

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

EFETOS ECOTOXICOLÓGICOS DO GLIFOSATO E FORMULAÇÕES
EM DIFERENTES ORGANISMOS

Laís de Brito Rodrigues

Goiânia

2016

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: *Raís de Brito Rodrigues*

Título do trabalho: *Efeitos ecotoxicológicos do glifosato e formulações em diferentes organismos*

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Raís de Brito Rodrigues

Assinatura do (a) autor (ã)

Data: 03 / 02 / 17

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DO GLIFOSATO E FORMULAÇÕES
EM DIFERENTES ORGANISMOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientada: Laís de Brito Rodrigues.

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira.

Co-orientadora: Profa. Dra. Marize Campos Valadares.

Goiânia

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Rodrigues, Laís de Brito
Efeitos ecotoxicológicos do glifosato e formulações em diferentes organismos [manuscrito] / Laís de Brito Rodrigues. - 2016.
71 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira; co orientadora Dra. Marize Campos Valadares.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia, 2016.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Roundup. 2. Glifosato AKB 480. 3. Toxicidade aguda. 4. Fitotoxicidade. 5. Zebrafish. I. de Oliveira, Gisele Augusto Rodrigues, orient. II. Título.

CDU 615



Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



ATA DA SEÇÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aluno (a): Laís de Brito Rodrigues

Orientador (a): Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira

Título da Dissertação: "Efeitos ecotoxicológicos do glifosato e formulações em diferentes organismos".

Data: 23 de março de 2016

Horário: 14:00 horas

Local: Sala da pós-graduação/anexo II da Faculdade de Farmácia

Sugestões*:

*Obs: sugestão de alteração de título da dissertação deve ser acompanhada de justificativa.

*A aluna deverá realizar as alterações sugeridas pela banca
na versão final do trabalho*

Parecer da Banca Examinadora

Membro	Aprovado/R eprovado	Assinatura
Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira (FF/UFG) - Presidente	Aprovada	Gisele A. Rodrigues de Oliveira
Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira (USP)	APROVADA	Danielle Palma de Oliveira
Prof. Dr. César Koppe Grisolia (UnB)	APROVADA	César Koppe Grisolia
Prof. Dr. Eric de Souza Gil (FF/UFG) - Suplente		
Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha (FF/UFG) - Suplente		

Parecer Final	Aprovado/Reprovado	APROVADA
----------------------	---------------------------	-----------------

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: RODRIGUES, Laís Brito

Título do trabalho: Efeitos ecotoxicológicos do glifosato e formulações em diferentes organismos.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientada: Laís de Brito Rodrigues

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira.

Co-orientadora: Profa. Dra. Marize Campos Valadares.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos por Deus, por me dar sabedoria ao tomar as decisões e sempre me colocar de volta aos eixos em momentos de aflição.

Aos meus pais, Luiz Alberto e Maria da Consolação, meu infinito agradecimento por sempre depositarem toda credibilidade e confiança em minha capacidade em todas as situações e por terem me dado condições para chegar onde cheguei. Além disso, por serem meu grande exemplo. Amo vocês acima de qualquer circunstância.

À minha amiga e colega de trabalho Lara por tantos momentos compartilhados, principalmente nos últimos dois anos, sendo presente não somente no desenvolvimento deste trabalho, como também em minha vida pessoal de uma maneira singular.

À minha orientadora, Dra. Gisele, por quem tenho muito respeito e admiração. E, apesar de tantos obstáculos ao longo desse período, sempre acreditou no meu potencial de uma forma que eu não acreditava ser capaz de corresponder. Sempre disposta a ajudar, querendo que eu aproveitasse cada oportunidade que o mestrado pudesse me proporcionar. Você não foi somente uma orientadora, mas em muitos momentos foi uma grande amiga.

A minha co-orientadora Dra. Marize, meus sinceros agradecimentos por me receber no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Universidade Federal de Goiás por todos esses 5 anos. Pela amizade e confiança em meu potencial.

A toda equipe do Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade de Brasília, em especial ao Dr. Cesar e Dr. Rhaul por todos os conhecimentos compartilhados, confiança em nosso trabalho, prestatividade e alegria.

Aos colegas de laboratório, especialmente Thaís, Larissa, Linauri, Marilisa e Thainá que se tornaram verdadeiras amigas e tornaram mais leve meu trabalho. Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias, pela atenção e pelo apoio.

À secretária da Pós-graduação, Fernanda por ser sempre tão solícita, competente e por vezes tão mãe e amiga.

À CAPES e FAPEG pelo apoio financeiro.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Herbicidas à base de glifosato são amplamente utilizados em todo o mundo devido à sua eficácia e pelo fato de serem relativamente não-tóxicos para espécies não-alvo. O uso indiscriminado desses praguicidas podem levar a consequências graves em termos de saúde humana e desequilíbrio de ecossistemas. O presente trabalho avaliou a toxicidade aguda do ingrediente ativo (GLI) e duas formulações à base de glifosato, Roundup Original (RUP) e Glifosato de AKB 480 (AKB), em diferentes organismos: sementes de pepino (*Cucumis sativus*), alface (*Lactuca sativa*) e tomate (*Lycopersicon esculentum*), microcrustáceo *Artemia salina* e fases iniciais de desenvolvimento de zebrafish (*Danio rerio*). Para o *endpoint* de germinação, *L. esculentum* mostrou-se sensível a exposição ao AKB com CE50 de 702,10 mg/L e *L. sativa* para a exposição ao GLI com CE50 de 612,30 mg/L. No entanto, as três substâncias induziram efeito tóxico significativo no alongamento da raiz de todas as espécies testadas. GLI, RUP e AKB induziram toxicidade significativa para *A. salina* e foram classificados na Categoria III de acordo com critérios do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação (GHS). No entanto, o RUP (CL50-48h de 39,4 mg/L) foi mais tóxico do que GLI (CL50-48h de 65,24 mg/L) e AKB (CL50-48h de 104,20 mg/L). Para o teste de toxicidade com as fases iniciais de zebrafish, RUP (CL50-96h de 28,23 mg/L) provou ser mais tóxico para o parâmetro de mortalidade do que AKB (CL50-96h de 75,33 mg/L) e GLI (CL50 > 100 mg/L), enquanto que para o *endpoint* de eclosão, AKB (CE50-48h de 6,23 mg/L) mostrou-se mais tóxico do que o RUP (CE50-48h de 8,29 mg/L) e a exposição GLI não afetou a eclosão das larvas. Concluiu-se que, tanto o ingrediente ativo glifosato, quanto as formulações AKB e RUP foram fitotóxicos para as três espécies de sementes e induziram efeitos tóxicos em organismos não-alvo como *A. salina* e zebrafish. Além disso, nossos dados apontam para a necessidade de avaliação das diversas formulações a base de glifosato, uma vez que as mesmas apresentam diferentes potenciais tóxicos para diferentes organismos.

Palavras-chave: Glifosato, Roundup®, Glifosato AKB 480, Toxicidade aguda, Fitotoxicidade.

ABSTRACT

Glyphosate-based herbicides are the most commonly used worldwide due to their effectiveness and they are relatively non-toxic to non-target species. Unlimited and uncontrolled use of such pesticides can lead to serious consequences in terms of human health and ecological balance. We evaluated the acute toxicity of active ingredient glyphosate (GLI) and two glyphosate-based formulations, Roundup Original (RUP) and Glyphosate AKB 480 (AKB) on different organisms: seeds of cucumber (*Cucumis sativus*), lettuce (*Lactuca sativa*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*), microcrustacean *Artemia salina* and zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. For germination endpoint, *L. esculentum* presented sensitivity (EC₅₀ = 702.10 mg/L) for AKB and *L. sativa* for GLI exposure (EC₅₀ = 612.30 mg/l) whereas the three substances induced significant toxic effect on root elongation of all tested species. GLI, RUP and AKB induced significant toxicity to *A. salina* and were classified as Category III according to Globally Harmonized Classification System (GHS) criteria. However, RUP (LC₅₀-48h of 39.4 mg/L) was more toxic than GLI (LC₅₀-48h of 65.24 mg/L) and AKB (LC₅₀-48h of 104.20 mg/L). For embryo-larval toxicity test, RUP proved be more toxic than AKB for mortality endpoint (LC₅₀-96h of 28.23 and 75.33 mg/L, respectively) and GLI (LC₅₀ > 100 mg/L) while for hatching parameter, AKB (EC₅₀-48h of 6.23 mg/L) was more toxic than RUP (EC₅₀-48h of 8.29 mg/L) and GLI exposure did not affect the hatching process. We concluded that active ingredient (GLI), AKB and RUP glyphosate-based formulations are phytotoxic and induce toxic effects in non-target organisms like *A. salina* and zebrafish early life stage. In addition, our results shows the evaluation necessity of glyphosate-based formulations, once they present different toxic potentials on different organisms.

Keywords: Glyphosate, Roundup®, Glyphosate AKB 480, Acute toxicity, Phytotoxicity

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Fórmula estrutural do glifosato (N-fosfometil glicina).....21
- FIGURA 2.** Esquemática da ação do glifosato na rota metabólica do ácido chiquímico. Fonte: Adaptado de Graham e Webb (1991).....22
- FIGURA 3.** Disposição das sementes na placa de Petri previamente esterilizada. Todos os testes foram realizados na presença de controles negativo (água deionizada à 10% de água Milli-Q) e positivo (sulfato de zinco heptahidratado).....37
- FIGURA 4.** Desenvolvimento das sementes de pepino após 120 horas de incubação com sulfato de zinco - controle positivo (A) e água destilada - controle negativo (B).....38
- FIGURA 5.** Artefatos para eclosão dos naúplios de *A. salina*.....40
- FIGURA 6.** Representação da disposição dos ovos nas placas de 24 poços. (ci) controle interno da placa para verificar a reprodutibilidade do ensaio; (cn) controle negativo; (cx) concentrações testadas de GLI, AKB e RUP em mg/L.....42
- FIGURA 7.** Taxa de germinação relativa (TGR) de sementes de alface (*L. sativa*), pepino (*C. sativus*) e tomate (*L. esculentum*) após exposição a diferentes concentrações de glifosato puro (A), Roundup® (B) e Glifosato AKB (C). As barras de erro indicam o erro padrão de três réplicas. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ estatisticamente diferente em relação aos respectivos controles negativos (teste de Dunnett).....45
- FIGURA 8.** Taxa de crescimento relativo (TCR) das raízes de sementes de alface (*L. sativa*), pepino (*C. sativus*) e tomate (*L. esculentum*) após exposição a diferentes concentrações de glifosato puro (A), Roundup® (B) e Glifosato AKB (C). As barras de erro indicam o erro padrão de três réplicas. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ estatisticamente diferente em relação aos respectivos controles negativos (teste de Dunnett).....47
- FIGURA 9.** Curva dose-resposta para mortalidade de *Artemia salina* após 48h de exposição a diferentes concentrações de glifosato puro (GLI), Roundup® RUP e Glifosato AKB (AKB). As barras de erro indicam o erro padrão das três réplicas.....49

FIGURA 10. Curva dose-resposta para a mortalidade dos embriões de zebrafish após 96 horas de exposição às diferentes concentrações de glifosato puro (GLI), Roundup® RUP e Glifosato AKB (AKB).....52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Formulações comerciais à base de glifosato com suas respectivas composições e concentrações.....24

TABELA 2. Toxicidade aguda (CL50-96h em mg/L) de diferentes espécies de organismos expostos ao ácido e sal de glifosato, a formulação Roundup® e seu principal ingrediente inerte, POEA.....27

TABELA 3. Concentração média de efeito (CE50) sobre o crescimento das raízes de alface (*L. sativa*), pepino (*C. sativus*), e tomate (*L. esculentum*) após a exposição de 120 horas ao glifosato puro (GLI), Roundup® (RUP) e Glifosato AKB (AKB) com seus respectivos intervalos de confiança (IC).....48

TABELA 4. Concentração letal média (CL50) após 48 horas de exposição a glifosato puro (GLI), Roundup® RUP e Glifosato AKB (AKB) sobre *A. salina* e classificação de toxicidade de acordo com o critério do GHS (2007). Os intervalos de confiança (IC, $\alpha = 0,05$) foram gerados pelo software GraphPad Prism®.....50

TABELA 5. Concentrações médias letais (CL50) com os respectivos intervalos (IC) de confiança após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição a glifosato puro (GLI), Roundup® RUP e Glifosato AKB (AKB) em embriões de zebrafish.....51

TABELA 6. Taxas de eclosão das larvas (%) após a exposição a diferentes concentrações das formulações Roundup® RUP, Glifosato AKB (AKB) e Glifosato puro (GLI). Os valores estão representados pela taxa de eclosão \pm erro padrão.....53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKB	Formulação equivalente – Glifosato AKB 480
AMPA	Ácido aminometilfosfônico
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPL	Boas Práticas de Fabricação
CE50	Concentração Efetiva 50%
CL50	Concentração Letal 50%
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
EPSPs	5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FET	<i>Fish Embryo Toxicity Test</i>
GHS	<i>Globally Harmonized System</i>
GLI	Ingrediente ativo – Glifosato puro
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.
IC	Intervalo de Confiança

LOAEC	Menor concentração de efeito adverso observado
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PPA	Potencial de Periculosidade Ambiental
POEA	Polioxietileno amina
POEAs	Taloaminas polietoxiladas
QSARs	Modelos de relação estrutura-atividade
RUP	Formulação de referência – Roundup® Original
TCR	Taxa de comprimento relativo
TGR	Taxa de germinação relativa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Contaminação dos ecossistemas aquáticos	16
1.2 Praguicidas.....	17
1.2.1 Glifosato.	20
1.3 Avaliação ecotoxicológica	26
1.3.1 Ensaio de fitotoxicidade	28
1.3.2 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Artemia salina</i>	29
1.3.3 Ensaio de toxicidade aguda com os estágios embrio-larvais de zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	30
2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Substâncias-teste	35
3.1.1 Ingrediente ativo	35
3.1.2 Formulação de referência.....	35
3.1.3 Formulação equivalente	36
3.2 Ensaio ecotoxicológicos	36
3.2.1 Ensaio de fitotoxicidade utilizando sementes de alface (<i>L. sativa</i>), pepino (<i>C. sativus</i>) e tomate (<i>L. esculentum</i>)	36
3.2.2 Ensaio de toxicidade aguda com <i>A. salina</i>	39
3.2.3 Ensaio de toxicidade aguda com os estágios embrio-larvais de zebrafish (<i>D. rerio</i>).....	40
3.2.3.1 Manutenção do zebrafish	40
3.2.3.2 Aquisição de ovos.....	41
3.2.3.3 Procedimento do ensaio	41
4. RESULTADOS	43
4.1 Avaliação ecotoxicológica de GLI, RUP e AKB.....	44
4.1.1 Avaliação da fitotoxicidade do GLI, RUP e AKB utilizando sementes de alface (<i>L. sativa</i>), pepino (<i>C. sativus</i>) e tomate (<i>L. esculentum</i>)	44
4.1.2 Avaliação da toxicidade aguda de GLI, RUP e AKB sobre náuplios de <i>A. salina</i>	49
4.1.3 Avaliação da toxicidade com os estágios embrio-larvais de zebrafish (<i>D. rerio</i>)	50
4.1.3.1 Efeitos sobre a mortalidade	50
4.1.3.1 Efeitos sobre a eclosão	52
5. DISCUSSÃO	54

6. CONCLUSÃO	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXO	74
Anexo: Comitê de Ética aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA).....	75

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contaminação dos ecossistemas aquáticos

A água é um recurso de alta complexidade, dependente de um ciclo dinâmico de chuva, escoamento e evaporação, com enormes variações temporais e espaciais, bem como variações na qualidade que determinam o seu valor para os seres humanos e ecossistemas (RIJSBERMAN, 2006).

