



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LAÍS DE BRITO RODRIGUES

Avaliação toxicológica de uma formulação a base de glifosato e seus principais constituintes sobre o estágio embrio-larval de zebrafish: exposição única e repetida

GOIÂNIA
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES 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 9.610/98](#), 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.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Laís de Brito Rodrigues

3. Título do trabalho

Avaliação toxicológica de uma formulação a base de glifosato e seus principais constituintes sobre o estágio embrio-larval de zebrafish: exposição única e repetida

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
 - b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
- O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.

Documento assinado eletronicamente por **LAÍS DE BRITO RODRIGUES, Discente**, em 06/07/2022, às



14:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gisele Augusto Rodrigues De Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 11/07/2022, às 15:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3028015** e o código CRC **548F74E9**.

LAÍS DE BRITO RODRIGUES

Avaliação toxicológica de uma formulação a base de glifosato e seus principais constituintes sobre o estágio embrio-larval de zebrafish: exposição única e repetida

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

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

GOIÂNIA
2022

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

Rodrigues, Laís de Brito

Avaliação toxicológica de uma formulação a base de glifosato e seus principais constituintes sobre o estágio embrio-larval de zebrafish: exposição única e repetida [manuscrito] / Laís de Brito Rodrigues. - 2022.

XCVIII, 98 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia, 2022.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

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

1. Surfactante . 2. AMPA. 3. FET. 4. Ensaio cometa . 5. Danio rerio. I. Oliveira, Gisele Augusto Rodrigues de, orient. II. Título.

CDU 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE FARMÁCIA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº **61** da sessão de Defesa de Tese de **Laís de Brito Rodrigues** que confere o título de Doutora em **Ciências Farmacêuticas**, na área de concentração em **Fármacos e Medicamentos**.

Aos **doze dias do mês de julho de dois mil e vinte e um**, a partir das **14:00 horas**, através de **videoconferência**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “**Avaliação toxicológica de uma formulação a base de glifosato e seus principais constituintes sobre o estágio embrio-larval de zebrafish: exposição única e repetida**”. Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Doutora **Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira (FF/UFG) - cuja participação ocorreu através de videoconferência**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor **Eric de Souza Gil (FF/UFG) - cuja participação ocorreu através de videoconferência**, membro titular interno; Professora Doutora **Marize Campos Valadares (FF/UFG) - cuja participação ocorreu através de videoconferência**, membro titular interno; Professora Doutora **Simone Maria Teixeira de Sabóia Morais (ICB/UFG) - cuja participação ocorreu através de videoconferência**, membro titular externo; Professor Doutor **Thiago Lopes Rocha (IPTS/UFG) - cuja participação ocorreu através de videoconferência**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do **trabalho**. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora **Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira (FF/UFG) - cuja participação ocorreu através de videoconferência**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **doze dias do mês de julho de dois mil e vinte e um**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Marize Campos Valadares, Professor do Magistério Superior**, em 12/07/2021, às 17:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eric De Souza Gil, Professor do Magistério Superior**, em 12/07/2021, às 17:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gisele Augusto Rodrigues De Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 12/07/2021, às 18:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Thiago Lopes Rocha, Professor do Magistério Superior**, em 13/07/2021, às 10:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Simone Maria Teixeira De Sabóia Morais, Coordenadora de Pós-Graduação**, em 13/07/2021, às 15:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2190219** e o código CRC **DBA55D4C**.

Referência: Processo nº 23070.035235/2021-27

SEI nº 2190219



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Eric Souza Gil

Vice-coordenadora do Programa de Pós-Graduação

Profa. Dra. Stephania Fleury Taveira

GOIÂNIA
2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

BANCA EXAMINADORA

Discente: Laís de Brito Rodrigues

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira

Profa. Dra. Elisa Raquel Anastácio Ferraz Avelino
Professora Titular da Universidade Federal Fluminense, UFF.

Prof. Dr. Eric de Souza Gil
Professor Titular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira
Professora Adjunta da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás,
FF/UFG.

Profa. Dra. Profa. Dra. Marize Campos Valadares
Professora Titular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Profa. Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais
Professora Titular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal
Fluminense, ICB/UFG.

Profa. Dra. Stephania Fleury Taveira
Professora Titular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Prof. Dr. Thiago Lopes Rocha
Professor Adjunto do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade
Federal de Goiás, IPTSP/UFG.

Data: 12/07/2021

Dedico o presente trabalho à comunidade científica brasileira e todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização dessa pesquisa.

***Desejo, grandemente, dias melhores para nosso país.
Esses dias só serão possíveis com o fortalecimento da educação e da ciência.***

Minha sincera gratidão à Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Toxicologia Ambiental – EnvTox/FF/UFG.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Instituto Nacional de Tecnologias Alternativas para Detecção, Avaliação Toxicológica e Remoção de Micropoluentes e Radioativos (CNPq, INCT/DATREM – Número do Processo: 465571/2014-0) pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia in Vitro (ToxIn), especialmente a Profa. Dra. Marize Campos Valadares, pelo apoio técnico e científico para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Pesquisa em Toxicologia Ambiental (EnvTox), especialmente a Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues, pelo apoio técnico e científico para o desenvolvimento deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

PARTE I: Introdução geral.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A evolução do glifosato no mercado nacional e mundial.....	1
1.2 Propriedades físico-químicas e mecanismo de ação do glifosato.....	2
1.3 Comportamento ambiental do glifosato.....	4
1.3.1 Toxicidade do glifosato para organismos aquáticos.....	6
1.4 Zebrafish (Danio rerio) como organismo modelo para avaliação de toxicidade.....	8
1.5 Avaliação de toxicidade de praguicidas/agrotóxicos utilizando exposições repetidas.....	10
2. JUSTIFICATIVA.....	12
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo Geral.....	15
3.2 Objetivos Específicos.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Substâncias-teste.....	16
4.2 Manutenção dos peixes adultos.....	16
4.2.1 Aquisição de ovos.....	16
4.3 Teste de toxicidade aguda com estágios embrio-larvais de zebrafish (FET) após exposição única.....	17
4.4 Teste de toxicidade aguda com estágios embrio-larvais de zebrafish após exposições repetidas.....	17
4.5 Avaliação da capacidade de resiliência de larvas de zebrafish após exposições repetidas.....	20
4.6 Ensaio cometa com larvas de zebrafish.....	20
4.7 Análise estatística.....	22
PARTE II: Artigo publicado na revista Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.....	23
5. Impact of the glyphosate-based commercial herbicide, its components and its metabolite AMPA on non-target aquatic organisms (ISSN: 1383-5718; fator de impacto: 2.256; doi: https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.05.002)	23
PARTE III: Resultados e Discussão.....	45

6.	RESULTADOS.....	45
6.1	Avaliação da toxicidade aguda com os estágios embrio-larvais de zebrafish após exposições repetidas.....	45
6.2	Avaliação da capacidade de resiliência de larvas de zebrafish após exposição em pulsos.....	50
7.	DISCUSSÃO.....	55
PARTE IV: Conclusões e Considerações finais.....		62
8.	CONCLUSÕES.....	62
9.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
REFERÊNCIAS.....		65
ANEXOS E APÊNDICES.....		75

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AMPA	Ácido aminometilfosfônico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEO	Concentração de efeito observado
CL ₅₀	Concentração letal média
dpf	Dias pós-fertilização
DL ₅₀	Dose letal média
e.a.	Equivalente ácido
EFSA	Autoridade Europeia para Segurança Alimentar
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA)
EPSPS	5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FET	<i>Fish Embryo Toxicity Test</i>
GLI	Ingrediente ativo glifosato
hpf	Horas pós-fertilização
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial de Saúde
POEA	Polioxietilenoamina

Figura 1. Fórmula estrutural do glifosato (N-fosfometil glicina).....	2
Figura 2. Distribuição e transporte de glifosato e AMPA nos ecossistemas aquáticos.....	5
Figura 3. Representação esquemática da exposição de embriões e larvas de zebrafish à ATN, GLI e POEA em pulsos de 1, 2 e 5 horas.....	19
Figura 4. Equação para o cálculo do Índice de Dano (ID) ao DNA.....	21
Figura 5. Taxa de sobrevivência dos estágios embrio-larvais de zebrafish após exposição ao ingrediente ativo glifosato (GLI) em pulsos de 1 hora (A), 2 horas (B) e 5 horas (C). Os pulsos foram realizados a cada 24 horas durante 4 dias (96 horas). As barras representam a média ± o erro padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ é estatisticamente diferente em relação aos respectivos controles negativos (CN). CN: água de manutenção.....	46
Figura 6. Taxa de sobrevivência dos estágios embrio-larvais de zebrafish após exposição à formulação Glifosato Atanor 48 (ATN) em pulsos de 1 hora (A), 2 horas (B) e 5 horas (C). Os pulsos foram realizados a cada 24 horas durante 4 dias (96 horas). As barras representam a média ± o erro padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ é estatisticamente diferente em relação aos respectivos controles negativos (CN). CN: água de manutenção.....	47
Figura 7. Taxa de sobrevivência dos estágios embrio-larvais de zebrafish após exposição ao surfactante polioxietilenoamina (POEA) em pulsos de 1 hora (A), 2 horas (B) e 5 horas (B). Os pulsos foram realizados a cada 24 horas durante 4 dias (96 horas). As barras representam a média ± o erro padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,0001$ são estatisticamente diferentes em relação aos respectivos controles negativos (CN). CN: água de manutenção.....	48
Figura 8. Efeitos subletais em estágios iniciais de desenvolvimento de zebrafish após exposições repetidas em pulsos de 1, 2 e 5 horas de ATN e POEA. EP: edema de pericárdio; ESV: edema de saco vitelínico; ES: escoliose; MCb: malformação na cabeça; MCd: malformação na cauda; MO: malformação no olho; MSV: má absorção no saco vitelínico. A: embrião 24 hpf; B: embrião 48 hpf; C: larva 72 hpf; D: larva 96 hpf; E: embrião 48 hpf após pulsos de 1 h de ATN na concentração de 50 mg/L; F: larva 72 hpf após pulsos de 2 h de ATN na concentração de 23 mg/L; G: larva 72 hpf após pulsos 5 h de ATN na concentração de 100 mg/L; F: larva	

96 hpf após pulsos de 5 h de ATN na concentração de 50 mg/L; I: embrião 48 hpf após pulsos de 1 h de POEA na concentração de 4 mg/L; J: larva 72 hpf após pulsos de 2 h de POEA na concentração de 8 mg/L; K: larva após 72 hpf após pulsos de 5 h na concentração de 8 mg/L; L: larva 96 hpf após pulsos de 5 h na concentração de 16 mg/L..... 50

Figura 9. Comparação das taxas de sobrevivência durante o período de recuperação (D3) de larvas de zebrafish expostas ao surfactante polioxietilenoamina (POEA) entre os pulsos de exposição. (A) 1 h e 5 h na concentração de 4 mg/L; (B) 2 h e 5 h na concentração de 4 mg/L; (C) 1 h e 5 h na concentração de 8 mg/L; (D) 2 h e 5 h na concentração de 8 mg/L; (E) 1 h e 5 h na concentração de 16 mg/L; (F) 2 h e 5 h na concentração de 16 mg/L.* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ são estatisticamente diferentes (teste T de Student)..... 54

Tabela 1. Concentração letal média (CL50-96 h) com os respectivos intervalos de confiança (IC) após exposição dos estágios embrio-larvais de zebrafish ao ingrediente ativo glifosato (GLI), à formulação Glifosato Atanor 48® (ATN) (e.a) e ao surfactante polioxietilenoamina (POEA) em pulsos de 1, 2 e 5 horas durante 96 horas.....	49
Tabela 2. Resumo dos efeitos letais e subletais observados em estágios embrio-larvais de zebrafish após exposições repetidas a diferentes concentrações de GLI, ATN e POEA.....	49
Tabela 3. Taxa de sobrevivência das larvas de zebrafish durante o período de recuperação de 3 dias (D1, D2 e D3) após 96 h de exposição as diferentes concentrações do Glifosato Atanor 48® (ATN) em pulsos de 5 horas. Os resultados são expressos como média de três repetições e desvio padrão (DP) de três experimentos independentes. (*) $p < 0,05$ é estatisticamente diferente em relação à sobrevivência observada ao final das 96 horas (teste T de Student). (#) $p < 0,05$ é estatisticamente diferente em relação aos respectivos controles negativos (teste de Dunnett). CN: água de manutenção.....	51
Tabela 4. Taxa de sobrevivência das larvas de zebrafish durante o período de recuperação de 3 dias (D1, D2 e D3) após 96 h de exposição às diferentes concentrações do surfactante polioxietilenoamina (POEA) em pulsos de 1, 2 e 5 horas. Os resultados são expressos como média de três repetições e desvio padrão (DP) de três experimentos independentes. (*) $p < 0,05$ é estatisticamente diferente em relação aos respectivos controles negativos (teste de Dunnett). CN: água de manutenção. (#) $p < 0,05$ é estatisticamente diferente em relação à sobrevivência observada ao final das 96 horas (teste T de Student).....	52

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE UMA FORMULAÇÃO A BASE DE GLIFOSATO E SEUS PRINCIPAIS CONSTITUINTES SOBRE O ESTÁGIO EMBRIO-LARVAL DE ZEBRAFISH: EXPOSIÇÃO ÚNICA E REPETIDA

RODRIGUES, L.B.¹; OLIVEIRA, G.A.R.¹

¹Laboratório de Pesquisa em Toxicologia Ambiental (EnvTox), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás.

O glifosato (GLI) é o ingrediente ativo encontrado em inúmeras formulações herbicidas úteis no controle de plantas daninhas em áreas agrícolas e não agrícolas. Em decorrência do uso indiscriminado de formulações a base de glifosato, alguns de seus componentes, incluindo o ingrediente ativo, podem alcançar ambientes aquáticos através de escoamento superficial e lixiviação. O presente estudo avaliou a toxicidade aguda após exposição única e repetida em pulsos, além da genotoxicidade da formulação a base de glifosato Atanor 48 (ATN) e seus principais constituintes: GLI, o surfactante polioxietilenoamina (POEA) e o ácido aminometilfosfônico (AMPA, principal produto de degradação de GLI) sobre estágios iniciais de zebrafish (*Danio rerio*). Além disso, a capacidade de resiliência das larvas após exposições repetidas a ATN, GLI e POEA também foi avaliada. Os efeitos tóxicos da formulação a base de GLI e seus principais constituintes foram avaliados utilizando o teste de toxicidade aguda com o estágio embrionário de zebrafish, enquanto os efeitos genotóxicos foram investigados utilizando o ensaio cometa com células de larvas de zebrafish e células gonadais (linhagem RTG-2) de truta arco-íris. GLI e AMPA não apresentaram efeitos tóxicos após exposição única, enquanto ATN e POEA induziram efeitos letais significativos em zebrafish ($CL_{50-96\text{ h}}$ 76,50 mg/L e 5,49 mg/L, respectivamente). Sendo assim, os efeitos agudos para o estágio embrio-larval de zebrafish após única exposição seguiu a seguinte ordem, do mais tóxico para o menos tóxico: POEA > ATN > GLI \approx AMPA. Todas as substâncias foram genotóxicas para larvas de zebrafish (CEO 1,7 mg/L para GLI, ATN e AMPA e 0,4 mg/L para POEA). POEA também induziu dano ao DNA em células RTG-2 (CEO 1,6 mg/mL), indicando um genotóxico de ação direta. GLI não induziu efeitos tóxicos após exposições repetidas em pulsos. No entanto, ATN induziu mortalidade significativa ($CL_{50-96\text{ h}}$ 148,80 mg/L) na maior concentração testada (100 mg/L) após pulsos de 5 horas. POEA induziu toxicidade aguda significativa em estágios iniciais de zebrafish após pulsos de 1, 2 e 5 horas com $CL_{50-96\text{ h}}$ de 43,49 mg/L, 47,23 mg/L e 11,61 mg/L, respectivamente. Durante o período de recuperação, não houve reversão de efeitos subletais. Os efeitos tóxicos induzidos por ATN e POEA após exposição repetida em pulsos foram menores quando comparados aos efeitos observados na exposição única. Em síntese, diferentes parâmetros toxicológicos em cenários de exposição distintos devem ser analisados para prever e entender a toxicidade de formulações a base de GLI e seus constituintes.

Palavras-chave: surfactante, AMPA, FET, ensaio cometa, *Danio rerio*, resiliência.

Agradecimentos: EnvTox, ToxIn, CNPq, INCT/DATREM and CAPES.

TOXICITY EVALUATION OF GLYPHOSATE-BASED FORMULATION AND ITS MAIN CONSTITUENTS ON THE ZEBRAFISH EARLY LIFE STAGES: CONTINUOUS AND REPEATED PULSE EXPOSURE**RODRIGUES, L.B.1; OLIVEIRA, G.A.R.1**

¹Laboratório de Pesquisa em Toxicologia Ambiental (EnvTox), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás.

Glyphosate (GLY) is the active ingredient of several herbicide formulations used to control weeds in agricultural and non-agricultural areas. Due to intensive use of GLY-based formulations and the repeated applications once weed resistance, some of their components, including the active ingredient, may reach the aquatic environment through direct run-off and leaching. The present study assessed the acute toxicity, after continuous and repeated exposures, and genotoxicity of the GLY-based formulation Atanor 48 (ATN) and its major constituents GLY, surfactant polyethoxylated tallow amine (POEA), as well as the main metabolite of GLY aminomethylphosphonic acid (AMPA) on zebrafish early life stages. Also, we evaluate larvae resilience after ATN, GLY and POEA pulsed-exposure. The toxic effects of these chemicals were evaluated in the fish embryo acute toxicity test with zebrafish (*Danio rerio*), while genotoxic effects were investigated in the comet assay with cells from zebrafish larvae and rainbow trout gonad-2 (RTG-2). GLY and AMPA caused no acute toxic effect after continuous exposure, while ATN and POEA induced significant lethal effects in zebrafish (LC_{50-96 h} 76.50 mg/L and 5.49 mg/L, respectively). In summary, these data indicate that the lethal effects on zebrafish early-life stages can be ranked in the following order from most to least toxic: POEA > ATN > GLY ≈ AMPA. All compounds were genotoxic to zebrafish larvae (LOEC 1.7 mg/L for GLY, ATN, AMPA and 0.4 mg/L for POEA). Unlike *in vivo*, POEA induced DNA damage in RTG-2 cells (LOEC 1.6 mg/L), suggesting that it is a direct acting genotoxic agent. GLY caused no acute toxic effect after repeated pulse exposure. However, ATN showed significant mortality (LC_{50-96 h} 148.80 mg/L) after 5 h pulse at 100 mg/L and POEA induced significant toxicity on zebrafish early life stages after 1, 2 and 5 h pulse with LC_{50-96 h} of 43.49 mg/L, 47.23 mg/L and 11.61 mg/L, respectively. Zebrafish was not able to reverse the sublethal effects induced by ATN, GLY and POEA during the recovery period. The toxic effects induced by ATN and POEA after pulsed-exposure were less than continuous exposure. Therefore, its important to evaluate different toxicological endpoints with distinct exposure scenarios to predict the hazards of GLY-based formulations, their components and breakdown product to aquatic biota.

Keywords: surfactant, AMPA, FET, Comet assay, *Danio rerio*, resilience.

Acknowledgements: EnvTox, ToxIn, CNPq, INCT/DATREM and CAPES.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A evolução do glifosato no mercado nacional e mundial

O glifosato, N-(fosfonometil) glicina, foi sintetizado em 1950 por Henri Martin em uma pequena empresa farmacêutica suíça (*Swiss Pharmaceutical Company*), mas não apresentou finalidades farmacológicas relevantes. Uma década mais tarde, a molécula de glifosato chamou a atenção da *Monsanto Company*, devido a sua propriedade herbicida, que foi reconhecida por um de seus pesquisadores, John Franz, em 1970 (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997; DILL et al., 2010). No ano seguinte, o glifosato foi patenteado como um herbicida (US Patent No. 3799758) e a Monsanto introduziu a primeira formulação a base de glifosato, o Roundup®, no mercado (DUKE; POWLES, 2008; BENBROOK, 2016; MESNAGE; ANTONIOU, 2017).

Desde sua introdução, as taxas de aplicação anual têm aumentado de modo significativo, especialmente devido a admissão de culturas de soja, canola, milho e algodão geneticamente modificadas e a identificação de espécies de plantas daninhas resistentes a esse ingrediente ativo, no ano de 1996 (CUHRA; BOHN; CUHRA, 2016; MYERS et al., 2016; MESNAGE; ANTONIOU, 2017).

Atualmente, o ingrediente ativo glifosato lidera o mercado mundial de agrotóxicos e se tornou o herbicida mais comercializado para o controle de plantas daninhas em áreas agrícolas e não agrícolas. Vale destacar que em decorrência da remoção da patente, o glifosato está presente em mais de 750 formulações registradas no mundo, sendo 123 produtos formulados registrados no Brasil (GUYTON et al., 2015; AGUIAR et al., 2016; ZHANG et al., 2017; GRIGORI, 2019).

Em 2012, cerca de 127 mil toneladas de glifosato foram utilizadas nos Estados Unidos e 700 mil no mundo (BENBROOK, 2012; SWANSON et al., 2014), aumentando para cerca de 825 mil toneladas, em 2014 (BENBROOK, 2016; GILL et al., 2018). No Brasil, esse cenário não é diferente, uma vez que, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) desde 2008 o país ocupa o primeiro lugar no ranking mundial em consumo de agrotóxicos (BRASIL, 2011).

Em 2000, o Brasil consumiu cerca de 170 mil toneladas de agrotóxicos e, em 2014, esse número aumentou para cerca de 500 mil. Além disso, o Brasil consome 20% de todo agrotóxico comercializado no mundo e segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e

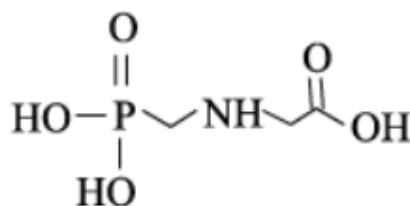
dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) em 2014, o glifosato e seus sais estiveram no topo do ranking dos ingredientes ativos mais consumidos no país, representando 39% das vendas. Ainda segundo o órgão ambiental, 173 mil toneladas de glifosato foram vendidas no Brasil em 2017 (BRASIL, 2011; BOMBARDI, 2017; GRIGORI, 2019).

A justificativa para o aumento do consumo estaria relacionada ao crescimento da produtividade agrícola e ao aumento da área plantada de culturas geneticamente modificadas, sendo que o Brasil representa 23% dessa área a nível mundial (GOMES et al., 2014; GILL et al., 2017; VAN BRUGGEN et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019).

1.2 Propriedades físico-químicas e mecanismo de ação do glifosato

O glifosato pertence ao grupo dos fosfonatos, com estrutura química (FIGURA 1) semelhante aos organofosforados, diferenciando apenas 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).



FONTE: Amarante, Junior e Santos (2002).

O glifosato é uma denominação comumente utilizada para uma família de compostos obtidos por diferentes processos químicos. É uma molécula complexa que existe sob duas formas diferentes nas formulações herbicidas, o equivalente ácido de glifosato (e.a.), responsável pela ação herbicida e os sais de glifosato (também denominados derivativos), como o sal de isopropilamina, sal de dimetilamônio, sal de potássio, glifosato amônio e glifosato sesquisódio, que conferem aumento na solubilidade e estabilidade do e.a. Tanto o glifosato quanto seus sais são sólidos cristalinos, com alta solubilidade em água (10 a 15,7 g/L a 25 °C, para glifosato (e.a.) e 1000 g/L a 25 °C, para o sal de isopropilamina) (AMARANTE JUNIOR; SANTOS, 2002; DILL et al., 2010; CUHRA; BOHN; CUHRA, 2016; SILVA, 2019).

O glifosato é comercializado em formulações, que variam em composição química e são mais tóxicas do que o ingrediente ativo isolado. Essas formulações são constituídas

por água, ingrediente ativo em diferentes concentrações e compostos categorizados como ingredientes inertes, podendo também ser denominados adjuvantes, co-formulantes ou surfactantes. Esses compostos são adicionados à formulação com objetivo de aumentar a eficácia do ingrediente ativo (FOLMAR et al., 1979; WEBSTER et al., 2014; MESNAGE et al., 2015; MESNAGE; BENBROOK; ANTONIOU, 2019; MARTENS et al., 2019).

Dentre as inúmeras formulações existentes no mercado, o Roundup® é a mais utilizada e apresenta em sua composição 360 g/L de glifosato e.a., 480 g/L de sal de isopropilamina de glifosato e o surfactante não iônico polioxietilenoamina (POEA), em concentrações que variam de 50 a 150 g/L (WILLIAMS; KROS, MUNRO, 2000; HOWE et al., 2004; MESNAGE; BENBROOK; ANTONIOU, 2019).

Os POEAs são uma mistura complexa de compostos obtidos a partir de ácidos graxos de origem animal, sendo adicionados à formulação para aumentar a adesão do ingrediente ativo à superfície da folha da planta daninha, melhorando seu perfil de absorção e translocação (BENBROOK, 2016; MARTENS et al., 2019; MESNAGE; BENBROOK; ANTONIOU, 2019). Devido a sua elevada eficiência, os POEAs têm sido os surfactantes mais utilizados em herbicidas a base de glifosato. No entanto, seus efeitos tóxicos podem superar os efeitos tóxicos do glifosato isoladamente. A diferença de toxicidade entre a formulação de referência, Roundup®, e o princípio ativo foi discutida pela primeira vez por Folmar e colaboradores (1979). Inúmeros estudos corroboraram o anterior e compararam a toxicidade de formulações equivalentes em relação a formulação de referência e ao glifosato isolado, concluindo que elas se mostravam mais tóxicas do que o princípio ativo (WAN; WATTS; MOUL, 1989; TSUI; CHU, 2003; MESNAGE; BERNAY; SÉRALINI, 2013; MORENO; SOFIA; MARTINEZ, 2014; WEBSTER et al., 2014; MESNAGE et al., 2015; RODRIGUES et al., 2017; MESNAGE; BENBROOK; ANTONIOU, 2019; RODRIGUES et al., 2019).

