



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
LABORATÓRIO DE COMPORTAMENTO CELULAR

EFEITOS TÓXICOS E GENOTÓXICOS DO HERBICIDA
ROUNDUP TRANSORB[®] EM GUPPY (*Poecilia reticulata*)
SUBMETIDO A TRATAMENTO AGUDO

José de Souza Filho

Goiânia – Goiás – Brasil

Janeiro 2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
LABORATÓRIO DE COMPORTAMENTO CELULAR

**EFEITOS TÓXICOS E GENOTÓXICOS DO HERBICIDA
ROUNDUP TRANSORB[®] EM GUPPY (*Poecilia reticulata*)
SUBMETIDO A TRATAMENTO AGUDO**

Orientando (Mestre): José de Souza Filho, B. Sc.
Orientadora: Prf^a. Dr^a. Simone Maria de Teixeira Sabóia-Morais
Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
(Área de concentração: Biologia Celular e
Molecular) da Universidade Federal de
Goiás, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Biologia.

Goiânia – Goiás – Brasil
Janeiro 2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

Souza Filho, José de.

Efeitos Tóxicos e Genotóxicos do Herbicida Roundup Transorb[®] em Guppy (*Poecilia reticulata*) Submetido a Tratamento Agudo [manuscrito] / José de Souza Filho. - 2011.

xvii, 163 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais; Co-orientadora: Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, 2011.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras e tabelas.

1. *Poecilia reticulata* 2. herbicida 3. Glifosato 4. ensaio cometa 5. teste micronúcleo.

Banca Examinadora

Profª Drª Simone M. T. de Sabóia-Morais - Orientadora - Presidente da Banca

Programa de Pós-Graduação em Biologia

Departamento de Morfologia

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Goiás (UFG)

Prof. Drª Angela Adamski da Silva Reis - Membro Interno

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Goiás (UFG)

Profª Drª Rosália dos Santos Amorin Jesuino – Membro Interno

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Goiás

Aos meus avôs: Umbelino de Souza Lima e Rita Castorina de Lima; José de Almeida e Luzia Pires de Almeida, e meu primo Luiz Márcio de Souza Júnior, que eles possam estar na presença do Criador, e assim com Ele, olhar por todos que amam, agora, são prisioneiros do eterno amor.

DEDICO

Àqueles a quem devo devoto minha missão terrena:

Meus Pais:

José de Souza

Terezinha de Almeida

Minha irmã:

Marinêz de Almeida Souza

Meus pais adotivos:

William Silva Melo

Filomena Maria de Melo Silva

Meu companheiro de anos:

William Melo Júnior

Meu mentor espiritual:

Antônio Alencar Sampaio, Esp.

OFEREÇO

"Nunca sei ao certo se sou um menino de dúvidas ou homem de fé, certezas o vento leva só dúvidas continuam de pé".

Paulo Leminski

"Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena

Acreditar no sonho que se tem

Ou que seus planos nunca vão dar certo

Ou que você nunca vai ser alguém

Tem gente que machuca os outros

Tem gente que não sabe amar

Mas eu sei que um dia a gente aprende

Se você quiser alguém em quem confiar

Confie em si mesmo

Quem acredita sempre alcança!"

Renato Russo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade recebida de desenvolver esse trabalho com dedicação e carinho. Pela saúde que não me faltou para conseguir concluir e dar continuidade a minha missão humana e social.

Agradeço a padroeira do Brasil, Nossa Senhora Aparecida pela força e graças recebidas antes e durante a execução deste trabalho.

Também agradeço a Nossa Senhora do Perpétuo Socorro que me abençoou e fortaleceu durante essa jornada onde encontrei inúmeras dificuldades.

Aos meus familiares (família Souza Lima e Almeida) que de forma direta e indireta me ajudaram através das orações, compreensão, carinho e amor. Também a minha irmã Marinêz de Almeida e Souza e meu cunhado Thiago Bento Fonseca pelo incentivo.

A minha mãe, meu maior exemplo de vida. Obrigado pelo carinho, dedicação e força empreendida ao longo dos meus vinte e sete anos de vida. Lhe devo tudo que tenho e sou.

Agradeço de forma muito especial ao meu grande companheiro Fisioterapeuta Esp. Willian Melo Júnior pelo tempo, dedicação, carinho e ajuda empreendida de forma desmedida.

A todos os meus colegas do Laboratório de Comportamento Celular (LCC/LNB/ICB IV) pelo convívio, amizade e apoio em todo o trabalho realizado.

Um agradecimento especial aos colegas Thiago Lopes Rocha, Ana Paula Rezende, Fernando Santiago Pires, Alex Rodrigues, Mariane Brom Sobreiro, Viviane Gomes Barroso, Prof. M.Sc. Joana Cristina Neves de Menezes Faria, Prof. Dr. Walter Dias Júnior pela amizade, pelas nossas conversas profundas sobre tudo, pelos ensinamentos e discussões científicas, momentos de alegria que ajudaram a aliviar as tensões cotidianas. Em resumo, pessoas que enriqueceram este tempo que passei junto a UFG.

A Universidade Federal de Goiás pela oportunidade concedida para a minha formação e qualificação.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biologia do ICB/UFG pela paciência e competência na transmissão de seus conhecimentos.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Simone M. T. Sabóia-Morais, pelo carinho, atenção, apoio com o qual fui recebido e desfrutei durante estes anos. Também pela oportunidade de aprimoramento na docência através da EAD e do estágio em docência na graduação, meu muito obrigado por tudo que a senhora me proporcionou (formação completa e integral). Obrigado também pelo exemplo, fibra e coragem que em poucas mulheres consegui encontrar.

Ao Núcleo de Pesquisas Replicon/PUC-Goiás e toda equipe pela disponibilidade de materiais e reagentes para desenvolvimento de parte dos testes.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva, pelo força, dedicação, apoio e ensinamentos que enriqueceram bastante o trabalho realizado.

Aos colegas Caio César Neves Sousa, Rafael Cosme Machado, Alex Rocha e Cristiane Torres de Miranda pelo apoio durante o desenvolvimento dos bioensaios no Replicon/PUC-Goiás.

Em especial ao prof. Dr. Aparecido D. da Cruz, uma das minhas grandes referências desde os tempos da graduação.

Aos amigos e colegas do RAN/ICMBio onde comecei minha história de jovem cientista e amante da conservação, a vocês o meu muito obrigado, pela força e o incentivo.

Em especial ao meu amigo Rafael Antônio Machado Balestra analista ambiental do RAN/ICMBio pela amizade, força, conselhos e direção.

Ao Laboratório de Microcópia Eletrônica e ao Departamento de Histologia e Embriologia da UNICAMP pela disponibilidade de materiais e equipamentos para desenvolvimento de parte dos trabalhos.

Aos colegas e amigos que fiz na UNICAMP, obrigado pelo exemplo.

Ao professor Aúreo Tatsumi Yamada pelos ensinamentos profícuos e pelo exemplo de ética, profissionalismo que representa no meio acadêmico. Um dos poucos professores que conheci com tanta coerência e vocação para o ensino, ao senhor o meu muito obrigado. Aprendi muito no pouco tempo que passei ao seu lado.

Ao meu amigo de longas datas Leandro Prudente pela acolhida em sua casa e por me apoiar durante o tempo em que fiquei na UNICAMP. Muito obrigado por tudo.

A minha querida amiga Maria Tereza Pinho Silva pelo apoio, carinho e confiança. Meu muito obrigado pela chance ofertada e por acreditar em mim.

Ao grande amigo e Prof. Dr. Anésio de Lelles Ferreira Filho pelo apoio e ajuda nos momentos mais difíceis. Pelas acolhidas em sua residência, pelo exemplo de profissional e pessoa humana. Meu muito obrigado.

Ao grande amigo e Prof. Dr. Elder Geraldo Domingues pelo incentivo e apoio, pelos conselhos e exemplo, meu muito obrigado por tudo.

Agradeço ao meu querido amigo Prof. M.Sc. José Valladares Neto pela amizade, incentivo e exemplo. É com certeza uma das poucas pessoas que admiro, profissional de coragem e amigo da hora. Valeu!!!

Ao meu grande amigo Prof. Esp. Luciano Nunes da Silva por todo carinho e incentivo. Obrigado por tudo!!!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq pela bolsa de mestrado concedida, sem a qual não seria possível desenvolver este trabalho com grande dedicação.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIV
RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVII
APRESENTAÇÃO	18
1. REVISÃO DA LITERATURA	22
1.1. Caracterização do Bioma Cerrado	22
1.2. Uso do Solo	24
1.3. Uso de Agrotóxico.....	30
1.4. Problemas Ambientais.....	32
1.5. Saúde Coletiva e Uso de Agrotóxicos.....	36
1.6. Consumo de Agrotóxicos (Herbicidas).....	42
1.7. Herbicida Roundup Transorb® (Glifosato).....	45
1.8. Teste de Toxicidade.....	53
1.8.1. Genética Toxicológica – Genotoxicidade e Mutações.....	57
1.8.2- Teste Micronúcleo (MN)	60
1.8.3- Ensaio Cometa (EC).....	63
1.9. Biomarcadores, Bioindicadores, Biotransformação e Biomonitoramento.....	69
2. ESCOLHA DOS BIOINDICADORES.....	71
2.1. Bioindicador escolhido, <i>Poecilia reticulata</i> (Peters, 1860).....	72
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

Artigo 1- EFEITOS TÓXICOS E HISTOPATOLÓGICOS DO HERBICIDA ROUNDUP TRANSORB® EM FÍGADO DE *Poecilia reticulata* (Guppy)

RESUMO	97
ABSTRACT	98
1-INTRODUÇÃO	99
2- MATERIAIS E MÉTODOS101	
2.1- Coleta dos peixes	101
2.2- Determinação da Concentração Média Letal (CL50;12-96h)102	
2.3- Estudos do Comportamento	102
2.4- Análises Físico-químicas da Água dos Aquários.....	102
2.5- Teste Subletal.....	103

2.6- Análises Histopatológicas e Histomorfométrica	103
2.7- Análise estatística.....	105
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	105
3.1- Determinação da CL50	105
3.2- Comparações das CL 50;96h Roundup Original® e Roundup Transorb® para várias espécies de peixes.....	111
3.3- Estudos do Comportamento	114
3.4- Efeitos Histopatológicos e Histomorfometria no Fígado do guppy.....	117
4- CONCLUSÃO	124
AGRADECIMENTOS	124
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

ARTIGO 2- EFEITO MUTAGÊNICO E GENOTÓXICO DO HERBICIDA ROUNDUP TRANSORB® EM CÉLULAS BRANQUIAIS E ERITRÓCITOS DO

Poecilia reticulata	135
RESUMO	135
ABSTRACT	136
1. INTRODUÇÃO.....	137
2- MATERIAL E MÉTODOS	139
2.1- Químicos	139
2.2- Bioensaios com o modelo Poecilia reticulata (Peters, 1860).....	140
2.3- Teste Micronúcleo (MN) e Alterações Morfológicas Nucleares (AMNs)	141
2.4-Ensaio Cometa (EC).....	141
2.5- Análise Estatística).....	142
3- RESULTADOS.....	142
4- DISCUSSÃO	146
AGRADECIMENTOS	153
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	154

LISTA DE TABELAS

1. REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Áreas (em hectares) ocupadas pelas diferentes classes de uso da terra nos estados cobertos pelo Bioma Cerrado (ano-base: 2002; área total do Cerrado: 204,7 milhões de hectares)27

ARTIGO 1- EFEITOS TÓXICOS E HISTOPATOLÓGICOS DO HERBICIDA ROUNDUP TRANSORB® EM FÍGADO DE *Poecilia reticulata* (Guppy)

Tabela 1. Parâmetros adotados para análise histomorfométrica no fígado do *Poecilia reticulata* 105

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão das variáveis físicas e químicas da água no teste de toxicidade aguda em guaru (*Poecilia reticulata*), exposto ao herbicida Roundup Transorb® 109

Tabela 3. CL50, 96 h Roundup Original® e Roundup Transorb® (herbicidas a base de glifosato) para diferentes espécies de peixes dulcícolas 112

Tabela 4. Classificação dos agrotóxicos de acordo com a CL50 para organismos aquáticos definido pelo IBAMA 112

Tabela 5. Manifestações comportamentais do *Poecilia reticulata* em concentrações crescentes do herbicida Roundup Transorb® 115

Tabela 6. Alterações histológicas do fígado de *Poecilia reticulata* em exposição aguda (24 h) ao herbicida Roundup Transorb® em concentrações crescentes, mais grupo controle (0µl/L) com respectivos estágios e frequência das modificações no tecido 120

Tabela 7. Mensurações avaliadas da área, diâmetro, raio e volumedo dos hepatócitos mais o volume e área do citoplasma em tratamentos com Roundup Transorb® 122

Tabela 8. Mensurações avaliadas dos núcleos dos hepatócitos e diâmetro do sinusóide em tratamentos com Roundup Transorb® 122

Tabela 9. Diferenças estatísticas entre os grupos tratados em relação às mensurações histomorfométricos estabelecidos para tecido hepático 122

**ARTIGO 2- EFEITO MUTAGÊNICO E GENOTÓXICO DO HERBICIDA
ROUNDUP TRANSORB® EM CÉLULAS BRANQUIAIS E ERITRÓCITOS DO
*Poecilia reticulata***

Tabela 1. Médias das Alterações Morfológicas Nucleares (AMNs) nos eritrócitos do *Poecilia reticulata* exposto ao herbicida Roundup Transorb® em tratamento agudo 144

Tabela 2. Média dos Scores do Ensaio Cometa analisados nas diferentes concentrações do herbicida Roundup Transorb® em 24 h de exposição 145

Tabela 3. Índice de danos individual (IDi) e total (IDt) nos eritrócitos do *Poecilia reticulata* expostos ao herbicida Roundup Transorb® utilizando o Ensaio Cometa..... 145

LISTA DE FIGURAS

1. REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Área do Cerrado dentro do território brasileiro e distribuição espacial das classes de uso da terra no bioma no ano de 2002.....	26
Figura 2 - Quantidade Vendida de Defensivos Agrícolas, em Produto Comercial e Ingrediente Ativo, Brasil, 2004 a 2009.....	42
Figura 3 - Participação das Classes na Quantidade Vendida de Defensivos Agrícolas, em Produto Comercial, Brasil, 2009.....	43
Figura 4- Estimativa de Vendas Mensais de Defensivos Agrícolas, Brasil, 2007 a 2009	44
Figura 5. Estrutura molecular do glifosato.....	45
Figura 6: A via do Xiquimato.....	47
Figura 7: Diagrama de blocos exemplificando a síntese do Triptofano.....	47
Figura 8: Diagrama de blocos exemplificando a síntese de Fenilalanina e Tirosina.....	48

ARTIGO 1- EFEITOS TÓXICOS E HISTOPATOLÓGICOS DO HERBICIDA ROUNDUP TRANSORB® EM FÍGADO DE *Poecilia reticulata* (Guppy)

Figura 1. Mortalidade (%) do <i>Poecilia reticulata</i> (n= 36) após 96 horas de exposição em cinco concentrações de Roundup Transorb® mais controle negativo, e média dos períodos de exposição nas respectivas concentrações.....	62
Figura 2. CL50 do herbicida Roundup Transorb® em 12, 24, 48, 72 e 96 horas de exposição com os intervalos de confiança (95% superior e inferior).....	62
Figura 3. Representação gráfica da mortalidade do <i>Poecilia reticulata</i> em função da concentração do Roundup Transorb® nos três bioensaios de toxicidade aguda.....	63
Figura 4. Fotomicrografia do tecido hepático do <i>Poecilia reticulata</i> exposto ao Roundup Transorb®.....	72
Figura 5. Cálculo do Índice de Alterações Histopatológico (IAH) para tecido hepático do <i>Poecilia reticulata</i> exposta a concentrações crescentes do Roundup Transorb® pelo período de 24 h.....	74
Figura 6. Representação gráfica da área do hepatócito em função da concentração do Roundup Transorb®.....	77
Figura 7. Representação gráfica da área do núcleo em função da concentração do Roundup Transorb®.....	77

**ARTIGO 2- EFEITO MUTAGÊNICO E GENOTÓXICO DO HERBICIDA ROUNDUP
TRANSORB® EM CÉLULAS BRANQUIAIS E ERITRÓCITOS DO *Poecilia reticulata***

Figura 1. Scores estabelecidos para análise de dano ao DNA pelo Ensaio Cometa 141

Figura 2. Alterações Morfológicas Nucleares nos eritrócitos dos peixes expostos ao herbicida Roundup Transorb®..... 143

Figura 3. Frequência absoluta e cálculo do coeficiente de regressão linear das AMNs encontradas nos eritrócitos do *Poecilia reticulata* exposto ao herbicida Roundup Transorb® nas diferentes concentrações..... 143

Figura 4. Média dos níveis de Scores encontrados em células do *Poecilia reticulata* no Ensaio Cometa em diferentes concentrações do herbicida Roundup Transorb® 146

RESUMO**EFEITOS TÓXICOS E GENOTÓXICOS DO HERBICIDA ROUNDUP TRANSORB® EM GUPPY
(*Poecilia reticulata*) SUBMETIDO A TRATAMENTO AGUDO**

Os efeitos de substâncias tóxicas, mutagênicas e genotóxica sobre órgãos-alvos e o genoma de peixes tem sido objeto de muitos estudos, sobretudo daqueles que buscam estabelecer respostas destes órgãos e dos genes aos estímulos ambientais. Estudos histopatológicos, mutagênicos, genotóxicos e em *Poecilia reticulata* (Guppy) foram motivados pela escassez de dados na literatura referente aos efeitos provocados pela formulação do herbicida Roundup Transorb®. Com tudo, pretendeu-se conhecer os efeitos produzidos por essa formulação que é bastante utilizada no Centro-Oeste do país. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação tóxica, mutagênica e genotóxica do herbicida R. Transorb® em fígado, brânquia e eritrócito do guppy, calculando a CL₅₀ e aplicando Teste de Micronúcleo (MN) e Ensaio Cometa (EC). Os bioensaios de toxicidade foram realizados para calcular a CL_{50,12-96h}, avaliar os efeitos das concentrações subletais do herbicida submetido a tratamento agudo. Utilizou-se 36 peixes adultos, pesando em média 0,496g ± 0,28g para cálculo da CL₅₀ e 75 peixes também adultos para realizar o MN e EC. Durante a exposição ao herbicida observou-se o comportamento dos peixes em todas as concentrações e controlada as variações químicas e físicas da água. Os eritrócitos foram obtidos pela centrifugação das brânquias sendo adicionado soro fetal bovino ao precipitado, e posteriormente gotejado sobre as lâminas para realizar o esfregaço e eletroforese. Para a análise das lâminas, foram contadas 75.000 células e estipulada a frequência de ocorrência de Alterações Morfológicas Nucleares (AMNs), e para EC foram analisadas 100 células por espécime. A CL_{50; 12, 24, 48, 72 e 96 h} do R. Transorb® foram de 11.24; 8.55; 6.5; 6.10 e 5.65µl/L, respectivamente, indicando que esta espécie é bastante sensível ao herbicida estudado em relação às demais espécies tropicais analisadas. Esses fatores podem estar relacionados às diferentes formulações dos herbicidas e seus respectivos surfactantes. Verificou-se que a porcentagem de mortalidade dos peixes intoxicados pelo herbicida aumentou à medida que as concentrações de exposição aumentaram. Os valores da CL_{50; 12- 96 h} apresentam tendência de queda ao longo do tempo, sugerindo que em períodos de menor exposição serão necessárias quantidades maiores de herbicida para causar a mortalidade de 50% da população de animais. Os animais expostos ao herbicida apresentaram alterações comportamentais variadas, tais como: agressividade; irritabilidade; perda do reflexo de fuga; escurecimento da superfície corporal e choque contra a parede do aquário. Além disso, o R. Transorb® induziu alterações hitológicas hepáticas prejudicando de forma sensível o funcionamento normal deste órgão. No MN e EC foi possível detectar efeitos mutagênicos e genotóxicos significativos nos eritrócitos e células da brânquia, ocorrendo aumento gradual no número de células com AMNs e com danos ao DNA de acordo com aumento das concentrações, indicando efeito concentração-dependente. Este herbicida apresenta toxicidade aguda para guppy, promovendo alterações comportamentais, agindo possivelmente de forma danosa não só no fígado, mas também no sistema nervoso e branquial. Tais resultados sugerem também que a formulação deste herbicida possui ação genotóxica e mutagênica em eritrócitos e células branquiais detectados através dos MN e EC. Por tanto, se confirma o alto risco deste herbicida ao meio ambiente, sua contaminação pode apresentar forte ameaça para as populações de peixes e outros organismos tanto vertebrados como invertebrados e saúde do homem.

Palavras Chaves: *Poecilia reticulata*, herbicida, glifosato, ensaio cometa e teste micronúcleo.

ABSTRACT

TOXIC EFFECTS AND GENOTOXICITY OF ROUNDUP TRANSORB® IN GUPPY (*Poecilia reticulata*)
SUBMITTED TO ACUTE TREATMENT

The effects of toxic, mutagenic and genotoxic on target organs and the fish genome has been the subject of many studies, especially those that seek to establish these bodies and responses of genes to environmental stimuli. Histopathological studies, mutagenic, genotoxic and *Poecilia reticulata* (Guppy) were motivated by the scarcity of data in the literature concerning the effects of the formulation of the herbicide Roundup Transorb®. With everything, we sought to ascertain the effects produced by this formulation that is widely used in the Midwest of the country. This study aimed to evaluate the toxicity and mutagenic and genotoxic herbicide R. Transorb® in liver, gill and erythrocytes of the guppy, calculating and applying the LC₅₀ test micronucleus (MN) and Comet assay (AC). The toxicity bioassays were performed to calculate the LC_{50;12-96h}, to evaluate the effects of sublethal concentrations of herbicide subjected to acute treatment. We used 36 adult fish, weighing on average 0.496 g ± 0.28 g to calculate the LC₅₀ and 75 adult fish also carry the MN and AC. During exposure to the herbicide was observed fish behavior at all concentrations and controlled chemical and physical changes of water. The erythrocytes were obtained by centrifugation of the gills being added to precipitate fetal calf serum, and then dripped on the slides to make the smear and electrophoresis. For the analysis of plates, 75.000 cells were counted and stipulate the frequency of occurrence of Nuclear Morphological Changes (AMNs) and AC were analyzed for 100 cells per specimen. The LC_{50; 12, 24, 48, 72 e 96h} of R. Transorb® were 11:24, 8:55, 6.5, 6.10 and 5.65µl/L, respectively, indicating that this species is very sensitive to the herbicide studied in relation to other tropical species analyzed. These factors may be related to different formulations of herbicides and their respective surfactants. It was found that the mortality rate of fish poisoned by the herbicide increased as exposure concentrations increased. The values of LC_{50;12-96h} show a downward trend over time, suggesting that during periods of reduced exposure will require greater amounts of herbicide to cause mortality of 50% of the population of animals. Animals exposed to the herbicide showed behavioral changes varied, such as aggressiveness, irritability, loss of the escape reflex, darkening of the body surface and banging against the wall of the aquarium. In addition, R. Transorb® hitológicas induced liver changes appreciably impairing the normal functioning of this organ. In MN and EC was possible to detect significant genotoxic and mutagenic effects in erythrocytes and gill cells, occurring gradual increase in the number of cells with AMNs and ADN damage under higher concentrations, indicating concentration-dependent effect. This herbicide has acute toxicity to guppy, promoting behavioral changes, possibly acting in a manner damaging to the liver but also in the nervous system and gill. These results also suggest that the formulation of this herbicide has genotoxic and mutagenic in erythrocytes and gill cells detected by the MN and AC. Therefore, it confirms the high risk of herbicide to the environment, its contamination may present a strong threat to populations of fish and other organisms both vertebrates and invertebrates and human health.

Key words: *Poecilia reticulata*, pesticides, glyphosate, comet assay and micronucleos test.

APRESENTAÇÃO

O Brasil se destaca como país de maior potencial para a expansão da agricultura e aquicultura, neste momento em que é crescente a demanda mundial por alimentos, não apenas em função da expansão populacional, mas também pela preferência por alimentos mais saudáveis (Rocha, 1997; Pires, 1999; Sano *et al.*, 2002).

O ambiente rural brasileiro, em especial a região Centro-Oeste (Bioma Cerrado), ao longo das últimas três décadas tem influenciado com a dicotomia rural-urbana como resultado do processo de industrialização da agricultura. O consumo de herbicidas nessa região aumentou muito nas três últimas décadas (1980-2010) devido à exploração indiscriminada deste bioma e continua crescente pelo aumento da área plantada de cana-de-açúcar, soja, milho e citros (CERAGRO, 2010).

Observou-se e constatou-se que na região Centro-Oeste existe grande quantidade de propriedades rurais que realizam o plantio de várias monoculturas, dando preferência pela utilização do herbicida a base de glifosato da marca Roundup Transorb[®], produzido pela Monsanto Brasil. Tal herbicida é bastante utilizado pelos agricultores, que descreve o produto como eficaz de ação rápida no combate de pragas, principalmente em períodos de chuva (AGRODEFESA, 2009).

A população dessa região está em constante exposição a substâncias químicas presentes nessa formulação de agrotóxico que atinge as águas subterrâneas e superficiais e os alimentos, além da poluição gerada pela atividade humana, assim como também a diversas fontes de radiação natural e artificial. Destes agentes físico-químicos, apenas uma pequena parcela possui estudos que avaliam seus efeitos sobre os seres humanos e outros organismos.

O *Chemical Abstract Service* (CAS) divisão da *American Chemical Society* possuía em 2010 em seus registros mais 43 milhões de substâncias orgânicas e inorgânicas e mais de 62 milhões de sequências químicas. Tais substâncias são lançadas ao meio ambiente por períodos longos e em sua maioria são de difícil adsorção e degradação (CAS, 2010).

Desta forma com frequência cada vez maior, compostos químicos estranhos ao ambiente, chamados genericamente de xenobióticos (agentes tóxicos), têm chegado e influenciado a dinâmica dos ecossistemas e a saúde humana (Spadotto, 2006).

Existe ainda, uma grande demanda por fontes de água pura e segura para fins de consumo humano, agricultura e lazer. As águas utilizadas para este consumo, normalmente provêm de grandes reservatórios naturais como lagos ou rios que frequentemente recebem resíduos domésticos, industrial e agrícola (Spadotto, 2006).

Alguns dos agentes tóxicos que com maior frequência alcançam os ecossistemas são os bifenis policlorados (PCBs), os pesticidas organoclorados e organofosforados (OCPs), os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) e as dioxinas entre outros (Balnova, 1993; Brambilla *et al.*, 1993; Tekel & Kovacicová, 1993; Pereira *et al.*, 1996).

Percebendo esse cenário regional que utiliza grande quantidade do Roundup[®], onde segundo trabalhos toxicológicos publicados apontam que este produto se comporta como organofosforado (Souza *et al.*, 2006), desta forma, é importante a avaliação de sua toxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade *in vivo*. Para realização dessas análises foi escolhida a espécie sentinela *Poecilia reticulata* (guppy) por ser peixe de pequeno porte, por tanto de fácil manuseio em aquários, assim como para coleta e processamento de materiais para biomarcação (Kiss, *et al.* 2003).

Entendendo-se como biomarcador, qualquer mudança de resposta biológica a elemento ou substância química presente no ambiente que seja passível de ser detectada por alterações celulares e moleculares; por alterações fisiológicas; por mudanças comportamentais no organismo em estudo. Entre os diferentes tipos de biomarcadores destacam-se os parâmetros hematológicos, imunológicos, reprodutivos, endócrinos, fisiológicos, morfológicos, enzimáticos e genotóxicos, dentre outros (Peakall, 1994; Amorim, 2003).

Esse estudo permitiu avaliar os efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos em fígado, células branquiais e eritrócitos do guppy. O entendimento da toxicidade desse herbicida e sua quantificação são ferramentas úteis para o estabelecimento de mecanismos efetivos de controle e avaliação de risco real à saúde e ao ambiente. Deste modo, o estudo da toxicidade por exposição induzida do agente tóxico (Roundup Transorb[®]) representa maior perspectiva para a toxicologia aquática. A utilização de biomarcadores e a parametrização do guppy como modelo de avaliação dos *endpoints* constituem ferramenta eficaz e muito relevante para a adoção de políticas públicas que visem à proteção das comunidades aquáticas e da saúde humana. Permitindo o estabelecimento de biomarcadores eficientes para avaliação do risco do uso deste produto, auxiliando no estabelecimento de concentrações máximas permissíveis nos corpos d'água, visando à proteção das comunidades aquáticas e à saúde pública, uma vez que o potencial consumidor final deste recurso é o homem.

1. INTRODUÇÃO

A degradação ambiental no Cerrado, decorrente da exploração da agropecuária, tem transformado consideravelmente o seu perfil, resultando em excesso de desmatamento, compactação do solo, erosão, assoreamento de rios, contaminação da água subterrânea, e perda de biodiversidade, com reflexos sobre todo o ecossistema (Cunha *et al.*, 2008). Segundo Sano *et al.* (2002), aproximadamente 42% das áreas nativas do Cerrado já foram convertidas para atividades agropastoris.

Neste século, as principais ameaças à biodiversidade no Cerrado estão centradas na expansão da agricultura e da pecuária, que tem sido efetivada, em geral, mediante a conversão de áreas de Cerrado em áreas de agropecuária, com perda de vegetação originária. Esta expansão da agropecuária tem sido feita com uso intensivo de agrotóxicos, fertilizantes e corretivos (Cunha *et al.*, 2008).

Bioma Cerrado têm sido alvo de poucas ações concretas e estudos visando a sua conservação (Ratter *et al.*, 2006). Estudos mostram que permanecem intactos apenas 20% da cobertura original do Cerrado em todo o país e somente 2,2% deste bioma estão inseridos em áreas protegidas (Machado *et al.*, 2004). Em Goiás as unidades de conservação federais, estaduais, municipais e particulares totalizam apenas 4,89% do território goiano (Galinkin, 2001; Brasil, 2006), índice muito inferior ao mínimo (10%) considerado necessário pela maioria dos especialistas.

Além da rápida e drástica redução de área, pressões antrópicas diversas ameaçam permanentemente as áreas remanescentes. Tais pressões, cada vez mais intensas e frequentes em decorrência, sobretudo, de atividades agropecuárias, determinaram significativos danos ambientais aos ecossistemas do Cerrado (Alger & Lima, 2003), principalmente pelo uso de agrotóxicos nas plantações.

O consumo anual de agrotóxicos no Brasil tem sido superior a 300 mil toneladas de produtos comerciais. Expresso em quantidade de ingrediente-ativo (i.a.), são consumidas anualmente no país cerca de 130 mil toneladas; representando um aumento no consumo de agrotóxicos de 700% nos últimos quarenta anos, enquanto a área agrícola aumentou 78% nesse período (Spadotto, 2006).

Presença de agrotóxicos tem sido relatada em águas superficiais, subterrâneas e em água de chuva (Buser, 1990; Funari *et al.*, 1995). Agrotóxicos têm sido encontrados na atmosfera

mesmo distantes de áreas agrícolas (Grover *et al.*, 1997; Laabs *et al.*, 2002). Resíduos desses produtos têm sido ainda encontrados no orvalho (Glofelty *et al.*, 1987), na neve do ártico (Gregor e Gummer, 1989) e na névoa do oceano (Schomburg e Glofelty, 1991), promovendo danos crescentes a biota aquática e terrestre pela acumulação de tais substâncias químicas que alcançam de forma direta o homem.

Dentre os grupos de agrotóxicos utilizados no Bioma Cerrado/Centro-Oeste/Goiás se destaca o herbicida a base de glifosato (Roundup Transorb[®]) (EMBRAPA, 2002; AGRODEFESA, 2009), este herbicida também tem sido amplamente utilizado, principalmente como dessecante em cultivos sob plantio direto, nas entrelinhas de culturas e na eliminação de plantas daninhas de ambientes aquáticos (Rodrigues & Almeida, 1995; AGRODEFESA, 2009).

Os produtos à base de glifosato são altamente tóxicos para pessoas e animais. Entre os sintomas mais comuns registrados são: irritação nos olhos e pele, dor de cabeça, náuseas, entorpecimento, elevação da pressão arterial e palpitações. O surfactante polioxietileno-amina (POEA) usado no produto formulado (Roundup[®]) é mais tóxico que o glifosato puro; a combinação dos dois potencializa a ação tóxica (Cox, 1998).

Embora a comercialização deste herbicida seja liberada, estudos laboratoriais detectaram efeitos adversos em todas as categorias dos testes toxicológicos. Entre eles, a toxicidade em médio prazo, toxicidade em longo prazo, danos genéticos, efeitos reprodutivos, e carcinogenicidade (Cox, 1998). Esses testes podem ser realizados em espécies mamíferos e não mamíferos como peixes, crustáceos, répteis e anfíbios.

Os peixes são geralmente usados como organismos sentinela por possuírem grande importância na cadeia trófica, acumulando substâncias tóxicas e respondendo a baixas concentrações de mutagênicos (Çavas & Ergenegozukara, 2005). Assim, o uso de peixes como indicador de efeitos da ação tóxica de certa substância, através da biomarcação é de grande importância, permitindo a detecção de problemas aquáticos (López-Barea, 1996; Van Der Oost *et al.*, 2003).

O emprego de parâmetros genotóxicos, principalmente em organismos aquáticos como forma de avaliar potencial tóxico da substância teste, bem como alterações de seu potencial tóxico ou genotóxico após interação com o ambiente é extremamente válido. Em nível celular pode-se utilizar, pelo menos, dois tipos de bioindicadores como indicativos de dano ao material genético: o teste do micronúcleo e o Ensaio Cometa (Bomfim & Carvalho, 2008).

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Caracterização do Bioma Cerrado

Ao longo dos anos, por causa do aumento da população mundial e do rápido desenvolvimento industrial tornou-se necessário aumentar a produtividade agrícola, visando à produção de alimentos. Em consequência, após a 2ª Guerra Mundial (1939- 1945), passou-se a utilizar, cada vez mais, não só fertilizantes, como também pesticidas, incluindo os inseticidas, herbicidas e fungicidas, para defender as lavouras de insetos, ervas daninhas e fungos (Bonacella, 1990). No entanto a presença de tais substâncias contaminantes no meio ambiente, em sua maioria xenobióticos, tornou-se grave problema, provocando a formação e deposição de grandes quantidades de resíduos (Castro Júnior *et al.*, 2006).

No Brasil o Bioma Cerrado é segundo maior bioma brasileiro, possuindo um terço da biodiversidade nacional e 5% da flora e da fauna mundiais. A flora deste bioma é considerada a mais rica dentre as savanas do mundo (WWF, 1995), ocupa um quarto do território brasileiro, com total superior a 200 milhões de hectares. Deste, 155 milhões de hectares está no Planalto Central e 38,8 milhões de hectares no Nordeste (Freire, 1997), a maior parte (30,3 milhões de hectares) na região Meio-Norte: Maranhão com 43,3% e Piauí com 64,7% (Rocha, 1997). Existem áreas de Cerrado em Rondônia, Roraima, Amapá e Pará, bem como em São Paulo. É nítido o contraste entre o papel deste bioma na manutenção dos grandes equilíbrios biogeoquímicos planetários e o valor que lhes é atribuído pela opinião pública brasileira e internacional (Abramovay, 1999).

Outra característica do Cerrado Brasileiro é a sua capacidade de armazenamento de carbono. A ausência de florestas densas é compensada pela grande extensão e pela vegetação com raízes profundas. Estas raízes formam uma imensa “floresta subterrânea”, que torna significativa a contribuição do Cerrado em termos de absorção de carbono na atmosfera terrestre (Hogan *et al.*, 2002; Sawyer, 2002; Santos, Barbieri & Carvalho, 2010).

A água acumulada nos lençóis freáticos deste bioma no Centro-Oeste abastece nascentes que dão origem a seis das oito maiores bacias hidrográficas brasileiras, exceção apenas para as bacias do Rio Uruguai e do Atlântico Sudeste. Além disso, a região central do Brasil distribui as águas das bacias do Amazonas, do São Francisco e Prata, e sua abundância hídrica é importante para vegetação (Pires, 1996).

O clima dessa região é estacional, com período chuvoso, que dura de outubro a março, seguido por outro período de seca, de abril a setembro. A precipitação média anual é de 1.500mm e as temperaturas são geralmente amenas ao longo do ano, entre 22°C e 27°C em média. Os remanescentes de Cerrado que existem nos dias de hoje desenvolveram-se sobre

solos muito antigos, intemperizados, ácidos, depauperados de nutrientes, mas que possuem concentrações elevadas de alumínio (muitos arbustos e árvores nativos do Cerrado acumulam o alumínio em suas folhas – Haridasan, 1982). Para torná-los produtivos para fins agrícolas, aplicam-se fertilizantes e calcário aos solos do Cerrado. A pobreza dos solos, portanto, não se constituiu em obstáculo para a ocupação de grandes extensões de terra pela agricultura moderna, especialmente a cultura da soja, um dos principais itens da pauta de exportações do Brasil, e as pastagens plantadas (Klink & Machado, 2005).

Os latossolos são considerados as áreas privilegiadas de expansão da agricultura especializada em grãos pela facilidade que oferecem à mecanização. Mas é importante não perder de vista que o crescimento destas culturas supõe a adaptação do solo e do regime hídrico a plantas cujas exigências não podem ser satisfeitas pelos recursos disponíveis: mais que isso, tanto a mecanização, como o uso em larga escala de fertilizantes químicos, agrotóxicos e irrigação contribuem decisivamente para empobrecer a diversidade genética destes ambientes. O plantio direto – cuja adoção vem aumentando significativamente nos Cerrados do Centro-Oeste, chegando hoje a três milhões de hectares – tem aí um papel decisivo. A rotação de culturas, sobretudo em áreas de pecuária é principal meio para recuperar pastagens degradadas e aumentar a oferta de grãos sem a abertura e a degradação de novas áreas (Pires, 1996).

Estudos anteriores indicaram uma área aberta, superior a 85 milhões de hectares até o início do presente século, representando cerca de 48% da superfície coberta pelo Cerrado no Brasil. Esse avanço indiscriminado, sem plano de manejo sustentado, tem ameaçado, substancialmente, a biodiversidade do Cerrado. Apesar de sua aparente uniformidade, o Cerrado guarda grande variedade de espécies de seres vivos, bem como variados e importantes subsistemas, dentre os quais, as Veredas (WWF, 1995; Ferreira, 2005).

Apesar de todo aparato de Leis, Decretos e Resoluções, a Legislação não está sendo cumprida a contento quanto à preservação ambiental no Brasil, principalmente no que se refere ao Cerrado e seus subsistemas. Assim, vemos que não se cumpre o determinado no Código Florestal Brasileiro, Resoluções e Decretos complementares, emitidos pelos órgãos “competentes”. Os órgãos institucionais auferidos da competência de gerir e fiscalizar o cumprimento da legislação ambiental não tem exercido sua função institucional no que se refere às paisagens do Cerrado. Especificamente no Estado de Goiás, a Lei 12.596, que instituiu a Política Florestal, primeiramente torna o Bioma Cerrado “Patrimônio Natural do Estado”, estabelecendo em seus artigos uma série de restrições ao uso de seus subsistemas, porém, conflituosamente apresenta a questão da “função social da propriedade”, ponto passível de discussão segundo interesses vários, principalmente o político. Também não estabelece e nem

delimita, com clareza, os seus vários subsistemas, especialmente o de Vereda, fazendo apenas uma alusão ao mesmo, continuando o processo de devastação do Cerrado com abertura de novas frentes agroindustriais (Malheiros, 2000; Ferreira, 2005).

Ferreira (2005) sugere um trabalho mais focado na política de esclarecimento e observância da legislação, exigindo que os órgãos competentes atuem junto à população e comunidades que estão inseridas nas áreas de Cerrado. Sem esse trabalho, a legislação continuará sendo apenas parte burocrática e o Bioma Cerrado continuará sendo explorado sem ordem e critérios pré-estabelecidos frente a legislação em vigor. Na realidade, o usuário dos recursos do Cerrado ainda não conseguiu perceber a importância do mesmo, conseqüentemente, não atribuiu valorização quanto à importância de sua preservação, corroborado pela ineficácia da fiscalização institucional brasileira, especialmente do Estado de Goiás. Assim, falta a implantação de política educacional mais eficaz, com referência a preservação ambiental e do patrimônio genético desse bioma, bem como a estruturação de instituições de pesquisa visando o estudo e preservação do Cerrado (Santos Barbieri & Carvalho, 2010)

Como se pode perceber, a grande maioria das descrições ou conceituações auferidas ao Cerrado e subsistemas são desprovidas de significância perceptiva, uma vez que estas definições são, na maioria, feitas de fora, sem que o observador participe do espaço (Bioma Cerrado) interagindo de forma direta (Malheiros, 2000; Ferreira, 2005).

Geralmente estas definições são feitas considerando documentação pré-existente, não sendo extraídas de observação e experiência de campo, onde o observador possa se sentir como parte integrante. Muito mais, talvez, pela necessidade de ocupar esses ambientes para deles usar seus recursos, especialmente a água e o solo (Ferreira, 2005; Santos, Barbieri & Carvalho, 2010).

1.2.Uso do Solo

O Cerrado Brasileiro vem sofrendo um acelerado processo de degradação devido ao crescimento das cidades nele localizadas, mas, principalmente, pela expansão da agricultura e da pecuária. O impacto ambiental mais evidente desse processo é o desaparecimento gradativo do ecossistema e a sua substituição por uma paisagem bastante homogênea, formada por pastagens e por grandes lavouras (Santos, Barbieri & Carvalho, 2010).

No Censo Demográfico de 2000, por exemplo, o Brasil apresentou uma densidade demográfica de 19,94 habitantes por quilômetro quadrado, enquanto, para a região do Cerrado Brasileiro, foi de apenas 8,82. Ademais, somente a população residente na região metropolitana

de Goiânia e no Distrito Federal totalizava, em 2000, mais de 3,69 milhões de pessoas, ou seja, 20,5% da população total do Cerrado ocupavam apenas 0,5% da área total do bioma (Klink & Moreira, 2002).

Abrangendo aproximadamente 25% do território nacional, o Cerrado é o bioma brasileiro que mais vem sofrendo com a pressão antrópica. Segundo Sano *et al.* (2002), aproximadamente 42% das áreas nativas do Cerrado já foram convertidas para atividades agropastoris. Deste total, 35 milhões são pastagens cultivadas, 10 milhões voltam-se às culturas anuais e 2 milhões correspondem a culturas perenes (café e fruteiras) e florestais. Os Cerrados respondem por 30% das principais lavouras, além de abrigar 40% do rebanho bovino e 20% do rebanho suíno nacional (Rocha, 1997). Apenas 7% deste bioma não foram submetidos a algum tipo de exploração intensiva ou extensiva (Assad e Assad, 1999).

Na Figura 1, apresenta a distribuição espacial das classes de uso da terra dentro do Cerrado Brasileiro. Nela, fica evidente o papel da expansão da agricultura e da pecuária, dentro do processo de degradação do bioma. Os números referentes ao tamanho da área do Cerrado urbanizada ou convertida em pastagens ou lavouras divergem bastante, devido a questões metodológicas e à dificuldade de se monitorar o processo de ocupação do solo da região (Santos, Barbieri & Carvalho, 2010).

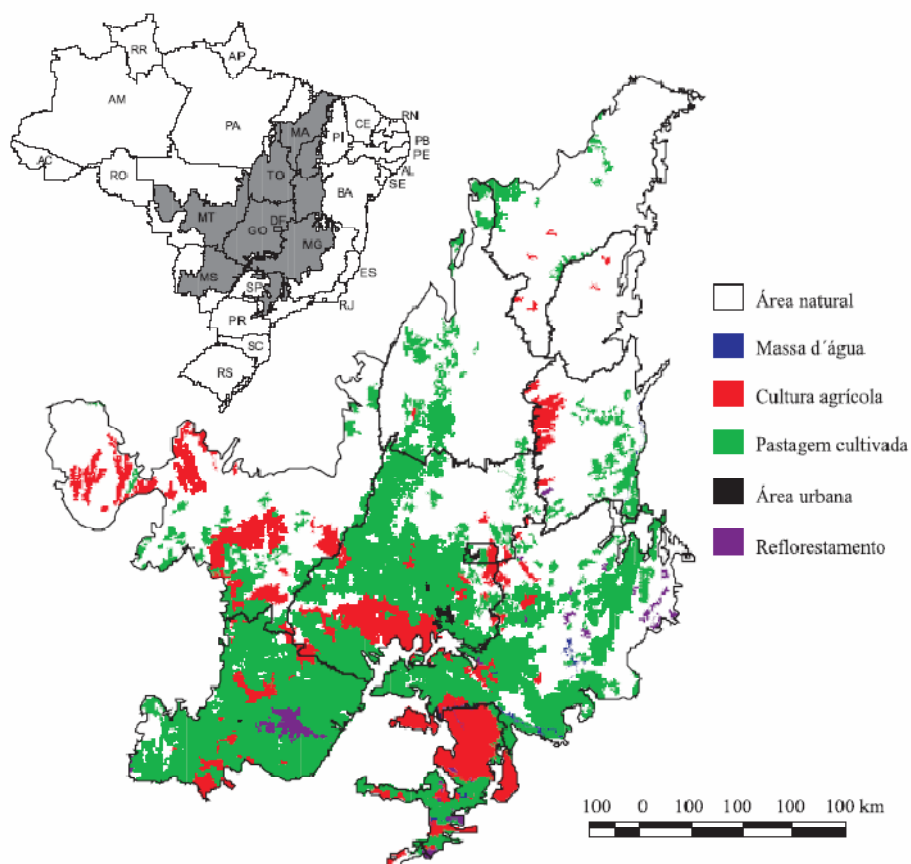


FIGURA 1. Área do Cerrado dentro do território brasileiro e distribuição espacial das classes de uso da terra no bioma no ano de 2002. Fonte: Sano *et al.*, 2008.

Segundo Sano *et al.* (2008), o mapeamento de uso da terra do Cerrado torna-se um desafio em decorrência da extensão, da dinâmica acentuada da ocupação humana, da sazonalidade da vegetação natural e da confusão espectral entre certas classes temáticas.

Foram identificados 80 milhões de hectares, sob diferentes usos da terra do Bioma Cerrado, o que corresponde a 39,5% da área total do Cerrado. As duas classes mais representativas de uso da terra, isto é, as pastagens cultivadas e as culturas agrícolas, ocuparam 26,5 e 10,5% do Cerrado, respectivamente, e apresentaram distribuição espacial bastante heterogênea na região de estudo (Tabela 1). As áreas mais extensas de uso da terra foram encontradas na porção sul, enquanto a maior parte da vegetação natural localizou-se na porção norte (Figura 1). Esse retrato é fruto do próprio histórico de ocupação das terras do Brasil. A ocupação do Cerrado iniciou-se na década de 1920, quando a indústria de café estava em plena atividade, principalmente no Estado de São Paulo. Mais tarde, com o esgotamento de terras férteis do Sul e Sudeste do Brasil e com o crescimento populacional, o governo de Getúlio Vargas (1930-1945) promoveu um incentivo à ocupação do sul do Estado de Goiás, por meio de fornecimento de subsídios e assistência técnica aos pecuaristas interessados (Klink & Moreira, 2002). A porção norte mostrou-se relativamente preservada por causa das dificuldades de acesso e pela maior distância dos grandes centros urbanos e consumidores (Sano *et al.*, 2008).

Tabela 1. Áreas (em hectares) ocupadas pelas diferentes classes de uso da terra nos estados cobertos pelo Bioma Cerrado (ano-base: 2002; área total do Cerrado: 204,7 milhões de hectares).

Estado	Cerrado ⁽¹⁾ (%)	Cultura agrícola	Pastagem cultivada	Reflorestamento	Área urbana	Área com mineração	Total	Uso da terra (%)
PI	37	215.265	521.731	1.379	20.933	0	759.307	8
MA	65	356.028	1.901.655	27.171	35.876	0	2.320.731	11
TO	91	175.565	4.253.134	376.645	36.350	2.406	4.844.100	19
BA	27	1.572.701	2.257.253	125.869	11.892	0	3.967.715	26
MT	40	5.561.053	6.508.944	31.974	64.268	3.289	12.169.529	34
MG	57	2.122.452	11.838.147	1.302.344	171.832	1.889	15.436.664	46
CO	97	5.037.522	12.931.552	50.514	182.089	0	18.201.676	55
DF	100	137.455	119.749	3.504	101.853	0	362.561	62
MS	61	2.712.019	10.948.449	1.017.755	61.630	73	14.739.925	68
PR	2	83.534	103.739	66.697	1.892	0	255.863	68
SP	33	3.585.977	2.622.416	533.236	200.445	213	6.942.286	85
Total		21.559.571	54.006.770	3.537.088	889.059	7.870	80.000.357	39

⁽¹⁾Porcentagem do estado coberto pelo Bioma Cerrado.

