



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais



**Efeitos comparativos de herbicidas à base de
glifosato sobre parâmetros oxidativos e qualidade
espermática no peixe estuarino *Jenynsia
multidentata***

Jessica Andrea Albañil Sánchez

Orientadora: Camila De Martinez Gaspar Martins

Rio Grande



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais



**Efeitos comparativos de herbicidas à base de
glifosato sobre parâmetros oxidativos e qualidade
espermática no peixe estuarino *Jenynsia
multidentata***

Aluno: Jessica Andrea Albañil Sánchez
Orientadora: Camila De Martinez Gaspar Martins

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande
2015

DEDICATÓRIA

A minha família, pelo apoio incondicional durante este processo enriquecedor longe de casa. Vocês são meu motor do dia a dia.

“Ningún árbol es fuerte sin continuos vientos; pues con ellos se fortifican sus raíces”

Lucio Anneo Séneca

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer principalmente a Deus pela vida e pelas bênçãos que dia a dia ele coloca na minha caminhada, pela maravilhosa família que ele me proporcionou e que foi meu motor constante para seguir de pé. Agradeço pelo apoio incondicional dos meus pais Alberto Albañil Picón e Eddy Sánchez Martínez que são as pessoas mais importantes na minha vida junto com meus irmãozinhos Stefany A. Albañil Sánchez e Daniel F. Albañil Sánchez os quais são peças fundamentais do meu ser. Os amo com todo meu coração!

Gostaria muito de agradecer a minha orientadora a Dra. Camila De Martinez Gaspar Martins que foi aquela pessoa que marcou minha vida brindando-me a oportunidade de crescer como pessoa e profissional, obrigada por oferecer-me seu apoio incondicional nestes dois maravilhosos anos no Brasil. Admiro muito seu trabalho e agradeço pela paciência, conhecimento transmitido, palavras de incentivo para continuar, orientações e contribuições para o desenvolvimento desta dissertação “Muchisimas gracias Profa Camila”.

Durante este processo de formação cognitivo, pessoal e cultural tive o privilegio de conhecer pessoas que muito ou pouco fizeram grandes mudanças em mim e que perdurarão sempre na minha vida. Marcela Brandão e Thiago Goulart duas pessoas que me acolheram e receberam no Rio grande com os braços abertos e que apesar das diferencias no idioma “que não foi uma limitante” me guiaram e acompanharam nesta caminhada distante das minhas raízes e fizeram que o tempo fora menos difícil para mim. Marcelita e Juba se converteram em aquelas pessoas incondicionais e confiáveis que proporcionavam paz e alegria a meus dias e me ensinaram realmente que é ser um AMIGO sem interesses, condições, nem prejuízos “siempre estarán en mi mente y corazón, gracias infintas”.

Carolina Kersting mais que uma amiga te tornaste no meu “ser alado”, Farides Lugo uma mulher maravilhosa que me ensino a ver a vida de outra forma. Vocês se converteram na minha família, “gracias por los consejos, risadas, cahetadas com jamón, noches de pepinillos, celebraciones internacionales, angustias existenciales, Pink Floyd, diarrea mental y demás momentos que pasamos juntas” só tenho mais uma coisa por dizer: “en Rio grande encuentre mi ojo de venado” Gracias totales!.

Agradeço as demais pessoas que fizeram parte da minha vida nestes dois anos no Rio grande, a senhora Nubia e suas doces conversas. Fabio Penna, Simone Maia, Xênya Garcia, Brisa Peres, Francesca Tavares e Virgiane Lima obrigada pelos inesquecíveis momentos compartilhados juntos. Janaina Camacho, Roberta Klein, Marta Klosterhoff e Fernanda Lopes, me sinto imensamente agradecida com vocês por estar sempre dispostas a me ajudar com um sorriso na sua cara e a me dar sua mão nos momentos que eu precisei de vocês no processo de desenvolvimento

deste trabalho. Michele Fenzke e Andrea Milanelli “minhas duas estagiarias” obrigada pela mão amiga nos laboratórios e momentos desesperantes de amostragem.

Obrigada pela conformação das parceiras compostas de grandes pessoas e profissionais que merecem de todo meu respeito. O Dr. Luis Carlos Romano, o Dr. Antonio Sergio Varela, a Dra. Carine Dahl Corcini, Dr. Ednei Gilberto Primel e Ms. Sergiane Caldas, Obrigada por aceitar, acolher e proporcionar todo seu apoio a meu projeto.

Indubitavelmente quero agradecer a CAPES pelo apoio financeiro, à organização dos estados americanos (OEA) por me dar a oportunidade de sair do meu país para fazer o mestrado no Brasil, à Universidade Federal do Rio Grande (FURG), ao Instituto de Ciências Biológicas (ICB) a ao Programa de Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais por me aceitarem como aspirante a mestrado. Gracias por el apoyo.

RESUMO

O uso de agrotóxicos vem aumentando nos últimos anos em decorrência da ampliação das áreas de plantio e presença de pragas mais resistentes. No Rio Grande do Sul / Brasil, as culturas de arroz são consideradas como as principais responsáveis pelo lançamento destes produtos nos corpos d'água, uma vez que o Estado concentra 61% da rizicultura irrigada do país. Dentre os herbicidas mais utilizados nestas plantações estão variações de Roundup[®], cujo princípio ativo é o glifosato. O modo de ação do glifosato como herbicida consiste na inibição da EPSPS, uma enzima-chave envolvida na biossíntese de amionoácidos essenciais de vegetais. Apesar disso, alguns estudos têm demonstrado que o glifosato pode atingir diferentes espécies animais, consideradas como espécies não-alvo. Tendo em vista o exposto, o objetivo do trabalho foi determinar, comparativamente possíveis efeitos que as formulações à base de glifosato, Roundup Original[®] (RO), Roundup Transorb[®] (RT) e Roundup WG[®] (RWG), possam estar causando à peixes que habitam regiões onde estes herbicidas são lançados. Para tanto, foi feito um teste agudo de mortalidade utilizando-se as concentrações de 0,5, 1 e 5 mg.L⁻¹ de glifosato, calculado a partir da sua concentração em cada fórmula, e escolheu-se aquela onde não houveram animais mortos para avaliação de parâmetros oxidativos e qualidade espermática de exemplares de *Jenynsia multidentata*. Apenas na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de glifosato não houve mortalidade em nenhuma formulação, entretanto, os resultados mostraram que acima desta, a RT provocou maior mortalidade. Quanto aos parâmetros oxidativos, houve um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) com consequente dano no fígado dos peixes. Esta situação foi mais evidenciada nos animais expostos ao RO que apresentaram aumento de EROs e redução na capacidade antioxidante total às 24 h de teste o que se refletiu num aumento expressivo de lipoperoxidação (LPO) às 96 h. Com relação aos parâmetros de qualidade espermática, apenas as análises de motilidade, funcionalidade mitocondrial e integridade de DNA dos espermatozoides apresentaram-se sob efeito dos herbicidas, sendo a motilidade o parâmetro mais sensível, pois foi inibida pelo glifosato nas 3 formulações experimentais (RO, RT e RWG) em 24 e 96 h de exposição. Assim, podemos concluir que os herbicidas à base de glifosato causam danos à espécie de peixe *J. multidentata*, induzindo o estresse oxidativo e influenciando negativamente na reprodução por afetar a qualidade espermática dos machos. No que compete à análise comparativa das formulações, a RT parece ser a mais tóxica por provocar maior mortalidade, no entanto, quando em concentração não letal e ambientalmente relevante como é o caso de 0,5 mg.L⁻¹ de glifosato, a RO, que contém maior quantidade dos chamados componentes “inertes”, provoca maior dano oxidativo, no entanto as 3 formulações influenciam igualmente a qualidade espermática.

Palavras-chave: herbicidas, glifosato, biomarcadores, peixe.