O glifosato é um potente herbicida não seletivo, pós-emergente e de amplo espectro. Seu mecanismo de ação está associado à inibição competitiva da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPs). Esta rota sintética, presente em plantas e alguns microorganismos, é responsável pela produção de chiquimato, necessário na biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano, aminoácidos essenciais para a síntese de precursores de ligninas, flavonoides, taninos e outros compostos fenólicos (COLE, 1985; FRANZ, 1985; ANNETT; HABIBI; HONTELA, 2014; BAI; OGBOURNE, 2016).

Após a aplicação, o herbicida é rapidamente absorvido pela superfície da planta sendo difundido através de sua cutícula. As propriedades físico-químicas do glifosato permitem que ele seja translocado das folhas para as raízes e, em decorrência desse

transporte sistêmico, a planta é totalmente eliminada, inicialmente por clorose foliar (amarelamento do limbo foliar) seguido de necrose, acometendo meristemas, órgãos de armazenamento, raízes jovens, folhas e tecidos em crescimento da planta (SIEHL, 1997; GEIGER et al., 1999; KIRKWOOD et al., 2000; DUKE; POWLES, 2008).

1.3 Comportamento ambiental do glifosato

A grande variedade de herbicidas a base de glifosato e seu uso extensivo em áreas agrícolas e não agrícolas tem resultado em níveis elevados de resíduos de ingrediente ativo e seus constituintes nos ecossistemas, gerando grande preocupação ambiental (VAN BRUGGEN et al., 2018). O glifosato entra no solo através da pulverização direta em campos agrícolas tradicionais, campos agrícolas geneticamente modificados e em áreas urbanas. Após aplicação, parte do composto que não atinge o alvo, fica retido no solo.

A retenção do glifosato no solo desempenha um papel importante relacionado à formação de complexos com água e íons metálicos (Ca^{2+} e Mg^{2+}), disponibilidade para biodegradação por microrganismos, reabsorção por plantas adjacentes e, ainda, sorção com sedimentos suspensos no solo como argila e matéria orgânica (PRATA, 2010; DUKE et al., 2012).

As taxas de sorção aumentam com a redução da área de superfície do solo, presença de metais e valores de pH baixos. No entanto, as taxas de degradação no solo não estão relacionadas ao conteúdo de argila e matéria orgânica, mas possivelmente, ao pH do solo e, em menor grau, às concentrações totais de metais (DUKE; POWLES, 2009; BANKS et al., 2014; GRANDCOIN; PIEL; BAURÈS, 2017).

O glifosato apresenta grande afinidade pela maioria dos solos devido às suas características físico-químicas e, o aumento das quantidades aplicadas, tem relação direta com essa afinidade. Alguns fatores relevantes, como degradação lenta da molécula, tempo de meia-vida (4 a 151 dias) e redução da ação potencial pós-aplicação, contribuem esse aumento (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997; BANKS et al., 2014; GRANDCOIN; PIEL; BAURÈS, 2017; VAN BRUGGEN et al., 2018).

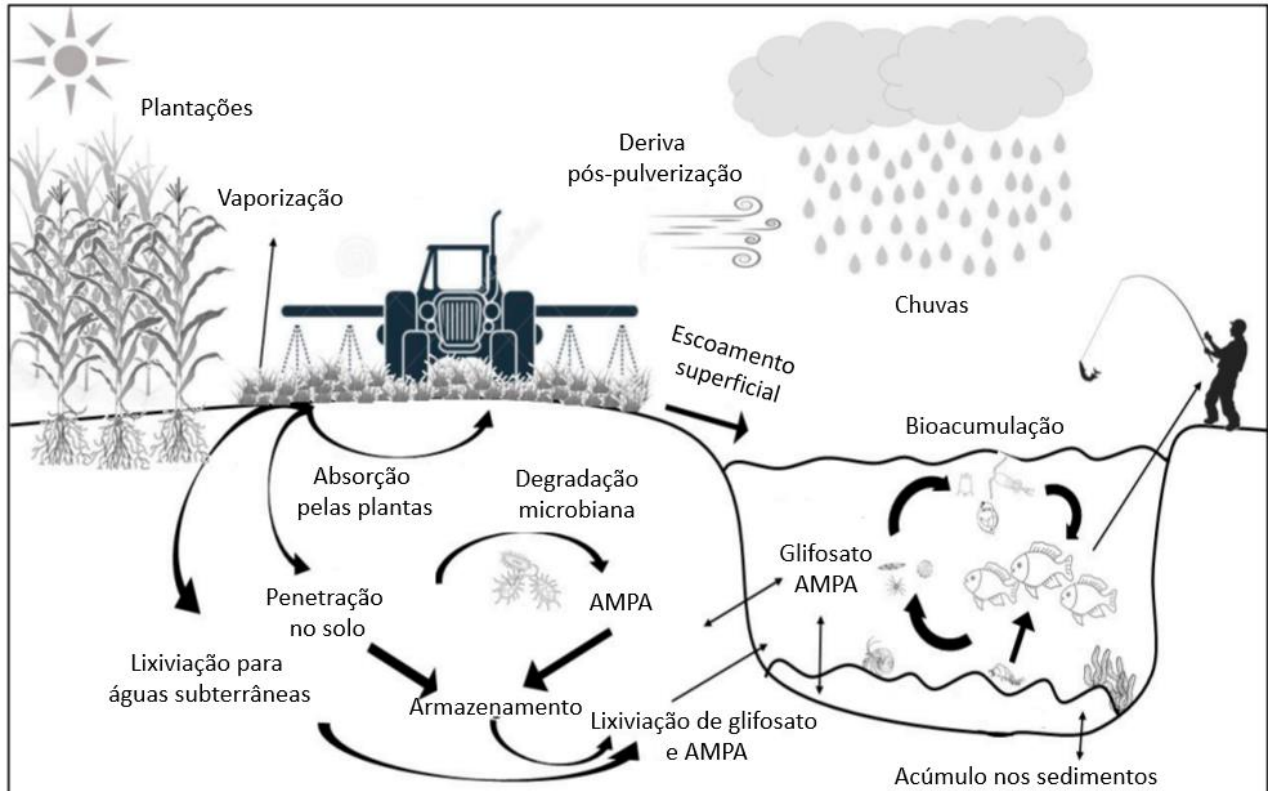
A sorção do glifosato ao solo facilita o processo de degradação microbiana que pode ocorrer por duas vias, uma que leva a formação do ácido aminometil fosfônico (AMPA), como metabólito principal e outra que forma sarcosina, glicina e glioxilato, como metabólitos secundários (BORGGAARD; GIMSING, 2008; WANG et al., 2016). Em relação à persistência no solo, ao contrário do glifosato, o AMPA é classificado como persistente, apresentando meia-vida de 151 dias, que pode variar de 76 a 240 dias a depender das condições do solo. Quando comparado ao glifosato, AMPA tem se mostrado de 3 a 6 vezes

mais tóxico (SUN; LI; JAISI, 2019; TRESNAKOVA; STARA; VELISEK, 2021; MARTINS-GOMES et al., 2022).

A degradação microbiológica do glifosato envolve a ação de três enzimas: glifosato oxidoreductase, glicina oxidase e C-P liase. As duas primeiras estão associadas a formação de glioxilato e AMPA, enquanto C-P liase relaciona-se com a formação dos subprodutos metilamina e fosfato inorgânico, ambos consumidos por microorganismos presentes no solo. A sarcosina, um subproduto de degradação do glifosato, como citada acima, é convertida à formaldeído e glicina igualmente úteis à microbiota do solo (GILL et al., 2017).

A contaminação de ecossistemas aquáticos por herbicidas a base de glifosato, surfactantes e seu metabólito principal pode acontecer de diversas maneiras. Tanto o glifosato quanto AMPA acumulam-se nas camadas mais externas do solo e podem ser transportados para águas superficiais através do escoamento superficial, lixiviação, deriva pós-pulverização e após chuvas intensas (FIGURA 2) (ANNET; HABIBI; HONTELA, 2014; GRANDCOIN; PIEL; BAÛRES, 2017; RODRIGUES et al., 2019; TRESNAKOVA; STARA; VELISEK, 2021).

FIGURA 2. Distribuição e transporte de glifosato e AMPA nos ecossistemas aquáticos.



FONTE: Adaptado de Tresnakova, Stara e Velisek (2021).

As propriedades físico-químicas do glifosato sugerem que a contaminação das águas subterrâneas é relativamente baixa (CONNOR et al., 2007; COUPE et al., 2012; ANNET; HABIBI; HONTELA, 2014; GRANDCOIN; PIEL; BAURÈS, 2017). As maiores concentrações desse composto nos recursos hídricos ocorrem no primeiro episódio de escoamento superficial após aplicação das formulações. Além disso, a aplicação direta em água também resulta em quantidades significativas de resíduos de glifosato e dos demais constituintes da formulação. Vale destacar que, a presença ou ausência de glifosato em águas superficiais depende da proximidade da área de aplicação do herbicida ao corpo d'água (ANNET; HABIBI; HONTELA, 2014; VAN BRUGGEN et al., 2018).

O glifosato tem demonstrado ser persistente em águas superficiais, sendo encontrado em concentrações que variam de 0,01 mg/L a 0,7 mg/L e, em casos de aplicação direta na água, em concentrações entre 1,7 mg/L e 5,2 mg/L (ANNET; HABIBI; HONTELA, 2014; VAN BRUGGEN et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019). Segundo Tush e colaboradores (2018), o POEA tem sido encontrado em cursos d'água, após escoamento de culturas glifosato-resistente e geneticamente modificadas. Já o AMPA, que ocorre concomitantemente ao glifosato em decorrência de ser seu principal produto de degradação, tem sido detectado com frequência em águas superficiais, apresentando um perfil de persistência semelhante ao observado para o glifosato. Destaca-se ainda que a presença de AMPA nesse compartimento ambiental pode ser um indicador útil da presença de glifosato (GRUNEWALD et al., 2001; BAI; OGBOURNE, 2016; CATTANI et al., 2017; GRANDCOIN; PIEL; BAURÈS, 2017).

Estudos recentes têm demonstrado que o uso de herbicidas a base de glifosato em áreas urbanas tem sido uma importante fonte de contaminação de águas superficiais, contribuindo fortemente para contaminação desses ecossistemas aquáticos em comparação às áreas agrícolas (ANNET; HABIBI; HONTELA, 2014; GRANDCOIN; PIEL; BAURÈS, 2017; VAN BRUGGEN et al., 2018).

1.3.1 Toxicidade do glifosato para organismos aquáticos

A contaminação dos ecossistemas aquáticos por glifosato e suas formulações afeta o crescimento e as funções metabólicas de inúmeros organismos, incluindo protozoários, mexilhões, crustáceos, anfíbios e peixes (GILL et al., 2017; GRANDCOIN; PIEL; BAURÈS, 2017; LANZARIN et al., 2019).

Estudos de toxicidade aguda em espécies aquáticas, importantes para a compreensão dos limites de exposição, têm se concentrado na avaliação tanto das formulações à base de glifosato, quanto dos constituintes individuais e do principal produto de degradação (ANNET; HABIBI; HONTELA, 2014; GRANDCOIN; PIEL; BAURÈS, 2017, VAN BRUGGEN et al., 2018).

De acordo com a literatura, o glifosato isoladamente não se bioacumula nos organismos aquáticos. Porém, existem evidências de que o fator de bioacumulação pode aumentar na presença de POEA, visto que o aumento da permeabilidade do ingrediente ativo proporcionado por essa substância em células de plantas daninhas, também pode ser observado em células animais. Esse fator suporta a possibilidade de contaminação em vários níveis da cadeia trófica, sendo uma preocupação maior para espécies de peixes, especialmente durante as fases iniciais de desenvolvimento (CONTARDO-JARA; KLINGELMANN; WIEGANG, 2009; HEDBERG; WALLIN, 2010; ANNET; HABIBI; HONTELA, 2014).

Os peixes são uma das mais importantes classes nos ecossistemas aquáticos, pois tem um papel importante na cadeia alimentar e mantendo o equilíbrio natural das teias alimentares (GILL et al., 2017). Esses organismos são expostos a uma ampla faixa de estressores ambientais durante seu ciclo de vida, porém se adaptam para responder a mudanças em seu ambiente natural através de compensações fisiológicas e comportamentais. A presença de estressores provenientes da ação antropogênica, tais como os herbicidas a base de glifosato na água, pode alterar a fisiologia e *endpoints* comportamentais críticos para a manutenção da função normal, causando efeitos do nível celular ao populacional (GUILHERME et al., 2012; HUED; OBERHOFER; BISTONI, 2012). Além disso, pelo fato de ocuparem níveis tróficos elevados, são susceptíveis a efeitos através de fontes alimentares contaminadas como algas, invertebrados e outras espécies de peixes (SOLOMON; THOMPSON, 2003).

Um estudo realizado por Geisy e colaboradores (2000), revisou dados de toxicidade para 12 espécies de peixes expostos ao herbicida a base de glifosato, Roundup® Original, e demonstrou valores de concentração letal média (CL₅₀) após 96 horas de exposição variando entre 4,2 e 52,0 mg/L. Vale ressaltar que, grande parte da toxicidade da formulação é atribuída a presença do surfactante, particularmente o POEA. Além disso, deve-se levar em consideração a sensibilidade interespecies. Dentre as espécies avaliadas no estudo, a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) mostrou-se mais sensível à exposição à formulação com CL_{50-96h} de 4,2 mg/L.

Outro ponto importante relacionado à toxicidade, deve-se ao ciclo de vida do peixe. Em geral, os efeitos tóxicos do herbicida são mais acentuados nos estágios iniciais de desenvolvimento (FOLMAR et al., 1979; JIRAUNGKOORSKUL et al., 2002; SULUKAN et al., 2017; ZHANG et al., 2017; FIORINO et al., 2018). Um estudo conduzido por Bridi e colaboradores (2017) avaliou a diferença de toxicidade do ingrediente ativo glifosato e de Roundup® Original sobre estágios embrio-larvais (72 horas pós-fertilização) e adultos de zebrafish (*Danio rerio*). A partir de avaliações comportamentais, o estudo corroborou a já conhecida diferença de toxicidade entre ativo e formulação e, além disso, demonstrou que os estágios iniciais de desenvolvimento são mais sensíveis a agentes tóxicos quando comparados aos organismos adultos. Portanto, é importante compreender os efeitos tóxicos das novas gerações de herbicidas a base de glifosato contendo diferentes concentrações do ingrediente ativo, surfactantes e substância inerte, especialmente durante a embriogênese dos organismos, fase em que são mais suscetíveis (MASSEI et al., 2015).

1.4 Zebrafish (*Danio rerio*) como organismo modelo para avaliação de toxicidade

O zebrafish (*Danio rerio*), um peixe tropical nativo dos rios de água doce da Índia, Sul e Sudoeste da Ásia, é um teleósteo com 3 a 5 centímetros, pertencente à família dos ciprinídeos (NAGEL, 2002). Em 1982, George Streisinger propôs pela primeira vez o uso do zebrafish como modelo experimental para o estudo da frequência de mutações em resposta a agentes carcinogênicos ambientais e, nas três décadas subsequentes, foi empregado na identificação de agentes teratogênicos e na elucidação de mecanismos de ação tóxicos (BAMBINO, CHU, 2017). Desde então, vem sendo utilizado como organismo modelo para inúmeros estudos, incluindo nas áreas de farmacologia, oncologia, reprodução, toxicologia ambiental, ecotoxicologia e avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade (NAGEL, 2002; SCHOLZ et al., 2008, DAI et al., 2014).

Dentre as vantagens do uso do zebrafish como modelo experimental, um conjunto específico de características têm contribuído para sua popularidade, sendo elas: tamanho pequeno, rápido desenvolvimento, fácil manutenção em laboratório, alta taxa de fecundidade, produção de grande número de embriões e curto ciclo reprodutivo. Além disso, a transparência dos ovos e larvas, permite a avaliação do desenvolvimento através de procedimentos não invasivos minimizando, desse modo, o sofrimento e reduzindo o estresse do animal. O plano básico do corpo do zebrafish é estabelecido 24 horas pós-fecundação (hpf) e os embriões eclodem em aproximadamente 48 a 50 hpf. Após 120 hpf, a organogênese dos principais órgãos da larva está concluída. Ademais, em decorrência

de seu curto ciclo de vida, esse organismo alcança maturidade sexual com 3 meses de idade (KIMMEL et al., 1995; SCHOLZ et al., 2008; SCHOLZ, 2013; HOWE et al., 2013). Outro motivo de destaque é que, de acordo com a regulamentação de bem-estar animal da comunidade europeia (Diretiva, 2010/63/EU), os estágios embrionários do zebrafish não necessitam de proteção, pois são independentes da alimentação exógena, sendo considerados similares aos modelos *in vitro* e, portanto, alternativos ao uso de animais (DIRECTIVE 2010/63/EU; SCHOLZ et al., 2008; TEIXIDÓ et al., 2013).

Em vista dessas inúmeras características vantajosas e a sua sensibilidade a diferentes tipos de contaminantes, o zebrafish pode ser utilizado como organismo modelo para estudos que visem monitoramento ecotoxicológico, incluindo avaliação de contaminantes emergentes como fármacos, disruptores endócrinos, agrotóxicos, corantes, retardantes de chama, nanomateriais, dentre outros (GOOLISH; OKUTAKE; JOHNSON, 2000; DAI et al., 2014; LEME et al., 2015; RODRIGUES et al., 2016; BRITO et al., 2018; FELZENSZWALB et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2018; MORENO et al., 2019; PEREIRA et al., 2019; RODRIGUES et al., 2019). Outro ponto importante está relacionado ao seu genoma estar completamente sequenciado e a sua similaridade genética aos camundongos e humanos, possibilitando extrapolações (PARNG et al., 2002; LIESCHKE; CURRIE, 2007; HOWE et al., 2013; SCHOLZ, 2013; TANNENBAUM; BENNET, 2015; GARCIA; NOYES; TANGUAY, 2016; SALEEM; KANNAN, 2018; SHEHWANA; KONU, 2019). Desse modo, além do emprego na área ambiental, o zebrafish tem sido modelo na investigação de doenças humanas, incluindo estudos para distúrbios no coração, rins, fígado, sistema hematopoiético, sistema imunológico, sistema nervoso central, dentre outros (SCHOLZ et al., 2008; STRÄHLE et al., 2012; DAI et al., 2014; BAMBINO; CHU, 2017; SALEEM; KANNAN, 2018). Nesse sentido, por razões éticas e considerando o bem-estar dos animais, o *Fish Embryo Toxicity (FET) test* com zebrafish se tornou popular entre a comunidade científica, pois permite o estudo dos efeitos de toxicantes sobre os estágios iniciais de desenvolvimento embrionário. Além disso, o FET pode ser empregado na substituição ao ensaio utilizando peixes adultos. Destaca-se ainda que o teste pode ser aplicado a agentes que apresentam variadas propriedades físico-químicas (NAGEL, 2002; HERMSEN et al., 2011; OECD, 2013).

Embriões de peixe recém-fertilizados são expostos a um agente tóxico por um período de 96 horas. A cada 24 horas indicadores de letalidade, incluindo coagulação dos embriões, ausência de formação de somitos (musculatura primitiva), de desprendimento da cauda do saco vitelínico e de batimentos cardíacos são registrados. Ao final do período de

exposição, a toxicidade aguda é determinada calculando-se a CL_{50} , tomando por base os indicadores supracitados (OECD, 2013).

Dentre os vários ensaios disponíveis para avaliar a genotoxicidade de compostos o ensaio cometa é considerado uma técnica rápida, sensível e econômica (JARVIS, KNOWLES, 2003; KOSMEHL et al., 2006) que tem sido indicada para a detecção de danos na estrutura do DNA, em qualquer célula eucariota individual, tais como as atividades de reparo, modo de seu empacotamento e sua integridade (TICE et al., 2000; GONTIJO, TICE, 2003). Destaca-se, ainda, que o ensaio se tornou um biomarcador sensível para estudos de monitoramento ambiental (LEE; STEINERT, 2003). Além disso, o ensaio cometa tem sido a principal metodologia para análise de dano no DNA em embriões e larvas de zebrafish (CANEDO; ROCHA, 2021).

Na versão alcalina, as células individualizadas são embebidas em agarose e lisadas para liberar seu DNA nuclear. Essa etapa é seguida pela eletroforese alcalina e neutralização. A coloração é feita com brometo de etídio para avaliar a situação do DNA usando um microscópio de fluorescência. Se o DNA nuclear estiver danificado, será observada uma imagem semelhante a um cometa (JARVIS, KNOWLES, 2003).

Se não reparadas, as lesões ao DNA, podem iniciar uma cascata de efeitos biológicos em diversos níveis, incluindo células, órgãos, em todo organismo e, eventualmente, a nível populacional (KOSMEHL et al., 2006).

Nesse contexto, esse trabalho avaliou e comparou os efeitos tóxicos agudos após exposição única e repetidas, assim como investigou os efeitos genotóxicos de uma formulação de herbicida a base de glifosato (Glifosato Atanor 48 - ATN), do ingrediente ativo glifosato (GLI), do surfactante polioxietilenoamina (POEA) e do metabólito principal ácido aminometilfosfônico (AMPA) sobre os estágios embrio-larvais de zebrafish.

1.5 Avaliação da toxicidade de praguicidas/agrotóxicos utilizando exposições repetidas

A entrada de agrotóxicos em ecossistemas aquáticos geralmente ocorre sob a forma de pulsos e não por exposições contínuas. A principal fonte de entrada se dá por escoamento superficial em áreas agrícolas e não agrícolas, após chuvas intensas. Quando adentram nesses ecossistemas, esses compostos atingem concentrações máximas nos corpos d'água. No entanto, em decorrência diluições, mudanças na estrutura da molécula, alterações no perfil de solubilidade e degradação, as concentrações tornam-se menores

podendo atingir níveis mínimos (REINERT; GIDDINGS; JUDD, 2002; CHÈVRE; VALLOTTON, 2013).

Os ensaios de toxicidade comumente empregados utilizam cenários de exposição contínua, não levando em consideração o período no qual ocorre a redução da concentração do agrotóxico no compartimento aquático. Essa redução pode implicar em diminuição da sensibilidade do organismo-modelo ao composto e a reprodução de um cenário de exposição não realista (REINERT; GIDDINGS; JUDD, 2002; VALLOTTON et al., 2008).

A vulnerabilidade de células, órgãos ou organismos depende de como eles se comportam a uma variação negativa provocada, por exemplo, por um agente tóxico. Essa habilidade da célula ou organismo em lidar com estímulos danosos e se recuperar das alterações provocadas por eles é conhecida como resiliência celular. Essa propriedade fisiológica também pode ser definida como o oposto de vulnerabilidade, embora haja opiniões divergentes na literatura. A resiliência não está relacionada apenas ao retorno da célula ao seu estado normal, mas como o estressor alterou a sua funcionalidade e resposta. Assim, uma célula resiliente não é necessariamente uma célula saudável (SMIRNOVA et al., 2015).

2. JUSTIFICATIVA

O glifosato tem sido objeto de estudo de agências reguladoras nacionais e internacionais desde sua introdução no mercado. Esse ingrediente ativo é classificado com toxicidade relativamente baixa para mamíferos apresentando dose letal média (DL_{50}) maior do que 5000 mg/kg. No que concerne aos estudos de carcinogenicidade, as agências reguladoras americana e europeia concluíram que esse herbicida não oferece risco significativo para seres humanos (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000; NPCI, 2011; TARAZONA et al., 2017; VAN BRUGGEN et al., 2018; BENBROOK, 2019). No entanto, em um relatório divulgado em 2015 pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), tanto a classificação do ingrediente ativo isolado quanto dos produtos formulados foi alterada para grupo 2A, ou seja, “provavelmente carcinogênico para seres humanos” (GUYTON et al., 2015; MESNAGE; ANTONIOU, 2017; BENBROOK, 2019).

A consequência dessa nova classificação resultou em um movimento para a reavaliação da toxicidade do glifosato pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA), Autoridade Europeia para Segurança Alimentar (EFSA) e pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO/OMS) em 2016. Após detalhada avaliação, as agências reguladoras chegaram a uma conclusão contrária à proposta pela IARC, aumentando o debate científico e social acerca da toxicidade do ingrediente ativo glifosato e seus produtos formulados (TARAZONA et al., 2017; BENBROOK, 2019).

As divergências científicas encontradas nos estudos com o glifosato podem estar relacionadas às diferentes abordagens, metodologias e interpretações dos dados. Contudo, é importante ressaltar que apesar dos resultados obtidos pela US-EPA, EFSA e FAO/OMS se mostrarem diferentes daqueles atingidos pela IARC, as agências atualizaram o perfil toxicológico do composto, propondo novos valores de referência (TARAZONA et al., 2017; BENBROOK, 2019).

No Brasil, o glifosato está em processo de reavaliação pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) desde 2008. Em 2018, a agência apresentou uma nota técnica preliminar sobre as conclusões da reavaliação do glifosato concluindo que, em relação às propriedades proibitivas para o registro de agrotóxicos, previstas na Lei 7.802 de 11 de julho de 1989, a Lei dos Agrotóxicos, o ingrediente ativo isolado não apresenta características mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas (BRASIL, 2018). A decisão

final sobre a regulamentação e classificação toxicológica foi tomada após a Consulta Pública 484/201, culminando na Resolução nº 2.080 de 31 de julho de 2019 que divulga a reclassificação de agrotóxicos, inclusive àqueles que contém glifosato. Segundo a resolução, o herbicida a base de glifosato mundialmente utilizado, Roundup® Original, passou a ser classificado como “Categoria 4 - Produto Pouco Tóxico” (BRASIL, 2019).

Vale ressaltar que, a grande maioria dos estudos conduzidos pelas agências reguladoras são realizados com o ingrediente ativo isolado. No entanto, a exposição humana e ambiental a este composto se dá através da aplicação de produtos formulados, ou seja, uma mistura do ingrediente ativo com as substâncias inertes (adjuvantes, co-formulantes ou surfactantes) que, como citado anteriormente, podem aumentar a toxicidade do glifosato (FOLMAR et al., 1979; MESNAGE; BERNAY; SÉRALINI, 2013; DEFARGE et al., 2016; BENBROOK, 2019; LANZARIN et al., 2019; RODRIGUES et al., 2019).