Fonte: Sano *et al.* (2008)

São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul foram os estados que apresentaram os menores índices de cobertura vegetal natural: 15, 32 e 32%, respectivamente. Por sua vez, os três

estados da região norte do Cerrado, Piauí, Maranhão e Tocantins, apresentaram os maiores índices de preservação: 92, 89 e 79%, respectivamente. As áreas de reflorestamento concentram-se principalmente nos estados de São Paulo, Goiás e Minas Gerais. As outras classes de uso da terra consideradas no trabalho de Sano *et al.* (2008) ocuparam áreas bem menos extensas: 889 mil hectares de área urbana e 7.870 hectares de área com mineração. A exatidão global do mapa final foi de 96,5% segundo Sano *et al.* (2008).

SISTEMA DE PLANTIO NO CERRADO

O grande desafio para qualquer empreendimento agrosilvipastoril nos Cerrados está na implementação de sistemas de manejo que possibilitem o bom uso dos recursos naturais – solo, água, ar e biodiversidade. Assim, o planejamento do uso e manejo da terra, associado à adoção de sistemas conservacionistas como o plantio direto, é essencial à manutenção do frágil equilíbrio entre a necessidade de produção de alimentos e a preservação ambiental da região (EMBRAPA, 2003).

O sistema de plantio direto (SPD) é a forma de manejo conservacionista que envolve um conjunto de técnicas integradas que visam otimizar a expressão do potencial genético de produção das culturas com simultânea melhoria das condições ambientais (água-solo-clima). O SPD está fundamentado em três requisitos mínimos: revolvimento do solo restrito à cova ou sulco de plantio, a biodiversidade pela rotação de culturas, e a cobertura permanente do solo com culturas específicas para formação de palhada. Estes requisitos são associados, ainda ao manejo integrado de pragas, doenças e plantas invasoras (Salton *et al.*, 1998, Plataforma Plantio Direto, 2001; Freitas, 2002; EMBRAPA, 2003).

No SPD há redução da perda de solo, água e nutrientes por erosão devido à manutenção da agregação do solo, da cobertura vegetal e de restos culturais na superfície. Por isso o SPD é a alternativa para a sustentabilidade dos recursos naturais e utilização agrícola do solo, em contraponto ao modelo usual de exploração agrícola da região, baseado na pecuária extensiva e nas monoculturas intensivas que revolvem o solo com práticas de aração e gradagens. Por suas reconhecidas características comprovadas amplamente pela pesquisa, o SPD é considerado como importante ação ambiental brasileira em atendimento às recomendações da conferência da Organização das Nações Unidas (Eco-92) e da Agenda 21 brasileira, em harmonia com o acordado no Protocolo Verde (Plataforma Plantio Direto, 2001; EMBRAPA, 2003).

A ausência do revolvimento do solo, a rotação de culturas e a permanente cobertura do solo com plantas ou restos culturais melhoram a condição estrutural do solo. Esta melhoria também é observada nas características químicas e biológicas. Estes processos se refletem

diretamente na melhoria da fertilidade do solo, levando ainda à redução futura da utilização de corretivos e fertilizantes. No entanto, os procedimentos de recomendação de adubação no Brasil foram desenvolvidos para o sistema convencional de preparo do solo. Existem recomendações de adubação para SPD para a região Sul do Brasil, porém ainda faltam recomendações para a região dos Cerrados (Freitas *et al.*, 1998; EMBRAPA, 2003).

No Brasil, o SPD teve seu início em 1972 nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul e, atualmente, estima-se que o cultivo de grãos e plantas de cobertura alcancem uma área aproximada de 25 milhões de hectares. As primeiras experiências com o SPD nos Cerrados se iniciaram na década de 70, estendendo-se pela década de 80. Os fatores que colaboraram para a consolidação do plantio direto nos Cerrados na década seguinte (90) foram: mudança de atitude dos agricultores; fundação em 1992 da Associação do Plantio Direto no Cerrado; migração de agricultores com experiência em plantio direto do sul do Brasil; e a adaptação da soja aos Cerrados (Plataforma Plantio Direto, 2001; EMBRAPA, 2003).

A evolução da área de SPD mostra que cerca de 35% da área total está nos Cerrados. No entanto, existe ainda um alto potencial de expansão na região, sem a necessidade de abrir novas áreas, pois em tre a Amazônia e o Cerrado existem aproximadamente 80 milhões de ha de pastagens quase todas degradadas, ou em fase de degradação podendo ser aproveitadas com o SPD na integração lavoura-pecuária. (Sano *et al.*, 1999, Landers & Freitas, 2002; EMBRAPA, 2003).

O sistema de preparo convencional (SPC), com a utilização de arados, grades e subsoladores, é o responsável pela degradação acelerada do solo e conseqüente perda de solo, água e nutrientes por erosão hídrica e eólica. O uso do SPC causa a destruição de agregados do solo e, se executado na estação das chuvas, deixa a superfície do solo exposta, sem nenhuma cobertura vegetal ou restos de plantas. O resultado é o impacto direto da gota de chuva, causando encrostamento na superfície do solo, diminuição da infiltração de água e conseqüente formação de enxurradas (Freitas, 1994; EMBRAPA, 2003).

As experiências no sul do Brasil demonstraram que a utilização de práticas mecânicas (terraços, cordões vegetados ou de pedras etc.), como única forma de controle da erosão, sem proteção da superfície do solo não são suficientes para o controle efetivo da erosão hídrica do solo (Vieira, 1994). As severas perdas econômicas e ambientais causadas pela erosão motivaram forte movimento em favor da adoção do SPD (Freitas, 2002; EMBRAPA, 2003).

Muitos ainda acreditam que os gastos com herbicidas são os maiores desmotivadores para a adoção do SPD. Poucos se atêm ao fato de que o SPD pode propiciar economia de até 60% no consumo de combustível. Quando consolidado, após o 5º ou 6º anos, e desde que

adotado com critério, os custos com herbicidas são menos relevantes que com fertilizantes. No município de Chapadão do Sul (MS), numa lavoura de soja em SPD, os custos com herbicidas corresponderam a 12% dos custos totais variáveis, enquanto que a maior parte, 25%, corresponde aos gastos com fertilizantes. Uma das razões para a adoção do SPD pelos agricultores é o menor custo total de produção em comparação com o sistema convencional envolvendo aração e gradagens leves. Como exemplo, o custo total por hectare para a produção de milho numa lavoura em Dourados (MS) foi de R\$757,56 (US\$432.89) em sistema convencional e de R\$731,57 (US\$418.04), ou seja, uma estimativa de custo total por hectare no SPD 3,5% menor que no sistema convencional. A vantagem do SPD sobre o SPC está na manutenção de produtividades adequadas com o mínimo de perdas de solo e água (Melo Filho & Mendes, 1999; EMBRAPA, 2003).

Mesmo com a adoção do SPD existe um sério problema que se manifesta nas áreas de Cerrado propícias à prática da agricultura, é a intensidade de uso de fertilizantes químicos e, sobretudo, agrotóxicos. No entanto, é claro que os sistemas agrícolas adotados apóiam-se decisivamente sobre o uso de fertilizantes minerais solúveis e agrotóxicos. Embora haja no SPD, em princípio, redução no emprego de pesticidas, relativamente aos métodos convencionais, é grande o uso de herbicidas (Freitas, 2002; EMBRAPA, 2003).

1.3. Uso de Agrotóxicos

O desenvolvimento da síntese orgânica durante a Segunda Guerra Mundial e a consolidação do padrão tecnológico da agricultura moderna teve importância fundamental no desenvolvimento da indústria mundial de agrotóxicos. A descoberta das propriedades inseticidas do organoclorado (Dicloro-Difenil-Tricloroetano - DDT), em 1939, é tida como um marco de transição nas técnicas de controle fitossanitário (Spadotto, 2006).

A introdução de agrotóxicos organossintéticos no Brasil teve início em 1943, quando chegaram às primeiras amostras do inseticida DDT. O consumo anual de agrotóxicos no Brasil tem sido superior a 300 mil toneladas de produtos comerciais. Expresso em quantidade de ingrediente-ativo (i.a.), são consumidas anualmente no país cerca de 130 mil toneladas; representando aumento no consumo de agrotóxicos de 700% nos últimos quarenta anos, enquanto a área agrícola aumentou 78% nesse período (Spadotto, 2006).

O Brasil possui legislação de agrotóxicos evoluída, exigente e restritiva, que cuida além da necessidade de comprovação da eficiência agrônômica, das garantias da minimização dos

perigos ao ser humano (seja de caráter ocupacional, alimentar ou de saúde pública) e das ameaças ao meio ambiente proveniente desses produtos químicos. Antes a avaliação ambiental restringia-se à classificação da periculosidade de cada agrotóxico, baseada em dados toxicológicos e ecotoxicológicos do produto comercial. É necessária a avaliação dos riscos ambientais de cada produto, considerando, além da ecotoxicidade, a exposição dos organismos nos diferentes compartimentos ambientais, o que demanda mais amplo e profundo entendimento de como os agrotóxicos se comporta no ambiente depois de aplicados e de quais efeitos pode causar aos vários organismos, incluindo o homem (Spadotto, 2006).

O padrão agrícola estabelecido no pós-guerra tem sua base tecnológica assentada no uso de agroquímicos (agrotóxicos, fertilizantes e corretivos), mecanização, cultivos de alto potencial de rendimento e técnicas de irrigação, visando à elevação da produtividade. Existe, portanto, uma estreita relação entre a agricultura moderna intensiva e a utilização de agrotóxicos. A partir da década de 1960, tal modelo agrícola foi difundido para as regiões de países subdesenvolvidos (chamados anteriormente de países de Terceiro Mundo), num processo conhecido como Revolução Verde (Spadotto, 2006).

Os agrotóxicos, além de cumprirem o papel de proteger as culturas agrícolas das pragas, doenças e plantas daninhas, podem oferecer riscos à saúde humana e ao ambiente. O uso frequente, e muitas vezes incorreto, de agrotóxicos pode causar a contaminação dos solos, da atmosfera, das águas superficiais e subterrâneas, dos alimentos, apresentando, conseqüentemente, efeitos negativos em organismos terrestres e aquáticos e intoxicação humana pelo consumo de água e alimentos contaminados, assim como o risco de intoxicação ocupacional de trabalhadores e produtores rurais. Além dos perigos aos seres humanos, sabe-se que a introdução de agrotóxicos no ambiente pode provocar efeitos indesejáveis, como a alteração da dinâmica bioquímica natural pela pressão de seleção exercida sobre os organismos, tendo como consequência, mudanças no funcionamento do ecossistema afetado (Spadotto, 2006).

Os herbicidas representam mais de 50% do total de agrotóxicos consumidos no país (IBGE, 2005). Os dados fornecidos pela Associação Brasileira de Indústria Química (ABIQ) mostraram que, em 2004, o país consumiu US\$ 4,2 bilhões de agrotóxicos, o que coloca o país como o quarto maior consumidor mundial. O emprego de agrotóxicos no estado de Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Tocantins corresponde atualmente a 70% do total utilizado no país (ANVISA, 2005).

Os efeitos causados pelas substâncias contidas nos produtos químicos existentes nos pesticidas, herbicidas, inseticidas e fertilizantes, bem como seus adjuvantes, podem ser responsáveis por inúmeras alterações no sistema reprodutivo de machos e fêmeas. Estes efeitos podem ser agudos ou crônicos, na dependência do tempo de exposição, concentração no ambiente, modo de contato com o produto e tipo de degradação (Akingbemi *et al.*, 2004).

Os herbicidas a base de glifosato apresenta elevada eficiência na eliminação de ervas daninhas. Desde 1971, quando foi relatado primeiramente como herbicida, três tipos de glifosato vêm sendo comercializados: glifosato-isopropilamônio, glifosato-sesquisódio (patenteados por Monsanto e vendido como Roundup[®]), e glifosato-trimesium (patenteado por ICI, atual Syngenta). Seja como sal de amônio ou sódio, glifosato é organofosforado que não afeta o sistema nervoso da mesma maneira que outros organofosforados. Apesar de o glifosato ser citado como pouco tóxico, há evidências de efeitos deletérios no ambiente, principalmente devido à resistência adquirida por algumas espécies de ervas, após o uso prolongado do herbicida (Amarante Junior & Santos, 2002).

A presença de herbicidas tem sido relatada em águas superficiais, subterrâneas e em água de chuva (Buser, 1990; Funari *et al.*, 1995; Amarante Junior & Santos, 2002). Os agrotóxicos têm sido encontrados na atmosfera mesmo distantes de áreas agrícolas (Grover *et al.*, 1997; Laabs *et al.*, 2002). Resíduos desses produtos têm sido ainda encontrados no orvalho (Glofelty *et al.*, 1987), na neve do ártico (Gregor e Gummer, 1989) e na névoa do oceano (Schomburg e Glofelty, 1991).

Nos últimos anos, houve grande crescimento na utilização de herbicidas em todo país, o que tem sido associado ao aumento vertiginoso dos riscos de contaminação prejudiciais à saúde. O descuido com os herbicidas pode ser fatal e causar agravos à saúde, tais como: irritações na pele e nos olhos, problemas respiratórios, câncer em vários órgãos e distúrbios sexuais, como a impotência e a esterilidade (Needham, Calafat & Barr, 2006; ANVISA, 2008).

1.4. Problemas Ambientais

Dentre os inúmeros casos de problemas ambientais já relatados pela literatura internacional, destaca-se o caso do DDT, inseticida organoclorado, o primeiro usado em larga escala a partir de 1945. Após 27 anos, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S.E.P.A.) banuiu seu uso (Metcalf, 1974), por apresentar alta persistência no ambiente e ser bioacumulado e biomagnificado. Nimmo (1985) relata inúmeros casos de problemas ambientais com agrotóxicos e outras substâncias químicas como os polibifenil clorados (PCB's) que

também são compostos organoclorados, com estrutura química muito similar aos agrotóxicos DDT, dieldrin e aldrin. Os relatos incluem casos de contaminação da água e de organismos.

Spacie & Hamelink (1985) também reportaram que a bioacumulação e biomagnificação de poluentes recebeu atenção pública pela primeira vez nos anos 60, com a descoberta de resíduos de DDT, dicloro-difenil-dicloroetano (DDD) e de metil-mercúrio em peixes e animais silvestres. Problemas de mortalidade e de reprodução em peixes e pássaros que se alimentam de peixes foram relacionados às altas concentrações de DDT ou seus metabólitos encontrados no tecido adiposo destes animais. Como, especialmente os pássaros que eram carnívoros estavam com as concentrações mais elevadas de resíduos do que o alimento (peixes) que ingeriram, era lógico postular que a acumulação havia ocorrido primariamente pela transferência através da cadeia trófica. Esta idéia apoiou-se indiretamente na observação dos resíduos de DDT que aumentavam passo a passo de nível trófico.

Inúmeros outros compostos já foram detectados em águas superficiais, em águas subterrâneas e de abastecimento (Balnova, 1993; Brambilla *et al.*, 1993; Tekel & Kovacicová, 1993; Zahradnicková *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 1996) relacionando atividades urbanas e agrícolas com os casos de contaminação ambiental. De acordo com Tekel & Kovacicová (1993), na maioria dos países europeus e nos Estados Unidos, os herbicidas representam mais de 50% de todos os agrotóxicos usados e, portanto, não é de surpreender que esta classe de compostos contribua de maneira tão significativa para a contaminação do ambiente, particularmente solo, águas superficiais e subterrâneas. Além do alto volume de uso, muitos dos herbicidas são aplicados em áreas próximas aos corpos d'água, portanto, comumente encontrados em águas superficiais. Além disso, também alcançam águas subterrâneas em função de sua mobilidade em solo permitindo sua migração.

Em água de abastecimento também já foram encontrados resíduos de herbicidas, principalmente a atrazina que é um herbicida triazínico. As triazinas são os herbicidas mais antigos e mais comumente usados, sendo responsáveis por cerca de 30% do mercado mundial de agrotóxicos. Mais recentemente as triazinas, especialmente atrazina, está sendo gradualmente substituída por herbicidas que apresentem risco ambiental menor (Tekel & Kovacicová, 1993).

Amaraneni & Pillala (2001) encontraram resíduos de vários agrotóxicos nas duas espécies de peixes usados como bioindicadores, coletados no lago Kolleru, Índia. Os resultados demonstraram que os peixes continham resíduos de agrotóxicos em níveis superiores aos padrões estabelecidos pela *Food and Agriculture Organization* (FAO), organismo das Nações Unidas, se constituindo como mais uma fonte de exposição dos habitantes da região aos

agrotóxicos. Os resultados relataram também o nível de poluição por estes compostos naquele lago bem como o perigo a que os habitantes estavam expostos ao consumirem os peixes contaminados. Younes & Galalgorchev (2000) ressaltam que a capacidade dos agrotóxicos persistirem e produzirem efeitos tóxicos sobre a saúde humana e sobre o meio ambiente é muito variada em função das inúmeras classes químicas existentes. Além disto, em função de seu amplo uso, os agrotóxicos podem estar presentes inclusive em água de abastecimento.

Num estudo realizado no Parque Turístico do Alto Ribeira (PETAR) localizado no Vale do Ribeira (São Paulo), Elfvendahl (2000) analisou amostras de água, sedimento e peixe no período das chuvas, em janeiro de 2000, e seus resultados indicaram que a fauna e flora do PETAR estão expostas a diferentes agrotóxicos que se encontram dissolvidos na água ou presentes no sedimento, sendo que dos 20 agrotóxicos detectados na água, sete eram considerados altamente tóxicos para peixes e outros organismos aquáticos e os demais eram considerados moderadamente tóxicos.

Strandberg & Scott-Fordsmand (2002), considerando organismos expostos ao herbicida simazina em meio terrestre e meio aquático, relataram inúmeros efeitos ecológicos, dentre eles a bioacumulação de simazina em organismos aquáticos, a diminuição de densidade e diversidade de algumas espécies de organismos de solo expostos ao herbicida. Além disto, o estudo relata inúmeros experimentos e monitoramentos efetuados nos Estados Unidos e Europa sobre a toxicidade de simazina para diversos organismos aquáticos e terrestres e discutem os fatores bióticos e abióticos que influenciaram a toxicidade e comportamento ambiental do herbicida.

Dores & De-Lamonica-Freire (2001), através do levantamento e análise de parâmetros físicos e químicos do solo e de 29 agrotóxicos, verificaram o potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas em área agrícola em Primavera do Leste (MT), demonstrando o risco potencial que cada composto estudado apresentava naquele ambiente. Embora tenha sido um estudo efetuado com dados sobre os pesticidas retirados da literatura internacional e, portanto, obtidos em clima diferente do local, este estudo demonstrou a necessidade e a possibilidade de se utilizar análises preliminares deste tipo para se priorizar estudos mais aprofundados de comportamento ambiental e toxicidade de agrotóxicos.

Filizola *et al.*(2002) afirmam que, avaliações preliminares da possibilidade de contaminação das águas superficiais, subsuperficiais e subterrâneas por pesticidas de uma dada área agrícola, podem se constituir em instrumentos importantes para avaliação de risco ambiental, sendo vantajoso inclusive devido ao alto custo das análises químicas de resíduos de pesticidas.

Laabs *et al.* (2002) concluíram que, na área da bacia do Pantanal, a atmosfera representa importante porta de entrada de agrotóxicos nos ecossistemas, inclusive na água, de forma diferente do que ocorre em regiões temperadas, reafirmando a necessidade de estudos em condições ambientais brasileiras. Outra lacuna importante relaciona-se à realização de estudos, como o desenvolvido por Farre *et al.* (2002), aliando-se testes toxicológicos com organismos e as análises químicas quantitativas e qualitativas, permitindo assim o levantamento de dados químicos como concentração e dose real, juntamente com a verificação dos efeitos toxicológicos para os organismos, de forma a embasar avaliações globais.

O glifosato é apontado como um potencial contaminante ambiental, visto que é altamente hidrossolúvel, existindo muitos relatos de sua detecção em águas superficiais (Cox, 1998). Entretanto, há poucos relatos de contaminação de lençóis freáticos, possivelmente por conta de sua propriedade de alta adsorção ao solo, variando essa capacidade, possivelmente, em função dos diferentes teores de íons metálicos presentes nos mesmos (Souza *et al.*, 2006). A dispersão pelo ar, juntamente à contaminação de corpos hídricos, são potenciais fontes de exposição a seres humanos, sendo de forma direta (aplicadores de agrotóxicos, agricultores) ou indireta (pessoas que se servem das águas contaminadas) (Amaral, 2009).

No meio-ambiente, o Glifosato é rapidamente convertido em seu principal metabólito, o Ácido Amino-Metil-Fosfônico (AMPA), que também possui baixa toxicidade, mas uma persistência maior. O AMPA é relacionado ao excesso de divisão celular nos rins e bexigas de ratos, além de provocar diminuição de peso nestes (Souza *et al.*, 2005).

O glifosato é indicado para uso diretamente na água para controle de plantas aquáticas, controle de ervas daninha anuais e perenes, monocotiledôneas ou dicotiledôneas, em diversas culturas, sendo seu uso mais comum no plantio de arroz e de soja (Amarante Jr *et al.*, 2002; Amaral, 2009). Nesse último caso, é mais utilizado ainda, em virtude da aprovação do plantio transgênico no Brasil, em outubro de 2003 (Vendramini, 2004; Amaral, 2009). Como age não-seletivamente, o glifosato possui ação sobre qualquer planta. Porém, a soja transgênica utilizada nas lavouras brasileiras, a Roundup Ready[®] (RR), é modificada geneticamente para ser resistente ao herbicida. Sendo assim, este agrotóxico pode ser usado em larga escala sobre a lavoura, visto que esta é resistente ao princípio ativo (Amaral, 2009).

O plantio de soja transgênica, além de favorecer o maior consumo de glifosato e outros agrotóxicos como fenoxiácido 2,4-D, trazendo outros tipos de problemas à saúde humana e ambiental, além de graves problemas sociais. Persley (2008), afirma que a biotecnologia seja talvez a mais importante ferramenta para a redução da pobreza e desnutrição, além do aumento da segurança alimentar. Ou seja, o discurso atual a favor dos transgênicos em muito se parece

com o discurso da década de 1950, Revolução Verde, onde se afirmava que o uso de agrotóxicos seria responsável por aumento significativo da produção agrícola e redução da fome e da pobreza no mundo, cujas “promessas” não foram completamente cumpridas, além de causarem graves efeitos à saúde do homem e do meio ambiente (Amaral, 2009).

Portanto, os riscos do plantio de lavouras transgênicas não se resumem à saúde do homem e do meio ambiente, mas também mostra que pode haver grande impacto social atrelado a si. E quanto a este impacto social, os transgênicos seriam apenas mais um passo. O cultivo da soja comum, seja pelo uso intenso de pesticidas ou pelo simples fato da disseminação da monocultura, já é um fator muito impactante no que diz respeito à biodiversidade e à sobrevivência da agricultura familiar. A cultura transgênica seria, portanto um passo à frente no sentido da dominação do agronegócio sobre a agricultura familiar (Porto, 2004). Um grande problema no caso da monocultura é a intensa propaganda alardeada pelo governo federal, com um drástico incentivo ao agronegócio e a expansão das áreas de cultivo de soja. Em “Projeções do agronegócio, Mundial e Brasil 2006/07 a 2016/17” (MAPA, 2006), do Ministério da Agricultura, não se fala em um só momento de desenvolvimento sustentável, mas sim de bater metas, recordes e de tornar o Brasil o maior exportador mundial em 10 anos, não citando no texto, a que preço isso deve ocorrer. Com os impactos sociais, econômicos e ambientais da monocultura de soja bem estudados e sabidos, ainda existem os efeitos ambientais do uso do Glifosato, que, a longo prazo, são desconhecidos. Além disso, a aplicação de forma indiscriminada gera diversas fontes de exposição a seres humanos, sendo necessários mais estudos que façam esse tipo de avaliação (Amaral, 2009).

O Glifosato é considerado específico para sua função e, teoricamente, sem riscos para humanos. Outro problema que ocorre é que essa substância, bem como os outros agrotóxicos, possui quantidade definida a ser utilizada no campo (0,36 a 2,16 mg/L) (Gluszczak *et al.*, 2007), que na maioria das vezes, não é respeitada por quem aplica, o que pode acarretar num “excesso” de exposição ao herbicida, sendo que o manuseio errado de agrotóxicos é um dos principais causadores de acidentes de trabalho no campo (Brito & Câmara, 2006). Segundo Amaral (2009), apesar da propalada inofensividade atribuída pelos fabricantes, diversos efeitos colaterais à saúde humana vem sendo associados à sua exposição.

1.5. Saúde Coletiva e Uso de Agrotóxicos

O trabalho agrícola no Brasil é uma atividade significativa do ponto de vista social e de negócio. Entretanto, a saúde do trabalhador desse setor nem sempre recebe a atenção necessá-

ria. Agregados ao trabalho agrícola podem-se encontrar ruídos de vários tipos, vibrações e produtos químicos específicos, como os agrotóxicos (Manjabosco, 2005).

O Brasil, embora apresente um parque industrial diversificado com grande inserção de empresas multinacionais, ainda possui sua economia baseada na agricultura, com seu potencial agrícola apontado como fator estimulante para o desenvolvimento de forte indústria de adubos e defensivos químicos para as lavouras (Barreira & Philippi Junior, 2002). Para atender à crescente demanda, agricultores têm sido estimulados a utilizar uma grande variedade de substâncias a fim de aumentar a produtividade e reduzir as perdas das safras. Esta ação tem levado ao uso indiscriminado de agrotóxicos, colocando em risco a saúde dos produtores, do meio ambiente e dos consumidores (Araújo *et al.*, 2007).

A utilização dos agrotóxicos no meio rural brasileiro tem trazido uma série de consequências tanto para o ambiente como para a saúde do trabalhador rural. Em geral, essas consequências são condicionadas por fatores intrinsecamente relacionados, tais como o uso inadequado dessas substâncias, a alta toxicidade de certos produtos, a falta de utilização de equipamentos de proteção e a precariedade dos mecanismos de vigilância. Esse quadro é agravado pelo baixo nível socioeconômico e cultural da grande maioria desses trabalhadores (Oliveira-Filho *et al.*, 2001; Körbes *et al.*, 2010).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a cada ano ocorra cerca de 3.000.000 casos de intoxicação aguda por pesticidas, com 220.000 óbitos. A maioria destes incidentes ocorre nos países em desenvolvimento, como a África do Sul, Ásia, América Central e América do Sul (Oliveira-Filho *et al.*, 2001; Körbes *et al.*, 2010).

A intoxicação por agrotóxicos pode ocorrer por três vias: inalação, ingestão e dérmica (Lemus & Chlorpyrifos, 2000; Lima *et al.*, 2001; Körbes *et al.*, 2010). No caso de envenenamento por inalação, os sintomas iniciais mais comuns são caracterizados por dores no tórax, dificuldade de respiração e dores de cabeça, aliadas à visão borrada e lacrimejante. Quando ingerido provoca náuseas, vômitos, diarréias e câimbras (efeitos iniciais mais comuns de envenenamento). Contrações e suor na pele são sintomas observados em caso de contato do produto com partes do corpo (Lima *et al.*, 2001; Körbes *et al.*, 2010).

De acordo com a literatura, as variáveis que determinam a toxicidade do organofosforado são o nível de exposição ao agrotóxico no meio-ambiente, a dose absorvida e o nível de depressão da acetilcolinesterase individual (Jaga, Dharmani & Sources, 2003; Körbes *et al.*, 2010).

Os agrotóxicos organofosforados são conhecidos por seu efeito anticolinesterásico. Estes agentes inibem a enzima acetilcolinesterase, responsável pela hidrólise da acetilcolina,

levando a um acúmulo deste neurotransmissor nas sinapses nervosas (Bedor *et al.*, 2007). Os sinais de intoxicação aguda estão associados à inibição da colinesterase, ou seja, aos efeitos colinérgicos exacerbados. A toxicidade crônica é relacionada a efeitos neurotóxicos (Cantarutti, 2005; Körbes *et al.*, 2010).

Em virtude do efeito inibidor das colinesterases, os pesticidas organofosforados podem ocasionar, em mamíferos, lacrimejamento, salivação, sudorese, diarreia, tremores e distúrbios cardiorrespiratórios. Estes últimos são decorrentes de broncoconstrição, aumento das secreções brônquicas e bradicardia, bem como de depressão do sistema nervoso central, sendo as principais causas de morbidade e mortalidade por tais produtos (Ecobichon & Joy, 1991; Körbes *et al.*, 2010).

Como sintomas da intoxicação aguda por inseticidas organofosforados, podem ser descritos suor, salivação, lacrimejamento, fraqueza, tontura, dores e cólicas abdominais, seguidos de vômitos, dificuldade respiratória, colapso, tremores musculares, convulsões e morte (Ames *et al.*, 1995; Pires, Caldas & Recena, 2005; Körbes *et al.*, 2010). Os organofosforados causam também efeitos neurológicos retardados após a exposição aguda e como consequência da exposição crônica, incluindo confusão mental e fraqueza muscular (Alavanja, Hoppin & Kamel, 2004). A exposição crônica a estes compostos pode levar ao desenvolvimento de sintomas de depressão, um fator importante nos suicídios. Outros autores complementaram referindo que a exposição crônica ao agrotóxico está relacionada, entre outros, ao câncer, efeitos teratogênicos, neuropatias periféricas tardias e toxicidade reprodutiva (Caldas & Souza, 2000; Körbes *et al.*, 2010).

Em estudo realizado por alguns pesquisadores, a tontura foi o sintoma de maior destaque e, por se tratar de uma das expressões clínicas da exposição aos agrotóxicos, os estudiosos sugeriram que a mesma deve ser avaliada e detectada durante a anamnese específica do trabalhador rural, bem como devidamente investigada pelas equipes de saúde responsáveis pelo atendimento médico nas localidades (Hoshino *et al.*, 2008).

A elevada prevalência de quadros de intoxicação pelos agrotóxicos, tanto aguda como crônica, reflete a precariedade com que são realizadas as atividades de controle de pragas no campo, sem proteção por equipamentos de segurança e com uso indiscriminado de substâncias químicas prejudiciais ao meio ambiente, às espécies e ao homem. Os autores comentaram ainda que a frequência de sinais e sintomas proveem de uma ocorrência elevada de casos de contaminação humana por exposição simultânea a inúmeros produtos, utilizados geralmente na forma de coquetel, em curtos intervalos de reaplicação e sem a adoção das adequadas medidas de segurança (Araújo *et al.*, 2007). O trabalhador agrícola, desconhecendo os riscos e os

impactos negativos do uso de agrotóxicos na saúde, tende a supervalorizar seus benefícios para as plantações de culturas diversas, utilizando muitas vezes doses maiores que as necessárias, para obter melhores resultados agrônômicos (Soares, Almeida & Moro, 2003; Körbes *et al.*, 2010).

O agrotóxico Roundup[®], organofosforado da classe dos herbicidas é o mais usado no Brasil e no mundo (Baylis, 2000; Woodburn, 2000; Géhin *et al.*, 2006). Seu princípio ativo é glifosato (N-fosfometil-glicina), pertence ao grupo químico das glicinas substituídas (Williams *et al.*, 2000; Batista, 2008).

O Roundup[®] é formulado com água a 2.13 M (356g/l ácido livre ou 480 g/l sal de isopropilamina) e surfactante, adicionado para permitir sua penetração na superfície da planta e, conseqüentemente, melhorar sua efetividade, além de outras substâncias consideradas inerte, presentes em sua composição. O surfactante predominante usado é polioxietilento amino (POEA), sintetizado a partir de ácidos graxos derivados de animais (Williams *et al.*, 2000).

O Roundup[®], devido a seu caminho biológico específico, que não se encontra presente nos animais, exerce seu efeito herbicida somente em plantas e alguns microorganismos. Por isso, tanto o glifosato puro, com suas formulações comerciais eram considerados seguros, de acordo com testes experimentais (Williams *et al.*, 2000). No entanto, a segurança do Roundup[®], bem como a do glifosato à saúde animal vem sendo questionada (Jiraungkoorskul *et al.*, 2003; Tsui e Chu, 2008; Langiano e Martinez, 2008).

Hokanson *et al.* (2007), sugerem que os níveis de estrógenos são desregulados pelo glifosato, causando alteração da expressão dos genes EGR-1, CXCL12 e HIF-1, (genes estrogênio-dependentes). Esses genes são responsáveis por diversas funções fisiológicas no organismo, e sua alteração, na presença do glifosato, pode acarretar a indução de apoptose celular em tecido cerebral e miocárdico, aumento da angiogênese em tumores, isquemia retinal, hipertensão, pré-eclampsia, retardo do crescimento fetal e inativação de genes supressores de tumor, entre outras.

Daruich *et al.* (2001), mostram que ratas expostas ao glifosato durante o período de gravidez, apresentaram diversas alterações enzimáticas, bem como em seus fetos. Isso significa a alteração de importantes funções no organismo, pois essas enzimas atuam em diferentes órgãos, como cérebro, fígado e coração. Particularmente no caso dos fetos, a inibição em qualquer dessas funções, principalmente a cerebral, pode gerar seqüelas para o resto da vida. Foi mostrado ainda que os animais apresentavam perda de peso, diminuição no consumo de água e comida, além da diminuição no tamanho do fígado. A toxicidade às mães foi

demonstrada pelo número aumentado de abortos ou mortes, ocasionados pela exposição ao herbicida.

Richard *et al.* (2005), sugerem que o glifosato atua como inibidor da enzima Aromatase, no Citocromo P-450, em seres humanos. Essa enzima é de fundamental importância na síntese de estrógenos. O mesmo estudo mostra ainda uma comparação entre os efeitos do glifosato isoladamente e do Roundup, produto comercial que tem o glifosato como princípio ativo, mas que apresenta outros componentes adjuvantes na fórmula. Os resultados dessa comparação mostram que o Roundup[®] é mais nocivo à saúde, possivelmente por efeito sinérgico entre o glifosato e os adjuvantes do produto. Então, o Roundup[®] atua mais fortemente como inibidor enzimático/disruptor endócrino que o princípio ativo isolado, sendo que os resultados de inibição da Aromatase aparecem mesmo em doses cem vezes menores que as recomendadas pelo fabricante, para o uso na lavoura.

Em um estudo com aves, Oliveira *et al.* (2007), mostram a alteração da morfologia dos testículos e do epidídimo, bem como a alteração nos níveis séricos de estradiol e testosterona nesses animais. Os resultados apresentaram relação dose-resposta, mostrando que o herbicida glifosato pode causar problemas reprodutivos a longo prazo.

Benachour *et al.* (2006), fazem relação entre o aumento da citotoxicidade do glifosato, bem como sua ação como desregulador endócrino, e o tempo de exposição, mostrando que a exposição prolongada ao herbicida pode levar a sérios problemas de cunho reprodutivo em seres humanos. O autor afirma que os efeitos tóxicos, incluindo os de disfunção endócrina, de diversas substâncias, podem estar sendo subestimados ao não se levar em conta sua interação com adjuvantes presentes na fórmula, bem como com outros princípios ativos, levando a graves erros na elaboração de políticas regulatórias para tais produtos.

Marc *et al.* (2002), fizeram um estudo utilizando células embrionárias de ouriço do mar. Neste estudo, os autores demonstram os efeitos do Roundup[®] sobre o ciclo celular. O resultado encontrado mostra que o herbicida atua efetivamente na desregulação do ciclo, demonstrando sua ação como gerador de células tumorais, utilizando concentrações bem acima das recomendadas para uso nas lavouras. Como o mecanismo do ciclo celular é o mesmo, desde células eucarióticas primitivas até seres complexos como os mamíferos, os resultados levam a questionar se a saúde humana poderia ser afetada da mesma forma pelo produto comercial contendo glifosato. Além disso, o próprio fato de afetar os ouriços sugere que estes animais podem ser utilizados como indicadores ambientais de exposição ao Roundup[®] ou qualquer outro produto comercial com glifosato. Isto porque o glifosato isolado não mostrou efeitos no mesmo sentido. Foi então observado efeito sinérgico entre o glifosato e os adjuvantes da

fórmula, sendo desconhecidos os efeitos exatos dessa interação na saúde humana e também da interação entre o glifosato e outros agrotóxicos, além da observação de que, quanto maior o tempo de exposição, maiores os efeitos observados nas células. O estudo sugere ainda que todas as espécies expostas a agrotóxicos contendo glifosato podem estar sujeitas a um possível desenvolvimento de tumores, visto que o mecanismo do ciclo celular é comum a todos os organismos vivos.

Marc *et al.* (2004), organizaram um estudo sobre os efeitos de diferentes produtos comerciais contendo o glifosato como princípio ativo sobre a regulação do ciclo celular, em comparação com o Roundup[®]. Os resultados obtidos mostraram que todos os produtos atuavam de maneira similar, causando retardamento nas fases do ciclo celular, ocasionando em replicação errônea do DNA e/ou segregação de segmentos errados de cromossomos para as células-filhas. Isso demonstra que não só o Roundup[®], mas todos os produtos contendo glifosato em sua fórmula atuam da mesma maneira sobre as células somáticas. Mostra que, a possibilidade levantada de o glifosato interagir sinergicamente com os demais componentes da formulação dos produtos comerciais é de grande plausibilidade. As doses para aparecimento de efeitos adversos em pelo menos uma célula variaram entre as cinco marcas testadas, indo de 10 uM até 120 uM. Uma vez que a dose recomendada pelo fabricante é de 40mM, pode-se afirmar que a exposição se dá a doses, pelo menos, 360 vezes maiores que a dose onde começam a ocorrer as primeiras alterações celulares. Isso sem considerar possíveis sinergismos com outros princípios ativos, tempo de exposição, exposição crônica e que, as doses aplicadas, usualmente, são maiores do que as recomendadas pelos fabricantes. O estudo nos informa também que a aplicação pode ser perigosa para os locais vizinhos, uma vez que o produto se dispersa facilmente pelo ar e é bem absorvido por via inalatória. Por fim, os autores afirmam que o método desenvolvido por eles é capaz de detectar as alterações celulares causadas pela exposição a produtos contendo glifosato em estágio prematuro.

Penagos *et al.* (2004), em estudo feito com trabalhadores de uma plantação de bananas, no Panamá, mostram que uma considerável percentagem dos expostos a glifosato e outros agrotóxicos, apresentavam sinais de doenças cutâneas. Os autores sugerem a introdução de um teste que identifique os trabalhadores sensíveis dermicamente a esses compostos. Os testes apresentaram resultado positivo para 41% dos trabalhadores diagnosticados como tendo doenças cutâneas. O estudo conclui que as dermatites são uma doença ocupacional comum nos trabalhadores das áreas agrícolas do Panamá. Os autores sugerem ainda, que os testes sejam aprimorados e feitos mais freqüentemente a trabalhadores que sofram uma grande carga de exposição a agrotóxicos.

Wester *et al.* (1996), relatam, em seu estudo sobre a absorção cutânea do glifosato e do malathion, presentes em roupas de algodão, é via de contaminação importante relacionada ao desenvolvimento de dermatites. Esse estudo foi motivado por conta de, na Guerra do Golfo, soldados americanos terem apresentado grande número de sintomas de problemas dérmicos e intoxicações. Isso foi explicado pelo fato dos uniformes, durante sua fabricação, terem sido submetidos à exposição a agentes químicos para evitar a contaminação das roupas por parte de insetos. Juntando a isso, o fato de que, não apenas uniformes de guerra, mas também roupas comuns sofrem exposição a agentes químicos para coloração de tecido e controle de insetos, tal estudo se mostra muito relevante. Os resultados obtidos no trabalho de Wester *et al.* (1996) sugerem que há absorção cutânea, tanto do glifosato, quanto do malathion, podendo esses agentes chegarem até mesmo à circulação sistêmica. Outro fato importante no que diz respeito à absorção de agentes químicos pela pele, é a exposição dos trabalhadores a agrotóxicos. Muitas vezes, esses trabalhadores dão preferência à roupas de algodão, em detrimento do EPI, que efetivamente o protegeria. Isso mostra o quanto eles se expõem utilizando um tipo de roupa inadequado não só por conta da falta de proteção, mas também, por reter os agrotóxicos e prolongar a exposição do aplicador a esses agentes (Amaral, 2009).

Segundo Romano *et al.* (2008) foi observado que algumas agricultoras que utilizam glifosato têm apresentado problemas para engravidar, sendo o mecanismo de ação do glifosato em mamíferos questionado. Richard *et al.* (2005) demonstraram que o glifosato em baixas concentrações não tóxicas causa efeito de disrupção sobre a enzima aromatase em células de placenta humana *in vitro*. A partir do momento que o glifosato penetra na célula, e isso é facilitado nas formulações de Roundup® com adjuvantes, ele reduz a atividade da enzima aromatase, responsável pela síntese de estrógenos.

1.6. Consumo de Agrotóxicos (Herbicidas)

Em 2009, as quantidades totais vendidas de defensivos agrícolas (agrotóxicos) no Brasil apresentaram expansão quando comparadas com o ano anterior. Observou-se que, em termos de produto comercial, foram comercializadas 725.577 t (acréscimo de 7,7% em relação a 2008), correspondendo a 335.816 t de princípio ativo (incremento de 7,4%, no período), de acordo com dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG) (Figura 1) (Ferreira, Vegro & Camargo, 2010).

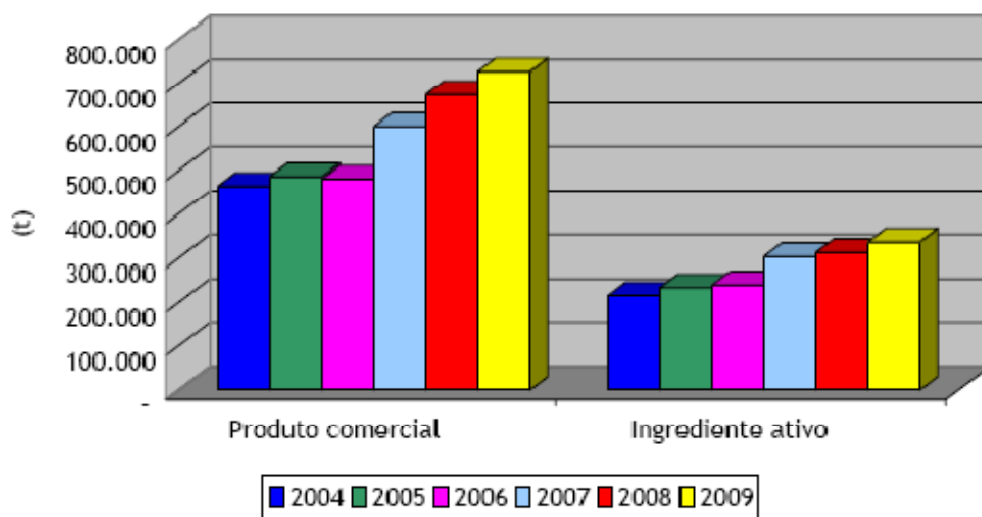


Figura 2 - Quantidade Vendida de Defensivos Agrícolas, em Produto Comercial e Ingrediente Ativo, Brasil, 2004 a 2009. Fonte: Elaborada por Ferreira, Vegro & Camargo, 2010 a partir de dados do SINDAG.

Comparativamente ao ano anterior, essa expansão em 2009 resultou em melhores vendas para a cultura da soja, com acréscimo de 16,7% em quantidade de produto comercial. Outros produtos também tiveram aumento da demanda de agrotóxicos como algodão (11,9%), milho safrinha (29,1%), café (9,2%), feijão (12,2%), arroz irrigado (28,3%) e atividade de reflorestamento. Em contrapartida, registraram decréscimo nas vendas de milho safra (17,8%), cana-de-açúcar (8,3%) e cítrus (20,9%) (Ferreira, Vegro & Camargo, 2010).

A classe de agrotóxicos que apresentou melhor desempenho comercial foi a dos fungicidas, cujas vendas em 2009 aumentaram, em quantidade de produto comercial, 14,5% (em relação a 2008). As vendas desse tipo de produto para a cultura da soja foram as que mais se destacaram, em virtude da necessidade de se combater a ferrugem asiática. Cresceram, também, as vendas de herbicidas (10,3%) e de “outros” (18,9%), enquanto que as de acaricidas apresentaram queda de 39,6%, em função, principalmente, dos baixos preços vigentes para a laranja (Ferreira, Vegro & Camargo, 2010).

O aumento das quantidades comercializadas não causou incremento do faturamento das indústrias de agrotóxicos, pois em 2009, em valores corrigidos, permaneceu praticamente estável em relação ao anterior (acréscimo de apenas 1,1%), totalizando aproximadamente R\$12,88 bilhões. Por outro lado, as vendas em dólar americano contabilizaram U\$6,625

bilhões em 2009, com decréscimo de 7,0%, em função das taxas cambiais vigentes no decorrer do período (Ferreira, Vegro & Camargo, 2010).

No Brasil, a classe de herbicidas é a que tem respondido pelo maior valor das vendas de agrotóxicos. Em 2009, foi responsável por 37,8% do faturamento total, ou seja, US\$2,50 bilhões, enquanto que, em quantidade de produto comercial, os herbicidas representaram 429.693 t (59,2%). As vendas de herbicidas estão voltadas, principalmente, para cana-de-açúcar, soja, milho, algodão, café e pastagem (Figura 2).

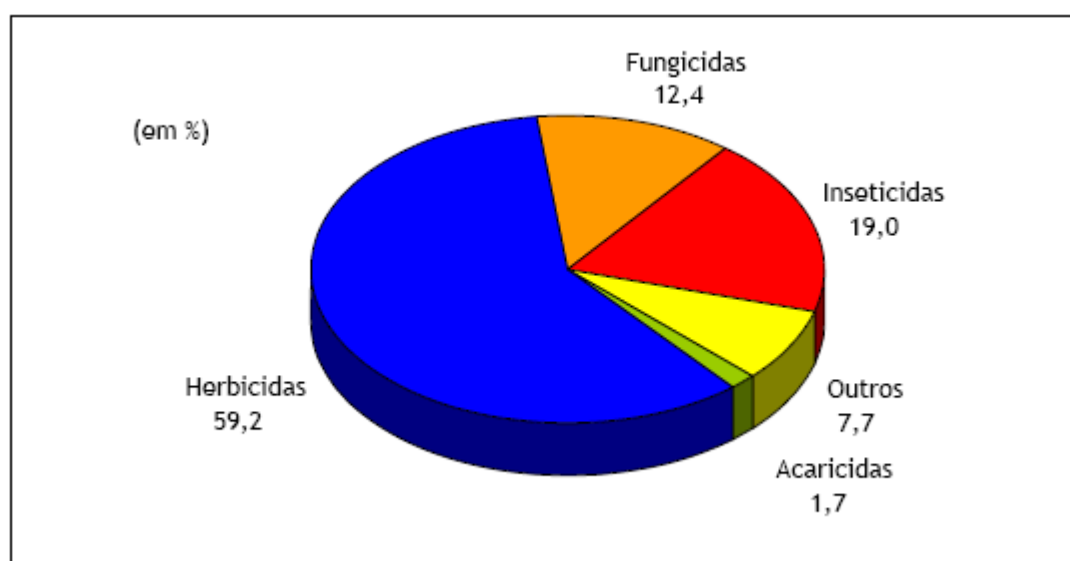


Figura 3 - Participação das Classes na Quantidade Vendida de Defensivos Agrícolas, em Produto Comercial, Brasil, 2009. Fonte: Elaborada por Ferreira, Vegro & Camargo, 2010 a partir de dados do SINDAG.

A soja é a principal consumidora de agrotóxicos no Brasil, sendo responsável, em 2009, por 47,1% do valor total das vendas. No segundo lugar aparece o milho (11,4%), em seguida cana-de-açúcar (8,2%), algodão herbáceo (7,4%), café (3,8%) e cítrus (3,0%). Essas seis culturas somam 80,9% do valor comercializado nesse ano (Ferreira, Vegro & Camargo, 2010).

No exame do comportamento das vendas em termos de valor, por Unidade da Federação, Mato Grosso se destacou como o maior Estado consumidor em 2009, representando 18,8% das vendas nacionais em termos de produto comercial e 18,9% em valor, ou seja, US\$1,25 bilhão. Ele é seguido por São Paulo (14,5%), Paraná (14,3%), Rio Grande do Sul (10,8%), Goiás (9,9%), Minas Gerais (8,9%), Bahia (6,4%) e Mato Grosso do Sul (5,2%). As demais Unidades da Federação, juntas, responderam por 11,1% do valor total. A comercialização de defensivos agrícolas em 2009 seguiu o padrão sazonal, com a concentração das vendas no segundo semestre, simultaneamente ao plantio das culturas de verão, que

receberam 67,6% do faturamento total em moeda nacional (Figura 3) (Ferreira, Vegro & Camargo, 2010).