ABSTRACT

The use of pesticides has increased in recent years due to the expansion of planting areas and the presence of more resistant pests. In Rio Grande do Sul / Brazil, the rice crops are considered to be primarily responsible for the launch of these products in water bodies, since the state concentrates 61% of irrigated rice culture in the country. Among the most widely used herbicides in these plantations, are variations of Roundup®, whose active ingredient is glyphosate. The mode of action of glyphosate as an herbicide is the inhibition of EPSPS, a key enzyme involved in the biosynthesis of essential amino acids in plants. Nevertheless, some studies have shown that glyphosate can achieve different animal species, considered as non-target species. In the view of the above, the purpose of this study was to determine comparatively the effects of the glyphosate-based formulations, Roundup Original® (RO), Roundup Transorb® (RT) and Roundup WG® (RWG), may be causing in fish that inhabit these regions where herbicides are released. For that, an acute mortality test was performed with 0.5, 1 e 5 mg.L⁻¹ of glyphosate, calculated following its concentration in each formulation, and we chosen the one that did not cause mortalities in fish to evaluate oxidative parameters and sperm quality of *Jenynsia multidentitata*. Only at a concentration of 0.5 mg.L⁻¹ of glyphosate, there was no mortality in any formulation, however, the results showed that above this, RT caused higher mortality. As for the oxidative parameters, there was an imbalance between antioxidant defenses and the generation of reactive oxygen species (ROS) with consequent damage in fish liver. This situation was more evident in animals exposed to RO, where was observed an increase in ROS and a decrease in total antioxidant capacity at 24 h of test, that reflected in a significant increase in LPO at 96 h. With respect to sperm quality, only the motility analysis, mitochondrial functionality and DNA integrity of sperm are presented under the effect of herbicides, being motility the most sensitive parameter because it was inhibited by glyphosate in the 3 experimental formulations (RO RT and RWG) at 24 and 96 h of exposure. In summary, we conclude that the glyphosate-based herbicides cause damage to the fish species *J. multidentitata*, inducing oxidative stress and negatively influencing reproduction. As it is for the comparative analysis, the RT appears to be the most toxic since it causes increased mortality, however, when at non-lethal and environmentally relevant concentration such as 0.5 mg.L⁻¹ of glyphosate, RO which contains higher amounts of components called "inert", causes increased oxidative damage, but the 3 formulations affects sperm quality in the same intensity.

Key-words: herbicides, glyphosate, biomarkers, fish.

SUMÁRIO

1-	LISTA DE FIGURAS.....	9
2-	LISTA DE TABELAS.....	10
3-	INTRODUÇÃO GERAL.....	11
4-	OBJETIVOS.....	17
4.1-	OBJETIVO GERAL.....	17
4.2-	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
5-	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	18
6-	CAPÍTULO 1.....	25
6.1-	RESUMO.....	27
6.2-	INTRODUÇÃO.....	28
6.3-	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
6.3.1-	Coleta e aclimação dos animais.....	29
6.3.2-	Exposição dos peixes aos herbicidas.....	30
6.3.2.1-	Testes de mortalidade.....	30
6.3.2.2-	Testes para análises dos parâmetros oxidativos.....	31
6.3.2.3-	Testes para análises da qualidade espermática.....	31
6.3.3-	Análises bioquímicas.....	31
6.3.4-	Análises de qualidade espermática.....	32
6.3.5-	Análises de glifosato na água.....	34
6.3.6-	Análises dos dados.....	34
6.4-	RESULTADOS.....	34
6.5-	DISCUSSÃO.....	36
6.6-	CONCLUSÕES.....	40
6.7-	AGRADECIMENTOS.....	40
6.8-	REFERENCIAS.....	40
6.9-	LEGENDA PARA FIGURAS.....	46
7-	FIGURAS.....	48

1- LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL.

FIGURA 1. Fórmula estrutural do equivalente ácido de glifosato.....	12
FIGURA 2. Mapa de distribuição da <i>Jenynsia multidentata</i>	16
FIGURA 3. Ilustração do dimorfismo sexual da espécie <i>Jenynsia multidentata</i>	16
FIGURA 4. Ilustração da cópula de <i>Jenynsia multidentata</i>	17

Capítulo 1.

FIGURA 5. Gráfico de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	48
FIGURA 6. Gráfico de Capacidade Antioxidante Total (ACAP).....	49
FIGURA 7. Gráfico de Atividade da Glutathiona-S-Transferasa (GST)	50
FIGURA 8. Gráfico de dano por Lipoperoxidação (LPO).....	51
FIGURA 9. Gráfico de concentração de células espermáticas	52
FIGURA 10. Gráfico de motilidade espermática	53
FIGURA 11. Gráfico de funcionalidade mitocondrial.....	54
FIGURA 12. Gráfico de integridade da membrana espermática	55
FIGURA 13. Gráfico de integridade do DNA	56

2- LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Resultados do teste de mortalidade de <i>Jenynsia multidentata</i>	35
--	----

3- INTRODUÇÃO GERAL

Com o passar dos anos, pelo rápido desenvolvimento urbano e industrial com consequente aumento da população mundial, tornou-se necessário aumentar a produtividade agrícola. Por exemplo, em 2011, a população mundial foi estimada pela United Nations Fund for Population Activities (UNFPA, 2011) em 7 bilhões de pessoas, com previsão para 9 bilhões em 2050, sendo que os países em desenvolvimento têm sido os maiores contribuintes para este crescimento. Além do desafio de atender ao crescimento demográfico e demanda mundial por alimentos, a atividade agrícola também enfrenta crescentes pressões de impacto ambiental (FAO, 2010). Neste sentido, o uso de agrotóxicos vem aumentando cada vez mais na tentativa de defender as lavouras contra pragas, incluindo ervas daninhas (Bonacella, 1990). Os agrotóxicos são na sua maioria xenobióticos, ou seja, compostos estranhos aos organismos, capazes de provocar toxicidade (Castro Júnior *et al.*, 2006). Dentre os agrotóxicos mais comumente usados estão os herbicidas à base de glifosato, que tornaram-se imprescindíveis à agricultura, principalmente, após a implementação dos transgênicos resistentes à herbicidas (Cunha, 2005). No Brasil, o glifosato tem sido usado desde 1978, devido ao seu alto rendimento agrícola (Galli & Montezuma, 2005). De fato, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2010), em 2010 o Brasil foi responsável por cerca de 20% do mercado global de herbicidas e sua venda movimentou mais de US\$ 7 bilhões no ano. No Rio Grande do Sul, em especial, as culturas de arroz são consideradas como as principais responsáveis pelo lançamento do herbicida nos corpos d'água, uma vez que o Estado concentra 61% da rizicultura irrigada do país (SOSBAI, 2010). Atualmente, a legislação vigente delimita valores máximos de glifosato em 65 µg/L para água doce classe 1 e 280 µg/L para água doce classe 3 (resolução 357, CONAMA, 2005).

O glifosato (N-(fosfometil) glicina) (Fig. 1) é um herbicida pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas, pós-emergente, sistêmico, de amplo espectro, não seletivo, usado no combate de plantas indesejáveis na agricultura, na indústria, em áreas urbanas e aquáticas (Amarante Jr *et al.*, 2002; Galli & Montezuma, 2005; WHO, 2005). Este químico apresenta alta solubilidade em água, variando de 10.000 a 15.700 mg/L à 25°C e tem baixa pressão de vapor, o que sugere uma pequena perda para a atmosfera. A meia vida do glifosato em ambientes aquáticos é relatada na faixa de 7 a 14 dias (Giesy *et al.*, 2000). Sua propriedade herbicida foi descoberta pela empresa Monsanto em 1970 e sua primeira formulação comercial foi lançada nos Estados Unidos em 1974, com o nome comercial de Roundup (Galli & Montezuma, 2005). O Roundup[®] é composto basicamente por sal de isopropilamina (IPA), ácido equivalente de glifosato e surfactantes. Existem diferentes tipos de Roundup[®] e segundo suas bulas, estes tipos variam principalmente na proporção entre os compostos mencionados.