Além disso, a avaliação da toxicidade aguda de agrotóxicos, geralmente, é realizada através de uma única exposição, ou seja, o organismo permanece em contato com o agrotóxico durante todo o período do ensaio, o que não reflete o cenário de exposição real. Nesse caso, a análise da toxicidade de um agrotóxico após exposições repetidas, múltiplas exposições ou exposições em pulsos pode representar uma resposta mais fidedigna para os organismos não-alvo, considerando que os métodos tradicionais de proteção dos campos agrícolas, geralmente, exigem altas doses e aplicações repetidas desses compostos (REINERT; GIDDINGS; JUDD, 2002).

As exposições em pulsos podem ter consequências a nível individual e populacional. O primeiro pulso de exposição pode selecionar os organismos mais resistentes, causando uma toxicidade aparentemente baixa, porém se a frequência dos pulsos aumentar, a toxicidade pode se tornar similar àquela obtida após exposição contínua (REINERT; GIDDINGS; JUDD, 2002; MORETON et al., 2020). Outro aspecto importante que deve ser considerado em um cenário real de exposição aos agrotóxicos é a capacidade de resiliência do organismo exposto, ou seja, a sua habilidade em lidar com estímulos danosos e se recuperar das alterações provocadas por eles após exposições repetidas (GIESY et al., 1999; BUNDSCHUH et al., 2017).

Tendo em vista a variedade de formulações de herbicidas a base de glifosato e o impacto ambiental proveniente do uso indiscriminado delas, principalmente em decorrência da flexibilização da legislação brasileira e a recente reclassificação das formulações pelas agências regulatórias, esse trabalho avaliou e comparou a toxicidade aguda e a genotoxicidade da formulação comercial Glifosato Atanor 48 (ATN), do ingrediente ativo

glifosato (GLI), do surfactante polioxietilenoamina (POEA) e do metabólito principal do GLI, o ácido aminometilfosfônico (AMPA) sobre os estágios embrio-larvais de zebrafish após exposição única. Além disso, para ter conhecimento de um cenário mais fidedigno de exposição ao ATN, GLI e POEA, esse trabalho avaliou a toxicidade aguda desses compostos para embriões e larvas de zebrafish após exposições repetidas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar e comparar a toxicidade aguda e a genotoxicidade da formulação comercial Glifosato Atanor 48 (ATN), do ingrediente ativo glifosato (GLI), do surfactante polioxietilenoamina (POEA) e do metabólito principal ácido aminometilfosfônico (AMPA) sobre os estágios embrio-larvais de zebrafish após exposição única e repetidas.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos tóxicos agudos induzidos por ATN, GLI, POEA e AMPA sobre os estágios embrio-larvais de zebrafish após exposição única, através da análise de parâmetros letais e subletais;
- Avaliar os efeitos genotóxicos de ATN, GLI, POEA e AMPA sobre larvas de zebrafish após exposição única, através da análise do índice de dano ao DNA;
- Comparar a toxicidade aguda e a genotoxicidade induzidas por ATN, GLI, POEA e AMPA sobre os estágios embrio-larvais de zebrafish após exposição única;
- Avaliar os efeitos tóxicos agudos induzidos pelo ATN, GLI e POEA sobre os estágios embrio-larvais de zebrafish após exposição repetida em pulsos;
- Avaliar a capacidade de resiliência das larvas de zebrafish após exposições repetidas em pulsos ao ATN, GLI e POEA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Substâncias-teste

Os ensaios foram conduzidos com as seguintes substâncias-teste: glifosato puro (GLI) (CAS No. 1071-83-6; pureza: 99%) e ácido aminometilfosfônico (AMPA) (CAS no. 1066-51-9; pureza: 99%) obtidos da Sigma-Aldrich (Seelze, LS, Alemanha), uma formulação à base de glifosato obtida comercialmente, Glifosato Atanor 48 (ATN) (Porto Alegre, RS, Brasil), composta por sal de isopropilamina de glifosato (480 g/L) e equivalente ácido de glifosato (360 g/L) e o surfactante polioxietilenoamina (POEA) obtido da Crescent Chemical Company (Islandia, NI, EUA).

4.2 Manutenção dos peixes adultos

Peixes adultos machos e fêmeas de zebrafish (*D. rerio*) adquiridos de petshop foram mantidos no sistema de recirculação Rack Hydrus (Alesco), no Laboratório de Pesquisa em Toxicologia Ambiental (EnvTox) da Universidade Federal de Goiás (UFG). A água utilizada no sistema foi obtida por osmose reversa, passando por vários níveis de filtração (filtros de carvão ativado e filtros biológicos), esterilizada por luz ultravioleta (UV) e com ajuste automático de pH e condutividade. A temperatura da água foi mantida a 26 ± 1 °C, condutividade a 750 ± 50 µS, pH a $7,5 \pm 0,5$ e oxigênio dissolvido de 8 ppm. Nitrato, nitrito e amônia foram monitorados regularmente. Os peixes foram mantidos em ciclo claro:escuro de 12:12 horas e alimentados com ração comercial duas vezes ao dia (TetraColor Flakes®) e náuplios de *Artemia salina* uma vez ao dia. Tanto a manutenção dos peixes adultos quanto a execução dos testes foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFG (PROTOCOLO N. 102/14).

4.2.1 Aquisição de ovos

No dia anterior à execução do teste, os peixes foram selecionados na proporção de 2:1 (machos:fêmeas) e transferidos para aquários de reprodução. A desova iniciou-se durante as primeiras horas do ciclo claro da manhã seguinte. Cerca de 30 minutos após a desova, os ovos foram coletados e transferidos para uma placa de Petri contendo água de manutenção proveniente do sistema de recirculação. Com auxílio de um estereomicroscópio (Bel Photonics STM PRO, Leica Microsystems) os ovos viáveis (fertilizados) foram separados dos ovos não-viáveis (coagulados), os quais foram descartados.

4.3 Teste de toxicidade aguda com estágios embrio-larvais de zebrafish (FET) após exposição única

O teste de toxicidade aguda com estágios embrio-larvais de zebrafish foi conduzido de acordo com o *Guideline* OECD 236 (2013). Vinte ovos fertilizados foram distribuídos individualmente em placas de cultura de 24 poços contendo 2,0 mL de GLI, ATN e AMPA nas concentrações de 1,7; 5, 10, 23, 50 e 100 mg/L e POEA nas concentrações de 0,4; 0,8; 1,6; 4, 8 e 16 mg/L, assim como para o controle negativo (água de manutenção) e positivo (3,4-dicloroanilina a 4,5 mg/L). A escolha das concentrações de GLI, ATN e AMPA foi baseada no limite máximo preconizado pelo *Guideline* OECD 236 (2013) (100 mg/L). A partir dessa concentração se estabeleceu um fator de 2 a 3, em que a concentração de 1,7 mg/L representou a concentração ambientalmente relevante (ANNET; HABIBI; HONTELA, 2014; ROY; CARNEIRO; OCHS, 2016; RODRIGUES et al., 2019). Já em relação ao POEA, a escolha foi orientada a partir de ensaios preliminares no qual a maior concentração testada (16 mg/L), apresentou alta taxa de mortalidade para estágios embrio-larvais de zebrafish nas primeiras 24 horas de exposição. Nesse sentido, um fator de 2 a 5 foi aplicado para estabelecer a faixa de concentração.

O teste foi realizado em triplicata com três experimentos independentes. As placas foram incubadas em câmara com fotoperíodo 12:12 horas (claro:escuro) a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e em condição estática. O desenvolvimento dos embriões foi acompanhado por 24, 48, 72 e 96 hpf com auxílio de um esteromicroscópio (Bel Photonics STM PRO, Leica Microsystems).

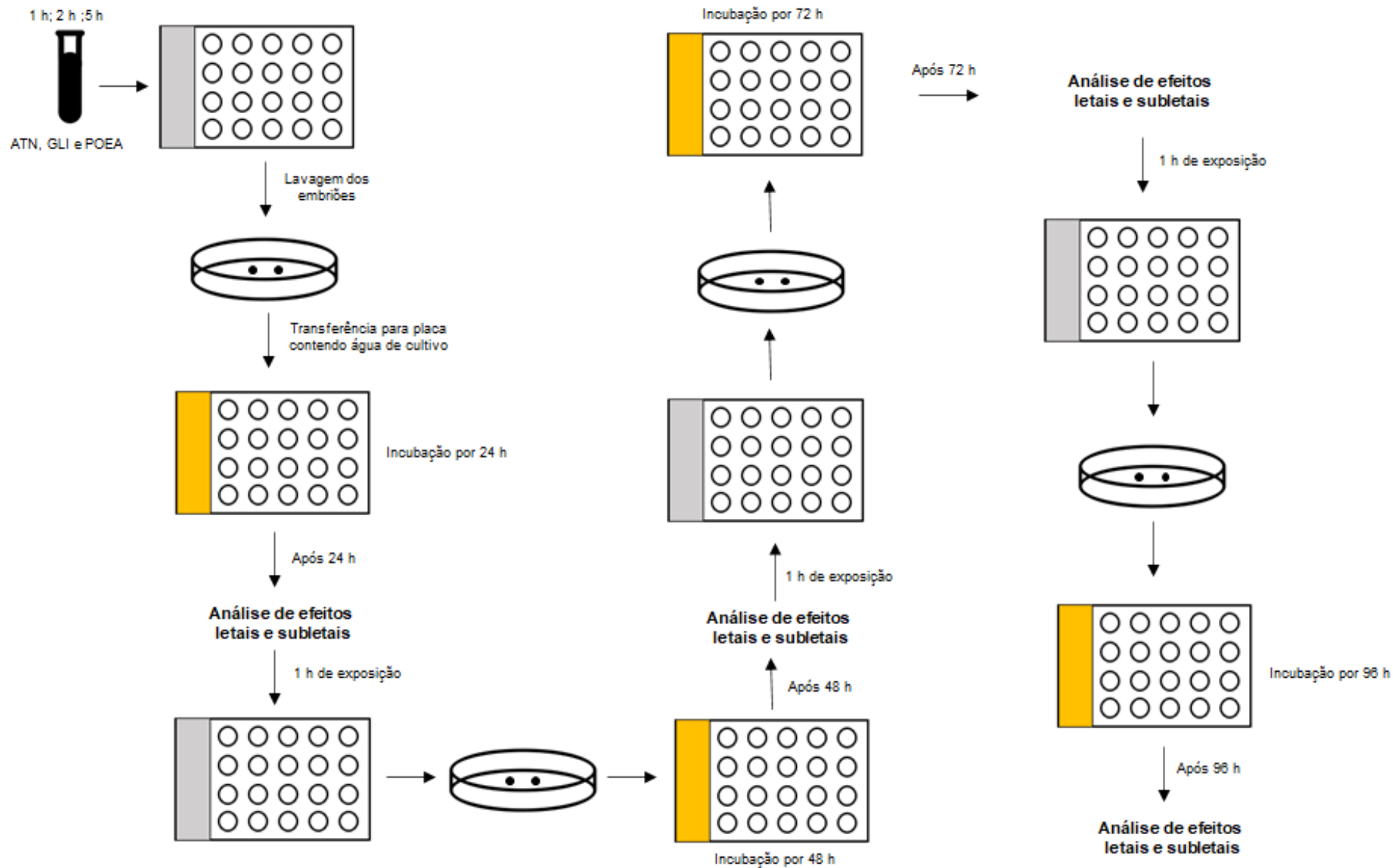
A distinção entre o desenvolvimento normal e anormal dos estágios embrio-larvais de zebrafish foi realizada tomando-se como referência as descrições de Kimmel e colaboradores (1995). A mortalidade foi identificada pela coagulação dos ovos, ausência de formação de somitos, ausência de desprendimento da cauda do saco vitelínico e ausência de batimentos cardíacos (OECD, 2013). Os parâmetros subletais foram avaliados de acordo com o desenvolvimento embrionário, como: pigmentação do corpo e olho, absorção do saco vitelínico, eclosão precoce ou tardia de larvas, comprometimento da inflação da bexiga natatória, formação do otólito, presença de edemas, acumulação de sangue e deformidades na cauda (NAGEL, 2002). Como critério de validação do teste, estabeleceu-se mortalidade inferior a 10% no controle negativo.

4.4 Teste de toxicidade aguda com estágios embrio-larvais de zebrafish após exposições repetidas

A avaliação da toxicidade aguda após exposição repetida (em pulsos) foi realizada de acordo com o *Guideline* OECD 236 (2013) e a metodologia descrita por Brent e Herricks

(1999) com adaptações. Vinte ovos fertilizados foram distribuídos individualmente em placas de cultura de 24 poços contendo 2,0 mL de GLI e ATN nas concentrações de 5,0; 10,0; 23,0; 50,0 e 100,0 mg/L e POEA nas concentrações de 0,4; 0,8; 1,6; 4,0; 8,0 e 16,0 mg/L. Para o controle negativo, utilizou-se água de manutenção fornecida pelo sistema de recirculação Rack Hydrus (Alesco). O teste foi realizado em triplicata com três experimentos independentes. As placas foram incubadas em câmara com fotoperíodo 12:12 horas (claro:escuro) a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e em condição semi-estática, ou seja, os embriões foram expostos ao GLI, ATN e POEA em pulsos de 1, 2 e 5 horas a cada 24 horas por um período de 4 dpf (ou 96 hpf) (FIGURA 3). O desenvolvimento dos embriões foi acompanhado por 24, 48, 72 e 96 hpf com auxílio de um esteromicroscópio (Bel Photonics STM PRO, Leica Microsystems).

FIGURA 3. Representação esquemática da exposição de embriões e larvas de zebrafish à ATN, GLI e POEA em pulsos de 1, 2 e 5 horas.



FONTE: A autora (2020).

Conforme indicado na FIGURA 3, no 1º dia, os embriões foram expostos ao GLI, ATN e POEA em diferentes concentrações por 1h e depois transferidos para placas de 24 poços sem as substâncias-teste, ou seja, apenas com água do sistema de manutenção e incubados em câmara com fotoperíodo 12:12 horas (claro:escuro) a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24h. Após esse período (24 hpf), os efeitos letais e subletais foram avaliados com auxílio de um esteromicroscópio (Bel Photonics STM PRO, Leica Microsystems) e novamente, os embriões foram expostos ao GLI, ATN e POEA por 1 h. Após a exposição, os embriões foram transferidos para placas sem as substâncias-teste e incubados em câmara por mais 24 h. Após esse período (48 hpf), foi realizada a avaliação dos efeitos letais e subletais induzidos pelo GLI, ATN e POEA e realizou-se, novamente, a exposição dos embriões e/ou larvas de zebrafish às substâncias-teste por 1h. Após esse período (72 hpf), foi realizada a avaliação dos efeitos tóxicos e, novamente, outra exposição de 1h ao GLI, ATN e POEA. Após 96 hpf, os efeitos letais e subletais foram avaliados. As mesmas etapas foram realizadas durante a exposição por 2 e 5 h por dia ao GLI, ATN e POEA, com avaliações a cada 24 h, durante 4 dias.

A distinção entre desenvolvimento normal e anormal dos estágios embrio-larvais de zebrafish foi realizada tomando-se como referência o Guideline OECD 236 (OECD, 2013) e as descrições de Kimmel e colaboradores (1995) e Nagel (2002). Como critério de validação do teste, estabeleceu-se mortalidade inferior a 10% no controle negativo.

4.5 Avaliação da capacidade de resiliência de larvas de zebrafish após exposições repetidas

Ao final da avaliação dos efeitos tóxicos induzidos pelo GLI, ATN e POEA após exposição em pulsos por 4 dias, avaliou-se a capacidade de resiliência das larvas sobreviventes. As larvas foram transferidas para placas de 24 poços contendo água de manutenção e foram incubadas por mais 3 dias em câmara com fotoperíodo 12:12 horas (claro:escuro) a $26 \pm 1^\circ\text{C}$. A recuperação das alterações provocadas pelo GLI, ATN e POEA foram avaliadas a cada 24 h, com auxílio de um esteromicroscópio (Bel Photonics STM PRO, Leica Microsystems) durante os 3 dias.

4.6 Ensaio cometa com larvas de zebrafish

Para a execução do ensaio cometa em condições alcalinas, utilizou-se as metodologias estabelecidas por Kosmehl et al. (2006) e Tice et al. (2000) com adaptações. Cerca de 10 a 20 larvas de zebrafish sobreviventes ao teste de toxicidade aguda após exposição única (FET) foram coletadas das placas contendo as substâncias-teste,

transferidas para tubos do tipo *ependorf* e eutanasiadas por hipotermia. O mesmo procedimento foi realizado para o controle negativo (água de manutenção). Para o controle positivo, larvas provenientes do controle interno da placa foram transferidas para tubos do tipo *ependorf* contendo água de manutenção e submetidas à radiação UV (320 nm) por 10 minutos (FELZENSZWALB et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019). Após exposição à luz UV, as larvas foram eutanasiadas por hipotermia.

As células foram isoladas utilizando solução de tripsina/EDTA a 0,25/0,03% (v/v) por 10 minutos à 37 °C. Após esse período, a solução foi neutralizada e os tubos foram submetidos à centrifugação a 212 g por 10 minutos. As células foram ressuspensas em tampão fosfato (pH 7,4) e separadas com auxílio de um separador de células (100 µm). À suspensão celular adicionou-se 80 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,7% m/v) à 37 °C sendo, em seguida, disposta em lâminas revestidas previamente com agarose normal (1% m/v). As lâminas foram cobertas com lamínulas e resfriadas para o endurecimento da agarose. Após a remoção das lamínulas, as lâminas foram incubadas em solução de lise (EDTA a 100 mM, 2,5 mM NaCl, 1% de dodecil sulfato de sódio, 1% Triton X-100 e 10% de dimetilsulfóxido; pH 13) a uma temperatura de 4° C por 1 hora e 30 minutos.

As lâminas foram transferidas para uma cuba eletroforética contendo tampão de eletroforese (NaOH a 12 g/L e EDTA a 0,37 g/L) à temperatura de 4 °C por 20 minutos, para ocorrer a desnaturação do DNA. Após esse período, iniciou-se a eletroforese a 0,8 V/cm e 310 mA por 20 minutos. As lâminas foram neutralizadas em tampão Tris-HCl (400 mM e pH 7,5) por 2 minutos e fixadas em álcool etílico PA por 5 minutos. Depois de secas, as lâminas foram coradas com solução de brometo de etídio (20 µg/mL; Sigma-Aldrich) e analisadas visualmente em microscópio de fluorescência (DMI 4000 B, Leica Microsystems). Para cada tratamento, duas lâminas foram preparadas em paralelo e os ensaios foram realizados em triplicata. Para a análise de dano ao DNA, foram contadas 50 células por lâmina, totalizando 100 células por tratamento. Os danos foram classificados em cinco categorias, considerando o tamanho da cauda do cometa (COLLINS; AI-GUO; DUTHIE, 1995; COLLINS et al., 2008; KUMARAVEL et al., 2009). O índice de dano foi calculado pela seguinte equação:

FIGURA 4. Equação para o cálculo do Índice de Dano (ID) ao DNA.

$$ID = [(n^{\circ} \text{ nucleoides classe } 0) \times 0] + [(n^{\circ} \text{ nucleoides classe } 1) \times 1] + [(n^{\circ} \text{ nucleoides classe } 2) \times 2] + [(n^{\circ} \text{ nucleoides classe } 3) \times 3] + [(n^{\circ} \text{ nucleoides classe } 4) \times 4]$$

FONTE: A autora (2020).

4.7 Análise estatística

As análises estatísticas dos dados obtidos através do FET (exposição única e em pulsos) e do ensaio do cometa com larvas de zebrafish foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Dunnett. Os valores obtidos foram comparados com seus respectivos controles negativos e a diferença estatística foi considerada significativa quando $p < 0,05$. Em relação ao FET, a mortalidade foi expressa como concentração letal média (CL₅₀) e os efeitos subletais como concentração média de efeito (CE₅₀). Os valores foram determinados utilizando o software GraphPad Prism 5.0® (San Diego, CA, USA) admitindo-se um intervalo de confiança de 95%.

Para os dados obtidos na avaliação da capacidade de resiliência de larvas de zebrafish após exposição repetida em pulsos, a análise estatística foi realizada por meio do teste T de Student e teste de Tukey utilizando o software supracitado. A diferença estatística foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

PARTE II:

**ARTIGO – IMPACT OF THE GLYPHOSATE-BASED COMMERCIAL
HERBICIDE, ITS COMPONENTS AND ITS METABOLITE AMPA ON NON-
TARGET AQUATIC ORGANISMS**

5. Artigo publicado na revista *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* (ISSN: 1383-5718; fator de impacto: 2.256; doi: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.05.002>)

**IMPACT OF THE GLYPHOSATE-BASED COMMERCIAL HERBICIDE, ITS
COMPONENTS AND ITS METABOLITE AMPA ON NON-TARGET AQUATIC
ORGANISMS**

Laís de Brito Rodrigues¹, Gessyca Gonçalves Costa¹, Emanoela Lundgren Thá², Lucas Rafael da Silva², Rhaul de Oliveira³, Daniela Morais Leme^{2,5}, Marta Margarete Cestari², Cesar Koppe Grisolia⁴, Marize Campos Valadares¹, Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira^{1,5*}.

¹Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brazil.

²Department of Genetics – Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil

³Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil;
School of Technology, State University of Campinas, UNICAMP, Limeira, SP, Brazil.

⁴Biological Sciences Institute – University of Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brazil.

⁵National Institute for Alternative Technologies of Detection, Toxicological Evaluation and Removal of Micropollutants and Radioactives (INCT-DATREM), UNESP, Institute of Chemistry, P.O. Box 355, 14800-900 Araraquara, SP, Brazil.

*Corresponding author: Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira

Email: gaugusto@ufg.br or gisele23.rodrigues@hotmail.com

Address for correspondence: Rua 240, s/n, Setor Leste Universitário, 74605-170, Goiânia/Goiás, Brazil. Tel.: +55 62 3209 6450; Fax: +55 62 3209 6037

HIGHLIGHTS

GLY and AMPA induced no acute toxicity to zebrafish early-life stages.

ATN and POEA caused significant lethal effects to zebrafish.

GLY, POEA, ATN and AMPA were genotoxic for zebrafish larvae.

POEA induced DNA damages into RTG-2 cells.

ABSTRACT

Glyphosate (GLY) is the active ingredient of several herbicide formulations widely used to control weeds in agricultural and non-agricultural areas. Due to the intensive use of GLY-based herbicides and their direct application on soils, some of their components, including the active ingredient, may reach the aquatic environment through direct run-off and leaching. The present study assessed the acute toxicity and genotoxicity of the GLY-based formulation Atanor 48 (ATN) and its major constituents GLY, surfactant polyethoxylated tallow amine (POEA), as well as the main metabolite of GLY aminomethylphosphonic acid (AMPA) on non-target aquatic organisms. The toxic effects of these chemicals were evaluated in the fish embryo acute toxicity test with zebrafish (*Danio rerio*), while genotoxic effects were investigated in the comet assays with cells from zebrafish larvae and rainbow trout gonad-2 (RTG-2). GLY and AMPA caused no acute toxic effect, while ATN and POEA induced significant lethal effects in zebrafish (LC_{50-96h} 76.50 mg/L and 5.49 mg/L, respectively). All compounds were genotoxic in comet experiments with zebrafish larvae (LOEC 1.7 mg/L for GLY, ATN, AMPA and 0.4 mg/L for POEA). Unlike *in vivo*, only POEA induced DNA damage in RTG-2 cells (LOEC 1.6 mg/L), suggesting that it is a direct acting genotoxic agent. In summary, these data indicate that the lethal effects on zebrafish early-life stages can be ranked in the following order from most to least toxic: surfactant POEA > formulation ATN > active ingredient GLY ≈ metabolite AMPA. Genotoxic effects were observed in both RTG-2 cells (only POEA) and zebrafish (all test compounds) with the lowest tested concentrations. Therefore, it is important to evaluate different toxicological endpoints as well as use different non-target organisms to predict the hazards of GLY-based formulations and their components and breakdown product to aquatic biota.

Keywords: surfactant, AMPA, FET, Comet assay; zebrafish, RTG-2 cells.

1. INTRODUCTION

Since 2008, Brazil occupies the first position in the world ranking of countries that consumes pesticides [1,2]. These compounds have significant economic, environmental, and public health impacts [3]. The widespread use of pesticides in Brazil is related to the high agricultural productivity, making this country one of the world's largest food producers [1]. In addition, Brazil is the world's third largest agricultural exporter, behind the United States of America and European Union [4]. The high agricultural productivity of Brazil supported by pesticide use has been associated with a variety of human health problems and environmental impacts [5].

Glyphosate [N-(phosphonomethyl) glycine; GLY] is currently among the most widely used herbicides worldwide [2,5,6]. GLY is the active ingredient of several commercial formulations used to control weeds in agricultural and non-agricultural areas (*e.g.*, domestic use) [7-9]. The broad-spectrum herbicidal activity of GLY in combination with the use of genetically modified crops has exponentially enhanced the use of GLY-based formulations [6,10-13]. In agricultural fields, GLY is sprayed on plant foliage, but it can reach water resources, mainly through soil run-off or leaching processes, leading to exposure of non-target aquatic organisms [14-18]. In water bodies, GLY-based herbicide measured as GLY acid equivalent has been detected from 0.01 to 0.7 mg/L, reaching the worst-case for surface waters of 1.7 mg/L [4, 15-17].

GLY has no or low toxicity to non-target organisms, because the shikimic acid pathway is not verified in animals [6,19-21]. However, GLY-based formulations have been associated with toxic effects in animals, which have been attributed to the presence of surfactants such as polyethoxylated tallow amine (POEA) [5,6,13,16,22-24]. GLY is never used alone in agriculture because may not penetrate or concentrate enough in plants to exert herbicidal activity. It has been suggested the addition of POEA could facilitate the penetration of GLY through animal cell membranes, as it does for plant cell [5,13]. Consequently, there is evidence that the bioconcentration factor of GLY is increased with the presence of POEA on aquatic environments [25,26].

In addition, GLY has also been detected together with its major breakdown product aminomethylphosphonic acid (AMPA) in plants, soil, and water [13,27,28]. According to Food and Agriculture Organization (FAO), AMPA is of potential toxicological concern, mainly due to its accumulation in the food chain [28].

