santos et al., 2016). Já as alterações degenerativas, como necrose, devem receber maior importância visto que são consideradas efeito direto de compostos tóxicos, sendo geralmente irreversíveis. Sua progressão e persistência pode levar a perda parcial ou total da função orgânica. A maioria das alterações proliferativas pode não ser reversível conforme a gravidade e extensão da alteração (Agamy, 2012). O DTC calculado para o fígado de pacamãs (4,0 g) do segundo teste de toxicidade aguda demonstraram valores que representam lesões graves para os animais mantidos nas concentrações de 10,0 e 15,0 mg L⁻¹ (51 < DTC < 100) e lesões graves irreversíveis no tecido hepático dos animais mantidos na concentração de 20 mg L⁻¹ (DTC > 100).

Segundo Costa et al. (2009), uma das maiores dificuldades dos estudos histopatológicos em peixes relaciona-se com a falta de especificidade das lesões e alterações em relação a um contaminante ou classe de contaminantes, o que prejudica significativamente a avaliação de causa-efeito quando vários tóxicos estão envolvidos. Sabe-se que a maioria das formulações comerciais de glifosato contém o surfactante polioxietilenoamina (POEA), que para alguns autores, são considerados mais tóxicos aos peixes do que o próprio glifosato (Giesy et al., 2000; Shiogiri et al., 2012). Muitas

vezes, os surfactantes e sua quantidade não são descritos nos rótulos das formulações comerciais, sendo descritas apenas como “ingredientes inertes”.

Tendo em vista que o estudo de glifosato na formulação Roundup® realizado com o pacamã promoveu alterações patológicas e que o glifosato pode atingir águas superficiais contaminando o ambiente aquático, vale ressaltar que maiores estudos de toxicidade envolvendo organismos aquáticos devem ser realizados. Além disto, a aplicabilidade do herbicida, local de aplicação e a legislação sobre o seu uso em diversos países devem ser melhor avaliadas, pois além deste contaminante promover mortalidade e prejudicar o bem-estar animal em baixas concentrações, o glifosato pode também contribuir para redução de populações em risco de extinção, como no caso da espécie estudada *L. alexandri*.

A CL_{50} mensurada para juvenis de 0,05 g (2,71 mg L⁻¹ de glifosato), demonstrou que uma concentração baixa de glifosato foi capaz de causar a mortalidade de 50% dos animais. No entanto, o grau de alteração do tecido branquial calculado (DTC) mostrou lesões ligeiras no tecido na maior concentração testada (tratamento de 5,0 mg L⁻¹ de glifosato).

A CL_{50} mensurada para juvenis de pacamã (4,0 g) no segundo teste de toxicidade aguda demonstrou que a concentração estimada de 4,21 mg L⁻¹ foi responsável pela mortalidade de 50% dos animais em experimento. O grau de alteração tecidual (DTC) calculado para os animais avaliados, demonstrou lesões ligeiras para brânquias dos animais expostos às concentrações de 6,0, 10,0, e 15,0 mg L⁻¹, e lesões moderadas para animais expostos a concentração de 20,0 mg L⁻¹. No entanto, o DTC calculado para o fígado, mostrou que nas concentrações de 10,0 e 15,0 mg L⁻¹ houve a presença de lesões graves e na concentração de 20,0 mg.L⁻¹, os animais apresentaram lesões irreversíveis, prejudicando o bom funcionamento do órgão.

No teste de toxicidade subcrônico, o glifosato mesmo nas concentrações de 0,21 mg L⁻¹ e 0,42 mg L⁻¹ causou letargia nos animais tornando alguns exemplares moribundos e mortalidade de 25% dos animais expostos à maior concentração em 19 dias de experimento. Todavia, o DTC calculado para as brânquias dos animais, mostrou que não houve alterações danosas nos tecidos avaliados, indicando o seu bom funcionamento. Porém, o DTC calculado para o fígado no tratamento de maior concentração indicou lesões teciduais. O objetivo dos testes subletais é determinar a natureza do estresse, ou o efeito de poluentes, que podem causar alterações sutis ao organismo-teste, tais como alterações bioquímicas e fisiológicas (Moraes et al., 2001).