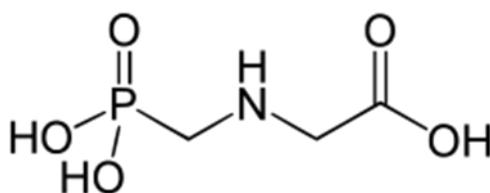


Fig. 1. Fórmula estrutural do equivalente ácido de glifosato N-(fosfonometil) glicina (Acesso em: 23 de março, 2015. Disponível em: <http://es.wikipedia.org/wiki/Glifosato>)

O glifosato lançado no ambiente expressa sua atividade mais eficientemente através do contato direto com as folhas, seguindo de translocação através do floema, para os tecidos meristêmicos. Por ser um derivado da glicina (um aminoácido essencial das plantas), a molécula de glifosato não é percebida como agressor potencial. Uma vez absorvido, ele inibe a atividade da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato síntese (EPSPS), que é catalisadora de uma das reações de síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais de vegetais: fenilalanina, tirosina e triptofano, os quais são precursores de outros produtos, como: lignina, alcalóides, flavonóides e ácidos benzóicos (Amarante Jr. *et al.*, 2002; Galli & Montezuma, 2005).

Levando-se em conta que o glifosato inibe uma via de biossíntese de aminoácidos aromáticos de vegetais, os mecanismos de ação deste composto deveriam ser exclusivo às plantas (Cerdeira *et al.*, 2007; Romano *et al.*, 2008; 2009; Williams *et al.*, 2000). No entanto, diversos trabalhos têm demonstrado que o glifosato e suas formulações podem ser tóxicos à diferentes espécies animais, consideradas, no caso, como organismos não-alvo. De fato, a toxicidade aguda do glifosato para animais é considerada baixa segundo dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005). Porém, segundo resultados de Tsui e Chu (2004), suas formulações, como o Roundup[®], são geralmente mais tóxicas para organismos aquáticos devido à adição do surfactante polietoxileno amina (POEA), utilizado para aumentar a eficácia do herbicida. O surfactante age sobre as membranas lipídicas, tornando-as mais permeáveis aos agrotóxicos.

Estudos mostram que as concentrações letais medianas (CL₅₀) do glifosato puro e do produto Roundup[®] variam para espécies de peixes, sendo na faixa de 22 à >1000 mg/L para o glifosato e de 4,2 à 52 mg/L para o Roundup[®]. Por exemplo, no Bluegill *Lepomis macrochirus*, a CL₅₀ para glifosato puro foi calculada em 120 mg/L e para Roundup[®] em 5,8 mg/L (ABC inc. 1978; 1982). No salmão *Oncorhynchus kisutch*, a CL₅₀ de glifosato e de Roundup[®] é de 36 e 22 mg/L, respectivamente (Mitchell *et al.*, 1987; Wan *et al.*, 1989). Além disso, outros trabalhos reportam que as CL₅₀ do formulado variam de acordo com a fase de vida e condições do teste. Por exemplo,

foram observados os seguintes valores de CL_{50} (96 h) de Roundup[®] para a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*: 0,01 mg/L para espécimes jovens e 0,03 mg/L para adultos (Jiraungkoorskul *et al.*, 2002).

O glifosato e suas diversas formulações são prejudiciais para a saúde de espécies não-alvo. Alterações histopatológicas em decorrência da exposição ao Roundup[®] em concentrações subletais foram evidenciadas em diferentes espécies de peixes, como no curimatá *Prochilodus lineatus* (Langiano & Martinez, 2008), no barrigudinho *Jenynsia multidentata* (Hued *et al.*, 2012), na carpa *Cyprinus carpio* exposta à concentração equivalente à 1 % (Neskovic *et al.*, 1996) e 2 % da sua CL_{50} (Szarek *et al.*, 2000), na tilápia do Nilo em *O. niloticus* (Jiraungkoorskul *et al.*, 2002; 2003) e no piavuçu *Leporinus macrocephalus* (Albinati *et al.*, 2009). Estas alterações estruturais foram evidenciadas, principalmente, na brânquia (hiperplasia lamelar, fusão lamelar, descamação do epitélio, etc) e no fígado (formação de vacúolos e alterações nucleares dos hepatócitos, concomitantemente à alterações de enzimas hepáticas).

Outro efeito descrito para o glifosato e Roundup[®] são alterações bioquímicas. Dentre estas, está a inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE), enzima que degrada o neurotransmissor acetilcolina liberado nas fendas sinápticas. De fato, a inibição da AChE é descrita como um dos mecanismos de toxicidade mais comuns de várias classes de pesticidas tanto para invertebrados quanto para vertebrados (Montserrat *et al.*, 2002) e já foi demonstrado que o glifosato puro inibe a AChE em tecidos musculares e cerebrais do mexilhão *Perna perna* e dos peixes *Danio rerio* e *J. multidentata*. Brevemente, a AChE, localizada nas membranas sinápticas, catalisa a hidrólise da acetilcolina (ACh) em ácido acético e colina, interrompendo a transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses dos neurônios colinérgicos do sistema nervoso central e periférico. A acetilcolina é um mediador químico secretado pelas células nervosas que ao atingir uma outra célula nervosa ou uma célula muscular, provoca, geralmente, resposta excitatória. A resposta excitatória traduz-se em impulsos nervosos, no caso de uma célula nervosa, ou em contração muscular, quando se trata de uma célula muscular. No entanto, no músculo cardíaco, esse neurotransmissor tem ação inibitória, reduzindo tanto a força quanto a frequência de contração do mesmo. Assim, quando a AChE é inibida, o mediador químico ACh age de forma intermitente na fenda sináptica e, conseqüentemente, observa-se um quadro de colapso nervoso e paralisia muscular que leva os indivíduos ao óbito (Guyton & Hall, 2006)

Continuando no âmbito das alterações bioquímicas, tem sido demonstrado que os herbicidas à base de glifosato também promovem o estresse oxidativo em diversas espécies de peixes (Jiraungkoorskul *et al.*, 2003; Glusczak *et al.*, 2007; Cericato, 2008; 2009; Langiano & Martinez, 2008; Lushchak, 2009; Modesto & Martinez, 2010a), situação esta que se caracteriza por um desbalanço entre agentes pró e antioxidantes. Na realidade, os agrotóxicos em geral são capazes de

estimular a geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) que são compostos resultantes da redução parcial do oxigênio molecular e, portanto, altamente reativos. Dentre as EROs encontram-se o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}), moléculas geradas naturalmente como consequência do metabolismo aeróbico e que, devido ao sistema de defesa antioxidante dos organismos, são mantidas dentro de limites fisiológicos (Halliwell & Gutteridge, 1990; Ribeiro *et al.*, 2005). Inclusive, em concentrações fisiológicas as EROs atuam como mensageiros de sinalização celular, no entanto, elas são capazes de reagir com diferentes biomoléculas como DNA, lipídeos e proteínas e, quando em excesso, podem interferir na respiração celular, inativar enzima, peroxidar lipídios de membranas, causar danos proteicos e de DNA, entre outros (Sies, 1991). Para neutralizar as EROs, os organismos utilizam componentes antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT, GPx, GST, etc) e não enzimáticos (GSH, Metalotioneína, Vitamina E, etc). A superóxido desmutase (SOD), pertence à primeira linha de defesa antioxidante e é responsável por catalisar a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio continua degradando-se em água e oxigênio pela ação da enzima catalase (CAT), que está presente principalmente nos peroxissomas. Por sua vez, a glutathiona peroxidase (GPx) metaboliza uma variedade de peróxidos incluindo peróxido de hidrogênio, e a glutathiona-S-transferase (GST) atua no processo de biotransformação, catalisando a conjugação de metabolitos e xenobióticos com a glutathiona reduzida (GSH). A GSH é um tripeptídeo que atua como o principal antioxidante na célula, conjugando elementos a fim de torná-los menos tóxicos, mais solúveis em água e mais fáceis de serem degradados e excretados (Hermes Lima, 2004; Carletti *et al.* 2008; Huber & Almeida, 2008). O fígado é o principal órgão de detoxificação dos animais, portanto, é muito comum que as EROs e os componentes antioxidantes sejam analisadas neste órgão.