Faced with the above, this study was realized to assess the acute toxicity and genotoxicity of the GLY-based formulation ATN and its major constituents, namely active ingredient GLY, surfactant POEA, as well as the main metabolite of GLY AMPA on zebrafish

(*Danio rerio*) early life-stage and rainbow trout gonad-2 cell fish line (RTG-2). Fish are also currently used in the assessment of chemical toxicity in aquatic environments, since they are the most diverse group of vertebrates found in this ecosystem [30]. Zebrafish early life-stage test has been recommended as an alternative for acute toxicity tests with juvenile/adult fish. This model identifies a series of morphological and behavioral endpoints which are used to predict the mode-of-action of chemicals [31-33]. Similarly, fish cell line RTG-2 derived from gonads of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) has been successfully introduced for detection of genotoxic effects as an alternative to *in vivo* fish bioassays [33-36].

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Test chemicals

Technical-grade glyphosate (GLY; Glyphosate PESTANAL[®]; purity 99%, CAS No. 1071-83-6) and aminomethylphosphonic acid (AMPA, purity 99%, CAS No. 106651-9) were purchased from Sigma-Aldrich. GLY-based formulation Atanor 48 (ATN), composed of isopropylamine salt of glyphosate at 48% (w/v) as active ingredient (or 480 g a.i./L of formulation) and 36% (w/v) of glyphosate equivalent (or 360 g a.e./L of formulation), was obtained on agricultural supplies retailer. In this study, ATN exposure is expressed as glyphosate acid equivalents (a.e.). The identity of the co-formulants declared as inert ingredients is, in general, maintained as confidential by manufacturers. Polyethoxylated tallow amine (POEA; CAS No. 61791-26-2; purity 64%) was purchased from Crescent Chemical Company.

2.2. Zebrafish maintenance and egg production

Adult male and female zebrafish (*D. rerio*) were provided by the zebrafish facility (ZebTec Tecniplast) at the Institute of Biology, University of Brasília and kept in separate tanks (ethical approval UFG N^o 102/2014). Fish were maintained in a Rack Hydrus (Alesco) recirculating system using water filtered by reverse osmosis, where water passes through several levels of filtration (activated carbon filters and biological filters), is then disinfected by ultraviolet (UV) light and automatically adjusted for pH and conductivity. The temperature was maintained at $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, conductivity at $750 \pm 50 \mu\text{S}$, pH at 7.5 ± 0.5 and dissolved oxygen of 8 ppm. Nitrate, nitrite and ammonia were regularly monitored. This water was used in preparing the test solutions of all assays performed. Adult organisms were fed with commercial dry flake food (TetraColor Flakes[®]) and live brine shrimp. On the day of the test, zebrafish eggs were collected about 30 min after natural mating, rinsed in water and

examined under a stereomicroscope (Bel Photonics STM PRO). Unfertilized or damaged eggs were discarded. The fertilization success was checked, and only batches of eggs with a minimum fertilization rate of 90% were used.

2.3. Fish embryo acute toxicity (FET) test

The zebrafish embryo-larval toxicity test was carried out according to OECD Test Guideline 236 [29]. Twenty fertilized eggs per concentration were randomly selected and carefully distributed in a 24-well plate, filled with 2 mL of GLY, ATN, AMPA at 1.7, 5, 10, 23, 50 and 100 mg/L and, POEA at 0.4, 0.8, 1.6, 4, 8 and 16 mg/L and controls (negative control – NC: maintenance water and positive control – PC: 3,4-dichloroaniline at 4.5 mg/L). Tests were performed in triplicates (three independent experiments) in a climate chamber at $26\pm 1^\circ\text{C}$ and 12 h light under static conditions. Neither food nor aeration was provided during the bioassays. Embryo development was assessed at 24, 48, 72 and 96 hours post-fertilization (hpf), using a stereomicroscope (Bel Photonics STM PRO) with 3x magnification. The distinction between the normal and abnormal development of embryos was established according to the zebrafish development descriptions reported by Kimmel et al. [37]. Lethal (egg coagulation, no somite formation, non-detachment of the tail from yolk sac and no heart beating) and sublethal (effects on the eye and body pigmentation, absorption of the yolk sac, hatching rate, swimming bladder inflation, otolith, presence of edemas and blood accumulation, tail deformities) parameters were observed and reported.

2.4. Alkaline Comet assay with zebrafish larvae

The Comet assay was performed based on Kosmehl et al. [30]. and adapted from Tice et al. [38]. Surviving zebrafish larvae (10 – 20 larvae per concentration) from the GLY, POEA, ATN and AMPA exposure and control groups (NC: maintenance water and PC: UV light for 10 min) were pooled and euthanized in ice water. The larvae exposure to UV light was conducted at 320 nm for 10 min in maintenance water [33]. Their nuclei were isolated using trypsin/EDTA at 0.25/0.03% (v/v) for 10 min at 37°C . Then a trypsin neutralizer was added and centrifuged at 212 g for 10 min. The cells were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and filtered using a cell separator (100 μm). The cell suspension was embedded in 80 μL of low-melting agarose 0.7% (w/v) at 37°C and spread out on slides precoated with 1% (w/v) normal melting agarose. Slides were covered with coverslips and cooled on ice for 10 min. The coverslips were removed, and the slides were incubated in the dark in lysing solution (100 mM EDTA, 2.5 mM NaCl, 1% sodium dodecyl sulfate, 1% Triton X-100, and 10% dimethyl sulfoxide: pH 13) at 4°C for 1.5 h. For DNA

unwinding, the slides were transferred to a horizontal electrophoresis tank filled with electrophoresis buffer (12 g/L NaOH and 0.37 g/L EDTA) at 4°C for 20 min. Electrophoresis was carried out in the same buffer at 4°C (0.8 V/cm and 310 mA) for 20 min. The slides were then neutralized with 400 mM Tris-HCl buffer at pH 7.5 for 2 min, and fixed with 100% ethanol for 5 min. They were then stained with ethidium bromide solution (20 µg/mL; Sigma-Aldrich), and examined under a fluorescence microscope (DMI 4000 B, Leica Microsystems, Bannockburn, USA). Determination of damage was carried out by visual scoring and classification into five categories based on tail intensity and length, from 0 (no tail) to 4 (almost all DNA in tail) [39-41]. The total score expressed as genetic damage index (DI) was calculated by the equation: $DI = [(n^{\circ} \text{ nucleoid class } 0) \times 0] + [(n^{\circ} \text{ nucleoid class } 1) \times 1] + [(n^{\circ} \text{ nucleoid class } 2) \times 2] + [(n^{\circ} \text{ nucleoid class } 3) \times 3] + [(n^{\circ} \text{ nucleoid class } 4) \times 4]$, on 100 randomly selected cells from duplicate slides [42]. The experiments were performed in triplicate and the length of DNA migration measured in 100 randomly selected nucleoids (50 per slide).

2.5. *In vitro* alkaline Comet assay with the rainbow trout gonad-2 cell line (RTG-2)

RTG-2 cells (5×10^4 cells/well, 24-well plate) [European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) 90102529], cultured at 22°C in L-15 (Leibovitz-15) medium with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine and 1% antibiotic (Penicillin-Streptomycin) (all from Gibco®), were exposure to GLY, ATN and AMPA (10, 23, 50 mg/L), and POEA (1.6, 4, 8 mg/L) for 3 h. Untreated cells (*i.e.*, cells cultured at L-15 medium) was used as NC, while cells treated with 0.5 mM methyl methanesulfonate (MMS, CAS No. 66-27-3, Sigma-Aldrich) was used as PC. After 3 h of exposure, the RTG-2 cells which presented cell viability $\geq 80\%$ (Trypan Blue Dye Exclusion Test) were harvested and processed for the alkaline Comet assay (pH>13) as described by Felzenszwalb et al. [33] and Oliveira et al. [36] DNA lesions were quantified as tail intensities using a computer-based image analyzer (Metafer CometScan v.2.8.0®, Metasystems, Germany) on 100 randomly selected nucleoids per treatment. The *in vitro* Comet data represent three independent experiments (*i.e.*, three biological replications) with single well per treatment.

2.6. Statistical analysis

The FET and Comet data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. Each experimental value was compared to its corresponding negative control and the statistical difference was considered significant when $p < 0.05$. With respect to the FET, the toxicity was expressed as the lethal

concentration (LC_{50}), which was calculated using GraphPad Prism software (version 5.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) with 95% confidence interval.

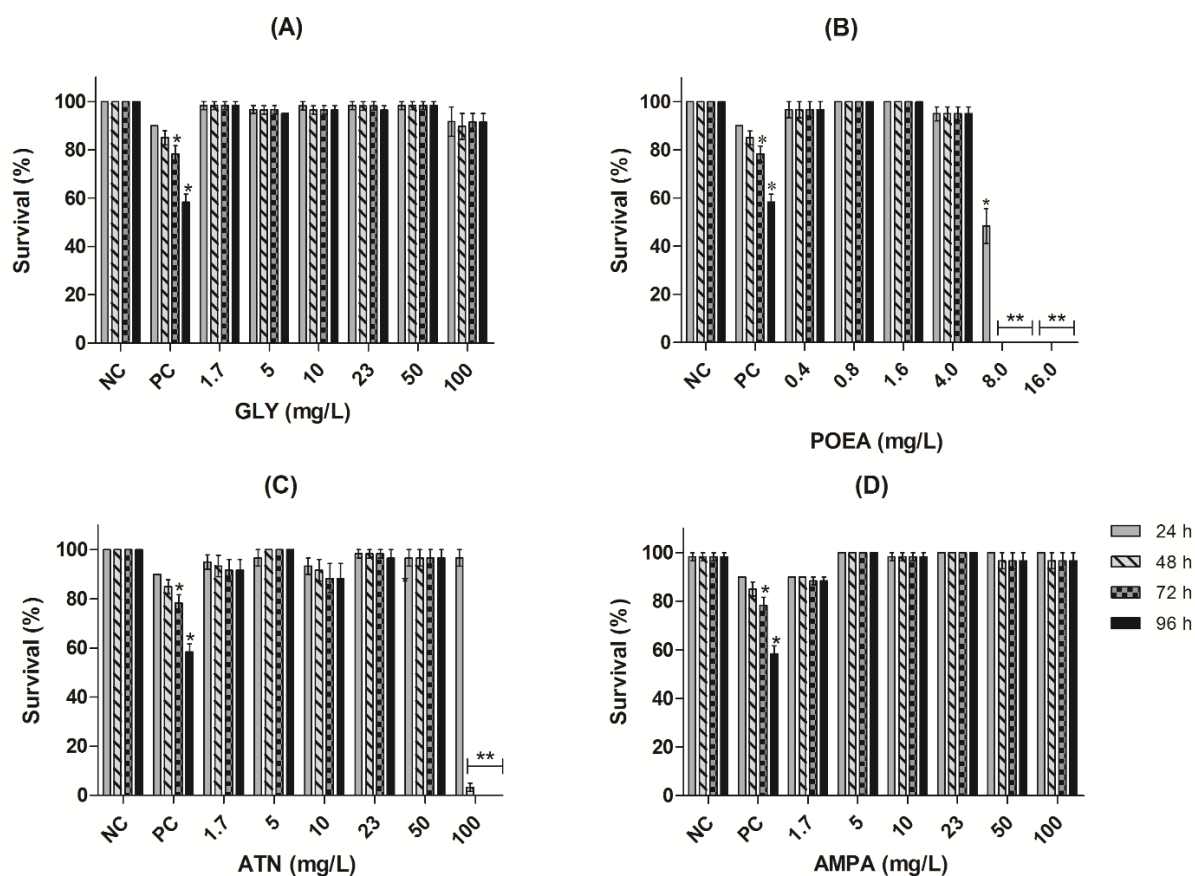
3. RESULTS

3.1. Acute effects for zebrafish early-life stages

The present study investigated the effects of the GLY-based formulation ATN, active ingredient GLY and its metabolite AMPA, as well as of the surfactant POEA, on the zebrafish embryonic development (survival and malformations) at 24, 48, 72 and 96 h of exposure.

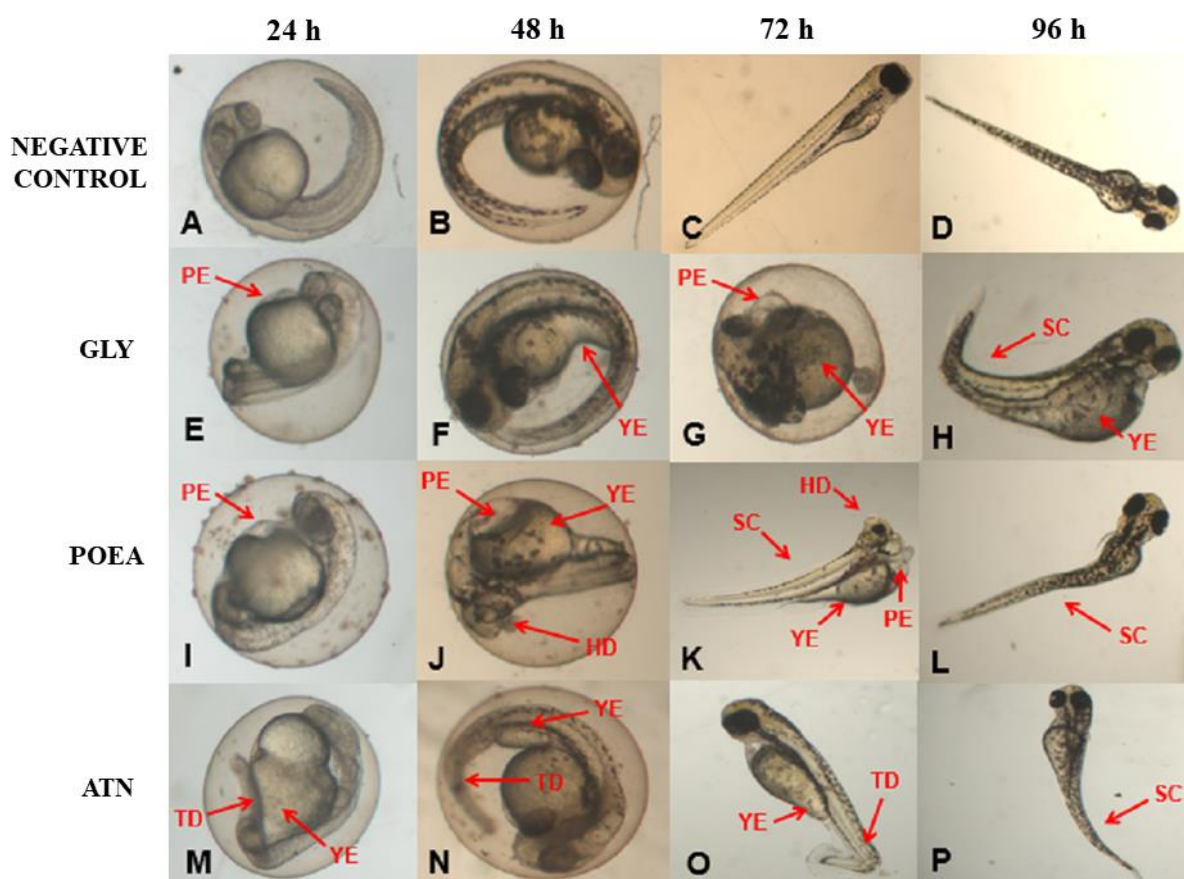
According to Figure 1, no significant mortality was observed in zebrafish early-life stage after exposure to different concentrations (1.7 – 100 mg/L) of GLY (Figure 1A) and AMPA (Figure 1D), which presented survival rate $\geq 90\%$ in all exposure periods. In contrast, POEA (Figure 1B) and ATN (Figure 1C) induced significant lethal effects to zebrafish with LC_{50-96h} of 5.49 mg/L and 76.50 mg/L, respectively. POEA was the most toxic compound, exhibiting concentration- and time- dependent toxicity. In addition, all embryos exposed to 16 mg/L of POEA were coagulated in the first 24 h of exposure ($p < 0.001$). ATN was more toxic than active ingredient GLY, inducing significant mortality at the highest tested concentration (100 mg/L; $p < 0.001$) from 48 h of exposure.

Figure 1. Survival rate of zebrafish at different developmental stages exposed to GLY (A), POEA (B), ATN (C) and AMPA (D) for 24, 48, 72 and 96 h. Twenty fertilized eggs per experimental group were evaluated. Bars represent the mean \pm standard error of the mean of three independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.0001$ statistically different from the respective negative control (NC) based on one-way ANOVA and Dunnett's post hoc test. PC = positive control (3,4-dichloroaniline at 4.5 mg/L after 24, 48, 72 and 96 h of exposure).



In relation to sublethal effects, Figure 2 shows that GLY (E-H), POEA (I-L) and ATN (M-P) induced some morphological abnormalities, including: pericardial and yolk sac edemas, spinal curvature, head and tail deformities in different exposure times; however, these malformations were not statistically significant when compared to their respective negative control.

Figure 2. Zebrafish embryos and larvae abnormalities after GLY, POEA and ATN exposures: pericardial edema (PE), yolk sac edema (YE), spinal curvature (SC), head deformity (HD), tail deformity (TD). Embryos control after 24 h and 48 h of exposure, respectively (A - B); larvae control after 72 h and 96 h of exposure, respectively (C – D), embryos exposed to GLY at 23 mg/L and 100 mg/L for 24 h and 48 h, respectively (E-F); non-hatching embryo exposed to GLY at 10 mg/L for 72 h (G); larvae exposed to GLY at 100 mg/L for 96 h (H); embryos exposed to POEA at 8 mg/L and 4 mg/L for 24 h and 48 h, respectively (I-J); larvae exposed to POEA at 0.4 mg/L and 4 mg/L of POEA for 72 h and 96 h, respectively (K-L); embryos exposed to ATN at 100 mg/L and 50 mg/L for 24 h and 48 h, respectively (M-N); larvae exposed to ATN at 50 mg/L for 72 h and 96 h, respectively (O-P).



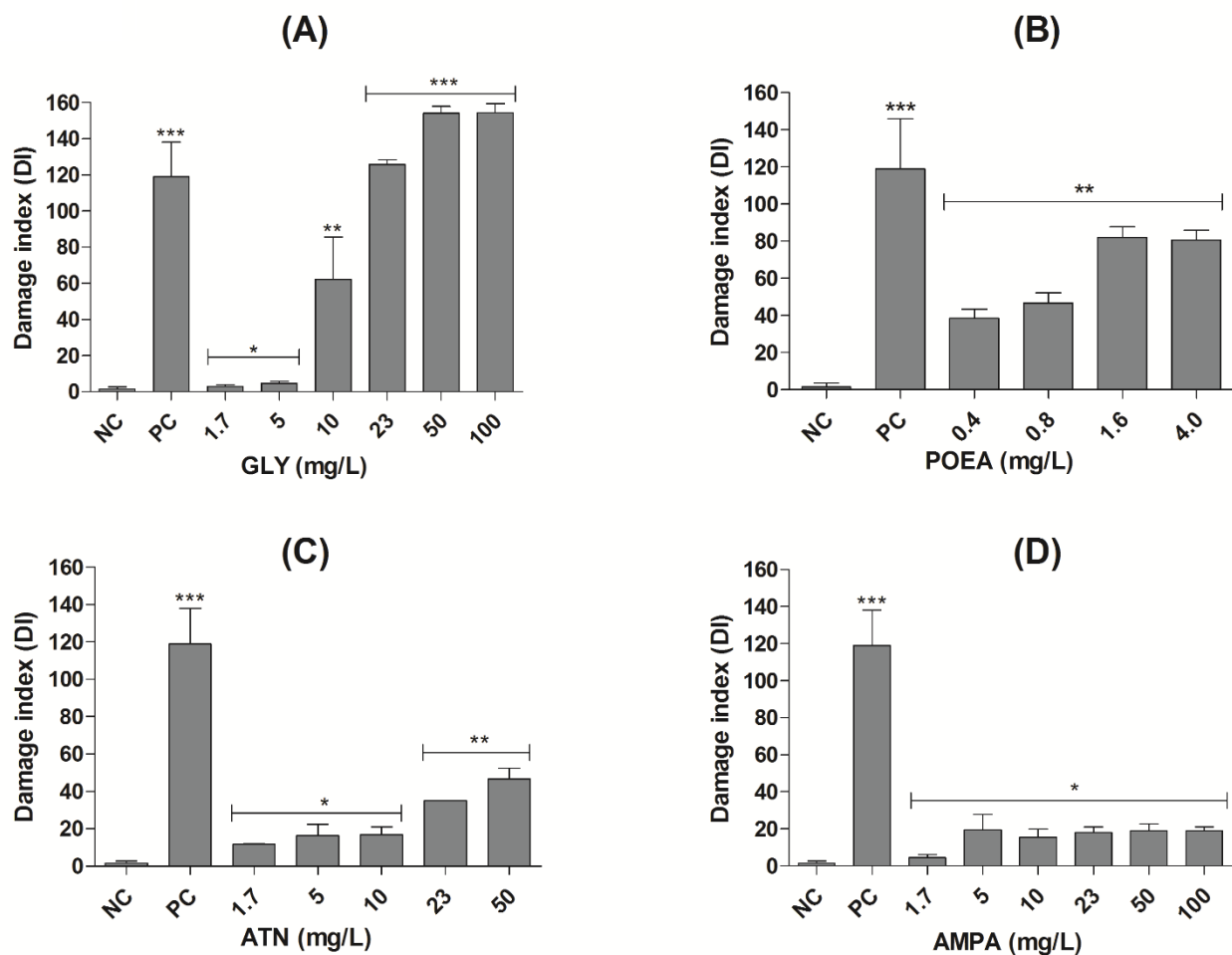
3.2. Genotoxicity test

The DNA damages were estimated using two fish test systems – zebrafish early-life stages and RTG-2 cell line (gonadal cell line) – in order to verify potential species- or organ-specific responses.

Figure 3 shows the levels of DNA strand breaks measured by DNA damage index (DI) in single cells derived from zebrafish larvae after 96 h of exposure to GLY, POEA, ATN, AMPA and controls. Our findings demonstrated that all tested compounds induced genotoxic effects from the lowest tested concentrations with LOEC of 1.7 mg/L for GLY, ATN, AMPA and 0.4 mg/L for POEA. GLY (Figure 3A) induced the highest levels of DNA damage ($p < 0.0001$) followed by POEA (Figure 3B; $p < 0.001$), ATN (Figure 3 C; $p < 0.001$) and AMPA (Figure 3D; $p < 0.05$).

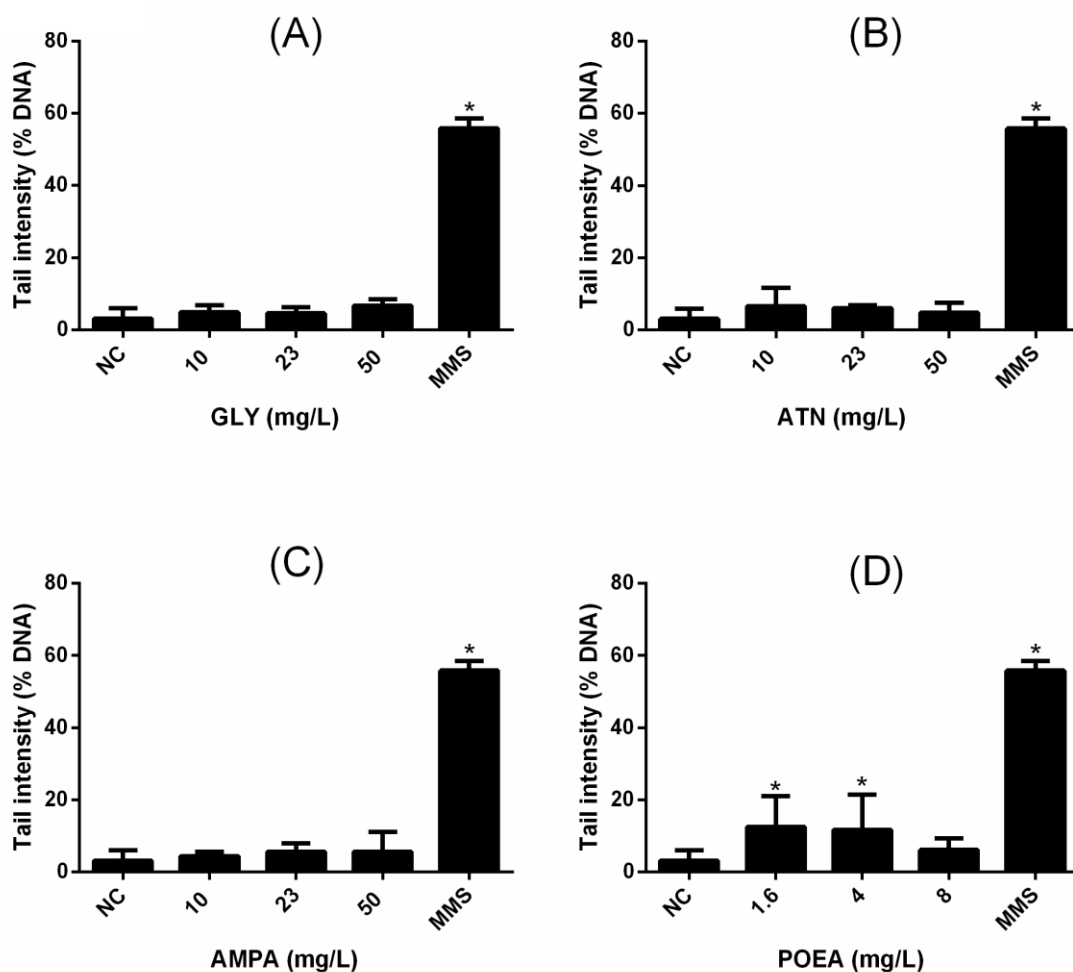
Figure 3. Damage index (DI) of DNA evaluated by the Comet assay in zebrafish larvae cells after 96 h of exposure to GLY (A), POEA (B), ATN (C) and AMPA (D) using 10 – 20 surviving larvae per concentration. Bars represent the mean \pm standard error of the mean of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ and *** $p < 0.0001$ statistically different

from the respective negative control (NC). PC = positive control (UV light for 10 min at 320 nm).