Embora a maior parte do planeta seja coberto por água, esse recurso em sua grande maioria encontra-se em formas indisponíveis para os seres vivos (ROBARTS; WETZEL, 2000). A pequena parcela renovável proporciona inúmeros benefícios desde a manutenção da biota aquática até irrigação de campos agrícolas, dessedentação de animais, produção industrial, recreação e consumo humano (ROSENBERG; MCCULLY; PRINGLE, 2000).

De acordo com dados da UNESCO, as águas doces representam apenas 2,7% da disponibilidade hídrica total do planeta. Desse total, a maior parcela (77,2%) se encontra em estado de inutilização, mostrando que a quantidade de água doce disponível para o consumo humano, presente nos lagos, rios e aquíferos de menor profundidade, representa menos de 1% da disponibilidade hídrica mundial (VARGAS, 1999).

Considerando o uso indiscriminado desse recurso, estima-se que em 2025 cerca de 1,8 bilhões de pessoas estarão vivendo sob a escassez absoluta de água, e que dois terços da população do mundo poderão viver em condições graves de estresse hídrico, ou seja, o limiar para satisfazer as necessidades de água para a agricultura, a indústria, uso doméstico, energia e meio ambiente (WHO, 2007; UNEP, 2007).

Adicionalmente, a escassez de água agrava os efeitos de fatores relacionados ao estresse hídrico como, alterações geomorfológicas, mudanças de uso da terra, a captação de água, patógenos e contaminação orgânica e inorgânica, resultando na diminuição da qualidade da mesma (NAVARRO-ORTEGA et al., 2015).

Há diversos tipos de substâncias presentes na água que são consideradas contaminantes emergentes, tais como medicamentos, produtos de higiene pessoal, praguicidas, retardantes de chama, corantes, hormônios, protetores solares, nanomateriais e toxinas de algas. Esses contaminantes podem ser definidos como

substâncias cuja ocorrência ou relevância no ambiente foi constatada recentemente ou sua ocorrência e persistência estão relacionadas a níveis significativamente diferentes do esperado e, seus riscos sobre a saúde humana e ambiental ainda permanecem incertos (RICHARDSON, 2008; MATAMOROS et al., 2012; US-EPA, 2014).

As propriedades físico-químicas como, solubilidade em água, pressão de vapor, polaridade, são fatores determinantes para o comportamento de um contaminante emergente no ambiente (DEBLONDE; COSSU-LEGUILLE; HARTEMANN, 2011). Eles podem ser degradados por processos biológicos, físicos ou químicos gerando subprodutos com um perfil toxicológico diferente do composto original (JAHAN et al., 2008). No entanto, alguns compostos não são degradados com facilidade podendo persistir no ambiente e se acumular entre níveis tróficos representando, desse modo, riscos à saúde humana e ambiental (LA FARRÉ et al., 2008). Os contaminantes persistentes no solo, por exemplo, podem ser lixiviados para águas subterrâneas ou ainda, transportadas para águas superficiais através de escoamento (OECD, 2012).

1.2 Praguicidas

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (Food and Agriculture Organization – FAO), os praguicidas são produtos químicos ou quaisquer substâncias ou mistura de substâncias destinadas à prevenção, destruição ou ao controle de pragas, incluindo vetores de doenças humanas e animais, que possam causar prejuízo ou interferir na produção, elaboração, armazenagem, transporte ou comercialização de alimentos, para homens e animais, de produtos agrícolas e da madeira, ou que possam ser administrados aos animais para combater insetos, aracnídeos ou outras pragas dentro de seus corpos e ainda, regular crescimento de plantas (ALONZO; CORREA, 2014).

Outras denominações como, praguicidas, agrotóxicos, defensivos agrícolas, agroquímicos, pesticidas, desinfestantes, biocidas são dadas às substâncias ou misturas de substâncias, naturais ou sintéticas, destinadas a repelir ou combater pragas, organismos que podem: a) consumir ou deteriorar materiais usados pelo homem, incluindo-se aí os alimentos; b) causar ou transmitir doenças ao homem ou a animais domésticos (SUCEN, 2001).

No Brasil a Lei Federal nº 7.802/1989 intitulada Lei de Agrotóxicos, regulamentada pelo Decreto nº 4.074/2002 esclarece o que pode ser legalmente considerado como agrotóxicos e componentes” no Capítulo I, Artigo 2.º, incisos XX e XXI como:

XX - agrotóxicos: Os produtos químicos destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento;

XXI - componentes: os princípios ativos, os produtos técnicos, suas matérias-primas, os ingredientes inertes e aditivos usados na fabricação de agrotóxicos e afins; (BRASIL, 1989).

No Brasil, a comercialização de praguicidas depende do registro que é realizado em conjunto e mediante a avaliação e aprovação por parte dos órgãos federais responsáveis pelos setores de saúde (Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA), de meio ambiente (Ministério do Meio Ambiente/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA) e de agricultura (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA) tendo como principal finalidade a avaliação da eficácia do produto e a comprovação da segurança para saúde humana e ambiental (IBAMA, 2014).

Nesse contexto, para um novo praguicida ser registrado, é necessário que sua ação tóxica seja igual ou menor do que a de outros praguicidas já existentes e destinados ao mesmo fim (PALAEZ; TERRA; DA SILVA, 2010). A comprovação da diferença de toxicidade se dá por meio de verificação entre as características físico-químicas de um praguicida já registrado (referência) e aquele candidato ao registro (equivalente) (BRASIL, 2002).

Em 2006, o Decreto nº 5.981 trouxe uma simplificação no processo de registro por meio de três requisitos. Na primeira fase apresentam-se laudos técnico-científicos dos processos de síntese e físico-químicos. Então, caso o novo

praguicida apresente os mesmos parâmetros de equivalência daquele de referência, o mesmo é aprovado. Caso contrário, uma segunda fase é aplicada com avaliações quanto à toxicidade aguda e mutagenicidade. Se os resultados obtidos na segunda fase forem insatisfatórios, a terceira fase será a avaliação da toxicidade crônica. Assim, se o novo praguicida for equivalente aquele de referência em uma das fases de avaliação, o registro é concedido (BRASIL, 2006).

A avaliação da toxicidade ambiental dos praguicidas é estabelecida conforme disposto no inciso II, Artigo 7º do Decreto nº 4.074/02 que diz que cabe ao Ministério do Meio Ambiente realizar a avaliação ambiental dos agrotóxicos, seus componentes e afins, estabelecendo suas classificações quanto ao potencial de periculosidade ambiental (PPA) (IBAMA, 2015).

O intuito dessa avaliação é estabelecer critérios que permitam a utilização racional e segura de praguicidas, a fim de preservar a qualidade dos recursos naturais. Desse modo, é solicitado aos registrantes uma série de estudos físico-químicos, toxicológicos e ecotoxicológicos para que seja possível a caracterização do produto, conhecimento de seu destino nos compartimentos ambientais, bem como sua toxicidade a diferentes organismos. Além disso, os estudos devem ser realizados por laboratórios nacionais ou internacionais que respeitem as Boas Práticas de Fabricação (BPL) e valer-se de metodologias nacionais ou internacionalmente aceitas e validadas (IBAMA, 2015).

Nesse estudo foram avaliadas a ecotoxicidade de duas formulações a base de glifosato, o Roundup (RUP) como formulação de referência e o Glifosato AKB 480 (AKB) como formulação equivalente.

Desde 1975, o Brasil encontra-se entre os seis maiores mercados consumidores de praguicidas (TERRA, 2008; NETO; SARCINELLI, 2009). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a partir de 2008, esse país passou a ocupar o primeiro lugar no ranking mundial de consumo desses compostos. (ANVISA, 2010; DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI et al., 2013; HARAYASHIKI et al. 2013; CATTANI et al., 2014).

Em 2010, os praguicidas com ação herbicida lideraram o mercado de produtos mais comercializados, representando 33% (2.428 milhões de dólares) das vendas em todo país (SINDAG, 2012). Além disso, o consumo anual de praguicidas no Brasil aumentou muito nos últimos anos e esse uso extensivo é justificado pelo

aumento da atividade agrícola, fazendo do país um dos maiores produtores de alimento do mundo (CATTANI et al., 2014).

Outra justificativa para esse aumento, deve-se ao fato de que o Brasil apresenta uma parcela significativa da área plantada de culturas geneticamente modificadas do mundo (23%), e ainda, o aumento do plantio dessas culturas, principalmente, a soja transgênica, tem levado ao aumento do uso de herbicidas com destaque especial para o glifosato (GOMES et al., 2014).

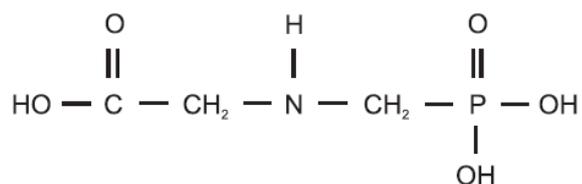
1.2.1 Glifosato

De acordo com o Relatório de Comercialização de Agrotóxicos elaborado anualmente pelo IBAMA, o glifosato é o ingrediente ativo com destaque nas formulações de herbicidas, representando, em 2012 uma grande parcela do mercado com mais de 180.000 toneladas em vendas (IBAMA, 2010).

A molécula de glifosato, N-(fosfometil)glicina, foi sintetizada pela primeira vez em 1950 por um pesquisador de uma pequena empresa farmacêutica suíça (Cilag), Henri Martin. No entanto, o composto não apresentou finalidade farmacêutica. Uma década mais tarde, após a venda da empresa Cilag para a distribuidora de produtos químicos, Aldrich Chemical Co., a molécula de glifosato chamou atenção de pesquisadores da Monsanto Company (FRANZ et al., 1997; DILL et al., 2010).

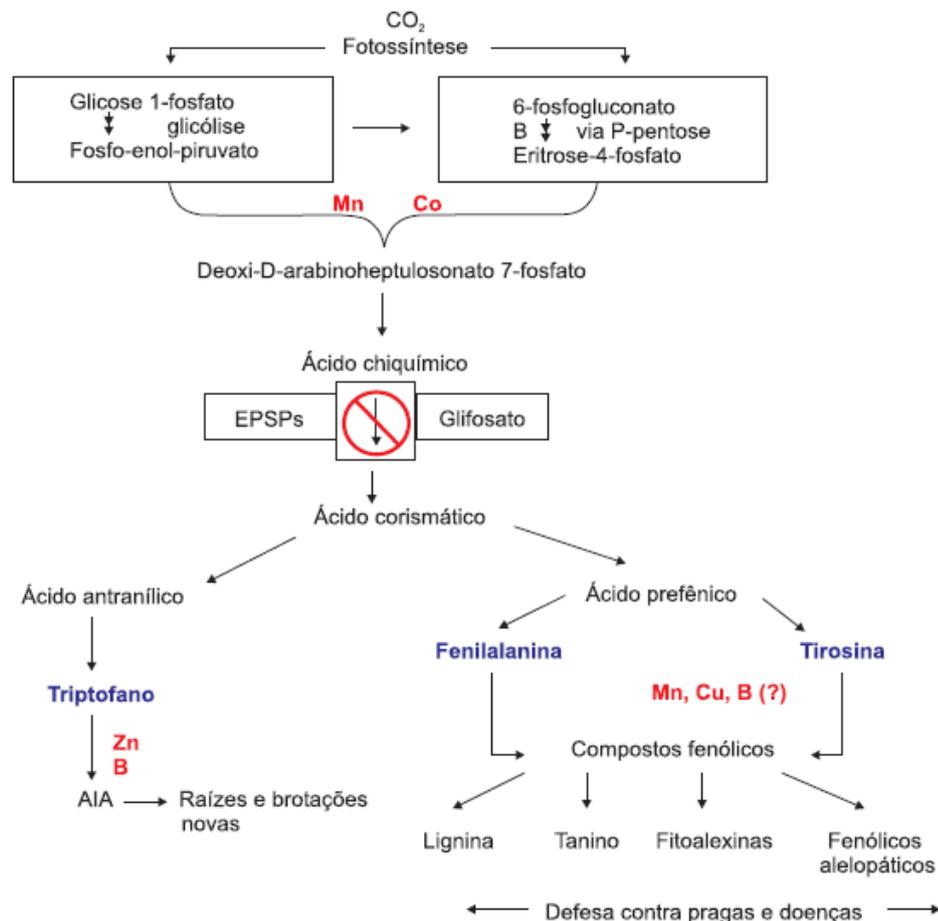
Sua ação herbicida foi descrita por Baird e colaboradores em 1971 e reivindicada pela Monsanto que, mais tarde, introduziria esse composto no produto formulado Roundup®. Em meados dos anos 70, o glifosato liderou o mercado de praguicidas e tornou-se o herbicida mais comercializado do mundo para o controle de ervas daninhas em áreas agrícolas e não-agrícolas (AGUIAR et al., 2016).

O glifosato pertence ao grupo dos fosfonatos e apresenta estrutura química (FIGURA 1) similar à classe dos organofosforados, com a diferença na substituição de um dos átomos de oxigênio ligado ao fósforo pelo aminoácido natural glicina (BAIRD, 2002).

FIGURA 1. Fórmula estrutural do glifosato (N-fosfometil glicina).

Esse composto é um potente herbicida pós-emergente, de largo espectro, não seletivo, com ação sob 76 espécies de plantas daninhas. O mecanismo de ação primário deste herbicida se dá por inibição competitiva da enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPs). Esta enzima participa da via de metabolização do ácido chiquímico, e quando não é ativada, não promove a síntese de triptofano, fenilalanina e tirosina, aminoácidos essenciais responsáveis pela síntese de precursores de ligninas, flavonoides, taninos e outros compostos fenólicos (COLE, 1985; FRANZ, 1985; BAI; OGBOURNE, 2016; GOMES et al., 2017), como mostra a FIGURA 2.

FIGURA 2. Esquemática da ação do glifosato na rota metabólica do ácido chiquímico.



Fonte: Adaptado de Graham e Webb (1991).

Uma vez pulverizado, ocorre uma rápida translocação das folhas para as raízes levando a eliminação total de plantas invasoras (FRANZ, 1985; SHANER, 2009). A presença de surfactante nas formulações de herbicidas faz-se determinante, uma vez que o mesmo tem a função de aumentar a eficiência de penetração do ingrediente ativo no interior das plantas (YAMADA; CASTRO, 2007).

Após aplicação, os sintomas observados são clorose foliar (amarelamento do limbo foliar) e, por consequência, necrose. Plantas tratadas com glifosato morrem de maneira lenta, em dias ou semanas, e em decorrência ao transporte sistêmico do composto, nenhuma parte da planta sobrevive (GRUYS; SIKORSKI, 1999).

Desde que foi introduzido no mercado de praguicidas, o uso do glifosato tornou-se uma prática frequente, devido à sua grande eficácia contra plantas daninhas, apresentando mais de 750 formulações registradas (TONI; SANTANA;

ZAIA, 2006; DOMINGUEZ et al., 2016). As formulações comerciais variam na composição química de acordo com as suas aplicações, podendo apresentar maior ou menor toxicidade (WEBSTER et al., 2014). De acordo com Folmar et al. (1979), o produto formulado apresenta toxicidade maior quando comparado ao ingrediente ativo puro.

Essas formulações são constituídas por glifosato em diferentes concentrações e acrescidas de ingredientes inertes, como os surfactantes, que são derivados de ácidos graxos, conhecidos como taloaminas polietoxiladas (POEAs) e encontrados em concentrações de 10 a 20% (m/v) (HOWE et al., 2004; RELYEA, 2006). A formulação à base de glifosato mais amplamente utilizada é denominada por Roundup®. Ela contém glifosato sobre a forma de ácido equivalente e de sal de isopropilamina, além de ingredientes inertes que aumentam a eficácia desse ingrediente ativo (TSUI; CHU, 2003).

A TABELA 1 apresenta algumas formulações à base de glifosato com suas respectivas concentrações de ingrediente ativo e substâncias inertes.