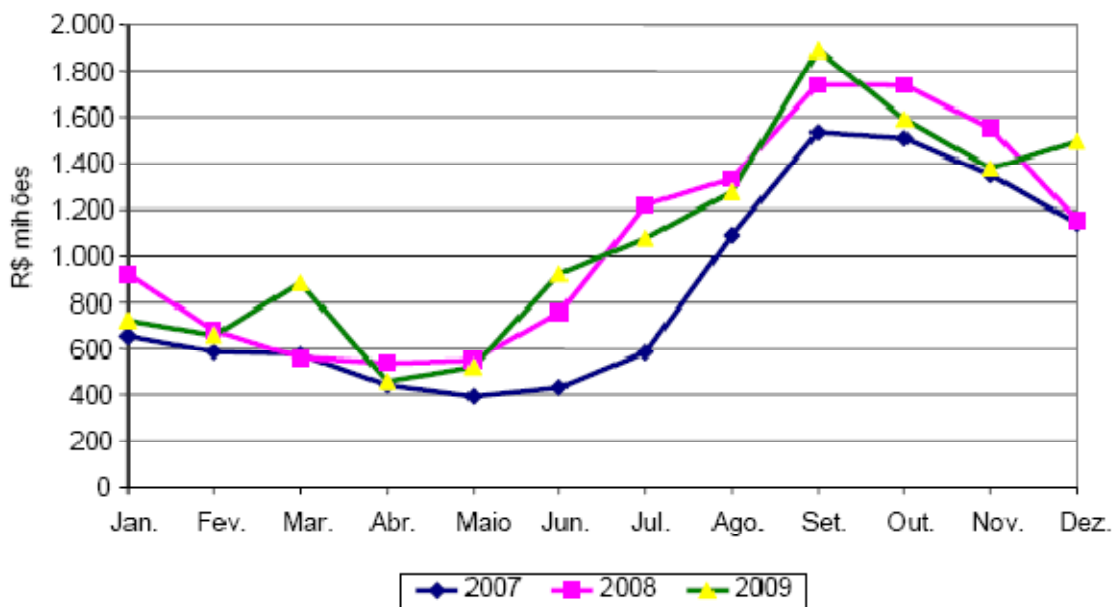


Figura 4- Estimativa de Vendas Mensais de Defensivos Agrícolas, Brasil, 2007 a 2009. Fonte: Elaborada por Ferreira, Vegro & Camargo, 2010 a partir de dados do SINDAG.

Nos cinco primeiros meses de 2010, foi estimado aumento de 5% nas vendas brasileiras de agrotóxicos em relação ao mesmo período de 2009. Contribuíram para isso, em grande parte, a queda dos preços de agrotóxicos e o aumento nos preços recebidos de vários produtos agrícolas (Ferreira, Vegro & Camargo, 2010).

Ficando a previsão para a safra de verão 2010/11, existem expectativas de aumento do consumo na cultura da soja e cana-de-açúcar, em função dos preços estáveis no mercado internacional. Também são boas as perspectivas de maior emprego de defensivos no algodão, na laranja e especialmente no café, cujos preços dispararam no mercado internacional, em função da oferta global apertada (Ferreira, Vegro & Camargo, 2010).

1.7. Herbicida Roundup Transorb® (Glifosato).

O glifosato [n-(fosfonometil) glicina], GLI é o herbicida mais utilizado no mundo (Figura 5) (Mendelson, 1998). Sua molécula foi descoberta em 1971 por J. E. Franz e introduzida comercialmente em 1974, na Europa, com o nome comercial de Roundup® (Grossbard & Atkinson, 1986). No Brasil, este herbicida também tem sido amplamente utilizado, principalmente como dessecante em cultivos sob plantio direto, nas entrelinhas de

culturas e na eliminação de plantas daninhas de ambientes aquáticos (Rodrigues & Almeida, 1995).

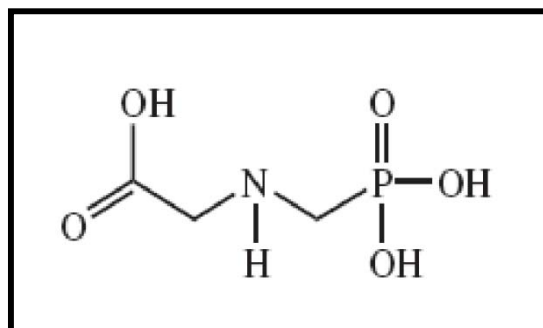


Figura 5. Estrutura molecular do glifosato. Fonte: IUPAC 2009 modificado

O glifosato tem fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ e, na forma de sal de isopropilamônio, apresenta-se acrescido do grupo $(CH_3)_2CHNH_3^+$ (BCPC, 1994). Em condições ambientais, tanto glifosato quanto seus sais são sólidos cristalinos, muito solúveis em água (12g/L a 25°C, para glifosato) e quase insolúveis em solventes orgânicos comuns, tais como acetona e etanol, entre outros. Glifosato funde a 200°C possui densidade de 0,5g/cm³ e se apresenta bastante estável em presença de luz, inclusive em temperaturas superiores a 60°C (BCPC, 1994; Rodrigues *et al.* 2009). É composto anfótero, pertencente ao grupo químico dos derivados da glicina, e apresenta massa molecular igual a 169,1 g, solubilidade em água (S_w) de 12 g L⁻¹ a 25°C, pK_a variados, pressão de vapor praticamente nula e capacidade de atuar como ácido fraco e base fraca ao mesmo tempo, o que o caracteriza como um “*zwitterion*”. Por ser polar é altamente solúvel em substâncias aquosas, se complexando facilmente (Franz, 1986; Vereecken, 2005). Ele se liga fortemente as partículas do solo, possuindo normalmente vida média de 45-60 dias, podendo chegar a persistir por até 170 dias (Vereecken, 2005). Normalmente, é aplicado em pós-emergência, apresentando ação sistêmica. Na maioria dos casos, este herbicida não é metabolizado pela planta, razão por que não apresenta seletividade. Somente variedades geneticamente alteradas para tal são resistentes ao glifosato. Desta forma, praticamente toda a concentração do ingrediente ativo aplicado chega ao solo na sua forma original (Franz, 1986).

Esse herbicida é não seletivo, sistêmico, pós-emergente, representando atualmente 60% do mercado mundial de herbicidas não seletivos totalizando a cifra de 1,2 bilhões de dólares anuais. Sua elevada eficiência na eliminação de ervas daninha e o fato de possuir uma baixa toxicidade aos que o manipulam são responsáveis pelo seu grande sucesso (Amarante Jr *et al.*,

2002; Teófilo *et al.*, 2004), é classificado no Grupo IV- pouco tóxico, segundo a Organização Mundial de Saúde (Roberts *et al.*, 2002; Junior & Santos, 2002). Na região do cerrado brasileiro, está entre os principais agrotóxicos utilizados na cultura da soja, com uma quantidade aproximada de 0,5 a 1,0 kg/ha ou L/há (Oliveira-Filho & Lima, 2002). O GLI é classificado como uma glicina substituída (Souza *et al.*, 2006) é também como um herbicida organofosforado, sem, no entanto, afetar o sistema nervoso da mesma maneira que outros organofosforados e, apesar de ser citado como pouco tóxico, há evidência de efeitos deletérios no ambiente após seu uso prolongado, principalmente devido à resistência adquirida por algumas espécies de ervas (Amarante Jr *et al.*, 2002). Adicionalmente, é necessário atentar-se para outro risco, visto que a formulação mais comercializada no País contém surfactante com significativa ação irritativa dermatológica (Souza *et al.*, 2006), conhecido como polietoxietileno amina- POEA (Gehin *et al.*, 2005).

O modo primário de ação do GLI é a inibição competitiva da 5- enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), interferindo na produção de aminoácidos aromáticos e outros compostos aromáticos em plantas, as quais, quando tratadas com este herbicida, não conseguem produzir os aminoácidos aromáticos necessários para sua sobrevivência (Figuras 6, 7 e 8) (Amarante Jr *et al.*, 2002).

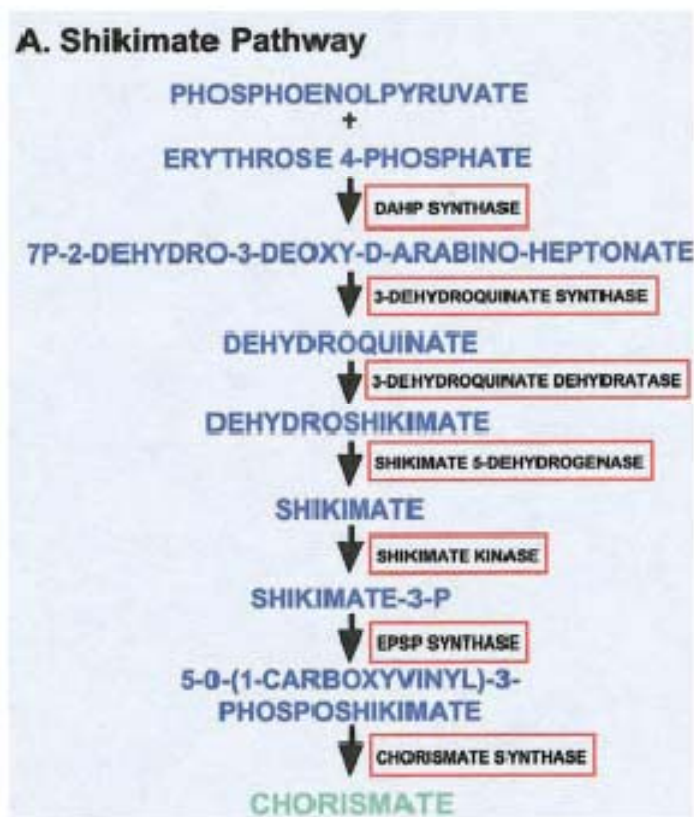


Figura 6: A via do Xiquimato. Fonte: Roberts *et al.*, 2002

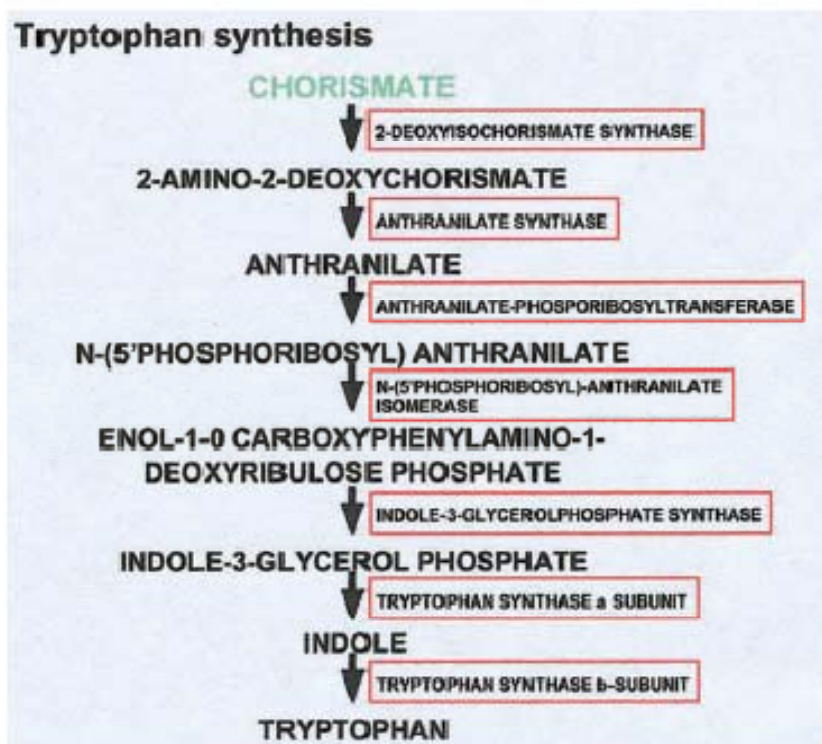


Figura 7: Diagrama de blocos exemplificando a síntese do Triptofano Fonte: Roberts *et al.*, 2002

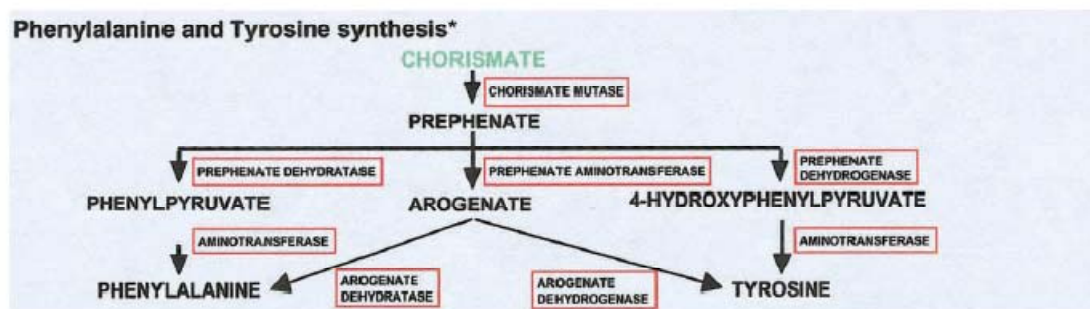


Figura 8: Diagrama de blocos exemplificando a síntese de Fenilalanina e Tirosina Fonte: Roberts *et al.*, 2002

BIOTRANSFORMAÇÃO DO GLIFOSATO EM ANIMAIS

O glifosato, administrado oralmente, sofre pouca biotransformação em animais. Administrado a ratos, uma única dose oral de $6,7 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$, verificou-se que somente 15% da dose foi absorvida em machos e 15-35% em fêmeas. A excreção da quantidade absorvida foi quase inteiramente através da urina. A excreção biliar e pela circulação entero-hepática ocorreu em menor extensão, e menos de 1% da dose foi expirada como CO_2 . Em 48 horas, os animais machos eliminaram aproximadamente 94-98% do glifosato, enquanto que as fêmeas eliminaram 82-84% (Williams *et al.*, 2000; Braguini, 2005).

O ácido aminometilfosfônico (AMPA), o único metabólito do glifosato encontrado em quantidades significativas em sistemas biológicos, é moderadamente ($\sim 20\%$) absorvido pelo trato digestivo, e a excreção ocorre quase totalmente pela urina (Smith & Oehme, 1992; Braguini, 2005).

TOXICIDADE AGUDA

A toxicidade aguda deste pesticida é considerada baixa (WHO, 1994). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO), a DL_{50} oral do glifosato puro em ratos é de 4.230 mg/kg , enquanto que o fabricante (Monsanto, 2010) cita DL_{50} de 5.600 mg/kg . A toxicidade relativamente baixa pode ser atribuída à modalidade bioquímica de ação do glifosato em um caminho metabólico nas plantas (chamado mecanismo do ácido “shikimico”), similar ao existente em alguns microorganismos mais complexos, não existindo, entretanto, em animais. O glifosato pode, no entanto, impedir a ação de funções enzimáticas nos animais. Quando injetado no abdômen de ratos, causou diminuição da atividade de algumas enzimas (Usufumigation, 2002; Amarante Jr *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2009). Apesar da toxicidade relativamente baixa do glifosato, alguns dos componentes de seus produtos formulados

apresentam-na mais elevada que o ingrediente ativo. As formulações encontradas no mercado contêm, geralmente, surfactante, cuja finalidade é impedir a formação de gotas e o alcance de áreas além das folhas que são pulverizadas. Alguns destes são irritantes sérios, tóxicos para peixes (Usfumigation, 2002; Amarante Jr *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2009).

Os tipos mais extensamente usados em formulações do glifosato são os compostos orgânicos etilaminas ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}_2$). Os compostos deste grupo de surfactantes são significativamente mais tóxicos do que o glifosato, causando sérias irritações nos olhos, sistema respiratório e pele. Devido ao potencial irritante e tóxico destas substâncias, novos surfactantes têm sido desenvolvidos e produtos com estas novas formulações vêm sendo vendidos, com aprovação dos órgãos de fiscalização competentes (Usfumigation, 2002; Amarante Jr *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2009).

TOXICIDADE CRÔNICA

A toxicidade aguda do glifosato é considerada baixa, mas alguns trabalhos (WHO, 1994; Bristish, 1994; Usfumigation, 2002; Amarante Jr *et al.*, 2002; Dallegrave, 2003; Rodrigues *et al.*, 2009) têm sugerido que o herbicida pode causar defeitos crônicos de nascimento em determinadas espécies de animais, quando administrado em doses elevadas e por um período prolongado, considerando a bioacumulação no organismo, ele se torna potencialmente tóxico.

A dose diária aceitável por massa corpórea deste composto é relativamente baixa (IDA= $0,05 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$). Os estudos crônicos de alimentação não mostraram perda de peso, efeitos ao sangue e pâncreas ou, ainda, evidência de carcinogenicidade nos seres humanos. No entanto, estudos feitos com ratos demonstraram perda de peso, descarga nasal e morte de matrizes grávidas, além de desordens digestivas (Usfumigation, 2002; Amarante Jr *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2009). Em plantas, o glifosato apresenta grande toxicidade, exceto em caules suberizados. Entre os efeitos agudos e crônicos em seres humanos, são citados: dermatite de contato e síndrome tóxica após a ingestão de doses elevadas (epigastralgia, ulceração ou lesão de mucosa gástrica, hipertermia, anúria, oligúria, hipotensão, conjuntivite, edema orbital, choque cardiogênico, arritmias cardíacas, edema pulmonar não-carcinogênico, pneumonite, necrose tubular aguda, elevação de enzimas hepáticas, aumento da quantidade de leucócitos, acidose metabólica e hipercalemia. Em ambientes aquáticos, a toxicidade do glifosato é acentuada com o aumento da temperatura e do pH (Usfumigation, 2002; Amarante Jr *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2009).

Quanto aos aspectos toxicológicos, o glifosato é irritante dérmico e ocular, podendo causar danos hepáticos e renais quando ingerido em doses elevadas. O composto é absorvido por via oral e dérmica, sendo excretado principalmente na urina. A excreção biliar, no entanto, é limitada e a eliminação através de ar expirado é muito baixa (Amarante Jr *et al.*, 2002; Monsanto, 2010).

O uso intenso pode causar danos às plantas que não são alvo da aplicação, aumentando o número de espécies que podem ser afetadas. O uso repetido tem resultado na maior resistência de ervas daninhas através dos mecanismos da seleção natural (Amarante Junior & Santos, 2002; Monsanto, 2010) que beneficia biótipos resistentes, preexistentes na população, levando ao aumento da quantidade destes indivíduos. Em consequência, a população de plantas resistentes pode aumentar a ponto de comprometer o nível de controle das ervas (Amarante Jr *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2009 Monsanto, 2010).

TOXICIDADE E EFEITOS ADVERSOS AO MEIO AMBIENTE E A SAÚDE

A agência de proteção ambiental norte americana (EPA-US, 1992; Rodrigues *et al.*, 2009), que classifica os herbicidas pela sua toxicidade aguda em quatro categorias onde I é o mais tóxico e IV é o menos tóxico, classifica o glifosato como herbicida de categoria IV.

No Brasil a concentração máxima de glifosato permitida pela resolução, Nº 357, de 17 de março de 2005, para águas de classe tipo I é de 65 µg/L (ppb) (CONAMA, 2009). A Lei 7.802/89 regulamentada pelo Decreto 4.074/02 estabelece os parâmetros de avaliação dos efeitos nocivos dos agrotóxicos no país. O herbicida R. Transorb[®] está registrado na lista de herbicidas da Agência Goiana de Defesa Agropecuária-AGRODEFESA, sob nº. 1450 e com registro no MAPA/IBAMA/ANVISA sob nº4299 na classe III - medianamente tóxico e perigoso ao meio ambiente (AGRODEFESA, 2010).

Os herbicidas são considerados como mutagênicos químicos em potencial, e para vários deles e seus componentes, foram demonstradas atividades associadas às alterações dos ácidos nucleicos (Gabbianelli *et al.*, 2004), com possível indução à apoptose celular e alterações dos produtos gênicos finais. Estudos com piretróides demonstram que essa substância gera alterações na permeabilidade da membrana de eritrócitos com concomitante aumento das enzimas que atuam contra o estresse oxidativo (Nasuti *et al.* 2003; Rodrigues *et al.*, 2009).

A destruição de eritrócitos resulta em hipóxia que é uma causa comum de lesões e danos celulares (Carneiro *et al.*, 2007). Assim como outras moléculas pequenas e anfipáticas, como o etanol, um dos possíveis mecanismos de ação do glifosato sobre as membranas pode ser a diminuição da constante dielétrica do solvente (água) que a envolve e torna possível sua

conhecida organização em bicamada, com concomitante diminuição das forças hidrofóbicas entre os seus lipídios, associado, também, com o aumento da pressão osmótica do sistema sanguíneo (Penha-Silva *et al.*, 2008), esses são os mecanismo comuns da ação dos caotrópicos que atuam sobre as forças hidrofóbicas estabilizadoras de proteínas (Fonseca *et al.*, 2006).

Tais efeitos conduzem a membrana do eritrócito para um estado energético mais favorável em termos termodinâmicos na presença do agente praguicida, com a formação das formas expandidas e contraídas dos eritrócitos, ambas com possibilidades de sofrerem lise (Penha-Silva *et al.*, 2008), estudos recentes têm demonstrado que o glifosato gera fragilidade osmótica de eritrócitos humanos e de ratos dentro das concentrações indicadas pelos fabricantes. As características da intoxicação pelo glifosato podem ser explicadas pela hipóxia causada pela hemólise dos eritrócitos. Como todos os estudos sobre herbicidas têm demonstrado, cuidados na utilização e precauções para se evitar contaminação do ambiente são essenciais. É ainda incipiente, mas os pesticidas podem estar associados com a aquisição de demências, com o aumento da população de idosos no país, o contato tempo-dependente dos indivíduos com substâncias nocivas provavelmente aumentam os níveis de demências provocadas por fatores exógenos tende a aumentar também, desse modo a contaminação do ambiente por agrotóxicos e as doenças assim derivadas devem ser consideradas como um problema de saúde pública (Rodrigues *et al.*, 2009).

A toxicidade do glifosato em mamíferos e pássaros é relativamente baixa. No entanto, sendo não seletivo, o largo espectro de atividade do herbicida conduz à destruição de ambientes naturais e de fontes de alimento de alguns pássaros e anfíbios, levando à redução das populações. Um exemplo extremo é uma espécie de sapo da região de Houston, considerada espécie em perigo de extinção devido à destruição de seu habitat pelo glifosato (Usfumigation, 2002; Amarante Jr *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.* 2009).

Os peixes e os invertebrados aquáticos são os mais sensíveis ao glifosato e aos outros componentes de seus produtos comerciais. Em estudos recentes, onde vários herbicidas foram avaliados quanto a sua ação sobre microorganismos, observou-se que o glifosato apresenta a segunda maior toxicidade para bactérias e fungos, apresentando, ainda, efeitos adversos em alguns invertebrados do solo, incluindo ácaros (Usfumigation, 2002; Amarante Jr *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2009).

Os produtos à base de glifosato são mais tóxicos se inalados que absorvidos por via oral; a inalação de Roundup[®] por ratos provocou toxicidade em todos os grupos testados com sintomas que consistiram de falta de ar, olhos congestionados, redução da atividade e perda de peso (EPA-US, 1992). Os sintomas da toxicidade aguda de glifosato em humanos incluem

dores abdominais, vômitos, excesso de líquido nos pulmões, dores de cabeça, perda de consciência, destruição de células vermelhas do sangue (Sawada, 1988), palpitações cardíacas, dormência facial, coceiras, formigamento entre outros (Temple e Smith, 1992), disfunção dos pulmões, erosão do trato gastrointestinal (Tominack, 1991; Talbot *et al.*, 1991; Temple e Smith, 1992), eletrocardiogramas anormais, danos nos rins (Menkes *et al.*, 1991; Tominack, 1991; Temple e Smith, 1992), danos na laringe (Hung *et al.*, 1997), riscos de ocorrência de linfoma não-*Hodgkin* que pode formar metástases para muitos órgãos e tumores intestinais (Rodrigues *et al.*, 2009). Há também estudos que relacionaram o glifosato ao aumento da incidência de abortos entre a 12ª e a 19ª semana de gravidez em mulheres de fazendeiros expostas a esse componente em Ontario, Canadá (Arbackie *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2009).

Entre as marcas comerciais mais conhecidas, destaca-se o Roundup® (glifosato) (Munro *et al.*, 2000; Szarek *et al.*, 2000; Tsui & Chu, 2003). Esse herbicida está entre os mais utilizados em lavouras, principalmente nas plantações de soja (*Glycine max*). É um herbicida de amplo espectro, com alta eficiência contra 90 tipos de gramas emergidas e ervas daninhas de folha larga (Smith & Oehme, 1992). Serve também para o controle de ervas daninhas aquáticas, em canais e açudes, sendo talvez, o mais importante herbicida desenvolvido nestes últimos anos (Rodrigues & Almeida, 1998, Tsui & Chu, 2003).

No entanto, pouco se conhece sobre os efeitos de águas contaminadas com Roundup® e o que podem provocar em peixes. O glifosato, de acordo com alguns estudos, não é considerado tóxico para o ambiente, e pouco tóxico para os organismos aquáticos (Giesy *et al.*, 2000). Estudando o Roundup® e seus componentes: glifosato, AMPA (ácido aminometilfosfórico) e POEA (polioxietilenoamino), Munro *et al.* (2000), concluíram que ambos não oferecem risco à saúde humana, exceto quando ingerido em grande quantidade, a fim de suicídio.

No entanto, em estudos com Roundup® e POEA, via oral, observaram além de irritação intestinal, efeitos secundários tais como: redução de peso em cães e ratos, diarreia e diminuição de peso no gado bovino. Segundo Tsui e Chu (2003), o POEA, frequentemente usada na composição deste herbicida, com a finalidade de potencializar sua ação, chega a ser de duas a três vezes mais tóxicas que o glifosato. Estudos realizados em carpas, expostas ao herbicida, mostraram alterações hematológicas e histopatológicas degenerativas no fígado e no rim destes animais (Szarek *et al.*, 2000).

Os produtos (herbicidas) à base de glifosato são altamente tóxicos para pessoas e animais. Entre os sintomas mais comuns registrados são: irritação nos olhos e pele, dor de

cabeça, náuseas, entorpecimento, elevação da pressão arterial e palpitações. O surfactante POEA usado no produto formulado (Roundup[®]) é mais tóxico que o glifosato puro; a combinação dos dois potencializa a ação tóxica (Cox, 1998; Roman *et al.*, 2009).

Embora a comercialização deste herbicida seja liberada, estudos laboratoriais detectaram efeitos adversos em todas as categorias dos testes toxicológicos. Entre eles, a toxicidade crônica (lesões em glândulas salivares), toxicidade subcrônica (inflamações nas mucosas do estômago), danos genéticos (em células sanguíneas do corpo humano), efeitos reprodutivos (redução dos espermatozóides em ratos; maior frequência de espermatozóides anormais em coelhos), e carcinogenicidade (maior frequência de tumores no fígado de ratos e câncer de tiróide em ratos) (Cox, 1998; Roman *et al.*, 2009).

No meio-ambiente, o herbicida a base glifosato é rapidamente convertido em seu principal metabólito, o Ácido Amino-Metil-Fosfônico (AMPA), que também possui baixa toxicidade, mas persistência maior. O AMPA é relacionado ao excesso de divisão celular nos rins e bexigas de ratos, além de provocar diminuição de peso nestes (Souza *et al.*, 2005). É apontado como um potencial contaminante ambiental, visto que é altamente hidrossolúvel, existindo muitos relatos de sua detecção em águas superficiais (Cox, 1998; Amaral, 2009). Entretanto, há poucos relatos de contaminação de lençóis freáticos, possivelmente por conta de sua propriedade de alta adsorção ao solo, variando essa capacidade, possivelmente, em função dos diferentes teores de íons metálicos presentes nos mesmos (Souza *et al.*, 2006). A dispersão pelo ar, juntamente à contaminação de corpos hídricos, é potenciais fontes de exposição a seres humanos, sendo de forma direta (aplicadores de agrotóxicos, agricultores) ou indireta (pessoas que se servem das águas contaminadas, por exemplo) (Amaral, 2009).

1.8. Testes de Toxicidade

A Toxicologia tem como objeto fundamental estudar a intoxicação sob todos os aspectos. Por intoxicação entende-se a manifestação (clínica e/ou laboratorial) de efeitos adversos que revelam um estado patológico causado pela interação de um toxicante, isto é, de um agente químico com um organismo. Os agentes tóxicos são, portanto, substâncias químicas capazes de quebrar o equilíbrio orgânico, ou seja, substâncias que provocam alterações na homeostase do organismo (Larini, 1993; Souza, 2008).

Desse modo, a toxicidade é uma propriedade potencial que as substâncias químicas possuem, em maior ou menor grau, de instalar um estado patológico em consequência de sua introdução e interação com o organismo. Esta maior ou menor gravidade de ação dependerá de

fatores relacionados com a substância química, com o organismo e com o ambiente onde a ação ocorre (Larini, 1993; Souza, 2008).

A preocupação com os ambientes aquáticos começou na década de 1930, nos Estados Unidos e em países Soviéticos, quando foram implementados os primeiros testes de toxicidade aguda com organismos aquáticos, com o objetivo de estabelecer a relação causa/efeito de substâncias químicas e despejos líquidos sob a qualidade da água. A partir da década de 1940 foi recomendado o uso de peixes para avaliar a toxicidade desses despejos líquidos. Porém, um pouco mais tarde, em estudos foi observado que havia espécies de peixes resistentes a certos produtos químicos. Assim, surgiu a necessidade da utilização de espécies mais sensíveis, de importância econômica e representativa do ecossistema aquático (Rand, 1995; Souza, 2008).

Os estudos continuaram evoluindo e nas décadas de 1950 e 1960 deu-se maior importância a critérios e padrões que permitiram as disposições desses agentes em níveis compatíveis à preservação dos recursos hídricos. Na década de 70 houve grande desenvolvimento de sistemas adequados para a condução dos testes de toxicidade, aguda e crônica, utilizando ovos e larvas de peixes na avaliação da toxicidade de substâncias químicas (Rand, 1995; Souza, 2008).

No Brasil, a partir de 1976, os estudos de toxicologia aquática começaram a serem desenvolvidos. Porém, o modelo utilizado na avaliação da toxicidade foi baseado nos critérios norte-americanos e soviéticos, os quais avaliavam apenas o caráter potável da água e não a qualidade da vida na água. Com o avanço dos estudos, os conhecimentos tornaram-se mais eficientes e esses importantes aspectos de manutenção da vida aquática começou a ser percebido e utilizado como critério de avaliação da toxicidade das substâncias químicas, estabelecendo-se padrões seguros para o ambiente e para a qualidade da água (Zagatto e Bertolotti, 2006; Souza, 2008).

No final da década de 70 foi constituído um grupo de pesquisadores com o objetivo de padronizar metodologias e editar normas nacionais sobre testes de avaliação de toxicidade aguda e crônica utilizando-se organismos-testes (nativos) já eleitos nas normas internacionais. Foram realizados testes de toxicidade com os peixes das seguintes espécies: *Hemigramus marginaltus* (nativo), *Tilapia melanopleura* e *Cyprinus carpio*, *Salmo gairdneri*, *Poecilia reticulata* e *Brachyodaphnia dubia* (exótico). Também foram realizados testes de toxicidade com cladóceros das espécies: *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* (exóticas). Estes organismos foram expostos a efluentes industriais, soluções de compostos metálicos e detergentes com a finalidade de se avaliar a Concentração Média Letal 50 % (Pereira *et al.*, 1987). Pereira *et al.* (1987) verificaram que exposição crônica a íons cúpricos pode provocar

degeneração nas células do baço, fígado e intestinos, enquanto que nas brânquias ocorreu apenas o acúmulo de sais de cobre.

Na década de 1980 foram desenvolvidos ensaios de toxicidade de curta duração com as fases mais sensíveis de alguns organismos, a fim de aumentar a eficiência e minimizar os custos. Métodos utilizando microcrustáceos e peixes de águas continentais e marinhas foram normalizados e estão sendo usados mundialmente e fazem parte das exigências legais dos órgãos ambientais em vários países (Macek, 1980; Souza, 2008).

O primeiro trabalho no país sobre avaliação de toxicidade de agrotóxicos para organismos aquáticos foi realizado por Almeida (1997), na tentativa de determinar a toxicidade do DDT para fêmeas de *Phallocero caudimaculatus*. Nesta época não existia padronização quanto aos procedimentos laboratoriais e ao estabelecimento de parâmetros biológicos e físico-químicos para a realização dos bioensaios de toxicidade.

O impacto dos agrotóxicos sobre os organismos do ambiente aquático pode ser estimado e monitorado por testes de toxicidade conduzidos em laboratório (Rand & Petrocelli, 1985).

Segundo Rand & Petrocelli (1985), os testes de toxicidade obedecem ao modelo geral de procedimento que consiste na exposição de organismos-teste a diferentes concentrações do agente tóxico, em locais (laboratórios) sob rigoroso controle das condições ambientais (temperatura, pH, alcalinidade). Os efeitos estabelecidos anteriormente ao teste (mortalidade, reprodução ou crescimento), são avaliados pela comparação com o grupo controle (Rauco, 2002)

Os bioensaios com organismos aquáticos em condições de laboratório possibilitam a qualificação e a mensuração dos efeitos dos compostos orgânicos tóxicos sobre a biota e a estimativa dos riscos de intoxicação ambiental. Os bioensaios, aplicados ao controle da poluição da água, permitem estimar os efeitos dos principais poluentes do meio ambiente, frente a organismos aquáticos (marinhos ou dulcícolas), pertencentes a diferentes níveis tróficos destes ecossistemas (Almeida, 1997; Rauco, 2002).

A toxicologia clássica estuda, em condições de laboratório, os efeitos de tóxicos sobre organismos individuais, sistemas, órgãos, tecidos e células, objetivando extrapolar os resultados obtidos para a população humana. A toxicologia do ecossistema é limitada a dados disponíveis sobre espécies de interesse. A ecotoxicologia é uma ciência complexa e multidisciplinar, que se preocupa com a avaliação do risco que determinada perturbação pode trazer a determinado ecossistema, bem como o desenvolvimento de método que contribua para a determinação desse risco. Assim, a ecotoxicologia estuda os efeitos dos agentes tóxicos sobre

a estrutura e a função de comunidades bióticas e sobre sua integração com os componentes abióticos (Guimarães, 1996; Rauco, 2002).

O universo de testes de toxicidade é grande e, por razões práticas e econômicas, a escolha deve atender as exigências científicas, de modo que as técnicas sejam reconhecidas ou padronizadas nacional ou internacionalmente (Zagatto & Goldtein, 1991). Com esta finalidade, para o ambiente aquático, foram desenvolvidos e utilizados principalmente testes com peixes, microcrustáceos, algas e bactérias, sendo que alguns métodos já foram padronizados e outros estão em vias de padronização (Rauco, 2002)

O termo teste de toxicidade aquática foi proposto por Rand & Petrocelli (1985), por acharem que o termo bioensaio seria aplicado apenas às indústrias farmacêuticas, que deles se utilizam para avaliar a potência de vitaminas e outros compostos farmacologicamente ativos (Rauco, 2002).

O teste de toxicidade aquática é um procedimento no qual as respostas de organismos aquáticos são usadas para detectar ou medir a presença ou efeito de uma ou mais substâncias, resíduos ou fatores ambientais, sozinhos ou em combinação. Estes testes são utilizados para avaliar a poluição do corpo de água quando os testes químicos e físicos não são suficientes para avaliar os efeitos potenciais sobre a biota aquática e, conseqüentemente, estabelecer procedimentos para protegê-la (Golstein *et al.*, 1983; Rauco, 2002).

Os estudos em toxicologia aquática são qualitativos e quantitativos em relação aos efeitos tóxicos sobre os organismos aquáticos. Herricks (2002) cita que os efeitos tóxicos podem incluir tanto a letalidade (mortalidade) e efeitos subletais, como alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, respostas farmacocinéticas, patologia, bioquímica, fisiologia e comportamento (Manrique, 2009).

Por meio dos testes de avaliação da toxicidade determina-se o tempo e as concentrações em que o agente químico é potencialmente prejudicial para determinado organismo. Para qualquer produto, o contato com a membrana celular ou sistema biológico pode não produzir efeito adverso se a concentração do produto for baixa ou o tempo de contato for insuficiente. Por outro lado, concentrações e tempo de exposição poderão não ter efeitos prejudiciais em tempo de exposição extremamente curtos (Rand & Petrocelli, 1985; Rauco, 2002).

Os testes de toxicidade são realizados para estudar a toxicidade aguda, crônica, a bioacumulação e a biodegradação das substâncias tóxicas, além dos testes subletais, que podem ser reunidos em três grupos básicos: bioquímicos e fisiológicos, comportamentais e histológicos. (Rand & Petrocelli, 1985; Rauco, 2002).

Investigação e Determinação da Concentração Média Letal de 50% (CL₅₀)

A Concentração Média Letal de 50% (CL₅₀) pode ser definida como a concentração estimada que promova a mortalidade de 50% da população exposta ao agente tóxico por determinado período de tempo. Este período, variável com a espécie-teste utilizada, situa-se geralmente entre 24 e 96 horas. Os testes de toxicidade aguda são frequentemente conduzidos utilizando-se o sistema estático, ou seja, sem renovação de água no decorrer do experimento. Este sistema é muito utilizado por ser mais simples e menos dispendioso quando comparado aos sistemas semi-estático (renovação parcial) ou ao sistema de fluxo contínuo (renovação contínua) (Rand & Petrocelli, 1985, Rauco, 2002). O sistema estático é especialmente recomendado quando a substância-teste estudada é comprovadamente estável no ambiente, como o cobre e outros metais pesados (Rauco, 2002). Lombardi (1999) observou que praticamente não houve diferenças, em termos de CL₅₀, entre o sistema estático e o semi-estático em testes de toxicidade de oxiclreto de cobre para o camarão de água doce (*Macrobrachium rosenbergii*).

A CL₅₀ pode ser calculada por diferentes métodos, dentre os quais o da Interpolação “Moving Average” (Bennet, 1952), o “Probit” (Finney, 1971), o método Binomial (Stephan, 1977), ou o "Trimed Spearman-Karber" (Hamilt n *et al.*, 1977). Lombardi (1999), estudando a toxicidade de diferentes agrotóxicos para o camarão de água doce, verificou resultados estatisticamente semelhantes com os diferentes métodos de cálculo da CL₅₀ (Rauco, 2002).

1.8.1- Genética Toxicológica – Genotoxicidade e Mutações

A Genética Toxicológica estuda os efeitos promovidos por agentes genotóxicos no material genético dos seres vivos. Os estudos e investigações de genotoxicidade podem abranger dois aspectos. O primeiro analisa os efeitos do produto sobre o material genético, que podem resultar em alterações na estrutura do DNA como as quebras em fita simples ou dupla e a formação de adutos (ligação covalente de um elemento ou composto químico com as bases nitrogenadas do DNA) entre outros. Estas alterações ocorridas na molécula de DNA, quando não reparadas podem levar a mutações. Sabe-se que a capacidade de reparo do DNA diminui com o passar do tempo e que a taxa de mutação de cada divisão celular aumenta com a idade do indivíduo. Foi constatado que os sobreviventes de Hiroshima e Nagasaki tiveram um aumento anual nas mutações no gene da Gliforina A (Grupo MN) (Grisolia, 2005).

A segunda analisa os efeitos destas alterações nos produtos gênicos (RNAs, polipeptídios e proteínas) os quais podem se refletir nas populações alterando sua fertilidade e sua capacidade de responder as mudanças ambientais entre outras (Grisolia, 2005).

A partir destes aspectos se destacam três linhas de estudos: a identificação da frequência e modo como uma alteração genética se desenvolve em face da exposição de um agente genotóxico; o estudo dos mecanismos físicos e químicos que causam estas desordens e a avaliação de agentes com potencial para ocasioná-las (Ferraro, 2009).

A exposição de um organismo a compostos tóxicos pode ser o fator indutor de cascata de eventos sobre o DNA que pode levar a formação de alterações nesta macromolécula. Como resultado desta mudança pode ocorrer diversas disfunções metabólicas que podem levar a vários tipos de doenças, inclusive ao câncer. A detecção e quantificação destes eventos podem ser empregadas com a utilização de biomarcador de exposição e de efeitos em organismos expostos a tais agentes no ambiente (Maroni, 2000).

Uma provável causa da iniciação do câncer pode ser a formação de adutos, como resultado da interação de compostos genotóxicos com o DNA, caso não ocorra o reparo desta lesão, esta pode ser propagada para as células filhas. Estas células podem permanecer latentes por muitos anos acumulando novos danos ou ainda sofrerem exposição posterior ao agente promotor, em ambos os casos poderiam desencadear processo de malignização. Os agentes iniciadores do processo geralmente estabelecem ligações diretas ao DNA, enquanto que os promotores podem agir mimetizando hormônios, alterando a expressão gênica ou as vias metabólicas das células (Grisolia, 2005).

Muitos dos xenobióticos lançados ao ambiente constituem-se de agentes causadores de mutações gênicas e de alterações cromossômicas. Alguns destes são chamados de aneugênicos, pois atuam provocando alterações na distribuição dos cromossomos durante o processo de divisão celular, dando origem a aneuploidias. Outros, chamados de clastogênicos, induzem quebras e produzem alterações na estrutura do cromossomo. Estas quebras e alterações podem ser detectadas através de estudos citogenéticos. Portanto, tendo efeito clastogênico ou não, através de ensaios de genotoxicidade e citogenéticos, é possível proceder-se à avaliação dos efeitos mutagênicos de determinado composto, o que torna estes tipos de teste imprescindíveis nas avaliações de risco aos seres humanos e ao ambiente (Rabello-Gay, Rodrigues & Monteleone-Neto, 1991).

Os efeitos de muitos poluentes podem ser examinados diretamente em vários organismos, normalmente através da análise de células, tecidos ou órgãos, mediante a utilização de biomarcadores. No entanto sob o ponto de vista genético os efeitos mutagênicos

destas substâncias podem não se manifestar por várias gerações, mas em dado momento de sua história, passar a ter efeito importante (Padrangi *et al.*, 1995).

Genotoxicidade dos Agrotóxicos (herbicida glifosato)

Estudos sobre os efeitos biológicos adversos dos agrotóxicos têm aumentado nos últimos anos, porém, são muitas vezes incompletos com dados contraditórios referente à sua ação genotóxica. Agrotóxicos são compostos muito reativos que podem formar ligações covalentes com vários centros nucleofílicos de biomoléculas celulares, incluindo DNA. Além disso, estudos apresentaram vários herbicidas que induziram a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem estar envolvidas nas quebras de fitas simples de DNA (Bolognesi *et al.*, 1997; Bagchi *et al.*, 1995; Poletta, 2008).

Os efeitos genotóxicos do glifosato e sua formulação comercial Roundup[®], vários estudos em diferentes sistemas de teste foram realizados nos últimos anos, relatando resultados inconsistentes. Alguns estudos testaram tanto glifosato como sua formulação comercial (Roundup[®]), havendo poucos trabalhos que investigaram ambos simultaneamente. Li e Long (1988) obtiveram resultados negativos para glifosato na avaliação de genotoxicidade *in vitro*, em hepatócitos de rato por meio do ensaio de síntese de DNA não-programada e *in vivo* na medula óssea de ratos pelo teste de Aberrações Cromossômicas (AC). Da mesma forma, outros estudos considerou que tanto o glifosato (Rank *et al.*, 1993) quanto Roundup[®] não induziram aumento na frequência de micronúcleos [Rank *et al.*, 1993; Dimitrov *et al.*, 2006] nem AC (Dimitrov *et al.*, 2006) na medula óssea de ratos em *in vivo*.

Contrariamente a estes resultados, Bolognesi *et al.* (1997) observaram que tanto o glifosato como Roundup[®] promoveram efeitos genotóxicos positivos *in vitro* em sangue periférico humano evidenciado pela troca de cromátides irmãs, também resultados positivos forma encontrados *in vivo* em camundongos, comprovados através do teste de eluição alcalina 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) pela quantificação de células renais e do fígado, confirmada pelo teste de micronúcleo em células de medula óssea. Da mesma forma, Clements *et al.* (1997) relatou danos no DNA para Ensaio Cometa em eritrócitos de girinos da *Rana catesbeiana* após exposição ao glifosato puro e ao Roundup[®]. Verificou-se que o Roundup[®] também induziu significativo aumento na frequência de micronúcleos, anormalidades nucleares e danos ao DNA (ensaio cometa) em eritrócitos periféricos do peixe dulcícula *Carassius auratus* (Cavas & Könen, 2007). Observou-se também aumento na frequência de micronúcleos após a exposição de espécimes de *Tilapia rendalli* (peixe), não ocorrendo o mesmo em camundongos (Grisolia, 2002). Resultado positivos encontrados *in vivo* para

adutos DNA em camundongos foram demonstrados em testes com Roundup[®], não foram obtidos resultados semelhantes com glifosato puro (Peluso *et al.*, 1998). Em teste com *Allium cepa* o Roundup[®] também apresentou resultados positivos para AC (Rank *et al.*, 1993). Em células humanas normais e fibrossarcoma humano, estudos *in vitro* constataram que o Roundup[®] induz aumento na quebra de fitas do DNA (Monroy *et al.*, 2005). Outros autores relataram resultados contraditórios em cultura de linfócitos periféricos expostos ao Roundup[®], mostrando aumento na frequências de trocas das cromátides irmãs, mas não ocorreu aumento de CA (Šiviková & Dianovský, 2006).

Entre a variedade de métodos desenvolvidos para a detecção de danos ao DNA, o Ensaio Cometa ou *Single Cell Gel Eletroforese* (SCGE) juntamente com o Teste do Micronúcleo são frequentemente utilizados pela sua rapidez, praticidade e de fácil aplicação, particularmente interessantes como métodos para realizar estudos de monitoramento *in vivo* (Schmid, 1975; Singh *et al.*, 1988; Hartmann *et al.*, 2003; Campos Ventura, Fransceschi de Angelis & Marin-Morales, 2008).

1.8.2- Teste Micronúcleo (MN)

Hoofman e De Raat (1982), tomando por base o teste do micronúcleo (MN) originalmente desenvolvido por Schmid (1975) para células da medula óssea de camundongos, introduziram-no nos estudos de células sanguíneas de peixes mantidos em laboratório. Esta modificação do teste original passou a ser conhecida como *Piscine Micronucleus Test*, adotado pela maioria dos pesquisadores como Teste do Micronúcleo Pisceo (Carrasco, Tilbury & Myers, 1990; Ferraro, 2009).

Para Hose *et al.* (1987) este teste revelou grandes potencialidades por ser de rápida execução, não dispendioso e um excelente indicador da contaminação química do ambiente nos peixes.

Desde o início de seus trabalhos, com o MN em peixes Hoofman e De Raat (1982), fizeram observações sobre alterações morfológicas nos núcleos eritrocitários, os quais normalmente são elípticos, mas que em alguns casos perdiam esta forma usual (Ferraro, 2009).

Hose *et al.* (1987), ao analisarem as frequências de micronúcleos em eritrócitos circulantes de duas espécies de peixes marinhos (*Genyonemus lineatus* e *Paralabrax clathratus*) coletados em regiões poluídas e não poluídas, da região sul da Califórnia, encontraram frequências maiores de micronúcleos (na ordem de quatro vezes, na primeira espécie e na ordem de onze vezes na segunda espécie) entre os grupos. Neste trabalho, os autores descrevem várias alterações morfológicas nos núcleos dos eritrócitos circulantes. Como

as frequências das alterações morfológicas nucleares apresentavam diferenças significativas entre os grupos coletados nas regiões poluídas e os grupos coletados em regiões não poluídas, os autores sustentaram, em seu trabalho, que estas alterações morfológicas nucleares eram indicadores dos efeitos genotóxicos de substâncias químicas presentes na água. Consideraram ainda que estas alterações fossem possíveis de serem incluídas nas contagens dos micronúcleos realizadas em seu trabalho. Estes autores concluem ainda que o teste dos micronúcleos fosse aplicável a qualquer espécie de peixe, independente de suas características cariotípicas (Ferraro, 2009).

Carrasco, Tylbury e Myers (1990) (*in* Ferraro, 2009), fotografaram e quantificaram os micronúcleos encontrados em seu trabalho, assim como as alterações morfológicas nucleares encontradas. Estas alterações foram descritas e classificadas pelos autores em:

a) *Blebbled*: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina (mais escuro). Os tamanhos destas evaginações situam-se na faixa de pequenas protuberâncias até estruturas completamente circunscritas, semelhantes aos micronúcleos, mas ainda ligadas ao núcleo principal.

b) *Lobed*: núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os *Blebbled*. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas.

c) *Vacuolated*: núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos no seu interior. Estes “vacúolos” apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior.

d) *Notched*: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Estes cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pelo envoltório nuclear.