Unlike *in vivo* assay with cells from zebrafish larvae, wherein the results pointed out genotoxicity for all tested compounds, Figure 4 shows that only POEA induced DNA damage in RTG-2 cells in a concentration-dependent manner (inverse effect; $p < 0.05$) (Figure 4D) with LOEC of 1.6 mg/L, suggesting that it is a direct acting genotoxic agent.

Figure 4. Genotoxicity evaluation of the GLY (A), ATN (B), AMPA (C) and POEA (D), using the Comet assay with the rainbow trout gonad-2 cell line (RTG-2) after 3 h of exposure. Hundred nucleoids per experimental group were evaluated. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD) of % DNA in tail (Tail Intensity) of three independent experiments. NC: negative control; MMS: Methyl methanesulfonate at 0.5 mM after 3 h of exposure as positive control. * $p < 0.05$ statistically different from the respective negative control (NC) based on one-way ANOVA and Dunnett's post hoc test.



4. DISCUSSION

As previously mentioned, the direct application of GLY-based formulations on the soil can result in aquatic contamination by their constituents (active ingredient GLY and surfactant POEA) and GLY metabolite AMPA through direct run-off, mainly during heavy rains, and leaching [14,24,43].

GLY is usually detected in the aquatic environment with its major metabolite AMPA [13,27,28]. There is a lack of knowledge for concentration levels of AMPA in waters bodies, as well as for the toxic potential of this compound to aquatic biota [27,28]. However, it is known that AMPA has higher persistence and mobility in soils compared to GLY [6,40], and thus its ecological risk is of note [28].

Our current results showed that GLY and AMPA did not induce acute toxicity in zebrafish early-life stage with $LC_{50-96h} > 100$ mg/L. Similar effect was observed by Fiorino et al. [44]. in assessing the acute effects of GLY (0.005; 0.05; 5; 10 and 50 mg/L) on early-life stages of zebrafish and common carp (*Cyprinus carpio*) for 120 h. The authors demonstrated that all tested concentrations, except the highest concentration (50 mg/L),

induced cumulative mortality $\leq 10\%$ after 96 h of exposure. GLY at 50 mg/L caused the highest cumulative mortality, reaching 17.5% after 120 h of exposure [43] while in our study, there were no significant differences between this group (GLY at 50 mg/L) and control with 1.7% of larvae mortality after 96 of exposure. It is worth noting that according to OECD 236 [29], the survival of embryos in the NC must be $\geq 90\%$ (validation criterion of the test), and therefore mortality $\leq 10\%$ in the experimental groups is acceptable. In addition, several studies suggest that the levels of GLY residues in water (ranging from 0.01 mg a.e./L to 1.7 mg a.e./L) [15-17] are not capable of causing toxicity in aquatic species, but the toxicity can be highly species dependent [6]. Fiorino et al. [44] demonstrated that GLY from 5 mg/L in 96 h induced significant cumulative mortality in common carp (*C. carpio*). Therefore, there still is a need in improving the knowledge about the impacts of GLY on aquatic environment [28].

The adoption of genetically modified crops increased substantially the use of GLY-based formulation due to the acquired resistance that requires several re-applications of this herbicide [10,45]. There is a discrepancy when the toxicity of the active ingredient GLY is compared with the toxicity of the GLY-based commercial formulations [6]. GLY-based formulation components are found in water because the active ingredient GLY is never used without its adjuvants, which allow and enhance its herbicidal activity, facilitating penetration of the active principle GLY into the plant cuticle [20,46]. Although there is a variety of adjuvants, the most used surfactant in GLY-based herbicide formulations is the polyethoxylated tallow amine (POEA) [6]. It has been found in superficial and ground water collected from agricultural areas and its half-life (21 – 42 days) in aquatic environment is even longer than GLY (7-14 days) [20].

POEA toxicity has traditionally been assessed by comparing with active ingredient GLY or by evaluating POEA at nominal concentrations due to difficulties in determining the environmentally relevant concentrations of this surfactant [25]. Perkins et al. [47] evaluated the effects of the GLY-based formulations Rodeo[®] (GLY active ingredient formulated without a surfactant) and Roundup[®] (a reference formulation with GLY formulated with a surfactant) on the embryonic development of *Xenopus laevis* using Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX). They observed that Rodeo[®] was the least toxic, with a LC₅₀ of 5,407 mg a.e./L, while Roundup[®] showed LC₅₀ of 9.4 mg a.e./L. The authors also revealed that POEA, surfactant of the Roundup[®], showed LC₅₀ of 2.7 mg/L. Several authors have suggested that the toxicity of commercial formulations may be derived from synergistic effects between GLY and other formulation products, such as the surfactant POEA [48].

In our study, we compared the potential toxicity of ATN (GLY-based formulation equivalent to Roundup), POEA and GLY alone on the embryonic development of zebrafish. Some of our results are in agreement with Perkins et al. [47], showing that POEA is the most toxic constituent of GLY-based formulation (LC₅₀-96h of 5.49 mg/L) followed by the ATN formulation (LC₅₀-96h of 76.50 mg/L), GLY alone and its metabolite AMPA (LC₅₀-96h > 100 mg/L), for which the acute toxicity was not observed. Other data from our group showed that both Roundup® and GLY AKB 480 (formulation equivalent to Roundup®) were toxic to the embryonic stages of zebrafish; however, AKB (LC₅₀-96h of 27.13 mg/L) and ATN (investigated in this study) were less toxic than Roundup® (LC₅₀-96h of 10.17 mg/L) [16].

Concerning the alterations in zebrafish morphology, we observed that the embryos and larvae exposed to GLY (from 10 mg/L to 100 mg/L), POEA (from 0.4 mg/L to 8 mg/L) and ATN (50 mg/L and 100 mg/L) caused some malformations or delayed development which were not relevant (no significant statistical differences; $p > 0.05$).

In this work, we also evaluated the potential of GLY, POEA, ATN and AMPA in inducing primary DNA lesions on fish, using comet assay with zebrafish larvae and RTG-2 cells. All tested compounds were genotoxic for zebrafish larvae with GLY inducing the highest level of DNA damage from the environmentally relevant concentration (1.7 mg/L; $p < 0.05$) [15-17]. It is also important to note that the DNA damage induced by POEA occurred at concentrations lower than those of the other tested compounds. Studies have pointed out that POEA is more toxic than the active ingredient GLY and the formulated products [49].

Similar to our results, Navarro et al. [49] demonstrated that POEA at 0.15, 0.75 and 1.5 mg/L induced DNA damage in blood cells of *Prochilodus lineatus* with scores of DNA damage significantly higher ($p < 0.001$) than control. The genotoxicity of GLY and Roundup Transorb®, a GLY-based formulated, was also reported by Moreno et al. [50] to gill cells and erythrocytes of the fish *P. lineatus*.

Zebrafish (*D. rerio*) has been recommended as a model species of fish toxicity testing, and the use of this organism is increased due to the requirements of replacing/reducing non-mammalian vertebrates in ecotoxicology [51-53]. Zebrafish larvae and adult stages are also used for estimating the genotoxic potential of aquatic contaminants [16,53-55]. However, fish is the most diverse group of vertebrates in aquatic environments and accounts for around 20,000 fish species occupying the aquatic niches [56]. Thus, there is a concern on the reliability of using zebrafish to estimate the hazard of aquatic contaminants to fish in general, due to species differences that can influence the responses to toxicants [57].

In addition, chemicals can trigger different toxic effects depend on the target organ, due to tissue-specific characteristics, such as biochemical and physiological features and

xenobiotic metabolic capacity, which can lead to organ-specific genotoxicity [58,59]. To draw a more detail picture of the impact of glyphosate-based formulations and their constituents and breakdown product on aquatic biota, we also investigated the genotoxic potential of GLY, ATN, AMPA e POEA on the permanent fish cell line RTG-2 and observed that only POEA induced DNA damage in this model.

RTG-2 cell line is derived from gonads of the teleost fish rainbow trout (*O. mykiss*), and representing a valid model for genotoxic studies, estimating the impacts of chemicals on the reproductive system of fish [33,36,60-64]. GLY and GLY-based herbicide formulations have also the potential of inducing DNA damages on a variety of fish species as reported by studies conducted with whole organisms instead of single cells in culture [17,57,65]. The uncorrelated genotoxic results between our *in vivo* (whole larvae) and *in vitro* systems can be related to particular physiological features and complexities of these systems, as well as species differences.

Rodrigues et al. [16] correlated the lack of xenobiotic metabolic capability of zebrafish embryos to their low sensitivity of detecting the genotoxicity of the GLY-based herbicides Roundup® and AKB. The capacity of RTG-2 cells in expressing xenobiotic metabolic enzymes has been already demonstrated; however, this cell line presented slow capacity of metabolize benzo(a)pyrene compared to the liver fish cell line PHLC-1, requiring more than 24 h to complete metabolize this pro-mutagen [66]. In our study, zebrafish larvae were exposed to the tested compounds by 96 h whereas RTG-2 cells were exposed by 3 h, which allows the detection of direct genotoxicants.

Therefore, our findings pointed out that POEA may act as a direct genotoxicant while GLY, ATN and AMPA might require metabolic activation to damage DNA. Furthermore, the slow xenobiotic metabolic capacity of gonadal cells can be a “protective” feature against pro-genotoxicants, which lead the reproductive system a non-target organ in exposures to GLY active ingredient and its metabolite AMPA and GLY-based herbicides.

5. CONCLUSIONS

In conclusion, these data indicate that the acute effects on zebrafish early-life stages can be ranked in the following order from most to least toxic: surfactant POEA > formulation ATN > active ingredient GLY ≈ metabolite AMPA. Genotoxic effects were observed in both RTG-2 cells (only POEA) and zebrafish (all compounds) with the lowest tested concentrations. It is significant to emphasize that GLY induced DNA damages at an environmentally relevant concentration for zebrafish larvae. Taken together, the present findings confirm that it is important to evaluate different toxicological endpoints as well as

use different non-target organisms to predict the hazard of GLY-based formulations and their components and breakdown product to aquatic biota.

Acknowledgment

The authors are grateful to the Goiás Research Foundation (FAPEG), Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES), Araucária Foundation, and to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq: INCT/DATREM - Process No. 465571/2014-0), for their scholarships and financial support. The authors would like also to thank the Biological Sciences Institute - University of Brasília; the Multi-User Confocal Microscopy Center of the Federal University of Paraná; and the Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás for their help in carrying out this research.

Conflict of interest

The authors declare there are no conflicting interests.

6. References

- [1] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Principais realizações, http://portal.anvisa.gov.br/documents/281258/308532/Relatorio_5_anos_DEFINITIVO.pdf/857a85f9-ab6e-4358-b67c-1f0b81bee7d1, 2010 (accessed 5 March 2018).
- [2] C.A. Harayashiki, A.S. Varela, A.A. Machado, L.C. Cabrera, E.G. Primel, A. Bianchini, C.D. Corcini, Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water, *Aquat. Toxicol.* 142-143 (2013) 176-184. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.08.006.
- [3] M.E.A. Elhalwagy, N.I. Zaki, Comparative study on pesticide mixture of organophosphorus and pyrethroid in commercial formulation, *Environ. Toxicol. Phar.* 28 (2009) 219-224. doi: 10.1016/j.etap.2009.04.007.
- [4] IBAMA - Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis. Pesticides and related products commercialized in Brazil in 2009, http://www.ibama.gov.br/phocadownload/qualidadeambiental/relatorios/pesticidas_commercialized_in_brazil_2009.pdf, 2010 (accessed 5 March 2018).
- [5] V.L.L.O. Cavalli, D. Cattani, C.E.H. Rieg, P. Pierozan, L. Zantatta, E.B. Parisotto, D. Wilhelm Filho, M.B.F.R. Silva, R.P. Pureur, A. Zamoner, Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells, *Free Radic. Biol. Med.* 65 (2013) 335-346. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.043.

- [6] R. Annett, H.R. Habibi, A. Hontela, Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment, *J. Appl. Toxicol.* 34 (2014) 458-479. doi: 10.1002/jat.2997.
- [7] J.P. Giesy, S. Dobson, K.R. Solomon, Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 167 (2000) 35–120. doi: 10.1007/978-1-4612-1156-3_2.
- [8] L.M. Aguiar, F.H. Figueira, M.S. Gottschalk, C.E. Rosa, Glyphosate-based herbicide causes antioxidant defence responses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*, *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 185-186 (2016) 94-101. doi: 10.1016/j.cbpc.2016.03.006.
- [9] T.M.U. Webster, L.V. Laing, H. Florence, E.M. Santos, Effects of glyphosate and its formulation, roundup, on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*), *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 1271-1279. doi: 10.1021/es404258h.
- [10] M.P. Gomes, E. Smedbol, A. Chalifour, L. Hénault-Ethier, M. Labrecque, L. Lepage, M. Lucotte, P. Juneau, Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview, *J. Exp. Bot.* 65 (2014) 4691–4703. doi: 10.1093/jxb/eru269.
- [11] F.F. Carneiro, R.M. Rigotto, L.G.S. Augusto, K. Friedrich, A. C. Búrigo, Dossiê Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. https://www.abrasco.org.br/dossieagrototoxicos/wp-content/uploads/2013/10/DossieAbrasco_2015_web.pdf, 2015 (accessed 5 March 2018).
- [12] J.R.V. Osten, R. Dzul-Caamal, Glyphosate Residues in Groundwater, Drinking Water and Urine of Subsistence Farmers from Intensive Agriculture Localities: A Survey in Hopelchén, Campeche, Mexico, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 14 (2017) 1-13. doi: 10.3390/ijerph14060595.
- [13] D. Cattani, P.A. Cesconetto, M.K. Tavares, E.B. Parisotto, P.A. Oliveira, C.E.H. Rieg, M.C. Leite, R.D.S. Prediger, N. C. Wendt, G. Razzera, D.W. Filho, A. Zamoner, Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress, *Toxicology*, 387 (2017) 67-80. doi: 10.1016/j.tox.2017.06.001.
- [14] P. Bonfanti, M. Saibene, R. Bacchetta, P. Mantecca, A. Colombo, A glyphosate micro-emulsion formulation displays teratogenicity in *Xenopus laevis*, *Aquat. Toxicol.* 195 (2018) 103-113. doi: 10.1016/j.aquatox.2017.12.007.

- [15] N. Wagner, W. Reichenbecher, H. Teichmann, B. Tappeser, S. Lotters, Questions concerning the potential impact of glyphosate-based herbicides on amphibians, *Environ. Toxicol. Chem.* 32 (2013) 1688–1700. doi: 10.1002/etc.2268.
- [16] L.B. Rodrigues, R. Oliveira, F.R. Abe, L.B. Brito, D.S. Moura, M.C. Valadares, C.K. Grisolia, D.P. Oliveira, G.A.R. Oliveira, Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides: effects on different organisms, *Environ. Toxicol. Chem.* 36 (2017) 1755-1763. doi: 10.1002/etc.3580.
- [17] S. Guilherme, I. Gaivão, M.A. Santos, M. Pacheco, European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup—A glyphosate-based herbicide, *Mutagenesis* 25 (2010) 523–530. doi: 10.1093/mutage/geq038.
- [18] X. Yang, F. Wang, C.P.M. Bento, S. Xue, L. Gai, R. van Dam, H. Mol, C.J. Ritsema, V. Geissen, Short-term transport of glyphosate with erosion in Chinese loesssoil—a flume experiment. *Sci. Total Environ.* 512-513 (2015) 406-414. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.01.071.
- [19] J.C. Brodeur, M.B. Poliserpi, M.F.D. Andrea, M. Sánchez, Synergy between glyphosate- and cypermethrin-based pesticides during acute exposures in tadpoles of the common South American Toad *Rhinella arenarum*, *Chemosphere*, 112 (2014) 70-76. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.02.065.
- [20] R. Mesnage, N. Defarge, J.S. Vendômois, G.E. Séralini, Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits, *Food Chem. Toxicol.* 84 (2015) 133-153. doi: 10.1016/j.fct.2015.08.012.
- [21] J.P. Myers, M.N. Antoniou, B. Blumberg, L. Carroll, T. Colborn, L.G. Everett, M. Hansen, P.J. Landrigan, B.P. Lanphear, R. Mesnage, L.N. Vandenberg, F.S.V. Saal, W.V. Welshons, C.M. Benbrook, Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement, *Environ Health*, 15 (2016) 19. doi: 10.1186/s12940-016-0117-0.
- [22] P. Bonfanti, M. Saibene, R. Bacchetta, P. Mantecca, A. Colombo, A glyphosate micro-emulsion formulation displays teratogenicity in *Xenopus laevis*, *Aquat. Toxicol.* 195 (2018) 103-113. doi: 10.1016/j.aquatox.2017.12.007.
- [23] N. Wagner, W. Reichenbecher, H. Teichmann, B. Tappeser, S. Lotters, Questions concerning the potential impact of glyphosate-based herbicides on amphibians, *Environ. Toxicol. Chem.* 32 (2013) 1688–1700. doi: 10.1002/etc.2268.

- [24] D. Bridi, S. Altenhofen, J.B. Gonzalez, G.K. Reolon, C.D. Bonan, Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish, *Toxicology*, 392 (2017) 32-39. doi: 10.1016/j.tox.2017.10.007.
- [25] J.L. Rodriguez-Gil, R. Prosser, D. Poirier, L. Lissemore, D. Thompson, M. Hanson, K.R. Solomon, Aquatic hazard assessment of MON 0818, a commercial mixture of alkylamine ethoxylates commonly used in glyphosate-containing herbicide formulations. Part 1: Species sensitivity distribution from laboratory acute exposures, *Environ. Toxicol. Chem.* 36 (2017) 501–511. doi: 10.1002/etc.3559.
- [26] D. Tush, M.T. Meyer, Polyoxyethylene Tallow Amine, a Glyphosate Formulation Adjuvant: Soil Adsorption Characteristics, Degradation Profile, and Occurrence on Selected Soils from Agricultural Fields in Iowa, Illinois, Indiana, Kansas, Mississippi, and Missouri, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 5781–5789. doi: 10.1021/acs.est.6b00965.
- [27] E. Mañas, L. Peralta, J. Raviolo, H.G. Ovando, A. Wayers, L. Ugnia, M.G. Cid, I. Larripa, N. Gorla, Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate assessed by the Comet assay and cytogenetic tests, *Ecotoxicol Environ Saf.* 72 (2009) 834-837. doi: 10.1016/j.ecoenv.2008.09.019.
- [28] S.H. Bai, S.M. Ogbourne, Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (2016) 18988-19001. doi: 10.1007/s11356-016-7425-3.
- [29] OECD. 2013. Fish Embryo Toxicity (FET) Test. OECD Guideline 236. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- [30] T. Kosmehl, A.V. Hallare, G. Reifferscheid, W. Manz, T. Braunbeck, H. Hollert, A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos, *Environ. Toxicol. Chem.* 25 (2006) 2097–2106. doi: 10.1897/05-460R.1.
- [31] S. Scholz, S. Ficher, U. Gundel, E. Kuster, T. Luckenbach, D. Voelker, The zebrafish embryo model in environmental risk assessment-applications beyond acute toxicity testing, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 15 (2008) 394-404. doi: 10.1007/s11356-008-0018-z.
- [32] J.C. Mendis, K. T.K. Tennakoon, C.D. Jayasinghe, Zebrafish embryo toxicity of a binary mixture of pyrethroid insecticides: d-tetramethrin and cyphenothrin, *Journal of Toxicology*, 2018 (2018) 1-8. doi: 10.1155/2018/44182694.
- [33] I. Felzenszwalb, A.S. Fernandes, L.B. Brito, G.A.R. Oliveira, P.A.S. Silva, M.E. Arcanjo, M.R.C. Marques, T. Vicari, D.M. Leme, M.M. Cestari, E.R.A. Ferraz, Toxicological evaluation of nail polish waste discarded in the environment, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* (2018) 1-14. doi: 10.1007/s11356-018-1880-y.

- [34] S. Nehls, H. Segner, Detection of DNA damage in two cell lines from rainbow trout, RTG-2 and RTL-W1, using the comet assay, *Environ. Toxicol* 16 (2001) 321–329. doi: 10.1002/Tox.1039.
- [35] M. Munari, J. Sturve, G. Frenzilli, M.B. Sanders, A. Brunelli, A. Marcomini, M. Nigro, B.P. Lyons, Genotoxic effects of CdS quantum dots and Ag₂S nanoparticles in fish cell lines (RTG-2), *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 775–776 (2014) 89–93. doi: 10.1016/j.mrgentox.2014.09.003.
- [36] G.A.R. Oliveira, D.M. Leme, J. Lapuente, L.B. Brito, C. Porredón, L. B. Rodrigues, N. Brull, J. T. Serret, M. Borràs, G. R. Disner, M.M Cestari, D. P. Oliveira, A test battery for assessing the ecotoxic effects of textile dyes, *Chemico-Biological Interactions*, 291 (2018) 171-179. doi: 10.1016/j.cbi.2018.06.026.
- [37] C.B. Kimmel, W.W. Ballard, S.R. Kimmel, B. Ullmann, T.F. Schilling, Stages of embryonic development of the zebrafish, *Dev. Dynam.* 203 (1995) 253-310. doi: 10.1002/aja.1002030302.
- [38] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.R. Sasaki, Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206–221. doi: 10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J.
- [39] A.R. Collins, A.A. Oscoz, G. Brunborg, I. Gaivão, L. Giovannelli, M. Kruszewski, C.C. Smith, R. Stetina, The comet assay: topical issues, *Mutagenesis*, 23 (2008) 143–151. doi: 10.1093/mutage/gem051.
- [40] A.R. Collins, M. Ai-guo, S.J. Duthie, The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cell, *Mutation Research*, 1 (1995) 69-77. doi: 10.1016/0921-8777(94)00043-6.
- [41] T.S. Kumaravel, B. Vilhar, S.P. Faux, A.N. Jah, Comet assay measurements: a perspective, 25 (2009) 53-64. doi: 10.1007/s10565-007-9043-9.
- [42] A. Azqueta, G. Pachón, M. Cascante, E.E. Creppy, A. López de Cerain. DNA damage induced by a quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivative (hypoxic selective agent) in Caco-2 cells evaluated by the comet assay. *Mutagenesis*, 20 (2005) 165-71. <https://doi.org/10.1093/mutage/gei023>.
- [43] N.M Roy, B. Carneiro, J. Ochs, Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish. *Environ Toxicol Pharmacol* 42 (2016) 45-54. doi: 10.1016/j.etap.2016.01.003.
- [44] E. Fiorino, P. Sehonova, L. Plhalova, J. Blahova, Z. Svobodova, C. Faggio, Effects of glyphosate on early life stages: comparison between *Cyprinus carpio* and *Danio rerio*, *Environ Sci Pollut Res* 25 (2018) 8542-8549. doi: 10.1007/s11356-017-1141-5.

- [45] N. Wagner, H. Muller, B. Viertel, Effects of a commonly used glyphosate-based herbicide formulation on early developmental stages of two anuran species, *Environ Sci Pollut Res* 24 (2017) 1495-1508. doi: 10.1007/s11356-016-7927-z.
- [46] R. Mesnage, B. Bernay, G.E S eralini, Ethoxylated adjuvantes of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity, *Toxicology* 313 (2013) 122-128. doi: 10.1016/j.tox.2012.09.006.
- [47] P.J. Perkins, H.J. Boermans, G.R. Stephenson, Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay – *Xenopus*, *Environ Toxicol* 19 (2000) 940-945. doi: 10.1002/etc.5620190422.
- [48] M. Cuhra, T. Traavik, T. Bohn, Clone- and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*, *Ecotoxicology* 22 (2013) 251-262. doi: 10.1007/s110646-012-1021-1.
- [49] C.D.C Navarro, C.B.R. Martinez, Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genotoxic, biochemical, and physiological parameters of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*, *Comp Biochem Physiol Part C* 165 (2014) 83–90. doi: 10.1016/j.cbpc.2014.06.003.
- [50] N.C Moreno, S.H Sofia, C.B Martinez, Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*, *Environ Toxicol Pharmacol.* 37 (2014) 448-54. doi: 10.1016/j.etap.2013.12.012.
- [51] Z. Dang, L.T.M van der Ven, A.S. Kienhuis, Fish embryo toxicity test, threshold approach, and moribund as approaches to implement 3R principles to the acute fish toxicity test. *Chemosphere* 186 (2017) 677-685. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.047.
- [52] M. Sobanska, S. Scholz, A.M Nyman, R. Cesnaitis, S.A Gutierrez, N. Kl uver, R. K uhne, H. Tyle, J. de Knecht, Z. Dang, I. Lundbergh, C. Carlon, W. De Coen, Applicability of the fish embryo acute toxicity (FET) test (OECD 236) in the regulatory context of Registration, Evaluation, Authorisation, and Restriction of Chemicals (REACH), *Environ Toxicol Chem.* 37 (2018) 657-670. doi: 10.1002/etc.4055.
- [53] R. Kov acs, Z. Csenki, K. Bakos, B. Urb anyi,  . Horv ath, V. Garaj-Vrhovac, G. Gajski, M. Geri c, N. Negreira, M.A L opez, D. Barcel o, E. Heath, T. Kosjek, B.  egura, M. Novak, I. Zajc, S. Baebler, A. Rotter, Z. Ram sak, M. Filipi c, Assessment of toxicity and genotoxicity of low doses of 5-fluorouracil in zebrafish (*Danio rerio*) two-generation study, *Water Res.* 15 (2015) 201-212. doi: 10.1016/j.watres.2015.03.025.
- [54] S. Babic, J. Barisic, H. Visic, R.S. Klobucar, N.T Popovic, I. Strunjak-Perovic, R. Coz-Rakovac, G. Klobucar, Embryotoxic and genotoxic effects of sewage effluents in zebrafish

embryo using multiple endpoint testing, *Water Research* 115 (2017) 9-21. doi: 10.1016/j.watres.2017.02.049.

[55] M. Parolini, A. Ghilardi, T.C. Della, S. Magni, L. Prosperi, M. Calvagno, L. Del Giacco, A. Binelli, Environmental concentrations of cocaine and its main metabolites modulated antioxidant response and caused cyto-genotoxic effects in zebrafish embryo cells. *Environ Pollut.* 226 (2017) 504-514. doi: 10.1016/j.envpol.2017.04.046.