Embora a formulação equivalente AKB, objeto desse estudo apresente falhas na apresentação do rótulo com relação a informações como tipo e concentração de compostos inertes, fundamentais para a interpretação da toxicidade, esse composto é bastante comercializado na região Centro-Oeste, devido a sua fácil aquisição (sem receituário agrônomo). Contudo, essa formulação como mostra a TABELA 1 é equivalente a Roundup®, pois apresenta em seu conteúdo 48% (m/v) de sal de isopropilamina de glifosato e 36% (m/v) de equivalente ácido de N-(fosfometil) glicina.

TABELA 1. Formulações comerciais à base de glifosato com suas respectivas composições e concentrações.

Formulação	Concentração de ingrediente ativo (% m/v)	Concentração de substâncias inertes (% m/v)
Glifosato AKB 480 (AKB)	Sal de isopropilamina de glifosato (48%) e equivalente ácido de N-(fosfometil) glicina (36%)	--- ^a
Roundup® Original (RUP)	Sal de isopropilamina de glifosato (48%) e equivalente ácido de N-(fosfometil) glicina (36%)	68,4%
Roundup® Transorb	Sal de potássio de glifosato (58%) e equivalente ácido de N-(fosfometil) glicina (48%)	82%
Roundup® WG	Sal de amônio de glifosato 79,25% e equivalente ácido de N-(fosfometil) glicina (48%)	20,7%
Touchdown®	Sal de potássio de glifosato (62%) e equivalente ácido de N-(fosfometil) glicina (50%)	74%
Glifos®	Sal de isopropilamina de glifosato (48%) e equivalente ácido de N-(fosfometil) glicina (36%)	65,7%
Rodeo®	Sal de isopropilamina de glifosato (53,8%)	46,2%

---^a A concentração de substâncias inertes não é informada no rótulo do produto.

Fonte: o autor.

Devido à remoção da patente para a produção e comercialização do Roundup®, a utilização contínua e indiscriminada de herbicidas à base de glifosato no meio ambiente, faz desses praguicidas uma preocupação ecotoxicológica uma vez que tanto fatores ambientais quanto as substâncias inertes presentes em sua composição podem modificar a toxicidade de um produto (FISHER, 1990; TSUI; CHU, 2003; DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI et al., 2013; HARAYASHIKI, et al., 2013).

O glifosato entra no solo através da pulverização direta e, quando aplicado, espera-se que após sua ação o composto seja completamente degradado e eliminado do ambiente. Após aplicação, parte do composto que não atinge o alvo é depositado no solo e desse modo, ocorrem processos que determinam seu destino final (MORAES; ROSSI, 2010). Para o glifosato no solo os processos mais importantes incluem: formação de complexos em água com íons metálicos de Ca^{2+} , Mg^{2+} , absorção e metabolismo por plantas, biodegradação por microrganismos e sorção com sedimentos ou partículas suspensas em água e solo (PRATA, 2002).

A sorção é um processo físico-químico de interação praguicida-sedimento-água que varia de acordo com o tipo de sólidos no solo e características físico-químicas do praguicida. Sabe-se que, quanto menor a solubilidade de uma molécula em água, maior é sua capacidade de sorção no solo. Entretanto, o comportamento do glifosato contraria esta regra, por ser um composto altamente solúvel em água, mas com grande capacidade de sorção (NOMURA; HILTON, 1977; MORAES; ROSSI, 2010).

A sorção desse composto se apresenta em duas fases: a primeira é rápida, correspondendo a maior parte da retenção do glifosato, seguida por um longo período de degradação (NOMURA; HILTON, 1977; MORAES; ROSSI, 2010). Devido as suas características, o glifosato apresenta grande afinidade pela maioria dos solos apresentando uma adsorção nas primeiras quatro horas após a aplicação (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997). Esse fenômeno reduz parte de sua ação potencial levando ao aumento das quantidades de glifosato utilizadas. Uma vez adsorvido, o glifosato pode permanecer como resíduo no ambiente até sua completa mineralização, processo que pode durar dias ou meses, dependendo das características do solo, como textura, pH, conteúdo de carbono orgânico, entre outras (TONI; SANTANA; ZAIA, 2006).

A atividade microbiana também é um fator determinante para a presença de glifosato no solo, pois os microrganismos são os principais responsáveis por sua degradação e o utilizam como fonte de energia, fósforo, nitrogênio e carbono, gerando dois subprodutos: AMPA (ácido aminometilfosfônico) como metabólito principal e sarcosina como metabólito intermediário (DICK; QUINN, 1995; MATTOS et al., 2002).

O uso de herbicidas na agricultura também pode resultar na contaminação dos corpos hídricos (águas subterrâneas e superficiais) através da lixiviação e do

escoamento superficial desses compostos presentes no solo (PRATA et al., 2000). O glifosato pode persistir em água superficiais até 60 dias após a sua aplicação, mesmo sendo completamente solúvel (SILVA et al., 2003; QUEIROZ et al., 2011). Além disso, dados da literatura mostram que a meia-vida para o glifosato a 25°C em locais de baixa intensidade de luz é de até 47 dias, estendendo-se até 267 dias na mesma temperatura e aumentando para 361 dias a 31°C na ausência completa de luz (MERCURIO et al., 2014).

1.3 Avaliação ecotoxicológica

Ensaio ecotoxicológicos mostram que a toxicidade do glifosato pode variar de não-tóxico a ligeiramente tóxico para animais. No entanto, essas informações sobre o ingrediente ativo não podem ser transferidas a formulações a base de glifosato, uma vez que, os ingredientes inertes adicionados a ela podem ser mais tóxicos do que o próprio ingrediente ativo (WAGNER et al., 2013).

Inúmeros estudos demonstraram que os ingredientes inertes em formulações a base de glifosato podem ser mais tóxicos a organismos não-alvo do que o ingrediente ativo sozinho. Portanto, as formulações são misturas químicas e devem ser consideradas nas avaliações de toxicidade, como um todo (FOLMAR et al., 1979; USDA-FS, 1997).

A TABELA 2 fornece uma comparação de dados de toxicidade aguda entre ácido e sal de glifosato, a formulação Roundup® e seu principal ingrediente inerte, POEA em valores de concentrações letais médias (CL50) para diferentes espécies de organismos.

TABELA 2. Toxicidade aguda (CL50-96h em mg/L) de diferentes espécies de organismos expostos ao ácido e sal de glifosato, a formulação Roundup® e seu principal ingrediente inerte, POEA.

	Substância teste	Espécie	CL50 (mg/L)	Referência
Algas	Ácido de glifosato	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	590	(MAULE; WRIGHT, 1984)
		<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	485	(NATEC, 1990)
	Sal de glifosato	<i>Skeletonema costatum</i>	2,27	(TSUI; CHU, 2003)
		<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	41	(TSUI; CHU, 2003)
		<i>Skeletonema costatum</i>	5,90	(TSUI; CHU, 2003)
	Roundup	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	58,60	(HERNANDO et al., 1989)
		<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	5,80	(TSUI; CHU, 2003)
	POEA	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	2,63	(TSUI; CHU, 2003)
		<i>Skeletonema costatum</i>	2,24	(TSUI; CHU, 2003)
	Invertebrados	Ácido de glifosato	<i>Acartia tonsa</i>	36
<i>Ceriodaphnia dubia</i>			147	(TSUI; CHU, 2003)
<i>Daphnia magna</i>			780	(TSUI; CHU, 2003)
Sal de glifosato		<i>Acartia tonsa</i>	49	(TSUI; CHU, 2003)
		<i>Ceriodaphnia dubia</i>	415	(TSUI; CHU, 2003)
		<i>Daphnia magna</i>	930	(BEYERS, 1993)
Roundup		<i>Acartia tonsa</i>	1,80	(TSUI; CHU, 2003)
		<i>Ceriodaphnia dubia</i>	5,40	(TSUI; CHU, 2003)
		<i>Daphnia magna</i>	3,00	(FOLMAR et al., 1979)
POEA		<i>Acartia tonsa</i>	0,38	(TSUI; CHU, 2003)
		<i>Ceriodaphnia dubia</i>	0,77	(TSUI; CHU, 2003)
		<i>Daphnia pulex</i>	2,00	(MOORE et al., 1987)
Vertebrados (peixes)	Ácido de glifosato	<i>Cyprinus carpio</i>	620	(NESKOVIC et al., 1996)
		<i>Oncorhynchus mykiss</i>	22,19	(WAN et al., 1989)
	Sal de glifosato	<i>Ictalurus punctatus</i>	130	(FOLMAR et al., 1979)
		<i>Oncorhynchus mykiss</i>	140	(FOLMAR et al., 1979)
	Roundup	<i>Cyprinus carpio</i>	3,10	(LIONG et al., 1988)
		<i>Oncorhynchus mykiss</i>	8,40	(MORGAN et al., 1991)
	POEA	<i>Ictalurus punctatus</i>	13	(FOLMAR et al., 1979)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>		0.65	(FOLMAR et al., 1979)	

De acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação (GHS), o glifosato é categorizado na categoria III (perigoso para o ambiente) para toxicidade aguda aquática utilizando peixes (CL50-96h), crustáceos (CL50-48h) e uma espécie de alga (CL50-72h) como organismos testes para estabelecer o parâmetro de toxicidade (GHS, 2007). Todavia, dados da literatura sugerem que a elevada toxicidade dos herbicidas a base de glifosato, principalmente em organismos aquáticos, está relacionada aos ingredientes inertes (surfactantes) e não ao ingrediente ativo puro (WAGNER et al., 2013).

Além disso, o potencial impacto de muitos contaminantes ambientais como, o glifosato, pode estar relacionado ao seu movimento e a sua distribuição através dos ecossistemas, ou seja, a transferência entre os compartimentos ambientais ou biota exposta, ligação a sedimentos e degradação, que dependem de uma variedade de fatores como, comportamento do contaminante, complexidade da cadeia alimentar e diferenças entre a sensibilidade a esses contaminantes entre espécies (RENZONI et al., 1994).

A pesquisa ecotoxicológica vem sendo realizada em cinco áreas principais: desenvolvimento de modelos de relação estrutura-atividade (QSARs) para prever os possíveis efeitos toxicológicos de contaminantes, avaliação utilizando organismos inferiores (ex: bactérias e invertebrados), estudos sobre os efeitos de contaminantes sobre embriões de peixes, avaliação através de uma vasta gama de técnicas *in vitro* e utilização de biomarcadores para tentar estabelecer uma relação entre a exposição de um organismo a um determinado contaminante e seu efeito biológico. (RENZONI et al., 1994).

1.3.1 Ensaio de fitotoxicidade

A fitotoxicidade é descrita como uma intoxicação de plantas vivas, pela absorção de substâncias tóxicas presentes no ambiente de crescimento e pelo acúmulo das mesmas no tecido do vegetal (ARAÚJO, MONTEIRO, 2005).

Uma maneira simples, sensível, rápida e de baixo custo para avaliar o potencial tóxico de substâncias químicas em plantas se dá através de estudos toxicológicos utilizando sementes, mediante a avaliação do processo de germinação das sementes e desenvolvimento das raízes (MUNZUROGLU; GECKIL, 2002; WANG et al., 2001). As espécies de plantas recomendadas pela Agência de

Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), *Food and Drug Administration* (FDA) e Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) para o ensaio de germinação e crescimento da raiz são: pepino, alface, trevo vermelho (*red clover*) e trigo (EPA, 1982; FDA; 1987; OECD, 1984).

O bioensaio de fitotoxicidade apresenta vantagens sobre alguns ensaios de toxicidade. Sementes secas, encontram-se dormentes podendo resistir a ambientes hostis sem perder a viabilidade. Assim, em condições favoráveis, tem seu metabolismo e fisiologia ativados tornando-as altamente sensíveis ao estresse ambiental (MAYER; POLJAKOFF-MAYBER, 1982; WANG, 1991). Além disso, sementes podem ser obtidas comercialmente e a maioria das espécies podem ser armazenadas por longos períodos com baixos custos de manutenção (WANG et al., 2001). Nesse contexto, o ensaio tem sido considerado um dos mais simples métodos para o biomonitoramento ambiental (WANG; WILLIAMS, 1990; WANG; KETURI, 1990).

1.3.2 Ensaio de toxicidade aguda com *Artemia salina*

A. salina é um dos invertebrados de água salgada mais utilizados em ensaios de ecotoxicidade devido a sua ampla distribuição geográfica, tolerância a mudanças de temperatura e salinidade, ciclo de vida curto, alta capacidade de adaptação a condições ambientais diversas, tamanho pequeno, fácil manipulação, alta capacidade reprodutiva e adaptabilidade a fontes de nutrientes, uma vez que é um organismo filtrador não-seletivo (NUNES; CARVALHO; GUILHERMINO, 2006). Além disso, seus ovos apresentam viabilidade por anos quando armazenados sob a forma de cistos a temperatura ambiente e em condições adequadas, as formas jovens podem ser obtidas em 24 a 48 horas (RAMOS et al., 1998).

Apesar de seu uso disseminado em ecotoxicologia, estudos mostram a *A. salina* como uma espécie menos sensível para ensaios ecotoxicológicos, quando comparados a outros organismos sob as mesmas condições experimentais, tais como *Streptocephalus rubricaudatus* e *Daphia magna*, entretanto, a sua tolerância natural pode ser encarada como uma vantagem, em comparação com outros organismos-teste, menos adaptados a variações abióticas.

As características intrínsecas, descritas anteriormente, somadas ao baixo custo de manutenção transformam/fazem desse microcrustáceo de água salgada um modelo para as avaliações ecotoxicológicas (CRISINEL et al., 1994; OKAMURA et

al., 2000; NUNES; CARVALHO; GUILHERMINO, 2006), em testes isolados ou combinados a outras espécies, para a determinação das respostas em diversos níveis tróficos (NUNES; CARVALHO; GUILHERMINO, 2006).

1.3.3 Ensaio de toxicidade aguda com os estágios embrio-larvais de zebrafish (*Danio rerio*)

O zebrafish, também conhecido como paulistinha ou peixe-zebra, é um teleosteo, de 3-4 cm de tamanho, tropical de água doce, nativo de rios do Sul e Sudeste da Ásia, pertencente à família dos Cyprinidae, à ordem dos Cypriniformes e a espécie *Danio rerio*. Entre as características do zebrafish, a mais marcante é o seu padrão de listras pretas e brancas ao longo do corpo. Ele possui nadadeiras anal e caudal e, os machos são geralmente mais delgados e escuros que as fêmeas (LAWRENCE, 2007; SCHOLZ et al., 2008).

Algumas características têm contribuído para a popularidade do zebrafish como modelo experimental, são elas: alta taxa de fecundidade, o tamanho pequeno, produção de grande número de embriões, curto ciclo reprodutivo, transparência dos ovos e larvas, que possibilita acompanhar o desenvolvimento do peixe e observar a presença de malformações, desenvolvimento externo, permitindo a utilização de procedimentos não invasivos minimizando, desse modo, o sofrimento e reduzindo o estresse que o animal pode experimentar. O genoma do zebrafish está completamente caracterizado e a similaridade genética aos humanos, cerca de 70%, também oferece uma posição privilegiada desse organismo-teste na avaliação genética e toxicológica (BALCOMBE et al., 2004; LAWRENCE, 2007; FEITSMA; CUPPEN, 2008; SCHOLZ et al., 2008; HOWE et al., 2013).

Como outros peixes, o zebrafish apresenta os estágios larval, juvenil e adulto de desenvolvimento. O estágio larval do zebrafish inicia-se logo após a eclosão do ovo, que ocorre em 48-72 horas pós-fertilização (hpf). Em 24-48 horas após a eclosão, as larvas inflam suas bexigas natatórias e 5 dias pós-fertilização (dpf), o coração, fígado, cérebro, pâncreas e outros órgãos já estão desenvolvidos (KIMMEL et al., 1995; SCHOLZ et al., 2008).