Sprague (1971), a partir de estudos envolvendo medição de toxicidade de poluentes, definiu um fator de aplicação de 0,1, a partir da CL_{50-96h} mensurada para o organismo-teste, onde os valores estimados são considerados níveis de segurança. De acordo com o mesmo autor, o nível de segurança é uma concentração presumivelmente inofensiva e, se respeitada, tenderia à redução da perda de organismos em função de um determinado tóxico. No entanto, podemos afirmar que os níveis de segurança testados para o pacamã gerou danos e mortalidade aos animais.

A legislação brasileira estabelece o limite máximo aceitável de $0,65 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato para águas doces destinadas a proteções de comunidades aquáticas e para atividades de aquicultura e pesca (Brasil, 2005). O valor estabelecido pela legislação vigente está bem aquém dos níveis de segurança mensurados neste experimento para *L. alexandri*, o que é favorável para a preservação da espécie. Todavia, devido ao grande uso de Roundup[®] em regiões agrícolas, acredita-se que este valor possa ser ultrapassado em regiões pontuais de fontes de contaminação.

5. CONCLUSÃO

Por meio dos resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda de glifosato (Roundup[®]) realizados em juvenis de *L. alexandri*, podemos concluir que o pacamã é sensível ao herbicida em relação às outras espécies de peixes estudadas. Além disso, a exposição crônica de pacamãs em concentrações subletais provocou mortalidade de alguns animais e letargia nos animais sobreviventes. O estudo histológico aplicado neste experimento para os órgãos de importância vital (fígado e brânquias) demonstrou alterações teciduais causadas pelo glifosato, que corroboraram com as alterações relatadas na literatura envolvendo testes de toxicidade com a mesma formulação comercial. Desta forma, considera-se preocupante a exposição de *L. alexandri* ao glifosato e a contaminação deste herbicida em ambientes aquáticos. Além disso, podemos afirmar que é de grande importância a realização de testes de toxicidade subcrônica empregando-se concentrações subletais (obtidas a partir dos testes de toxicidade aguda), pois estas concentrações de poluentes mesmo sendo definidas como “níveis de segurança” podem não ser, de fato, seguras para a espécie testada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALAKA, S.E.; FATIHU, M.Y.; IBRAHIM, N.D.G. *et al.* Gills and skin histopathological evaluation in african sharptooth catfish, *Clarias gariepinus* exposed to ethanol extract of *Adenium obesum* stem bark. *Egypt. J. Aquat. Res.*, v.41, p.119-127, 2015.
- ABDELGHANI, A.A.; TCHOUNWOU, P.B.; ANDERSON, A.C. *et al.* Toxicity evaluation of single and chemical mixtures of Roundup, Garlon-3A, 2,4-D, and Syndets surfactant to channel catfish (*Ictalurus punctatus*), bluegill sunfish (*Lepomis microchirus*), and crawfish (*Procambarus spp.*). *Environ. Toxicol. Water. Qual.*, v.12, p.237-243, 1997.
- ABDEL-MONEIM, A.M.; AL-KAHTANI, M.A.; ELMENSHAWY, O.M. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. *Chemosphere*, v.2012, p.1028-1035, 2012.
- AGAMY, E. Histopathological liver alterations in juvenile rabbit fish (*Siganus canaliculatus*) exposed to light arabian crude oil, dispersed oil and dispersant. *Ecotox. Environ. Safe.*, v.75, p.171-179, 2012.
- ALBINATI, A.C.L.; MOREIRA, E.L.T.; ALBINATI, R.C.B. *et al.* Toxicidade aguda do herbicida Roundup® para piauçu (*Leporinus macrocephalus*). *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, v.8, p. 184-192, 2007.
- ANNETT, R.; HABIBI, H.R.; HONTELA, A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J. Appl. Toxicol.*, v.34, p.458-479, 2014.
- APHA- American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington: 1998, 1496p.
- BÁLINT, T.; SZEGLETES, T.; SZEGLETES, K. *et al.* Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin. *Aquat. Toxicol.*, v.33, p.279-295, 1995.
- BECKER, A.G.; BALDISSEROTTO, B. Regulação Osmótica e Iônica: Brânquias. In: BALDISSEROTTO, B., CYRINO, J.E.P., URBINATI, E.C. *Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce*. Jaboticabal: FUNEP, 2014. 255p.
- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W. *et al.* Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish. Dis.*, v. 22, p.25-34, 1999.
- BORGGGAARD, O.K.; GIMSING, A.L. Review Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest. Manag. Sci.*, v.64, p.441-456, 2008.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente, Portaria MMA nº 445, de 17 de dezembro de 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção - Peixes e Invertebrados Aquáticos.