[56] N.C Bols, V.R. Dayeh, L.E.J. Lee, K. Schirmer, Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. *Piscine cell lines in environmental toxicology – chapter 2, Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* 6 (2005) 43-84. doi: 10.1016/S1873-0140(05)80005-0.

[57] E. Lammer, G.J Carr, K. Wendler, J.M Rawlings, S.E Belanger, T. Braunbeck, Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 149 (2009) 196-209. doi: 10.1016/j.cbpc.2008.11.006.

[58] W.W. Ku, A. Bigger, G. Brambilla, H. Glatt, E. Gocke, P.J. Guzzie, A. Hakura, M. Honma, H.J. Martus, R.S. Obach, S. Roberts, Strategy Expert Group, IWGT. Strategy for genotoxicity testing--metabolic considerations. *Mutat Res.* 627 (2007) 59-77. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.10.004>.

[59] D.P. Wasalathanthri, D.Li, D. Song, Z. Zheng, D. Choudhary, I. Jansson, X. Lu, J.B. Schenkman, J.F. Rusling. Elucidating Organ-Specific Metabolic Toxicity Chemistry from Electrochemiluminescent Enzyme/DNA Arrays and Bioreactor Bead-LC-MS/MS. *Chem Sci.* 6 (2015) 2457-2468. <https://doi.org/10.1039/C4SC03401E>.

[60] A. Castaño, C. Becerril. In vitro assessment of DNA damage after short- and long-term exposure to benzo(a)pyrene using RAPD and the RTG-2 fish cell line. *Mutat Res.* 552 (2004) 141-51. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.010>.

[61] S. Sánchez-Fortún, M.T. Llorente, A. Castaño A. Genotoxic effects of selected biocides on RTG-2 fish cells by means of a modified Fast Micromethod Assay. *Aquat Toxicol.* 73 (2005) 55-64. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.03.002>.

[62] L. Marabini, R. Calò, S. Fucile. Genotoxic effects of polychlorinated biphenyls (PCB 153, 138, 101, 118) in a fish cell line (RTG-2). *Toxicol In Vitro.* 25 (2011) 1045-52. doi: 10.1016/j.tiv.2011.04.004.

[63] M. Munari, J. Sturve, G. Frenzilli, M.B. Sanders, A. Brunelli, A. Marcomini, M. Nigro, B.P. Lyons. Genotoxic effects of CdS quantum dots and Ag2S nanoparticles in fish cell lines (RTG-2). *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 775-776 (2014) 89-93. doi: 10.1016/j.mrgentox.2014.09.003.

- [64] T. Klingelfus, G.R. Disner, C.L. Voigt, L.F. Alle, M.M. Cestari, D.M. Leme DM. Nanomaterials induce DNA-protein crosslink and DNA oxidation: A mechanistic study with RTG-2 fish cell line and Comet assay modifications. *Chemosphere* 215 (2019) 703-709. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.10.118.
- [65] F.R de Moura, R.R da Silva Lima, A.P.S da Cunha, P. da Costa Marisco, D.H. Aguiar, M.M Sugu, A.P. .Sinhorin, V.D.G Sinhorin, Effects of glyphosate-based herbicide on pintado da Amazônia: Hematology, histological aspects, metabolic parameters and genotoxic potential, *Environ Toxicol Pharmacol.* 56 (2017) 241-248. doi: 10.1016/j.etap.2017.09.019.
- [66] D.C Torre, M. Monti, S. Focardi, I. Corsi. Time-dependent modulation of cyp1a gene transcription and EROD activity by musk xylene in PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines, *Toxicol In Vitro* 25 (2011) 1575-1580. doi: 10.1016/j.tiv.2011.05.02.

6. RESULTADOS

6.1 Avaliação da toxicidade aguda com os estágios embrio-larvais de zebrafish após exposições repetidas

Os efeitos letais induzidos por exposições repetidas (pulsos de 1, 2 e 5 horas) de GLI, ATN e POEA sobre os estágios embrio-larvais de zebrafish estão demonstrados nas FIGURAS 5, 6 e 7, respectivamente.

De acordo com a FIGURA 5, o ingrediente ativo GLI não induziu efeitos letais significativos sobre embriões e larvas de zebrafish após exposição em pulsos de 1, 2 e 5 horas durante 4 dias. Resposta semelhante foi observada durante a exposição a formulação ATN em pulsos de 1 e 2 horas (FIGURA 6A e 6B). No entanto, durante a exposição em pulso de 5 horas (FIGURA 6C), ATN induziu mortalidade significativa na maior concentração testada (100 mg/L) a partir do 3º dia de exposição (72 horas), com valor de CL_{50-96h} de 148,80 mg/L (TABELA 1).

É possível observar que a letalidade causada por ATN aos embriões e larvas de zebrafish foi dependente da duração do pulso de exposição (FIGURA 6 A-C, TABELA 1).

Em relação ao POEA (FIGURA 7 A-C), a exposição em pulsos de 1, 2 e 5 horas induziu efeitos letais significativos, com valores de concentração de efeito observado (CEO) de 16, 8 e 4 mg/L após 96 horas do teste, respectivamente. Observa-se também que a letalidade causada por POEA foi dependente da duração do pulso de exposição e do tempo do teste (24, 48, 72 e 96 horas), com valor de CL_{50-96h} de 11,61 mg/L (TABELA 1) para o maior pulso (FIGURA 7C).

Ainda de acordo com a TABELA 1, o surfactante POEA apresentou maior toxicidade para os estágios embrio-larvais de zebrafish seguido pela formulação ATN e posteriormente pelo ingrediente ativo GLI.

FIGURA 5. Taxa de sobrevivência dos estágios embrio-larvais de zebrafish após exposição ao ingrediente ativo glifosato (GLI) em pulsos de 1 hora (A), 2 horas (B) e 5 horas (C). Os pulsos foram realizados a cada 24 horas durante 4 dias (96 horas). As barras representam a média \pm o erro padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ é estatisticamente diferente em relação aos respectivos controles negativos (CN). CN: água de manutenção.

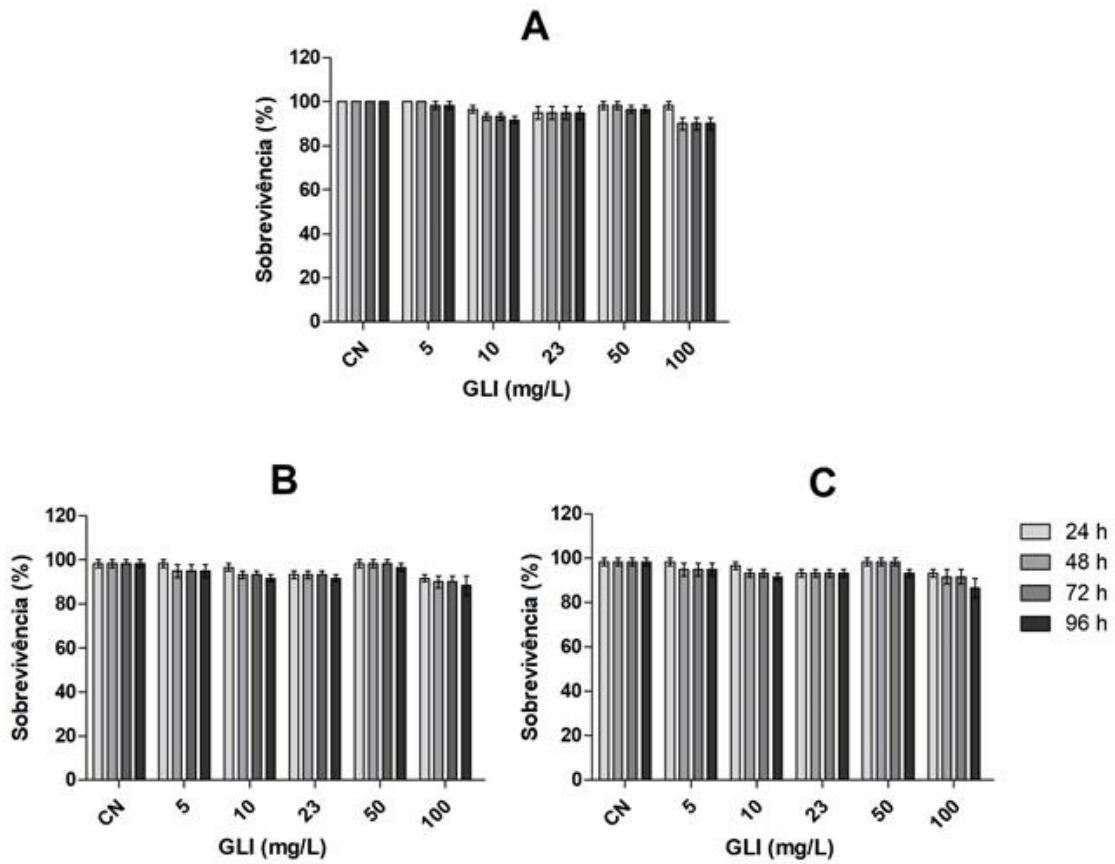


FIGURA 6. Taxa de sobrevivência dos estágios embrio-larvais de zebrafish após exposição à formulação Glifosato Atanor 48 (ATN) em pulsos de 1 hora (A), 2 horas (B) e 5 horas (C). Os pulsos foram realizados a cada 24 horas durante 4 dias (96 horas). As barras representam a média \pm o erro padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ é estatisticamente diferente em relação aos respectivos controles negativos (CN). CN: água de manutenção.

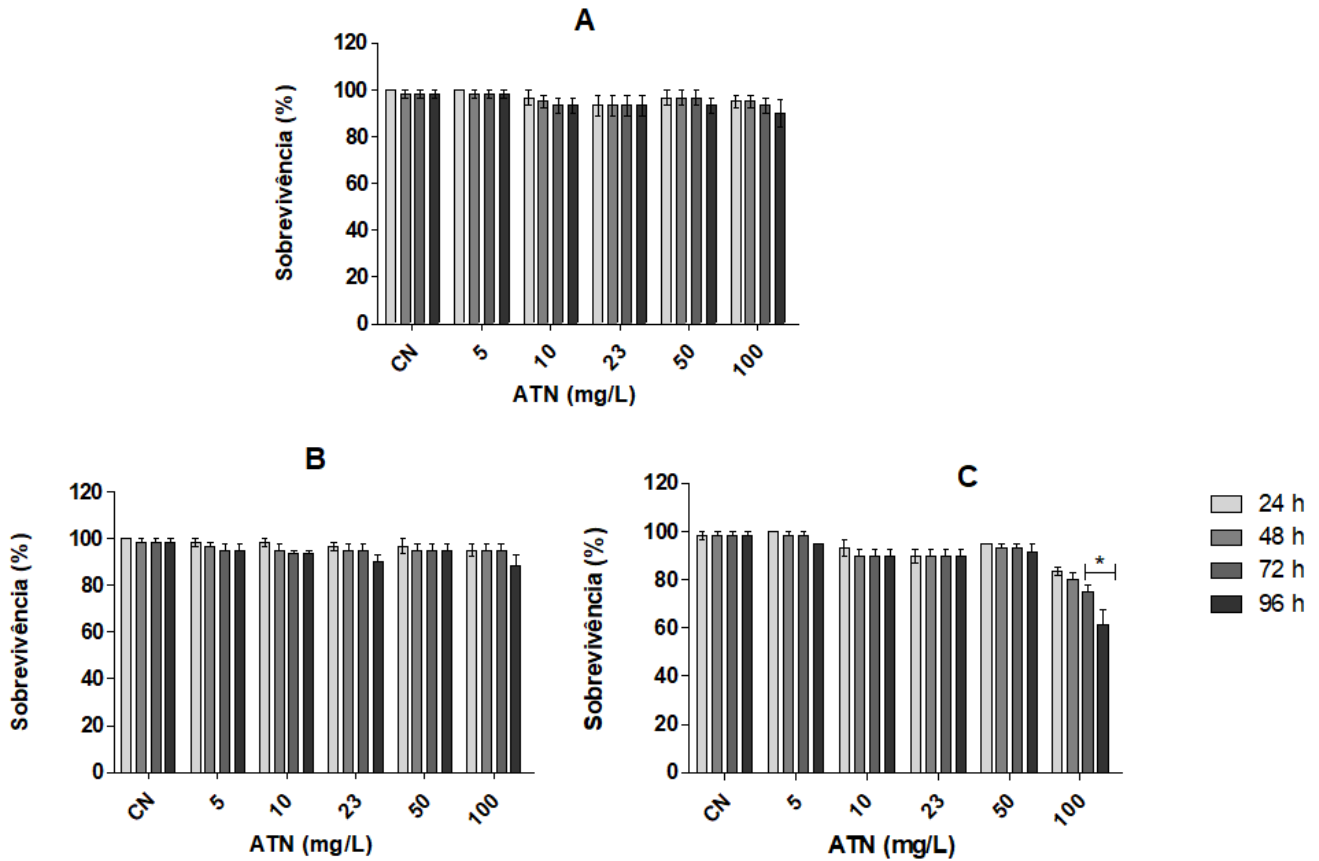


FIGURA 7. Taxa de sobrevivência dos estágios embrio-larvais de zebrafish após exposição ao surfactante polioxietilenoamina (POEA) em pulsos de 1 hora (A), 2 horas (B) e 5 horas (B). Os pulsos foram realizados a cada 24 horas durante 4 dias (96 horas). As barras representam a média \pm o erro padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,0001$ são estatisticamente diferentes em relação aos respectivos controles negativos (CN). CN: água de manutenção.

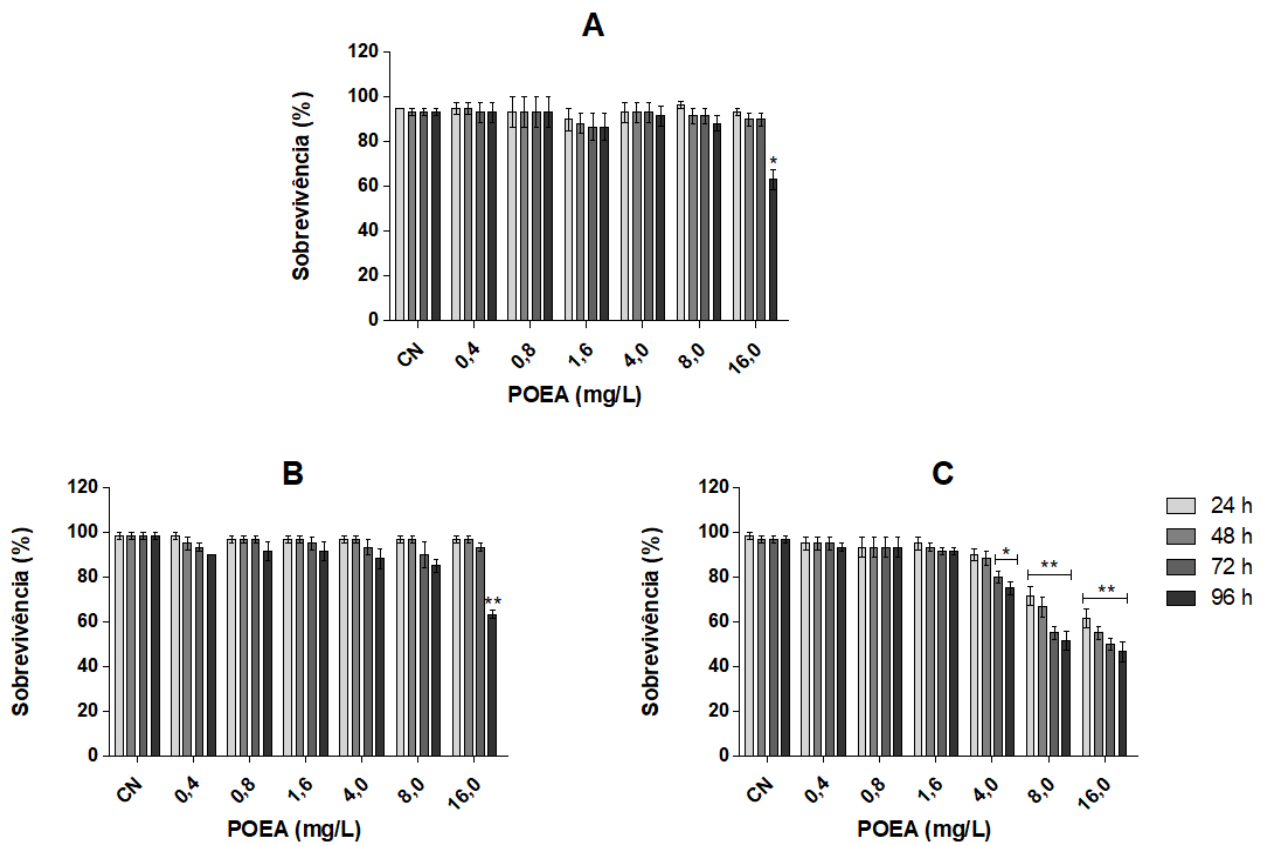


TABELA 1. Concentração letal média (CL_{50-96 h}) com os respectivos intervalos de confiança (IC) após exposição dos estágios embrio-larvais de zebrafish ao ingrediente ativo glifosato (GLI), à formulação Glifosato Atanor 48® (ATN) (e.a) e ao surfactante polioxietilenoamina (POEA) em pulsos de 1, 2 e 5 horas durante 96 horas.

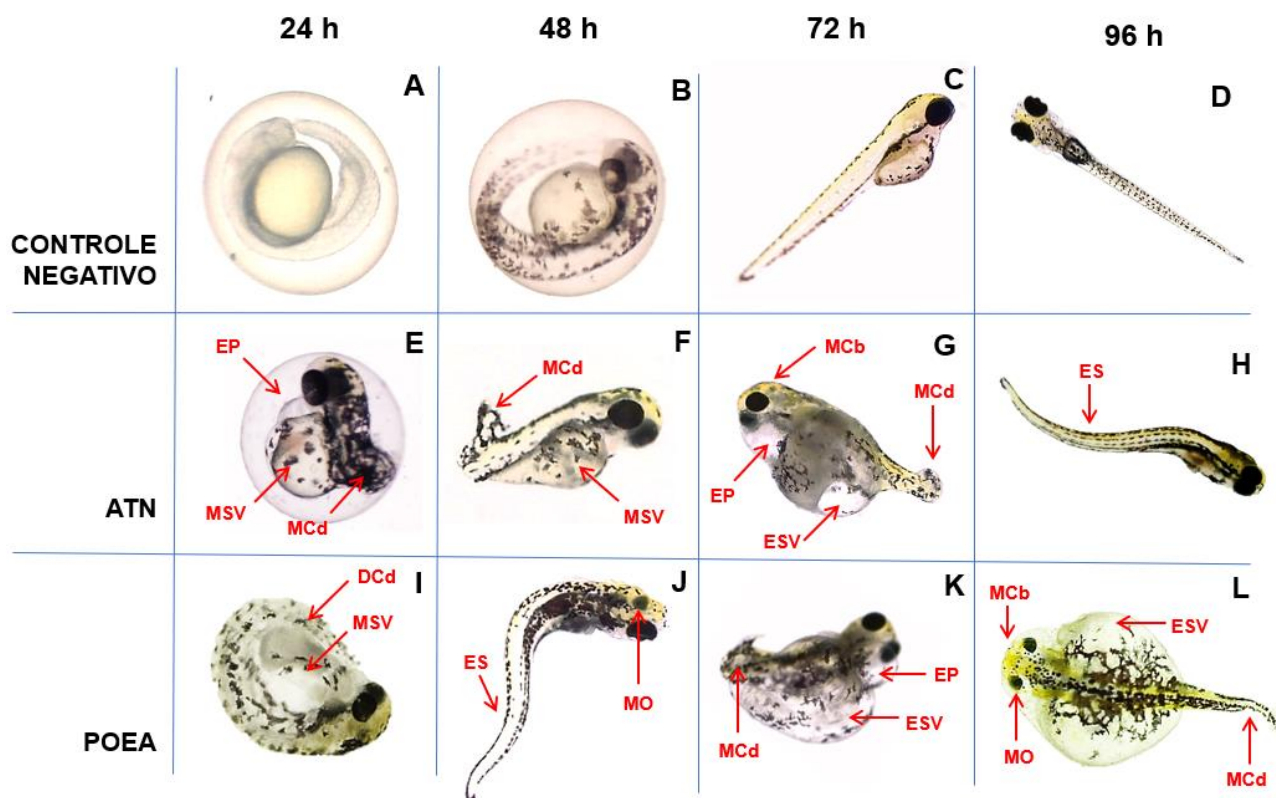
Exposição em pulsos	GLI	ATN	POEA
	CL _{50-96h} (IC) mg/L	CL _{50-96h} (IC) mg/L	CL _{50-96h} (IC) mg/L
1 h	> 100	> 100	43,49 (13,58 – 139,30)
2 h	> 100	> 100	47,23 (18,74 – 119,10)
5 h	> 100	148,80 (92,99 – 238,00)	11,61 (9,12 – 14,77)

Em relação aos indicadores de subletalidade (TABELA 2), GLI, ATN e POEA induziram anormalidades sobre o desenvolvimento embrionário de zebrafish, como: ausência de pigmentação do corpo, curvatura espinal, deformidades na cabeça e cauda, edema de pericárdio e de saco vitelínico, ausência da inflação da bexiga natatória e má absorção do saco vitelínico, porém quando comparados aos respectivos controles negativos esses efeitos subletais não foram estatisticamente significativos. A FIGURA 8 demonstra alguns desses efeitos observados.

TABELA 2. Resumo dos efeitos letais e subletais observados em estágios embrio-larvais de zebrafish após exposições repetidas a diferentes concentrações de GLI, ATN e POEA.

Substância	Efeitos letais				Efeitos subletais										
	Coagulação	Ausência de desprendimento da cauda	Ausência de formação de somitos	Ausência de batimentos cardíacos	Ausência de fluxo sanguíneo	Atraso no desenvolvimento	Ausência de pigmentação	Má absorção de saco vitelínico	Ausência da inflação da bexiga natatória	Malformação craniofacial	Malformação de olho	Malformação de cauda	Edema de saco vitelínico	Edema no pericárdio	Curvatura espinal
GLI	•							•	•						
ATN	•					•		•	•	•	•	•	•	•	•
POEA	•					•	•	•	•	•	•	•	•	•	•

FIGURA 8. Efeitos subletais em estágios iniciais de desenvolvimento de zebrafish após exposições repetidas em pulsos de 1, 2 e 5 horas de ATN e POEA. EP: edema de pericárdio; ESV: edema de saco vitelínico; ES: escoliose; MCb: malformação na cabeça; MCd: malformação na cauda; MO: malformação no olho; MSV: má absorção no saco vitelínico. A: embrião 24 hpf; B: embrião 48 hpf; C: larva 72 hpf; D: larva 96 hpf; E: embrião 48 hpf após pulsos de 1 h de ATN na concentração de 50 mg/L; F: larva 72 hpf após pulsos de 2 h de ATN na concentração de 23 mg/L; G: larva 72 hpf após pulsos 5 h de ATN na concentração de 100 mg/L; H: larva 96 hpf após pulsos de 5 h de ATN na concentração de 50 mg/L; I: embrião 48 hpf após pulsos de 1 h de POEA na concentração de 4 mg/L; J: larva 72 hpf após pulsos de 2 h de POEA na concentração de 8 mg/L; K: larva após 72 hpf após pulsos de 5 h na concentração de 8 mg/L; L: larva 96 hpf após pulsos de 5 h na concentração de 16 mg/L.



6.2 Avaliação da capacidade de resiliência de larvas de zebrafish após exposição em pulsos

A capacidade de resiliência das larvas de zebrafish foi avaliada durante o período de 3 dias consecutivos após a exposição ao GLI, ATN e POEA em pulsos de 1, 2 e 5 horas por 96 horas. A taxa de sobrevivência das larvas de zebrafish expostas ao GLI em pulsos de 1, 2 e 5 horas não foi alterada durante os 3 dias pós-teste e não foram observadas malformações durante esse período. Fato semelhante ocorreu após a exposição ao ATN em pulsos de 1 e 2 horas. Já após a exposição em pulso de 5 horas a 100 mg/L de ATN, houve uma redução na sobrevivência das larvas de zebrafish de 61,7% (após 96 horas de exposição) para 55,0% (D1, D2 e D3) (TABELA 3). No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$; teste T de Student). Por outro lado, quando se

compara as taxas de sobrevivência nessa mesma concentração durante o período de recuperação (D1, D2 e D3) com os respectivos controles negativos ($p < 0,05$; teste de Dunnett), observa-se que há diferença estatística significativa, reforçando a continuidade do efeito de ATN mesmo após um período no qual há ausência do estressor. Além disso, não houve reversibilidade das malformações induzidas pelo ATN durante 3 dias de recuperação.

TABELA 3. Taxa de sobrevivência das larvas de zebrafish durante o período de recuperação de 3 dias (D1, D2 e D3) após 96 h de exposição as diferentes concentrações do Glifosato Atanor 48® (ATN) em pulsos de 5 horas. Os resultados são expressos como média de três repetições e desvio padrão (DP) de três experimentos independentes. (*) $p < 0,05$ é estatisticamente diferente em relação à sobrevivência observada ao final das 96 horas (teste T de Student). (#) $p < 0,05$ é estatisticamente diferente em relação aos respectivos controles negativos (teste de Dunnett). CN: água de manutenção.

ATN (5 h) Concentração (mg/L)	Taxa de sobrevivência (%) \pm DP		
	D1	D2	D3
CN	98,3 \pm 2,9	98,3 \pm 2,9	93,3 \pm 2,9
5,0	95,0 \pm 0,0	95,0 \pm 0,0	93,3 \pm 7,6
10,0	90,0 \pm 5,0	90,0 \pm 5,0	91,7 \pm 14,4
23,0	90,0 \pm 5,0	90,0 \pm 5,0	85,0 \pm 13,2
50,0	91,6 \pm 5,7	91,6 \pm 5,7	91,6 \pm 7,6
100,0	55,0 \pm 8,7 [#]	55,0 \pm 8,7 [#]	55,0 \pm 8,7 [#]

A TABELA 4 mostra as taxas de sobrevivência das larvas de zebrafish durante o período de recuperação (3 dias) após exposição ao surfactante POEA em pulsos de 1, 2 e 5 horas por 4 dias (96 horas).