Em sua conclusão os autores põem em dúvida a aplicabilidade do MN em peixes e a quantificação das alterações morfológicas nucleares, apontando-as como inconsistentes pelas seguintes razões: nos trabalhos publicados, são poucas as áreas geográficas comparadas nos estudos de campo; médias aritméticas são frequentemente utilizadas para quantificar os micronúcleos; alguns resultados estão aparentemente relacionados a efeitos citotóxicos; e finalmente, as alterações morfológicas nucleares são atribuídas aos efeitos genotóxicos de substâncias, sem se considerar outros fatores etiológicos ou ambientais (Ferraro, 2009).

Estes autores ainda levantam a hipótese de que a Necrose Eritrocitária Viral poderia formar estruturas semelhantes aos micronúcleos ou as alterações morfológicas nucleares denominadas *blebbled*. Assim como as alterações denominadas *lobed*, lembram estruturas

encontradas em eritrócitos de sangue periférico, oriundos de exemplares com anemia induzida pela ausência da vitamina B₁₂ ou por deficiência do ácido fólico (Ferraro, 2009).

No entanto esta opinião não é compartilhada por outros autores. Assim, para Al – Sabti e Metcalfe (1995), uma vez que os peixes teleósteos apresentam eritrócitos nucleados, a presença de micronúcleos nestas células pode ser averiguada e usada como medida da atividade clastogênica ou aneugênica de substâncias no ambiente (Ferraro, 2009).

Para Minissi, Ciccotti e Rizzoni (1996), o MN mostrou resultados consistentes e sensíveis para a detecção dos efeitos mutagênicos de poluentes em ambientes aquáticos dulcícolas. Estas autoras realizaram estudos com a espécie *Barbus plebejus* coletados em dois rios da região central da Itália. Um deles, o rio Mignone, não poluído e o outro, o rio Tibre, poluído. Como controles, utilizaram exemplares obtidos em estações de piscicultura e mantidos em condições laboratoriais. Várias amostras de sangue para a realização do teste foram coletadas em tempos diferentes, sendo a primeira no ato da captura. Como resultados obtiveram diferenças não significativas entre o grupo controle e os exemplares coletados no rio Mignone e significativas em relação aos exemplares coletados no rio Tibre. Destacam ainda que não observaram efeitos sazonais nas frequências dos micronúcleos e as frequências destes diminuíram nos exemplares coletados no rio Tibre após 50 e 100 dias (Ferraro, 2009).

Gustavino *et al.* (2001), trabalhando com exemplares de carpa (*Cyprinus carpio*) submeteram um grupo à exposição de Raios – X e outro a colchicina por injeção intraperitoneal. Avaliaram posteriormente as frequências de micronúcleos entre os tratados e os controles examinando células eritrocitárias circulantes coletadas por punção cardíaca. Variando as dosagens de radiação, as concentrações de colchicina e fazendo coletas de amostras de sangue em tempos diferentes (3, 7, 14, 21, 35, 50 dias após os tratamentos) obtiveram resultados interessantes, principalmente, no grupo tratado com colchicina (Ferraro, 2009).

Alguns autores atribuem à origem de certas alterações morfológicas nucleares a problemas durante a segregação dos cromossomos eventualmente emaranhados e agregados ou ainda da amplificação gênica no ciclo ponte-quebra-fusão e a posterior eliminação do DNA amplificado destes cromossomos (Ergene, *et al.*, 2007).

Embora estas alterações já estivessem sendo observadas já faz algum tempo, não lhes era atribuída nenhuma origem genotóxica. A partir do ano de 2000, muitos autores começaram a levar em consideração estas alterações por perceberem que elas apareciam com mais frequência em peixes coletados em locais poluídos ou submetidos à bioensaios com metais tóxicos e agrotóxicos. Atualmente, estas alterações são também computadas junto com a frequência de micronúcleos em muitos trabalhos de monitoramento ambiental (Çavas;

Gözükara, 2003; Ferraro *et al.*, 2004; Çavas; Gözükara, 2005; Da Silva Souza & Fontanetti, 2006; Matsumoto *et al.*, 2006; Ferraro, 2009)

Além dos eritrócitos dos peixes, outras células também podem ser usadas na detecção de micronúcleos, tais como células das brânquias, fígado, rins e células das escamas dos peixes. Neste último exemplo, são realizados pequenos cortes nas membranas interradaiais das nadadeiras e posteriormente as células são coletadas. Como as células proliferativas estão em contato direto com água é sugerido que este ensaio seja muito útil na avaliação de contaminação aquática, tendo a vantagem assim como na análise dos eritrócitos de não ser necessário o sacrifício dos animais (Arkhipchuk & Garanko, 2005; Ferraro, 2009).

Como fica evidenciado, apesar do MN ser bem estabelecidos em camundongos, nos peixes muitos aspectos deste protocolo necessitam de refinamento. O conhecimento de fatores como a duração do ciclo dos eritroblastos, o tempo requerido para sua maturação e aparecimento na circulação e seu tempo de vida devem ser considerados. Deve-se salientar que o rim cefálico é o principal, mas, não o único órgão hematopoiético dos peixes. O sangue circulante, no entanto, recebe eritrócitos de vários órgãos hematopoiéticos e conseqüentemente eventuais eritrócitos com micronúcleos não originados a partir do rim cefálico. Além destes fatores, também devem ser consideradas as diferenças interespecíficas e desta forma novos ensaios com estes organismos devem ser realizados, uma vez que, ainda estamos muito distantes da total compreensão dos mecanismos envolvidos na formação dos micronúcleos e das anormalidades da morfologia nuclear (Udroiu, 2006; Ferraro, 2009).

1.8.3- Ensaio Cometa (EC)

O Ensaio Cometa (EC), também conhecido como SCGE (*Single-Cell Gel Electrophoresis*), é uma técnica capaz de detectar dano ao DNA em células individualizadas. As células nas quais se deseja verificar o dano ocasionado ao seu DNA, são suspensas em agarose de Baixo Ponto de Fusão - LMP e então colocadas em lâminas de vidro para microscopia as quais foram previamente recobertas com uma camada de agarose normal. As lâminas contendo as células são então submetidas a uma corrida de eletroforese (Speit & Hartmann, 1999; Ferraro, 2009).

O DNA contido em células de organismos eucariotos possui alguns centímetros de comprimento. Para que o DNA seja acomodado no interior do núcleo que possui entre 5 µm e 10 µm de largura, este DNA tem que ser fortemente condensado. Danos impostos à molécula de DNA provocam um relaxamento desta condensação e ocasionalmente quebras na estrutura molecular (Rojas, Lopez, Valverde, 1999; Collins *et al.*, 2008; Ferraro, 2009).

O princípio desta técnica se baseia no fato de que o DNA da célula que não tiver dano migrará em conjunto formando um círculo (os aspectos descritos só são visíveis após a coloração adequada). Caso ocorra dano ao DNA, serão formados fragmentos de diversos tamanhos. Os fragmentos menores tendem a migrar mais rapidamente do que os maiores. Ocorrendo um dano muito intenso em uma célula, muitos fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, formando-se então a figura típica de um cometa (Olive, Banáth e Durand, 1990; Collins *et al.*, 2008; Ferraro, 2009).

As quebras detectadas pelo EC podem ocorrer em virtude da digestão do DNA no processo de apoptose. Para Olive, Banáth e Durand (1990), as células que se encontram neste processo são distinguíveis das outras, pois não apresentam nucleóide típico, estando todo seu DNA fragmentado (Ferraro, 2009).

Várias são as metodologias empregadas para avaliar a extensão do dano ocasionado ao DNA. Uma das medidas utilizadas na avaliação deste dano é feita pela relação entre o raio do núcleo e a extensão da “cauda” (*Tail length*) formada pelo DNA em migração. Outra forma de medir o dano é a distribuição do DNA na cauda. A partir destas medidas outras foram sendo incorporadas na quantificação dos danos ao DNA (Kumaravel & Jha, 2006; Kumaravel *et al.* 2007; Ferraro, 2009).

Destas análises, o comprimento da cauda em relação ao diâmetro do nucleóide pode ser medido visualmente. As outras necessitam de programas de análise. Programas de análise de imagem são excelentes ferramentas que podem quantificar os danos sofridos pelo DNA sob diferentes parâmetros. No entanto, muitos destes programas são vendidos apenas junto com a marca específica de microscópio adquirido. Outros, apesar de funcionarem bem com qualquer equipamento têm como fator limitante o alto custo. Para contornar estes inconvenientes existem programas de domínio público que rodam sob diferentes plataformas e sob diversos sistemas operacionais que permitem a análise das imagens de cometas (Kumaravel & Jha, 2006; Kumaravel *et al.*, 2007; Ferraro, 2009).

Este ensaio é de fácil execução, custo relativamente baixo, com boa reprodutibilidade, rapidez e sensibilidade. Além de apresentar as características citadas, este ensaio permite obter resultados a partir de poucas células e os dados são extraídos de cada célula individualmente, podendo ser usado para avaliar danos em células em experimentos *in vitro* ou *ex vivo* (Monteith & Vanstone, 1995; Sasaki *et al.*, 1997; Rojas, Lopez & Valverde, 1999; Kumaravel *et al.*, 2007).

Ao contrário de outros tipos de ensaio como o dos micronúcleos (MN), de aberrações cromossômicas (AC) ou de trocas de cromátides irmãs (SCE) que necessitam de células em

proliferação para sua viabilidade, o EC não necessita desta condição podendo ser utilizado em, virtualmente, qualquer tipo de célula (Padrangi *et al.*, 1995; Rojas, Lopez & Valverde, 1999). Uma vez que, substâncias genotóxicas, muito frequentemente, são tecido específicas, ficam evidentes as vantagens do uso do EC. Como já citado anteriormente este ensaio não depende da proliferação celular. Então, o tecido alvo do agente genotóxico pode ser analisado diretamente, sendo que as células danificadas podem ser quantificadas individualmente (Padrangi *et al.*, 1995).

Rydberg e Johanson, citados por Rojas, Lopez e Valverde (1999), foram os primeiros a quantificar o dano sofrido pelo DNA em células individualizadas. Misturaram uma suspensão celular com agarose e colocaram esta mistura sobre uma lâmina. Esta foi então colocada em solução de lise sob condições alcalinas brandas. Como corante utilizaram o corante Laranja de Acridina. Com o auxílio de um fotômetro quantificaram o dano no DNA. As quebras em fita dupla têm coloração vermelha e as quebras em fita simples coloração verde. As variações de tonalidade entre estas cores indicam a quantidade de quebras e qual tipo. Ostling e Johanson (1984) desenvolveram a eletroforese em lâmina com gel chamada então de EC devido à forma característica tomada pelo DNA, que sofreu o processo de migração ao final da aplicação deste ensaio. Nesta técnica, as células eram misturadas a agarose LMP e depositadas sobre uma lâmina com agarose normal. Sofriam então processo de lise por detergentes e soluções salinas altamente concentradas. Isto permitia a liberação do DNA. As lâminas eram então submetidas à eletroforese em tampão neutro. Esta técnica apresentava algumas limitações, pois só era capaz de detectar quebras de fita dupla no DNA e ainda poderia ser confundido com o RNA ainda presente no núcleo (Rojas; Lopez & Valverde, 1999).

Singh *et al.* (1988), com a intenção de verificar danos no DNA ocasionados por Raios – X e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), desenvolveram uma variação da técnica anteriormente descrita, utilizando-se de um tampão de eletroforese com pH superior a 13. Com esta modificação é possível detectar no DNA as quebras em fita simples, os sítios álcali – lábeis e sítios de reparo tardio. Esta é a versão conhecida por SCGE e por motivos históricos com o nome de EC (Ferraro, 2009)

Olive, Banáth e Durand (1990), modificaram alguns parâmetros da técnica de Ostling e Johanson (1984). Neste caso a lise das células é feita em meio alcalino e a eletroforese é executada em meio neutro ou alcalino (pH 12,3). Embora as técnicas descritas por Olive, Banáth e Durand (1990) e Singh *et al.*(1988), sejam idênticas em princípio e similares na prática, o método desenvolvido por Singh parece ser pelo menos duas vezes mais sensível na capacidade de detectar danos (Rojas; Lopez & Valverde, 1999; Ferraro, 2009).

Os locais do DNA que são suscetíveis ao processo de alquilação são mais sensíveis a degradação. Estes pontos, onde a depurinação está aumentada, transformam-se em pontos de quebras da fita de DNA sendo, portanto, visíveis através do EC (Hahn & Hock, 1999). As condições de pH da solução de lise e do pH do tampão de eletroforese onde ocorre o relaxamento da molécula de DNA influem no tipo de dano a ser visualizado, bem como nas características do cometa obtido. Sob condições neutras (pH 7,5) os cometas apresentam caudas mais densas enquanto que sob condições alcalinas (pH>10) são mais dispersas. Em meio alcalino as caudas são mais curtas e mais intensamente coradas, enquanto que em meio pouco alcalino (pH 10 –11), são mais longas e coram-se mais fracamente (Klaude *et al.*, 1996).

O EC realizado sob condições alcalinas permite a detecção de quebras em fita simples do DNA sob condições não desnaturantes e a detecção de quebras de fita dupla do DNA (Olive *et al.*, 1992; Olive & Banáth, 1995). Estima-se que com cerca de 200 quebras na fita de DNA, de uma célula, o teste é sensível. Este número de quebras é muito menor do que qualquer outro método para detectar danos ao DNA (Rojas; Lopez & Valverde, 1999). Já para Olive *et al.* (1998) podem ser detectados pelo EC a partir de 50 quebras em uma das fitas do DNA de células diplóides (Ferraro, 2009).

As quebras de fita simples, detectadas pelo método alcalino (SCGE), resultam de vários tipos de reações como: reparo por excisão de nucleotídeos ou de bases; excisão direta das proteínas estruturais do DNA por agentes químicos ou físicos; excisão seguida de intercalação de agentes químicos na estrutura do DNA; ação de endonucleases ou topoisomerases entre outros (Mitchelmore & Chipman, 1998; Horváthova *et al.*, 1998).

O papel da lise no EC é o de remover os conteúdos celulares, com exceção do material nuclear. O DNA permanece bem condensado devido à presença de uma pequena quantidade de proteínas não histônicas. Porém, quando colocado na solução de eletroforese, a qual possui um pH maior que 13, a espiralização do DNA começa a relaxar a partir dos pontos de quebra da fita. Permitindo desta maneira que os mesmos sejam revelados pela eletroforese na sequência do teste (Yendle *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 1997; Klaude *et al.*, 1996; Ferraro, 2009).

Yendle *et al.* (1997), trabalhando com queratócitos de camundongo e hepatócitos de roedores observaram que o tempo de permanência na solução da eletroforese para permitir o relaxamento da estrutura do DNA, pode influir muito nos parâmetros de análise das caudas dos cometas. Indicam ainda em seus resultados, que os agentes que afetam, unicamente, as proteínas da superestrutura do DNA, podem aumentar o comprimento das caudas, embora não estejam afetando diretamente o DNA. Desta forma existiriam duas classes de substâncias que

promoveriam resultados idênticos no EC, mas que teriam implicações diversas como agentes genotóxicos.

Collins *et al.* (1997 e 2008) enfatizam que o DNA não migra em fragmentos como na eletroforese convencional, onde a distância percorrida é inversamente proporcional ao tamanho do fragmento. Destaca ainda que as distâncias entre as quebras originadas e detectadas pelo ensaio estão na ordem de 10⁹ Da, muito além da faixa detectável pela eletroforese convencional. Nesta, o comprimento dos fragmentos está na ordem de 1 mm enquanto que a cauda de um cometa mede um centésimo deste valor. Outro fato importante destacado por estes autores é o de que mesmo após o tratamento com a solução de lise e a solução salina da eletroforese, o núcleo ou nucleóide, tem uma estrutura. Esta estrutura mantém os nucleossomos; desta maneira a figura da cauda do cometa seria um relaxamento da superespiralização do DNA originadas pelos danos à estrutura do DNA.

Como o EC analisa as células individualmente, estas têm que ser individualizadas. Por esta razão surgem algumas limitações de ordem prática que devem ser consideradas. Na separação das células, a partir de seu tecido original, através de processos de fragmentação ou através do uso da tripsina podem ocorrer incrementos no número de quebras do DNA. Outra consideração a ser feita é a de que incrementos no número de quebras podem estar associados a situações de estresse (Mitchelmore & Chipman, 1998; Ferraro, 2009).

Sendo assim, ao se escolher o tecido ou células que servirão como unidades no ensaio estas devem ser convenientemente separadas por meios que não causem danos a estas células, mas que permitam a individualização delas. No caso de células sanguíneas estas podem ser diluídas em soro bovino fetal ou em uma solução fisiológica. Qualquer que seja o meio a ser utilizado, todo o processamento das células deve obrigatoriamente ser executado sem que danos adicionais ao DNA possam ocorrer. Desta maneira, as células devem ser manipuladas ao abrigo da luz, uma vez que esta causa danos ao DNA (Ferraro, 2009).

Além destes aspectos, devem-se considerar os mecanismos de reparo próprios do DNA, os quais podem estar atuando antes da análise do material em estudo. Com o uso de substâncias como a citosina-b-D-arabinofuranosina que inibem a ação da DNA polimerase e da ligase, foi demonstrado um incremento na frequência das quebras detectadas pelo EC (Mitchelmore & Chipman, 1998).

Ressalve-se que sob o aspecto do reparo do DNA, os organismos aquáticos e no caso específico dos peixes, os mecanismos de reparo do DNA são mais lentos do que nas células de mamíferos (Espina & Weiss, 1995; Ferraro, 2009).

Embora as condições ideais para incrementar a sensibilidade do EC dependam do agente a ser testado, das células que serão utilizadas e da maneira de obtê-las para o ensaio, danos ao DNA podem ser detectados, mesmo com curtas exposições ao agente genotóxico. Monteith e Vanstone (1995) detectaram dano ao DNA em hepatócitos de ratos expostos por duas horas a dimetilnitrosamina (DMNA) e logo em seguida analisados (Ferraro, 2009).

Uma vez que células individualizadas podem ser observadas, torna-se possível, com este ensaio, verificar se todas as células de uma determinada população têm a mesma quantidade de danos e ainda se, os mecanismos de reparo do DNA, dentro de uma determinada população celular ocorrem na mesma frequência. Desta forma, subpopulações de células podem ser identificadas (Mitchelmore & Chipman, 1998; Olive, Banáth & Durand, 1990; Olive *et al.*, 1992).

A técnica do EC originalmente desenvolvida para detectar efeitos genotóxicos em mamíferos mostrou-se de grande eficiência na detecção de substâncias genotóxicas em organismos do ambiente aquático, além de encontrar amplo emprego na área clínica em estudos de reparo do DNA no biomonitoramento ambiental e no monitoramento humano (Ferraro, 2009).

Utilizando pela primeira vez do EC em peixes para avaliar os efeitos da Aflotoxina B1 (AFB1), Abd-Allah *et al.* (1999), demonstraram que esta substância foi capaz de provocar danos extensos no DNA dos diferentes tipos de tecidos analisados da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). No entanto, em outra espécie utilizada, o catfish (*Ictalurus punctatus*), não encontraram diferenças significativas entre o grupo tratado e o controle (Ferraro, 2009).

Padrangi *et al.* (1995), utilizando-se dos peixes *Ameiurus nebulosus* e *Cyprinus carpio*; Ferraro *et al.* (2004) analisando o efeito do chumbo inorgânico (PbII) e do tributilestanho (TBT) em traíras (*Hoplias malabaricus*) e Cestari *et al.* (2004) também utilizando-se de traíras, demonstraram e confirmaram a grande eficiência do EC no monitoramento das águas através dos peixes.

No caso específico do EC realizado com os peixes, o sangue revela-se um tecido potencialmente útil no biomonitoramento ambiental. Em primeiro lugar, por ser um material que pode ser obtido de maneira pouco invasiva e em segundo lugar por apresentar em sua composição, aproximadamente 97% de eritrócitos nucleados e 3% de leucócitos. Garantindo, desta forma, uma substancial homogeneidade no tecido. Embora os leucócitos sejam mais sensíveis à ação de agentes genotóxicos do que os eritrócitos, esta sensibilidade pode ser mascarada pelo grande número de eritrócitos (Mitchelmore & Chipman, 1998; Theodorakis, Surney & Shugart, 1994).

A vantagem adicional na utilização do sangue dos peixes é a de que são necessárias quantidades mínimas de amostras para a realização do ensaio, menos de 1 ml de sangue são suficientes, podendo ser coletadas várias amostras ao longo do tempo. Embora existam muitos trabalhos realizados com EC e seus protocolos estejam bem estabelecidos em estudos com humanos e muitos mamíferos, no campo da ecotoxicologia e da genotoxicologia com a utilização de organismos aquáticos, notadamente os peixes, a ausência de padronização dos protocolos, torna difícil o cruzamento dos dados encontrados em diferentes espécies ou mesmo dentro de uma mesma espécie (Frenzili, Nigro & Lyons, 2008).

Ainda que existam críticas pela relevância dos resultados obtidos pelo EC no campo da ecotoxicologia é inegável a revolução que o mesmo provocou nesta área. Pela sua simplicidade, rapidez, não necessidade de prévio conhecimento do cariótipo da espécie ou do tempo de renovação celular do tecido utilizado. Sua utilização tem sido tão intensa nos estudos de genotoxicidade que a *Organisation for Economic Co-operation and Development* – OECD esta desenvolvendo um roteiro de utilização do ensaio em sua versão alcalina (pH>13) para ensaio *in vivo*, e validações dos estudos também *in vivo* estão sendo desenvolvidas pelo *Mammalian Mutagenesis Study Group - MMSG/Japanese Center* (Jha, 2008; Collins *et al.* 2008, Ferraro, 2009).

1.9. Biomarcadores, Bioindicadores, Biotransformação e Biomonitoramento.

Com o propósito de estudar a ação dos agentes tóxicos nos seres vivos, os pesquisadores utilizam-se dos *biomarcadores*.

Os biomarcadores podem ser classificados como de exposição, efeito ou suscetibilidade (Bomfim & Carvalho, 2008). Entendendo-se como *biomarcador*, qualquer mudança de resposta biológica a um elemento ou substância química presente no ambiente que seja passível de ser detectada por alterações moleculares na célula, por alterações fisiológicas ou ainda por mudanças comportamentais nos organismos em estudo (Peakall, 1994; Bomfim & Carvalho, 2008). São também identificados pelas alterações biológicas mensuráveis que evidenciam a exposição dos organismos a um ou vários poluentes. Um exemplo de biomarcadores de exposição são os parâmetros bioquímicos que têm sido testados em peixes com relação a suas respostas a substâncias tóxicas. Entre os indicadores mais investigados nesses animais estão às enzimas presentes no tecido hepático, envolvidas na detoxificação de xenobióticos e seus metabólitos, englobando as enzimas de biotransformação de fase I e fase II e cofatores e as enzimas antioxidantes (Lech & Vodcnik, 1985; Bomfim & Carvalho, 2008), como por exemplo, a indução do citocromo P-450 (CYP1A) monoxidase, sob exposição a hidrocarbonetos poliaromáticos (Bucheli & Fent, 1995; Bomfim & Carvalho, 2008). Esses

biomarcadores são muito sensíveis e específicos para os compostos referidos. Uma das grandes vantagens do uso desses biomarcadores é o baixo custo, que chega a ser 100 a 200 vezes mais barato em relação ao de análise química (Schlenk, 1999; Bomfim & Carvalho, 2008).

Para Van Gastel e Van Brummellen (1996), o termo *biomarcador* não deve ser confundido com *bioindicador* e com *indicador ecológico*. O primeiro seria qualquer resposta biológica para uma substância química presente no ambiente, possível de ser medida dentro do organismo ou em seus produtos (pêlos, urina, fezes), indicando desvio da normalidade encontrada naqueles organismos não expostos ao elemento/substância. O segundo seria o organismo do qual se está obtendo as informações das condições ambientais do seu habitat. O terceiro seria um parâmetro ecológico que descreve a estrutura e o funcionamento do ecossistema.

Esta conceituação é frequentemente ignorada em publicações onde seus autores utilizam-se do termo *biomarcador* de forma genérica, servindo tanto para o parâmetro biológico como para a espécie que serve como modelo do ensaio, como exemplo Gustavino *et al.* (2001); Rodriguez-Cea, Ayllon e Garcia-Vazquez (2003). É praticamente impossível o monitoramento de todos os contaminantes aquáticos sejam eles de origem humana ou natural. No entanto, é possível submeter de diferentes formas plantas, animais e outros seres vivos a xenobióticos tóxicos e analisar suas respostas metabólicas com o uso de diferentes tipos de *biomarcadores*. Entre os diferentes tipos de *biomarcadores* destacam-se os parâmetros hematológicos, imunológicos, reprodutivos, endócrinos, fisiológicos, morfológicos, enzimáticos e genotóxicos entre outros (Peakall, 1994).

Os biomarcadores de efeitos, em geral, não são específicos em relação aos estressores e não fornecem informações sobre a sua natureza, mas são característicos da ocorrência de um estresse que poderá ser reversível tão logo o estressor cesse a atuação. São caracterizados pela indução de mecanismo de defesa celular, que se iniciam sempre como uma resposta adaptativa em nível molecular/ bioquímico. Entretanto, se esse mecanismo falha ou se sua capacidade de resposta é ultrapassada, poderão ser desencadeadas alterações fisiológicas ou histológicas, podendo ser irreversíveis, dependendo da capacidade do sistema ou órgão em responder ao estressor. Assim, o organismo pode ter afetada sua capacidade de reprodução ou crescimento. Alguns desses biomarcadores são órgão-específico como enzimas que são lançadas na corrente sanguínea após lesão em tecidos, como várias hepato-amino-ácidos transaminases, indicativas de respostas adaptativas a estressores são as envolvidas com a peroxidação lipídica ou estresse oxidativo (Winzer *et al.*, 2001).

Os biomarcadores de suscetibilidade podem ser definidos como indicadores de processos que causam variações de repostas ao longo do tempo e entre exposição e efeito (Barrett *et al.*, 1997), determinando condições como: indivíduo sadio, compensação do metabolismo, perturbação das funções, alterações morfológicas e morte. Estas condições aumentam a taxa de transição entre esses dois extremos (exposição e efeito). Os organismos, mesmo da mesma espécie, não respondem igualmente a exposição a xenobióticos. Sexo, jejum, estresse pelo confinamento, tamanho e estágio de desenvolvimento são parâmetros de variação nas respostas a estressores, bem como o polimorfismo genético de uma população. Estes biomarcadores correspondem aos chamados biomarcadores de efeito latente (Fossi & Leonzio 1993), significando que um organismo pode, em determinadas circunstâncias, ter limitada a habilidade de se adaptar ou sobreviver, o que pode ser determinado por mensuração de respostas fisiológicas que, analisadas em conjunto, expressam a diminuição da energia disponível para o crescimento (Nascimento *et al.*, 2006).

Alguns autores (Fossi & Leonzio 1993) defendem outra classificação que incluiria, além dos citados, os biomarcadores de exposição e efeito, que, além de indicarem a ocorrência de exposição a determinados poluentes, podem ligar, com especificidade, essa exposição ao efeito evidenciando, de modo a caracterizá-lo. A inibição da acetilcolinesterase (AChE) é o melhor exemplo. Essa enzima hidrolisa a acetilcolina, impedindo a ação continuada dessa substância sobre seus receptores em nível das sinapses, propiciando, assim, um controle na transmissão do impulso nervoso. Organofosforados e carbamatos inibem a acetilcolinesterase, causando hiperestimulação dos receptores de acetilcolina, o que impede a contração muscular normal. Por ser específica para esses praguicidas, a inibição dessa enzima é considerado um biomarcador de exposição e de efeito (Nascimento *et al.*, 2006).

Dessa forma, a escolha de parâmetros biológicos pré-determinados, como histologia, bioquímica, fisiologia que são conhecidos por variar em resposta aos efeitos tóxicos dos agrotóxicos (herbicidas), são recomendados para avaliar o grau da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos e de sua ação em sítios não alvo.

2. ESCOLHA DOS BIOINDICADORES

Dentre as plantas ou vertebrados escolhidos, para os ensaios de toxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade, o uso de organismos endêmicos como sentinelas ambientais será sempre preferível ao uso de espécies exóticas. No entanto para que este objetivo possa ser alcançado de maneira eficiente, o organismo endêmico eleito para este fim deve ser submetido

a ensaios suficientemente sensíveis com a finalidade de ser estabelecido um padrão de resposta aos agentes genotóxicos (Padrangi *et al.*, 1995).

Ensaio com animais vivos possibilitam várias vias de administração da substância em estudo, quer seja através dos alimentos, da água ou mesmo injetando-se diretamente no animal. Pode-se ainda avaliar seus efeitos em órgãos ou tecidos específicos, em células germinativas ou somáticas assim como diferenças entre contaminações crônicas e agudas. Estas possibilidades de comparações podem nos fornecer vários resultados que reproduzem, no melhor possível, as condições de uma exposição dos seres humanos a estas substâncias (Rabello-Gay, Rodrigues & Monteleone-Neto, 1991).

No caso de ensaios com substâncias mutagênicas presentes na água ou em sedimentos, estes podem ser realizados em condições laboratoriais com o uso de vários tipos de animais como, por exemplo, anfíbios, moluscos e peixes, os quais servirão como bioindicadores da poluição do meio aquático (Minissi; Ciccotti & Rizzoni, 1996). Para este propósito, os mais adequados são os peixes, assim como os mamíferos, pois sofrem bioacumulação, respondem a agentes mutagênicos em baixas concentrações e são capazes de ativar o citocromo P450 (enzima responsável pelo metabolismo oxidativo de compostos lipofílicos de origem endógena ou exógena como hormônios esteróides ou poluentes ambientais), em resposta a poluentes (Goksoyr *et al.*, 1991).

Dentre os muitos tipos de organismos utilizados como bioindicadores para avaliar possíveis efeitos de riscos naturais ou de origem antropogênica (Medina, 2008), os peixes reúnem características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de biomonitoramento aquático (Benicá, 2006; Moron *et al.*, 2006; Ramisdorf, 2007). Os peixes, como os grandes vertebrados, têm sido considerados como ótimos organismos indicadores da qualidade do ambiente aquático (Damato, 1995; Lopes-Poleza, 2004; Pantaleão, 2008) devido a sua capacidade de responder a elementos tóxicos (Benincá, 2006). Além disso, os peixes desempenham funções diferentes na cadeia trófica e são capazes de bioacumular de forma direta contaminantes dissolvidos na água (Lopes-Poleza, 2004; Souza e Fontanetti, 2007).

2.1. Bioindicador escolhido, *Poecilia reticulata* (Peters, 1860)

O *Poecilia reticulata*, conhecido popularmente por guaru, guppy ou lebiste, pertence à ordem dos Ciprinodontiformes, é peixe teleosteo e eurialino (Silva *et al.*, 2003). Esses peixes foram trazidos ao Brasil para o controle biológico de mosquitos, entre eles o transmissor da malária, pois são excelentes larvófagos. É uma espécie ovovivípara, que apresenta dimorfismo sexual. O macho é menor e possui a nadadeira anal modificada em órgão copulador

denominado gonopódio. As fêmeas atingem até 5,0 cm de comprimento (Allen, 1991). Os machos amadurecem sexualmente em dois meses e as fêmeas, em três (Riehl & Baensch, 1991).

O hábito alimentar desses peixes segue algumas táticas, tais como cata de itens arrastados pela corrente, poda e cata de presas. Está presente em diversos habitats, pequenos córregos e riachos que, normalmente, estão presentes em áreas agrícolas ou em áreas colonizadas por macrófitas (Kiss *et al.*, 2003), desde águas altamente turvas em charcos e canais (Kenny, 1995), assim como águas paradas com vegetação (Allen, 1991). Porém, nos riachos a preferência por micro-habitats mais lênticos parece ser uma característica marcante nessa espécie. Têm ampla faixa de tolerância à salinidade da água, porém requerem temperaturas entre 23 e 24 °C e vegetação estática para sua vivência (Skelton, 1993). Com estas características, o guppy é um peixe adequado para ser utilizado como organismo teste em estudos toxicológicos e genotóxicos com agrotóxicos.

Os guppies são organismos indicados pelo protocolo da Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico - OECD de número 203, *Guideline for Testing Chemicals – “Fish, Acute Toxicity test”* (1992) para a realização de testes de toxicidade e ecotoxicidade, pois são cosmopolitas, facilmente adaptáveis às condições de laboratório e apresentam sensibilidade a diversas substâncias tóxicas (IBAMA, 1987; OECD, 1992).

O uso de organismos bioindicadores parece ser estratégia adequada para avaliar os efeitos combinados de substâncias químicas que interagem com os componentes biológicos de forma simultânea (Kiss *et al.*, 2003). A bioindicação é importante, especialmente para alguns produtos que são empregados diretamente no ambiente aquático para o controle de parasitoses e vetores de macrófitas aquáticas (Wang e Freemark, 1995). Os bioensaios constituem-se em ferramenta para estudos toxicológicos e ecotoxicológicos e permitem avaliar os potenciais impactos das substâncias tóxicas aos organismos (Kiss *et al.*, 2003).

Os organismos bioindicadores são utilizados em testes ecotoxicológicos para avaliar potenciais impactos causados por derramamentos acidentais ou pela contínua liberação de efluentes industriais no ambiente aquático e para mensurar os possíveis impactos causados pela utilização de agrotóxicos de forma direta ou indireta (Kiss *et al.*, 2003).

A sensibilidade do *P. reticulata* foi avaliada para diversos agrotóxicos, e a resposta aos contaminantes varia em função das condições de realização dos bioensaios, dos protocolos adotados e das características da substância teste.

Em um estudo de avaliação da toxicidade do fungicida oxiclureto de cobre para o peixe guppy (*P. reticulata*), com peso corporal médio de 0,9 g, foi calculada a $CL_{50, 96h}$ de 0,1 mg.L⁻¹,

onde observa-se a grande sensibilidade desta espécie ao fungicida cúprico (Boock e Machado-Neto, 2005).

Boock *et al.* (2004) realizaram estudos de toxicidade aguda com o inseticida regulador de crescimento metoprene para *P. reticulata* (guppy) e *Brachydanio rerio* (paulistinha). Verificaram que o guppy é mais sensível ao inseticida que o paulistinha.

Selvi *et al.* (2005) estudaram a toxicidade aguda do inseticida organofosforado metilclorpirifós para o guppy e calcularam a $CL_{50, 96h}$ de $1,79 \text{ mg.L}^{-1}$. Observaram ainda alterações em parâmetros comportamentais dos peixes, quando comparados aos controles, como perda do equilíbrio, natação errática e alterações na atividade geral.

O inseticida alfa-cipermetrin, utilizado no controle de uma ampla variedade de insetos na área agrícola, contra mosquitos, pulgas e outros vetores em saúde pública, e no controle de parasitoses em aquicultura, é extremamente tóxico para a espécie *P. reticulata* com $CL_{50, 96h}$ de $9,43 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ (Yilmaz *et al.*, 2004).

Em testes de toxicidade aguda realizados com o inseticida Diflubenzuron (DFB) para o *P. reticulata*, com quatro semanas de idade, foi constatado que concentrações inferiores a $36 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ não causam nenhum efeito sobre o peixe estudado, sob condições de pH 7,3 e temperatura de 20°C (Nebeker *et al.*, 1983).

Favero, Souza & Matias (2005) realizaram estudos toxicológicos com herbicida a base de glifosato para espécie *P. reticulata* e calcularam a $CL_{50, 24h} = 8,11 \text{ ppm}$. Os peixes apresentaram comportamento alterado na presença do herbicida.

Frente a todos os estudos toxicológicos já realizados com *P. reticulata* fica evidente a sua sensibilidade e importância na realização de novos bioensaios com agrotóxicos, na tentativa de padronização destes bioensaios e consagração do modelo biológico para tal finalidade.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abramovay, R. Moratória para os Cerrados. Elemento para uma estratégia de agricultura sustentável. Agenda 21. Museu Emílio Goeldi. São Paulo em fevereiro; 1999.
2. Agência Goiana de Defesa Agropecuária - AGRODEFESA. [online] 2009. Disponível: <http://www.agrodefesa.go.gov.br> [Acessado em: 11/05/2009].
3. Agência Goiana de Defesa Agropecuária - AGRODEFESA. [online] 2010. Disponível: <http://www.agrodefesa.go.gov.br> [Acessado em: 10/07/2010].
4. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. (Brasil). Brasília, DF. [online] 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.org.br> Acessado em: 23/12/2010.
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. (Brasil). Brasília, DF. Toxicologia.[online] 2005. Disponível: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/para>. Acessado em: 30/08/2010.
6. Akingbemi BT, Ge, R, Klinefelter GR, Zirkin BR, *et al.* Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 2004; v. 101, n. 3, p. 775-780.
7. Alavanja MC, Hoppin JA, Kamel F. Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. Annu Rev Public Health; 2004. 25:155-97.
8. Alger K, Lima A. Políticas Públicas e a Fragmentação de Ecossistemas, Fragmentação de Ecossistemas – Causas, Efeitos sobre a Biodiversidade e Recomendações de Políticas Públicas, volume 6 - Ministério do Meio Ambiente – Brasília 2003.
9. Allen GR. Field guide to the freshwater fishes of New Guinea. Christensen Research Institute, Madang, Papua New Guinea; 1991. [online] Disponível em: filaman.ifmgeomar.de/References/ReferencesList.Cfm Acesso em: 03 ago. 2009.
10. Almeida PR. Ensaio de laboratório sobre a toxidez do DDT aos peixes guaru (*Phalloceros caudimaculatus*). Arq. Inst. Biol., São Paulo; 1997; v.18 n 2, p 31-37.
11. Al-Ssabt K, Metcalfe CD. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Mutation Research – Genetic Toxicology. 1995; v. 343, p. 121-135.
12. Amaral EI. Avaliação da Exposição Ambiental ao Glifosato na Área Agrícola da Serrinha do Mendanha”. Fundação Oswaldo Cruz. Ministério da Saúde. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca-ENSP. Dissertação de Mestrado em Ciências na área da Saúde Pública e Meio Ambiente; 2009.
13. Amaraneni SR, Pillala RR. Concentrations of pesticide residues in tissues of fish from Kolleru Lake in India. *Environmental Toxic Chemicals*; 2001; 16(6): 550-556.

14. Amarante Jr OP, Santos TCR, Brito NM, Ribeiro ML. Glifosato: Propriedade, Toxicidade, Usos e Legislação. 2002. *Quim.Nova*, 25, 589.
15. Ames RG, Steeland K, Jenkins B, Chrislip D, Russo J. Chronic neurological sequelae to cholinesterase inhibition among agricultural pesticide applicators. *Arch Environ Health*; 1995; 50(4):440-4.
16. Amorim LCA. Os Biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*; 2003; 6:158-170.
17. Araújo AJ, Lima JS, Moreira JC, Jacob SC, Soares MO, Monteiro MC, *et al.* Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. *Ciênc Saúde Coletiva*; 2007; 12 (1): 115-30.
18. Arkhipchuk VV, Garanko NN. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2005; v. 62, p. 42-52.
19. Assad ED, Assad MLL. *Cerrado brasileiro: possibilidades e alternativas para produção e preservação*. Texto preparado como subsídio à formulação da Agenda 21, área temática – agricultura sustentável. Brasília.1999.
20. Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides, *Toxicology*; 1995; 140, 129–140.
21. Balinova A. Solid-phase extraction followed by highperformance liquid chromatographic analysis for monitoring herbicides in drinking water. *Journal of Chromatography*; 1993; 643: 203-207.
22. Barreira LP, Philippi Junior A. A problemática dos resíduos de embalagens de agrotóxicos no Brasil. In: XXVIII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitaria y Ambiental; 2002; Cancun, México.
23. Barrett JC, Vainio H, Peakall D, Goldstein BD. 12TH Meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemical: susceptibility to environmental hazards. *Environmental Health Perspective*; 1997; 105: 699–737.
24. Batista MTA. Efeito do Herbicida Roundup[®] sobre a Estabilidade de Membranas de Eritrócitos de Coelhos e de Frangos. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG; 2008; 60 f.
25. Baylis AD. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Society of Chemical Industry*; 2000; v. 56, Issue 4, p. 299-308 April. DOI: 10.1002/(SICI)1526-4998(200004).

26. BCPC (British Crop Protection Council). The Pesticide Manual: incorporating the agrochemicals handbook; 1994; 10 ed., Surrey: Tomlin.
27. Bedor CN, Ramos LO, Rego MA, Pavão AC, Augusto LG. Avaliação e reflexos da comercialização e utilização de agrotóxicos na região do submédio do Vale do São Francisco. *Rev Baiana Saúde Pública*; 2007;31(1):68-76.
28. Benachour N, Sipahutar H, Moslemi S, Gasnier C, Travert C, Séralini GE. Time- and Dose-Dependent Effects of Roundup on Human Embryonic and Placental Cells In *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*; 2006; 53, 126–133.
29. Benincá C. Biomonitoramento das lagoas estuarinas do Camacho - Jaguaruna (SC) e Santa Marta- Laguna (SC), utilizando *Geophagus brasiliensis* (CICHLIDAE); 2006, 112 f. Dissertação (Mestrado em Genética), Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
30. Bennett BM. Estimation of CE (I)50 by moving averages. *J. Hyg.*; 1952; v 50, p157-64.
31. Braguini WL. Efeitos da Deltametrina e do Glifosato, sobre Parâmetro do Metabolismo Energético Mitocondrial, sobre membranas Artificiais e Naturais e Experimentos in vivo. Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná; Curitiba-PR, 31 de março de 2005.
32. Brambilla A, Rindone B, Polesello S, Galassi S, Balestrini R. The fate of triazine pesticides in River Po water. *Science of the Total Environmen*. 1993. 32: 339-348.
33. BRASIL. Constituição da República Federativa do Brasil. 27. ed. São Paulo: Atlas: 2006. Organizada por Alexandre Moraes.
34. British Crop Protection Council. Em *The Pesticide Manual: Incorporating the Agrochemicals Handbook*; 1994; 10 ed., Surrey: Tomlin.
35. Brito PF, Gomide M, Câmara V. Trabalho e exposição aos agrotóxicos em uma pequena comunidade agrícola no município do Rio de Janeiro, *In Cadernos de Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, 2006; 14(3): 531-548.
36. Bolognesi C, Bonatti S, Degan P, Gallerani E, Peluso M, Rabboni R, Roggieri P, Abbondandolo A. Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup, *J. Agric. Food Chem*; 1997; 45, 1957–1962.
37. Bomfim TJ, Carvalho CEV. Utilização de Biomarcadores em Peixes com Ferramenta para Avaliação de Contaminação Ambiental por Mercúrio. *Oecol. Bras.*; 2008; 12(4): 680-693.
38. Bonacella PH. A poluição das águas. Coleção Desafio. São Paulo: Ed. Moderna; 1990; p. 28-30.
39. Boock MV, Machado-Neto JG. Estudos sobre a toxicidade aguda do oxiclureto de cobre para o peixe *Poecilia reticulata*. *B. Inst. Pesca*; 2005; v.31, n.1, p.29-35.

40. Boock MV, Zorzenon FJ, Farias AA, Silva EA, Almeida SBB. Toxicidade aguda do inseticida metoprene, para os peixes *Brachydanio rerio* (paulistinha) e *Poecilia reticulata* (lebiste). Arq. Inst. Biol.; 2004; v.7, p.307-312.
41. Bucheli TD, Fent K. Induction of cytochrome P450 as biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. Critical Review in Environmental Science Technology; 1995; 25: 201–268.
42. Buser HR. Atrazine and other s-triazine herbicides in lakes and in rain in Switzerland. Environ. Sci. Technol.; 1990; v. 24, p. 1049-1058.
43. Caldas ED, Souza LC. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. Rev Saúde Pública; 2000; 34(5):529-37.
44. Cantarutti TF. Risco tóxico de resíduos de pesticidas em alimentos e toxicidade reprodutiva em ratos wistar [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.
45. Carneiro G, Ribeiro Filho FF, Togeiro SM, Tufik S, Zanella MT. Interações entre síndrome da apnéia obstrutiva do sono e resistência à insulina. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia; 2007; 51 (7): 1035-1040b.
46. Carrasco, KR, Tilbury KL, Myers MS. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. Can. J. Fish. Sci., Ottawa; 1990; v. 47, p. 2123-2136.
47. CAS – Division of the American Chemical Society. Divisão de Registro de Substâncias químicas na CAS. [online] 2010. Disponível em: www.cas.org/products/index.html. Acessado em: 12/12/2010.
48. Castro-Júnior JV, Selbach PA, Sáchiaayub MA. Avaliação do efeito do herbicida glifosato na microbiota do solo. Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e meio ambiente. Curitiba; 2006; v. 16, p. 21-30, dez/jan.
49. Çavas T, Ergene-Gözükara S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plants effluents. Aquatic Toxicology; 2005; v. 74, p. 264-271.
50. Çavas T, Ergene-Gözükara S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions as cyto-genetic indicator in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. Mutation Research; 2003; v. 534, p. 93-99.
51. Cavas T, Könen S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay, Mutagenesis; 2007; 22, 263–268.

52. Clements C, Ralph S, Petras M. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay, *Environ. Mol. Mutagen*; 1997; 29, 277–288.
53. CERAGRO- Centro de Referência do Agronegócio Região Sul. Organizado por: Guanzioli C, Bereguer MO. Experiências recentes em Agronegócio e Desenvolvimento Rural Sustentável bem sucedida no Brasil. Instituto Interamericano de Cooperação para Agricultura. [Online] 2010. Disponível: <http://www.iica.int/Esp/region/sur/brasil/Lists/> Acessado em: 12/01/2011.
54. Cestari MM, Lemos PM, Ribeiro CA, *et al.* Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. *Genetics and Molecular Biology*; 2004; v. 27, 2 p. 270-274.
55. Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, *et al.* The comet assay: what can it really tell us. *Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Amsterdam; 1997; v. 375, p. 183-193.
56. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, *et al.* The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*; 2008; v. 23, 3, p. 143-151.
57. CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente, Ministério do Meio Ambiente. Resolução nº416, de 30 de setembro 2009. [online] 2009. Disponível em: www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=616. Acessado em: 12/11/2009.
58. Cox C. Glyphosate (Roundup®). *Journal of Pesticide Reform/Fall*, vol. 18, nº3 Northeast Coalition for Alternatives to Pesticides P.O. Box 1393, Oregon 97440; 1998; (541) 344-5044.
59. Cunha NRS, Lima JE, Gomes MFM, Brag MJ. A intensidade da exploração agropecuária como indicador da degradação ambiental na região dos Cerrados, Brasil. *Rev. Econ. Sociol. Rural*; 2008; vol. 46 n. 2 Brasília Apr./June.
60. Da Silva TS, Fontanetti CS. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research*; 2006; v. 605(1–2), p. 87-93.
61. Dallegrave E, Mantese FD, Coelho RS, Pereira JD, Dalsenter PR, Langeloh A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. *Toxicology Letters*; 2003; 142: 45-52.
62. Damato M. Determinação da toxicidade aguda de dicromato de potássio para *Phalloceros caudimaculatus*, *Poecilia vivipara* e *Cyprinus carpio*. In: Encontro Brasileiro de

Ictiologia, 11., Campinas, 1995. Resumos; Campinas: Pontifícia Universidade Católica de Campinas/Sociedade Brasileira de Ictiologia.

63. Daruich J, Zirulnik F, Gimenez MS. Effect of the Herbicide Glyphosate on Enzymatic Activity in Pregnant Rats and Their Fetuses In Environmental Research; 2001; Section A 85, 226- 23.

64. Dimitrov BD, Gadeva1 PG, Benova DK, Bineva MV. Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems, Mutagenesis; 2006; 21, 375–382.

65. Dores EFGC, De-Lamonica-Freire EM. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso, – Análise Preliminar. Quim. Nov; 2001; Vol. 24, No. 1, 27-36.

66. Ecobichon DJ, Joy RM. Pesticides and neurological diseases. In: Casarett LJ, Doull J. Toxicology the basic science of poisons. Boca Raton: CRC Press; 1991. p. 565-622.

67. Elfvendahl S. Detection of pesticide residues in water, sediment and ish in Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira, State of São Paulo, Brazil. Dissertação de Mestrado. Swedish University of Agricultural Sciences, Suécia; 2000; 50p.

68. EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Correção do Solo e Adubação no Sistema de Plantio Direto nos Cerrados. ISSN 1517-2627; junho 2003.

69. EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Potencial de Impacto da Agricultura sobre os Recursos Hídricos na Região do Cerrado. ISSN 1517-5111; 2002 dezembro. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA. Documentos 56.

70. EPA-US (Environmental Protection Agency U. S.). Pesticide tolerance for glyphosate. Federal Register; 1992; 57: 8739-8740.

71. Ergene S, Cavas T, Celik A, *et al.* Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. Ecotoxicology; 2007; v. 16, p. 385-391.

72. Farre M, Gonçalves C, Lacorte S, Barceló D, Alpendurada MF. Pesticide toxicity assessment using an electrochemical biosensor with *Pseudomonas putida* and a bioluminescence inhibition assay with *Vibrio ischeri*. Analyses and bioanalises Chemical; 2002; 373(8): 696-703.