BRAUNBECK T.; STORCH V.; BRESCH H. Species-specific reaction of liver ultrastructure in zebra fish, *Brachydanio rerio* and trout, *Salmo gairdneri* after prolonged exposure to 4-chloroaniline. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v.19, p.405-418, 1989.

BRAZ-MOTA, S.; SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; DUARTE, R.M. *et al.* Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. *Chemosphere*, v.135, p.53-60, 2015.

BUSSE, M.D.; RATCLIFF, A.W.; SHESTAK, C.J. *et al.* Glyphosate toxicity and effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.*, v.33, p.1777-1789, 2001.

CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotrop. Ichthyol.*, v.5, p.327-336, 2007.

CARDOSO, E.L.; CHIARINI-GARCIA, H.; FERREIRA, R.M.A.; POLI, C.R. Morphological changes in the gills of *Lophiosilurus alexandri* exposed to un-ionized ammonia. *J. Fish. Biol.*, v.49, p.778-787, 1996.

CARMONA, R.; GARCIA-GALLEGO, M.; SANZ, A. *et al.* Chloride cells and pavement cells in gill epithelia of *Acipenser naccarii*: ultrastructural modifications in seawater-acclimated specimens. *J. Fish Biol.*, v.64, p.553-566, 2004.

CEREJEIRA, M.J.; VIANA, P.; BATISTA, S. *et al.* Pesticides in portuguese surface and ground Waters. *Water. Res.*, v.37, p.1055-1063, 2003.

COSTA, D.C.; SILVA, W.S.; FILHO, R.M. *et al.* Capture, adaptation and artificial control of reproduction of *Lophiosilurus alexandri*: A carnivorous freshwater species. *Anim. Reprod. Sci.*, v.159, p.148-154, 2015.

COSTA, P.M.; DINIZ, M.S.; CAEIRO, M.S. *et al.* Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach. *Aquat. Toxicol.*, v.92, p.202-212, 2009.

COUPE, R.H.; KALKHOFF, S.J.; CAPELC, P.D.; GREGOIRE, C. Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. *Pest. Manag. Sci.*, v.68, p.16-30, 2011.

CRUZ, A.L.; FERNANDES, M.N. What is the most efficient respiratory organ for the loricariid air-breathing fish *Pterygoplichthys anisitsi*, gills or stomach? A quantitative morphological study. *Zoology.*, v,119, p.526-533, 2016.