TABELA 4. Taxa de sobrevivência das larvas de zebrafish durante o período de recuperação de 3 dias (D1, D2 e D3) após 96 h de exposição às diferentes concentrações do surfactante polioxietilenoamina (POEA) em pulsos de 1, 2 e 5 horas. Os resultados são expressos como média de três repetições e desvio padrão (DP) de três experimentos independentes. (*) p<0,05 é estatisticamente diferente em relação aos respectivos controles negativos (teste de Dunnett). CN: água de manutenção. (#) p<0,05 é estatisticamente diferente em relação à sobrevivência observada ao final das 96 horas (teste T de Student).

TAXA DE SOBREVIVÊNCIA (%) ± DP										
Exposição em pulsos	1 h			2 h			5h			
	POEA (mg/L)	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3
CN		93,3 ± 2,9	93,3 ± 2,9	93,3 ± 2,9	98,3 ± 2,9	98,3 ± 2,9	98,3 ± 2,9	96,7 ± 2,9	96,7 ± 2,9	96,7 ± 2,9
0,4		93,3 ± 7,6	93,3 ± 7,6	93,3 ± 7,6	90,0 ± 0,0	90,0 ± 0,0	90,0 ± 0,0	93,3 ± 2,9	93,3 ± 2,9	93,3 ± 2,9
0,8		91,7 ± 14,4	91,7 ± 14,4	91,7 ± 14,4	91,7 ± 7,6	91,7 ± 7,6	91,7 ± 7,6	93,3 ± 7,6	91,7 ± 7,6	91,7 ± 7,6
1,6		85,0 ± 13,2	85,0 ± 13,2	85,0 ± 13,2	91,7 ± 7,6	91,7 ± 7,6	91,7 ± 7,6	91,7 ± 2,9	90,0 ± 5,0	90,0 ± 5,0
4,0		91,6 ± 7,6	91,6 ± 7,6	91,6 ± 7,6	88,3 ± 7,6	88,3 ± 7,6	88,3 ± 7,6	71,7 ± 7,6*	68,3 ± 7,6*	68,3 ± 7,6*
8,0		88,3 ± 5,7	88,3 ± 5,7	86,7 ± 7,6	83,3 ± 2,9	83,3 ± 2,9	88,3 ± 7,6	46,7 ± 7,6*	45,0 ± 5,0*	45,0 ± 5,0*
16,0		63,3 ± 7,6*	63,3 ± 7,6*	61,7 ± 5,8*	60,0 ± 5,0*	60,0 ± 5,0*	60,0 ± 5,0*	41,7 ± 7,6*	40,0 ± 5,0*	40,0 ± 5,0*

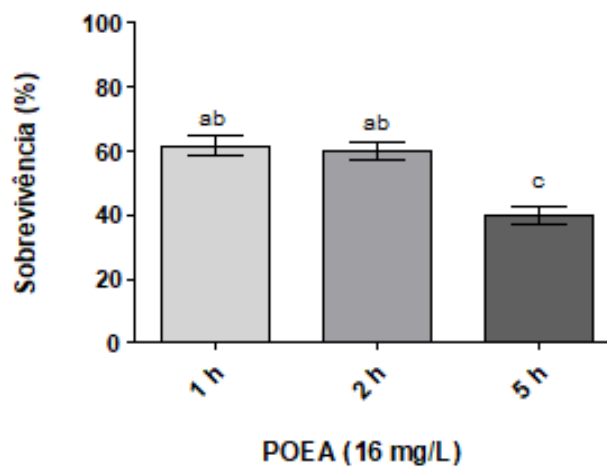
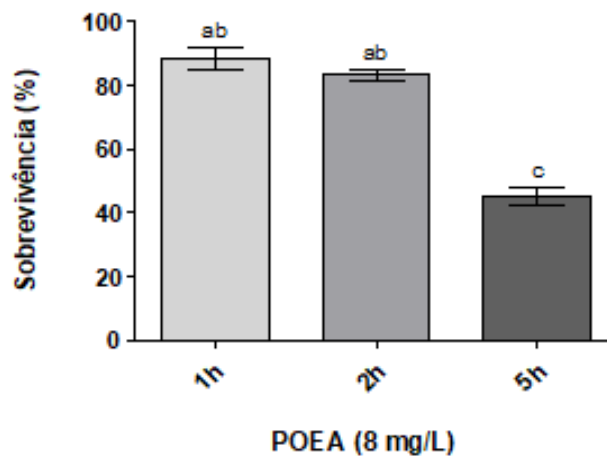
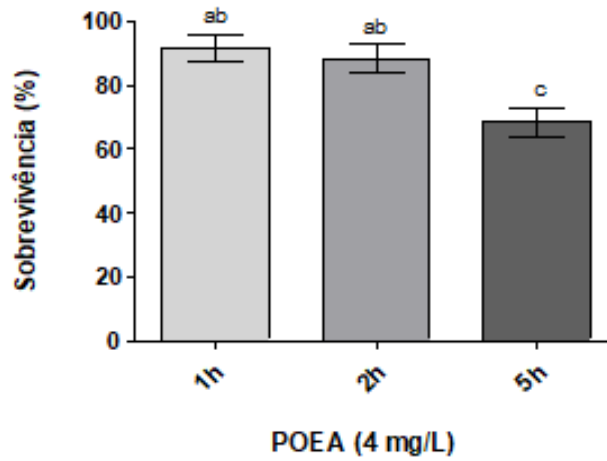
De acordo com a TABELA 4, quando se compara as taxas de sobrevivência no período de recuperação (D1, D2 e D3) com àquelas encontradas no último dia de exposição repetida (96 horas), não há diferença estatística significativa ($p > 0,05$; teste T de Student).

Por outro lado, a taxa de sobrevivência para larvas expostas a POEA durante o período de recuperação reduziu em todos os pulsos de exposição. Nos pulsos de 1, 2 e 5 horas, observa-se que na maior concentração testada (16 mg/L) houve menor sobrevivência ($p < 0,05$; teste de Dunnett). O mesmo efeito foi observado após pulsos de 5 horas nas concentrações de 4 e 8 mg/L.

Quando se compara as taxas de sobrevivência das larvas entre os diferentes pulsos de exposição no último dia (D3) do período de recuperação (FIGURA 8), é possível observar que a maior duração do tempo do pulso (5 horas) causa uma redução significativa da sobrevivência ($p < 0,05$; teste de Tukey).

Essas observações reforçam continuidade do efeito de POEA mesmo após um período no qual há ausência do estressor. Em relação a reversibilidade de efeitos subletais, foi observado que durante o período de recuperação, não houve reversão de efeitos induzidos por POEA.

FIGURA 9. Comparação das taxas de sobrevivência durante o período de recuperação (D3) de larvas de zebrafish expostas ao surfactante polioxietilenoamina (POEA) entre os diferentes pulsos de exposição. (A) 1, 2 e 5 horas na concentração de 4 mg/L; (B) 1, 2 e 5 horas na concentração de 8 mg/L; (C) 1, 2 e 5 horas na concentração de 16 mg/L. As barras representam a média \pm o erro padrão de três experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; teste de Tukey).



7. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a toxicidade do ingrediente ativo glifosato, bem como suas formulações têm sido estudadas em diversos tipos de organismos aquáticos. Em peixes, a exposição a essas substâncias pode causar diferentes efeitos, incluindo mortalidade, alterações hematológicas e bioquímicas em tecidos, genotoxicidade, danos histopatológicos, imunotoxicidade, cardiotoxicidade e estresse oxidativo (RODRIGUES et al., 2019; TRESNAKOVA; STARA; VELISEK, 2021).

A entrada de agrotóxicos em ecossistemas aquáticos ocorre, com frequência, sob a forma de pulsos e não por exposições contínuas. O presente estudo avaliou a toxicidade aguda do GLI, ATN e POEA após exposições repetidas ou em pulsos de 1, 2 e 5 horas sobre estágios embrio-larvais de zebrafish. A diferença entre esse modelo de exposição e a exposição tradicional está relacionada a mimetização de um cenário ambiental mais realista (REINERT; GIDDINGS; JUDD, 2002; RODRIGUEZ-GIL et al., 2017; MORETON et al., 2020).

GLI não apresentou toxicidade aguda significativa nas condições testadas (FIGURA 5). Em decorrência de sua alta solubilidade em água, resíduos de glifosato podem ser encontrados em águas superficiais próximas aos locais de aplicação (ROY; CARNEIRO; OCHS, 2016; LANZARIN et al., 2019; RODRIGUES et al., 2019). Vale ressaltar que, as principais fontes de contaminação aquática por herbicidas estão associadas ao escoamento superficial em áreas agrícolas e urbanas após chuvas intensas e à deriva pós-pulverização. Quando adentram os corpos d'água, os herbicidas podem atingir valores máximos de concentração. No entanto, devido a alterações relacionadas a diluição, mudanças físico-químicas da molécula, solubilidade, sorção a sedimentos e degradação, as concentrações podem sofrer alterações. Isso resulta em um intervalo no qual as concentrações do herbicida podem atingir níveis abaixo daqueles detectáveis (período de recuperação) (REINERT; GIDDINGS; JUDD, 2002; CHÈVRE; VALLOTTON, 2013). Em corpos d'água em que o fluxo é maior, o glifosato é encontrado em concentrações mais baixas. No entanto, naqueles em que o fluxo da água é menos intenso, podem ser encontrados níveis de glifosato em concentrações que variam de 0,01 mg/L a 1,7 mg/L, podendo alcançar 5,2 mg/L em um pior cenário de exposição (ANNET; HABIBI; HONTELA, 2014; ROY; CARNEIRO; OCHS, 2016; RODRIGUES et al., 2019).

Entretanto, de acordo com Lanzarin e colaboradores (2017), o glifosato é uma substância complexa devido às suas propriedades físico-químicas, como peso molecular relativamente baixo, alta polaridade, elevada solubilidade em água e sorção à sedimentos,

além de apresentar comportamento anfotérico. Ainda de acordo com o estudo, essas propriedades dificultam o entendimento sobre o potencial de toxicidade e bioacumulação desse ativo em organismos não-alvo, especialmente em estágios iniciais de desenvolvimento de zebrafish. Outro ponto importante relacionado à bioacumulação, de acordo com Wu e colaboradores (2017), é que devido à alta hidrossolubilidade, o glifosato pode se acumular ao redor do córion, não ultrapassando essa barreira física de proteção do embrião. E, ainda, caso consiga penetrar, o ativo pode ser excretado durante processos metabólicos. Portanto, além das propriedades físico-químicas do ingrediente ativo glifosato contribuírem para sua baixa toxicidade, vale ressaltar que o processo bioquímico no qual o glifosato interfere não é compartilhado por animais (ANNET; HABIBI; HONTELA, 2014; MESNAGE et al., 2015; CATTANI et al., 2017; SCHWEIZER et al., 2019).

Semelhante a resposta encontrada para o GLI, embriões e larvas expostas ao ATN em pulsos de 1 e 2 horas não apresentaram mortalidade estatisticamente significativa. No entanto, após pulsos de 5 horas, ATN apresentou toxicidade aguda com CL_{50-96h} de 148,10 mg/L. As formulações a base de glifosato são amplamente aplicadas em áreas agrícolas e não agrícolas devido a sua elevada eficácia no controle de plantas daninhas (WEBSTER et al., 2014; BRIDI et al., 2016; RODRIGUES et al., 2017; ROY et al., 2016; ZHANG et al., 2017; LANZARIN et al., 2019; RODRIGUES et al., 2019).

Essas formulações são misturas complexas no qual o glifosato atua como ingrediente ativo. A adição de surfactantes como o POEA, objeto do presente estudo, permite que sejam formadas estruturas micelares que aumentam a solubilidade e a penetração do glifosato nas membranas celulares das plantas daninhas, além de proteger o ativo frente a degradação. Isso aumenta a meia-vida do ingrediente ativo e melhora sua atividade herbicida (CATTANI et al., 2017; MESNAGE; ANTONIOU, 2018). Dados da literatura demonstram que este surfactante apresenta maior toxicidade para organismos não-alvo, incluindo *Acartia tonsa*, *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna*, *Lepomis macrochirus* e *Oncorhynchus mykiss*, quando comparado ao ingrediente ativo isolado, podendo ser de 5 a 50 vezes maior. (FOLMAR et al., 1979; GIESY et al., 2000; TSUI; CHU, 2003; BRAUSCH; BEALL; SMITH, 2007; MESNAGE; BERNAY; SÉRALINI, 2013; MORENO; SOFIA; MARTINEZ, 2014; WEBSTER et al., 2014; MARTENS et al., 2019; MESNAGE et al., 2019; RODRIGUES et al., 2019).

O POEA é considerado um ingrediente inerte e, devido a isso, geralmente é isento de avaliações que estabelecem os limites de toxicidade (MESNAGE et al., 2019). No presente trabalho, esse surfactante apresentou toxicidade aguda significativa após múltiplas exposições. O efeito letal induzido pelo POEA sobre os estágios embrio-larval de zebrafish

foi concentração-tempo-dependente com valores de CL_{50-96h} de 43,49 mg/L, 47,23 mg/L e 11,61 mg/L após pulso de 1, 2 e 5 horas, respectivamente.

O POEA pode ser transportado em pulsos de elevadas concentrações das formulações e alcançar águas superficiais após eventos de escoamento. A toxicidade do POEA está relacionada as suas propriedades físico-químicas, a exemplo da lipossolubilidade (MESNAGE et al., 2019). Essa característica permite que a substância penetre a membrana de células de organismos não-alvo alterando sua estrutura e funções levando, conseqüentemente, a prejuízos ao organismo (CAVALLI et al., 2013; MESNAGE; BERNAY; SÉRALINI, 2013; DEFARGE et al., 2016; CATTANI et al., 2017). Existem fortes evidências de que a bioacumulação do glifosato pode aumentar na presença do POEA em ambientes aquáticos, pois a alta lipossolubilidade do surfactante, utilizada para melhorar o transporte do ativo na planta, também pode facilitar a permeabilidade do glifosato em células animais aumentando desse modo, o fator de concentração (CONTARDO-JARA; KLINGELMANN; WIEGAND, 2009; HEDBERG; WALLIN, 2010).

O presente estudo demonstrou que após 4 dias (96 horas) sendo expostas a pulsos de 5 horas de ATN, larvas de zebrafish apresentaram mortalidade significativa (FIGURA 5). Esse efeito pode estar relacionado tanto a presença de POEA, que apresenta elevada toxicidade e facilita a entrada do ativo melhorando sua ação herbicida, como citado anteriormente, quanto ao fato de que após 96 horas, todas as larvas eclodiram não havendo, portanto, a presença da barreira física realizada pelo córion. Efeito semelhante foi observado para embriões e larvas expostos ao POEA em pulsos de 1, 2 e 5 horas, especialmente com o pulso de maior duração (FIGURA 6C). Observa-se que POEA foi mais tóxico do que a formulação a base de glifosato ATN após 72 horas de exposição, já que houve um decréscimo significativo da sobrevivência das larvas (FIGURA 6C). Além da alta toxicidade do POEA já discutida, nesse caso as larvas permaneceram mais tempo em contato com o surfactante, uma vez que o córion foi rompido devido à eclosão, que ocorre por volta de 50 hpf (SCHOLZ et al., 2008).

O efeito tóxico durante as exposições repetidas em pulsos é geralmente menor do que a resposta obtida em uma exposição contínua. Além disso, o primeiro pulso pode selecionar indivíduos mais tolerantes, causando uma diminuição aparente da resposta tóxica e indica que organismos capazes de suportar os efeitos iniciais da exposição à substâncias tóxicas, podem sobreviver ao final do ensaio (REINERT; GIDDINGS; JUDD, 2002; DUSQUENE; REYNALDI; LIESS, 2006). Esse fato foi corroborado no presente estudo, uma vez que após exposição a ATN e POEA no regime de pulsos, observou-se valores de CL_{50-96h} (148,80 mg/L e 11,61 mg/L, respectivamente) maiores do que àqueles

obtidos durante a exposição contínua (76,50 mg/L e 5,49 mg/L, respectivamente). De acordo com Clark e colaboradores (1986), exposições repetidas são menos tóxicas para organismos aquáticos do que exposições contínuas em que o ensaio tem igual duração. Isso sugere que pode ocorrer algum nível de metabolização ou eliminação da substância no qual o organismo foi exposto durante o período no qual não há contato com ela.

Um ponto importante, discutido por Reinert e colaboradores (2002), é que a toxicidade de agrotóxicos está intimamente relacionada à duração do pulso de exposição. Sendo assim, quanto maior for a duração do pulso de exposição, o potencial tóxico induzido será similar ao gerado com a exposição contínua. No presente estudo observou-se que com o incremento do tempo de duração do pulso para o surfactante, houve redução da sobrevivência dos estágios iniciais de desenvolvimento de zebrafish (FIGURA 6C). A concentração de POEA necessária para afetar a sobrevivência de estágios embrio-larvais de zebrafish no pulso de menor duração (1 hora) foi 16 mg/L. Nota-se que a CEO reduziu com aumento da duração do pulso, sendo de 8 mg/L para o pulso de 2 horas e de 4 mg/L para o pulso de 5 horas (FIGURA 6). Essas respostas estão em consonância com outros estudos que também apontam que a concentração e o tempo de duração do pulso são fatores determinantes para o aparecimento de efeitos tóxicos (NADDY; JOHNSON; KLAINE, 2000; SCHULZ; LIESS, 2000; COLD; FORBES, 2004).

Há ainda outro fator para a redução de toxicidade, relacionado ao período no qual o organismo não se encontra em contato com o agente tóxico, denominado período de recuperação. Durante esse período o organismo pode se recuperar, sugerindo o acontecimento de processos toxicocinéticos (REINERT; GIDDINGS; JUDD, 2002; CHÈVRE; VALLOTON, 2013; FINOTELLO et al., 2017; MORETON et al., 2020). Nesse estudo, avaliou-se a capacidade de resiliência de larvas sobreviventes à exposição a GLI, ATN e POEA em pulsos de 1, 2 e 5 horas durante o período de recuperação de 3 dias. Observou-se que larvas expostas a GLI mantiveram-se vivas e sem malformações significativas. Além disso, apesar do decréscimo observado na sobrevivência de larvas expostas a ATN (pulsos de 5 horas) e POEA (pulsos de 1, 2 e 5 horas) em relação à exposição aguda (até 96 horas) não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$; teste T de Student).

O termo resiliência tem diversos significados dependendo do contexto em que é inserido. De acordo com Bundschuh e colaboradores (2017), resiliência (ou recuperação) é definida como a capacidade e o tempo necessário para que atributos funcionais ou estruturais de um organismo ou ecossistema retornem a sua condição inicial uma vez que o estímulo estressor é retirado. Em uma outra visão, a resiliência descreve um processo de

adaptação a um regime de exposição sem que haja retorno a uma condição anterior, ou seja, os organismos ou o ecossistema se estabilizam em um novo regime (ANGELER et al., 2018).

O presente estudo também avaliou os efeitos subletais (FIGURA 7) induzidos por GLI, ATN e POEA em estágios embrio-larvais de zebrafish após exposição em pulsos. As substâncias induziram anormalidades no desenvolvimento embrionário e os efeitos subletais recorrentes foram ausência da inflação na bexiga natatória, má absorção do saco vitelínico e deformidades na cauda, no entanto, não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos respectivos controles negativos. Considerando que os estágios embrio-larvais foram expostos em solução preparada com água de cultivo com pH de $7,5 \pm 0,5$ e que o ingrediente ativo glifosato é uma molécula ionizável que exerce maior toxicidade em ambientes de baixo pH, sugere-se que o baixo índice de efeitos subletais pode estar relacionado a presença de formas ionizadas da molécula que, por apresentarem cargas elétricas, tem penetração reduzida em biomembranas (SCHEWEIZER et al., 2019). Por outro lado, em decorrência de sua característica lipofílica, estágios embrio-larvais de zebrafish expostos a POEA especialmente durante pulso de 5 horas apresentaram uma maior quantidade de efeitos subletais (TABELA 2). Além disso, durante o período de recuperação, em que foi avaliada a capacidade de resiliência, não houve reversão dos efeitos subletais provocados durante as exposições repetidas.

De acordo com von Hellfeld (2020), os efeitos subletais podem, ou não, apresentar potencial para recuperação. Edemas que envolvem a região do pericárdio ou do saco vitelínico podem desaparecer com o desenvolvimento do organismo e não comprometer sua sobrevivência. No entanto, eventos como: curvatura espinal, malformações craniofaciais, malformações no olho e ausência da inflação da bexiga natatória podem ser consideradas irreversíveis implicando na sobrevivência do organismo no ecossistema.

De acordo com Kattwinkel e colaboradores (2015), ensaios com curtos períodos de recuperação, como no presente estudo, podem não ser suficientes para observar reversão de efeitos tóxicos. Além disso, a duração da recuperação pode variar de 3 a 28 dias e, dependendo da espécie estudada, podem ser necessários até 8 semanas para a recuperação total (BUNDSCHUH et al., 2017). Entretanto, é importante ressaltar que durante o período de recuperação (3 dias), estágios iniciais de desenvolvimento de zebrafish não experimentarão dor ou sofrimento (STRÄHLE et al., 2012; SCHOLZ, 2013). Sendo assim, a escolha desse período é justificada por respeitar o princípio dos 3R'S proposto por Russel e Burch (1959).

Por outro lado, a ausência de recuperação tanto pode estar relacionada a irreversibilidade do impacto, quanto com a importância da relação interespecies durante o período de exposição ao estressor. Diante disso, múltiplas respostas, seja de recuperação ou não, podem acontecer em decorrência da perturbação do ecossistema em questão. Grande parte delas estão relacionadas às características da própria espécie, como tolerância fisiológica, metabolização, capacidade de dispersão do contaminante, reprodução e crescimento (BAHO et al., 2014; BUNDSCHUH et al., 2017).

A atração ou aversão à contaminantes presentes no ambiente também é um fator importante para a recuperação. Organismos que permanecem por períodos mais longos na presença de agrotóxicos, por se atrair ou não os perceber, tendem a absorver maiores quantidades deles. O contrário também é válido, quando se trata de contaminantes nos quais o organismo tem aversão (DA ROSA et al., 2016). Da Rosa e colaboradores avaliaram a atração ou aversão de adultos de zebrafish à agrotóxicos, incluindo formulações a base de glifosato. O estudo indicou que os peixes adultos apresentam comportamento aversivo, após 30 segundos de exposição, por perceberem a substância e ela causar desconforto devido ao caráter ácido da formulação (pH = 6,5).

Quando se trata de estágios embrio-larvais de zebrafish, pode-se sugerir que os organismos não apresentam habilidade para a percepção sensorial do contaminante. Essa atividade fisiológica é tomada como indicação de um sistema nervoso maduro, o que não está completo no período inferior a 120 horas (GEISLER et al., 2017). Sendo assim, embriões e larvas podem permanecer mais tempo na presença dos agentes tóxicos quando comparados aos peixes adultos, levando a uma maior ocorrência de efeitos letais e subletais e, conseqüente, falha na recuperação.

O presente estudo também avaliou e comparou as taxas de sobrevivência entre os pulsos de exposição (1, 2 e 5 horas) durante o período de recuperação de larvas de zebrafish. Após exposição ao ATN em pulsos de 5 horas, houve redução na sobrevivência das larvas de 61,7% (96 horas) para 55,0% durante todo período de recuperação (3 dias). No entanto, essa redução não foi estatisticamente significativa. Quando se compara as taxas de sobrevivência entre os diferentes pulsos (1, 2 e 5 horas) durante o período de recuperação de larvas expostas ao surfactante POEA a 4, 8 e 16 mg/L, há um aumento dos efeitos letais estatisticamente significativo (FIGURA 8). Essa diferença estatística ocorre entre o pulso de maior duração (5 horas) em relação aos pulsos de menor duração (1 e 2 horas). Portanto, esses dados podem sugerem que os organismos ainda estão sob a ação tóxica do surfactante mesmo na sua ausência. Isso pode estar relacionado tanto ao maior

tempo de exposição, quanto a sua capacidade de bioacumulação nas larvas, fatores anteriormente discutidos.

Os estágios iniciais de desenvolvimento de zebrafish oferecem uma enorme versatilidade de aplicações, incluindo avaliação do risco ambiental e humano após a exposições a agentes tóxicos (LAMMER et al., 2009; SCHOLZ, 2013; FIORINO et al., 2018). Além disso, como o genoma de zebrafish está completamente sequenciado e possui similaridade com o de seres humanos, é possível extrapolar resultados obtidos nos estudos de ecotoxicidade para outros mamíferos (PARNG et al., 2002; HOWE et al., 2013; SCHOLZ, 2013). Uma questão relevante nas extrapolações para humanos utilizando embriões e larvas de zebrafish como modelo de estudo, deve considerar como as concentrações em que se observa efeito letal ou subletal podem se relacionar aos modelos utilizando mamíferos. Entretanto, a grande maioria dos estudos ecotoxicológicos com estágios iniciais de desenvolvimento de peixes, a exposição ao agente tóxico se dá de maneira contínua, não fornecendo um parâmetro de comparação real (SCHOLZ, 2013).

Em vista disso, estudos que abordem uma correlação mais fidedigna do cenário de exposição à agrotóxicos são bastante relevantes a nível de saúde humana e ambiental, especialmente em relação às formulações de herbicida a base de glifosato, um importante contaminante ambiental, que gera discussões polêmicas e controversas sobre o seu potencial tóxico.