73. Favero S, Souza EM, Matias R. Ecotoxicidade do Paration Metílico e Glifosato para *Poecilia reticulata* (Pisces: Poecilidade) em Laboratório. Ensaios e ci., Campo Grande; 2005; v. 9 n.2, p.315-324. Ago.

74. Ferraro MVM. Avaliação de Três Espécies de Peixes- *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como Potenciais Bioindicadores em Sistemas Hídricos Através dos Ensaio: Cometa e dos Micronúcleos. Tese Doutorado. Universidade Federal Paraná. Curitiba-PR; 2009.
75. Ferraro MVM, Fenocchio AS, Mantovani MS, *et al.* Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetic and Molecular Biology*; 2004; v. 27,1, p. 103-107. doi:10.1590/S1415-47572004000100017.
76. Ferreira CRRPT, Vegro CLR, Camargo MLB. Defensivos Agrícolas: expectativas de aumento nas vendas em 2010. *Análise e Indicadores do Agronegócio* ISSN 1980 0711; 2010; v 5, n.7 julho. [online] 2010. Instituto de Economia Agrícola. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/index.php> Acessado em: 13/02/2011.
77. Ferreira IM. Bioma Cerrado, um estudo das paisagens do Cerrado. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Geografia, área de Concentração em Organização do Espaço – UNESP- Campus de Rio Claro (SP); 2005.
78. Filizola HF, Ferracini VL, Sans LMA, Gomes MAF, Ferreira CJA. Monitoramento e avaliação do risco de contaminação por pesticidas em água superficial e subterrânea na região de Guaira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*; 2002; 37(5): 659-667.
79. Finney DJ. Probit Analysis. 3. ed. Cambridge: University Press; 1971, 138 p.
80. Fonseca LC, Corrêa NCR, Garrote-Filho MS, Cunha CC, Penha-Silva N. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. *Química Nova*; 2006; 29 (3): 543-548.
81. Fossi C, Leonzio C. Nondestructive biomarkers in vertebrates. Boca Raton. Floride, Lewis; 1993; 313p.
82. Franz JE. Discovery, development and chemistry of glyphosate. In: Grossard E, Atkinson D. (Ed.). *The herbicide glyphosate: Britash Library*; 1986, p.3-17.
83. Freire EC. Potencialidade para a produção de algodão nos cerrados do Meio-Norte. In: *Simpósio sobre os Cerrados do Meio-Norte*; 1997. Teresina. Cerrados: sua biodiversidade é uma benção da Natureza. Anais... Teresina: [s.n.].
84. Freitas PL. Aspectos físicos e biológicos do solo. In: LANDERS, J. N. (Ed.). *Fascículo de experiências de Plantio Direto no Cerrado*. Goiânia: APDC; 1994. p. 199-213.
85. Freitas PL, Blancaneaux P, Moreau M. Caractérisation structurale de sols des Cerrados Brésiliens (Savanes) sous différents modes d'utilisation agricole. *Etude et Gestion des Sols*, Paris; 1998; v. 5, n. 2, p. 93-105.

86. Freitas PL. Harmonia com a natureza. Agroanalysis, Rio de Janeiro; fev. 2002; p. 12-17.
87. Frenzili G, Nigro M, Lyons BP. The Comet Assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. Mutation Research – Reviews in Mutation Research. Article in press (MUTREV-7886); 2008; 13p.
88. Funari E, Donati L, Sandroni D, Vighi M. Pesticide levels in ground water: value and limitations of monitoring. In: VIGHI, M.; FUNARU, E. (Eds.). Pesticide risk in groundwater. Boca Raton, FL: CRC Press; 1995, p. 3-44.
89. Gabbianelli R, Nasuti C, Falcioni G, Cantalamessa F. Lymphocyte DNA damage in rats exposed to pyrethroids: Effect of supplementation with Vitamins E and C. Toxicology; 2004; 203 (1-3): 17-26.
90. Galinkin M. (Ed.). Estado ambiental de Goiás 2001: atualização. Goiânia: Agência Ambiental de Goiás; 2001; 60 p.
91. Géhin A, Guillaume YC, Millet J, Guyon C, Nicod L. Int. J. Pharm; 2005; 288, 219.
92. Géhin A, Guyon C, Nicod L. Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. Environmental. Toxicology and Pharmacology; 2006; v. 22, n.1 p. 27-34.
93. Giesy JP, Dobson S, Solomon KR. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. Rev. Environ. Contam. Toxicol; 2000; v. 167, p. 35-120.
94. Glofelty DE, Seiber JN, Liljedahl L.A. Pesticides in fog. Nature; 1987; v. 325, p. 602-605.
95. Gluszczak L, Miron DS, Moraes BS, Simões RR, Schetinger MRC, Morsch VM, Loro V. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) In *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C; 2007; 146 (2007) 519–524.
96. Golstein EG. Avaliação da toxicidade dos principais despejos industriais da região de E.R.Q. – Suzano, através de ensaios biológicos. Rev. DAE., São Paulo; 1983; v.132, p 42-47.
97. Gregor DJ, Gummer WD. Evidence of atmospheric transport and deposition of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in Canadian artic snow. Environ. Sci. Technol.; 1989; v. 23, p. 561-565.
98. Grisolia CK. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides, Mutat. Res.; 2002; 518, 145–150
99. Grisolia CK. Agrotóxicos Mutações, Câncer e Reprodução. Editora da UnB. Brasília; 2005, 392 p.

- 100.** Grossbard E, Atkinson D. Preface. In: Grossbard E, Atkinson D. (Ed.). The herbicide glyphosate : Britash Library; 1986; p.1.
- 101.** Grover R, Wolt JD, Cessna AJ, Schiefer HB. Environmental fate of trifluralin. Rev. Environ. Contam. Toxicol.; 1997; v. 153, p. 1-64.
- 102.** Guimarães GL. Toxicologia e meio ambiente e legislação específica In: AREAS. Curso de proteção de plantas. Brasília; 1996; p. 1-41. (módulo 8).
- 103.** Gustavo B, Scornajenghi KA, Minissi Ciccotti E. Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-rays and colchicines. Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis; 2001; v. 494, p. 151–159.
- 104.** Hahn A, Hock B. Assessment of DNA damage in filamentous fungi by single cell gel electrophoresis, comet assay. Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola; 1999, v. 18, p. 1421–1424.
- 105.** Hamilt n MA, Russo RC, Thurston RV. Trimmed Spearman-Kärber method for stimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environmental Science and Technology; 1977; v. 11, p. 714-719.
- 106.** Haridasan M. Aluminum accumulation by some Cerrado native species in Central Brazil. Plant and Soil; 1982; 65: 265-273.
- 107.** Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay, Mutagenesis; 2003; 18, 45–51.
- 108.** Herricks E. Princípios gerais de toxicologia. In: Matsui S, Barret BFD, Banerjee J. Gerenciamento de substâncias tóxicas em lagos e reservatórios. (Série Diretrizes para o gerenciamento de lagos). São Carlos: ILEC – IIE; 2002; v.4, p.9-30.
- 109.** Hogan D J, Carmo RL, Cunha JMP, Baeninger R. (org). Migração e ambiente no Centro-Oeste. Campinas, NEPO/UNICAMP: PRONEX; 2002; 324p.
- 110.** Hokanson R, Fudge R, Chowdhary R, Busbee D. Alteration of estrogenregulated gene expression in human cells induced by the agricultural and horticultural herbicide glyphosate In Human & Experimental Toxicology; 2007; 26; 747.
- 111.** Hooftman RN, De Raat WK. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. Mutation Research, Amsterdam; 1982; v. 104, p.147–152.
- 112.** Horvãthova E, Slameňová D, Hlinčíková L, *et al.* The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. Mutation Research – DNA Repair, Amsterdam; 1998; v. 409, p. 163 – 171.

- 113.** Hose JE, Cross JN, Smith SG, Diehl D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated of southern califórnia. *Marine Environmental Research*, Kidlington; 1987; v. 22, p. 167-176.
- 114.** Hoshino AC, Pacheco-Ferreira H, Taguchi CK, Tomita S, Miranda MF. Estudo da ototoxicidade em trabalhadores expostos a organofosforados. *Rev Bras Otorrinolaringol*; 2008; 74 (6): 912-8.
- 115.** Hung D, Deng J, Wu T. Laryngeal survey in glyphosate intoxication: a athophysiological investigation. *Human and Experimental Toxicology*; 1997; 16: 596-599.
- 116.** IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Brasil, Ministério do Meio Ambiente. Avaliação da toxicidade aguda para peixes. In: Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos. Brasília; 1987; p.20-32.
- 117.** IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamento familiar 2002-2003. Microdados. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, RJ; 2005. Brasil.
- 118.** IUPAC-The International Union of Pure and Applied Chemistry. [online] 2009. Disponível: [http:// sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/373.htm](http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/373.htm) [Acessado em: 20/08/2009].
- 119.** Jaga K, Dharmani C. Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides. *Rev Panam Salud Pública*; 2003; 14(3):171-85.
- 120.** Jesus
- 121.** Jha AN. Ecotoxilogical applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*; 2008; v. 23, 3 p. 207-221.
- 122.** Jiraungkoorskul W, Upatham ES, Krutrachue M, Sahaphong S, Vichasri-Grams S, Pokethitiyook P. Biochemical and histopathological effects, a Glyphosate Herbicide, to Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Enviromental Toxicology*; 2003;18: 260-267.
- 123.** Junior OPA, Santos TCR. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação In *Química Nova*; 2002 Vol. 25, No. 4, 589-593.
- 124.** Kenny JS. Views from the bridge: a memoir on the freshwater fishes of Trinidad. St. Joseph; 98p. [online] 1995. Disponível em: filaman.ifmgeomar.de/References/ReferencesList.cfm Acesso em: 02 jun. 2010.
- 125.** Kiss I, Kováts N, Szalay T. Evaluation of some alternative guideline for risk assessment of various habitats. *Toxicology Letters*; 2003; v.140-141, p.411-417.
- 126.** Klaude M, Eriksson S, Nygren J, *et al.* The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research – DNA Repair*, Amsterdam; 1996; v. 363, p. 89-96.

- 127.** Klink CA, Machado RB. A conservação do Cerrado brasileiro. Belo Horizonte, Megadiversidade; 2005; v. 1, n. 1, jul., p. 148-155.
- 128.** Klink CA, Moreira AG. Past and current human occupation and land-use. In: Oliveira PS, Marquis RJ. (org.) The Cerrado of Brazil: Ecology and natural history of a neotropical savanna. New York, Columbia University Press; 2002; p. 69-88, 424 p.
- 129.** Körbes D, Silveira AF, Hyppolito MA, Munaro G. Alterações no Sistema Vestibulococlear Decorrentes da Exposição ao Agrotóxico: Revisão de literatura. Ver. Soc. Bras. Fonoudiol; 2010; 15 (1): 146-52.
- 130.** Kumaravel TS, Jha AN. Reliable Comet Assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. Mutation Researchn; 2006; v. 544, p. 7-16.
- 131.** Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP, Jha AN. Comet Assay measurements: a perspective. Cell Biology and Toxicology. Epub 2007 Nov 27. [online]. Disponível em:<http://www.springer.com/life+sci/cell+biology/journal>. Acessado: janeiro 2010.
- 132.** Laabs V, Amelung W, Pinto A, Wantzen M, Silva CJ, Zech W. Pesticides in surface water, sediment, and rainfall of the Northeastern Pantanal Basin, Brazil. J. Environ. Qual.; 2002; v. 31, p. 1636-1648.
- 133.** Langiano VC, Martinez CB. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, Toxicology & Pharmacology; 2008 Mar; v. 147, n.2, p. 222-231.
- 134.** Landres JL, Freitas PL. Preservação da vegetação nativa nos trópicos brasileiros por incentivos econômicos aos sistemas de integração lavoura x pecuária com plantio direto; 2002; In: Simpósio sobre Economia e Ecologia. Belém, PA. Anais... Belém; 2001; p. X – XX.
- 135.** Larini, L. Toxicologia. São Paulo: Editora Manole, 2ª Edição; 1993; 281p.
- 136.** Lech JJ, Vodick MJ. Biotransformation; 1985; Pp. 526-557. In: G.M. Rand, S.R. Petrocelli. (eds.). Fundamentals of Aquatic Toxicology; Methods and Applications. Hemisphere Publishing Corporation, New York, USA. 666p.
- 137.** Lemus R, Abdelghani A. Chlorpyrifos: an unwelcome pesticide in our homes. Rev Environ Health; 2000; 15 (4): 421-33.
- 138.** Li AP, Long TJ, An evaluation of the genotoxic potential of glyphosate, Fundam. Appl. Toxicol.; 1988; 10, 537–546.
- 139.** Lima FJ, Marques PR, Nunes GS, Tanaka SM. Inseticida organofosforado metamidofós: aspectos toxicológicos e analíticos. Pesticidas: Rev Ecotoxicol e Meio Ambiente; 2001; 11:17-34.

- 140.** Lombardi JV. Toxicidade aguda de agrotóxicos para o camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* De Man (Decápoda, Palemonidae). Rio Claro, Departamento de Zoologia, UNESP – Rio Claro; 1999; 110p. Tese (doutorado em zoologia).
- 141.** Lopes-Poleza SDC. Avaliação do efeito do metilmercúrio (CHHG+) em *Hoplias malabaricus* através da frequência de aberrações cromossômicas e dos ensaios Cometa e Micronúcleo; 2004; 70 f. Dissertação (Mestrado em Genética), Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
- 142.** López-Barea J. Biomarkers to detect environmental pollution. *Toxicology. Letters*; 1996; v. 88, p. 79.
- 143.** Macek JK. Aquatic Toxicology: Fact or Fiction? *Environ Health Perspect.*;1980; v.34, p.159-163.
- 144.** Machado RB, Ramos Neto MB, Pereira PGP, Caldas EF, Gonçalves DA, Santos NS, Tabor K, Steininger M. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Brasília, Conservation Internacional; 2004; 23 p.
- 145.** Malheiros R. Cerrado: aspectos biogeográficos. Goiânia: ITS/UCG, 2000.
- 146.** Manjabosco CA. Perfil audiométrico de trabalhadores agrícolas. In: Morata TC, Zucki F, organizadores. Caminhos para a saúde auditiva: ambiental-ocupacional. São Paulo: Plexus; 2005; p. 53-66.
- 147.** Manrique WG. Toxicidade Aguda e Risco Ecotoxicológico do Fipronil para o Guaru (*Poecilia reticulata*) e Dissipação no Ambiente Aquático. Dissertação apresentada ao Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, São Paulo; 2009.
- 148.** MAPA - Ministério Agricultura Pecuária e Abastecimento. Projeções do agronegócio, Mundial e Brasil 2006/07 a 2016/17; In Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento. [online] 2006. Acessado em: www.mapa.gov.br Acessado em: 12/12/2010.
- 149.** Marc J, Mulner-Lorillon O, Durand G, Bellér R. Pesticide Roundup Provokes Cell Division Dysfunction at the Level of CDK1/Cyclin B Activation In *Chem. Res. Toxicol.*; 2002; 15, 326-331.
- 150.** Marc J, Mulner-Lorillon O, Bellé R. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation In *Biology of the cell*; 2004; pp. 245-249.
- 151.** Maroni M, Colosio C, Ferioli A, Fait A. Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review, Introduction. *Toxicology*; 2000; v. 143, p. 1-118.
- 152.** Matsumoto ST, Mantovani MS, Malagutti MIA, *et al.* Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet

assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetic and Molecular Biology*; 2006; V. 29(1) p. 148-158.

153. Medelson, J. Roundup o herbicida mais vendido no mundo. *The Ecologist*, Cameldord; 1998; v.28, p.24-27.

154. Medina BMO. Indicadores ambientais. *Ecologia hoje*. [online] 2008. Disponível em: <<http://www.biologo.com.br/ecologia/ecologia3.htm>>. Acesso em: 5 nov. 2010.

155. Melo-Filho GA, MENDES DS. Estimativa de custo de produção de milho, nos sistemas plantio direto e convencional, safra 1999/2000. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; 1999; 3 p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Comunicado Técnico, 3).

156. Menkes DB, Temle WA, Edwards IR. Intentional self-poisoning with glyphosate-containing herbicides. *Human Experimental Toxicology*; 1991; 10 (1): 103-107.

157. Metcalf RL. A Laboratory model ecosystem to evaluate compounds producing biological magnification. *Essays Toxicology*; 1974; 5: 17-38.

158. Minissi S, Ciccotti E, Rizzoni M. Micronucleus Test in Erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from Two Natural Enviroments: a Bioassay for the in Situ Detection of Mutagens in Freshwater. *Mutation Research – Genetic Toxicology*; 1996; v. 367, p. 245-251.

159. Mitchelmore CL, Chipman JK. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Amsterdam; 1998; v. 399, p. 135-147.

160. Monsanto Company (Brasil). Herbicida Glifosato [online] 2010. Disponível em: www.monsantocompany.com.br Acessado: 14/11/2010.

161. Monroy CM, Cortés AC, Sicard DM, Groot de Restrepo H. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato, *Bioméd* 25 (2005) 335–345.

162. Monteith DK, Vanstone J. Comparison of tha Microgel Eletrophoresis Assay and other Assays for Gemotoxicity in the Detection of DNA Damage. *Mutation Research – Genetic Toxicology*; 1995; v. 345, p. 97-103.

163. Moron SE, Polez VLP, Artoni RF, *et al.* 2006. Estudo de alterações na concentração de íons plasmáticos e da indução de micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* exposto ao herbicida Atrazina. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 1, n. 1, p. 27-30.

164. Munro IC, Williams GM, Kroes R. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*; 2000; v. 31, p. 117-165.

- 165.** Nascimento IA, Pereira AS, Leite MB. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição; 2006; Pp. 413-431. In: P.A Zagatto & E. Bertoletti. (eds.). Ecotoxicologia Aquática- Princípios e Aplicações. São Paulo, 478p.
- 166.** Nasuti C, Cantalamessa F, Falcioni G, Gabbianelli R. Different effects of type I and type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. *Toxicology*; 2003; 191 (2): 233-244.
- 167.** Nebeker AV, Mckinney P, Cairns MA. Acute and chronic effects of Diflubenzuron (dimilin) on freshwater fish and invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.*;1983; v.2, p.239.
- 168.** Needham LL, Calafat AM, Barr DB. Uses and issues of biomonitoring. In *Int. J. Hyg. Environ.-Health*; 2006. doi:10.1016.
- 169.** Nimmo DR. Pesticides. Pp 335-373. In: G.M. Rand & S.R. Petrocelli, (eds.). *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. Hemisphere, New York; 1985; 85p.
- 170.** OECD - Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico. Guideline for testing chemicals. Fish, Acute Toxicity Test 203; 1992.
- 171.** Olive PL, Banáth JP, Durand RE. Heterogeneity in radiationinduced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. *Radiation Research*, Oak Brook; 1990; v. 122, p. 86-94.
- 172.** Olive PL, Wlodek D, Durand RE, Banáth JP. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Experimental Cell Research*, Orlando, 1992; v. 198, p. 259 – 267.
- 173.** Olive PL, Banáth JP. Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA crosslink agent. *Experimental Cell Research*, Orlando; 1995; v. 221, p. 19-26.
- 174.** Olive PL, Johnston PJ, Banath JP, Durand RE. The comet assay: A new method to examine heterogeneity associated with solid tumors. *Nature Medicine*, New York; 1998; v. 4, p. 103-105.
- 175.** Oliveira AG, Telles LF, Hess RA, Mahecha GAB, Oliveira CA. Effects of the herbicide Roundup on the epididymal region of drakes *Anas platyrhynchos* In *Reproductive Toxicology*; 2007; 23 182–191.
- 176.** Oliveira-Filho EC, Lima JEFW. Potencial de Impacto da Agricultura sobre os Recursos Hídricos na Região do Cerrado, EMBRAPA-CPAC: Planaltina; 2002; Documentos 56.

- 177.** Oliveira-Silva JJ, Alves SR, Meyer A, Perez F, Sarcinelli PN, Mattos RC, *et al.* Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. *Rev Saúde Pública*; 2001; 35(2):130-5.
- 178.** Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Orlando; 1984; v. 123, nº 1, p. 291-298.
- 179.** Padrangí R, Petras M, Ralph S, Vrzoc M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, New York; 1995; v. 26, p. 345-356.
- 180.** Pantaleão SM. Impacto genotóxico de poluentes químicos presentes na água e sedimento do Rio Japarutuba (Sergipe) [online] 2008. Disponível em: <<http://biblioteca.universia.net/ficha.do?id=5582691>> Acesso em: 3 fev. 2011.
- 181.** Peakall DW. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicol. Ecotoxicology. News*; 1994; v. 1 p. 55-60.
- 182.** Peluso M, Munnia A, Bolognesi C, Parodi S. 32 Ppostlabeling detection of DNA adducts in mice treated with the herbicide Roundup, *Environ. Mol. Mutagen.*; 1998; 31, 55–59.
- 183.** Penagos H, Ruepert C, Partanen T, Wesseling C. Pesticide Patch Test Series for the Assessment of Allergic Contact Dermatitis Among Banana Plantation Workers in Panama In *American Contact Dermatitis Society*; 2004; 15 (3): 137-145.
- 184.** Penha-Silva N, Arvelos LR, Cunha CC, Aversi-Ferreira TA, Gouvêa-e-Silva LF, Garrote-Filho MS, Finotti CJ, Bernardino-Neto M, Freitas Reis FG. Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. *Bioelectrochemistry*; 2008; 73: 23-29.
- 185.** Persley GJ. *Agricultural Biotechnology and the Poor: Promethean Science*. [online] 2008. Disponível online em <http://www.cgiar.org/biotech/rep0100/persley.pdf>>, acessado em 10/10/2009.
- 186.** Pereira ND, Gherardi-Goldstein E, Zagatto PA, Sassi R. Bioensaios : Um Programa a Serviço do Controle da Poluição, Resultados Iniciais. *Revista Ambiente*; 1987; 1 (1) : 32-36. São Paulo.
- 187.** Pereira WE, Domagalski JL, Hostettler FD, Brown LR, Rapp JB. Occurrence and accumulation of pesticides and organic contaminants in river sediment, water and clam tissues from the San Joaquim River and tributaries. *Environmental Toxic Chemical*; 1996; 15(2): 172-180.

- 188.** Peters, W. Untitled Monatsberiche der Königlich Preassischen Akademic der Wissenschaften zu Berlin; 1860; 1859:411-412.
- 189.** Pires DX, Caldas ED, Recena MC. Intoxicações provocadas por agrotóxicos de uso agrícola na Microrregião de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, no período de 1992 a 2002. *Cad Saúde Pública*; 2005; 21(3):804-14.
- 190.** Pires MO. Desenvolvimento e sustentabilidade: um programa de cooperação nipo-brasileiro de desenvolvimento dos cerrados – Prodecer. 1996. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Sociologia da Universidade de Brasília, Brasília.
- 191.** Pires PJF. Análise inter-relacional de variáveis sócio-econômicas e ecológicas: um estudo exploratório na microbacia hidrográfica do rio ibicuí-Santa Maria-RS, Santa Maria-RS, CPGER-UFSM; 1999, (dissertação de mestrado).
- 192.** Plataforma Plantio Direto. Introdução e histórico. 2001. [online] Disponível: <http://www.embrapa.br/plantiodireto/>. Acessado em: 08/2010.
- 193.** Porto MF. Riscos, incertezas e vulnerabilidades: transgênicos e os desafios para a ciência e a governança. 2004. In III seminário Internacional de Estudos Interdisciplinares, Florianópolis.
- 194.** Rabello-Gay M N, Rodrigues MAR, Monteleone-Neto R, (Ed.). *Mutagênese Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação*. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética. 1991.
- 195.** Ramisdorf W. Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax* sp B e *A. altiparana*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri- UFPR); 2007; 127 f. Dissertação (Mestrado em Genética), Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- 196.** Rand GM, Petrocelli SR. *Fundamentals of aquatic toxicology* Washigton, Publinshing. Hemisphere; 1985; 665p
- 197.** Rand, G.M. *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, environmental fate and risk assessment*. Second Edition. Taylor & Francis, Washington, DC; 1995; 1125p.
- 198.** Rank J, Jensen AG, Skov B, Pedersen LH, Jensen K. Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, Salmonella mutagenicity test, and allium anaphase—telophase test, *Mutat. Res.*; 1993; 300, 29–36.
- 199.** Ratter JA, Bridgewater S, Ribeiro JF. Biodiversity patterns of the woody vegetation of the Brazilian Cerrados. In: Penington T, Ratter JA. (org.), *Neotropical Savannas and Seasonally Dry Forests*. Florida: Boca Raton, Cap. 2; 2006; p. 31-66.

- 200.** Rauco LRR. Toxicidade Aguda do Sulfato de Cobre e do Triclorfon para Três Espécies de Daphnias em Presença e Ausência de Sedimento. Dissertação apresentada ao Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista Campus de Jaboticabal, São Paulo; 2002 Outubro.
- 201.** Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, Benachour N, Séralini GE. Differential effects of Glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase In Environmental Health Perspectives; 2005; vol. 113, N°6, pp. 716-720.
- 202.** Riehl R, Baensch HA. Aquarien Atlas. Band. 1. Melle: Mergus, Verlag für Natur- und Heimtierkunde, Germany; 1991; 992p. [online] Disponível em: filaman.ifmgeomar.de/ReferencesList.cfm?Author Acesso em: 3 maio 2009.
- 203.** Roberts CW, Roberts F, Lyons RE, Kirisists MJ, Mui EJ, Finnerty J, Johnson JJ, Ferguson DJ, Coggins JR, Krell T, Coombs GH, Milhous WK. Kyle DE, Tzipori S, Barnwell J, Dame JB, Carlton J, Mcleod R. The Shikimate Pathway and Its Branches in Apicomplexan Parasites In The Journal of Infectious Diseases; 2002; 185(Suppl 1):S25–36.
- 204.** Rocha CMC. A região dos cerrados e as pesquisas desenvolvidas pela Embrapa Cerrados. In: Simpósio sobre os Cerrados do Meio Norte, 1. Teresina. Anais. Teresina: Embrapa, CPAMN; 1997; p. 57 – 80.
- 205.** Rodrigues BN, Almeida FS. Guia de Herbicidas. Londrina. 4 ed; 1998; p. 300-313.
- 206.** Rodrigues BN, Almeida FS Guia de herbicidas. Londrina: IAPAR; 1995; 675p. ROSEN.
- 207.** Rodrigues HG, Batista MTA, Fonseca LC, Aversi-Ferreira TA. Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos – Uma breve revisão. ISSN 0103-1643. Biotemas; 2009 março; 22(1):7-16.
- 208.** Rodriguez-Cea A, Ayllon F, Garcia-Vazquez E. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. Ecotoxicology and Environmental Safety; 2003 v. 56, p. 442-448.
- 209.** Rojas E, Lopez MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. Journal of Chromatography B, Amsterdam; 1999; v. 722, p. 225-254.
- 210.** Roman SS, Scolari S, Bergamin NA, Sachetti CG. Toxicidade Renal e Hepática em Camundongos Prenhes expostos à Associação do Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético e do Glifosato. Revista Eletrônica de Farmácia. ISSN 1808-0804; 2009; Vol. VI (2), 152-171.
- 211.** Romano RM, Romano MA, Oliveira CA. Exposição ao glifosato Roundup causa atraso no início da puberdade em ratos machos. Braz. J. vet. Res. Anim. Sci., São Paulo; 2008; v. 45, n.6, p. 481-487.

212. Salton JC, Hernani LC, Fontes CZ. Sistema plantio direto. O produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília: Embrapa - SPI; Dourados: Embrapa – CPAO; 1998; 248 p.
213. Sano EE, Barcellos AO, Bezerra HS. Área e distribuição espacial de pastagens cultivadas no cerrado brasileiro. Planaltina: Embrapa Cerrados; 1999. 21 p. (Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa, 3).
214. Sano EE, Barcellos AO, Bezerra HS. Assessing the spatial distribution of cultivated pastures in the Brazilian savanna. *Pasturas Tropicales*; 2002; 22 (3), p. 2-15.
215. Sano EE, Rosa R, Brito JLS, Ferreira LG. Mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, n. 1; 2008 jan; p.153-156.
216. Santos MA, Barbieri AF, Carvalho JAM. O Cerrado brasileiro: notas para estudo. 2010. Belo Horizonte UFMG/Cedeplar.
217. Sasaki YF, Izumiyama F, Nishidate E, *et al.* Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*; 1997; v. 393, p. 133-139.
218. Sawada, Y. Probable toxicity of surface-active agent in commercial herbicide containing glyphosate, *Lancet*; 1988, 1 (8580): 299.
219. Sawyer D. População, meio ambiente e desenvolvimento sustentável no cerrado. In: Hogan DJ, Carmo RL, Cunha JMP, Baeninger R. (org.). *Migração e ambiente no Centro-Oeste*. Campinas, NEPO/UNICAMP: PRONEX; 2002 p. 279-299.
220. Schlenk D. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Marine Pollution Bulletin*; 1999; 39: 48–53.
221. Schmid W. The micronucleus test. *Mutation Research*, Amsterdam; 1975; v. 31, p. 9-15.
222. Schomburg CJ, Glotfelty DE. Pesticide occurrence and distribution in fog collected near Monterrey, California. *Environ. Sci. Technol.*; 1991; v. 25, p. 155-160.
223. Selvi M, Sarikaya R, Erkoç F, Koçak O. Investigation of acute toxicity of chlorpyrifos-methyl on guppy *Poecilia reticulata*. *Chemosphere*; 2005; v.60, p.93-96.
224. Silva LD, Nascimento D, Santos SC, Morais JOR, Sabóia-Morais SMT. Análise morfológica das células do cloro de *Poecilia vivipara* expostas a frações da folha e casca do caule de *Caryocar brasiliensis*. *Acta Sci.: Biol. Sci.*; 2003; v.25, n.1, p.195-201.
225. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.*; 1988 Mar; v. 175 (1):184-191.
226. Šiviková K, Dianovským J. Cytogenetic effect of technical glyphosate on cultivated bovine peripheral lymphocytes, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 209 (2006) 15–20.

227. Skelton PH. A complete guide to the freshwater fishes of southern Africa. Southern book publishers; 1993; 388p.
228. Smith EA, Oehme FW. The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. *Veterinary and Human Toxicology.*; 1992; v. 34, p.531-543.
229. Soares W, Almeida RM, Moro S. Trabalho rural e fatores de risco associados ao regime de uso de agrotóxicos em Minas Gerais, Brasil. *Cad Saúde Pública*; 2003; 19(4):1117-27.
230. Souza JP. Toxicidade Aguda e Risco Ambiental do Diflubenzuron para *Daphia magna*, *Poecilia reticulata* e *Lemna minor* na Ausência e Presença de Sedimento. Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura; 2008. Jaboticabal, São Paulo.
231. Souza TA, Matta MHR, Montagner E, Abreu ABG. Estudo de Recuperação de Glifosato e AMPA Derivados em Solos Utilizado-se de Resinas Nacionais. *Quim. Nova*; 2006; Vol. 29, nº 6, 1372-1376.
232. Souza TA, Matta MHR, Montagner E, Sombra NM. Proposta de mecanismo de derivatização do ácido aminometilfosfônico (AMPA) com TFAA e TFE. In: Reunião anual, Fortaleza. 57º Reunião Anual da SBPC. São Paulo : Imprensa Oficial; 2005; v. 1. p. 106- 106.
233. Souza TS, Fontanetti CS. Ensaio do cometa para avaliação da qualidade das águas do Rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo. In: Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás, 4., Campinas, 2007. Anais... Campinas: PDPETRO.
234. Spacie A, Hamelink JL. Bioaccumulation. Pp 495-525. In: Rand GM, Petrocelli SR. (eds.), *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. Hemisphere, New York; 1985; 69p.
235. Spadotto CA. Abordagem Interdisciplinar na Avaliação Ambiental de Agrotóxicos. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. *Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar*; 2006. São Manuel.
236. Speit G, Hartmann A. The comet assay (single cell gel test) – a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: Henderson, D. S. (Ed.) *Methods in Molecular Biology: DNA repair protocols – eukaryotic systems*, Totowa; 1999; v. 113, p. 203-212.
237. Stephan CE. Methodos for calculating na LC50 In: *Aquatic Toxicology na hazard evaluation*. Philadelphia; 1977; p 65-84. (ASTM STP, 634).
238. Stranderg MT, Scott-Fordsmand JJ. Field effects of simazine at lower trophic levels – a review. *Science of the Total Environment*; 2002; 296: 117-137.

- 239.** Szarek J, Siwicki A, Andrzejewska A, Majewska-Terech E, Banaszekiewicz T. Effects of the herbicide Roundup on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Marine Environmental Research*; 2000; v. 50, p.263-266.
- 240.** Talbot AR, Shiaw MH, Huang JS, Yang SF, Goo TS, Wang SH, Chen CL, Sanford TR. Acute poisoning with a glyphosate-surfactant herbicide ('Roundup'): A review of 93 cases. *Human Experimental Toxicology*; 1991; 10 (1): 1-8.
- 241.** Tekel J, Kovacicová J. Chromatographic methods in the determination of herbicide residues in crops, food and environmental samples. *Journal of Chromatography*; 1993; 643: 291-303.
- 242.** Temple WA, Smith NA. Glyphosate herbicide poisoning experience in New Zealand. *New Zealand Medical Journal*; 1992; 105: 173-174.
- 243.** Teófilo RF, Reis EL, Reis C, Da Silva GA, Kubotal LT. Experimental Design Employed to Square Wave Voltammetry Response Optimization for the Glyphosate Determination *In J.Braz.Chem.Soc.* Vol.15 No.6; 2004; pp 865-871
- 244.** Theodorakis CW, D' Surney SJ, Shugart LR. Detection of genotoxic insult as DNA strand breaks in fish blood cells by agarose gel electrophoresis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Pensacola; 1994; v. 13 p. 1023-1031.
- 245.** Tominack RL, Yang GY, Tsai WJ, Chung HM, Deng JF. Taiwan National Poison Center: Survey of glyphosate-surfactant herbicide ingestions. *Clinical Toxicology*; 1991; 29 (1): 91-109.
- 246.** Tsui MTK, Chu LM. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*; 2003; v. 52, p.1189 -1197.
- 247.** Tsui MTK, Chu LM. Environmental fate and non-target impact of glyphosate-based herbicide (Roundup®) in a subtropical wetland. *Chemosphere*; 2008; v. 71, n.3, p. 439-446.
- 248.** Udriou I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology*; 2006; v. 79, p. 201-204.
- 249.** Usfumigation. Herbicidas-Glyphosate [internet]; 2002. [online] Disponível em: http://www.usfumigation.org/Chemical_Herbicidas/Glyphosate/glyphosate Acessado em: 12/01/2011.
- 250.** Van Der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*; 2003; 13: 57-149.
- 251.** Van Gastel CAM, Van Brummelent TC. Incorporation of the biomaker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*; 1996; v. 5, p. 217 – 225.

- 252.** Vendramini CR. Origem do Movimento dos Trabalhadores Rurais Sem-Terra In VIII Congresso Luso-Afro-Brasileiro de Ciências Sociais; 2004; Coimbra.
- 253.** Vereecken H. Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Management Science*; 2005; v. 61, n.12, p. 1139-1151.
- 254.** Vieira MJ. Embasamento técnico do sub-programa de manejo e conservação dos solos do Paraná Rural. In: PARANÁ. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. Manual técnico do subprograma de manejo e conservação do solo; 1994; 2. ed. Curitiba: IAPAR/ SEAB p. 12-40.
- 255.** Wang W, Freemark K. The use of plants for environmental monitoring and assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*; 1995; v.30, p.289-301.
- 256.** Wester RC, Quan D, Maibach HI. In Vitro Percutaneous Absorption of Model Compounds Glyphosate and Malathion from Cotton Fabric into and through Human Skin In *Food and Chemical Toxicology*; 1996; 34 731-735, 1996
- 257.** WHO - World Health organization. Em *Glyphosate: Environmental Health Criteria*; 1994; 159, Genebra.
- 258.** Williams GM, Kroes R, Munro IC. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*; 2000; v.31, n.2, p. 117-165.
- 259.** Winzer K, Winston GW, Becker W, Van Noorden CJF, Kocheler A. Sex-related responses to oxidative stress in primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquatic Toxicology*; 2001; 52: 143–155.
- 260.** Woodburn A. Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest Management Science*; 2000; 56, 309–312.
- 261.** WWF – Fundo Mundial para a Natureza. De grão em grão o cerrado perde espaço. *Impactos do Processo de Ocupação*. Brasília: WWF/Fundação Pró-Cerrado; 1995; 66p.
- 262.** Yendle JE, Tinwell H, Elliot BM, *et al.* The genetic toxicity of time: Importance of DNA – unwinding time to the outcome of single-cell gel electrophoresis assays. *Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Amsterdam; 1997; v. 375 (2): 125-136.
- 263.** Yilmaz M, Gül A, Erbash K. Acute toxicity of alpha-cipermethrin to guppy (*Poecilia reticulata*, Pallas, 1859). *Chemosphere*; 2004; v.56, p.381-385.
- 264.** Younes M, Galal-Gorchev H. Pesticides in drinking water – a case study. *Food and Chemical Toxicology*.; 2000; 38: S87-S90.
- 265.** Zagatto PA, Goldstein EG. Toxicidade em águas do Estado de São Paulo. *Ambiente*; 1991; v.5, n.1, p. 13-20.

266. Zagatto PA, Bertoletti E. Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. Editora Rima, São Carlos; 2006, 478p.

267. Zahradnícková H, Simek P, Horicová P, Tríska J. Determination of atrazine and simazine in drinking and surface waters by solid-phase extraction and high performance thin layer chromatography. Journal of Chromatography; 1994; 688: 383-389.

**Artigo 1. EFEITOS TÓXICOS E HISTOPATOLÓGICOS DO HERBICIDA ROUNDUP
TRANSORB[®] EM FÍGADO DE *Poecilia reticulata* (Guppy)**

**JOSÉ DE SOUZA FILHO¹, FERNANDO SANTIAGO PIRES¹, THIAGO LOPES
ROCHA¹, ANA PAULA REZENDE¹ E SIMONE MARIA TEIXEIRA DE SABÓIA-
MORAIS²**

RESUMO: A toxicidade do herbicida Roundup Transorb[®] à base de glifosato amplamente utilizado na agricultura foi investigada e determinada para o *Poecilia reticulata* (guppy). A CL₅₀; 12, 24, 48, 72 e 96 h do R. Transorb[®] foi de 11.24; 8.55; 6.5; 6.10; 5.65µl/L, respectivamente, indicando que esta espécie é bastante sensível ao herbicida estudado em relação às demais espécies tropicais estudadas. Os bioensaios de toxicidade foram realizados para avaliar os efeitos das concentrações subletais do herbicida em tratamento agudo (24h). Foram utilizados 36 peixes, adultos pesando em média 0,496g ± 0,28g em cada replicata. Verificou-se que a porcentagem de mortalidade dos peixes intoxicados pelo herbicida aumentou à medida que as concentrações de exposição aumentaram, obtendo mortalidade de 100% dos peixes em 4 horas de exposição na maior concentração. Os animais expostos ao herbicida apresentaram alterações comportamentais, tais como: agressividade; irritabilidade; perda do reflexo de fuga; escurecimento da superfície corporal; choque contra a parede do aquário; contorção; tremores; midríase e perda do sentido de direção. Além disso, o R. Transorb[®] induziu alterações histológicas hepáticas prejudicando de forma sensível o funcionamento normal do fígado. Este herbicida apresenta toxicidade aguda para guppy, promovendo alterações comportamentais, agindo possivelmente não só no fígado, mas também no sistema nervoso e branquial. Portanto, se confirma o alto risco deste herbicida ao meio ambiente, sua contaminação pode apresentar forte ameaça para as populações de peixes e outros organismos tanto vertebrados como invertebrados e saúde do homem.

PALAVRAS-CHAVE: Toxicidade aguda; CL₅₀; Histopatologia fígado; Roundup; Guppy.

ABSTRACT: The toxicity of the herbicide R. Transorb[®] the basis of glyphosate widely used in agriculture was investigated and determined to *Poecilia reticulata* (guppy). The LC50 for 12, 24, 48, 72 and 96 h of R. Transorb[®] was 1.24; 8.55; 6.5; 6.10; 5.65µl/L, respectively, indicating that this species is very sensitive to the herbicide studied compared to other tropical species studied. The toxicity bioassays were conducted to evaluate the effects of sublethal concentrations of herbicide in the acute treatment (24h). We used 36 fish, weighing an average adult 0.496 g ± 0.28 g in each replicate. It was found that the mortality rate of fish poisoned by the herbicide increased as exposure concentrations increased, achieving 100% mortality of fish in four hours of exposure at the highest concentration. Animals exposed to the herbicide showed behavioral changes such as aggressiveness, irritability, loss of the escape reflex, darkening of the body surface, colliding with the wall of the tank, contortion, tremors, mydriasis and loss of sense of direction. In addition, R. Transorb[®] histológicas induced liver changes appreciably impairing the normal functioning of the liver. This herbicide has acute toxicity to guppy, promoting behavioral changes, possibly by acting not only in liver but also in the nervous system and gill. There fore, it confirms the high risk of herbicide to the enviroment, its contamination may present a strong threat to populations of fish and other organisms both vertebrates and invertebrates and human health.

KEY WORDS: Acute toxicity; LC₅₀; Liver histopathology; Roundup; Guppy.

¹ Biólogos, bolsistas de mestrado do CNPq e CAPES/PPGBIO-ICB / UFG.

Correspondência para autor: Samambaia, Campus II ICB-IV Laboratório de Comportamento Celular, 74001-970, Goiânia-GO, Brasil Tel.: +55 62 3521 1485 Email: souzabiocelufg@gmail.com

² Professora Doutora, Associado II do Departamento de Morfologia e, Pesquisadora Coordenadora do Laboratório de Comportamento Celular – ICB - UFG.

1-INTRODUÇÃO

O Roundup Transorb[®] é um herbicida muito utilizado no Centro-Oeste em especial no estado de Goiás pelos agricultores no plantio da cana-de-açúcar, café, milho e citros (Embrapa, 2002). O referido herbicida possui formulação a base de sal isopropilamina de glifosato na concentração de 648g/L, equivalente ácido de N-(fosfometil) glicina (glifosato) na concentração 480g/L e ingredientes inertes na concentração de 594g/L, sua classificação toxicológica é medianamente tóxico - classe III, e com classificação do potencial de periculosidade ambiental como perigoso ao meio ambiente - classe III. Cada litro desse herbicida corresponde a 648g/L do sal de isopropilamina de glifosato ou 480g/L do equivalente ácido de glifosato, segundo informações na ficha de segurança do produto publicada pelo fabricante (Monsanto Brasil, 2009).

Os produtos à base de glifosato são altamente tóxicos para seres humanos e várias outras espécies. Entre os sintomas mais comuns citam-se irritação nos olhos e pele, dor de cabeça, náuseas, entorpecimento, elevação da pressão arterial e palpitações. O surfactante usado no produto mais comum à base de glifosato (Roundup[®]) pode ser mais tóxico que o glifosato puro (Cox, 1998).

No Brasil a Lei 7.802/89 regulamentada pelo Decreto 4.074/02 estabelece os parâmetros de avaliação dos efeitos nocivos dos agrotóxicos no país. O herbicida R. Transorb[®] está registrado na lista de herbicidas da Agência Goiana de Defesa Agropecuária (Agrodefesa), sob n°. 1450 e com registro no MAPA/IBAMA/ANVISA sob n°. 4299 na classe III - medianamente tóxico (Agrodefesa, 2009).

O Roundup[®] além do glifosato em sua formulação possui o surfactante polietoxileno amina (POEA), que é adicionado para aumentar a eficácia do herbicida (Tsui e Chu, 2004; Releya, 2005). Devido à sua alta solubilidade em água e extenso uso (especialmente em sistemas de águas rasas), a exposição de organismos aquáticos não-alvos a esse herbicida é uma preocupação (Tsui e Chu, 2003).

A toxicidade aguda do glifosato é considerada baixa pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1994). No entanto, formulações comerciais de glifosato são mais tóxicos que o glifosato puro (Amarante *et al.*, 2002; Peixoto, 2005). Surfactante como POEA no Roundup[®] é o principal componente tóxico em sua formulação à base de glifosato para organismos aquáticos (Tsui e Chu, 2003). Em estudos de revisão de dados toxicológicos, Giesy *et al.* (2000) encontraram POEA sendo mais tóxica para os peixes do que o glifosato puro. Neskovic *et al.* (1996) realizaram bioensaios de toxicidade aguda com carpas (*Cyprinus carpio*) e encontraram a $CL_{50, 96h}$ do glifosato sendo bastante elevada, 620 mg L⁻¹. No entanto,

considerando o produto formulado da marca Roundup® a $CL_{50, 96h}$ obteve variações de 2 a 55 mg L⁻¹, dependendo das espécies de peixes, fase da vida e diferentes protocolos utilizados nos testes de toxicidade (Jiraungkoorskul *et al.*, 2002).

No entanto, o glifosato puro ou em produtos formulados foi anteriormente considerada inofensivo em condições normais de uso e na exposição crônica em trabalho realizado por Williams *et al.*(2000). Os efeitos tóxicos do herbicida nas concentrações subletais também foram investigados e analisados em peixes por Marc *et al.* (2004), e as concentrações subletais de glifosato, correspondendo a menos de 2% da CL_{50} promoveram danos na ultraestrutura do fígado de *C. carpio* (Szarek *et al.*, 2000). Alterações histológicas foram observadas no fígado, guelras e rins de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) após exposição aguda e crônica a concentrações subletais de Roundup® em estudos realizados por Jiraungkoorskul *et al.*(2002, 2003).

Apesar do fato de que o Roundup® é amplamente utilizado no Brasil existe quantidade limitada de informações disponíveis sobre seus efeitos tóxicos para peixes tropicais eurialinos. Recentemente, os efeitos agudos de tal herbicida em parâmetros metabólicos e enzimáticos de *Leporinus obtusidens* e *Rhamdia quelen* foram investigadas por Gluszczak e colaboradores (2006, 2007). Além destes estudos, as respostas toxicológicas em peixes tropicais aos herbicidas a base de glifosato permanecem pouco esclarecidas.

Diferentes biomarcadores tem sido utilizada para indicar os efeitos biológicos de xenobióticos em certos organismos aquáticos (peixes, anfíbios, reptéis) tanto em ambientes naturais como em condições experimentais (Ferrando *et al.*, 2006). Além da medição/avaliação de produtos químicos e parâmetros físicos, as provas resultantes de exames histo-citopatológicos têm sido cada vez mais reconhecidas como ferramenta valiosa para avaliar o impacto dos poluentes sobre peixes (Alazemi *et al.*, 1996; Braunbeck, 1998; Segner, 1998; Bernet *et al.*, 1999; Au, 2004; Van Dyk, 2005; Lagiano e Martinez, 2008).

As alterações histológicas promovidas pelo estresse em médio prazo representam método rápido para detectar os efeitos de substâncias tóxicas em vários órgãos (Bernet *et al.*, 1999; Au, 2004). Tais estudos morfológicos quantitativos da morfologia são importantes para detectar efeitos subagudos e para facilitar a comparação das respostas em nível celular e tecidual (Jagoe *et al.*, 1996).

As brânquias, fígado e rim são comumente órgãos-alvos primários para muitos produtos químicos, devido aos processos de detoxificação e regulação iônica que realizam no organismo dos peixes. O fígado tem sido referido como principal órgão-alvo para determinação de biomarcadores hito-citopatológico em estudos que ivestigam a poluição aquática. O referido

órgão é alvo de estudo devido à manutenção da homeostase, metabolismo de nutrientes, armazenamento de glicogênio e lipídios, síntese e secreção de proteínas, dentre outras funções, destacando o metabolismo de agentes tóxicos (Alazemi *et al.*, 1996; Braunbeck, 1998; Segner, 1998; Bernet *et al.*, 1999; Au, 2004). A expressiva natureza dinâmica do fígado e sua regulação em vários processos metabólicos e fisiológicos fazem deste órgão importante modelo experimental para o estudo de mecanismos e processos envolvendo a atividade e ação de compostos bioativos (Segner, 1998) Muitos contaminantes tendem a se acumular no fígado dos peixes, expondo os tecidos deste órgão a níveis comparativamente mais elevados do que em outros órgãos estudados (Heath, 1995).

O estudo histopatológico do fígado de *P. reticulata* foi motivado pela escassez de dados na literatura referente aos efeitos provocados pela formulação do herbicida R. Transorb[®] (glifosato). Com tudo, pretendeu-se conhecer os efeitos produzidos por essa formulação que é bastante utilizada no Centro-Oeste do país.

A presente investigação é parte de um conjunto de experimentos para documentar os efeitos de diferentes formulações do herbicida Roundup[®] sobre os tecidos do fígado do *Poecilia reticulata* (guppy), particularmente os hepatócitos como biomarcadores adequados.