Efeitos das formulações Roundup[®] e Roundup Transorb[®] sobre parâmetros oxidativos foram analisados no peixe neotropical *Prochilodus lineatus* por Modesto e Martinez (2010a; 2010b). As autoras observaram que os herbicidas, nas concentrações de 5 e 10 mg/L, são capazes de inibir as defesas antioxidantes e provocar peroxidação lipídica (LPO). Na mesma linha, Lushchak *et al.* (2009) observaram uma redução de 29 a 34% na atividade de GST no fígado do peixe dourado *Carassius auratus L.* após exposição ao Roundup[®] (96 h) e indicaram também situação de estresse oxidativo nestes animais não apenas induzida pela redução na atividade da GST, mas também por uma redução do complexo enzimático antioxidante total; no entanto, no trabalho não se observou dano lipídico (LPO) após exposição ao herbicida.

Na maioria das vezes, o lançamento dos herbicidas nas lavouras, incluindo as plantações de arroz, coincide com a época de reprodução dos peixes (Primel *et al.*, 2005) A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (US-EPA, 2002) (Environmental Protection Agency – United States) mostra que o glifosato puro e sua formulação comercial Roundup[®] podem afetar a

reprodução de animais, agindo como desregulador endócrino por interferir em diversos processos como na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios. Efeitos negativos no comportamento reprodutivo de peixes também foram verificados como, por exemplo, reduções no número de cópulas e baixo sucesso no comportamento de corte de machos de *J. multidentata* (Hued *et al.*, 2012). Outros resultados com peixes foram reportados por Harayashikia *et al.* (2013) e Lopes *et al* (2014) com relação à qualidade espermática dos animais. No primeiro trabalho, os autores mostraram que o barrigudinho *Poecilia vivipara* quando expostos (96 h) às concentrações de glifosato 0,13 e 0,70 mg/L na formulação comercial Roundup[®], apresentam baixa qualidade espermática com alterações na integridade da membrana plasmática, integridade do DNA, funcionalidade mitocondrial e redução de motilidade e período da motilidade dos espermatozoides. No segundo trabalho, Lopes *et al* (2014) mostram que machos de zebrafish *Danio rerio* expostos às concentrações de 5 e 10 mg/L de glifosato puro durante 24 e 96 h, expressam redução na motilidade e período de motilidade dos seus espermatozoides, além de alterações na funcionalidade mitocondrial e integridade de membrana e DNA.

Os parâmetros mencionados acima como os histológicos, bioquímicos e de qualidade espermática são usados como ferramentas para avaliar os efeitos da presença de contaminantes no ambiente e, por isso, podem ser considerados como biomarcadores. Por definição, biomarcadores são alterações biológicas relacionadas à exposição e/ou aos efeitos tóxicos de compostos químicos (Beeby, 2001). A análise de biomarcadores é uma maneira sensível de avaliar a qualidade ambiental e, portanto, de detectar efeitos danosos que os agrotóxicos podem estar provocando aos organismos não-alvos, quando presentes no meio.

Tendo em vista o exposto, o objetivo do trabalho foi determinar, comparativamente possíveis efeitos que as formulações à base de glifosato, Roundup Original[®], Roundup Transorb[®] e Roundup WG[®], possam estar causando à peixes (organismos não-alvos) que habitam regiões onde estes herbicidas são lançados, por meio de avaliações de parâmetros oxidativos e qualidade espermática em *J. multidentitata* expostas agudamente aos compostos. O peixe *J. multidentata* é uma espécie residente no estuário da Lagoa dos Patos e ocorre apenas na América do Sul, desde o estado do Rio Grande do Sul, no Brasil, até o Rio da Prata, na Argentina (Ferreira *et al.*, 2012) (Fig. 2). No Rio Grande do Sul, esta espécie vive associada às áreas agrícolas de plantações de arroz, recebendo, portanto, os agroquímicos utilizados nessas lavouras.



Fig. 2. Mapa de distribuição de *Jenynsia multidentata* (Δ) (Ferreira *et al.*, 2012).

A *J. multidentata* habita ambientes estuarinos e é resistente à variações de salinidade e temperatura (Mai, 2005), mas é mais abundante em períodos de seca e maior salinidade no estuário (Garcia *et al.*, 2004). Possui hábito alimentar onívoro, ingerindo vegetais de fundo (diatomáceas epífitas), restos de vegetais em decomposição (detritos), poliquetos e anfípodes (Mai *et al.*, 2006). Quanto às características anatômicas externas, esta espécie apresenta dimorfismo sexual, isso é, as fêmeas são maiores que os machos e caracterizam-se por ter o ventre dilatado pelas gestações contínuas (Garcia *et al.*, 2004). Porém, são considerados de pequeno tamanho: os machos chegam a atingir um comprimento longitudinal máximo de 6 cm e as fêmeas de 12 cm, mas ambos os sexos possuem ventre arredondado com coloração escura no dorso e clara no ventre e séries de manchas escuras, estreitas e curtas, ocorrem ao longo das laterais do corpo (Fig. 3).

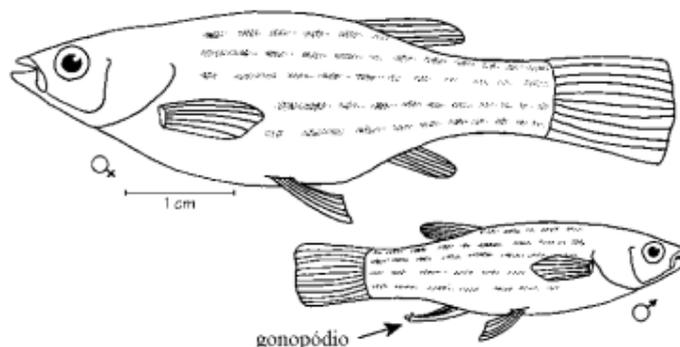


Fig. 3. Ilustração do peixe *Jenynsia multidentata* mostrando o dimorfismo sexual entre macho e fêmea da espécie. O indivíduo de maior comprimento representa a fêmea e de menor comprimento e com presença de gonopódio corresponde ao macho. (desenho obtido de Fischer (1998)).

As fêmeas de *J. multidentata* apresentam adaptações que envolvem o desenvolvimento dos embriões na cavidade ovariana e nos machos o gonopódio é tubular, associado ao duto espermático, formado a partir da modificação da nadadeira anal (Fialho, 2006). A *J. multidentata* é uma espécie vivípara com fecundação interna e gestação intraovárica matotrópica (Parenti, 1981; Schindler. & Vries., 1998; Siccardi, 1940). Durante a cópula, os machos introduzem o gonopódio nas fêmeas para fecundá-las (Fig. 4). Além disso, as fêmeas são capazes de manter espermatozóides vivos por um longo período, inclusive, por várias ninhadas sucessivas (Turner, 1957). A reprodução desta espécie ocorre em dois períodos do ano: um principal que é no fim da primavera e durante o verão e noutro período menos intenso que é no fim do inverno e início da primavera (Garcia *et al.*, 2004). Algumas destas características como, por exemplo, a viviparidade e desenvolvimento embrionário intrauterino, fazem da *J. multidentata* um modelo biológico interessante (Pinto *et al.*, 2015)



Fig. 4. Cópula de *Jenynsia. multidentata*, mostrado o gonopódio sendo introduzido na fêmea. (Acesso em: 24 de março, 2015. Disponível em: <http://aquafisher.org.ua/zhivorodyashhie/rod-jenynsia/>)

4- OBJETIVOS

4.1- OBJETIVO GERAL

Determinar possíveis efeitos de formulações à base de glifosato sobre parâmetros oxidativos e reprodutivos do peixe estuarino *Jenynsia multidentata* e, avaliar a capacidade de se utilizar tais parâmetros como biomarcadores da contaminação aquática por estes herbicidas.