- CURRIE, Z.; PROSSER, R.S.; RODRIGUEZ-GIL, J.K. *et al.* Toxicity of Cúspide 480SL[®] spray mixture formulation of glyphosate to aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.34, p.1178-1184, 2015.
- DANE, H.; SISMAN, T. Histopathological changes in gill and liver of *Capoeta capoeta* living in the Karasu River, Erzurum. *Environ. Toxicol.*, v.30, p.904-917, 2015.
- DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. *Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparações de amostras*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 60p.
- DELMONICO, E.L.; BERTOZZI, J.; SOUZA, N.E. *et al.* Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid for assessing the quality tap water using SPE and HPLC. *Acta Sci-Technol.*, v.36, p.613-519, 2014.
- DILL, G.M.; SAMMONS, R.D.; FENG, P.C.C. *et al.* Glyphosate: Discovery, development, applications, and properties. In: NANDULA, V.K. *Glyphosate resistance in crops and weeds*. Hoboken: John Wiley & Sons, p.1-33, 2010.
- DOS SANTOS, A.P.R.; ROCHA, T.L.; BORGES, C.L. *et al.* A glyphosate-based herbicide induces histomorphological and protein expression changes in the liver of the female guppy *Poecilia reticulata*. *Chemosphere*, v.168, p.933-943, 2017.
- DUKE, S.O.; POWLES, S.B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest. Manag. Sci.*, v.64, p.319-325, 2008.
- DUKE, S.O.; BAERSON, S.R.; RIMANDO, A.M. Herbicides: Glyphosate. In: PLIMMER, J.R., GAMMON, D.W., RAGSDALE, N.N. *Encyclopedia of Agrochemicals*. New York: John Wiley & Sons, 2003.
- DUKE, S.O.; LYDON, J.; KOSKINEN, W.C. *et al.* Glyphosate effects on plant mineral nutrition, crop rhizosphere microbiota, and plant disease in glyphosate-resistant crops. *J. Agric. Food Chem.*, v.60, 10375-10397, 2012.
- EVANS, D.H.; PIERMARINI, P.M.; CHOE, A.K.P. The Multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.*, v. 85, p.97-177, 2005.
- EVRARD, E.; MARCHAND, J.; THERON, M. *et al.* Impacts of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder *Platichthys flesus*. *Comp. Biochem. Phys. C.*, v.152, p.321-331, 2010.
- FANTA, E.; SANT'ANNA-RIOS, F.; ROMÃO, S. *et al.* Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, v.54, p.119-130, 2003.
- FERNANDES, M.N.; MORON, S.E. Respiração e adaptações respiratórias. In: BALDISSEROITO, B.; CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C. *Biologia de Peixes Neotropicais de Água Doce*. FUNEP: Jaboticabal, 2014. p.203-231.

- FIGUEREDO-FERNANDES, A.; FERREIRA-CARDOSO, J.V.; GARCIA-SANTOS, S. *et al.* Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, p.103-109, 2007.
- FIORI, E. D.; PIZARRO, H.; AFONSO, M.S. CATALDO, D. Impact of the invasive mussel *Limnoperna fortunei* on glyphosate concentration in water. *Ecotox. Environ. Safe.*, v.81, p.106-113, 2012.
- FOSKETT, J.K.; LOGSDON, C.D.; TURNER, T. Differentiation of the chloride extrusion mechanism during sea water adaptation of a teleost fish, the cichlid *Sarotherodon mossambicus*. *J. Exp. Biol.*, v.93, p.209-224, 1981.
- FRANZ, J.E.; MAO, M.K.; SIKORSKI, J.A. *Glyphosate: a unique global herbicide*. Washington: ACS, p.653, 1997.
- GHOLAMI-SEYEDKOLAEI, S.J.; MIRVAGHEFI, A.; FARAHMAND, H. KOSARI, A.A. Effect of glyphosate-based herbicide in *Cyprinus carpio*: Assessment of acetylcholinesterase activity, hematological responses and serum biochemical parameters. *Ecotox. Environ. Safe.*, v.98, p.135-141, 2013.
- GIESY, J.P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K.R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, v.167, p.35-120, 2000.
- GOMES, M.P.; SMEDBOL, E.; CHALIFOUR, A. *et al.* Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *J. Exp. Bot.*, v.65, p.4691-4703, 2014.
- GUILHERME, S.; GAIVÃO, I.; SANTOS, M.A.; PACHECO, M. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide-elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. *Mutat. Res.*, v.743, p.1-9, 2012.
- GUILOSKI, I.C.; SILVA, E.G.; NISHIKAWA, C.M. *et al.* Atividade da colinesterase em cérebro e músculo de *Corydoras paleatus* (Pisces, Teleostei) exposto ao carbaril. *Rev. Acad. Ciênc. Agrár. Ambient.*, v8, p.461-468, 2010.
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, v.12, p.714-719, 1977.
- HELANDER, M.; SALONIEMI, I.; SAIKKONEN, K. Glyphosate in northern ecosystems. *Trends Plant. Sci.*, v.17, p.569-574, 2012.
- HUED, A.C.; OBERHOEFER, S.; BISTONI, M.L.A. Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup) alters normal gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v.62, p.107-117, 2012.

INOKUCHI, M.; HIROI, J.; WATANABE, S. *et al.* Morphological and functional classification of ion-absorbing mitochondria-rich cells in the gills of Mozambique tilapia. *J. Exp. Biol.*, v.212, p.1003-1010, 2009.

JIRAUNGKOORSKULL, W.; UPATHAM, E.S.; KRUATRACHUE, M. *et al.* Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *ScienceAsia.*, v.28, p.121-127, 2002.