Para obter mais informações sobre a ameaça imposta pelo uso de herbicidas no Centro-Oeste a base de glifosato em espécies de peixes tropicais este trabalho investigou e determinou a CL_{50;12-96h} e a toxicidade do R. Transorb[®] para guppy, avaliando as respostas comportamentais e clínicas dos grupos tratados e controle, bem como o diagnóstico das alterações histopatológicas e histomorfométricas dos animais expostos em comparação ao controle após exposição aguda a concentrações subletais do herbicida.

2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1-Coleta dos peixes

Foram utilizados 36 peixes da espécie *P. reticulata*, fêmeas, adultas em cada replicata (três bioensaios) para teste de toxicidade, e 30 peixes adultos de ambos os sexos para o teste de efeitos subletal. Esses animais foram coletados na Escola de Agronomia, Campus II da Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia-Goiás, no mês de fevereiro de 2009 (Latitude 16.40S e Longitude 49.16W), transportados até o Laboratório de Comportamento Celular - LCC, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFG.

Os bioensaios seguiram as recomendações do Protocolo da OECD de número 203, *Guideline for Testing Chemicals – “Fish, Acute Toxicity test”* (1992) (OECD, 1992). Os animais foram alimentados *ad libitum* com ração suplementada da marca Alcon Colours[®]. A manutenção dos animais, bem como todo o experimento, foi realizado de acordo com as normas de conduta ética em experimentação animal descrita por Brasil (2008). Os procedimentos efetuados, estudados e analisados, foram aceitos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás com parecer substanciado e protocolado sob nº126.

2.2- Determinação da concentração média letal (CL₅₀; 12-96 h)

Utilizou-se um sistema estático com renovação da aeração constante. Para cada aquário foi colocado 06 (seis) peixes, pesando em média 0.496g±0.28g (24.23 ± 8.6 mm) nas seguintes concentrações: 2, 4, 8, 16 e 32µl/L mais grupo controle. Não foi realizada renovação periódica do agente tóxico (herbicida) nos aquários de experimentação, pois o mesmo não sofre degradação e nem redução nas condições experimentais em que foi submetido no período de 96 horas.

2.3- Estudos do Comportamento

Durante a exposição dos espécimes ao herbicida R. Transorb[®] foram observados seu comportamento em todas as concentrações mais grupo controle. Registraram-se as manifestações comportamentais nos primeiros minutos (30') e nos intervalos de 2, 4, 8 e 12 horas, no período diurno por um período de 15' cada observação. Foram analisadas as seguintes manifestações comportamentais: alterações na natação, localização no aquário, distribuição no aquário, manifestações clínicas, animais mortos e estáticos. O método de análise comportamental baseou-se nas análises estabelecidas por CETESB (1990) com modificações.

2.4- Análises Físico-químicas da Água dos Aquários

Foram retiradas amostras da água antes da exposição (T₀), após 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas para monitoramento do pH (aparelho da marca Tecnal[®], meter TEC-2, série 01809), amônia, temperatura, oxigênio dissolvido, nitrito e nitrato, com kits da marca Mydor[®] adquiridos em lojas especializadas.

2.5- Teste Subletal

Para avaliar os efeitos do R. Transorb[®] os bioensaios foram realizados com cinco grupos de animais, sendo quatro grupos expostos em concentrações subletais correspondendo a 25, 50, 75 e 100% da CL_{50, 96h} mais grupo controle em tratamento agudo (24h). Os animais foram colocados em aquários de vidro de 7 L, contendo seis peixes cada (0.632g±0.21g; 28.5±7.2mm). As características físico-químicas da água durante os testes subletais mantiveram-se estável. Imediatamente após a retirada do aquário, os peixes foram submetidos à eutanásia por secção da medula espinhal método recomendado pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária-CFMV (resolução nº 879, 15 fevereiro de 2008), e seus fígados foram imediatamente removidos e colocados em fixador Karnovsky modificado (Glutaraldeído a 2% e Paraformaldeído a 4% em Tampão Fosfato de Sódio 0.1M pH 7.4). Os fragmentos teciduais foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, depois destinados à inclusão em historesina. Após a inclusão em historesina, foram obtidos secções de 2,5 µm de espessura no ultra-micrótomo (Leica Ultracut UCT).

2.6- Análises Histopatológicas e Histomorfométrica

Amostras de fígado foram fixadas em fixador Karnovsky, incluídos em historesina e seccionados (2.5µm). As lâminas foram coradas com azul de toluidina 1%, analisados em fotomicroscópio Olympus (B071). As imagens obtidas foram processadas utilizando-se o programa computacional ImageLab (versão 2.3).

Mudanças nos tecidos do fígado induzida pelo herbicida R. Transorb[®] foram avaliados através do Índice de Alterações Histopatológica-**IAH**, que é baseado na gravidade das lesões e da possibilidade de recuperação. Para cálculo do **IAH** (modificado por Poleksić e Mitrović-Tutundžić (1994)), alterações hepáticas foram classificadas em três estágios progressivos de insuficiência funcional hepática:

- **estágio I** = mudanças que não danificam o tecido do fígado de tal forma que o órgão não consegue reparar-se;
- **estádio II** = mudanças reparáveis que são mais graves afetando a função dos tecidos associados;
- **estádio III** = mudanças que impedem o restabelecimento da estrutura funcional do fígado, mesmo com a mudança do ambiente (melhoria na qualidade da água).

O **IAH** foi calculado pela soma do número de tipos de lesões em cada um dos três estágios e multiplicado pelo índice de estágio, utilizando a seguinte equação matemática proposta por Poleksić e Mitrović-Tutundžić (1994):

- $IAH = (1 \times \Sigma I) + (10 \times \Sigma II) + (100 \times \Sigma III)$, onde I, II e III, é o número de lesões de fase I, II e III, respectivamente.

O valor obtido para cada **IAH** nos peixes foi utilizado para calcular o índice médio de cada grupo exposto ao herbicida e seus respectivos controles. As médias do **IAH** foram divididas em cinco categorias conforme proposto por Langiano e Martinez (2008):

- **0-10**: fígado funcionalmente normal;
- **11-20**: fígado ligeiramente a moderadamente danificado sua função;
- **21-50**: fígado moderadamente a fortemente danificado;
- **51-100**: fígado severamente danificado;
- **>100**: fígado danificado de forma irreparável

As mensurações histométricas foram realizadas no Programa Image Pro-Plus 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA/Microsoft® Windows 32-bit Systems Window® XP Vista). Para tanto, produziram-se 3 lâminas para cada peixe, cada uma contendo 10 cortes histológicos. As imagens geradas foram obtidas por meio da objetiva de 40X. Dessa forma, obteve-se três imagens de campos diferentes, de um mesmo corte escolhido aleatoriamente de cada lâmina histológica, registrando 9 imagens do fígado por animal, 54 imagens para cada grupo (controle negativo e tratado: 1.41; 2.83; 4.24 e 5.65 µl/L), totalizando 270 imagens, 4.050 hepatócitos e 810 sinusóides analisados. Utilizou-se a câmera Samsung Color Digital SHC 410 NAD acoplada ao microscópio óptico (Leica DM LB). A quantificação dos hepatócitos foi obtida pelas imagens de 15 hepatócitos escolhidos aleatoriamente para quantificar os parâmetros de volume, área e diâmetro, mais três vasos sinusóides para cada imagem para quantificar seus diâmetros. Tais variáveis medidas foram adaptadas dos trabalhos de Vertemati *et al.* (2008) e Golalipour *et al.* (2009) (tabela 1).

As mensurações volumétricas foram estimadas através de estudos realizados por Ke *et al.* (2007), os autores consideram o hepatócito como uma esfera de $V=4/3\pi R^3$, onde o cálculo do raio (R) se dá pela fórmula $A=\pi R^2$, todos os cálculos foram realizados a partir dos valores encontrados pela utilização das ferramentas disponíveis no programa Imagem Pro Plus 6.0.

Tabela 1. Parâmetros adotados para análise histomorfométrica no fígado do *Poecilia reticulata*.

Mensurações Histométricas		
Volume	Área	Diâmetro
		DHept=média-Dhept maior+Dhept menor
	AHept=média	
VHept= $4/3\pi R^3$ (R= AHept* π^2)		Dn=média-Dn maior+Dn menor
VCit= $4/3\pi R^3$ (R=ACit* π^2)	ACit=média-(AHept-An)	
	An= média	DSnd=média- 3 medidas em 3 Sinusóide
Vn= $4/3\pi R^3$ (R=An* π^2)		
	RHept=média (ACit/An)	

VHept=Volume Hepatócito; VCit= Volume Citoplasma; Vn= Volume Núcleo; AHept= Área Hepatócito; ACit= Área Citoplasma; An= Área núcleo; RHept= Razão Hepatócito; ACit= Área Citoplasma; An= Área núcleo; DHept= Diâmetro Hepatócito; Dn= Diâmetro núcleo; DSnd= Diâmetro Sinusóide.

2.7- Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos na forma de média, desvio padrão da média e erro padrão da média (EPM). Para as análise de variância utilizou-se ANOVA com nível de significância ($\alpha= 0.05$) e teste de Tukey através do programa PDF Word Count & Frequency Statistcs Software 7.0. Os gráficos e cálculos estatísticos foram realizados pelo programa Microsoft Office Excel 2007. Também as correlações foram analisadas pelo cálculo do índice de correlação de Pearson (r), com seus respectivos níveis de significância. As mortalidades do guppy em cada aquário nos períodos de 12, 24, 48, 72 e 96 horas foram utilizadas para estimar a CL₅₀ do herbicida para cada tempo de exposição por meio do software: TSK-Trimmed Spearman-Karber (TSK), versão 1.5 da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos-EPA (Hamilton *et al.*, 1977).

3- Resultados e Discussão

3.1- Determinação da CL₅₀

A CL_{50} foi determinada através das seguintes exposições: 2, 4, 8, 16 e 32 $\mu\text{L/L}$ durante 96 horas, sendo analisadas as mortalidades em cada aquário. Dessa forma, foi possível determinar as CL_{50} ; 12, 24, 48, 72 e 96h encontrando a média dos três bioensaios: 11.24 ± 0.13 ; 8.55 ± 2.66 ; 6.5 ± 2.16 ; 6.10 ± 1.47 e $5.65 \pm 0.72 \mu\text{L/L}$, respectivamente (Figura 1).

Verificou-se que a porcentagem de mortalidade dos peixes intoxicados pelo herbicida aumentou à medida que as concentrações aumentaram. Nas maiores concentrações (16 e 32 $\mu\text{L/L}$) obteve mortalidade de 100% dos peixes nas primeiras 4 horas de exposição, comprovando a alta toxicidade destas concentrações. A concentração de 8 $\mu\text{L/L}$ apresentou nível de mortalidade medianamente alto (58%) comparando os três bioensaios, confirmando a CL_{50} , 96h encontrada (5.65 $\mu\text{L/L}$). Já as concentrações menores (2 e 4 $\mu\text{L/L}$) apresentaram menor índice de mortalidade durante os bioensaios (Figura 1).

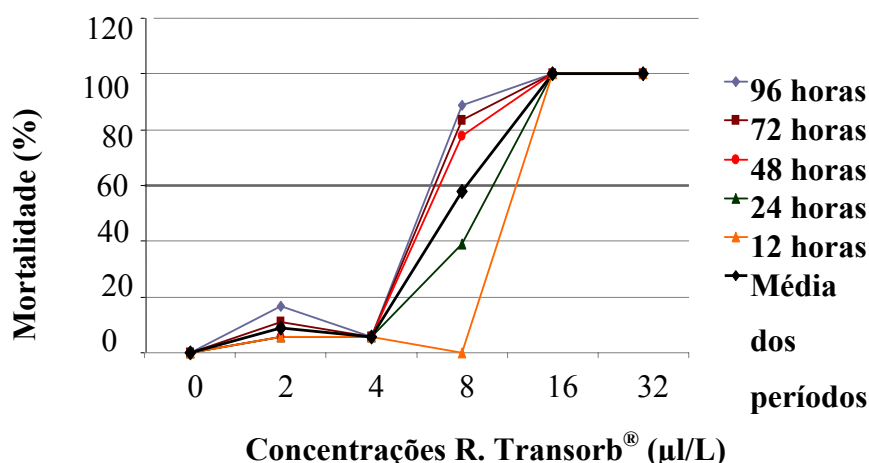


Figura 1. Mortalidade (%) do *Poecilia reticulata* (n= 36) após 96 horas de exposição em cinco concentrações de Roundup Transorb® mais controle negativo, e média dos períodos de exposição nas respectivas concentrações.

A correlação entre tempo (12-96h) e concentração média letal (CL_{50}) demonstrou ser inversamente proporcional ($R^2 = 0,7719$), quanto menor o tempo de exposição ao herbicida maior a o valor da CL_{50} (Figura 2). Na figura 2 estão representadas as porcentagens de mortalidade do *P. reticulata*, obtidas através das exposições realizadas com R. Transorb® para obtenção da CL_{50} , 96 h, observou-se que nos três bioensaios de toxicidade aguda e a taxa de mortalidade aumentou com a elevação da concentração do herbicida, e o valor do coeficiente de regressão linear calculado para os dados obtidos ($R^2 = 0,7719$) (Figura 2) apóia esse fato. Dessa maneira, os efeitos tóxicos do herbicida em questão indicam concentração-dependente.

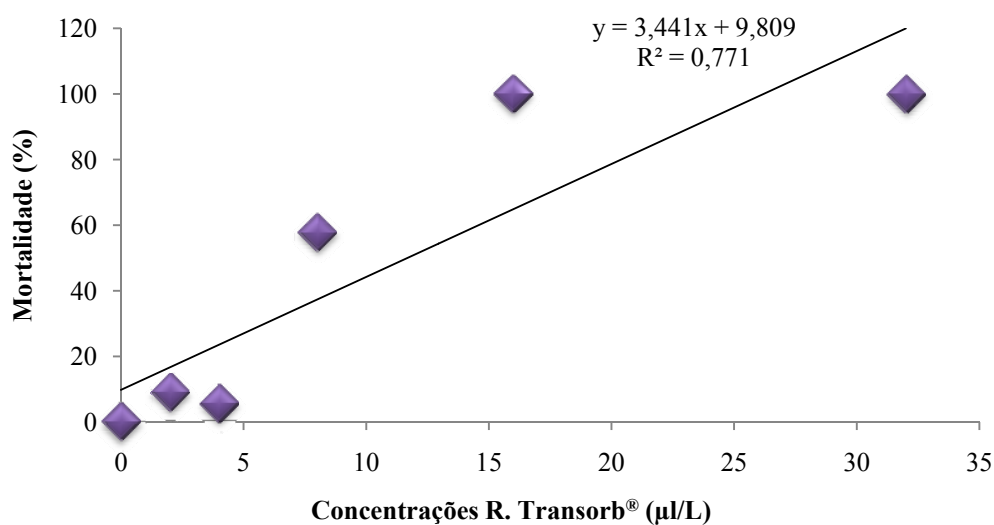


Figura 2. Representação gráfica da mortalidade do *Poecilia reticulata* em função da concentração do Roundup Transorb® nos três bioensaios de toxicidade aguda.

Os valores encontrados da $CL_{50;12-96h}$ apresentam tendência de queda ao longo do tempo, e os mesmos apresentaram diferença estatística ($t=0,01269$, $p>0.05$) nos três bioensaios. As diferenças são entre 12h ($11.24\pm 0.13\mu\text{L/L}$) e 48h ($6.5\pm 2.16\mu\text{L/L}$); 12h ($11.24\pm 0.13\mu\text{L/L}$) e 72h ($6.10\pm 1.47\mu\text{L/L}$); e 12h ($11.24\pm 0.13\mu\text{L/L}$) e 96h ($5.65\pm 0.72\mu\text{L/L}$) (Figura 3).

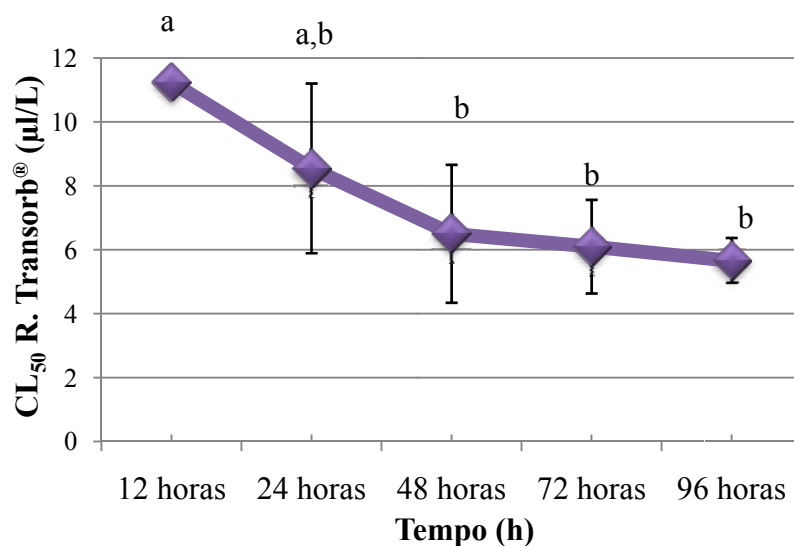


Figura 3. CL_{50} do herbicida Roundup Transorb® em 12, 24, 48, 72 e 96 horas de exposição com os intervalos de confiança (95% superior e inferior). (b) Diferença estatística quando comparada ao período 12h ($p<0.05$).

Pode-se sugerir que em curtos tempos de exposição é necessário que haja quantidade maior do herbicida para causar a mortalidade de 50% dos animais. Verificou-se também que a

CL₅₀; 12 e 24h foram maiores em comparação as demais, isso se deu devido ao curto período de tempo que os peixes ficaram expostos, sugerindo que nesse espaço de tempo os peixes conseguiram resisitir. De acordo com as análises feitas por Barbieri (2004), pode se sugerir que provavelmente essa reação ocorreu em função da modificação da atividade metabólica e de diversas enzimas frente ao herbicida, demonstrando maior resistencia neste período inicial (24h) de exposição (Figura 3).

A toxicidade depende da suscetibilidade dos organismos ao agente tóxico. As diferentes espécies possuem suscetibilidades diferentes de acordo com seu aparato metabólico, seus hábitos alimentares, seu comportamento, fase de desenvolvimento, dentre outros aspectos. Indivíduos jovens ou imaturos geralmente são mais suscetíveis aos agentes químicos do que adultos, provavelmente em função das diferenças no grau de desenvolvimento dos mecanismos de detoxificação (Silva e Santos, 2007).

Rand & Petrocelli (1985) afirmam que organismos estressados em função de exposição prévia a outros toxicantes também podem ser mais suscetíveis aos compostos químicos, cenário comum na realidade dos ecossistemas nacionais, pois normalmente há a presença simultânea de diferentes substâncias tóxicas.

Os fatores ambientais definidos pelas características bióticas e abióticas também podem afetar a toxicidade de agentes químicos no ambiente aquático. Os fatores bióticos incluem tipo de organismo (alga, inseto ou peixe), estágio de desenvolvimento (juvenil ou adulto), tamanho, estado nutricional e de saúde, alterações sazonais no estado fisiológico, dentre outros, sendo que estes fatores bióticos influenciam a resposta ao contaminante de diferentes maneiras. Os fatores abióticos que podem atuar modificando a toxicidade incluem todas as características físicas e químicas da água que circunda o organismo vivo, como a temperatura, o pH, o teor de oxigênio dissolvido na água, a salinidade e a dureza, conteúdo de matéria orgânica e material particulado em suspensão, a velocidade do fluxo da água, dentre outros (Sprague, 1984).

Segundo Swedmark (1971) a sensibilidade individual é determinada por fatores hereditários e influenciada pela idade dos indivíduos. Por isso, peixes juvenis são geralmente mais sensíveis a certas toxinas. Nos primeiros estágios de desenvolvimento os organismos apresentam maior sensibilidade, provavelmente devido à maior atividade mitótica durante estas fases. Barbieri (2002), diz que a capacidade de absorção reduzida do estômago e do intestino pode também diminuir a sensibilidade de algumas substâncias tóxicas. É mais comum, contudo, verificar que peixes com mais idade se mostrem mais sensíveis a poluentes químicos do ambiente, pois a metabolização e excreção dos contaminantes se processam de modo mais lento (Barbieri, 2004).

Neste estudo, o *P. reticulata* manifestou compartimento diferente ao que comumente é apresentado, se mostrando mais resistente ao herbicida R. Transorb[®] nas primeiras 24 horas de exposição. Entretanto, a poluição do ambiente aquático por esse herbicida de maneira contínua ou a exposição crônica pode causar a mortalidade nessa espécie, mesmo em concentrações baixas, tal como determinada na $CL_{50, 96h}$ ($5.65 \pm 0.72 \mu\text{l/L}$).

As variáveis físicas e químicas (Tabela 2) encontradas no teste de toxicidade aguda para os peixes guppy, não apresentaram alterações que pudessem comprometer os resultados obtidos durante o período de exposição (96 horas). Nos três bioensaios o meio apresentou-se neutro (pH 7-7.5) obtendo assim maior quantidade de amônia ionizada (não tóxica), contribuindo para bom desenvolvimento do experimento (Tabela 2). Foi observado variações nos valores de amônia total, mas segundo Noga (1995) e Queiroz (2007) a proporção de amônia tóxica (não ionizada, NH_3) observado neste experimento ficou abaixo dos níveis de toxicidade para peixes de água doce estabelecidos pelos padrões de qualidade.

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão das variáveis físicas e químicas da água no teste de toxicidade aguda em *Poecilia reticulata*, exposto ao herbicida Roundup Transorb[®].

Concentrações	pH	Temperatura °C	Amônia (ppm)	Nitrito (ppm)	Nitrato (ppm)	Oxigênio (ppm)
0 $\mu\text{l/L}$	7.3 ± 0.3	22.3 ± 1.0	0.4 ± 0.3	0.1 ± 0.1	12.5 ± 0	11 ± 0
2 $\mu\text{l/L}$	7.5 ± 0.4	22.2 ± 1.1	0.4 ± 0.3	0.2 ± 0.2	12.5 ± 0	11 ± 0
4 $\mu\text{l/L}$	7.4 ± 0.4	22.2 ± 1.0	0.5 ± 0.3	0.2 ± 0.2	12.5 ± 0	11 ± 0
8 $\mu\text{l/L}$	7.3 ± 0.3	22.5 ± 0.9	0.5 ± 0.4	0.1 ± 0.0	12.5 ± 0	11 ± 0
16 $\mu\text{l/L}$	7.0 ± 0.3	21.8 ± 0.9	0.3 ± 0.4	0.1 ± 0.0	12.5 ± 0	11 ± 0
32 $\mu\text{l/L}$	7.1 ± 0.3	22.4 ± 0.9	0.3 ± 0.4	0.1 ± 0.0	12.5 ± 0	11 ± 0

A razão amônia não ionizada e ionizada ($[\text{NH}_3]/[\text{NH}_4^+]$) depende do pH e do valor de constante de equilíbrio (K), sendo esta, função da temperatura e da composição iônica da água. Quando o pH é inferior a 8.5, ou seja, quando o meio passa de alcalino a neutro ou ácido, verifica-se que NH_4^+ predomina, enquanto NH_3 prevalece quando o pH está acima de 10, ou seja, quando o meio é alcalino. Por essa razão, quanto mais elevado for o pH, maior será a porcentagem da amônia total presente como NH_3 , forma não ionizada (tóxica) (Pereira & Mercante, 2005).

Com relação à sua solubilidade em água, o glifosato é um herbicida altamente solúvel, apresentando valor de 11.600 ppm a 25°C (Kollman & Segawa, 1995). Experimentos

procurando avaliar a estabilidade da molécula indicaram que o glifosato mostrou-se estável em água com pH 3, 5, 6 e 9, a uma temperatura de 35°C. Mostrou-se também estável à fotodegradação em pH 5, 7 e 9, em solução tampão sob luz natural, e a meia-vida por hidrólise foi maior que 35 dias (Kollman & Segawa, 1995). Bronstad & Friestad (1985) também indicaram que o glifosato mostrou pequena propensão à decomposição por hidrólise. Estudos conduzidos em Manitoba, Canadá (Kirkwood, 1979), mostraram que a perda do glifosato na água ocorreu através da adsorção a sedimentos e degradação microbiana. Ghassemi *et al.* (1981) concluíram que a taxa de degradação em água é geralmente menor porque existem menos microrganismos na água que na maioria dos solos. Estudos conduzidos em um ecossistema florestal por Feng (1990) e Goldsborough & Brown (1993) mostraram que o glifosato dissipou-se rapidamente na água de lagoas com muitos sedimentos suspensos, com a meia-vida variando entre 1.5 a 11.2 dias.

A variação da meia vida do glifosato não parece ter relação com o pH ou a quantidade de matéria orgânica, mas frequentemente esta relacionada com a atividade microbiana no solo (Smith & Oehme, 1992). Durante o tempo de exposição a concentração do herbicida provavelmente se manteve inalterado, pois o mesmo se manteve em aquários limpos e com água tratada de clorinada. As análises dos dados físico-químicos da água nos aquários mostraram que não houve correlação entre os parâmetros avaliados no decorrer do experimento, ou seja, a morte dos peixes foi associada apenas à presença do herbicida na água.

A concentração máxima de glifosato permitida pela resolução, Nº 357, de 17 de março de 2005, para águas de classe tipo I é de 65 µg/L (ppb) (CONAMA, 2009). No presente estudo foi investigada e determinada a CL_{50, 96h} para guppy de 5.65 µl/L (ppb), mais de onze (11) vezes menor que a concentração permitida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Mesmo levando em consideração que o experimento foi realizado com formulação comercial (R.Transorb[®]) em condições laboratoriais sem as múltiplas interferências do meio ambiente natural, pode-se verificar que a concentração máxima permitida pelo CONAMA é muito alta em relação à concentração média determinada neste estudo para a espécie *P. reticulata*. Não existe resolução feita pelo CONAMA para concentração máxima da formulação estudada a base de glifosato, mas apenas para seu princípio ativo, indicando a necessidade de adequação da legislação de agrotóxicos no país, passando a exigir estudos toxicológicos com produtos formulados através das instituições nacionais reguladoras de agrotóxicos, revendo as metodologias utilizadas pelas empresas responsáveis pelo registro das atuais e novas formulações. Dessa forma, promoveria à determinação de níveis máximos mais seguros destes herbicidas a base de glifosato e seus aditivos em águas de classe I.

3.2- Comparações das CL_{50, 96h} Roundup Original® e Roundup Transorb® para várias espécies de peixes

A maioria dos estudos de toxicidade aguda com o glifosato refere-se a espécies de clima temperado, poucos foram encontrados em espécies de clima tropical. Ensaio com espécies nativas do Brasil foram realizados por Langiano (2006), com o curimbatá (*Prochilodus scrofa*), Miyazaki, *et al.* (2004), com o tambaqui (*Colossoma macropomum*), Silva *et al.* (2004), com o jundiá (*Rhamdia quelen*), e por Rigolin-Sá (1999), com o jundiá (*Rhamdia hilarii*).

Mitchell e colaboradores (1987) encontraram em salmonídeos, CL_{50,96h} para o Roundup® que variaram de 15 mg/L a 26 mg/L, podendo ser considerados ligeiramente tóxicos, de acordo com a *U.S. Fish and Wildlife Service*. De acordo com essa classificação, o Roundup® também seria considerado ligeiramente tóxico para piaçu. Porém, de acordo com a classificação dos agrotóxicos, segundo a CL₅₀ estabelecida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-IBAMA em 1990 (Machado, 1999), o Roundup® pode ser considerado pouco tóxico para piaçu (*Leporinus macrocephalus*) (Albinati *et al.*, 2007)

A Tabela 3 apresenta diferentes relatos de toxicidade aguda com o Roundup Original® e Roundup Transorb® em diferentes espécies. Os resultados encontrados se diferem muito entre si, estando dentro da faixa descrita como pouco e moderadamente tóxico, de acordo com a classificação dos agrotóxicos (Tabela 4) segundo a CL₅₀ estabelecida pelo IBAMA em 1990.

Tabela 3. CL_{50, 96 h} Roundup Original[®] e Roundup Transorb[®] (herbicidas a base de glifosato) para diferentes espécies de peixes dulcícolas.

Espécie	CL _{50, 96 h} Roundup Original [®]	Autores
Guaru (<i>Poecilia reticulata</i>)	CL_{50, 96h} (R. Transorb[®]) 3,6 µg/ml	Presente trabalho
Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>)	10 mg/L	Silva <i>et al.</i> (2004)
Bagre do canal (<i>Ictalurus punctatus</i>)	10.6 mg/L	Rigolin-Sá (1999)
Tilapia do Nilo jovem (<i>Oreochromis niloticus</i>)	13 mg/L	Abdelghani <i>et al.</i> (1997)
Curimbatá (<i>Prochilodus lineatus</i>)	18.2 mg/L	Langiano e Martinez (2008)
Curimbatá (<i>Prochilodus lineatus</i>)	13.69 ppm	Langiano (2006)
Bluegill sunfish (<i>Lepomis macrochirus</i>)	14. 5 mg/L	Abdelghani <i>et al.</i> (1997)
Piaçu (<i>Leporinus macrocephalus</i>)	15.18 ppm	Albinati <i>et al.</i> (2007)
		Jiraungkoorskul, <i>et al.</i> (2002)
Tilapia do Nilo adulta (<i>Oreochromis niloticus</i>)	16.8 ppm	
Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	19.94 mg/L	Miyazaki <i>et al.</i> (2004)
Chinook salmon (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)	20 mg/L	Mitchell <i>et al.</i> (1987)
Coho salmon (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	22 mg/L	Mitchell <i>et al.</i> (1987)
Tambacu (<i>C. macropomum x Piaractus mesopotamicus</i>)	24.90 mg/L	Miyazaki <i>et al.</i> (2004)
<i>C. auratus</i>	25.61 mg/L	Antón <i>et al.</i> (1994)
Truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	26 mg/L	Mitchell <i>et al.</i> (1987)

Tabela 4. Classificação dos agrotóxicos de acordo com a CL₅₀ para organismos aquáticos definido pelo IBAMA.

CL ₅₀ ppm	CLASSIFICAÇÃO
>100	Praticamente não tóxico
10-100	Pouco tóxico
0,1-10	Moderadamente tóxico
< 0,1	Altamente tóxico

Fonte: Machado, 1999

O valor de CL_{50, 96h} do Roundup Original[®] para piaçu, encontrado no trabalho de Albinati *et al.*, (2007) foi de 15,18 ppm, demonstrando maior sensibilidade dessa espécie, em relação a outras espécies tropicais como o tambaqui e o híbrido tambacu (*Colossoma*

macropomum), (Miyazaki *et al.*, 2004) e uma menor sensibilidade, quando comparado com o jundiá (Rigolin-Sá, 1999; Silva, *et al.*, 2004) e curimatá (Langiano, 2006).

O valor encontrado da CL_{50, 96h} para guppy (3,6 µg/ml) neste experimento indicou menor resistência e por tanto maior sensibilidade dessa espécie em relação às demais espécies tropicais estudadas. Esses fatores podem estar relacionados às diferentes formulações dos herbicidas analisados e seus respectivos surfactantes. O R. Transorb[®] apresenta 648 g/L de glifosato e ácido de N-(fosfometil) glicina (48%), e o R. Original[®] possui quantidade menor, 360 g/L de glifosato com surfactante polioxientileno amina - POEA (15,4%); indicando o R. Transorb[®] como mais tóxico que o R. Original[®]. Dessa forma, sugere-se que em concentração maior de glifosato e o conjunto de diferentes surfactantes o peixe pode apresentar menor resistência diminuindo sua capacidade de adaptação, alterando de forma comprometedora sua fisiologia celular frente a esse herbicida.

A CL₅₀ é um dado muito importante para a avaliação de toxicidade de determinada substância, porém, nem todos os pesticidas provocam morte imediata dos peixes e doses subletais podem causar outros distúrbios à saúde desses animais, portanto as alterações histológicas em tecidos de peixes constituem ferramenta sensível para detectar os efeitos tóxicos diretos de compostos químicos em órgãos-alvo, sendo indicadores potentes da exposição prévia a estressores ambientais (Hinton *et al.*, 1992; Schwaiger, *et al.*, 1997).

Alguns trabalhos têm demonstrado a presença de lesões histológicas em órgãos de peixes expostos ao glifosato. Neskovic *et al.* (1996), trabalhando com carpas expostas a 2,5; 5 e 10 mg/L de glifosato por 14 dias e Rigolin-Sá (1999) estudando bagres expostos a concentrações de Roundup[®], que variaram de 8 a 12 mg/L, por 96 horas relataram alterações hepáticas, renais e branquiais. Da mesma forma, Jiraungkoorskul *et al.* (2002) observaram alterações em brânquias, fígado e rins de tilápias expostas a 36 ppm de Roundup[®] por 24, 48, 72 e 96 horas. Langiano (2006), trabalhando com curimatá, em exposições a 7,5 e 10,0 ppm de Roundup[®], por 6, 24 e 96 horas, encontrou alterações hepáticas, que embora reversíveis, comprometem o funcionamento normal do órgão (Albinati *et al.*, 2007).

Vale ressaltar a importância do *P. reticulata* como excelente bioindicador que ao longo dos últimos anos tem sido modelo de estudo em vários trabalhos relacionados à toxicidade e controle da qualidade ambiental hídrica. Sendo assim, maior investigação a nível morfológico, celular e molecular se faz necessário para verificar as alterações provocadas nessa espécie pelo herbicida em estudo. Também é preciso levar em consideração outros estudos já realizados com o mesmo herbicida em outras espécies de vertebrados e invertebrados aquáticos, e dessa forma reavaliar a sua classificação toxicológica que atualmente é medianamente tóxica (Classe III), se

baseando em alterações comportamentais, na determinação da CL_{50} e nas alterações morfofisiológicas e celulares.

3.3- Estudos do Comportamento

A investigação das manifestações comportamentais é baseada em análise de sintomas individuais como frequência respiratória, coordenação motora e equilíbrio (Skara & Baatrup, 1993) e em relações intra-específicas (Haller, 1988) e interespecíficas (Kania & O'Hara, 1974). Padrão comportamental variados possibilita ao peixe uma série de estratégias para garantir sua sobrevivência em meio natural, determinando muitas vezes maior capacidade de adaptação, necessária para solucionar situações inesperadas, aumentando suas possibilidades de sobrevivência.

Na análise registraram-se no controle negativo em todas as observações, os seguintes comportamentos: natação perfeita e coordenada em agrupamento, localizados nos dois terços médios e inferiores do aquário.

Nos aquários dos grupos experimentais nas 1ª e 2ª observação, registraram-se algumas manifestações comportamentais, como: defecação; agressividade; irritabilidade, essas foram observadas nas concentrações de 2µl/L e 4µl/L; perda do reflexo de fuga; choque contra a parede do aquário; contorção; tremores; midríase; perda do sentido de direção; postura de filhotes; animais mortos; escurecimento da superfície corporal; distribuição pelos dois terços do aquário, se mantendo na parte inferior do aquário (fundo), subindo a todo o momento a superfície; movimentos lentos nas nadadeiras laterais e caudais, poucos movimentos em ambas as nadadeiras ao mesmo tempo, essas foram observadas nas concentrações de 8µl/L, 16µl/L e 32µl/L. Além das manifestações comportamentais supracitadas, também se registrou os seguintes comportamentos nas concentrações 16µl/L e 32µl/L: natação errática; nado em círculos; anestesia; natação em parafuso com região ventral para cima e convulsão (Tabela 5).

Nas 3ª, 4ª e 5ª observações, as manifestações comportamentais foram às mesmas descritas nas observações anteriores. Constatou-se nas análises comportamentais aumento da mortalidade, sendo que nas concentrações maiores (16µl/L e 32µl/L) todos os peixes estavam mortos depois de 4 h de exposição, onde se observou nas brânquias coloração vermelho intenso quando comparadas com grupo controle. Nas demais concentrações se observaram aumento no número de peixes estáticos sem movimento nas nadadeiras, opérculos bem abertos e brânquias com coloração medianamente avermelhada (Tabela 5).

Tabela 5. Manifestações comportamentais do *Poecilia reticulata* em concentrações crescentes do herbicida Roundup Transorb®.

Concentrações	Tempo (h)					
	0	2	4	8	12	
2µl/L	*Defecação; agressividade e irritabilidade	(*)	(*)	(*)	(*)	
4µl/L	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	
8µl/L	**Perda do reflexo de fulga; choque contra a parede do aquário; contorção; tremores; midríase; perda do sentido de direção; distribuição pelos dois terços do aquário; se mantendo na parte inferior do aquário (fundo); escurecimento da superfície corporal; indo e voltando a superfície do aquário; movimentos lentos nas nadadeiras laterais e caudal; poucos movimentos em ambas as nadadeiras ao mesmo tempo (*).	(*,**)	(*,**)	(*,**)	(*,**)	
16µl/L	*** Natação errática; nado em círculos; anestesia; natação em parafuso com	(*,**,***)	(0)	(0)	(0)	

	região ventral para cima e convulsão					
	(*,**).					
32μl/L	(*,**,***)	(*,**,***)	(0)	(0)	(0)	
Controle negativo	# Normal sem alterações (natação perfeita e coordenada em agrupamento.	#	#	#	#	

Legenda: (*) manifestações comportamentais registradas entre 2μl/L, 4μl/L, 8μl/L, 16μl/L e 32μl/L; (** e ***) manifestações comportamentais registradas entre 8μl/L, 16μl/L e 32μl/L; (0) morte de todos os animais; (#) manifestações comportamentais normais registradas somente no controle negativo.

Foi também observado perda de massa corporal, em razão da abstinência de alimento durante o tratamento (96h) e possivelmente da peroxidação de lipídeos celulares pelos componentes tóxicos presentes na formulação do herbicida. Segundo Botelho *et al.* (2009) em tecidos animais, acontecem reações que visam produzir energia para as células. Nessas reações são formados os radicais livres instáveis, que atacam outras moléculas, como lipídios, material genético e proteínas, acelerando a oxidação de tecidos e provocando lesões nas células. A maioria dos pesticidas possui essa propriedade de formação de radicais livres. Essa hipótese explicaria o escurecimento dos peixes nas maiores concentrações (8µl/L, 16µl/L e 32µl/L testadas).

Essas alterações comportamentais são típicas da ação do herbicida no sistema nervoso. Segundo De La Torre (2002), o herbicida em estudo provoca à inibição da enzima acetilcolinesterase (colinesterase) que desempenha papéis importantes na neurotransmissão colinérgica central e periférica. Ela hidrolisa ésteres de colina e auxiliam na detoxificação de substâncias potencialmente tóxica ao organismo. As colinesterases são amplamente distribuídas tanto em vertebrados como em invertebrados.

Esse herbicida é organofosforado inibidor potente da enzima acetilcolinesterase (AChE) (Massoulié *et al.*, 1993). Com a diminuição da enzima AChE pela presença de inibidor, a acetilcolina liberada será acumulada na sinapse colinérgica central e junções neuromusculares, levando a super-estimulação das células-alvo. Como consequência, esses distúrbios podem afetar a locomoção e equilíbrio dos organismos expostos (Sanglio *et al.*, 1998a; Sanglio & Trijasse, 1998b).

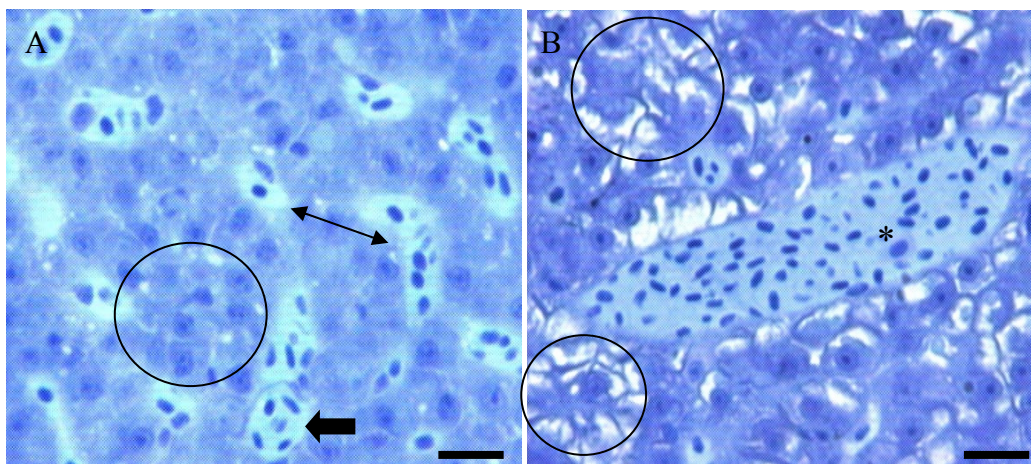
No estudo verificaram-se distúrbios no movimento e alterações no comportamento de natação já citados anteriormente. Estas alterações já foram bem descritas em outras espécies de peixes expostos ao herbicida atrazina em estudos feitos por Sanglio (1998a) e diuron feito por Bretau (2000). Em peixes, vários estudos demonstraram alterações na atividade de colinesterases em água contaminadas com herbicida (Sancho *et al.*, 2000; Dutta e Arends, 2003).

Existe provável interferência do herbicida no sistema respiratório dos peixes, que frequentemente subiam à superfície. Essa constatação é apoiada pela alteração na abertura dos opérculos e na coloração vermelha intensa das brânquias de alguns peixes. Segundo Fanta *et al.* (1997), essas alterações comportamentais estão relacionadas com alterações histopatológicas causadas pelo herbicida.

3.4- Efeitos Histopatológicos e Histomorfometria no Fígado do guppy

O presente trabalho, as análises macroscópicas do fígado de *P. reticulata* permitiram verificação que todos os espécimes estudados apresentavam fígado com alterações em diferentes graus, com aparência de massa disforme, extremamente frágil e nas maiores concentrações (2.83; 4.24 e 5.65 μL) apresentaram-se mais volumosos, inchados.

Os peixes expostos a ambas as concentrações de R. Transorb[®] mostrou várias alterações patológicas no fígado. As mais frequentes alterações foram: vacuolização; degeneração citoplasmática e hiperemia, ou seja, aumento do fluxo de sangue de forma considerável no fígado (Figura 4 -B); degeneração do citoplasma e núcleo (Figura 4-C); hipertrofia celular e hipertrofia nuclear (Figura 4-E); degeneração do núcleo (Figura 4-F). A frequência de ocorrência de alterações hepáticas é apresentada na Tabela 6. Os valores do IAH são determinados para o fígado do guppy após 24 h de exposição a 1.41; 2.83; 4.24 e 5.65 μL de R. Transorb[®], e em todo o período de exposição às maiores concentrações deste herbicida foram significativamente maiores que os controles (Figura 5).



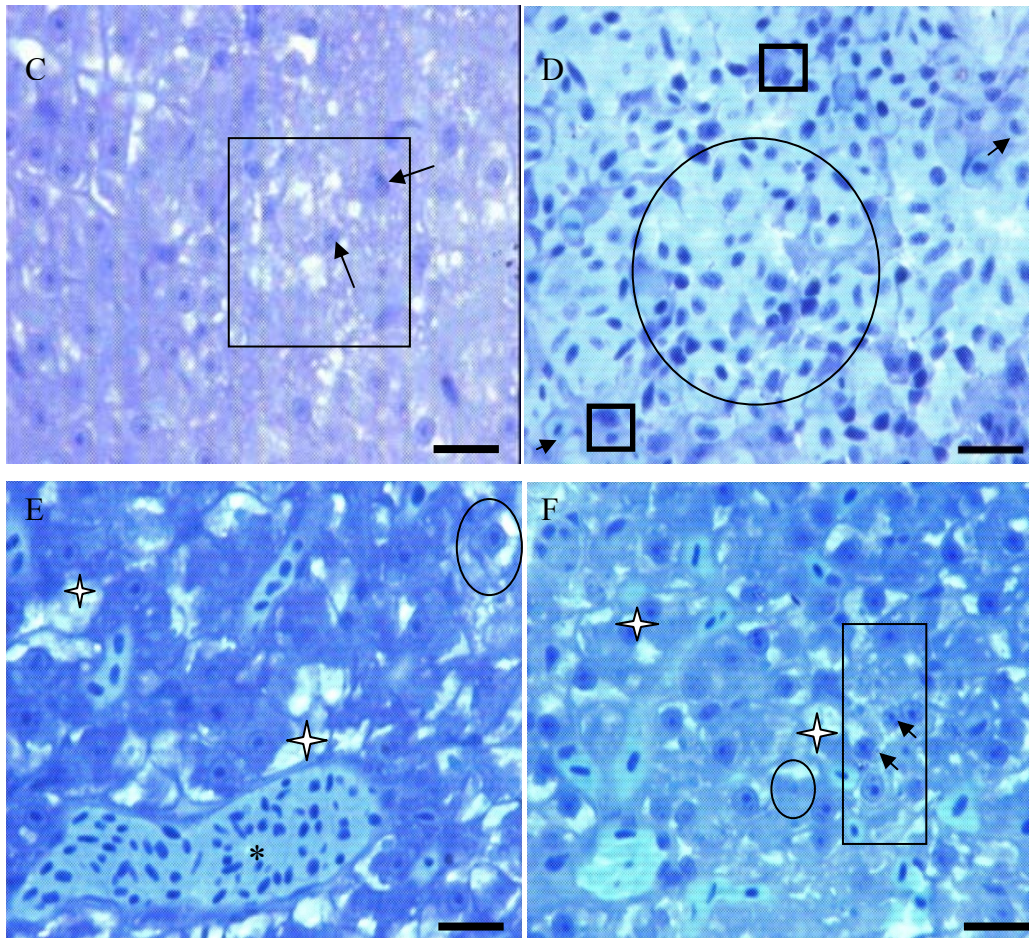


Figura 4. Fotomicrografia do tecido hepático do *Poecilia reticulata* exposto ao Roundup Transorb[®]. (A) Peixe controle, tecido hepático normal, hepatócitos (círculo), sinusóides (seta de duas cabeças) e pâncrea intrahepático (seta larga). (B) Peixe exposto em 1,41µg/L do herbicida, vacuolização do citoplasma (círculos) e hiperemia (asterisco). (C) Peixe exposto em 2,83µg/L, degeneração do citoplasma (retângulo) e degeneração do núcleo (setas). (D) Peixe exposto em 5,65µg/L, núcleo picnótico (quadrados), hemorragia (círculo) e vacúolo no núcleo (setas). (E) Peixe exposto 5,65 µg/L, hiperemia (asterisco), hipertrofia celular (estrelas) e hipertrofia nuclear (círculo). (F) Peixe exposto 4,24 µg/L, hipertrofia celular (estrelas), degeneração do citoplasma (retângulo), degeneração núcleo (setas) e hipertrofia nuclear (círculo). Barra corresponde 10µm.

Os peixes expostos ao R. Transorb[®] observou-se alterações histológicas hepáticas (Figura 4). A análise quantitativa destas alterações hepáticas mostrou que o fígado do guppy foi afetado após a exposição ao herbicida com valores médios IAH de 14.85 em 1.41µg/L; 26.85 em 2.83µg/L; 56 em 4.24µg/L e 94.29 em 5.65 µg/L, indicando que a ocorrência dessas alterações prejudica de forma sensível a função normal deste órgão, ficando o grupo controle com 2.57 o IAH (Figura 5).

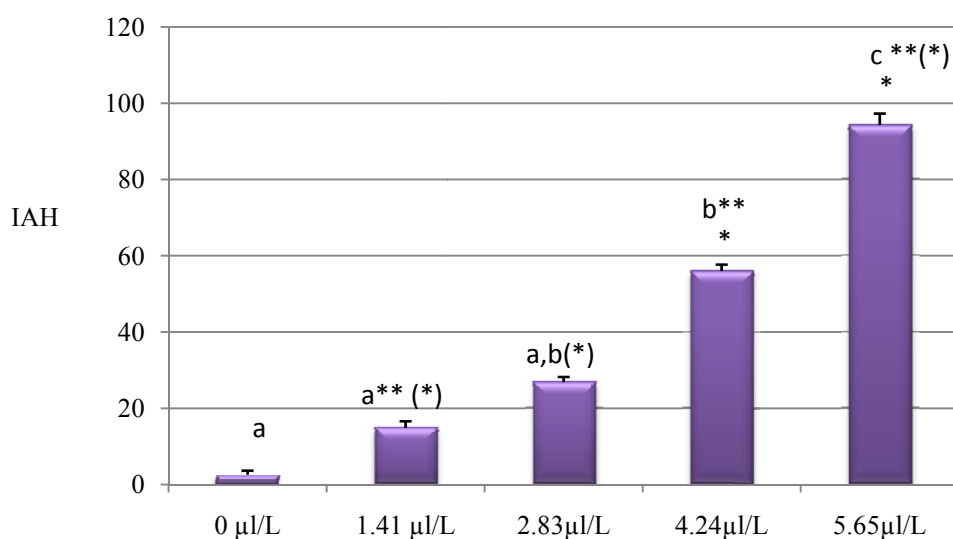


Figura 5. Cálculo do Índice de Alterações Histopatológico (IAH) para tecido hepático do *Poecilia reticulata* exposta a concentrações crescentes do Roundup Transorb® pelo período de 24 h. *Diferença estatística quando comparada ao controle ($P < 0.01$). a**, b** e c** ($p < 0.05$); a(*), a,b(*) e c(*) ($p < 0.01$). Os valores obtidos IHA foram transformados e calculados para análise estatística (ANOVA e teste Tukey).