4.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar parâmetros oxidativos como Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), capacidade antioxidante total (ACAP), atividade da GST (Glutathione – S – Transferase) e peroxidação lipídica em fígado de exemplares *J. multidentata* expostos agudamente às formulações de glifosato Roundup Original® e Roundup Transorb®;

- Avaliar a qualidade espermática de machos de *J. multidentata* expostos agudamente às formulações de glifosato Roundup Original[®], Roundup Transorb[®] e Roundup WG[®];
- Analisar comparativamente os herbicidas Roundup Original[®], Roundup Transorb[®] e Roundup WG[®] em termos de toxicidade para organismos não-alvos;
- Analisar a eficácia e potencialidade dos biomarcadores selecionados em *J. multidentata* para detectar e/ou quantificar possíveis danos ambientais provocados por atividades agrícolas.

5- REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ABC Inc. (1982) Dynamic 96-hour acute toxicity of Roundup to bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Monsanto study AB-82 – 033*. Analytical Biochemistry Laboratories, Inc., Columbia, MO.

ABC Inc. (1978). Acute toxicity of technical glyphosate to bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Monsanto unpublished study AB-78-123*. Analytical Biochemistry Laboratories, Inc., Columbia, MO.

Albinati, A.C.L., Moreira, E.L.T., Albinati, R.C.B., Carvalho, J.V., De Lira, A.D., Santos, G.B., Vidal, L.V.O. (2009). Biomarcadores histológicos – toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). *Bras. Med. Vet. Zootec.* , 61, 621-6 p.

Amarante Jr, O.P., Santos, T.C.R., Brito, N.M., Ribeiro, M.L. (2002). Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quím. Nova.* , 589-593 p.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (Março, 11 de 2010). Relatórios das empresas de agrotóxicos de produção, importação, comercialização e exportação. Brasília. Acesso em 23 de Fevereiro de 2015, disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>

Barry, H.; Jhon, G. (2007) Free radicals in biology and medicine, *Gutteridge 4th ed., New York* 207 - 220p.

Beeby, A. (2001). What do sentinels for? . *Environ. Pollut.* , 112:285-298 p.

- Bonacella, P.H . (1990). A poluição das águas. São paulo: Moderna 14 ed. (Coleção Desafios), 56p.
- Castro Júnior, J.V., Selbach, P.A., Sáchiaayub, M.A. (2006). Avaliação do efeito do herbicida glifosato na microbiota do solo. *Ecotoxicologia e meio ambiente*, 21-30 p.
- Cavalcante, D.G., C.B. Martinez and S. H. Sofia. (2008). Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat. Res.*, 41-46 p.
- Carletti E, Sulpizio M, Bocciarelli T, Boccio PD, Federici L & Di Ilio C. (2008). Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. *Aquat. Toxicol.* 90: 48-57p.
- Cerdeira, A.L., Gazziero, D.L.P., Duke, S.O., Matallo, M.B., Spadotto, C.A. (2007). Review of potential environmental impacts of transgenic glyphosato-resistant soybean in Brazil. *J. Environ. Sci. Health Part B: Pestic., Food Contam., Agric. Wastes.*, 42, 539 - 549 p.
- Cericato, L., Neto, J.G.M., Fagundes, M., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Finco, J. (2008). Cortisol response to acute stress in jundiá *Rhamdia quelen* acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.*, 148, 281 - 286 p.
- Cericato, L., Neto, J.G.M., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Rosa, J.G.S., Koakoski, G. (2009). Responsiveness of the interrenal tissue of Jundiá (*Rhamdia quelen*) to an in vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.*, 149, 363 - 367 p.
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. (17 de Março de 2005). *Resolução nº357*. Acesso em 22 de Fevereiro de 2015, disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res_conama_357_05.pdf
- Cunha, L. F. (2005). Transgênicos. revelação à vista. *Globo Rural*, 38 - 44 p.
- FAO - Food and Agriculture Organization (2010). *Statistical yearbook*, Rome: FAO. Acesso em 24 de fevereiro de 2015, disponível em: <http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e.PDF>

- Ferrari, A., Venturino, A., Péchen de D'Angelo, A.M., (2007). Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mukiss*. *Comp. Biochem. Physiol.* 146C: 308 – 313p.
- Ferreira, R.S., Monserrat, J.M., Ferreira, J.L.R., Kalb, A.C., Stegman, J., Bainy, A.C.D., Zanette, Z. (2012). Biomarkers of organic contaminaton in South America fish *Peocilia vivipara* and *Jenynsia multidentata*. *J. Environ. Toxicol Health. Part A.*, 75, 1023 – 1034p.
- Fialho, C. (2006). *Viviparous fishes: book review. Neotropic Ichthyology*, 4 (4): 462p.
- Fischer, L.G. (1999). Guia ilustrado para identificação dos peixes ósseos do estuário da Lagoa dos Patos, RS, Brasil. Monografia de Graduação em Oceanologia, *Fundação Universidade Federal do Rio Grande.*, 124 p.
- Galli, A. J. B.; Montezuma, M. C. (2005.). Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. *São Paulo: Monsanto do Brasil.*, 60 p.
- Garcia, A.M.; Vieira, J.P.; Winemiller, K.O., Raseira, M.B. (2004). Reproductive cycle and spatiotemporal variation in abundance of the one sided livebearer *Jenynsia multidentata*, in Patos Lagoon, Brazil. *Hydrobiologia.* , 515, 39-48p.
- Garcia, A.M.; Vieira, J.P.; Winemiller, K.O., Raseira, M.B., (2004). Reproductive cycle and spatiotemporal variation in abundance of the one sided live bearer *Jenynsia multidentata*, in Patos Lagoon, *Brazil. Hydrobiologia.*, 515, 39-48 p.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Slolomon, K.R. (2000.). Ecotoxicological risk assessment for Roudup herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 167, 35-120p.
- Gluszczak, 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. Part C Toxicol. Pharmacol.*, 146, 519 – 524p.

- Guyton, M. D., Hall, J. E. (2006). Tratado de fisiologia médica. Textbook of medical physiology, 11th Ed. Elsevier, Rio de Janeiro.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186:1-85p.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (2007). Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press*, New York.
- Harayashiki, C.A.Y., Varela Junior, A.S., Machado, A.A.S., Cabrera, L.C., Primel, E.G., Bianchini, A., Corcini, C.D. (2013). Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. *Aquat. Toxicol.* 142–143,176–184p.
- Huber PC & Almeida WP (2008) Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova.* 31: 1170-1179p.
- Hued, A. O. (2012). Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup®) alters normal Gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Environ. Contam. Toxicol.*, 62, 107 – 117p.
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M. (2003). Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ. Toxicol.* , 18, 260-267p.
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S., Pokethitiyook, P. (2002). Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Sci. Asia*, 28: 121-127p.
- Langiano, V.C., Martinez, C. B.R. (2008). Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 147, 222-231p.
- Lopes, F. M., Varela Junior A. S., Corcini, C. D., Silva, A. C., Guazzelli, V. G., Tavares, G., Rosa, C. E. (2014). Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. *Aquat. Toxicol.* 155: 322 – 326p.

- Lushchak, O.V., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I. (2009). Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere.*, 76, 932-937p.
- Mai, Ana C. G., Garcia, Alexandre M. and Vieira, João P. (2005). Influência da salinidade no crescimento de juvenis de *Jenynsia multidentata* Jenyns (Pisces). *Rev. Bras. Zool.* vol.22, n.3.
- Mai, A.C.; Garcia, A.M.; Vieira, J.P. (2006). Ecologia alimentar do barrigudinho *Jenynsia multidentata* (Jenyns, 1842) (Pisces, Cyprinodontiforme) no estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil. *Comun. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS, Sér. Zool.* (in press).
- Mitchell, D.G., P.M. Chapman, T.J. Long (1987). Acute toxicity of Roundup and Rodeo herbicides to rainbow trout, Chinook, and coho salmon. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 39: 1028 – 1035p.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R. (2010a). Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere.*, 78, 294-299p.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R. (2010b). Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 81: 781–787p.
- Monserrat, J. M.; Bianchini, A.; Bainy, A. C. D. (2002). Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species. *Mar. Environ. Res.*, 54: 781-785p.
- Neskovic, N.K., Poleksic, V., Elezovic, I., Karan, V., Budimir, M. (1996). Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp (*Cyprinus carpio*). *Environ. Contam. Toxicol.*, 56, 295–302p.
- Parenti, L. (1981). A phylogenetic and biogeographic analysis of cyprinodontiform fishes (Teleostei, Artherinomorpha). *Bolletín of the American Museum of Natural History.*, 168: 341 – 557p.