Nas últimas décadas, ensaios utilizando embriões e larvas do zebrafish (*D. rerio*) têm atraído à atenção de toxicologistas como organismos modelo para estudos da toxicidade de compostos químicos em relação ao desenvolvimento

desse vertebrado tanto para a avaliação do risco ambiental quanto humano (SCHOLZ et al., 2008; CARLSSON et al., 2013).

Em vista dessas inúmeras características vantajosas, e, ainda sua sensibilidade a diferentes tipos de contaminantes, este modelo pode ser utilizado para estudos que visem monitoramento ecotoxicológico, incluindo avaliação de poluentes ambientais como toxicidade de metais pesados, disruptores endócrinos e contaminantes emergentes (GOOLISH; OKUTAKE; JOHNSON, 2000; DAI et al., 2014). Além disso, o zebrafish representa uma alternativa viável a estudos com mamíferos, uma vez que apresenta baixo custo de manutenção, facilidade de manutenção em laboratório do que modelos utilizando roedores e, de acordo com a legislação europeia, os estágios iniciais de desenvolvimento não necessitam de regulamentação, pois não são considerados animais uma vez que embriões e larvas não alcançaram a alimentação exógena (BALCOMBE et al., 2004; DIRECTIVE 2010/63/EU).

Assim, por razões éticas os testes com embriões de *zebrafish* têm sido propostos como uma alternativa para a substituição dos experimentos com animais adultos em pesquisas biomédicas, ambientais, toxicológicas e ecotoxicológicas, reafirmando sua relevância para saúde humana e ambiental (TEIXIDÓ et al., 2013; GARCIA; NOYES; TANGUAY, 2016).

Tendo em vista a variedade de formulações comerciais de herbicidas a base de glifosato e o impacto ambiental proveniente do uso indiscriminado das mesmas, esse trabalho investigou e comparou a toxicidade do Roundup® Original (RUP) como formulação de referência, do Glifosato 480 AKB (AKB) como formulação equivalente e do ingrediente ativo glifosato puro (GLI), utilizando bioensaios com diferentes organismos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivos avaliar e comparar o potencial tóxico de duas formulações a base de glifosato, Roundup Original (referência, RUP) e Glifosato 480 AKB (equivalente, AKB) e o ingrediente ativo puro glifosato (GLI), em diferentes organismos.

Para atingir estes objetivos, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a fitotoxicidade do glifosato (GLI) e das formulações (RUP e AKB) utilizando sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*), pepino (*Cucumis sativus*) e alface (*Lactuca sativa*);
- Avaliar a toxicidade aguda do glifosato (GLI) e das formulações (RUP e AKB) utilizando o microcrustáceo *A. salina*;
- Avaliar os efeitos letais e subletais do glifosato (GLI) e das formulações (RUP e AKB) sobre o desenvolvimento embrio-larval de zebrafish (*D. rerio*);
- Comparar a toxicidade das formulações comerciais a base de glifosato com seu ingrediente ativo.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Substâncias-teste

Os ensaios foram conduzidos com os seguintes compostos: glifosato puro, obtido da Sigma-Aldrich (Seelze, LS, GER) e duas formulações a base desse ingrediente ativo, Glifosato 480 AKB (Anápolis, GO, BRA) e Roundup Original® (São José dos Campos, SP, BRA), que foram obtidas comercialmente. Todas as substâncias-testes com suas respectivas denominações respeitando o Decreto 4.074/02 estão descritas abaixo.

3.1.1 Ingrediente ativo

- *Glyphosate* PESTANAL® (GLI)
 - Nome químico: N-(fosfonometil)glicina;
 - CAS: 1071-83-6;
 - Peso molecular: 169,07 g/mol;
 - Pureza: 99,7%
 - Fabricante: Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH.
 - Lote: SZBD267XV

3.1.2 Formulação de referência

- Roundup Original® (RUP)
 - Tipo de formulação: concentrado solúvel;
 - Composição: sal de isopropilamina de N-(fosfometil) glicina (48% m/v), equivalente ácido de N-(fosfometil) glicina (36% m/v), ingredientes inertes (68,4% m/v);
 - Classe: herbicida não seletivo de ação sistêmica do grupo químico glicina substituída;
 - Classificação de periculosidade ambiental: produto perigoso ao meio ambiente (classe III);
 - Classificação toxicológica: medianamente tóxico (classe III);
 - Registro no MAPA: 0898793;
 - Fabricante: Monsanto do Brasil LTDA;
 - Lote do fabricante: BRO011.

3.1.3 Formulação equivalente

- Glifosato 480 AKB (AKB)
 - Tipo de formulação: concentrado solúvel;
 - Composição: glifosato (48% m/v), veículo;
 - Classe: glicina substituída;
 - Classificação de periculosidade ambiental: não apresenta classificação no rótulo;
 - Classificação toxicológica: não apresenta classificação no rótulo;
 - Registro na ANVISA/MS: 325220006;
 - Fabricante: Kelldrin Industrial LTDA;
 - Lote do fabricante: 1156.

3.2 Ensaios ecotoxicológicos

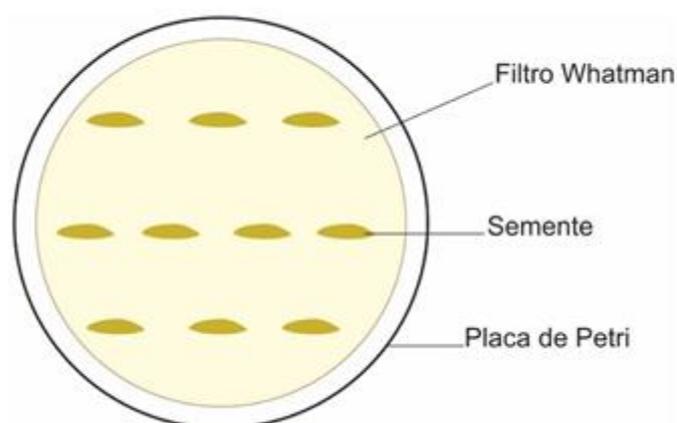
3.2.1 Ensaio de fitotoxicidade utilizando sementes de pepino (*Cucumis sativus*), alface (*Lactuca sativa*) e tomate (*Lycopersicon esculentum*)

O teste de toxicidade aguda com sementes foi realizado de acordo com *Ecological Effects Test Guideline - Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test* (OPPTS 850.4200), desenvolvido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA, 1996) com algumas adaptações. Sementes de *C. sativus* (pepino), *L. sativa* (alface) e *L. esculentum* (tomate) das marcas ISLA, FELTRIN e ISLA, respectivamente, foram obtidas comercialmente. Antes do início do ensaio, foram realizadas as etapas de esterilização e separação das sementes de qualidade inferior. Para esterilização, as sementes foram imersas em solução de hipoclorito a 0,1% por 10 minutos, com objetivo de prevenir o crescimento de fungos. Decorrido o tempo, a água de lavagem foi descartada, procedendo à etapa de enxágue em água deionizada por três vezes. A etapa de separação das sementes danificadas foi realizada em um béquer contendo água deionizada suficiente para cobrir as sementes, agitada em movimentos circulares com o auxílio de um bastão de vidro, de modo que as sementes sem danos ficassem no fundo do recipiente e as sem capacidade germinativa, na superfície. O conteúdo da parte superior foi removido com auxílio de uma peneira e a água foi descartada preservando as sementes

presentes no fundo do béquer. As placas de Petri contendo papel filtro Whatman (Freiburg, BRE, GER) número 2 (9 cm de diâmetro) também foram esterilizadas mediante luz UV por 20 minutos.

Um volume de 2 mL das soluções de GLI, RUP e AKB, controle negativo (água deionizada) e sulfato de zinco heptahidratado (controle positivo) a 0,68 mg/L para *L. sativa*; 2,88 mg/L para *C. sativus* e 4,61 mg/L para *L. esculentum* foi utilizado para umedecer toda a extensão do papel, de modo a saturá-lo, evitando a formação de bolsas de ar. Em seguida, cada placa recebeu 10 sementes por espécie vegetal, uniformemente distribuídas com 1,0 cm de distância entre si, garantindo um espaço suficiente para o crescimento, como demonstrado na FIGURA 3.

FIGURA 3. Disposição das sementes de pepino, alface e tomate na placa de Petri previamente esterilizada. Todos os testes foram realizados na presença de controles negativo (água deionizada à 10% de água Milli-Q) e positivo (sulfato de zinco heptahidratado).



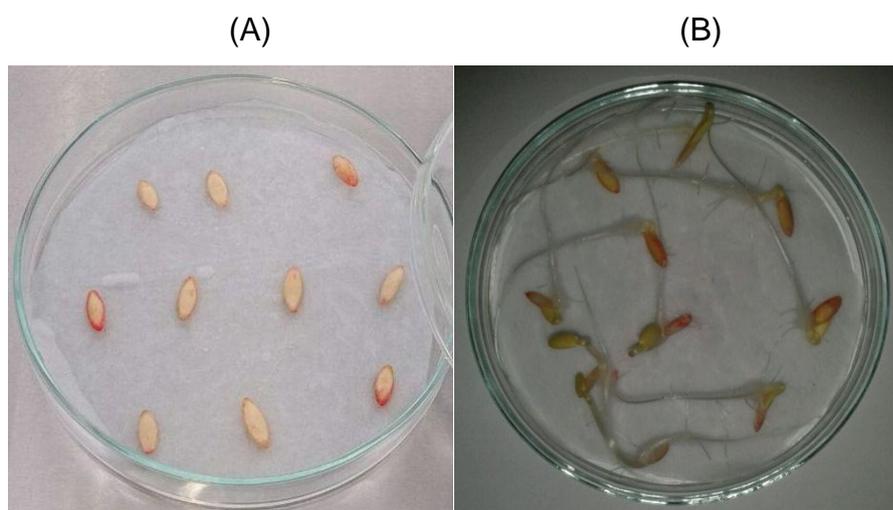
Fonte: O autor.

As sementes de cada espécie testada foram expostas a oito concentrações de GLI, RUP e AKB escolhidas de acordo com a OPPTS 850.4200 (US EPA, 1996) em uma escala de 2 ou 2,5 (0, 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 mg/L), considerando a concentração de 1000 mg/L como o limite máximo de concentração a ser testada, e a de 5 mg/L, como a concentração de nenhum efeito tóxico observado, obtida em ensaios preliminares.

As placas de Petri foram fechadas com tampa, identificadas e incubadas em estufa a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por um período de 120 horas, na ausência de luz. Durante esse período de germinação em estufa, o papel se manteve úmido.

Decorrido o tempo de exposição, as placas foram submetidas à análise em relação à germinação das sementes (número de sementes germinadas) e ao crescimento das raízes (comprimento das raízes) e comparadas com os respectivos controles negativos, obedecendo ao critério de validação, no qual 80% das sementes do controle negativo devem germinar e ter pelo menos 5 mm de protrusão radicular (FIGURA 4).

FIGURA 4. Desenvolvimento das sementes de pepino após 120 horas de incubação com sulfato de zinco - controle positivo (A) e água destilada - controle negativo (B).



Fonte: O autor.

O número de sementes germinadas foi contado e o comprimento das raízes foi medido, com auxílio de uma régua, após as 120 horas de exposição ao GLI, RUP e AKB.

A taxa de germinação relativa (TGR) foi calculada como:

$$\text{TGR} = \frac{\text{média número sementes germinadas}}{\text{número total sementes colocadas p/ germinar}} \times 100$$

Para avaliar o desenvolvimento da raiz, a taxa de comprimento relativo (TCR) foi determinada da seguinte forma:

$$\text{TCR} = \frac{\text{média comprimento da raiz}}{\text{média comprimento da raiz do CN}} \times 100$$

As análises estatísticas das três placas por espécie vegetal foram realizadas através da análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Dunnett utilizando o *software* GraphPad Prism 5.0® (San Diego, CA, USA). A concentração média de efeito sobre a germinação das sementes e crescimento da raiz (CE50) foram determinados pelo mesmo *software* admitindo o intervalo de confiança de 95%.

3.2.2 Ensaio de toxicidade aguda com *A. salina*

Para o teste de toxicidade aguda com náuplios de *A. salina*, utilizou-se a metodologia estabelecida por Meyer (1982) e OECD 202 (2004), com algumas modificações. Cistos de *A. salina* (Artêmia Salina do RN, Natal, RN, BRA), obtidos comercialmente, foram eclodidos em uma solução salina com 3,5% de sal marinho (Blue Treasure®) em água deionizada à temperatura de 27°C, sob aeração constante, na presença de luz (FIGURA 5). Após 48 horas, os náuplios foram coletados e distribuídos em placas de 24 poços em quadruplicata (5 náuplios/poço) com 2 mL das diferentes concentrações (0, 5, 10, 25, 50, 100 mg/L) de GLI, RUP, AKB controle negativo (água salina a 10% de água Milli-Q) e controle positivo (dodecil sulfato de sódio a 10 mg/L). As concentrações foram escolhidas a partir das informações obtidas no banco de dados ECOTOX Database (US EPA, 2014) e o ensaio foi conduzido em quadruplicata.

FIGURA 5. Artefatos para eclosão dos náuplios de *A. salina*.



Fonte: O autor.

O efeito observado após 48 horas de exposição foi a imobilidade dos organismos. Os náuplios que não apresentavam nado livre em um intervalo de 15 segundos, após agitação mecânica das soluções contidas nos poços, foram considerados mortos, ainda que fossem capazes de movimentar as antenas (OECD, 2004). A CL50 foi determinada como a concentração estimada para qual morrem 50% dos náuplios expostos após 48 horas. Os valores de CL50 foram determinados pelo *software* GraphPad Prism® 5.0 utilizando regressão não-linear com um intervalo de confiança de 95%. Como critério de validação, estabeleceu-se mortalidade inferior a 10% do grupo controle negativo.

3.2.3 Ensaio de toxicidade aguda com os estágios embrio-larvais de zebrafish (*Danio rerio*)

3.2.3.1 Manutenção dos peixes adultos

Peixes adultos machos e fêmeas de zebrafish (*D. rerio*) provenientes do Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade de Brasília foram mantidos em aquário com água reconstituída de acordo com o proposto pela OECD 236 (2013), com aeração constante, a uma temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, em ciclo claro:escuro de 12:12 horas, e, alimentados com ração comercial seca e *A. salina*

congelada. Vale ressaltar que esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás (PROTOCOLO N. 102/14).

3.2.3.2 Aquisição de ovos

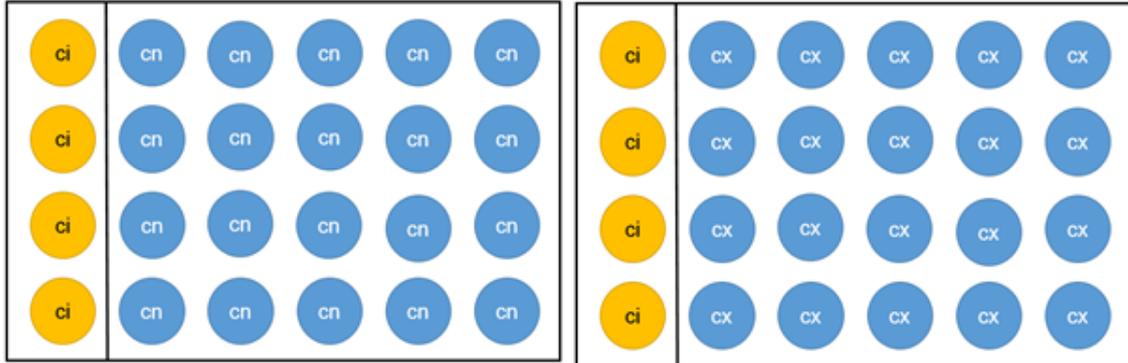
Para aquisição dos ovos, no dia anterior a desova, os peixes foram selecionados, transferidos para aquários na proporção de 2:1 (machos:fêmeas) e separados por uma barreira. De modo a criar um ambiente favorável a reprodução, plantas artificiais foram fixadas no fundo aquário. Bolas de vidro e uma tela também foram colocadas ao fundo para facilitar a coleta dos ovos. O acasalamento iniciava-se durante as primeiras horas do ciclo claro na manhã seguinte. Cerca de uma hora após a desova, os ovos foram coletados e transferidos para uma placa Petri para separação de ovos viáveis (embrionados) e descarte dos não viáveis (coagulados) observando-os em um estereomicroscópio.