As alterações histológicas mais encontradas foram à degeneração celular e nuclear, aumento do volume nuclear, vacuolização citoplasmática e nuclear, a presença de núcleos picnóticos, hipertrofia celular e nuclear, e hiperemia (Tabela 6). Essas alterações parecem ser desenvolvidos em comum nos peixes expostos ao herbicida considerando que Jiraungkoorskul *et al.* (2002) e Langiano e Martinez (2008), em estudo utilizando *Oreochromis niloticus* expostos a 36 mg L^{-1} do herbicida a base de glifosato (Roundup Original®) e *Prochilodus lineatus* expostos a 7.5 e 10 mg L^{-1} do mesmo herbicida, observaram também a ocorrência das mesmas lesões hepáticas.

Aumento do volume celular e nuclear dos hepatócitos (fase I) pode ser considerado como resposta ao agente estressor, pois indicam a ativação das funções do fígado e não prejudicam o desempenho hepático, indicando a intensificação da atividade metabólica dos hepatócitos em condições adversas (Takashima e Hibiya, 1995). Essas alterações foram frequentemente encontrados nos peixes expostos a $2.83 \mu\text{l/L}$, $4.24 \mu\text{l/L}$ e $5.65 \mu\text{l/L}$ do R. Transorb®, durante o período de 24 horas. Em contraste, as degenerações citoplasmáticas e nucleares representam lesões mais graves (fase II), apesar de reversível, pode impedir as funções desempenhadas pelo fígado, já que a área do tecido hepático ativa é metabolicamente diminuída.

Essas alterações podem corresponder a efeitos diretos causados pela exposição ao herbicida sendo encontrado em todos os peixes expostos, menos nos peixes do grupo controle (Tabela 6). No grupo controle foi encontrado apenas vacuolizações e alguns núcleos picnóticos em menor grau e frequência (apenas 2 espécimes), provavelmente como processo normal da atividade celular do tecido. Szarek *et al.* (2000) estudaram a ultraestrutura hepática em *Cyprinus carpio* expostos ao Roundup® e também verificou a ocorrência de diferentes pontos de vacúolos nos hepatócitos, bem como degeneração de mitocôndrias e aumento do complexo de Golgi, isso confirma que Roundup® a base de glifosato presente na água resulta em sensível lesão aos hepatócitos.

Tabela 6. Alterações histológicas do fígado de *Poecilia reticulata* em exposição aguda (24 h) ao herbicida Roundup Transorb® em concentrações crescentes, mais grupo controle (0µl/L) com respectivos estágios e frequência das modificações no tecido.

ALTERAÇÕES	ESTÁGIO	0 µl/L	1.41 µl/L	2.83 µl/L	4.24 µl/L	5.65 µl/L
Hipertrofia celular	I	0	++	+++	++++	++++
Hipertrofia nuclear	I	0	++	+++	+++	+++
Células irregulares	I	0	+++	+++	++++	++++
Núcleos irregulares	I	0	++	++	+++	++++
Núcleo periférico	I	0	++	+++	+++	+++
Vacúolo no citoplasma	I	+	+++	++++	++++	++++
Vacúolo no núcleo	II	0	0	+++	++++	++++
Degeneração citoplasma	II	0	+++	+++	++++	++++
Degeneração núcleo	II	0	+++	+++	++++	++++
Hiperemia	II	0	++	++++	++++	++++
Núcleo picnótico	II	+	++	+++	+++	++++
Hemorragia	II	0	0	0	0	++

Legenda: 0= ausência; + = baixa frequência; ++ = frequente; +++ = muito frequente; ++++ = frequência alta.

Vacuolização nuclear e núcleos picnóticos foram também encontrados em peixes expostos nas concentrações de 2.83, 4.24µl/L e 5.65µl/L do herbicida R. Transorb® durante todo período de exposição, discutido na Tabela 6. A vacuolização do núcleo ocorre no fígado

de muitos vertebrados e invertebrados aquáticos na presença de poluentes (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2002) e pode levar à degeneração subsequente do núcleo, indicado pela presença de núcleos picnóticos.

De acordo com o teste Tukey houve diferença significativa entre o grupo controle e os tratados nas maiores concentrações (4.24µl/L e 5.65µl/L), ocorreram também diferenças significativas entre os grupos tratados nas concentrações de 1.41 µl/L e 4.24 µl/L; 4.24 µl/L e 5.65 µl/L ($p>0.05$); 1.41 µl/L e 5.65 µl/L; 2.83 µl/L e 5.65 µl/L($p>0.01$). Essas diferenças indicam que o grau de alterações promovido pela ação do herbicida aumenta de forma sensível com a elevação da concentração, comprometendo o bom funcionamento do fígado (Figura 5 e Tabela 6).

Constatou-se, a partir da avaliação quantitativa obtida pela histomorfometria, que os animais submetidos a tratamento agudo com herbicida R. Transorb[®] apresentaram alterações significativas nos hepatócitos, núcleos e sinusóides. A principal alteração observada foi o aumento celular do hepatócito, juntamente com núcleo referente à área, diâmetro e volume, bem como hiperemia dos vasos sinusóides (Tabela 7 e 8). A hiperemia indica processo inflamatório agudo no fígado promovido pela presença do herbicida, que em exposição crônica pode evoluir para necrose, hemorragia ou até mesmo fibrose hepática.

A partir dos valores obtidos da análise histomorfométrica do tecido hepático obteve-se a média e o desvio padrão. A análise estatística entre os grupos tratados e grupo controle apresentou diferença significativa ($p<0.01$ e $p>0.05$). Os parâmetros utilizados para análise das alterações histomorfológicas apresentaram diferença em todas as concentrações quando comparadas ao controle negativo (Tabela 7 e 8). Constatou-se também diferenças entre os grupos tratados pelo teste Tukey, sendo mais evidentes as diferenças entre as mensurações encontradas nas maiores concentrações (4.24 e 5.65µl/L) (Tabela 9), indicando que as concentrações foram espaçadas suficientemente para se observar aumento dos níveis de alterações histomorfológicas em nível qualitativo e quantitativo, promovidas pela ação tóxica do herbicida nos hepatócitos, sendo crescentes conforme o aumento das concentrações.

Tabela 7. Mensurações avaliadas da área, diâmetro, raio e volumedo dos hepatócitos mais o volume e área do citoplasma em tratamentos com Roundup Transorb®.

Tratamentos (µl/L)	AHept (µm ²)	DHept (µm)	VHept (µm ³)	ACit (µm ²)	VCit (µm ³)	RHept
						ACit/An (µm ²)
0	66.3±15.4	8.8±1.1	414.54±139.1	58.2±15.5	343.1±132.9	7.1±2.37
1.41	78±21*	10.1±1.34*	533.61±220*	67.8±19.7**	432.9±193.9**	6.5±2.89
2.83	76.4±12.3**	10±1*	509.6±147.4**	66.7±14.6**	417.6±132.1	6.9±1.46
4.24	89.1±12.4*	10.9±0.7*	637.26±132.4*	77.1±11.4*	513.5±114.2*	6.4±1.62
5.65	88.8±19*	11±1.1*	640.4±203.3*	77.7±18.4*	526.2±187.6*	7±1.83

AHept=área hepatócito; DHept=diâmetro hepatócito; VHept=volume hepatócito; ACit=área citoplasma; VCit=volume citoplasma; RHept=razão hepatócito.

* p<0,01 e **p<0.05 entre o controle (0µl/L) em relação aos grupos tratados.

Tabela 8. Mensurações avaliadas dos núcleos dos hepatócitos e diâmetro do sinusóide em tratamentos com Roundup Transorb®.

Tratamentos (µl/L)	An (µm ²)	Dn (µm)	Vn (µm ³)	DSnd (µm)
0	8.1 ± 2.3	3.22 ± 0.2	17.9 ± 7	2.8 ± 0.5
1.41	10.4 ± 2.8*	3.64 ± 0.5*	25.8 ± 11.9*	11.8 ± 2.7*
2.83	9.6 ± 1.4*	3.62 ± 0.2*	22.6 ± 5.2**	7.3 ± 3.2*
4.24	11.9 ± 1.6*	4.02 ± 0.2*	31.5 ± 6.5*	15.6 ± 4.1*
5.65	11.1 ± 1.8*	3.96 ± 0.2*	28.1 ± 7.4*	13.2 ± 3.4*

An=área núcleo; Dn=diâmetro núcleo; Vn=volume núcleo; DSnd=diâmetro sinusóide

* p<0,01 e **p<0.05 entre o controle (0µl/L) em relação aos grupos tratados.

Tabela 9. Diferenças estatísticas entre os grupos tratados em relação às mensurações histomorfométricos estabelecidos para tecido hepático.

Tratamentos (µl/L)	1.41 µl/L	2.83 µl/L	4.24 µl/L	5.65 µl/L
1.41		9*	1*/ 2*/3**/4*/6*/ 7*/8*/9*	1*/2*/3**/4 */5*/7*
2.83			1*/ 2*/3*/4*/5*/ 6*/	2*/3*/4*/5*/6*/7*/

7*/8*/9*

8*/9*

4.24

1*

5.65

1= área do hepatócito; 2=diâmetro do hepatócito; 3=volume do hepatócito; 4=área citoplasma; 5=volume citoplasma; 6=área núcleo; 7=diâmetro núcleo; 8= volume núcleo; 9=diâmetro sinusóide.

* p<0,01 e **p<0.05

A análise total da área, diâmetro e volume dos hepatócitos e de seus núcleos demonstrou que os grupos tratados (1.41; 2.83; 4.24 e 5.65 µl/L do herbicida) apresentaram áreas significativamente maiores quando comparados com o grupo controle (Tabela 7 e 8). Tais resultados indicam que houve hipertrofia celular significativa dos hepatócitos estudados sob tratamento agudo com herbicida R. Transorb[®], confirmada pelas análises das alterações hitopatológicas realizadas nos grupos tratados e controle. Além disso, existe correlação positiva significativa entre a área total dos hepatócitos e seus núcleos comparados com a concentração administrada do herbicida ($R^2 = 0.85$ e $R^2 = 0.66$ p< 0,01 e p<0.05), indicando concentração dependente (Figuras 6 e 7).

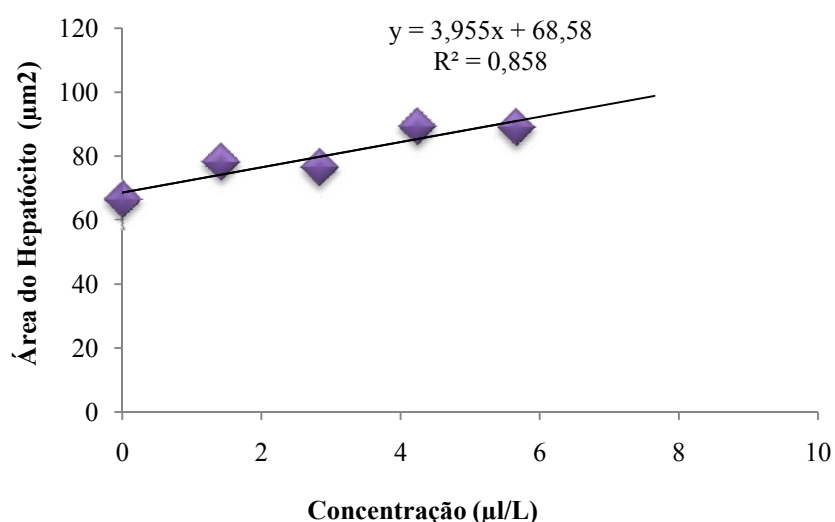


Figura 6. Representação gráfica da área do hepatócito em função da concentração do Roundup Transorb[®].

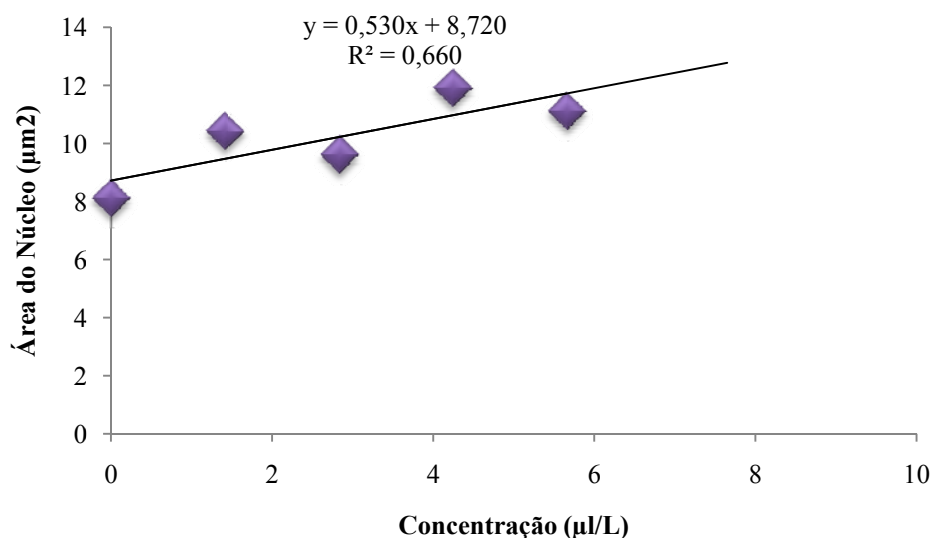


Figura 7. Representação gráfica da área do núcleo em função da concentração do Roundup Transorb®.

4- Conclusões

O herbicida a base de glifosato (R. Transorb®) estudado neste experimento apresenta efeitos tóxicos em exposição aguda no *P. reticulata*, promovendo alterações comportamentais nas espécimes tratadas, ficando evidente a ação no sistema nervoso e branquial.

Não foram observadas alterações significativas nas variáveis físico-químicas da água pelo herbicida em todas concentrações analisadas. Os resultados do trabalho mostraram que o R. Transorb® poderia ser menos tóxico para *P. reticulata* que outros herbicidas usados no Brasil. No entanto, esta espécie de peixe neotropical é mais sensível a este herbicida. O valor encontrado da $CL_{50; 96h}$ para guppy (3,6 µg/ml) neste experimento indicou maior sensibilidade dessa espécie em relação às demais espécies citadas em outros estudos. Comparando as duas formulações de herbicidas a base de glifosato, o R. Transorb® se apresentou mais tóxico que o R. Original®.

A avaliação histopatológica do fígado do *P. reticulata*, permitiu concluir que o R. Transorb® induziu várias alterações hepáticas prejudicando o funcionamento normal do fígado. Estudos relacionados com a resposta ao estresse oxidativo em *P. reticulata* exposto ao R. Transorb® se faz necessário para melhor compreensão dos mecanismos de toxicidade desta formulação.

Com este trabalho pode-se concluir que o herbicida estudado é moderadamente tóxico para o peixe *P. reticulata*, ressaltando a importância do risco deste herbicida ao meio

ambiente. Sua contaminação pode apresentar forte ameaça para as populações de peixes e outro organismos vertebrados e invertebrados. A investigação apurada para determinar critérios e percentuais mais seguros desta formulação de herbicida utilizada na agricultura nacional é fundamental. Contribuindo dessa forma para que os animais aquáticos, de maneira especial não sofra tanto com a ação danosa deste herbicida.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Escola de Agronomia da UFG pelo fornecimento dos peixes. Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq bolsa de mestrado J Souza-Filho) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROCAD 2009). Os autores também agradecem aos colegas parceiros anônimos, que contribuíram com ricas sugestões e críticas, em especial aos colegas do Laboratório de Comportamento Celular-LCC/ICB/UFG.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdelghani, A.A., Tchounwou, P.B., Anderson, C., Sujono, H., Heyer, L.R., Monkiedje, A., 1997. Toxicity evaluation of single and chemical mixtures of Roundup, Garlon-3A, 2,4-D, and Syndects surfactant to Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*), Bluegill Sunfish (*Lepomis microchirus*), and Crawfish (*Procambarus sp.*). Environm. Tox. and Wat. Qual., v.12,n.3,p.237-243, 1997.
2. [Agência Goiana de Defesa Agropecuária \(AGRODEFESA\), 2009. \[online\] Disponível em: http:// www.agrodefesa.gov.br \[Acessado: 10/07/2009\].](http://www.agrodefesa.gov.br)
3. [Alazemi, B.M., Lewis, J.W., Andrews, E.B., 1996. Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* \(Family: Mormyridae\) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study. Environ. Technol. 17, 225–238.](#)
4. [Albinati, A.C.L., Moreira, E.L.T., Albinati, R.C.B., 2007. Toxicidade Aguda do Herbicida Roundup® para Piaçu \(*Leporinus macrocephalus*\). Rev. Bras. Saúde Prod. Na., v.8, n.3 p. 184, jul/set, ISSN 1519 9940 \[online\] Disponível:http://www.rbspa.ufba.br Acessado: 12/08/2009.](#)
5. [Amarante Jr., O.P., Santos, T.C.R., Brito, N.M., Ribeiro, M.L., 2002. Glifosato: Propriedades, toxicidade, uso e legislação. Quím. Nova 25, 589–593.](#)
6. Antón, F.A., Laborda, E., De Ariz, M., 1994. Acute toxicity of the herbicide glyphosate to fish. Chemosph., v. 28, n. 4, p.745-753, 1994.

7. Au, D.W.T., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Mar. Pollut. Bull.*, 48: 817–834.
8. [Barbieri, E., Oliviera, I.R., Serralheiro, P.A.C., 2002. The use of metabolism to evaluate the toxicity of dodecil benzen sodium sulfonate \(LAS-C12\) on the *Mugil platanus* according to the temperature and salinity. *J. of Experim. Mar. Biol. and Ecol.*, 277:109-127.](#)
9. [Barbieri, E., 2004. Emprego de *Poecilia vivipara* \(Cyprinodontiformes\) E *Artemia salina* \(Crustacea\) para Determinar a Toxicidade Aguda da Água de Produção de Petróleo em Sergipe, Brasil. Instituto de Pesca-SAASP, Cananéia-SP. *São Cristóvão, SE* 5 \(1\): 26-29.](#)
10. Bernet, D., Schimidt, H, Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. of Fish Dis.*, 22: 25-34.
11. [Botelho, R.G., Santos, J.B., Oliveira, T.A., Braga, R.R., Byrro, E.C.M., 2009. Toxicidade aguda de herbicidas a *Tilapia \(Oreochromis niloticus\)*. *Planta Daninha.*, v.27, p.621-626.](#)
12. [Brasil, 2008. Lei nº. 11.794 de 08 de outubro de 2008. \[online\] Disponível em: \[www.ufrgs.br/bioetica\]\(http://www.ufrgs.br/bioetica\). \[Acessado: 10/07/2010\].](#)
13. Braunbeck, T., 1998. Cytological alterations in fish hepatocytes following in vivo and in vitro sublethal exposure to xenobiotics—structural biomarkers of environmental contamination. In: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (Eds.), *Fish Ecotox*. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 61–140.
14. [Bretaud, S., Totant, J.P., Saglio, P., 2000. Effects of carbofuron, Diuron and nicossulfuron on acethylcholinesterase activity in goldfish \(*Carassius auratus*\). *Ecotox. and Env., Saf.*, v. 47, p. 117-124.](#)
15. [Bronstad, J. O., Friestad, H. O., 1985. The herbicide glyphosate, p. 200-2005. Londres: Butterworth.](#)

16. [Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental \(CETESB\), 1990. Água-teste de toxicidade aguda com peixes. NBR L5.019-I, II e III. São Paulo: CETESB. np.](#)
17. [Conselho Nacional do Meio Ambiente \(CONAMA\), 2009. Resolução nº357, 17 março de 2005,\[online\] Disponível: <http://www.mma.gov.br/conama> \[Acessado: 12/05/2009\].](#)
18. [Conselho Federal de Medicina Veterinária \(CFMV\), 2008. Resolução nº879, de 15 de fevereiro de 2008. \[online\] Disponível em: \[http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_879.pdf\]\(http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_879.pdf\) Acessado: 12/05/2009.](#)
19. [Cox, C., 1998. Northeast Coalition for Alternative to Pesticides. J. of Pest. Reform/Fall. v. 18, n. 3.](#)
20. [De La Torre, F. R., Ferrari, L., Salibián, A., 2002. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. Comp. Biochem. Physiol. C 131, 271-280.](#)
21. [Dutta, H.M., Arends, D.A., 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. Environmental Research. v. 91, p. 157-162.](#)
22. [Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária \(EMBRAPA\), 2002. Potencial de Impacto da Agricultura sobre os Recursos Hídricos na Região do Cerrado. ISSN 1517-5111 Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento \(MAPA\).](#)
23. [Fanta, E., Moreira, L.A., Silva, S.O., 1997.Sintomas comportamentais de Oreochromis Niloticus submetidos à diferentes doses do organofosforado Folidol 600. In: Encontro Anual de Etologia, 15., São Carlos: UFSCar. Anais. São Paulo: UFSCar. p329.](#)
24. [Feng, J. C., Thompson, D. G., Reynolds, P. E., 1990. Fate of Glyphosate in a Canadian Forest Watershed. 1. Aquatic Residues and Off Target Deposit Assessment. J. Agric. Food Chem., Washington, v. 38, pp. 1110-8.](#)

25. Ferrando, S., Malsano, M., Parrino, V., Ferrando, T., Girosi, L., Tagliaferro, G., 2006. Gut morphology and metallothionein immunoreactivity in *Liza aurata* from different heavy metal polluted environments. *Ital. J. Zool.* 73, 7–14.
26. Ghassemi, M., Fargo, L., Painter, P., Quinlivan, S., Scofield, R., Takata, A., 1981. Environmental fates and impacts of major forest use pesticides, pp. A-149-68. Washington: U.S. EPA. Office of Pesticides and Toxic Substances.
27. Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 167, 35–120.
28. Glusczak, L., Miron, D.S., Crestani, M., Fonseca, M.B., Pedron, F.A., Duarte, M.F., Vieira, V.L.P., 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 237–241.
29. Glusczak, L., Miron, D.S., Moraes, B.S., Simões, R.R., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Loro, V.L., 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp. Biochem. Physiol. C.* 146, 519–524.
30. Golalipour, M.J., Grafari, S., Farsi, M. M., 2009. Effect of *Urtica dioica* L Extract on Quantitative Morphometric Alterations of Liver Parenchymal Cells in STZ Diabetic Rats. *Int. J. Morphol.*, 27(4): 1339.
31. Goldsborough, L.G., Brown, D.J., 1993. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and sediments of boreal forest ponds. *Envir. Tox. Chem.*, v. 12, pp. 1139-47.
32. Goldstein, E.G., Zagatto, P.A., Araújo, R.P.A., Bertoletti, E., 1983. Avaliação da toxicidade dos principais despejos industriais da região de E.R.Q.-Suzano, através de ensaios biológicos. *Revista Dae* 132, 42-47.
33. Haller, J., 1988. The effects of mercury chloride on the aggressive behavior of *Beta splendens*. *Stud. Unive. Babes-Bolyai Biol. Najoca*, v. 33, n. 2, p.66-68.

34. Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R.V., 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. and Tech.*, v. 11, p. 714-719.
35. Heath, A.G., 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*, second ed. CRC Lewis Publishers, Boca Raton.
36. Hinton, D.E., Baumann, P.C., Gardner, G.R., Hawkins, W.E., Hendricks, J.D., Murchelano, R.A., Okirino, M.S., 1992. Histopathology biomarkers. In: Hugget, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.M. and Ergaman, H.L., *Biomarkers _ Biochemical, physiological and histological markers of antropogenic stress*. Flórida: Lewis Publishers, p.155-209.
37. Jagoe, C.H., Faivre, A., Newman, M.C., 1996. Morphological and morphometric changes in the gills of mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) after exposure to mercury (II). *Aquat. Toxicol.* 34, 163–183.
38. Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Krutrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S., Pokethitiyook, P., 2002. Histopathological Effects of Roundup, a Glyphosate Herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Scien. Asia*, v.28, p.121-127.
39. Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S., Pokethitiyook, P., 2003. Biochemica and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ. Toxicol.*, 18, 260–267.
40. Kania, H. J., O'Hara, J., 1974. Behavioral alterations in a simple predator-prey system due to mercury. *Trans. Am. Fish. Soc.*, Bethesda, v. 103, n.1, p. 134-136.
41. Ke, W.M., Xie, S.B., Yu, L.N., Liu, T., Lai, J., He, D.Q., Li, X.H., Gao, Z.L., Ke Y., Chen, P.J., 2007. Decline of Serum HBV DNA and No Change Apportioned by the Same Hepatic Parenchyma Cell Volume from Hepatic Fibrosis Stage 1 to Stage 4 during the Natural History of Chronic Hepatitis B. *Intervir.*, 51:235-240.
42. [Kirkwood, R.C., 1979. Advance in pesticide science, p. 420-429. Oxford: Pergamon Press.](#)

43. [Kollman, W., Segawa, R., 1995. Interim report of the pesticide chemistry database: environmental hazards assessment program. Department of Pesticide Regulation.](#)
44. [Langiano, V.C., 2006. Toxicidade do Roundup e seus efeitos para o peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. 62p. Dissertação \(Mestrado\) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.](#)
45. [Langiano, V.C., Martinez, C.B.R., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus* Comp. Bioch. and Phy., Part C 147 \(2008\) 222-231.](#)
46. [Machado, M.R., 1999. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. NOPAR Científica, v.1, n.1, p.63-76.](#)
47. [Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Bellé, R., 2004. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. Biol. Cell, 96, 245–249.](#)
48. [Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Vallette, F.M., 1993. Molecular and Cellular Biology of Cholinesterases. Progr. in Neur., v. 41, p. 31-41.](#)
49. [Mitchell, D.G., Chapman, P.M., Long, T.J., 1987. Acute toxicity of Roundup and Rodeo herbicides to rainbow trout, chinook, and coho salmon. Bull. Environ Contam. Toxicol., v. 39, p.1028-1035.](#)
50. [Miyazaki, D.M.Y., Machado Neto, J.G., Castagnolli, N., 2004. Toxicidade aguda de triclorfon, partion metílico e glifosato para alevinos de tambaqui \(*Colossoma macroporum*\) e tambacu \(*C. macroporum* X *Piaractus mesopotamicus*\). In: Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos \(ENBRAPOA\), 8., 2004, Laguna . Anais... Maringá: Biblioteca Setorial da UEM, p.203.](#)
51. [Monsanto Company Brasil, 2009. \[online\] Disponível em: http://www.bio2.com.br \[Acessado em 12/08/2009\].](#)

52. [Neškovic, N.K., Poleksic, V., Elezovic, I., Karan, V., Budimir, M., 1996. Biochemical and Histopathological Effects of Glyphosate on Carpa, *Cyprinus carpio* L. Bull. Environ. Contam. Toxicol, v.56, p.295-302.](#)
53. [Noga, E.J., 1995. Fish Disease: Diagnosis and treatment. Mosby-Year Book. St. Louis, Missouri, USA., 367p.](#)
54. Oliveira Ribeiro, C.A., Schatzmann, M., Silva de Assis, H.C., Silva, P.H., Pelletier, E., Akaishi, F.M., 2002. Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51, 161–167.
55. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 1992. Guideline for testing chemicals. Fish, Acute Toxicity Test 203.
56. Peixoto, F., 2005. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere* 61, 1115–1122.
57. [Pereira, F.P.L., Mercante, J.T.C., 2005. A Amônia nos sistemas de Criação de Peixes e Seus Efeitos Sobre a Qualidade da Água. Uma Revisão. B. Inst. Pesca, São Paulo, 31\(1\): 81-88.](#)
58. [Polesksic, V., Mitrovic-Tutundzic, V., 1994. Fish gills a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Müller, R., Lloyd, R., Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Oxford: Fishing News Books, Cap. 30, p. 339-352.](#)
59. [Queiroz, F.J., Boeira, C. R., 2007. Boas Práticas de Manejo \(BPMs\) para Reduzir o Acúmulo de Amônia em Viveiros Aqüicultura. ISSN 1515-8638, Embrapa, Dezembro. Jaguariúna, SP.](#)
60. [Rand, G.M., Petrocelli, S.R., 1985. Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications, New York: Hemisphere, p. 1-28.](#)
61. [Releya, R.A., 2005. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecol. Appl.* 15, 618–627.](#)

62. [Rigolin-Sá, O., 1999. Toxicidade do Herbicida Roundup \(Glifosato\) e do Acaricida Omite \(Propargito\) nas fases iniciais da Ontogenia do Bagre *Rhamdia hilarii* \(Valenciennes, 1840\) \(Pimelodidae, Siluriformes\). 307f. Tese \(Doutorado\) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.](#)
63. [Sancho, E., Fernández-Vega, C., Sanchez, M., Ferrando, M.D., Moliner, A., 2000. Alternations on AChE activity of the fish *Anguilla Anguilla* as response to herbicide-contaminated water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* V. 46, 57-63.](#)
64. [Sanglio, P., Olsen, K.H., Bertaud, S., 1998a. Behavior and ofactory responses to prochloraz, bentazone, and nicosulfuron contaminated flows in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* v.35, p. 4-491.](#)
65. [Sanglio, P., Trijasse, S., 1998b. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* V. 35, p. 484-491.](#)
66. [Schwaiger, J., Rüdiger, W., Stefan, A., Micahel, P., Wolfgang, H., Rita, T., 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminan trelated stress in fish. *J. Aquat. Ecosyst Stress Recov*, v. 6, n. 1, p. 75-86.](#)
67. [Segner, H., 1998. Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. *Comp. Bioch. and Phys.*, 120 A: 71-81.](#)
68. [Silva, J.M., Santos, J.R., 2007. Toxicologia de Agrotóxicos em Ambientes Aquáticos. *Oecol. Bras.*, 11\(4\): 564-573.](#)
69. [Silva, T.O., Ritter, F., Silva, L.B., Quevedo, R.M., Baldissera, R., Finco, J., Bedin, A., De Lima, M.R., Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., 2004. Determinação da DL50 e da DL100 para o herbicida glifosato em alevinos de Jundiá, *Rhamdia quelen*. In: Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos \(ENBRAPOA\), 8. Laguna. Anais... Maringá: Biblioteca Setorial da UEM. p.204.](#)
70. [Skara, C., Baatrup, E., 1993. Quantitative and histochemical demonstration of mercury deposits in the inner ear of trout, *Salmo trutta*, exposed to dietary methymercury and dissolved mercuric chloride. *Aquat. Toxicol. Amsterdam*, v.25, p. 55- 70.](#)

71. [Smith, E.A., Oehme, F.W., 1992. The Biological activity of glyphosate to plants and animals: A literature review. Vet. Hum. Toxicol, v. 34, p. 531-543.](#)
72. [Sprague, J.B., 1984. Lethal concentrations of copper and zinc for young Atlantic salmon. J. Fish. Res. Board Can. 21\(1\): 17-26.](#)
73. [Swedmark, M., Braaten, B., Emanuelsson, E., Granmo, A., 1971. Biological effects of surface active agents on marine animals. Mar. Biol. 9:183-201.](#)
74. [Szarek, J., Siwick, A., Andrzejewska, A., Terech-Majewska, E., Banaszkiwics, T., 2000. Effects of the herbicide Roundup TM on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp \(*Cyprinus carpio*\). Mar. Environ. Res. 50, 236–266.](#)
75. [Takashima, F., Hibiya, T., 1995. An Atlas of Fish Histology Normal and Pathological Features, 2nd ed. Gustav Fisher Verlag, Kodansha.](#)
76. [Tsui, M.T.K., Chu, L.M., 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. Chemosphere 52, 1189–1197.](#)
77. [Tsui, M.T.K., Chu, L.M., 2004. Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: aqueous and sediment porewater exposures. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 46, 316–323.](#)
78. Van Dyk, J.C., 2005. Fish histopathology as a monitoring tool for aquatic health: a preliminary investigation. (Dissertação Mestrado) - University of Johannesburg, Johannesburg.
79. [Vertemati, M., Vizzotto, L., Moscheni, C., Dhillon, A., Dhillon, A., Quaglia, A., 2008. Morphometric model to minimize subjectivity in the histological assessment of hepatocellular carcinoma and its precursors in cirrhosis. Micr. Res. and Tech., v. 71, August, Iss. 8, pages 606-613.](#)

80. [Williams, G.M., Kroes, R., Munrot, I.C., 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. Regul. Toxicol. Pharmacol. 31, 117–165.](#)
81. [World Health Organization \(WHO\), 1994. Glyphosate: Environ. Health Criteria 159. Genève.](#)

**Artigo 2 - EFEITO MUTAGÊNICO E GENOTÓXICO DO HERBICIDA
ROUNDUP TRANSORB[®] EM CÉLULAS BRANQUIAIS E ERITRÓCITOS DO**

Poecilia reticulata

**JOSÉ DE SOUZA FILHO¹; CAIO CESAR NEVES SOUSA²; CRISTIANE TORRES DE MIRANDA³;
SIMONE MARIA TEIXEIRA DE SABÓIA-MORAIS⁴ E CLÁUDIO CARLOS DA SILVA⁵**

RESUMO: Os efeitos de substâncias mutagênicas e genotóxicas sobre o genoma de peixes tem sido objeto de muitos estudos, sobretudo daqueles que buscam estabelecer a resposta dos genes aos estímulos ambientais. O presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo sobre mutagenicidade e genotoxicidade em peixes da espécie *Poecilia reticulata*, pela exposição ao Roundup Transorb[®], utilizando o Teste de Micronúcleo (MN) e

Ensaio Cometa (EC). Os eritrócitos foram obtidos pela centrifugação das brânquias sendo adicionado soro fetal bovino ao precipitado, e posteriormente gotejado sobre as lâminas para realizar o esfregaço e eletroforese. Foram utilizados quinze peixes para cada tratamento nas seguintes concentrações: 0µl/L; 1.41µl/L; 2.83µl/L; 4.24µl/L e 5.65µl/L em 24h de exposição. Para a análise das lâminas, foram contadas 75000 células e estipulada a frequência de ocorrência de Alterações Morfológicas Nucleares (AMNs). No Teste MN e EC foi possível detectar efeitos mutagênicos e genotóxicos significativos nos eritrócitos e células da brânquia, ocorrendo um aumento gradual no número de células com AMNs e com danos ao DNA de acordo com aumento das concentrações, indicando um efeito concentração-dependente. Estes resultados sugerem que a formulação do herbicida testada apresentou ação genotóxica e mutagênica para os MN e EC, sendo os mesmos bastante eficientes em detectar níveis baixos de contaminação.

PALAVRAS-CHAVE: Peixes; eritrócitos; citogenética, brânquias e toxicidade.

ABSTRACT: The effects of mutagenics and genotoxics substances on the fish genome has been the subject of many studies, especially those that seek to establish the response of genes to environmental stimuli. This study aimed to conduct a study on mutagenicity and genotoxicity in fish *Poecilia reticulata*, by exposure to Roundup Transorb[®] using the micronucleus test (MN) and Comet assay. Erythrocytes were obtained by centrifugation of the gills being added fetal calf serum to precipitate, and then dripped onto wafers to make the smear and electrophoresis. Fifteen fish were used for each treatment at the following concentrations: 0µl / L, 1.41µl/L, 2.83 µl/L, 4.24 µl/L and 5.65µl/L at 24 hours of exposure. For the analysis of slides, 75000 cells were counted and agreed to the frequency of occurrence of Nuclear Morphological Changes (AMNs). In the MN test and Comet assay could detect significant genotoxic and mutagenic effects in erythrocytes and gill cells, indicating a gradual increase in the number of cells with AMNs and ADN damage under higher concentrations, indicating a concentration-dependent effect. These results suggest that the formulation of the herbicide tested showed

genotoxicity and mutagenicity tests for the MN and Comet assay, and they are very efficient in detecting low levels of contamination.

KEY WORDS: Fish; erythrocytes; cytogenetics, gills and toxicity.

¹ Biólogo, bolsistas de mestrado do CNPq PPGBio-ICB / UFG.

Correspondência para autor: Samambaia, Campus II ICB-IV Laboratório de Comportamento Celular, 74001-970, Goiânia-GO, Brasil Tel.: +55 62 3521 1485 Email: souzabiocelufg@gmail.com

² Bolsista de Iniciação Científica – PIBIC/PUC-Goiás.

³ Bióloga, Mestranda em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos pela Universidade de Brasília- UnB

⁴ Professora Doutora, Associado II do Departamento de Morfologia e, Pesquisadora Coordenadora do Laboratório de Comportamento Celular – ICB - UFG.

⁵ Professor Doutor do Departamento de Biologia da PUC-Goiás e pesquisador Associado do Núcleo de Pesquisa REPLICON/PUC-Goiás.

1-INTRODUÇÃO

No Brasil, os testes de ecogenotoxicidade têm sido empregados desde a década de 80, para avaliações ambientais (Valent, 1998). Também nos últimos 30 anos, tem-se verificado que os testes de toxicidade com organismos aquáticos constituem uma ferramenta efetiva para avaliação de efeitos de poluentes sobre os organismos vivos, para avaliação de risco/periculosidade de agentes químicos, no monitoramento da qualidade da água e no estabelecimento de limites permissíveis de lançamento de efluentes líquidos nos corpos hídricos (Zagatto, 1998).

É de suma importância que se procure estabelecer protocolos mais eficientes e rápidos para uma análise *in situ* sobre as condições ambientais aquáticas, buscando a melhoria destes ambientes para manutenção de sua biota. A relevância destas análises está em dar destaque aos dados coletados no ambiente e demonstrar ação danosa de substâncias tóxicas, os

quais persistem no organismo promovendo alterações intensas que são detectadas mesmo após um período de ausência do agente interveniente sobre a amostra (Shugart *et al.*, 1989).

O glifosato (organofosforado) é um herbicida que foi introduzido no controle de ervas-daninhas no início dos anos 70. Ele é amplamente empregado em cultivos de soja, cana-de-açúcar e citrus no Centro-Oeste (Oliveira-Filho & Lima, 2002), sendo realizada sua aplicação nas folhas com finalidade disseccante. Atualmente o glifosato possui várias formulações comerciais registradas em mais de 100 países (Williams *et al.*, 2000; Mañas *et al.*, 2009).

Os herbicidas a base de glifosato ao contrário do que indicavam as pesquisas, apresentam maior mobilidade e persistência em ambientes aquáticos (Kolpin *et al.*, 2006; Mañas *et al.*, 2009). Opiniões sobre a segurança do glifosato, herbicida Roundup® foi estudado pelos seguintes órgãos: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) e Organização Mundial da Saúde (OMS), que concluíram que não há indicação de qualquer problema de saúde em humanos (EPA, 1993; WOH, 1994; Williams *et al.*, 2000; Mañas *et al.*, 2009). No entanto, pesquisas recentes indicam que este herbicida pode não ser tão seguro quanto se pensava anteriormente (Isenring, 2004; Çağlar & Kolankaya, 2008; Mañas *et al.*, 2009). Dados e relatos substanciados sugerem que há ligação entre a pulverização aérea de glifosato adicionado a solução de surfactantes promovendo alterações genéticas em uma população de agricultores do Equador, fronteira com a Colômbia (Paz-y-Miño *et al.*, 2007; Mañas *et al.*, 2009).

Estudos demonstram o aumento de incidência de câncer em pessoas que utilizam e são expostos aos herbicidas a base de glifosato (De Roos *et al.*, 2005; Mañas *et al.*, 2009). Apesar da ampla utilização desse herbicida não existe definição clara a respeito de sua capacidade genotóxica e a literatura apresenta resultados contraditórios. Provavelmente, isso se deve pelos poucos estudos investigativos de testes genotóxicos e mutagênicos realizados e pelas diferenças de metodologias empregadas.

As análises de genotoxicidade são realizadas em bioindicadores de toxicidade (peixes, mamíferos, répteis, anfíbios e invertebrados), com o intuito de se investigar e comprovar os efeitos adversos, que podem ser definidos como: “qualquer resposta biológica, ao nível do indivíduo ou a um nível inferior, a um ambiente químico, que traduz a exposição a esse ambiente”; alterações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais (W.H.O., 1993; Capela, 2001).

Frequentemente são utilizados peixes como organismos teste para estudos e ensaios de toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade para avaliar a qualidade da água. Como exemplo, a nível celular o teste do micronúcleo (MN) aplicado em várias espécies de peixes está entre as mais difundidas avaliações de genotoxicidade (Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Hayashi *et al.*, 1998).

O *Poecilia reticulata* (guppy) é um peixe eurialino testado como um potencial modelo bioindicador (Bolis *et al.*, 2001). O gênero *P. reticulata* dentre seus representantes o *P. vivipara* possui grande capacidade de alterar sua biologia funcional, tecidual e celular em processo de rápida adaptação frente a agentes adversos no meio, tais como: salinidade (Sabóia-Morais *et al.*, 1996), metais pesados (Araujo *et al.*, 2001), flúor (Breseghelo *et al.*, 2004) e extratos de plantas do Cerrado (Silva *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2003; Motter *et al.*, 2004). Dentre suas características naturais, destacam-se: é espécime nativo do clima

neotropical; é peixe de pequeno porte, portanto de fácil manuseio em aquários, assim como para coleta e processamento de materiais para análise como lâminas de órgãos e tecidos; é excelente biomonitor de contaminação do ambiente aquático, pequenos córregos e riachos que, normalmente, estão presentes em áreas agrícolas ou em áreas colonizadas por macrófitas (Kiss *et al.*, 2003).

Atualmente as metodologias utilizadas para avaliar danos causados por substâncias tóxicas nos organismos é o teste de MN, inicialmente aplicado em eritrócitos de medula óssea de camundongos (Schimid, 1976). Esse tipo de teste tem sido recomendado para estudos de biomonitoramento ambiental, principalmente por sua capacidade de detectar agentes clastogênicos (quebra de cromossomos), e de agentes aneugênicos (segregação cromossômica anormal) requerendo, no entanto, proliferação celular para a observação do biomarcador de efeito. (Fenech, 2000; Ribeiro *et al.*, 2003).

Há outras maneiras de avaliação da genotoxicidade. Dentre elas está o Ensaio Cometa (EC/eletroforese em gel de células individuais), utilizado neste estudo para avaliação genotóxica do herbicida R. Transorb[®]. Esse teste possui ampla utilização para testar agentes genotóxicos de dejetos industriais, domésticos e agrícolas, que induzem danos e reparo no DNA, biomonitoramento de populações expostas a agentes citotóxicos, bem como em aplicações clínicas (White & Rasmussen, 1998; Hartmann *et al.*, 2003). As vantagens do EC incluem a sua simplicidade, rápido desempenho e sua alta sensibilidade para vários tipos de danos no DNA (Da Silva *et al.*, 2003; Gonçalves *et al.*, 2003), com capacidade de detectar lesões pré-mutagênicas (Kammann *et al.*, 2001).

Torna-se assim, mais vantajoso a utilização de dois testes para investigação da toxicidade genética, onde o teste MN avalia a habilidade da substância teste em induzir dano cromossômico estrutural e/ou numérico (potencial mutagênico) e o EC avalia grau de dano na molécula do DNA (potencial genotóxico).

O presente trabalho se deu pela falta de informações sobre a natureza mutagênica e genotóxica do herbicida R. Transorb[®] (glifosato) em organismos aquáticos, especialmente dados relativos aos seus efeitos sobre peixes. Este estudo tem o objetivo de investigar os efeitos mutagênicos e genotóxicos do herbicida em questão, utilizando o MN, Alterações Morfológicas Nucleares (AMNs) e EC em células branquiais e eritrócitos expostos *in vivo* em espécimes do *P. reticulata*, bem como o desenvolvimento de um protocolo de biomonitoramento.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Químicos

Formulação R. Transorb[®] (64,8% glifosato) foi obtido no comércio local, Casa da Lavoura, Goiânia-Go, Brasil. R. Transorb[®] é um herbicida bastante solúvel em água, contém sal de isopropilamina de glifosato [N-(fosfometil glicina), C₃H₈NO₅P] como seu ingrediente ativo (i.a) (*Chemical Abstracts Service-CAS*, 2010 No. 70901-12-1). R. Transorb[®] é produzido e fabricado pela Monsanto Company.

Dimetilsulfóxido (DMSO; CAS 67-68-5) foi adquirido pela Sigma-Aldrich. Agarose de baixo ponto de fusão (LMP; CAS 9012-36-6, A 9414), ponto de fusão normal agarose (NMP; CAS 9012-36-6, A 9539), brometo de etídio (CAS 1239-45-8), os demais reagentes utilizados no EC e teste MN foram também fornecidos pela Sigma-Aldrich.

2.2- Bioensaios com o modelo *Poecilia reticulata* (Peters, 1860)

Para este presente estudo, foi realizado bioensaio com exemplares adultos peixes da espécie *P. reticulata* (0.293±0.13g, 3.58±1.1cm) coletados na Escola de Agronomia do Campus II da Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia-Goiás, no mês de outubro de 2009 (Latitude 16.40S e Longitude 49.16W). Sendo coletados 100 exemplares e aclimatados por quinze dias em um sistema estático contendo 15 litros de água proveniente do tanque de coleta, com aeração constante e temperatura ambiente de 24±2°C e pH 7,3±0.3. Para os bioensaios foram selecionados 15 peixes para cada concentração mais o controle negativo.

As concentrações foram obtidas a partir da CL₅₀ (5.65µl/L) investigada e determinada através de exposição aguda em sistema estático, realizada no modelo biológico preditivo guppy. As concentrações administradas foram de 1.41, 2.83, 4.24 e 5.65µl/L do herbicida R. Transorb[®]. As brânquias foram coletadas para o Teste do MN e EC após tratamento agudo de 24h.

As concentrações utilizadas nos bioensaios foram determinadas por ensaios em lotes de 18 animais em triplicata expostos ao produto para cálculo da CL_{50, 96h} (Souza-Filho, Rocha & Sabóia-Morais, 2009).

Os bioensaios seguiram as recomendações da Organização para Cooperação do Desenvolvimento Econômica- OECD, através das orientações sugeridas para estudos toxicogênicos *in vitro* e *in vivo* na realização do EC e o guia de número 474, *Guideline for "Mammalian Erythrocyte Micronucleus tests"* (1997) (OECD, 1997), com adaptações para peixes. Os animais não foram alimentados antes da exposição por 24h e durante os bioensaios. Os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Hospital das Clínicas da UFG com parecer consubstanciado e protocolado sob nº126.

2.3-Teste Micronúcleo (MN) e Alterações Morfológicas Nucleares (AMNs)

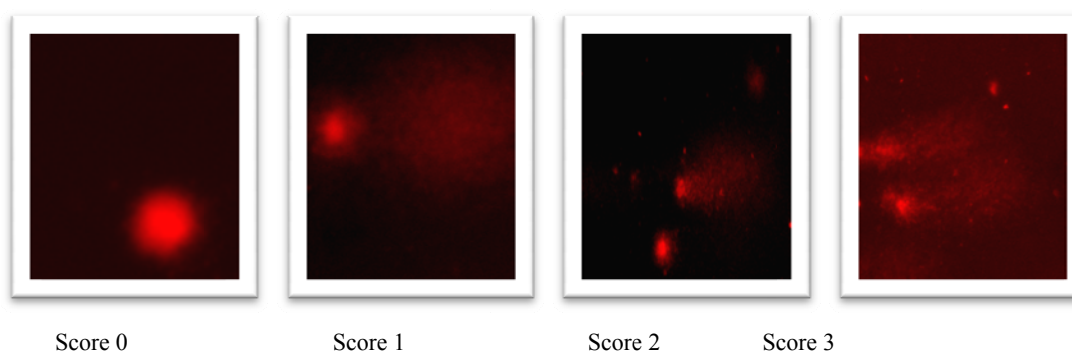
O teste MN e AMNs foram originalmente realizados em linfócitos de sangue periférico de espécies mamíferas (Schmid, 1976), no presente trabalho os bioensaios foram adaptados sofrendo modificações, pois foram realizados com eritrócitos de peixes (*P. reticulata*), sendo obtidos pela centrifugação das brânquias. Para cada animal foram preparados três esfregaços codificados (teste cego) para posterior análise. As lâminas foram coradas com Giemsa. Para cada esfregaço foram contados e analisados 1.000 eritrócitos através de *counter* manual. A frequência de MN e AMNs foram registradas com fotomicroscópio Olympus (B071 CX 40).