- Primel, E.G. et al. (2005). Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande Do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. *Química Nova*, v.28, n.4., 605-609p.
- Quintans, F.; Scasso, F.; Loureiro, M.; Yafe, A. (2009). Diet of *Cnesterodon decemmaculatus* (Poeciliidae) and *Jenynsia multidentata* (Anablepidae) in a hypertrophic shallow lake of Uruguay. *Iheringia, Sér. Zool.*, vol.99, n.1.
- Ramírez Duarte, W.F., Rondón Barragán, I.S., Eslava Mocham P.R.. (2008). Acute toxicity and histopathological alterations of Roundup herbicide on “cachama blanca” (*Piaractus brachypomus*). *Pesq. Vet. Bras.*, 28, 547-554p.
- Romano, R.M., Romano, M.A., Moura, M.O., Oliveira, C.A. (2008). A exposição ao glifosato-Roundup causa atraso no início da puberdade em ratos machos. *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.* , 45, 481-487p.
- Romano, R.M., Romano, M.A., Oliveira, C.A. (2009). Glifosato como desregulador endócrino químico. *Ambiência*, 5, 359-372p.
- Schindler., Joachim F.; Vries., U. D. (1998). Ovarian structural specialization facilitate aplacental matrotrophy in *Jenynsia lineata* (Cyprinodontiformes, Osteichthyes). *Journal of Morphology.*, 198: 331 – 339p.
- Siccardi, E. M. (1940). La viviparidad de *Jenynsia lineata* (Jenyns). *Museo Argentino de Ciencias Naturales, Publicação extra.*, 121, 8p.
- Sies, H. (1991). Oxidative Stress: oxidants and antioxidants. London.: Accademic Press.
- SOSBAI - Sociedade Sul Brasileira de Arroz Irrigad (2010). Arroz irrigado: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil. *Pelotas: SOSBAI, Embrapa Clima Temperado*, 161p.
- Szarek, J., Siwick, A., Andrzejewska, A., Terech-Majewska, E., Banaszkiewics, T. (2000). Effects of the herbicide Roundup™ on thse ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Mar. Environ. Res.*, 50, 236–266p.

- Tsui, M.T.K., Chu, L.M. (2004). Comparative toxicity of glyphosatebased herbicides: aqueous and sediment porewater exposures. *Arch. of Envir. Contam. and Toxic.* 46: 316 – 323p.
- Turner, C. L. (1957). The breeding cycle of the South American Fish, *Jenynsia lineata*, in the northern hemisphere. *Copeia.*, 3: 195 – 203p.
- UNFPA - United Nations Fund for Population Activities (2011). Relatório sobre a Situação da População Mundial. *World Population Prospects*, New York. Acesso em 24 de fevereiro de 2015, disponível em: <http://www.un.org/files/PT-SWOP11-WEB.pdf>
- US-EPA - United States Environmental Protection Agency. (2002). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 5^a Ed. 275p.
- Valko M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160: 1–40.
- Wan, M.T., R.G. Watts, D.J. Moul (1989). Effects of different dilution water types on the acute toxicity to juvenile Pacific salmonids and rainbow trout of glyphosate and its formulated products. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43: 378 – 385p.
- WHO - World Health Organization. (2005). Glyphosate and AMPA in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. WHO, Geneva.
- Williams, G.M., Kroes, R., Munro, I.C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 31, 117-165p.

6- CAPÍTULO 1

Efeitos comparativos de herbicidas à base de glifosato sobre parâmetros oxidativos e qualidade espermática no peixe estuarino *Jenynsia multidentata*

(Manuscrito a ser submetido à Aquatic Toxicology)

Efeitos comparativos de herbicidas à base de glifosato sobre parâmetros oxidativos e qualidade esperm no peixe estuarino *Jenynsia multidentata*

Jessica Andrea Albañil Sánchez^a, Antonio Sergio Varela Jr^a, Carine Dahl Corcini^b, Ednei Gilberto Primel^c, Roberta Daniele Klein^b, Camila De Martinez Gaspar Martins^{a,b,*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália km 8, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália km 8, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

^cEscola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália km 8, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

E-mail address: camilaos@hotmail.com (Camila De Martinez Gaspar)

Corresponding author: Camila De Martinez Gaspar Martins
Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Instituto de Ciências Biológicas
Av. Itália km 8 – Campus Carreiros
96.203-900 – Rio Grande – RS – Brazil
Phone: + 55 53 393-5162
FAX: + 55 53 3233-6848
E-mail: camilaos@hotmail.com

6.1- RESUMO

O uso de agrotóxicos vem aumentando nos últimos anos em decorrência da ampliação das áreas de plantio e presença de pragas mais resistentes. No Rio Grande do Sul / Brasil, as culturas de arroz são consideradas como as principais responsáveis pelo lançamento destes produtos nos corpos d'água, uma vez que o Estado concentra 61% da rizicultura irrigada do país. Dentre os herbicidas mais utilizados nestas plantações estão variações de Roundup[®], cujo princípio ativo é o glifosato. Alguns estudos têm demonstrado que o glifosato pode atingir diferentes espécies animais, consideradas como espécies não-alvo. Tendo em vista o exposto, o objetivo do trabalho foi determinar, comparativamente possíveis efeitos que as formulações à base de glifosato, Roundup Original[®] (RO), Roundup Transorb[®] (RT) e Roundup WG[®] (RWG), possam estar causando à peixes que habitam regiões onde estes herbicidas são lançados, como é o caso do barrigudinho *Jenynsia multidentata*. Para tanto, foi feito um teste de mortalidade (96 h) utilizando-se as concentrações de 0,5, 1 e 5 mg.L⁻¹ de glifosato, calculado a partir da sua concentração em cada formula, e escolheu-se a de 0,5 mg.L⁻¹ para avaliação de parâmetros oxidativos e qualidade espermática de *J. multidentata*, já que foi a única onde não houveram mortos. Os resultados mostram que acima de 0,5 mg.L⁻¹, a formulação RT é a mais tóxica pelo registro de maior mortalidade. Quanto aos parâmetros oxidativos, houve um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) com consequente dano no fígado dos peixes. Esta situação foi mais evidenciada nos animais expostos ao RO que apresentaram aumento de EROs e redução na capacidade antioxidante total às 24 h de teste o que se refletiu num aumento expressivo de lipoperoxidação (LPO) às 96 h. Com relação aos parâmetros de qualidade espermática, a motilidade foi o parâmetro mais sensível, pois foi inibida pelo glifosato nas 3 formulações experimentais (RO, RT e RWG) em 24 e 96 h de exposição. Assim, podemos concluir que os herbicidas à base de glifosato causam danos à espécie de peixe *J. multidentata*, induzindo o estresse oxidativo e influenciando negativamente na sua reprodução por afetar a qualidade espermática dos machos. No que compete à análise comparativa das formulações, a RT parece ser a mais tóxica por provocar maior mortalidade, no entanto, quando em concentração não letal e ambientalmente relevante como é o caso de 0,5 mg.L⁻¹ de glifosato, a RO, que contém maior quantidade dos chamados componentes “inertes”, provoca maior dano oxidativo, nos entanto as 3 formulações influenciam igualmente a qualidade espermática.

Palavras-chave: herbicidas, glifosato, biomarcadores, peixe.