8. CONCLUSÕES

Com base nos resultados é possível concluir que:

- A formulação a base de glifosato (ATN) e o surfactante (POEA) induziram mortalidade significativa sobre estágios iniciais de desenvolvimento de zebrafish após exposição única. No entanto, o ingrediente ativo (GLI) e seu principal metabólito (AMPA) não induziram toxicidade aguda significativa sob as mesmas condições.
- As substâncias testadas apresentaram valores de CL_{50-96h} distintos, estabelecendo a seguinte ordem de toxicidade: POEA>ATN>GLI≈AMPA.
- A exposição única a ATN, GLI e POEA induziu efeitos subletais em embriões e larvas de zebrafish, porém esses efeitos não foram estatisticamente significativos.
- Nas condições testadas, todas as substâncias foram genotóxicas para estágios iniciais de zebrafish, sendo que GLI induziu dano ao DNA em uma concentração ambientalmente relevante (1,7 mg/L).
- POEA induziu efeitos genotóxicos em células RTG-2 (CEO 1,6 mg/mL) sugerindo que é um agente de ação direta.
- Em relação a avaliação de toxicidade aguda após exposições repetidas em pulsos de 1, 2 e 5 horas, GLI não induziu efeitos significativos. ATN induziu mortalidade significativa após pulsos de 5 horas na maior concentração testada (100 mg/L), enquanto POEA induziu mortalidade significativa nos pulsos de 1, 2 e 5 horas com CEO de 16, 8 e 4 mg/L, respectivamente.
- As exposições repetidas em pulsos de ATN, GLI e POEA induziram efeitos subletais em embriões e larvas de zebrafish, porém esses efeitos não foram estatisticamente significativos.
- Na avaliação da capacidade de resiliência, não houve reversão de efeitos subletais induzidos por ATN, GLI e POEA durante o período de recuperação.
- A sobrevivência de larvas expostas a ATN em pulsos de 5 horas e POEA em pulsos de 1, 2 e 5 horas reduziu mesmo após a retirada do estímulo estressor. Entretanto, a redução não foi estatisticamente significativa quando se comparou com a sobrevivência ao final do teste de toxicidade aguda (96 horas).

- Os efeitos tóxicos induzidos por GLI, ATN e POEA após exposições repetidas em pulsos sobre estágios iniciais de desenvolvimento de zebrafish foram menores do que aqueles observados após exposição única.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desde sua introdução no mercado, os efeitos tóxicos agudos do glifosato e suas formulações comerciais vem sendo amplamente estudados. A aplicação indiscriminada e repetida nos campos agrícolas para aumentar a produtividade, levam a riscos a longo prazo para seres humanos e todos os ecossistemas (solo, ar e água).

A relevância do presente estudo se relaciona com a necessidade de uma avaliação detalhada acerca dos efeitos das formulações a base de glifosato e seus constituintes em cenários realísticos de exposição, a fim de compreender a dimensão dos efeitos nos níveis letal e subletal.

É um desafio controlar as fontes de contaminação e suas consequências. Além disso, a presença de glifosato e seus metabolitos em concentrações residuais em águas potáveis, subterrâneas e superficiais representa um problema global, uma vez que os efeitos tóxicos podem ocorrer por diversos mecanismos, muitos deles ainda pouco conhecidos.

Portanto, estudos que envolvem agrotóxicos, sobretudo o glifosato, prospectam a necessidade da elucidação de mecanismos tóxicos através da observação de alterações morfológicas e genéticas e, sem dúvidas, este modelo animal contribui para uma avaliação completa respeitando o princípio dos 3R's.

- 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.
- AMARANTE JUNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quím. Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.
- ANGELER, D.G. et al. Resilience in environmental risk and impact assessment: concepts and measurement. **Bull. Environ. Cont. Toxicol.**, v. 101, p. 543-548, 2018.
- ANNET, R.; HABIBI, H.R.; HONTELA, A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **J. Appl. Toxicol.**, v. 34, p. 458-479, 2014.
- 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: 08 fev 20.
- 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.
- BAMBINO, K.; CHU, J. Zebrafish in toxicology and environmental health. **Curr. Top. Dev. Biol.**, v. 124, p. 331-367, 2017.
- BANKS, M.L. et al. Soil microbial community response to surfactants and herbicides in two soils. **Appl. Soil Ecol.**, v. 74, p. 12-20, 2014.
- BENBROOK, C.M. How did the US EPA and IARC reach diametrically opposed conclusions on the genotoxicity of glyphosate-based formulations herbicides? **Environ. Sci. Eur.**, v. 31, n. 2, 2019.
- BENBROOK, C.M. Impacts of genetically engineered crops on pesticide use in the U.S. - the first sixteen years. **Environ. Sci. Eur.**, v. 24, 2012.
- BENBROOK, C.M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environ. Sci. Eur.**, v. 3, n. 28, p. 1-15, 2016.
- BOMBARDI, L.M. **Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia**. 1 ed. São Paulo: FFLCH-USP, 2017. 296 p.
- BORGAARD, O.K.; GIMSING, A.L. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. **Pest. Manag. Sci.**, v. 64, p. 441-456, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Nota Técnica nº 23 de 2018**. Apresenta a Nota Técnica Preliminar sobre as conclusões da reavaliação do Glifosato com as respectivas recomendações e proposta de minuta de RDC a ser submetida à consulta pública. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117833/Nota+t%C3%A9cnica+23+de+2018+-+Glifosato/faac89d6-d8b6-4d8c-8460-90889819aaf7>>. Acesso em: 15 nov 2019.

BRASIL. Diário Oficial da União. **Resolução-RE nº 2.080, de 31 de julho de 2019**. Divulga a reclassificação toxicológica de acordo com o disposto na Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 294, de 29 de julho de 2019, baseada nos critérios definidos pelo Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS). Disponível em: <<http://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-re-n-2080-de-31-de-julho-de-2019-208203097>>. Acesso em: 15 nov 2019.

BRAUNBECK, T. et al. Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species – an update. **ALTEX**, v.22, p.87–102, 2005.

BRAUSCH, J.M.; BEALL, B.; SMITH, P.N. Acute and sub-lethal toxicity of three poea surfactant formulations to *Daphnia magna*. B. **Environ. Contam. Tox.**, v. 78, p. 510-514, 2007.

BRENT, R.N.; HERRICKS, E.E. A method for the toxicity assessment of wet weather events. **Wat. Res.**, v. 33, n. 10, p. 2255-2264, 1999.

BRIDI, D. et al. Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. **Toxicology**, v. 392, p. 32-39, 2017.

BUNDSCHUH, M. et al. Resilience in ecotoxicology: toward a multiple equilibrium concept. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 36, n. 10, p. 2574-2580, 2017.

CANEDO, A.; ROCHA, T.L. Zebrafish (*Danio rerio*) using as a model for genotoxicity and DNA repair assessments: historical review, current status and trends. **Science of the Total Environment**, v. 762, 2021.

CATTANI, P.A. et al. Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. **Toxicology**, v. 387, p. 67-80, 2017.

CAVALLI, V.L.L.O. et al. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rats testis and Sertoli cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 65, p. 335-346, 2013.

CHÈVRE, N.; VALLOTTON, N. **Pulse exposure in ecotoxicology**. In: FÉRARD, J-H.; BLAISE, C. Encyclopedia of aquatic ecotoxicology. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2013. p. 917-926.

COLD, A.; FORBES, V.E. Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*. **Aquat. Toxicol.**, v. 63, n. 3, p. 287-299, 2004.

- 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.
- COLLINS, A.R. et al. The comet assay: topic issues. **Mutagenesis**, v. 23, p. 206-211, 2008.
- COLLINS, A.R.; AI-GUO, M; DUTHIE, S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cell. **Mutat. Res.**, v. 1, p. 69-77, 1995.
- CONNOR, M.S. et al. The slow recovery of San Francisco Bay from the legacy of organochlorine pesticides. **Environ. Res.**, v. 105, p. 87-100, 2007.
- CONTARDO-JARA, V.; KLINGELMANN, E.; WIEGAND, C. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidants enzymes. **Environ. Pollut.**, v. 157, n. 1, p. 57-63, 2009.
- COUPE, R.H. et al. Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. **Pest. Manag. Sci.**, v. 68, p. 16-30, 2012.
- CUHRA, M.; BOHN, T.; CUHRA, P. Glyphosate: too much of a good thing? **Frontiers in Environmental Science**, v. 4, n. 28, 2016.
- DA ROSA, J.G.S. et al. Fish aversion and attraction to selected agrichemicals. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 71, p. 415-422, 2016.
- DAI, Y-J. et al. Zebrafish as a model system to study toxicology. **Environ. Toxicol. Chem.**, 33, n. 1, p. 11-17, 2014.
- DEFARGE, N. et al. Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels. **Int. J. Environ Res. Public Health**, v. 13, n. 264, 2016.
- 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.
- DUKE, S.O. et al. Glyphosate effects on plant mineral nutrition, crop rhizosphere microbiota and plant disease in glyphosate-resistant crops. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, n. 42, p. 10375-10397, 2012.
- DUKE, S.O; POWLES, S.B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest. Manag. Sci.**, v. 64, p. 319-325, 2008.
- DUKE, S.O; POWLES, S.B. Glyphosate-resistant crops and weeds: now and in the future. **AgBioforum**, v. 12, p. 346-357, 2009.
- DUSQUESNE, S.; REYNALDI, S.; LIESS, M. Effects of the organophosphate paraoxon-methyl on survival and reproduction of *Daphnia magna*: importance of exposure duration and recovery. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 25, p. 1196-1199, 2006.
- European Economic Community (EEC). **Council Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used**

for scientific purposes Text with EEA relevance. 2010. Disponível em: <<http://https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32010L0063>>. Acesso em: 16 mai 20.

FELZENSZWALB, I. et al. Toxicological evaluation of nail polish waste discarded in the environment. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, v. 26, n. 27, p. 27590-27603, 2018.

FIORINO, E. et al. Effects of glyphosate on early life stages: comparison between *Cyprinus carpio* and *Danio rerio*. **Environ.Sci. Pollut. Res.**, v. 25, p. 8542-8549, 2018.

FINOTELLO, S. et al. Repeated pulse exposures to lambda-cyhalothrin affect and behavior, physiology, and survival of the damselfly larvae *Ischnura graellsii* (Insecta; Odonata). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 144, p. 107-114, 2017.

FOLMAR, L. C. et al. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. **Arch. Environ. Contain. 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. **Pharmacol. Ther.**, v. 161, p. 11-21, 2016.

GEIGER, D.R. et al. Causes of self-limited translocation of glyphosate in *Beta vulgaris* plants. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 64, n. 2, p. 124-133, 1999.

GEISLER, R. et al. Archiving of zebrafish lines can reduce animal experiments in biomedical research. **EMBO reports**, n. 18, n. 1, 2017.

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

GILL, J.P.K. et al. Glyphosate toxicity for animals. **Environ. Chem. Lett.**, v. 16, n. 2, p. 401-426, 2018.

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.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 173-200.

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

GRANDCOIN, A.; PIEL, S.; BAURÈS, E. Aminomethylphosphonic acid (AMPA) in natural waters: its sources, behavior and environmental fate. **Water Research**, v. 117, p. 187-197, 2017.

GRIGORI, P. **Anvisa retira alerta de consumo para produtos que podem até “corroer a córnea”**. El País, São Paulo, 01 nov 2019. Agência Pública. Disponível em: <http://https://brasil.elpais.com/brasil/2019/10/31/politica/1572547992_172742.html>. Acesso em: 02 mar 20.

GRUNEWALD, K. et al. Behavior of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in soils and water of reservoir Radeburg II catchment (Saxony/Germany). **J. Plant Nutr. Soil Sc.**, v. 164, n. 1, 2001.

GUILHERME, S. et al. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide - elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. **Mut. Res. - Gen. Toxicol. Environ. Mutagen.**, v. 743, p. 1-9, 2012.

GUYTON, K.Z. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon and glyphosate. **Lancet Oncol.**, v. 16, p. 490-491, 2015.

GUYTON, K.Z. et al. Recent progress in mechanistic data evaluation: the IARC monographs perspective. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 16, 2015.

HEDBERG, D.; WALLIN, M. Effects of Roundup and glyphosate formulations on intracellular transport, microtubules, and actin filaments in *Xenopus laevis* melanophores. **Toxicol. in Vitro**, v. 24, p. 795-802, 2010.

HERMSEN, S.A.B. et al. Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies. **Toxicol. in Vitro**, v. 25, n. 3, p. 745-753, 2011.

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.

HUED, A.C.; OBERHOFER, S.; BISTONI, M.D. Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup®) alters normal gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 62, n. 1, p. 107-117, 2012.

JARVIS, R.B.; KNOWLES, J.F. DNA Damage in zebrafish larvae induced by exposure to low-dose rate gamma-radiation: detection by the alkaline comet assay. **Mutat. Res.**, v. 541, n. 1-2, p. 63-69, 2003.

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

KIMMEL, C.B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Dev. Dynam.**, 203, p. 253-310, 1995.

KIRKWOOD, R.C. et al. Absorption, localisation, translocation and activity of glyphosate in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galii* (L.) Beauv): influence of herbicide and surfactant concentration. **Pest. Manag. Sci.**, v. 56, p. 359-367, 2000.

KOSMEHL, T. et al. A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 25, p. 2097-2106, 2006.

KUMARAVEL, T.S. et al. Comet assay measurements: a perspective. **Cell Biol. Toxicol.**, v. 25, p. 53-64, 2009.

LAMMER, E. et al. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v. 149, p. 196-209, 2009.

LANZARIN, A.B.G. et al. Dose-dependent effects of a glyphosate commercial formulation - Roundup® Ultramax – on the early zebrafish embryogenesis. **Chemosphere**, v. 223, p. 514-522, 2019.

LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of the single gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutat. Res.**, v. 544, n. 1, p. 43-64, 2003.

LEME, D.M. et al. Eco- and genotoxicological assessments of two reactive textile dyes. **J. Toxicol. Env. Heal. A**, v. 78, p. 287-300, 2015.

LIESCHKE, G.J.; CURRIE, P.D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature Rev.**, v. 8, 2007.

MARTENS, M.A. et al. Toxicology and human health risk assessment of polyethoxylated tallow amine surfactant used in glyphosate formulations. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 107, 2019.

MARTINS-GOMES, C. et al. Glyphosate vs. Glyphosate-based herbicides exposure: a review on their toxicity. **J. Xenobiot.**, v. 12, 2022.

MASSEI, R. et al. Differential sensitivity in embryonic stages of the zebrafish (*Danio rerio*): the role of toxicokinetics for stage-specific susceptibility for azinphos-methyl lethal effects. **Aquat. Toxicol.**, v. 166, p. 36-42, 2015.

MESNAGE, R.; ANTONIOU, M.N. Facts and fallacies in the debate on glyphosate toxicity. **Front. Public Health**, v. 5, p. 1-7, 2017.

MESNAGE, R.; ANTONIOU, M.N. Ignoring adjuvant toxicity falsifies the safety profile of commercial pesticides. **Front. Public Health**, v. 5, n. 361, 2018.

MESNAGE, R.; BENBROOK, C.; ANTONIOU, M.N. Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. **Food Chem. Toxicol.**, v. 128, p. 137-145, 2019.

- MESNAGE, R.; BERNAY, B.; SÉRALINI, G.E. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. **Toxicology**, v. 313, p. 122-128, 2013.
- MESNAGE, R. et al. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. **Food Chem. Toxicol.**, v. 84, p. 133-153, 2015.
- MORENO, N.C.; SOFIA, S.H.; MARTINEZ, C.B.R. Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb® and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. **Environ. Toxicol. Phar.**, v. 37, p. 448-454, 2014.
- MORETON, M.L. et al. Toxicity of the aquatic herbicide, Reward®, on the fathead minnow with pulsed-exposure proteomic profile. **Comp. Biochem. Physiol. Part D**, v. 33, 2020.
- MYERS, J.P. et al. Concerns overuse of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. **Environ. Health**, v. 15, n. 19, 2016.
- NADDY, R.B., JOHNSON, K.A., KLAINE, S.J. Response of *Daphnia magna* to pulsed exposures of chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 19, p. 423–431, 2000.
- NAGEL, R. DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* – a general model in ecotoxicology and toxicology. **ALTEX**, v. 19, n. 1, 2002.
- OLIVEIRA, G.A.R. et al. A test battery for assessing the ecotoxic effects of textile dyes. **Chem-Biol. Interact.**, v. 291, p. 171-179, 2018.
- OLIVEIRA, G.A.R. et al. Textile dyes induce toxicity on zebrafish early life stages. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 35, n. 2, p. 429-434, 2016.
- Organization for Economic Co-Operation and Development [OECD]. Guidelines for Testing of Chemicals, **Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (Guideline 236)**, 2013.
- PARNG, C. et al. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. **Assay Drug Dev. Techn.**, v. 1, n. 1-1, 2002.
- PEREIRA, A.C. et al. The zebrafish embryotoxicity test (ZET) for nanotoxicity assessment: from morphological to molecular approach. **Environmental Pollution**, v. 252, p. 1841-1853, 2019.
- 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.
- REINERT, K.H.; GIDDINGS, J.M.; JUDDS, L. Effects analysis of time-varying or repeated exposures in aquatic ecological risk assessment of agrochemicals. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 21, n. 9, p. 1977-1992, 2002.
- RODRIGUES, L.B. et al. Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides: effects on different organism. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 36, p. 1755-1763, 2017.

RODRIGUES, L.B. et al. Impact of the glyphosate-based commercial herbicide, its components and its metabolite AMPA on non-target aquatic organisms. **Mutat. Res. Gen. Tox. En.**, v.842, p. 94-101, 2019.

RODRIGUEZ-GIL, J.L. et al. Aquatic hazard assessment of MON 0818, a commercial mixture of alkylamine ethoxylates commonly used in glyphosate-containing herbicide formulations. Part 2: roles of sediment, temperature, and capacity for recovery following a pulsed exposure. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 36, n. 2, p. 512-521, 2017.

ROY, N.M.; CARNEIRO, B.; OCHS, J. Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish. **Environ. Toxicol. Pharm.**, v. 72, p. 45-54, 2016.

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

SALEEM, S.; KANNAN, R.R. Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer's disease and neurospecific drug discovery. **Cell Death Discov.**, v. 4, n. 45, 2018.

SHEHWANA, H.; KONU, O. Comparative transcriptomics between zebrafish and mammals: a roadmap for discovery of conserved and unique signaling pathways in physiology and disease. **Front. Cell Dev. Biol.**, v. 7, n. 5, 2019.

SCHOLZ, S. et al. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - applications beyond acute toxicity testing. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 15, n. 5, p. 394-404, 2008.

SCHOLZ, S. Zebrafish embryos as an alternative model for screening of drug-induced organ toxicity. **Arch. Toxicol.**, v. 87, p. 767-769, 2013.

SCHULZ, R.; LIESS, M. Toxicity of fenvalerate to caddisfly larvae: chronic effects of 1- vs 10-h pulse-exposure with constant doses. **Chemosphere**, v. 41, n. 10, p. 1511-1517, 2000.

SCHWEIZER, M. et al. How glyphosate and its associated acidity affect early development in zebrafish (*Danio rerio*). **PeerJ**, v. 7, 2019.

SIEHL, D.L. Inhibitors of EPSP synthase, glutamine synthase and histidine synthesis, in herbicide activity: toxicology, biochemistry and molecular biology. In: ROE, R.M. et al. **Herbicide activity: toxicology, biochemistry, and molecular biology**. IOS Press, 1997. p. 37-65.

SILVA, K.S. **Formulações de herbicidas: o que você precisa saber**. Disponível em: <<https://weedout.com.br/formulacoes-de-herbicidas-o-que-voce-precisa-saber/>>. Acesso em: 03 jun 21.

SMIRNOVA, L. Cellular resilience. **ALTEX**, v. 32, n. 4, p. 247-260, 2015.

SOLOMON, K.R.; THOMPSON, D.G. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate, **J. Toxicol. Environ. Health - Part B-Crit. Rev.**, n. 6, v. 3, p. 289-324, 2003.

- STRÄHLE, U. et al. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments - A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. **Reproductive Toxicology**, v. 33, p. 128-132, 2012.
- SULUKAN, E. et al. An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformation during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 180, p. 77-85, 2017.
- SUN, M.; LI, H.; JAISI, D.P. Degradation of glyphosate and bioavailability of phosphorus derived from glyphosate in soil-water system. **Water Res.**, v. 163, 2019.
- SWANSON, N.L. et al. Genetically engineered crops, glyphosate and the deterioration of health in the United States of America. **J. Org. Syst.**, v. 9, p. 9-37, 2014.
- TANNENBAUM, J.; BENNETT, B.T. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J. Am. Assoc. Lab. Sci.*, v. 54, n. 2, p. 120-132, 2015.
- TARAZONA, J.V. et al. Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. **Arch. Toxicol.**, v. 97, p. 2723-2743, 2017.
- 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.
- TICE, R.R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, p. 206-211, 2000.
- TRESNAKOVA, N.; STARA, A.; VELISEK, J. Effects of glyphosate and its metabolite AMPA on aquatic organisms. **Appl. Sci.**, v. 11, 2021.
- 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.
- TUSH, D.; MAKSIMOWICZ, M.M.; MEYER, M.T. Dissipation of polyoxyethylene tallow amine (POEA) and glyphosate in an agricultural field and their co-occurrence streambed sediments. **Sci. Total Environ.**, v. 636, p. 212-219, 2018.
- VAN BRUGGEN, A.H.C. et al. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Science of Total Environment**, v. 616-617, p. 255-268, 2018.
- VALLOTTON, N. et al. S-metolachlor pulse exposure on the alga *Scenedesmus vacuolatus*: Effects during exposure and the subsequent recovery. **Chemosphere**, v. 73, n. 3, p. 395-400, 2008.
- VON HELLFELD, R. Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Environ. Sci. Eur.**, v. 23, n. 122, 2020.
- WANG, S. et al. (Bio)degradation of glyphosate in water-sediment microcosms – a stable isotope co-labeling approach. **Water Res.**, v. 99, p. 91-100, 2016.

WAN, M.T.; WATTS, R.G.; MOUL, D.J. Effects of different dilution water types on the acute toxicity to juvenile Pacific salmonids and rainbow trout of glyphosate and its formulated products. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 43, p. 376-385, 1989.

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.

WILLIAMS, G.M.; KROES, R.; MUNRO, I.C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 31, p. 117-165, 2000.

WU, M. et al. Bioconcentration pattern and induced apoptosis of bisphenol A in zebrafish embryos at environmentally relevant concentrations. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 24, p. 6611-6621, 2017.

ZHANG, S. et al. Biological impacts of glyphosate on morphology, embryo biomechanics and larval behavior in zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 181, p. 270-280, 2017.

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética (Caro o projeto tenha sido submetido a algum Comitê de Ética em Pesquisa).



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação ecotoxicológica e toxicogenética de contaminantes emergentes presentes em sistemas hídricos", registrada com o protocolo nº 102/14, sob a responsabilidade de Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de 20/08/2018.

- Finalidade: () Ensino (X) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 08/12/2014 a 31/07/2020
- Espécie/linhagem/raça: *Danio rerio* (Zebrafish)
- Nº de animais autorizados: 100 peixes (60 machos e 40 fêmeas)
- Peso/Idade: adultos
- Sexo: machos e fêmeas
- Origem (fornecedor): Petshops da cidade de Goiânia

Dra. Marina Pacheco Miguel
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFV



Goiânia, 13 de abril de 2020.

I - Finalidade do projeto de pesquisa:

II - Identificação:

- Data de apresentação a CEUA:** 06/11/2014
- Data do atendimento da pendência:** 13/04/2020
- Título do projeto:** Avaliação ecotoxicológica e toxicogenética de contaminantes emergentes presentes em sistemas hídricos
- Pesquisador Responsável/ Unidade:** Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira
- Pesquisadores Participantes:** Andrew Henrique de Sousa Carvalho, Lauren Dalat de Sousa Coelho, Maria Eunice Bertelli Pimenta, Michele Resende Machado, Sara Raquel Marques Silva
- Médico Veterinário/CRMV:**
- Unidade onde será realizado:** Faculdade de Farmácia

III – Respostas as pendências:

- ✓ **Solicitação da CEUA:** Apresentação de novo cronograma de atividade contendo a data de encerramento da pesquisa

Resposta do Pesquisador Responsável: O novo cronograma de atividades do projeto foi elaborado para o período de 40 meses, com data de encerramento em 01 de agosto de 2023. Novas técnicas estão sendo incorporadas (a maioria com modelos invertebrados) nesse projeto a fim de caracterizar os diferentes mecanismos de ação tóxica de diversas classes de contaminantes emergentes em diferentes organismos, atendendo, principalmente, a demanda de uma colaboração com o grupo INCT-DATREM (<http://inct-datrem.iq.unesp.br>; com vigência até início de 2023), do qual a proponente faz parte. Desta forma, o novo cronograma do projeto compreende as seguintes etapas: (i) implantar o cultivo das algas *Raphidocelis subcapitata*, dos microcrustáceos de água doce *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*, e da minhoca *Eisenia foetida*. (ii) realizar a criação e manutenção dos peixes adultos de zebrafish, das algas, microcrustáceos e minhocas; (iii) desenvolver e padronizar ensaios para a avaliação da toxicidade aguda, crônica e genotoxicidade com algas, microcrustáceos e minhocas; (iv) promover o acasalamento e a colheita dos ovos de zebrafish; (v) avaliar os efeitos tóxicos dos compostos-testes sobre embriões e larvas de zebrafish, algas, microcrustáceos e minhocas, analisando os indicadores toxicológicos de letalidade, subletalidade e genotoxicidade; (vi) elaborar relatórios científicos e resumos; (vii) elaborar trabalhos de conclusão de curso e exames de qualificação de mestrado e doutorado; (viii) elaborar dissertações de mestrado e teses de doutorado e artigos científicos; (ix) revisão da literatura pertinente ao assunto do projeto de pesquisa, principalmente sobre os testes de toxicidade com algas, microcrustáceos e minhocas, além de atualizações sobre o bem-estar animal, buscando, pelo menos, reduzir o número de embriões de zebrafish necessários para a avaliação dos compostos-testes.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com

VI- Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, o projeto foi considerado **APROVADO** pela *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(s) pesquisador(es) responsável(is) deverá(ão) encaminhar à CEUA-PRPI-UFG 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, a qual está prevista para finalizar suas ações até **30 de agosto de 2023**.

VII- Data da reunião – ad referendum: 13/04/20.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação ecotoxicológica e toxicogenética de contaminantes emergentes presentes em sistemas hídricos**", registrada com o protocolo nº **102/14**, sob a responsabilidade de **Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), ad referendum em 13/04/20.

- Finalidade: () Ensino (X) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 08/12/2014 a 30/08/2023.
- Espécie/linhagem/raça: *Danio rerio* (Zebrafish)
- N° de animais autorizados: 180 peixes (100 machos e 80 fêmeas)
- Peso/Idade: adultos
- Sexo: machos e fêmeas
- Origem (fornecedor): Petshops da cidade de Goiânia

Dra. Marina Pacheco Miguel
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1° andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com