2.4- Ensaio Cometa (EC)

O EC alcalino foi realizado conforme descrito por Zamith (2001), com modificações exigidas pelas células branquiais do *P. reticulata*. Amostras de célula branquiais foram maceradas em 10% de soro fetal bovino e centrifugadas, posteriormente diluídas em agarose LMP (0.5%) pra a confecção das lâminas. Foram utilizadas lâminas previamente cobertas com agarose normal (LM; 1.5% p/v em tampão PBS). Em seguida, as lâminas foram imersas em tampão de lise por 24 h. Posteriormente incubadas em tampão alcalino, pré-resfriado entre 5-8°C e incubadas de maneira a cobrir as lâminas por 25-30 minutos. A eletroforese transcorreu a 25 V e 300 mA, por um período de 25 minutos, e posteriormente neutralizados em tampão (Tris 0.4 M).

Realizou-se uma análise cega de diferentes regiões da lâmina para manter a imparcialidade. Foram analisadas duas lâminas por indivíduo, com 50 cometas em cada lâmina, perfazendo 100 cometas por indivíduo para cada concentração, totalizando 1000 cometas por grupo (controle e tratados). Para a análise em microscópio de fluorescência, as lâminas foram coradas no momento da análise com brometo de Etídio. As imagens do cometa foram analisadas visualmente segundo protocolo descrito por Zamith (2001) e classificados em três classes de dano de acordo com tamanho da cauda e intensidade, denominadas por scores 0-3. score 0 corresponde aos cometas considerados intactos, sem danos causados pela exposição; score 1 cometas com danos mínimos; score 2 cometas com danos intensos; score 3 cometas com danos máximo. Os cometas obtidos na figura 1 ilustra os diferentes níveis de danos ao DNA, sendo utilizados como referência para classificação. Foram utilizados três índices nessa análise visual: média dos scores analisados, Índice de Danos Individuais (IDi) e Índice de Danos Total(Idx).

Figura 1. Scores estabelecidos para análise de dano ao DNA pelo Ensaio Cometa.



2.5- Análise Estatística

Os resultados obtidos foram expressos na forma de média, desvio padrão da média e erro padrão da média (EPM). Utilizou-se ANOVA seguido teste Tukey com nível de significância ($\alpha= 0.05$ e 0.01) para comparação dos grupos tratados em relação ao controle, apresentando as diferenças estatísticas entre os grupos e as alterações apresentadas (MN, AMNs e danos ao DNA), por meio do programa *PDF Word Count & Frequency Statistics Software 7.0*. Regressões lineares foram realizadas para determinar a existência de efeito dependente nas concentrações testadas frente às alterações manifestadas. Os gráficos e cálculos estatísticos foram realizados utilizando-se o programa *Microsoft Office Excel 2007*.

3 - RESULTADOS

A análise citogenética foi realizada em microscópio óptico em resoluções de 40x e de imersão (Figura 2), com contagem de 1.000 células por lâmina (Campana *et al.*, 1999; Grisolia, 2002). Os MNs foram identificados seguindo o critério proposto por Fenech *et al.*(2003).

Na avaliação do Teste MN comparou-se a frequência das AMNs encontradas em eritrócitos de peixes expostos nas concentrações de 1.41, 2.83, 4.24 e 5.65 μ l/L do herbicida R. Transorb[®] em relação ao controle negativo (sem herbicida), a frequência de AMNs e micronúcleos (MNs) aumentou ao longo das concentrações no período de 24h, apresentando valores significativos ($p<0.05$) entre controle e as maiores concentrações (2.83; 4.24 e 5.65 μ l/L). A correlação entre concentração e frequência absoluta das AMNs demonstrou ser diretamente proporcional ($R^2=0,9705$), quanto maior a concentração do herbicida maior a frequência de AMNs (Figura 3).

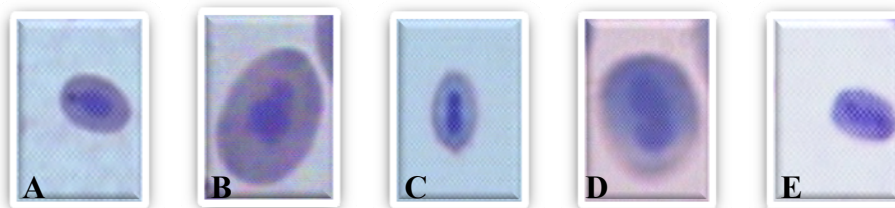


Figura 2. Alterações Morfológicas Nucleares nos eritrócitos do *Poecilia reticulata* expostos ao herbicida Roundup Transorb[®]. Legenda: (A) Micronúcleo; (B) Núcleo Lobado; (C) Núcleo Binucleado; (D) Núcleo em forma de Rim; (E) Núcleo segmentado.

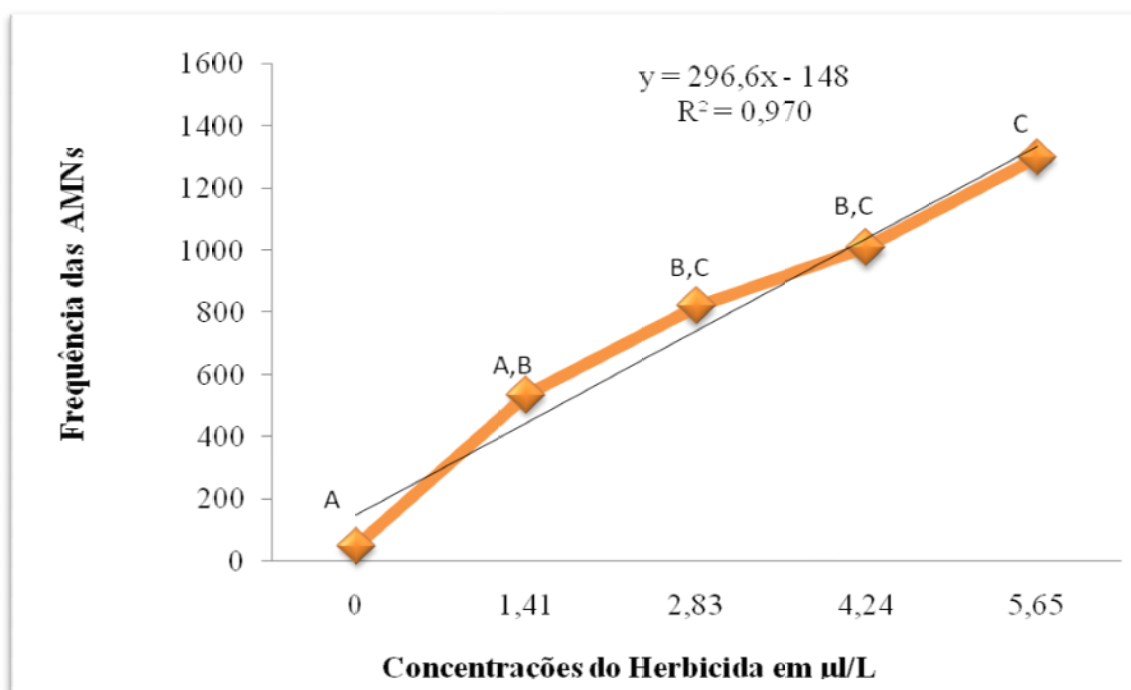


Figura 3. Frequência absoluta e cálculo do coeficiente de regressão linear das AMNs encontradas nos eritrócitos do *Poecilia reticulata* exposto ao herbicida Roundup Transorb[®] nas diferentes concentrações.

Letras diferentes em cada tratamento indicam diferença estatística ($p < 0.05$) entre as concentrações.

Na tabela 1, pode-se observar a quantidade de AMNs determinadas nos eritrócitos dos peixes expostos ao herbicida. Foram analisadas 3.000 células por animal obtendo 15.000 células por grupo, totalizando 75.000 células, ocorrendo diferença estatística na média das AMNs através da análise de variância (ANOVA) realizada nos grupos tratados. Essas diferenças foram determinadas através do teste Tukey ($p < 0.05$ e $p < 0.01$), ficando estabelecida entre controle e grupos tratados a partir da menor concentração testada em relação às seguintes alterações: Núcleo Lobado (L); Célula Binucleada (BN); Núcleo Segmentado (S); Micronúcleo (MN) e Núcleo em forma de Rim (K).

Tabela 1. Médias das Alterações Morfológicas Nucleares (AMNs) nos eritrócitos do *Poecilia reticulata* exposto ao herbicida Roundup Transorb[®] em tratamento agudo.

Tratamentos	Média das AMNs					Total de	
	L	BN	S	MN	K	Células Analisadas	Total AMNs
Controle	2±0.7	2±1.1	2±0.8	1±0.4	3±0.8	15000	49±1
1,41 µl/L	4±1.3	74±7.7 ^{*(**)}	8±3.6 [*]	8±1.3 ^{*(**)}	13±2.3 [*]	15000	536±27
24 h 2,83 µl/L	33±3.5 ^{*(**)}	88±4 ^{*(**)}	14±2.4 ^{*(**)}	4±1.1 [*]	25±5.9 ^{*(**)}	15000	820±30
4,24 µl/L	28±11.8 ^{*(**)}	111±12.3 ^{*(**)}	14±1.6 ^{*(**)}	11±1.5 ^{*(**)}	38±6.5 ^{*(**)}	15000	1008±38
5,65 µl/L	35±14.8 ^{*(**)}	142±13.2 ^{*(**)}	21±4.8 ^{*(**)}	22±2.6 ^{*(**)}	39±9.3 ^{*(**)}	15000	1296±48

*Diferença significativa ($p < 0.05$) e (***) altamente significativo ($p < 0.01$). Legenda: As letras da tabela significam: L=Núcleo Lobado; BN= Célula Binucleada; S=Núcleo Segmentado; MN=Micronúcleo; K= Núcleo em Forma de Rim.

As análises dos danos ocorridos ao DNA das células branquiais expostas ao herbicida R. Transorb® para o EC, constando as médias e desvios padrão dos scores 0; 1; 2 e 3 de danos para cada concentração, mais o controle negativo (0µl/L) estão demonstradas na tabela 2. Na figura 4, a média dos níveis de scores encontrados nas células do *P. reticulata* nas diferentes concentrações analisadas. No grupo controle é observado o maior número de células com ausência de danos ao DNA (score 0), apresentando níveis de danos ao DNA (scores 1, 2 e 3) não significativos. Nos grupos tratados (1.41; 2.83; 4.24 e 5.65µl/L) se observa um grande aumento dos níveis de scores 1, 2 e 3, ficando evidente os danos ocorridos nessas concentrações durante 24 h de tratamento. A maior média encontrada para score 3 foi na concentração 5.65 µl/L, sendo o score 3 o nível máximo de dano encontrado nas células. As maiores médias encontradas para score 2 foram nas concentrações de 1.41 e 2.83µl/L, evidenciando danos intensos já nas menores concentrações. O teste ANOVA e Tukey ($p < 0.05$) mostrou diferença significativa entre grupo controle e todos os grupos tratados com R. Transorb® para score 0. Para score 3 apresentou-se diferença entre grupo controle e tratados nas concentrações de 2.83; 4.24 e 5.65µl/L (Tabela 2).

O IDi e IDt calculados indicou crescente aumento de células danificadas nas concentrações testadas, indicando concentração-dependente aos danos encontrados no DNA das células branquias do *P. reticulata*, onde os maiores danos se apresentam nas concentrações de 2.83, 4.24 e 5.65µl/L do herbicida R. Transorb® (Tabela 3).

Tabela 2. Média dos Scores do Ensaio Cometa analisados nas diferentes concentrações do herbicida Roundup Transorb® em 24 h de exposição.

Tratamentos	Scores			
	0	1	2	3
Controle Negativo	285±12*	155±12	55±6	5±1
1.41µl/L	40±5	150±2	240±9	70±12
2.83µl/L	0±0	90±5	200±16	210±10*
4.24µl/L	5±4	135±11	145±14	200±12*
5.65µl/L	10±2	140±4	105±12	245±16*

*Apresenta diferença estatística ($p < 0.05$).

Tabela 3. Índice de danos individual (IDi) e total (IDt) células branquias do *Poecilia reticulata* expostos ao herbicida Roundup Transorb® pelo Ensaio Cometa.

Concentrações	Número de Células com danos ao DNA				Total	Σ IDindividual (=n°cometas*score)
	SCORES (IDindividual)					
	0	1	2	3		
0 µl/L	570	310	110	10	1000	560

1.41 µ/L	80	300	480	140	1000	1680
2.83 µ/L	0	180	400	420	1000	2240
4.24 µ/L	40	270	290	400	1000	2050
5.65 µ/L	20	280	210	490	1000	2170

Idtotal
 $(\sum Idind/3)$ 7253

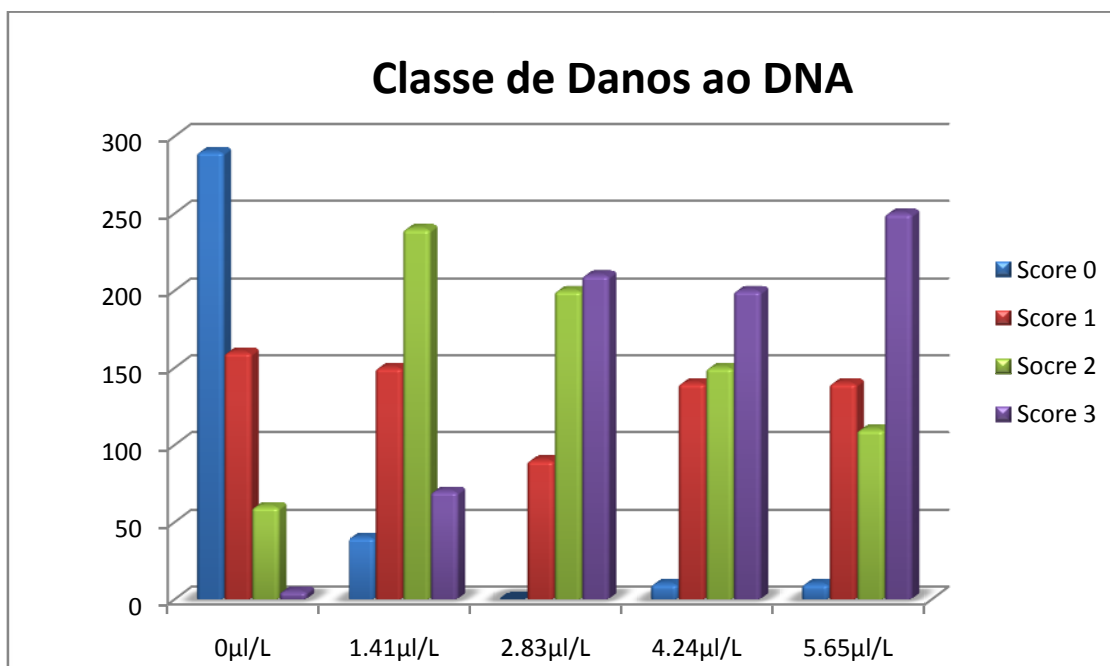


Figura 4. Média dos níveis de Scores encontrados em células branquiais do *Poecilia reticulata* pelo Ensaio Cometa em diferentes concentrações do herbicida Roundup Transorb®.

4-DISCUSSÃO

No presente estudo, o EC e Teste MN revelaram aumento significativo de danos ao DNA das células branquiais e AMNs nos eritrócitos dos animais expostos ao herbicida R. Transorb® durante a exposição de 24h. Isso sugere que o sistema de reparo nos peixes tenha atuado sobre o DNA das células branquiais e dos eritrócitos danificados pelo herbicida estudado, porém como as brânquias estão em contato direto com o agente tóxico presente na água, podem sofrer novas lesões de forma constante promovendo danos ao DNA e aos cromossomos, indicando maior dano nessas células. Dessa forma, é provável que a velocidade de danos ao DNA em novas células é maior que a capacidade das enzimas de atuarem no reparo das lesões ao DNA.

As investigações realizadas sobre o potencial genotóxico do glifosato puro e das formulações de produtos com sua base, como o produto comercial Roundup® demonstraram que há grande variação nas formulações testadas, em doses aplicadas, metodologia utilizada e organismo-teste estudado (Çavas *et al.*, 2007). Tal fato poderia explicar, em parte, os resultados controversos que têm sido publicados quanto aos efeitos destes produtos nos organismos testados. De acordo com alguns destes estudos, o glifosato e formulações à base deste agrotóxico podem tanto resultar na ausência (Wildeman *et al.*, 1982; Moriya *et al.*, 1983; Li & Long, 1988; Dimitrov *et al.*, 2006) quanto na incidência (Li & Long, 1988; Rank *et al.*, 1993;

Bolognesi *et al.*, 1997; Clements *et al.*, 1997; Lioi *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 2006; Poletta *et al.*, 2009) de danos ao material genético.

Diferentes estratégias, como reparo dos erros no genoma danificado, morte celular por citotoxicidade e/ou por apoptose e modulação da expressão gênica são utilizadas como resposta celular dos organismos para se defender de agentes genotóxicos (Moustacchi, 2000). Neste sentido, os danos apresentados demonstraram que todos esses processos considerados possam ter ocorrido. No entanto por serem as brânquias agentes primários de exposição a contaminantes ambientais estas ao serem expostas a concentrações crescentes da formulação testadas (R. Transorb[®]), tiveram células danificadas em curto espaço de tempo, na exposição aguda não demonstraram capacidade de reversibilidade. Contudo, há importante indicação da dose com respostas progressivamente aumentadas, sugerindo que em exposição a altas concentrações por período prolongado os animais terão dificuldades em reverter os efeitos danosos via mecanismo de reparo.

A biotransformação em peixes de alguns xenobióticos resulta frequentemente na produção de substâncias reativas intermediárias, altamente tóxicas, que podem ocasionar danos oxidativos ao DNA. Embora os diferentes organismos sejam dotados de um sistema de defesa intracelular e extracelular para proteger os tecidos contra a lesão oxidante provocada pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), se a velocidade de produção dos radicais livres exceder a capacidade dos mecanismos de defesa, ocorre a lesão celular (Saleha Banu *et al.*, 2001; Cadet *et al.*, 2003; Vanzella *et al.*, 2008) Simonato *et al.* (2008), atribui os danos genéticos observados para *Prochilodus lineatus*, submetidos à exposição aguda (6, 24 e 96h) e subcrônica da fração solúvel do óleo diesel, aos processos oxidativos resultantes da metabolização de hidrocarbonetos monoaromáticos e poliaromáticos presentes nesta fração do óleo.

Dessa forma, é possível supor que o aumento de danos no DNA de células branquiais de *P. reticulata*, detectado pelo EC para o tempo de 24h de exposição ao R. Transorb[®] podem estar relacionados à metabolização do mesmo, a qual poderia ter gerado EROs, que agiram sobre o DNA dos animais expostos, resultando nas lesões detectadas pelo EC. Neste caso, é provável que o intervalo de 24h não tenha sido suficiente para aumentar significativamente a expressão de enzimas responsáveis pela detoxificação de metabólitos do R. Transorb[®] é importante ressaltar que o mecanismo de reparo dos peixes é mais lento em relação às células de mamíferos (Espina & Weiss, 1995). Tal hipótese apóia-se nos resultados de Simonato *et al.* (2008) que observaram que a atividade da Glutathione -S-transferase (GST), uma enzima de ação anti-oxidante, no fígado de *P. lineatus* expostos à fração solúvel do óleo diesel somente aumentou após 96h. Neste sentido, os animais mais susceptíveis como jovens e senis poderiam ter alterações mais severas. Contudo, aqueles mais resistentes poderiam ser capazes de alterar seu comportamento celular produzindo maior quantidade de enzimas de ação anti-oxidante.

Resultados obtidos por alguns autores mostram que tanto o glifosato como a formulação Roundup[®] mostram algum grau de dano oxidativo ao DNA de alguns animais (Bolognesi *et al.*, 1997; Grisolia, 2002). Apresentam dados que demonstram no fígado de camundongos tratados intraperitonealmente com tais agentes, o glifosato resultou em efeito mais danoso após 24h de exposição. No rim, outro órgão-alvo de danos oxidativos, enquanto o glifosato não produziu aumento nos níveis de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), o tratamento com Roundup[®] resultou em aumento significativo de dano oxidativo ao DNA dos animais expostos (Grisolia, 2002).

Os dados de Lagiano e Martinez (2008), avaliando a toxicidade de diferentes concentrações do Roundup[®] para *Prochilodus lineatus*, observaram aumento significativo na atividade da catalase do fígado nos animais expostos a 10 mg L⁻¹ do herbicida, decorrente possivelmente da ativação das defesas anti-oxidantes dos peixes após exposição ao Roundup[®]. No mesmo estudo, os autores detectaram também alterações fisiológicas e histológicas nos animais expostos ao herbicida. Tais dados confirmam os resultados obtidos no presente trabalho com *P. reticulata* exposto ao herbicida R. Transorb[®], onde se determinou os níveis de danos ao DNA e alterações morfológicas nucleares se apresentaram bem evidentes nos grupos tratados nas maiores concentrações.

Resultados de Santos *et al.* (2010), observaram alterações celulares acentuadas nos hepatócitos conforme o aumento das concentrações experimentais do herbicida Roundup[®] em espécimes do *Poecilia vivipara*. A vacuolização dos hepatócitos estava presente em todos os grupos tratados, ficando evidente nos grupos de 25 e 35 µl/L. Também se observou

vasodilatação nos sinusóides e vasos de maior calibre, a congestão dos sinusóides e a presença de focos hemorrágicos também foram observadas em todos os grupos experimentais. Na histoarquitetura dos hepatócitos da espécie estuda apresentou-se com alterações bem acentuadas nos grupos de 25 e 35µl/L, onde ocorreram hipertrofia dos hepatócitos, focos eosinofílicos, núcleos picnóticos, fibrose, necrose e a presença de melanomacrófagos. Por métodos histoquímicos (PAS e PAS+amilase salivar) os grupos tratados apresentaram positividade, onde se indicou a presença de glicoprotéínas neutras e glicogênio. Os autores atribuem tais alterações devido à ação tóxica do herbicida Roundup®, indicando que o fígado é um dos principais órgãos-alvo deste contaminante e qualifica a espécie *P. vivipara* como sistema-modelo para avaliação dos efeitos tóxicos de contaminantes aquáticos. Esses resultados apóiam o presente trabalho confirmando o *P. reticulata* como modelo preditivo para realização de análises genotóxicas, bem como a potente ação tóxica das formulações a base de glifosato investiga e medida nas análises realizadas.

O Teste de MN em *P. reticulata* em exposição ao herbicida R. Transorb® manifestou diferenças significativas nos grupos tratados, onde se observou maior quantidade de AMNs nos grupos expostos nas maiores concentrações do herbicida. Também se observa evidente aumento na frequência de AMNs, sugerindo que a capacidade do teste de MN em detectar níveis baixos de contaminação é bastante eficiente. Isso revelou a ação mutagênica e genotóxica do herbicida R. Transorb® na menor concentração testada (1.41µl/L).

As quantidades de AMNs nos eritrócitos do *P. reticulata*, obtidas através das exposições com R. Transorb®. Registrou-se nos bioensaios que a quantidade de AMNs aumentou gradativamente com a elevação da concentração do herbicida, e o valor do coeficiente de regressão linear calculado para os dados obtidos ($R^2=0.993$) apóia este fato. Sendo assim, os efeitos mutagênicos e genotóxicos do herbicida estudado indicam concentração-dependente.

A menor concentração utilizada de R. Transorb® (1.41µl/L) é aproximadamente trezentos e cinquenta vezes inferior à admitida pelas normas brasileiras de potabilidade (500µg/L) expressas na Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde e aproximadamente 1,1 vezes menor do que a admitida pela Organização Mundial de Saúde (1.0 mg/L). Mas, estes valores são para o ingrediente ativo, glifosato e não para formulação vendida comercialmente.

Inúmeros testes têm sido desenvolvidos com biomarcadores de poluição aquática podendo ser potencialmente usados para análise de agentes químicos genotóxicos e mutagênicos. O Teste de MN e EC foram utilizados neste trabalho como ferramenta de análise mutagênica e genotóxica frente ao herbicida R. Transorb®.

Estudos com modelo tilápia (*Oreochromis niloticus*) utilizado como biomarcador nos Rios Itajaí-Açú e Itajaí-Mirim, no Estado de Santa Catarina-BR, averiguaram o nível de poluição por meio da mensuração de sua resistência à exposição pelo período de 10 dias, os dados do biomonitoramento foram obtidos pelo teste do MN (Bücker & Conceição, 2004). Teste do MN foi também empregado para a avaliação mutagênica comparativa entre peixes do Rio Madeira expostos ao mercúrio e peixes do Rio Solimões cuja área não estava poluída pelo mercúrio. Foram estudadas três espécies comercialmente importantes da bacia Amazônica (*Prochilodus nigricans*, Curimatã; *Mylossoma duriventris*, Pacu branco; e *Hoplias malabaricus*, Traíra). Por meio desse demonstrou-se ação genotóxica significativa quando comparado ao controle negativo (área não poluída por mercúrio) utilizando-se peixes do Rio Solimões (Porto *et al.*, 2005).

Segundo Sánchez-Galán *et al.* (1998), os peixes são considerados excelentes indicadores para a detecção de contaminação e poluição de recursos hídricos por substâncias genotóxicas. Eritrócitos de sangue periférico e órgãos alvos são muito comumente usados para a aplicação do Teste de MN, utilizando peixes como bioindicadores para avaliação ambiental

de contaminação genotoxicológica (Belpaeme, *et al.* 1996; Da Silva *et al.* 2002; Russo *et al.*, 2004; Buschini, *et al.*; 2004). Corroborar-se no presente estudo estes dados, uma vez que nossos resultados demonstram ser o Teste de MN e EC são ferramentas de análise mutagênica e genotóxica ao herbicida R. Transorb[®], postulando avaliação prévia para um biomonitoramento de mananciais através da utilização dos guppies como biomarcadores de efeito. Some-se a isso o fato de os resultados obtidos com contagem de MNs e AMNs indicarem diferenças significativas entre grupo tratado e controle. Evidenciando assim, as AMNs em todos os grupos expostos no período de 24h, já na menor concentração (1.41µl/L), sendo consideradas manifestações genotóxicas e mutagênicas induzidas pelo herbicida R. Transorb[®].

No trabalho desenvolvido por Guilherme *et al.* (2008) foi evidenciada a correlação entre a presença destas alterações e efeitos genotóxicos. Peixes da espécie *Liza aurata* coletados no verão e no inverno em águas contaminadas com mercúrio mostraram diferenças nestas frequências. Quando coletados no verão apresentavam frequência alta de eritrócitos policromáticos e número de AMNs elevadas. No inverno, o número de eritrócitos policromáticos decaiu bem como o número de AMNs. Sugerem os autores que no inverno a atividade hematopoética seria reduzida e ocorreria diminuição no número de eritrócitos com as AMNs. Isso não indica que os danos promovidos pelo mercúrio no DNA foram diminuídos sabendo-se que a concentração do mercúrio se manteve constante. Na maioria dos casos estudados, os efeitos genotóxicos podem estar relacionados também com tempo de exposição ao contaminante, sendo mais evidente nas primeiras horas de tratamento, isso permitiu evidenciar o grau de danos promovido nos eritrócitos. A avaliação realizada no presente estudo permitiu analisar e comparar as AMNs e os danos promovidos no DNA em tratamento agudo (24 h), indicando que os dois testes são importantes quando aplicados em conjunto dando maior credibilidade aos dados registrados.

Embora os testes para MN, já sejam bem estabelecidos, a padronização dos bioensaios foi feita para camundongos e ratos (mamíferos) (Schmid, 1976; George, Wootton & Gatehouse, 1990) e não em peixes. Desta maneira, o protocolo utilizado foi adaptado e modificado para que fossem obtidos dados adequados e compatíveis nas análises realizadas no presente estudo.

Nos peixes, o aparecimento dos MNs pode ser dependente da ação de produtos químicos clastogênicos ou aneugênicos (Macgregor *et al.*, 1987; Hayashi *et al.*, 1994). Embora às AMNs e MNs, quanto a suas origens, ainda não estejam completamente esclarecidas, vários resultados provenientes de estudos genotóxicos e mutagênicos sustenta à hipótese de que essas “alterações” ocorram devido aos eventos genotóxicos promovidos por substâncias químicas, dentre elas os herbicidas. A ausência ou baixa frequência de micronúcleos clássicos não significa necessariamente ausência de efeito genotóxico ou mutagênico de determinada substância tóxica, mas se deve ao pouco conhecimento dos processos de formação destas estruturas em peixes.

Nos resultados obtidos no presente estudo, o R. Transorb[®] exerceu papel aneugênico ou clastogênico sobre os eritrócitos e células branquiais do guppy, nas concentrações e no período de exposição testado. O comportamento genotóxico e mutagênico encontrado nestes ensaios são semelhantes aos encontrados nos trabalhos de Dallegre *et al.* (2003), obtidos na exposição de ratos ao Roundup[®] (glifosato), onde também foi evidenciada atuação citotóxica do produto (Gluszczak, *et al.*, 2006 e 2007). Foram observadas e registradas alterações em parâmetros metabólicos e enzimáticos em células de *Leporinus obtusidens* e *Rhamdia quelen*.

O Teste MN na detecção do dano ao genoma dos exemplares expostos ao herbicida ocorreu apresentando diferença significativa no período de 24h, denotando grande sensibilidade em avaliar e detectar danos ao DNA evidenciando os efeitos aneugênicos e clastogênicos na espécie *P. reticulata*.

Em pesquisas de avaliação comparada entre técnicas de MN e EC para detectar efeitos genotóxicos da radiação de Raios-X, He *et al.* (2000), encontraram maior sensibilidade para avaliação de dano ao DNA no EC que para o Teste MN. Isto pode indicar uma classificação de diferentes interpretações de avaliação genotoxicológica, ressaltando a necessidade e a importância de realizar combinação de bioensaios para melhor avaliação da mutagenicidade e

genotoxicidade desses agentes em baixas doses ou concentrações de efeitos. Neste sentido, a combinação dos testes MN e EC no presente estudo permitiram averiguar a ação mutagênica e genotóxica do herbicida R. Transorb[®] em células branquiais e eritrócitos dos guppies em tratamento agudo. Portanto, a associação de testes de fato é relevante porque resulta em dados substanciados permitindo conclusões bem fundamentadas.

EC é indicado para teste de biomonitoramento em níveis crônicos de exposição, podendo ser utilizado em inúmeras análises onde se podem avaliar células viáveis (Belpaeme *et al.*, 1996). Além das vantagens citadas e do relativo baixo custo, o EC difere de outros ensaios que detectam danos ao DNA por requerer células viáveis, mas não em divisão, permitindo, assim, sua aplicação a qualquer tipo de tecido dos quais células vivas possam ser obtidas (Collins *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 2003). Apesar da indicação do EC ser para níveis crônicos de exposição o presente estudo, o aplicou em testes agudos e obteve resultados significativos, supõe-se que se deva a quantitativo adequado de células branquiais viáveis.

No presente estudo, o EC apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle para grupo tratado nas maiores concentrações (2.83; 4.24 e 5.65µl/L) para os scores 0 e III durante o período de exposição, com aumento gradual de danos ao DNA nas concentrações crescentes, se comportando neste bioensaio, como concentração-dependente. O que adiciona dados indicativos e preditivos para o emprego de novos ensaios agudos na espécie estudada.

O IDi e IDt evidenciou de forma clara a ação genotóxica do herbicida R. Transob[®] nas células branquiais dos guppies, onde se observou danos crescentes (score 3) nas maiores concentrações. Esse comportamento confirma o padrão encontrado no teste MN, onde se registrou o maior número de alterações nos animais expostos nas maiores concentrações.

Os resultados obtidos no presente trabalho nos permitem inferir que as concentrações utilizadas foram inferiores àquelas permitidas na água para consumo humano por normas nacionais e internacionais. Tais concentrações classificadas como “seguras” para o consumo humano e que permitem o desenvolvimento e a manutenção da vida aquática, não deixa de causar preocupação e de levantar vários questionamentos. Se na maior concentração utilizada (5.65µl/L) nos bioensaios causou sérios danos nas células sanguíneas e branquiais dos peixes, como seria se fosse utilizada a concentração preconizada pelas normas nacionais (65µg/L). Tal concentração (5.65µl/L) é aproximadamente 1.41% apenas do limite máximo permitido pelas normas internacionais para águas potáveis. Os resultados encontrados no presente estudo sugerem diminuição considerável na atividade dos tecidos hematopoético e branquial nos peixes sob tais condições de exposição.

Os resultados obtidos se tornam mais preocupantes quando parte-se para dimensão em nível de populações naturais, que supostamente estão expostas a este produto com persistência superior a 120 dias no ambiente.

Foi observado ao longo dos bioensaios que para o EC e o Teste MN a detecção do dano ao genoma dos exemplares expostos nas concentrações crescentes do herbicida R.

Transorb[®] apresentou diferença significativa ao final dos testes, denotando grande sensibilidade em avaliar dano ao genoma.

O EC e o Teste MN demonstraram que houve efeito mutagênico e genotóxico significativo sobre os eritrócitos e células branquiais de *P. reticulata*, expostos nas concentrações de 1.41, 2.83, 4.24 e 5.65µl/L do herbicida R. Transorb[®].

Foi apresentado neste estudo o potencial mutagênico e genotóxico do herbicida R. Transorb[®] nos espécimes *P. reticulata*, mas sua forma e mecanismo de ação sobre o DNA e RNA são desconhecidos até o presente. Dessa forma se faz necessário uma investigação mais ampla a nível molecular permitindo descrição desde ativação de genes importantes na detoxificação do organismo, passando pelo processo de transcrição, produção de proteínas específicas até os metabólitos gerados. Aplicando técnicas de PCR em tempo real, microarranjo, eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamina para verificar tais mecanismos de ação no genoma do *P. reticulata*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Escola de Agronomia da UFG pelo fornecimento dos peixes. Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq bolsa de mestrado J Souza-Filho) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROCAD 2009). Os autores também agradecem aos colegas parceiros anônimos, que contribuíram com ricas sugestões e críticas, em especial aos colegas do Laboratório de Comportamento Celular-LCC/ICB/UFG e ao Núcleo de Pesquisa Replicon/PUC-Goiás pela pareceria e colaboração.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D., Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research – Genetic Toxicology*. v. 343 (1995), p. 121-135.
2. Araújo, E.J.A., Efeitos de poluentes químicos cumulativos e mutagênicos durante o desenvolvimento ontogênico de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). *Acta Scientiarum*, 23 (2001) (2): 391-399
3. Belpaeme, K., Delbeke, K., Zhu, L., Kirsch-Volders, M., Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline Comet assay. *Mutag.* (1996) N°11. p. 485-492.
4. Bolis, C.L., Piccolella, M., Dalla Valle, A.Z., Rankin, J.C., Fish as model in pharmacological and biological research. *Pharmac. Resear.*, 44 (2001) (4): 265-280.
5. Bolognesi, C., Bonatti, S., Degan, P., Gallerani, E., Peluso, M., Rabboni, R., Roggieri, P., Abbondandolo, A., Genotoxic Activity of Glyphosate and Its Technical Formulation Roundup[®], *Journal of Agriculture and Food Chemistry* (1997) v.45p. 1957-1962

6. Breseghelo, L., Cardoso, M.P., Borges-de-Oliveira, R., Bezerra, J.C.B., Ferreira, M., Sabóia-Morais, S.M.T., Effects of sodium fluoride in gills epithelium. *Brasilian Jour. of Veter. Rese.*, 40 (2004), In Press.
7. Bücken, A., Conceição, M.B., Avaliação da genotoxicidade por frequência de Micronúcleos em eritrócitos de tilápias expostas às águas do Rio Itajaí-Açú e Itajaí-Mirim, Santa Catarina-Brasil. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA. Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia – SETAC Brasil. Florianópolis, SC. (2004) Vol.2. Livro de Resumos. p 109-110.
8. Buschini, A., Martino, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Poli, P., Rossi, C., Santoro, M., Dörr, A.J.M., Rizzoni, M., Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutat. Res.*, (2004) N° 557, p 119-129.
9. Cadet, J., Douki, T., Gasparutto D., Luc Ravanat, J., 2003. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features, *Mutat. Res.* (2003) v. 531 p. 5–23.
10. Çaglar, S., Kolankaya, D., The effect of sub-acute and subchronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* (2008), 25, 57–62.
11. Campana, M.A., Panzeri, A.M., Moreno, V.J., Dulout, F.N., Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. *Mutat. Res.*, (1999) n°438, p.155-161.
12. Capela, F.S., Avaliação de Biomarcadores. Dept. de Biologia, Universidade de Évora, (2001)
13. CAS – Division of the American Chemical Society. Divisão de Registro de Substâncias químicas na CAS. [online] 2010. Disponível em: www.cas.org/proucts/index.html. Acessado em: 12/12/2010.

14. Çavas, T., Konen, S., Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay, *Mutag.* (2007), v. 22 p. 263-268.
15. Clements, C., Ralph, S., Petras, M., Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) *Envir. and Mol. Mutag.*, (1997) v.29, p. 277-288.
16. Collins, A.R., Dobson, V.L., Dusinska, M., Kennedy, G., Stetina, R., The comet assay: what can it tell us? *Mutat. Res.*, Amsterdam, (1997), v. 375, p. 183-193.
17. Da Silva, J., Herrmann, S.M., Heuser, V., Peres, W., Possa Marroni, N., González-Gallego, J., Erdtmann, B., Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food and Chem. Toxic.*, (2002), Nº 40, p. 941-947.
18. Da Silva, J., Erdtmann, B., Henriques, J.A.P., *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, (2003), v.1, p. 424.
19. Dallegrave, E., Matese, D.F., Coelho, R.S., Pereira, J.D., Dalsenter, P.R., Langeloh, A., The teratogenic potential of the herbicide glyphosate – Roundup® in Wistar rats. *Toxic. Lett.*, (2003), vol. 142, p. 45-52.
20. De Roos, A., Blair, A., Rusiecki, J., Hoppin, J., Svec, M., Dosemeci, M., Sandler, D., Alavanja, M., Cancer incidence among glyphosate- exposed pesticide applicators in the agricultural health study. *Environ. Heal. Persp.*, (2005), 113, 49–54.
21. Dimitrov, B.D., Gadeva, P.G., Benova, D.K., Bineva, M.V., Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup®, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems, *Mutagen.*, (2006), v. 21, p. 375–382.
22. Espina, N.G., Weiss, P., DNA repair in fish from polluted estuaries. *Marine Environ. Res.*, (1995), Kidlington, v. 39 p. 309-12.

23. Fenech, M., The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.*, (2000) nº 455, p.81-95.
24. Fenech, M., Cheng, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E., HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mut. Res.*, (2003), nº 534, 65-75p.
25. George, E., Wotton, A.K., Gatehouse, D.G., Micronucleous induction by azobenzene and 1, 2-dibromo-3-chloropropane in rat: Evaluation of a triple-dose protocol. *Mutat. Res.*, (1990), v. 234, p. 129-134.
26. Glusczak, L., Miron, D.D., Crestani, M., Fonseca, M.B., Pedron, F.A., Duarte, M.F., Vieira, V.L.P., Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotox. Env. Saf.*, (2006), v. 65, p. 237-241.
27. Glusczak, L., Miron, D.S., Moraes, B.S., Simões, R.R., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Loro, V.L., Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp. Biochem. Physiol*, (2007), v.146, p. 519-524.
28. Gonçalves, L.M., Conceição, M.B., Resgalla-Junior, C., Avaliação do potencial genotóxico das águas do Rio Itajaí-Açú e zona costeira sobre os hemócitos do mexilhão *Perna perna* através do Ensaio do Cometa, in: II Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental (2003), Itajaí, SC, Livro de Resumos. Vol.1, UNIVALI, p 384.
29. Grisolia, C.K., A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutat. Res.*, (2002), nº 518, p. 145-150.
30. Guilherme, S., Válega, M., Pereira, M.E., Santos, M.A., Pacheco, M., Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. *Ecotox. and Env. Saf.*, (2008), v. 70(3), p. 411-421.

- 31.** Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R., Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutag.*, (2003), vol. 18 (1), p. 45-51.
- 32.** Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., Ishidate, M., The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.*, (1994), v. 245, p. 245-249.
- 33.** Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K., Wada, K., Kinae, N., Saotomem, K., Tanaka, N., Takai, A., Sasaki, Y.F., Asano, N., Sofuni, T., Ojima, Y., Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutat. Res.*, (1998), n° 399, p. 125-133.
- 34.** He, J.L., Chen, W.L., Jin, L.F., Jin, H.Y., Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. *Mutat. Res.*, (2000), n° 469, p. 223-231.
- 35.** Isenring, R., Glyphosate. *Pestic. News*, (2004), 64, 20–21.
- 36.** Kamman, U., Bunke, M.H., Steinhart. The permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. *Mut. Res.*, Amsterdam, (20010, v. 498, p. 61-77.
- 37.** Kiss, I., Kováts, N., Szalay, T., Evaluation of some alternative guideline for risk assessment of various habitats. *Toxicol. Let.*, 2003, v.140-141, p.411-417.
- 38.** Kolpin, D., Thurman, M., Lee, E., Meyer, M., Furlong, E., Glassmeyer, S., Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Sci. Total Environ.* (2006), 354, 191–197.
- 39.** Langiano, V.C., Martinez. C.B.R., Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*, *Compar. Biochem. and Phy.*, (2008), v.147, p. 222-231.

40. Li, A.P., Long, T.J., An evaluation of the genotoxic potential of glyphosate, *Fundam. and appl. Tox.*, (1988), v. 10 p. 537–546.
41. Lioi, M.B., Scarfi, M.R., Santoro, A., Barbieri, R., Zeni, S., Salvemini, F., Berardino, D.I., Ursini, M.V., Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636, *Environm. and Mol. Mut.*, (1998), v. 32, p. 39–46.
42. Macgregor, J.T., Heddle, J.A., Hite, M., Margolin, B.H., Ramel, C., Salamone, M.F., Tice, R.R., Wild, D., Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat Res.*, (1987), v. 189, p. 103-112.
43. Mañas, F., Peralta, L., Raviolo, J., Ovando, H.G., Weyers, A., Ugnia, L., Cid, M.G., Larripa, I.N., Gorla, N., Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Environm. Tox. and Pharm.*, (2009), v. 28, Iss. 1, p. 37-41.
44. Moriya, M., Ohta, T., Watanabe, K., Miyazawa, T., Kato, K., Shirasu, Y., Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems. *Mutation Research*, (1983), v. 116, p.185– 216.
45. Motter, M.D.S., Silva, L.D., Borges-de-Oliveira, R., Yamada, A.T., Santos, S.C., Sabóia-Morais, S.M.T., Índice mitótico de células epiteliais das brânquias de guaru (*Poecilia vivipara*) tratadas por frações acetato de etila da folha e da casca do caule de pequi (*Caryocar brasiliensis*). *Brasilian Jour. of Veter. Res. And Anim. Scien.*, (2004) (4): 221-227.
46. Moustacchi, E., DNA damage and repair: consequences on dose-responses, *Mutation Research* (2000), v.464, p.35–40.
47. OECD-Organisation for Economic Co-operation and Development, Guideline for the testing of chemicals.Guideline for Mammalian Erythrocyte Micronucleus tests nº474. Paris, (1997).

48. Oliveira-Filho, E.C., Lima, J.E.F.W., Impacto da agricultura sobre os recursos hídricos na região do cerrado. Planaltina – DF, Embrapa Cerrados, (2002), 50 p.
49. Paz-Y-Miño, C., Sánchez, M.E., Arévalo, M., Muñoz, M.J., Witte, T., De La Carrera, G.O., Leone, P.E., Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. *Genet. Mol. Biol.* (2007), 30, 456–460.
50. Poletta, G.L., Larriera, A., Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mutat. Res.* 672 (2009), 95-102.
51. Porto, J.I.R., Araújo, C.S.O., Feldberg, E., Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test in three Amazonian fish species. *Envir. Res.*, (2005), nº 97, p. 287-292.
52. Rank, J., Jensen, A., Skov, B., Pedersen, L.H., Jensen, K., Genotoxicity testing of the herbicide Roundup® and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, *Salmonella* mutagenicity test, and *Allium cepa* anaphase–telophase test. *Mutat. Res.*, (1993), v. 300, p.29–36.
53. Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K., *Mutagênese Ambiental-Canoas*: Ed. ULBRA (2003), p. 356.
54. Russo, C., Lucia, R., Morescalchi, M.A., Stingo, V., Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotox. and Envir. Saf.*, (2004), nº 57, p. 168-174.
55. Sabóia-Morais, S.M.T., Hernandez Blazquez, F. J., Mota, D.L., Bittencourt A.M., Mucous cell types in the branquial epithelium of the euryhaline fish *Poecilia vivipara*. *Jour. Fish Biol.*, (1996), 49: 45-548.

- 56.** Saleha Banu, B., Danadevi, K., Rahaman, M.F., Ahuja, Y.R., Kaiser, J., Genotoxic effect of monocrotophos to sentinel species using comet assay, *Food and Chem. Tox.*, (2001), v.39, p. 361-366.
- 57.** Sánchez-Galán, S., Linde, A.R., Izquierdo, J.I., Garcia-Vásquez, E., Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. *Mutat. Res.*, (1998), nº 412, p. 219-225.
- 58.** Santos, A. P. R., Menezes-Faria, J.C.N., Rocha, T.L., Sabóia-Morais, S.M.T., Estudos Morfológico e Histoquímico da Hepatotoxicidade do Herbicida Rounup[®] no Fígado do Guaru (*Poecilia reticulata*), in: Registros da 62^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para Progresso da Ciência na Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN, Natal-RN 25-30 julho 2010.
- 59.** Schmid, W., The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection*. Ed. A. Hollaender. New York: Plenum Press (1976), 4. p.31-53.
- 60.** Shugart, L.R., Adams, S.M., Jiminez, B.D., Talmage, S.S., Mc Carthy, J.F., Biological markers to study exposure in animals and bioavailability of environmental contaminants. *Biolog. Monit. for Pestic. Exp. Amer. Chem. Soc.*, Washington-DC (1989).
- 61.** Silva, L.D., Rosa, L.V., Santos, S.C., Sabóia-Morais, S.M.T., Análise morfométrica do epitélio de revestimento do filamento branquial do guaru (*Poecilia vivipara*) exposto a fração do extrato da folha e casca do caule de pequi (*Caryocar brasiliensis*). *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, (2002), 6 (3):101-106.
- 62.** Silva, L.D., Nascimento, V., Santos, S.C., Morais, J.O.R., Sabóia-Morais S.M.T., Análise morfométrica das células do cloro de *Poecilia vivipara* expostas a frações da folha e da casca do caule de *Caryocar brasiliensis*. *Acta Scientiarum*, (2003), 25 (1): 195-201.

63. Simonato, J.D., Guedes, C.L.B., Martinez, C.B.R., Biochemical, Physiological, and Histological Changes in The Neotropical Fish *Prochilodus lineatus* exposed to Diesel oil. *Ecot. Env. Saf.*, (2008), 69 (1): 112-120.
64. Souza-Filho, J., Rocha, T.L., Sabóia-Morais S.M.T., Toxicidade Aguda do Roundup Transorb® para *Poecilia reticulata*. In: Barros SBM. Editora chefe. A multidisciplinaridade da toxicologia na proteção da vida. XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia 10 a 14 de outubro de 2009; Belo Horizonte, MG – MINASCENTRO: Braz. Jour. of Tox., ISSN 1415-2983, v.22 Supl.1, p. 9.
65. Torres, F.M., Urroz, M.B.G.C., Ovando, H.G., Anchordoqui, I.W., Vera, L.U., Hand, I.B.L., Abrate, N.G., La genotoxicidad del herbicida glifosato evaluada por el ensayo cometa y por la formación de micrunúcleus em ratones tratados. *Teoría* (2006), p. 53-60.
66. U.S. EPA, Re-registration Eligibility Decision (RED): Glyphosate.U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, (1993).
67. Valent, G.U., Histórico da importância e utilização dos testes de genotoxicidade no Brasil, in: Congresso de Ecotoxicologia. Itajaí-SC, 1998.
68. Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Colus, I.M.S., Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a eotropical fish species. *Mutat. Res.*, (2008), v.631, p. 36–43.
69. W.H.O., World Health Organization, International Program on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 155. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. Geneva, 1993.
70. W.H.O., World Health Organization, Glyphosate, Environm. Heal. Criteria 159. The Internal Programme on Chemical Safety (IPCS), WHO, Geneva, (1994), pp. 84–86.
71. White, A.P., Rasmussen, B.J., The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutat. Res.*, (1998), v. 410, p. 223-236.

72. Wildeman, A.G., Nazar, R.N., Significance of plant metabolism in the mutagenicity and toxicity of pesticides, *Jour. Can. of gen. and cyt.*, (1982), v. 24, p. 437–449.
73. Williams, G., Kroes, R., Munro, I., Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup® and its active ingredient, glyphosate for humans. *Regul. Toxicol. Pharm.*, (2000), 31, 117–165.
74. Zagatto, P.A., Significado dos estudos de validação de testes de toxicidade, in: *V Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia – Perspectivas da ecotoxicologia no Brasil*, Itajaí-SC, 1998.
75. Zamith, H.P.S., Ensaio Cometa. In: *Manual da Qualidade*. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2001, Seção 10, 61p.