3.2.3.3 Procedimento do ensaio

Inicialmente, fez-se uma pesquisa das concentrações médias letais para diferentes espécies de peixes obtidas em ensaios com duração máxima de 120 horas na base de dados ECOTOX Database (US-EPA, 2014), obtendo 282,05 mg/L como média das concentrações encontradas. A partir desse valor, as concentrações foram definidas nas proporções de 2 ou 2,3 (5, 10, 25, 50 e 100 mg/L) para AKB, RUP e GLI. As soluções de AKB, RUP e GLI foram preparadas utilizando como solvente água reconstituída (0,0065 g/L CaCl_2 ; 0,1335 g/L MgSO_4 ; 0,0004 g/L KCl ; e 0,0105 g/L NaHCO_3 , pH $7,0 \pm 0,5$).

O *Fish embryo toxicity (FET) test* foi executado de acordo com o Guideline OECD 236 (2013) com adaptações. Após a seleção dos ovos fertilizados, esses foram distribuídos em placas de cultura com 24 poços, dispostos individualmente em poços contendo 2,0 mL de cada concentração das soluções de AKB, RUP e GLI, assim como para os controles negativo (água reconstituída) e positivo (3,4 – dicloroanilina a 3,7 mg/L) conforme mostra a FIGURA 6. O ensaio foi realizado em triplicata e cada réplica foi constituída por controle interno da placa (ci), 20 embriões para o controle negativo (cn) e 20 embriões para cada concentração testada (cx).

FIGURA 6. Representação da disposição dos ovos nas placas de 24 poços. (ci) controle interno da placa para verificar a reprodutibilidade do ensaio; (cn) controle negativo; (cx) concentrações testadas de GLI, AKB e RUP em mg/L.



Fonte: O autor.

As placas foram incubadas em câmara com fotoperíodo 12:12 horas (claro:escuro) a $26 \pm 1^\circ\text{C}$. O desenvolvimento dos embriões foi acompanhado em 24, 48, 72 e 96 horas pós fertilização (hpf) com auxílio de um esteromicroscópio (CARL ZEISS *stereomicroscope Stemi 2000-C*). Os seguintes parâmetros foram avaliados: coagulação dos ovos, malformações no saco vitelínico, ausência de formação de somitos, desprendimento da cauda do saco vitelínico, ausência de batimentos cardíacos, formação de edema pericardial, atraso na eclosão das larvas, eclosão precoce de larvas, comprometimento na inflação da bexiga natatória. A mortalidade foi identificada pela coagulação dos ovos, ausência de formação de somitos ausência de desprendimento da cauda do saco vitelínico, assim como, a ausência de batimentos cardíacos.

Como critério de validação, estabeleceu-se mortalidade inferior a 10% no controle negativo. As análises estatísticas das três repetições foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Dunnett, utilizando o software do *software* SigmaPlot 11.0 (Systat, EUA).

RESULTADOS

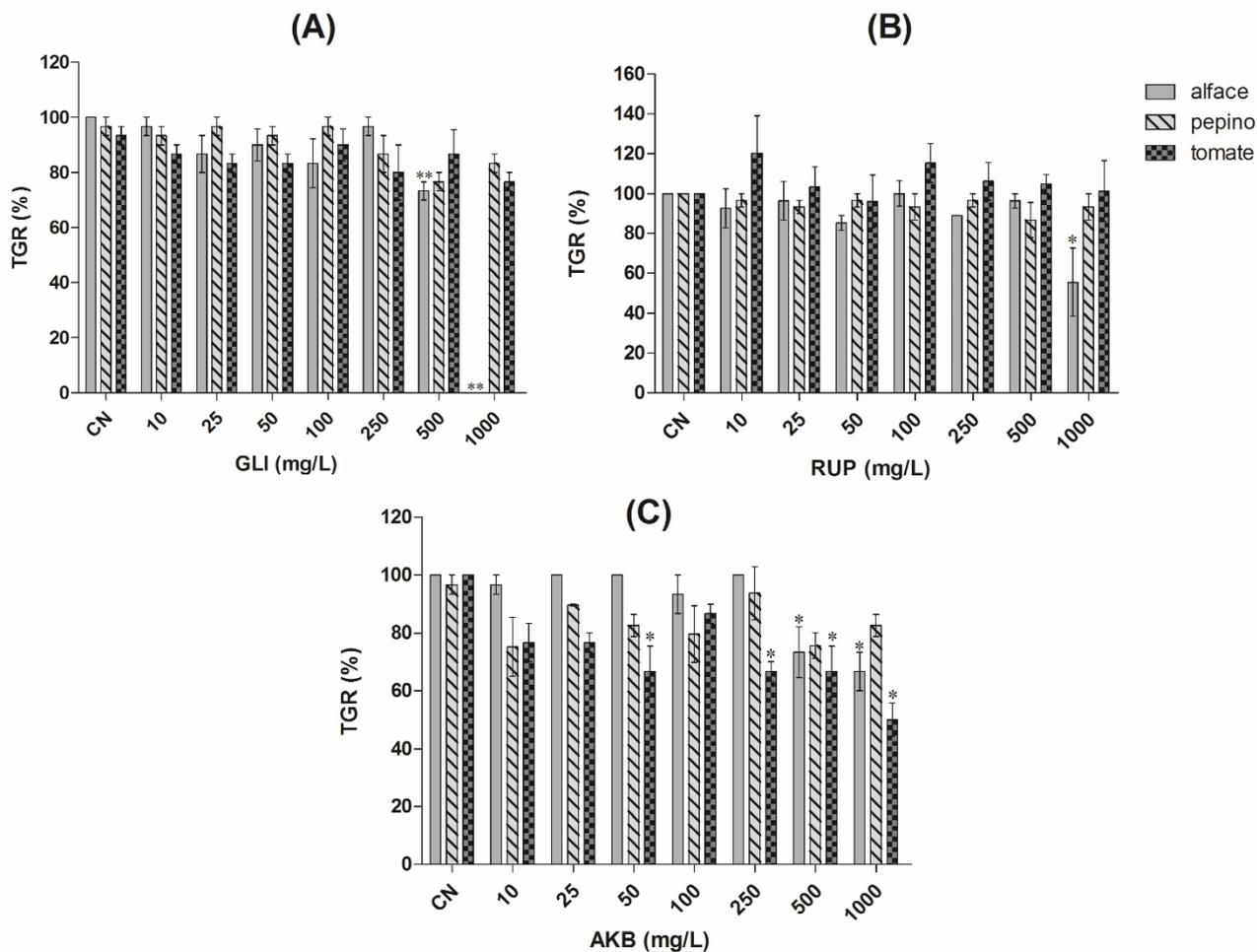
4 RESULTADOS

4.1 Avaliação ecotoxicológica de GLI, RUP e AKB.

4.1.1 Avaliação da fitotoxicidade do GLI, RUP e AKB utilizando sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*), pepino (*Cucumis sativus*) e alface (*Lactuca sativa*)

Os efeitos do ingrediente ativo (GLI) e das formulações de referência (RUP) e equivalente (AKB) sobre a germinação das sementes de alface (*L. sativa*), pepino (*C. sativus*) e tomate (*L. esculentum*) estão apresentados como taxa de germinação relativa (TGR) na FIGURA 7.

FIGURA 7. Taxa de germinação relativa (TGR) de sementes de alface (*L. sativa*), pepino (*C. sativus*) e tomate (*L. esculentum*) após exposição a diferentes concentrações de glifosato puro (A), Roundup® (B) e Glifosato AKB (C). As barras de erro indicam o erro padrão de três réplicas. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ estatisticamente diferente em relação aos respectivos controles negativos (teste de Dunnett).



Tanto GLI como o RUP exibiram efeito significativo apenas sobre a germinação das sementes de alface (FIGURA 7A e FIGURA 7B). O AKB também foi tóxico para as sementes de alface e tomate (FIGURA 7C).

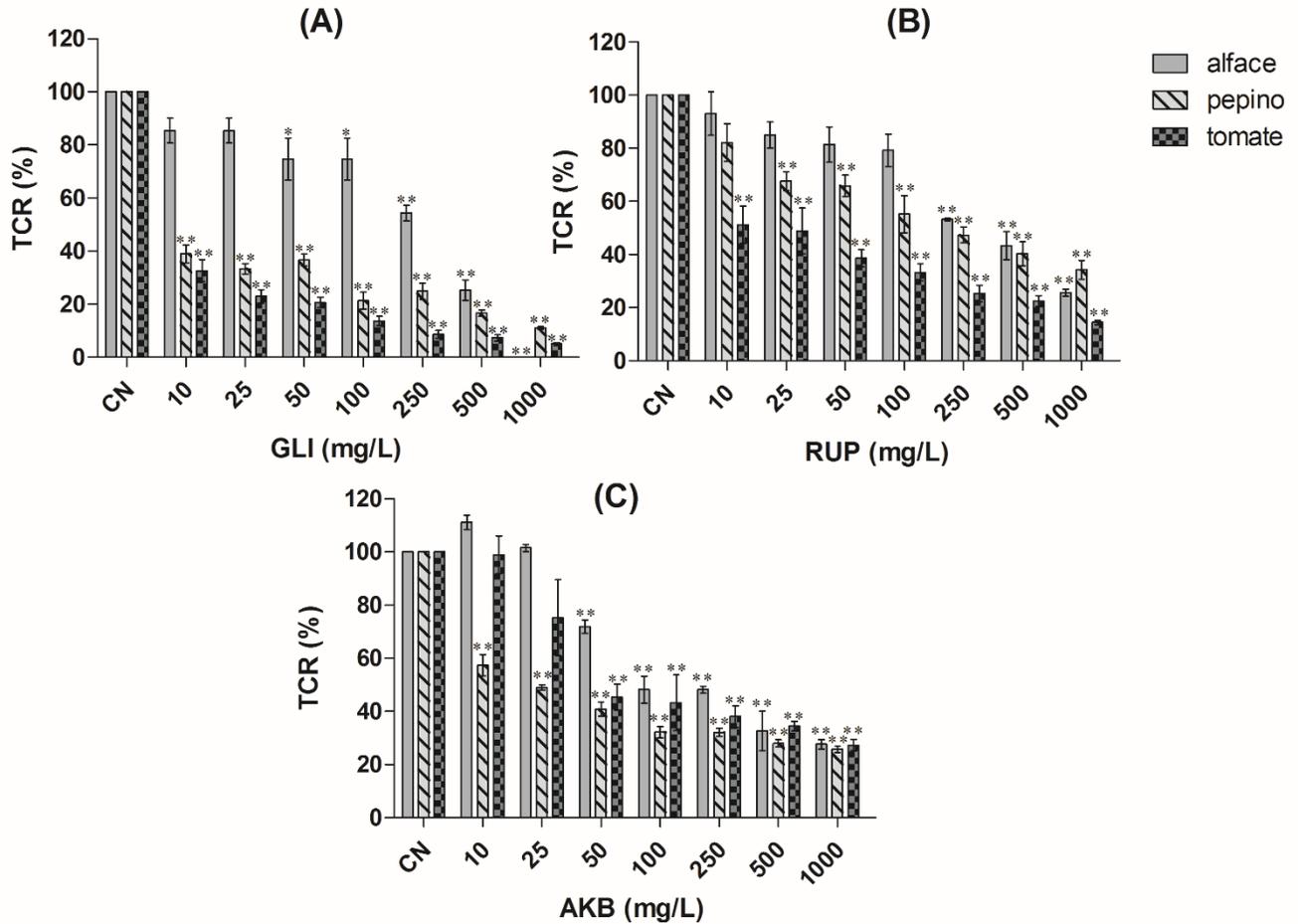
As concentrações médias de efeito (CE50) para a inibição da germinação da semente de alface exposta ao GLI e ao RUP foram 612,30 mg/L (intervalo de confiança: 353,60 mg/L a 1060,00 mg/L) e 1062,00 mg/L (intervalo de confiança:

843,10 mg/L a 1339,00 mg/L) respectivamente e da semente de tomate após a exposição ao AKB foi de 702,10 mg/L (423,10 mg/L a 1165,00 mg/L).

Nas condições testadas, a concentração de mínimo efeito adverso observado (LOAEC) para as sementes de tomate expostas ao AKB foi de 50 mg/L, enquanto que na exposição ao GLI, o LOAEC foi de 500 mg/L para as sementes de alface.

Os efeitos do ingrediente ativo (GLI) e das formulações equivalente (AKB) e de referência (RUP) sobre o desenvolvimento das raízes de alface (*L. sativa*), pepino (*C. sativus*), tomate (*L. esculentum*) estão apresentados como taxa de crescimento relativo (TCR) na FIGURA 8.

FIGURA 8. Taxa de crescimento relativo (TCR) das raízes de sementes de alface (*L. sativa*), pepino (*C. sativus*) e tomate (*L. esculentum*) após exposição a diferentes concentrações de glifosato puro (A), Roundup® (B) e Glifosato AKB (C). As barras de erro indicam o erro padrão de três réplicas. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ estatisticamente diferente em relação aos respectivos controles negativos (teste de Dunnett).



Pode-se observar que tanto as formulações quanto o ingrediente ativo induziram efeitos significativos no crescimento das raízes de alface, pepino e tomate (FIGURA 8). A inibição do desenvolvimento das raízes de todas as sementes testadas apresentou um comportamento concentração-dependente quando expostas ao GLI, RUP e AKB. O potencial tóxico do ingrediente ativo e das formulações sobre a inibição do crescimento da raiz foi determinado pelos valores de CE50 (TABELA 3).

TABELA 3. Concentração média de efeito (CE50) sobre o crescimento das raízes de alface (*L. sativa*), pepino (*C. sativus*), e tomate (*L. esculentum*) após a exposição de 120 horas ao glifosato puro (GLI), Roundup® (RUP) e Glifosato AKB (AKB) com seus respectivos intervalos de confiança (IC).

Substâncias teste	CE50 (mg/L)		
	Alface	Pepino	Tomate
GLI	196,00 (145,50 – 264,00)	12,90 (8,81 – 18,90)	6,92 (5,58 – 8,57)
AKB	194,80 (144,40 – 262,90)	29,01 (20,92– 40,21)	108,80 (67,44 – 175,50)
RUP	168,90 (127,20 – 224,30)	197,60 (130,10 – 300,00)	13,39 (8,26 – 21,71)

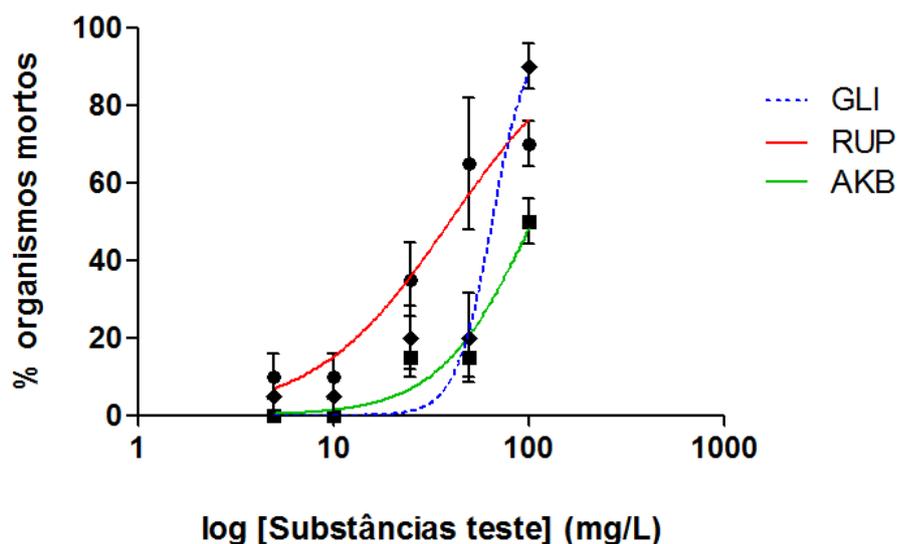
De acordo com TABELA 3, AKB foi mais tóxico para sementes de pepino com CE50 de 29,01 mg/L (20,92– 40,21 mg/L), enquanto que RUP e GLI mostraram-se mais tóxicos para sementes de tomate com valores de CE50 de 13,39 mg/L (8,26 – 21,71 mg/L) e 6,92 mg/L (5,58 – 8,57 mg/L), respectivamente.