6.2- INTRODUÇÃO

O glifosato, N-(fosfonometil) glicina, é um herbicida pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas, pós-emergente, de amplo espectro, não seletivo, usado mundialmente no combate às plantas indesejáveis na agricultura, na indústria, em áreas urbanas e aquáticas (Amarante Jr et al., 2002; Galli e Montezuma, 2005; WHO, 2005). No Brasil, ele tem sido utilizado desde 1978 (Galli e Montezuma, 2005) e, no Estado Rio Grande do Sul sua aplicação ocorre, principalmente, nas lavouras de arroz irrigado, atividade agrícola de maior importância na região. O glifosato, ao ser absorvido pelas plantas, inibe a enzima 5-enolpiruvato-shikimato-3-fosfato sintase (EPSPS) que catalisa reações de síntese de aminoácidos aromáticos essenciais de vegetais (Galli e Montezuma, 2005). A toxicidade aguda do glifosato para animais é considerada baixa segundo dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005), porém, suas formulações como, por exemplo, o Roundup[®], são geralmente mais tóxicas para organismos aquáticos devido a adição do surfactante polietoxileno amina (POEA), utilizado para aumentar a eficácia do herbicida (Tsui e Chu, 2004). Testes de toxicidade aguda (96-h) com diversas espécies de peixes teleósteos mostram que a concentração letal mediana (CL₅₀) de glifosato puro é cerca de 10 vezes maior em comparação à CL₅₀ do Roundup[®] (Giesy et al., 2000).

Peixes teleósteos têm sido considerados como bons modelos para avaliar os efeitos da contaminação aquática por agrotóxicos e outros contaminantes. O peixe estuarino *Jenynsia multidentata* (Jenyns, 1842), uma espécie que vive associada às plantações de arroz do sul do Brasil, é apontado como um potencial bioindicador regional para avaliação de compostos químicos em diversos processos biológicos (Cazenave et al., 2005; Hued et al., 2006; Ballesteros et al., 2007, Hued et al., 2012; Pinto et al., 2015). Por exemplo, a literatura mostra que o glifosato puro é capaz de inibir a AChE em tecidos cerebrais e musculares de *J. multidentata* (Sandrini et al., 2013), enquanto que seu formulado (Roundup[®]) e em concentrações subletais, causa alterações histopatológicas em brânquias e fígado destes animais (Hued et al., 2012), entretanto, os efeitos de herbicidas à base de glifosato sobre parâmetros oxidativos ainda não estão disponíveis para esta espécie.

Certamente, muitos poluentes são capazes de induzir a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), como o ânion superóxido (O₂^{•-}), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (OH[•]) e devido à sua alta reatividade, as EROs podem reagir com lipídios, proteínas e DNA, danificando suas estruturas e funções. No entanto, para neutralizar as EROs, os organismos contam com um arsenal de defesa antioxidante composto por elementos enzimáticos (glutaciona peroxidase (GPx), catalase (CAT), superóxido desmutase (SOD), glutaciona-S-transferase (GST)) e não enzimáticos (glutaciona reduzida (GSH), metalotioneína, melatonina, Vitamina E). Quando as

defesas antioxidantes são insuficientes para neutralizar as EROs, o dano oxidativo ocorre. A peroxidação lipídica (LPO), por exemplo, é um dano oxidativo que acontece em consequência da reação das EROs com os lipídeos de membrana das células, podendo afetar a permeabilidade seletiva das membranas e, assim, todo o funcionamento celular. A LPO induzida por herbicidas tem sido descrita para várias espécies de peixes (Sevgiler et al., 2004; Glusczak et al., 2006, 2007; Modesto e Martinez, 2010a).

Considerando-se o fato de que a drenagem da água das lavouras de arroz e aplicação dos herbicidas coincide com a época de reprodução de alguns peixes, como é o caso da *J. multidentata* (final da primavera e durante o verão) (Primel et al., 2005), é importante que também se conduzam estudos a respeito dos efeitos de herbicidas sobre aspectos reprodutivos destes animais. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA, 2002) (Environmental Protection Agency – United States) indica que o glifosato e sua formulação comercial (Roundup®) agem como desreguladores endócrinos, podendo interferir na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação dos hormônios naturais no corpo responsáveis por funções como a reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos aquáticos. Neste sentido, Hued et al. (2012) observaram inibição no número de cópulas e no sucesso de acasalamento de machos de *J. multidentata* expostos ao Roundup®, enquanto que Harayashiki et al. (2013) e Lopes et al. (2014) observaram efeitos negativos do herbicida na qualidade espermática do barrigudinho *Poecilia vivipara* e do zebrafish *Danio rerio*, respectivamente.

Tendo em vista o exposto, o objetivo deste estudo é avaliar comparativamente os efeitos das formulações à base de glifosato, Roundup Original®, Roundup Transorb® e Roundup WG®, sobre parâmetros oxidativos e de qualidade espermática em *J. multidentata*. A espécie *J. multidentata* pode ser considerada como um bom modelo para avaliações de atividade reprodutiva pelo: dimorfismo sexual, presença de gonopódio nos machos (estrutura tubular utilizada para transferência de espermatozoide durante a cópula) e viviparidade, características que permitem que estudos nestes animais sejam ainda mais extrapolados para outras espécies de vertebrados. Além disso, é importante salientar que a maioria dos estudos sobre efeitos toxicológicos de herbicidas incluem apenas um tipo de formulado ou o princípio ativo, não havendo estudos comparativos que possam sugerir formulações mais ou menos danosas à organismos não-alvos.

6.3- MATERIAIS E MÉTODOS

6.3.1- Coleta e aclimatação dos animais

Exemplares adultos de *Jenynsia multidentata* (machos: $0,54 \pm 0,03$ g, $2,90 \pm 0,06$ cm e fêmeas: $0,69 \pm 0,03$ g, $3,05 \pm 0,05$ cm) foram coletados (SISBIO 37129-2) em arroios que desembocam na praia do Cassino, Rio Grande/RS, com auxílio de um puçá. Os peixes capturados foram transferidos para o Biotério Aquático do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande (ICB/FURG) onde foram aclimatados por 15 dias em tanques equipados com filtro biológico, contendo água na salinidade 5 ppt (água salgada natural diluída em água doce declorada), sob condições controladas de fotoperíodo (12L:12E), temperatura (20°C) e aeração constante. Tanto no período de aclimação quanto nos períodos experimentais foi mantida a proporção de 1g de peixe por litro de água. Durante a aclimação os animais foram alimentados duas vezes ao dia, *ad libitum*, com ração comercial para peixes (ALCON BASIC®). Os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados nas variáveis: pH ($7,1 \pm 0,10$), nitrito ($0,2 \pm 0,29$ ppm), temperatura ($21,4 \pm 0,69$ °C), oxigênio dissolvido ($6,7 \pm 1,37$ mg.L⁻¹), salinidade (5 ppm), amônia total ($0,4 \pm 0,58$ ppm) e fotoperíodo (12C: 12E) no decorrer do período de aclimação e experimentos.

6.3.2- Exposição dos peixes aos herbicidas

6.3.2.1- Teste de mortalidade

Para o estudo comparativo entre as 3 formulações propostas: Roundup Original® (RO), Roundup Transorb® (RT) e Roundup WG® (RWG), uma concentração fixa de glifosato foi escolhida e calculada a partir da concentração destes compostos em cada formulação (360, 480, 720 g.L⁻¹ de ácido equivalente de glifosato nas formulações RO e RT e RWG, respectivamente). Esta concentração foi determinada em decorrência de um teste de mortalidade, onde os peixes aclimatados ($n=5$, sendo machos e fêmeas selecionados randomicamente) foram expostos agudamente (96 h) às 3 formulações nas concentrações nominais de 0,5, 1 e 5 mg.L⁻¹ de glifosato e a mortalidade foi observada. Um grupo controle foi mantido ao longo do teste. As condições do teste seguiram as condições de aclimação descritos acima, exceto pela adição do herbicida na água. Os herbicidas foram adicionados na água apenas no início do experimento e o meio não foi trocado. Durante o teste e 1 dia antes do mesmo os animais foram mantidos em jejum. Como mencionado, foi mantida a proporção de 1g de peixe por litro de água em cada aquário. Os peixes sem movimentos respiratórios e insensíveis à estímulos táteis foram considerados como mortos e removidos do aquário. O resultado do teste de mortalidade apresentado na Tabela 2 (item 3) mostra que apenas na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de glifosato não houve mortalidade, independente da formulação testada, e, portanto, esta foi a concentração escolhida para as análises de parâmetros

oxidativos e de qualidade espermática.