JIRAUNGKOORSKULL, W.; UPATHAM, E.S.; KRUATRACHUE, M. *et al.* Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ. Toxicol.*, v.18, p.260-267, 2003.

KANEKO, T.; WATANABE, S.; LEE, K.M. Functional morphology of mitochondrion-rich cells in euryhaline and stenohaline. *Aqua-BioSci. Monogr.*, v.1, p.1-62, 2008.

KARNAKY, K.J.; ERNST, S.A.; PHILPOTT, C.W. Teleost chloride cell I. Response of pupfish *Cyprinodon variegatus* gill Na,K-ATPase and chloride cell fine structure to various high salinity environments. *J. Cell Biol.*, v.70, p.144-156, 1976.

KOLPIN, D.W.; THURMAN, E.M.; LEE, E.A. *et al.* Urban contributions of glyphosate and its degrade AMPA to stream in the United States. *Sci. Total. Environ.*, v.354, p.191-197, 2006.

KOSKINEN, W.C.; MAREK, L.J.; HALL, K.E. Analysis of glyphosate and aminomethylphosphinic acid in water, plant materials and soil. *Pest. Manag. Sci.*, v.72, p.423-432, 2016.

LANGIANO, V.C.; MARTINEZ, C.B.R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.147, p.222-231, 2008.

LUSHCHAK, O.V.; KUBRAK, O.I.; STOREY, J.M. *et al.* Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere.*, v.76, p.932-937, 2009.

LUZ, R.K.; SANTOS, J.C.E. Densidade de estocagem e salinidade da água na larvicultura do pacamã. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.43, p.903-909, 2008.

MA, J.; LI, X. Alteration in the cytokine levels and histopathological damage in common carp induced by glyphosate. *Chemosphere*, v.128, p.293-298, 2015.

MAZON, A.F.; CERQUEIRA, C.C.C.; FERNANDES, M.N. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environ. Res.*, v.88, p.52-63, 2002.

MIYAZAKI, D.M.Y.; MACHADO-NETO, J.G.; CASTAGNOLLI, N. Toxicidade aguda de triclorfon, partion metílico e glifosato para alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e tambacu (*C. macropomum* X *Piaractus mesopotamicus*). In: Encontro

Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos (ENBRAPOA), Laguna. Maringá: Biblioteca Setorial da UEM, 2004, p.203.

MORAES, R.; CRAPEZ, M.; PFEIFFER, W. *et al.* *Efeitos de poluentes em organismos marinhos*. São Paulo: Arte e Ciência Villipress, 2001. 288p.

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Biotransformation, genotoxic and histopathological effects of environmental contaminants in european eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotox. Environ. Safe.*, v.53, p.331-347, 2002.

PELFRÈNE, A. Glyphosate: toxicologie et évaluation du risque pour l'homme. *Environ. Risques Santé.*, v.6, p.323-334, 2003.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MULLER, R., LLOYD, R. *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*. Oxford: Fishing News Books, 1994, p.339-352.

RAMIREZ-DUARTE, W.F.; RONDÓN-BARRAGÁB, I.S.; ESLAVA-MOCHA, P.R. Acute toxicity and histopathological alterations of Roundup[®] herbicide on “cachama blanca” (*Piaractus brachypomus*). *Pesq. Vet. Bras.*, v.28, p.547-554, 2008.

RELYEA, R.A. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecol. Appl.*, v.15, p.618-627, 2005.

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.

RUIZ-TOLEDO, J.; CASTRO, R.; RIVERO-PÉREZ, N. SÁNCHEZ, D. Occurrence of glyphosate in water bodies derived from intensive agriculture in a tropical region of southern Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.93, p.289-293, 2014.

SHIBATA, O.A. Family Pseudopimelodidae. In: REIS, R.E., KULLANDER, S.O., FERRARIS-JÚNIOR, C.J. *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre: Edipucrs, 2003, p.401-405.

SHIOGIRI, N.S.; PAULINO, M.G.; CARRASCHI, S.P. *et al.* Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Environ. Toxicol. Phar.*, v.34, p.388-396, 2012.