Nas condições testadas, as sementes de alface, pepino e tomate expostas ao RUP apresentaram valores de LOAEC de 50, 25 e 10 mg/L, respectivamente (FIGURA 8B). Na exposição ao AKB, as sementes de alface e tomate apresentaram o mesmo valor de LOAEC (50 mg/L), enquanto que para a semente de pepino o valor de LOAEC foi de 10 mg/L. Já para o ingrediente ativo, os valores de LOAEC para sementes de alface foi de 25 mg/L, enquanto as demais apresentaram o mesmo valor (10 mg/L).

4.1.2 Avaliação da toxicidade aguda de GLI, RUP e AKB sobre náuplios de *A. salina*

A porcentagem de mortalidade dos náuplios de *A. salina* após 48 h de exposição a diferentes concentrações do ingrediente ativo GLI e das formulações RUP e AKB está apresentada na FIGURA 9. Os organismos que não se moviam foram considerados mortos.

FIGURA 9. Curva dose-resposta para mortalidade de *Artemia salina* após 48h de exposição a diferentes concentrações de glifosato puro (GLI), Roundup® RUP e Glifosato AKB (AKB). As barras de erro indicam o erro padrão das três réplicas.



As três substâncias teste induziram efeitos letais significantes sobre os náuplios de *A. salina* com um comportamento dose-tempo-dependente (FIGURA 9). Além disso, observa-se que RUP foi mais tóxico que AKB e GLI. (FIGURA 9). Esse fato também é confirmado pelos valores das concentrações letais médias (CL50) que estão apresentadas na TABELA 4, juntamente com a classificação de toxicidade aquática estabelecida pelo *Globally Harmonized System* (GHS) (2007).

TABELA 4. Concentração letal média (CL50) após 48 horas de exposição a glifosato puro (GLI), Roundup® RUP e Glifosato AKB (AKB) sobre *A. salina* e classificação de toxicidade de acordo com o critério do GHS (2007). Os intervalos de confiança (IC, $\alpha = 0,05$) foram gerados pelo software GraphPad Prism®.

Substâncias teste	CL50 (IC) mg/L	Classificação de toxicidade
AKB	104,20 (84,44 – 128,70)	Categoria III
RUP	39,42 (26,79 – 58,00)	Categoria III
GLI	65,24 (53,86 – 79,02)	Categoria III

De acordo com o GHS, tanto o ingrediente ativo como as formulações são classificados na categoria III (CL50 entre 10 e 100 mg/L) e, portanto, substâncias de baixa toxicidade.

4.1.3 Avaliação da toxicidade embrio-larval com zebrafish

4.1.3.1 Efeitos sobre a mortalidade

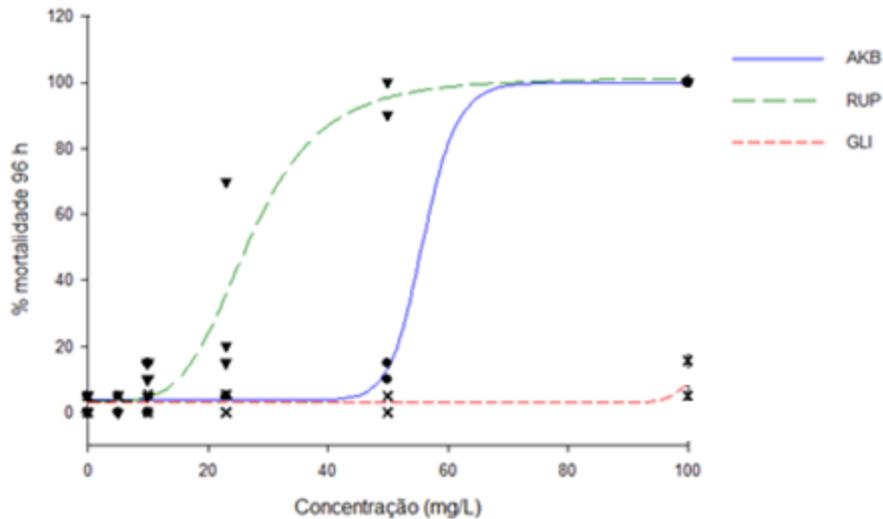
Os efeitos sobre a mortalidade em embriões de zebrafish foram observados em diferentes tempos de exposição (24, 48, 72 e 96 horas) a GLI, RUP e AKB. A coagulação dos ovos, o não desprendimento da cauda, a ausência de formação de somitos e ausência de batimentos cardíacos foram considerados indicadores de letalidade (OECD, 2013). Os valores de CL50 para as três substâncias testes estão demonstrados na TABELA 5.

TABELA 5. Concentrações médias letais (CL50) com os respectivos intervalos (IC) de confiança após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição a glifosato puro (GLI), Roundup® RUP e Glifosato AKB (AKB) em embriões de zebrafish.

Tempo de exposição	GLI	RUP	AKB
	CL50;IC (mg/L)	CL50;IC (mg/L)	CL50 ;IC (mg/L)
24 h	>100 mg/L	76,05	133,60
		(47,67 – 121,30)	(67,98 – 262,70)
48 h	>100 mg/L	48,59	77,69
		(26,48 – 89,18)	(35,12 – 171,90)
72 h	>100 mg/L	29,99	76,74
		(15,91 – 56,50)	(34,80 – 169,20)
96 h	>100 mg/L	28,23	75,33
		(14,33 – 55,61)	(34,65 – 163,70)

É possível inferir, de acordo com a TABELA 5 que RUP apresentou maior toxicidade quando comparado a AKB e GLI, com valores de CL50 em 96 horas de exposição de 28,23 mg/L, 75,33mg/L e maior que 100 mg/L, respectivamente. Além disso, todas as substâncias apresentam um comportamento dose-tempo-dependente (FIGURA 10) em relação à mortalidade de embriões e larvas de zebrafish.

FIGURA 10. Curva dose-resposta para a mortalidade dos embriões de zebrafish após 96 horas de exposição às diferentes concentrações de glifosato puro (GLI), Roundup® RUP e Glifosato AKB (AKB)



A curva dose-resposta exemplifica claramente que o RUP é mais tóxico que AKB e as duas formulações são muito mais tóxicas do que o ingrediente ativo glifosato.

4.1.3.2 Efeitos sobre a eclosão

O sucesso na eclosão de uma larva foi definido como a ruptura da membrana do ovo e a saída da mesma. A eclosão normalmente ocorre entre 48 a 72 horas (OECD, 2013). As taxas de eclosão após exposição ao AKB e RUP estão apresentadas na TABELA 6.

TABELA 6. Taxas de eclosão das larvas (%) após a exposição a diferentes concentrações das formulações Roundup® RUP, Glifosato AKB (AKB) e Glifosato puro (GLI). Os valores estão representados pela taxa de eclosão \pm erro padrão.

Formulação	48 h (média \pm EP)	72 h (média \pm EP)	96 h (média \pm EP)
AKB (mg/L)			
0	26,7 \pm 7,2	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
5	73,3 \pm 6,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
10	53,3 \pm 16,4	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
23	48,3 \pm 16,8	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
50	60,0 \pm 8,8	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
100	-	-	-
RUP (mg/L)			
0	27,1 \pm 7,2	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0
5	67,8 \pm 1,4*	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0
10	62,4 \pm 6,5*	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0
23	66,6 \pm 1,7*	98,2 \pm 1,7	98,2 \pm 1,7
50	70,0 \pm 10,1*	96,3 \pm 3,7	98,1 \pm 1,8
100	-	-	-
GLI (mg/L)			
0	3,4 \pm 2,4	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
5	1,7 \pm 2,4	98,1 \pm 2,6	100,0 \pm 0,0
10	0,0 \pm 0,0	93,1 \pm 6,2	100,0 \pm 0,0
23	8,5 \pm 6,0	98,3 \pm 2,4	100,0 \pm 0,0
50	10,3 \pm 6,9	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
100	3,5 \pm 4,9	92,3 \pm 3,4	100,0 \pm 0,0

* estatisticamente diferente em relação ao controle negativo (teste de Dunnett, $p < 0,05$)

“-” organismos mortos.

Como observado na TABELA 6, tanto RUP quanto AKB induziram eclosão prematura em embriões de zebrafish quando comparadas ao controle negativo a partir da primeira concentração testada (5 mg/L), sendo significativa apenas para o RUP. Para esse parâmetro, os valores das concentrações médias de efeito (CE50) foram de 8,29 mg/L (3,05 – 22,53 mg/L) para RUP e 6,23 mg/L (3,16 – 12,28 mg/L) para AKB. A exposição a ingrediente ativo glifosato não alterou o padrão de eclosão em relação ao controle negativo como representado na mesma tabela.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Apesar da aplicação direta de um herbicida trazer benefícios a agricultura, o uso indiscriminado e contínuo pode acarretar em desequilíbrio nos ecossistemas, com o aparecimento de novas pragas, resistência das plantas indesejáveis, mobilidade desses compostos para outros ecossistemas, além da ocorrência de resíduos em alimentos e água potável. Desse modo, a avaliação do risco ambiental faz-se necessária, pois possibilita o conhecimento dos efeitos tóxicos desses contaminantes uma vez que, as formulações a base de glifosato apresentam em sua composição, não somente o ingrediente ativo, mas também os surfactantes do tipo polioxietileno amina (POEA), que são denominados ingredientes inertes e aumentam a eficiência do produto formulado (BETTIOL et al., 2015; GOMES et al., 2014; GIESY; DOBSON; SOLOMON, 2000).

Neste trabalho, foram avaliados os efeitos tóxicos das formulações de referência (RUP) e equivalente (AKB), além do ingrediente ativo (GLI) sobre diferentes organismos. Considerando que os herbicidas podem ser depositados na superfície do solo durante as práticas agrícolas, é importante elucidar os seus efeitos sobre os processos fisiológicos relacionados ao crescimento das plantas, a fim de compreender o mecanismo e os seus possíveis efeitos sobre plantas não-alvo (GOMES et al., 2014).

Na avaliação da fitotoxicidade, as substâncias testadas induziram alteração na germinação das três espécies de sementes testadas (*L. sativa*, *C. sativus* e *L. esculentum*). No entanto, apenas as sementes de alface e tomate apresentaram efeitos significativos. Tanto RUP quanto GLI foram tóxicos para sementes de alface com valores de CE50 de 1062,00 mg/L e 612,30 mg/L, respectivamente. Já AKB, mostrou-se tóxico para sementes de tomate com valor de CE50 de 702,10 mg/L.

Na última década, cerca de 6,1 bilhões de quilogramas do herbicida glifosato foi aplicado em todo o mundo. Especificamente no Brasil, cerca de 340 milhões de litros de glifosato foram aplicados em 2011 (BENBROOK, 2016; DOMINGUEZ et al., 2016). No entanto, em vista da quantidade aplicada, o parâmetro germinação não pôde ser considerado um parâmetro sensível nas condições testadas.

Por outro lado, o crescimento da raiz parece ser um parâmetro eficaz para avaliar a toxicidade de GLI, RUP e AKB, uma vez que as três substâncias apresentaram efeitos significativos na inibição do desenvolvimento de todas as

espécies testadas. *C. sativus* foi mais sensível para AKB, enquanto que *L. esculentum* mostrou-se mais sensível para RUP e GLI.

Ademais, a toxicidade das substâncias apresentou comportamento dose-dependente corroborando os resultados encontrados por Sprankle e colaboradores (1975), no qual a medida que se aumentou a concentração de glifosato pulverizado, observou-se inibição na emergência das raízes.

O glifosato pode ser fortemente adsorvido no solo, mas apresenta alta solubilidade em água (GOMES et al., 2014; BETTIOL et al., 2015). Resíduos de praguicidas alcançam as águas superficiais pelo escoamento direto e lixiviação dos campos agrícolas, pela lavagem e eliminação descuidada dos recipientes sendo a contaminação dos corpos d'água, uma questão preocupante em relação aos efeitos tóxicos sobre organismos não-alvo (BENACHOUR; SÉRALINI, 2009). Sabe-se que menos de 0,1% dos praguicidas aplicados nas áreas de cultivo atingem seus alvos específicos, o que significa que o restante está livre para se mover entre os compartimentos ambientais (CATTANI et al, 2014; NGUYEN et al, 2016).

Tem sido relatada a presença de glifosato em águas de superfície 60 dias após a aplicação da formulação, indicando que este composto é capaz de persistir no ambiente (SILVA; PERALBA; MATTOS, 2003; BENACHOUR; SÉRALINI, 2009). Estudos recentes reportaram a presença de glifosato em ambientes aquáticos provenientes do processo de escoamento superficial, encontrando valores que variaram de 0,01 a 0,7 mg/L atingindo um valor máximo de 1,7 mg/L em situações de aplicação direta na água (HARAYASHIKI et al., 2013).

Nesse cenário, a exposição a organismos não-alvo, incluindo os aquáticos, se torna inevitável e está relacionada a alta solubilidade dessa substância na água (ROY; CARNEIRO; OCHS, 2016). No presente estudo, RUP, AKB e GLI induziram toxicidade significativa em náuplios de *A. Salina* com valores de CL50-48h de 39,42 mg/L, 104,20 mg/L e 65,24 mg/L, respectivamente e categorizados na categoria III (CL50 entre 10 e 100 mg/L) de acordo com a classificação de toxicidade aquática estabelecida pelo *Globally Harmonized System* (GHS) (2007).

A classificação em que as substâncias testadas foram inseridas, corrobora com estudos de Nunes *et al.* (2006), que afirma que organismos marinhos não-alvo apresentam toxicidade relativamente baixa ao glifosato com os valores CL50 variando entre 10 mg/L e 1000 mg/L. Além disso, náuplios de *A. salina* foram mais sensíveis a exposição a RUP do que as demais substâncias testadas. Em geral, as

formulações são mais tóxicas do que o ingrediente ativo puro, mas nesse trabalho GLI foi mais tóxico do que o AKB.

Tsui e Chu (2003) em um estudo com *Acartia tonsa* e *Ceriodaphnia dubia*, invertebrados marinhos de água doce, encontraram valores de CL50 de 1,77 e 5,39 mg/L, respectivamente, após 48 h de exposição à formulação Roundup®. Nesse mesmo estudo, valores de CL50 para exposição ao ingrediente ativo puro (GLI) foram de 49,3 mg/L para *A. tonsa* e 415,0 mg/L para *C. dubia*. O surfactante, POEA, mostra-se mais tóxico do que as formulações com CL50-48h de 0,38 mg/L e 0,77 para *A. tonsa* e *C. dubia*, respectivamente. Complementarmente, o surfactante pode ser de 3 a 5 vezes mais tóxico que a formulação mais consumida mundialmente, podendo contribuir em mais de 90% na toxicidade da formulação (SERVIZI et al., 1987; TSUI; CHU, 2003). Esse fato também foi confirmado, mostrando que formulações a base de glifosato que não continham POEA em sua composição apresentavam baixa toxicidade para organismos não-alvo (ALBERDI et al., 1996; TSUI; CHU, 2004).