SINHORIN, V.D.G.; SINHORIN, A.P.; TEIXEIRA, J.M.S. *et al.* Metabolic and behavior changes in surubim acutely exposed to a glyphosate-based herbicide. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v.67, p.659-667, 2014a.

SINHORIN, V.D.G.; SINHORIN, A.D.P.; TEIXEIRA, J.M.S. *et al.* Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant

responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp). *Ecotox. Environ. Safe.*, v.106, p.181-187, 2014b.

SMITH, E.A.; OEHME, F.W. The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. *Vet. Hum. Toxicol.*, v.34, p.531-543, 1992.

SOLOMON, K.R.; THOMPSON, D.G. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.*, v.6, p.289-324, 2003.

SPRAGUE, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish - III Sublethal effects and safe concentrations. *Water Res.*, v.5, p.245-266, 1971.

STERNENSEN, J. *Chemical pesticides: mode of action and toxicology*. Boca Raton: CRC Press, 2001. 295p. Disponível em: <<http://base.dnsgb.com.ua/files/book/Agriculture/Plant-Pathology/Chemical-Pesticides.pdf>> Acesso em: 02 dez. 2016.

STERNERSEN, J. *Chemical Pesticides: Mode of Action and Toxicology*. Boca Raton: CRC Press, 2004, 296p.

SZÉKÁCS, A.; DARVAS, B. Forty years with glyphosate. In: HASANEEN, M.N.A.E-G. *Herbicides-properties, synthesis and control of weeds*. Rijeka: Intech, 2012. P.247-284. Disponível em: <<http://www.ask-force.org/web/HerbizideTol/Szekacs-Darvas-FortyYears-Glyphosate-2012.pdf>> Acesso em: 10, dez. 2016.

TAKASHIMA, F.; HIBYIA, T. *An atlas of fish histology normal and pathological features*. Tokyo: Kondansha, 1995, 195p.

TENORIO, R.A.; SANTOS, A.J.G.; LOPES, J.P.; NOGUEIRA, E.M.S. Crescimento do niquim (*Lophiosilurus alexandri* Steindachner 1876), em diferentes condições de luminosidade e tipos de alimento. *Acta. Anim. Sci.*, v.28, 305-309, 2006.

TRAVASSOS, H. Catálogo dos peixes do vale do Rio São Francisco. *Bol. Soc. Cearense Agron.*, v.1, p.36, 1960.

VAN-DER-OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assesment: a review. *Environ. Toxicol. Phar.*, v.13, p.57-149, 2003.

VERECKEN, H. Review. Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest. Manag. Sci.*, v.61, p.1139-1151, 2005.

VOLPATO, G.L. Comportamento e bem-estar. In: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J.C.E.P.; URBINATI, E.C. *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce*. Jaboticabal: FUNEP, 2014. p.59-82.

WILSON, J.W.; LAURENT, P. Fish gill morphology: inside out. *J. Exp. Zool. Part.A.*, v.293, p.192-213, 2002.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os herbicidas estão entre os pesticidas mais utilizados e a formulação comercial Roundup[®], que contém o glifosato como ingrediente ativo, tem sido empregada no campo cada vez mais, gerando preocupações quanto aos riscos de contaminação ambiental.

Por meio dos estudos de toxicidade realizados em juvenis de pacamã, podemos sugerir que o glifosato é potencialmente tóxico para *L. alexandri*, visto que concentrações baixas de glifosato provocaram mortalidade dos animais expostos aos testes de toxicidade aguda, além de alterações histológicas. O teste de toxicidade subcrônica, apesar de não ter provocado danos teciduais severos, apresentou mortalidade de animais e peixes aparentemente moribundos em concentração bem baixa de glifosato. Desta forma, podemos considerar preocupante possíveis contaminações deste herbicida em corpos aquáticos, principalmente em ambientes povoados por *L. alexandri*.

Sabe-se que os animais aquáticos são sensíveis a alterações do ambiente e que efeitos de xenobióticos podem ser evidentes em nível tecidual e celular, comportamental e aparente, prejudicando a saúde, desempenho e bem-estar animal. Sugerimos, portanto, que a escolha do local para práticas de aquicultura e captação de água para sistemas de produção devem ser bem estudadas a fim de evitar futuras complicações.