Em ensaios de ecotoxicidade convencionais, os peixes são um complemento indispensável para avaliação da toxicidade de compostos no ambiente aquático, uma vez que este ambiente recebe grandes quantidades de dejetos que em conjunto tornam-se um risco potencial para o ecossistema. Além disso, peixes desempenham um papel crítico em cadeias alimentares em níveis inferiores e superiores e regulam o fluxo de nutrientes e energia (LAMMER et al., 2009).

Em vista disso, estágios embrionários de peixes estão cada vez mais sendo utilizados como um modelo alternativo de investigação toxicológica, por atenderem os princípios dos 3 R's (redução, refinamento e substituição) (RUSSELL; BURCH, 1959)

A avaliação de toxicidade utilizando embriões de zebrafish apresentou o mesmo comportamento dos ensaios com sementes e *A. salina*, mostrando diferenças entre a toxicidade das formulações. Embora AKB (formulação equivalente) seja embriotóxico para zebrafish, a sua toxicidade é menor quando comparada ao RUP (formulação de referência) com valores de CL50-96h de 75,33 mg/L e 28,23 mg/L, respectivamente.

Além disso, o ingrediente ativo (GLI) mostrou-se menos tóxico do que as formulações (CL50-96h > 100 mg/L), corroborando com os resultados de Folmar e colaboradores (1979) em que a mortalidade de *Oncorhynchus mykiss* foi maior

quando exposto ao POEA (CL50-96h de 2,0 mg/L) do que Roundup (CL50-96h de 8,3 mg/L) e ingrediente ativo (CL50-96h de 140 mg/L).

A formulação equivalente Vision® foi avaliada por Morgan e Kiceniuk (1992) também em *O. mykiss* encontrando um valor de CL50 após 96 de exposição de 10,20 mg/L, confirmando a hipótese de que a formulação equivalente apresenta toxicidade menor quando comprada a formulação de referência. Enquanto que, valores de CL50 obtidos em exposições ao ingrediente ativo puro para *Ictalurus punctatus* e *Cyprinus carpio* glifosato foram maiores do que 100 mg/L (FOLMAR et al., 1979; NESKOVIC et al., 1996).

O presente trabalho, também avaliou a capacidade de eclosão das larvas quando expostas a AKB, RUP e GLI. Para ambas formulações, as larvas apresentaram eclosão prematura em relação ao controle negativo na primeira concentração testada (5 mg/L). A exposição ao ingrediente ativo não alterou o perfil de eclosão em relação ao controle negativo. Webster et al. (2014), relataram o mesmo comportamento e a exposição a 10 mg/L Roundup® induziu eclosão em larvas de zebrafish.

Diante desses resultados, pode-se sugerir que a prematuridade da eclosão das larvas pode estar relacionada a maior exposição do embrião ao ingrediente ativo, que foi proporcionada pela ação do ingrediente inerte sobre o córion dos ovos de zebrafish.

A eclosão é consequência da atividade de enzimas e movimentos realizados pelo embrião e, uma eclosão prematura, ocorre devido ao aumento desses eventos. A eclosão normal de uma larva ocorre entre 48 a 72 horas. Alguns eventos importantes ocorrem entre o período de faríngula (24 a 48 horas pós fertilização) e período de eclosão (48 a 72 horas pós fertilização). O período de faríngula é caracterizado pela formação de barbatanas, nadadeiras rudimentares, arcos faríngeais e branquiais, completa formação dos somitos, desenvolvimento da notocorda, sistema nervoso e circulatório, rápido crescimento do embrião e, por fim, pigmentação dos olhos e corpo.

A seguir, no período de eclosão, ocorre o término do desenvolvimento dos sistemas rudimentares, nadadeiras e formação da boca. O embrião que eclode fora desses períodos de desenvolvimento provavelmente estará mais susceptível a uma situação de estresse no ambiente externo (KIMMEL, 1995; OECD, 2013; SAMAE

et al., 2015). Nesse estudo, apenas a formulação de referência (RUP) acelerou a eclosão dos ovos de forma significativa.

A utilização de bioensaios para a avaliação toxicológica de produtos sobre o ambiente ganhou espaço nas últimas décadas. São ferramentas úteis para análise de qualidade dos ecossistemas, haja vista que os testes físico-químicos comumente utilizados, não conseguem distinguir compostos que afetam os sistemas biológicos dos que são inertes no meio ambiente, não sendo suficientes para avaliação do potencial impacto ambiental dos contaminantes (BANKS et al., 2005; COSTA et al., 2008).

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Portanto, com base em nossos resultados podemos concluir que:

- O ingrediente ativo e as formulações de referência e equivalente foram fitotóxicos para sementes de alface (*L. sativa*), pepino (*C. sativus*) e tomate (*L. esculentum*), porém somente o parâmetro de crescimento da raiz foi considerado um parâmetro sensível de avaliação.
- Os três compostos foram classificados como Categoria III (CL50 entre 10 e 100 mg/L) para a toxicidade aquática com *A. salina* de acordo com o GHS, entretanto apresentaram valores de CL50 distintos, estabelecendo a seguinte ordem de toxicidade: RUP>GLI>AKB.
- As formulações de referência (RUP) e equivalente (AKB) foram tóxicas para embriões e larvas de zebrafish (*D. rerio*), causando mortalidade e indução de eclosão prematura. Já o ingrediente ativo (GLI) foi considerado não tóxico nas condições testadas (CL50-96h > 100 mg/L).
- Nossos dados apontam para a necessidade de avaliação das diversas formulações a base de glifosato, uma vez que as mesmas apresentam diferentes potenciais tóxicos para diferentes organismos.

REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, L. M. et al. Glyphosate-based herbicide causes antioxidant defence responses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **Comp Biochem Phys C.**, v. 185-186, p. 94-101, 2016.

ALBERDI, J. L. et al. Comparative acute toxicity of two herbicides, Paraquat and Glyphosate, to *Daphnia magna* and *D. spinulata*. Bull. **Environ. Contam. Toxicol.**, 57, 229-235, 1996.

ALONZO, H. G. A.; CORRÊA, C. L.. Praguicidas. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2014.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxico em Alimentos (PARA), dados da coleta e análise de alimentos de 2010. Brasília: ANVISA, 2011. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 1 out 15.

APARICIO, V. C. et al. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. **Chemosphere**, v. 93, n. 9, p. 1886-1873, 2013.

ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost. **Scientia Agricola**, v.62, n.3, p.286-290, 2005.

BAI, S. H.; OGBOURNE, S. M. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, v. 23, n. 19, p. 18988-9001, 2016.

BAIRD, C. Produtos orgânicos tóxicos. In: **Química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. p.121-273.

BAIRD, D. D. et al. Introduction of a new broadspectrum postemergence herbicide class with utility for herbaceous perennial weed control. **Proceedings North Central Weed Control Conference**, v. 26, p. 64-68, 1971.

BANKS, M. K. et al. Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soils. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 167, p. 211-219, 2005.

BENACHOUR, N., SÉRALINI, G. E. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 22, p. 97-105, 2009.

BENBROOK, C. M. Trends in glyphosate herbicide use in United States and globally. **Environmental Sciences Europe**, v. 28, n. 3, p. 1-15, 2016.

BETTIOL C. et al. Assessment of phenolic herbicide toxicity and mode of action by different assays. **Environ Sci Pollut Res Int.**, 2015. doi: 10.1007/s11356-015-5958-5.

BEYERS, D.W. **Acute toxicity of Rodeo and Valent X-77 to Rio Grande silvery minnow as estimated by surrogate species: Plains minnow, fathead minnow, Hyalella azteca, and Chironomus tentans.** US Bureau of Reclamation, Upper Colorado Regional Office, Final Report. 1993.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Casa Civil**, Subchefia para Assuntos Jurídicos, Brasília, DF, 11 jul. 1989.

BRASIL. 2002. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Casa Civil**, Subchefia para Assuntos Jurídicos, Brasília, DF, 4 jan. 2002.

BRASIL. 2006. Decreto nº 5.981, de 6 de dezembro de 2006. Dá nova redação e inclui dispositivos ao Decreto no 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. **Casa Civil**, Subchefia para Assuntos Jurídicos, Brasília, DF, 6 dez. 2006.

CARLSSON, G. et al. Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Aquatic Toxicology**, v.15, p.126:30-41, 2013.

CATTANI, D. et al. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: Involvement of glutamate excitotoxicity. **Toxicology**, v.320, p.34-45, 2014.

COLE, D. J. Mode of action of glyphosate - a literature analysis. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p. 48-74.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação, **Química Nova**, v. 31, p. 1820-1830, 2008.

CRISINEL, A. et al. Cyst-based ecotoxicity tests using Anostracans: Comparison of two species of *Streptocephalus*. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 9, n. 317, 1994.

DAI, et al. Zebrafish as a model system to study toxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 11-17, 2014.

DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI, V. L. et al. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v.65, p.335–346, 2013.

DEBLONDE, T.; COSSU-LEGUILLE, C.; HARTEMANN, P. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. **International Journal of Hygiene and Environment Health**, v. 214, p. 442-448, 2011.

DICK, R. E.; QUINN, J. P. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v.43, n.3, p.545-550, 1995

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

DOMINGUÉZ, et al. Toxicity of AMPA to the earthworm *Eisenia andrei* Bouché, 1972 in tropical artificial soil. **Sci Rep**, v. 6, 4691-4703, 2016.

EATON, R. C.; FARLEY, R. D. Spawning cycle and egg production of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the laboratory. **Copeia**, v.1, p.195-209, 1974.

European Economic Community (EEC). **Council Directive 98/83/EC of 3 november 1998 on the quality of water intended for human consumption**. 1998. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:330:0032:0054:EN:PDF>. Acesso em: 23 fev 16.

FEITSMA, H; CUPPEN, E. Zebrafish as a cancer model. **Mol. Cancer. Res.**, v. 6, p. 685–694, 2008.

FISHER, S. W. Changes in the toxicity of three pesticides as a function of environmental pH and temperature. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 46, p.197–202, 1990.

FOLMAR, L. C. et al. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 8, p. 269-278, 1979.

FRANZ, J. E. Discovery, developmental and chemistry of glyphosate. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. 653 p.

FRANZ, J. E.; MAO, M. K.; SIKORSKI, J. A. **Glyphosate: a unique global herbicide**. Washington: AOS monograph, 1997. 653 p.

GARCIA, G. R.; NOYES, P. D.; TANGUAY, R. L. Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 161, p. 11-21, 2016.

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

GLOBALLY HARMONIZED SYSTEM (GHS). 2007. **Hazardous to the aquatic environment**. Disponível em:

<http://www.ilo.org/legacy/english/protection/safework/ghs/ghsfinal/ghsc14.pdf>.

Acesso em: 20 dez 2015.

GOMES, M. P. et al. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 4691–4703, 2014.

GOMES, M. P. et al. Effects of glyphosate acid and the glyphosate-commercial formulation (Roundup) on *Dimorphandra wilsonii* seed germination: Interference of seed respiratory metabolism. **Environ. Pollut.**, v. 220, p. 452-459, 2017.

GOOLISH, E. M.; OKUTAKE, K.; JOHNSON, P. The behavioral response of zebrafish to hypergravity conditions. **J. Gravit. Physiol.**, v. 7, p. 99–100, 2000.

GRAHAM, R. D.; WEBB, M. J. Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. In: MORTWEDT, J. J.; COX, F. R.; SHUMAN, L. M.; WELCH, R. M. (Ed.). **Micronutrients in agriculture**. Madison: Soil Science Society of America, Inc., p.329-370,1991.

GRUYS, K. J.; SIKORSKI, J. A. Inhibitors of tryptophan, phenylalanine and tyrosine biosynthesis as herbicides. In: SINGH, B. K. **Plant amino acids: biochemistry and biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 357-384.

GUILHERME, S. et al. Differential genotoxicity of Roundup® formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): Considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 5, p. 1381-1390, 2012.

HARAYASHIKI, C. A. et al. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. **Aquatic Toxicology**, v.142-143, p.176-184, 2013.

HERNANDO, F. M. et al. Effects of glyphosate on the greening process and photosynthetic metabolism in *Chlorella pyrenoidosa*. **J. Plant Physiol.**, v. 134, p. 26-31, 1989.

HOWE, C. M. et al. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four north American frog species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 1928-1938, 2004.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, p. 498–503, 2013.

IBAMA. **Boletim de comercialização de agrotóxicos e afins. Histórico de vendas – 2000 a 2012.** 42 p. 2013. Disponível em: http://www.icict.fiocruz.br/sites/www.icict.fiocruz.br/files/IBAMA_boletim%20de%20comercializacao_2000_2012.pdf. Acesso em: 8 jul 15.

IBAMA. **Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA) de Agrotóxicos e Afins.** 8 p. 2015. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/qualidade-ambiental/avaliacao-do-potencial-de-periculosidade-ambiental-ppa>. Acesso em: 10 jan 16.

JAHAN, K. et al. Modeling biodegradation of nonylphenol. **Water Air Soil Pollut: Focus**, v. 8, p. 395-404, 2008.

KAHRU, A.; PÕLLUMAA, L. Environmental hazard of the waste streams of the Estonian oil-shale industry: an ecotoxicological review. **Oil Shale**, v.23, n.1, p. 53-93, 2006.

KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of zebrafish. **Dev Dyn.**, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

LA FARRÉ, M. *et al.* Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 11, 2008.

LAALE, H. W. The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research: A literature review. **J. Fish. Biol.**, v.10, p.121-173, 1977.

LAMMER, E. *et al.* Is the fish Embryo Toxicity (FET) with the zebrafish (*danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 149, p. 196-209, 2009.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. **Aquaculture**, v. 269, n. 1-4, p. 1-20, 2007.

LIONG, P. C. *et al.*, Toxicity of some pesticides towards freshwater fishies. **Malays. Agric. J.**, v. 54, p. 147-156, 1988.

MATAMOROS, V.; NGUYEN, L.X.; ARIAS, C.A.; SALVADÓ, V.; BRIX H. Evaluation of aquatic plants for removing polar microcontaminants: a microcosm experiment. **Chemosphere**, v.88, n.10, p.1257-64, 2002.

MATTOS, M. L. T. *et al.* Monitoramento ambiental do glyphosate e do seu metabólito (ácido aminometilfosfônico) na água de lavoura de arroz irrigado. **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.12, n. 1, p.145-154, 2002.

MAULE, A.; WRIGHT, S. J. L. Herbicide effects on the populations growth of some green algae and cyanobacteria. **J. App. Bacteriol.**, v. 57, p. 369-379, 1984.

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. 1982. The germination of seeds. 3 ed. Pergamon Press, Oxford. England.

MERCURIO, P.; FLORES, F.; MUELLER, J. F. *et al.* Glyphosate persistence in seawater. **Mar Pollut Bull**, v. 85, n. 2, p. 385-90, 2014.

MEYER, B. N. *et al.* Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, v.45, p.31-34, 1982.

MORAES, P. V. D.; ROSSI, P. Comportamento ambiental do glifosato. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 9, n. 3, p. 22-35, 2010.

MOORE, S. B. *et al.* Aquatic toxicities of textile surfactants. **Text. Chem. Color**, v. 19, p. 29-32, 1987.

MORGAN, J. D. *et al.* Acute avoidance reactions and behavioral responses of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to Garlon 4, Garlon 3A and Vision herbicides. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 10, p. 73 – 79, 1991.

MORGAN, M. J.; KICENIUK, J. W. Response of rainbow trout to a two month exposure to Vision®, a glyphosate herbicide. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 48, p. 772-780, 1992.

MUNZUROGLU, O.; GECKIL, H. Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 43, p.203-213, 2002.

NAGEL, R. 11 p. 2002. **DarT: the embryo test with the zebrafish *Danio rerio* – a genetal model in ecotoxicology and toxicology**. ALTEX 19.

NAVARRO-ORTEGA, A. et al. Managing the Effects of multiple stressors on aquatic ecosystems under water scarcity. The GLOBAQUA project. **Science of The Total Environment**, v. 503-504, p. 3-9, 2015.

NATEC. **Glyphosate: growth inhibition test with algae according to OECD-guideline 201**. Monsanto unpublished study XX-90-523. Study NA89 9654. NATEC Institut fur Naturwissenschaftlich Technische Dienste GmbH, Hamburg, Germany. 1990.

NEŠKOVIC, N. K. et al. Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp (*Cyprinus carpio*). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 56, 295–302, 1996.

NETO, M. L. F.; SARCINELLI, P. N. Agrotóxicos em água para consumo humano: uma abordagem de avaliação de risco e contribuição ao processo de atualização da legislação brasileira. **Eng Sanit Ambient**, v. 14, n. 1, p. 69-78, 2009.

NGUYEN, M. H. et al. Effects of the physical state of nanocarriers on their penetration in the root and upward transportation to the stem of soybean plants using confocal laser scanning microscopy. **Crop Protect**, v. 87, p. 25-30, 2016;

NOMURA, H. S.; HILTON, H. W. The adsorption and degradation of glyphosate in five Hawaii sugarcane soils. **Weed Research**, v. 17, p. 113-121, 1977.

NUNES, B. S.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environ Pollut.**, n. 144, p. 453-462, 2006.

OKAMURA, H. et al. Fate and ecotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment. **Water Research**, v. 34, p. 3523-3530, 2000.

Organization for Economic Co-Operation and Development [OECD]. Guidelines for Testing of Chemicals, ***Daphnia sp.* Acute Immobilisation Test** (Guideline 202), 2004.

Organization for Economic Co-Operation and Development [OECD]. Guidelines for Testing of Chemicals, **Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (Guideline 236)**, 2013.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **New and emerging water pollutants arising from agriculture**. 2012.

PALAEZ, V.; TERRA, F. H. B.; DA SILVA, L. R. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. **Revista de Economia**, v. 36, n. 1, p. 27-48, 2010.

PÉREZ, G. L.; VERA, M. S.; MIRANDA, L. A. 27 p. 2012. **Effects of herbicide glyphosate and glyphosate-based formulations on aquatic ecosystems**. Disponível em: <http://cdn.intechopen.com/pdfs/12592.pdf>. Acesso em: 1 dez 15.

PRATA, F. **Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazina**. 2002. 149 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

QUEIROZ, G. M. P., et al. Glyphosate transport in runoff and leaching waters in agricultural soil. **Quím. Nova**, v.34, p.190-195, 2011.

SILVA, M. D., PERALBA, M. C. R., MATTOS, M. L. T. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do Arroio Passo do Pilão. **Pesticidas**, v.13, p.19–28, 2003.

RAMOS, M. V. et al. Isolation and partial characterisation of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds. **Toxicon.**, v.36, n.3, p.477–484, 1998.

RELYEA, R. A. The effects of pesticides, pH, and predatory stress on amphibians under mesocosm conditions. **Ecotoxicology**, v. 15, p. 503-51, 2006.

RENZONI, A. et al. **Contaminants in the environment: A multidisciplinary assessment of risks to man and other organisms**. CRC Press, 1994. 304 p.

RICHARDSON, S.D. Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues. **Analytical Chemistry**, v.80, p.4373–4402, 2008.

RIECHERS, D. E. et al. Surfactant effects on glyphosate efficacy. **Weed Technol.**, v. 9, p. 281–285, 1995.

RIJSBERMAN, F. R. Water scarcity: fact or fiction? *Agricultural Water Management*, v. 80, n. 1-3, p.5-22, 2006.

ROBARTS, R. D.; WETZEL, R. G. The looming global water crisis and the need for international education and cooperation. ***Societas Internationalis Limnologiae News***, v. 29, p. 1–3, 2000.

ROSENBERG, D. M.; MCCULLY, P.; PRINGLE, C. M. Global-scale environmental effects of hydrological alterations: introduction. ***Bioscience***, v. 40, p. 746-751, 2000.

ROY, N. M.; CARNEIRO, B.; OCHS, J. Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish. ***Environ Toxicol Pharmacol***, n. 42, p. 45-54, 2016.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The principles of humane experimental techniques**. London, UK: Methuen; 1959.

SAMAEE, S-M. et al. Efficacy of the hatching event assessing the embryo toxicity of the nano-sized TiO₂ particles in zebrafish: a comparison between two different classes of hatching-derived variables. ***Ecotoxicology and Environmental Safety***, v. 116, p. 121-128, 2015.

SCHEFFER, M. et al. Alternative equilibria in shallow lakes. ***Trends in Ecology and Evolution***, v. 8, p. 275–279, 1993.

SCHOLZ, S. et al. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment--applications beyond acute toxicity testing. ***Environmental Science and Pollution Research International***, v. 15, n.5, p.394-404, 2008

SERVIZI, J. A.; GORDON, R. W.; MARTENS, D. W. Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, Daphnia, and trout. ***Bull. Environ. Contam. Toxicol.***, v.39, p.15-22, 1987.

SHANER, D. L. Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. ***Weed Science***, Lawrence, v. 57, n. 1, p. 118-123, 2009.

SINDAG. **Situação do mercado de agrotóxicos no mundo e no Brasil**. 16 p. 2012. Disponível em: <https://biowit.files.wordpress.com/2010/11/cartilha-dados-sobre-agrotoxicos-mundo-brasil-maio-12.pdf>. Acesso em: 17 fev 16.

SMITH, E. A.; OEHME, F. W. The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. ***Veterinary Human Toxicology***, v. 34, n. 6, p. 531-543, 1992.

SPRANKLE, P.; MEGGIT, W.; PENNER, D. Adsorption, mobility and microbial degradation of glyphosate in soil. **Weed Science**, Chichester, v. 23, p. 229-234, 1975.

STACHOWSKI-HABERKORN S. et al. Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an in situ microcosm experiment. **Aquat. Toxicol.** v.89, p.232–241, 2008.

SUCEN - **Superintendência de Controle de Endemias, Segurança em controle químico de vetores, Capítulo I: Praguicidas**, 96 p. 2001. Disponível em: <http://www.bvsde.paho.org/bvsapud/p/fulltext/plagui/plagui.pdf>. Acesso em: 28 jul 15.

TEIXIDÓ, E. et al. Assessment of developmental delay in the zebrafish embryo teratogenicity assay. **Toxicology in Vitro**, v.27, n.1, p.469-78, 2013.

TERRA, F. A indústria de agrotóxicos no Brasil. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Econômico. 2008.

TONI, L. R. M.; SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M. Adsorção de glyphosate sobre solos e minerais. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.4, p.829-833, 2006.

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.

TSUI, M. T. K.; CHU, L. M. Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: Aqueous and sediment porewater exposures. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 46, p. 316–323, 2004.

UNEP. **Global environmental outlook 4**. Environment for development, United Nations Environment Programme, 2007.

United States Environmental Protection Agency (EPA). **Basic Information about Glyphosate in Drinking Water**. 2015. Disponível em: <http://water.epa.gov/drink/contaminants/basicinformation/glyphosate.cfm>. Acesso em: 23 set 15.

US-EPA. United States Environmental Protection Agency. Ecological effects test guidelines. OPPTS 850.4200. **Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test**. EPA 712-C-96-154, 1996.

US-EPA, 2014. **United States Environmental Protection Agency**. Contaminants of Emerging Concern. Disponível em: <http://water.epa.gov/scitech/cec/>. Acesso em: 4 set 15.

USDA FS. **United States Department of Agriculture - United States Forest Service.** DIAMOND, G.; DURKIN, P. Effects of Surfactants on the Toxicity of Glyphosate, with Specific Reference to Rodeo. Final Report, 1997

VARGAS, M. **O gerenciamento integrado dos recursos hídricos como problema sócio ambiental.** Ambiente & Sociedade - Ano II - No 5 - 2o Semestre de 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/asoc/n5/n5a09.pdf>. Acesso em: 21 out 15.

WAGNER, N. et al. Questions concerning the potential impact of glyphosate-based herbicides on amphibians. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 32, p. 1688–1700, 2013.

WANG, W. Literature review on higher plants for Toxicity test. **Water, Air, Soil Pollut.**, v. 59. p. 381-400, 1991.

WANG, W.; KETURI, P. H., Comparative seed germination tests using ten plant species for toxicity assessment of metals engraving effluent sample. **Water, Air, Soil Pollut.**, v.52, p.369–376, 1990.

WANG, X.D. et al. Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*. **Chemosphere**, v.44, p.1711-1721, 2001.

WANG, W.; WILLIAMS, J. M., The use of phytotoxicity tests (common duckweed, cabbage, and millet) for determining effluent toxicity. **Environ. Monit. Assess.**, v.14, p.45–58, 1990.

WEBSTER, T. M. U. et al. Effects of Glyphosate and its Formulation, Roundup, on Reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 2, p. 1271-1279, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The international decade for action. Water for life 2005 – 2015. 2007. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/wwd7_water_scarcity_final_rev_1.pdf?ua=1>. Acesso em: 10 out 15.

YAMADA, T.; CASTRO, P. R. Efeitos do glifosato nas plantas daninhas: implicações fisiológicas e agrônômicas. **International Plant Nutrition**, v. 119, p. 5-15, 2007.

ANEXO

ANEXO – Comitê de Ética aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 08 de Dezembro de 2014.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 102/14.

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Iniciação Científica (IC) e Dissertação de mestrado.

II - Identificação:

- Título do projeto:** Avaliação ecotoxicológica e toxicogenética de contaminantes emergentes presentes em sistemas hídricos.
- Pesquisador Responsável/ Unidade:** Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira.
- Pesquisadores Participantes:** Aline Rangel Silva Araújo (IC) e Lara Barroso Brito (Dissertação).
- Unidade onde será realizado:** Faculdade de Farmácia/UFG.
- Data de apresentação a CEUA:** 06/11/2014.

III - Objetivos e justificativa do projeto: Esse trabalho propõe avaliar os impactos ambientais e para saúde humana, provocados pela presença de contaminantes emergentes (fármacos, praguicidas e corantes têxteis) em sistemas hídricos, empregando ensaios ecotoxicológicos e toxicogenéticos com células HepG2 (células derivadas de um hepatoblastoma) e embriões/larvas de zebrafish (*Danio rerio*).

IV - Sumário do projeto:

- Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:** A avaliação da toxicidade de contaminantes emergentes pode ser realizada com culturas celulares e bactérias como método alternativo à experimentação animal. Células HepG2, provenientes de hepatoblastoma humano serão utilizadas nesse projeto para avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade desses contaminantes, entretanto os testes *in vitro* são limitados pelo tempo de exposição (máximo de 72 horas). Esse projeto também propõe o ensaio de mutagenicidade com *Salmonella/microssoma*, que se limita a avaliação de apenas um endpoint de toxicidade, que é a mutagenicidade em bactéria *Salmonella typhimurium*. Assim, para ampliar os endpoints avaliados, ou seja, analisar os efeitos letais (mortalidade), subletais (malformações) e genotóxicos (danos ao DNA), assim como aumentar o tempo de exposição aos contaminantes simulando uma exposição subcrônica, esse projeto pretende utilizar embriões e larvas de zebrafish. O ensaio de toxicidade com embriões de zebrafish é uma metodologia que permite a redução ou substituição do uso de animais adultos na avaliação da ecotoxicidade.
- Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):** Serão utilizados 60 animais adultos de zebrafish (*Danio rerio*), com idade entre 3 e 6 meses, que serão mantidos em 4 tanques de 15 litros com cerca de 15 peixes cada, os quais serão monitorados e mantidos em quarentena. Os peixes serão cedidos pelo Instituto de Ciências Biológicas da UnB.
- Espécie e número total de animais utilizados:** 60 Peixes *Danio rerio* (40 machos e 20 fêmeas)

Comitê de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP: 74001-970, Goiânia - Goiás, Fone: (55-62) 3321-1876.
Email: com.uea@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



- Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:** Os peixes adultos serão alocados em 4 aquários de 15L em uma sala de manutenção e reprodução, protegida de luminosidade, correntes de ar e ruídos, vibração externa, com fotoperíodo e temperatura controlada. Os parâmetros da água como temperatura, pH, condutividade, dureza, oxigênio dissolvido e dosagem de amônia e nitrito serão monitorados periodicamente. Os peixes serão alimentados 2 vezes ao dia com ração comercial para a espécie *Danio rerio*. Na semana anterior à reprodução, os peixes receberão alimento vivo (*Artemia salina*) a fim de aumentar a viabilidade dos ovos e como forma de recompensa ao acasalamento. Para aquisição dos ovos, no dia anterior à desova, peixes na proporção de 2 machos para 1 fêmea serão colocados para acasalar na presença de plantas artificiais e bolas de vidro. Esses peixes serão distribuídos em 3 tanques de 10 litros, com 6 peixes machos e 3 fêmeas, por tanque, totalizando 9 peixes em cada aquário, com o intuito de obter pelo menos 200 ovos por reprodução. Cerca de 30 minutos após a desova os ovos serão coletados e analisados para o descarte dos ovos não fertilizados e seleção daqueles que alcançaram o estágio de blástula. Os ensaios para avaliação dos endpoints letais, subletais e genotóxicos serão realizados em triplicata para cada substância-teste (um antibiótico, um herbicida a base de glifosato e um azo corante), sendo necessários grupos de peixes distintos para cada reprodução e fêmeas com pelo menos uma semana de intervalo entre as reproduções. De acordo com a OECD, por réplica, serão expostos 168 ovos de zebrafish distribuídos em placas de 24 poços, sendo testadas cinco concentrações de cada contaminante emergente, um controle negativo, um controle interno das placas e um controle positivo, sendo necessário ao todo cerca de 2000 ovos gerados em cerca de 10 acasalamentos distintos. As placas com os ovos serão colocadas em incubadora BOD e o desenvolvimento embrionário-larval será analisado com 4, 24, 48, 72 e 96 horas de pós-fertilização, podendo se estender até 30 dias. Após finalizar a avaliação dos endpoints de subletalidade, embriões e larvas de zebrafish serão sacrificados por crioanestesia, ou seja, a anestesia por resfriamento intenso, aceita como um dos métodos para a eutanásia de zebrafish, de acordo com Guideline for Use of Zebrafish in the NIH (2009). Os ensaios toxicogenéticos *in vitro* serão realizados com células provenientes de um hepatoblastoma primário (HepG2).
- Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** Não se aplica a utilização de agente infeccioso. Os riscos do referido trabalho se referem a falhas na manipulação dos equipamentos durante o período experimental. No entanto, os pesquisadores que atuarão na criação, manutenção, reprodução e análise dos embriões serão devidamente treinados para exercerem suas atividades.
- Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais:** A metodologia está bem clara e devidamente detalhada, sendo tomadas todas as medidas mitigadoras para minimizar o sofrimento dos animais.
- Método de eutanásia:** Não se aplica.
- Destino do animal:** Não é descrito o destino dos animais adultos utilizados como reprodutores.

IV – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

- Quanto a documentos:** Foram apresentados todos os documentos solicitados pela CEUA.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFV, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -
CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3321-1876.

Email: ceua.ufv@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



- Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:** Os procedimentos de criação, manutenção e cuidados com os animais mimetizam o ambiente natural da espécie e garantem seu bem-estar. Os riscos desta pesquisa estão relacionados a falhas na manipulação de equipamentos, sendo minimizados com treinamento apropriado de toda a equipe.

V - Parecer da CEUA:

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas **APROVOU** o pedido de emenda de prorrogação do prazo do projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UFV, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) de acordo com as recomendações da Resolução n. 01, da Lei 11.794/08.

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPPG-UFV o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em 30/03/2018.

VI - Data da reunião: 08/12/2014

Dra. Marina Pacheco Miguel
Vice-coordenadora da CEUA/PRPI/UFV