6.3.2.2- Teste para análise dos parâmetros oxidativo

Para a análise dos parâmetros oxidativos, machos e fêmeas aclimatados foram selecionados ($n=12$) numa proporção de 2 machos : 1 fêmea, e expostos agudamente (96 h) à $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de glifosato nas formulações RO e RT. Um grupo controle foi mantido ao longo do experimento. As condições do teste foram as mesmas descritas no item 6.3.1. Diariamente, ao longo das 96 h de experimento, uma alíquota de água foi retirada e filtrada (filtro $0,2 \text{ }\mu\text{M}$; Millipore, Merck, São Paulo, Brasil) para monitorar a concentração de glifosato no meio. Os animais foram amostrados nos períodos 6, 24 e 96 h de exposição para análises de EROs, capacidade antioxidante total (ACAP) e atividade da GST e, somente em 24 e 96 h para análise de peroxidação lipídica (LPO). Os peixes amostrados foram eutanasiados com dose letal de Benzocaína ($500 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$) e seus fígados dissecados para as análises bioquímicas.

6.3.2.3- Teste para análise da qualidade espermática

A análise da qualidade espermática foi realizada em machos de *J multidentata* previamente aclimatados. Os animais ($n=10$) foram expostos agudamente (96 h) à $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de glifosato nas formulações RO, RT e RWG (mesmas condições experimentais descritas no item 6.3.1). Um grupo controle foi mantido ao longo do experimento. Uma alíquota de água também foi coletada diariamente e filtrada (filtro $0,2 \text{ }\mu\text{M}$; Millipore, Merck, São Paulo, Brasil) para mensurar a concentração de glifosato. Os animais foram amostrados nos períodos 0, 24 e 96 h de exposição, eutanasiados (Benzocaína[®] $500 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$) e tiveram seus testículos dissecados e imersos em solução de Hanks balanceada descrita em Harayashiki et al. (2013) (HBSS; 0.137 M NaCl , 5.4 mM KCl , $0.25 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $0.44 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, 1.3 mM CaCl_2 , 1.0 mM MgSO_4 e 4.2 mM NaHCO_3) para as análises espermáticas.

Os protocolos descritos no item 6.3.2 foram aprovados pela CEUA/FURG (Comissão de Ética em Uso Animal): Processo 23116.005051/2013-59.

6.3.3- Análises bioquímicas

Parte das amostras de fígado ($n=6$) foram destinadas para as análises de EROs, ACAP e atividade da GST, enquanto que na outra metade ($n=6$) foi analisada a LPO. Para as primeiras

análises, os fígados foram homogeneizados (9:1 w/v) em tampão composto por Tris-HCl (100mM), EDTA (2mM) e Mg^{2+} (5 mM) com pH ajustado em 7,75. Após, as amostras foram centrifugadas (10.000 x g, 20 min à 4°C), o pellet foi descartado e o sobrenadante utilizado para as análises propostas.

Para a quantificação de EROs, foi utilizado o diacetato de 2,7 diclorofluoresceína (H_2DCFDA , Invitrogen) que na presença de EROs gera fluorocromo, o qual é detectado nos comprimentos de onda de 488 e 525 nm de excitação e emissão, respectivamente. A capacidade antioxidante total contra peroxi-radicaís (ACAP) foi medida de acordo com método descrito por Amado et al., 2009. O método é baseado na detecção fluorimétrica de EROs também usando o 2,7' diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA , Invitrogen) como substrato. Neste caso o extrato do tecido é exposto aos radicais peroxil gerados pela decomposição térmica (35°C) do 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dicloridrato (ABAP, 4 mM) e a ACAP é estimada por fluorimetria (excitação: 485 nm; emissão: 520 nm) através da diferença da área gerada pelas EROs com e sem ABAP, relativa à fluorescência registrada sem ABAP. As leituras fluorimétricas foram realizadas em fluorímetro com leitor de microplacas (VICTOR²™ Multilabel Counter model 1420-051. Turku, Finlândia). A atividade da GST foi determinada pela conjugação da glutathiona reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), conforme a metodologia de Keen e William (1976). Os dados de EROs, ACAP e atividade da GST foram relativizados pelo conteúdo de proteína no sobrenadante, o qual foi determinada pelo método do biureto (Dolles, Goiânia, GO, Brasil).

Para a análise de LPO, as amostras foram homogeneizadas (1:9 v/w) em tampão composto KCl 1,15% e BHT 35 μ M, com pH ajustado para 7,75. A LPO foi determinada pelo método TBARS de acordo com Oakes e Van der Kraak (2003). Este método se baseia na reação entre o malondialdeído (MDA), um produto da degradação de lipídios peroxidados por EROs, e o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), que sob condições de alta temperatura e acidez geram um cromógeno que é medido por espectrofluorimetria. Os dados foram normalizados considerando-se o peso úmido (mg) dos tecidos empregados nas análises.

6.3.4- Análise da qualidade espermática

Os testículos dissecados foram coletados em tubos cônicos de 1,5 ml contendo solução de HBSS e agitados para a liberação dos espermatozeugmatas. Os espermatozoides foram, então, liberados pelo rompimento dos espermatozeugmatas utilizando-se uma pipeta de 10 μ L. A suspensão de espermatozoides foi a utilizada para as análises que serão descritas abaixo.

Para estimar-se a motilidade e a concentração espermática, colocou-se 10 µL da suspensão de espermatozoides numa lâmina coberta com lamínula. A motilidade foi observada ao microscópio BX 41 Olympus (América Olympus América, Inc., São Paulo, SP, Brasil), com aumento de 200 x. O resultado foi expresso em % de células movimentando-se ativamente para frente (Sun et al., 2010). A concentração de espermatozoides foi determinada por contagem em câmara de Neubauer (Varela Junior *et al.*, 2012), os resultados foram expressos por número de espermatozoides em 1 ml de sêmen.

A funcionalidade mitocondrial foi avaliada de acordo a metodologia de He e Woods (2004) adaptada por Varela Jr. et al. (2012) com a utilização do corante Rodamina 123 (Rh123) ($\geq 96\%$, Sigma-Aldrich). Para tanto, uma alíquota de 10 µl da suspensão de espermatozoides foi incubada com 40 µl da solução de Rh 123 (13 µM) por 10 min à 20°C. Posteriormente, uma alíquota de 10 µl da mistura foi colocada em lâmina, coberta com lamínula e as células foram observadas em microscópio epifluorescência (Olympus BX 51, América, São Paulo, SP, Brasil) com aumento de 400x. As células com mitocôndrias funcionais exibiam fluorescência verde enquanto que aquelas com alguma disfunção mitocondrial não apresentavam nenhuma fluorescência. Foram contadas 200 células, sendo que o índice de funcionalidade mitocondrial foi expresso como porcentagem de espermatozoides que emitiam fluorescência verde em comparação com o número total de espermatozoides analisados.

A integridade da membrana dos espermatozoides foi medida segundo metodologia descrita por Harrison e Vickers (1990). Uma alíquota de 10µl da suspensão de espermatozoides foi diluída em 20 µl de solução salina. A solução estoque foi preparada com 950 µL citrato de sódio (3%), 20 µL PI ($\geq 95\%$, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), 20 µL CFDA ($\sim 95\%$, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e 10µL de formaldeído. Após o período de incubação, 10 µl da mistura foi colocada em lâmina, coberta por lamínula e observada em microscópio de epifluorescência (Olympus BX51, América, São Paulo, SP, Brasil) utilizando aumento de 400x. As membranas em perfeito estado acumulam CFDA, que é hidrolisado em carboxifluoresceína gerando uma fluorescência de cor verde, enquanto as células com membranas danificadas incorporam o PI e emitem uma fluorescência de cor vermelha. Para uma análise quantitativa da integridade de membrana, 200 células foram contadas e classificadas de acordo com sua coloração. Os dados foram expressos como percentual de células com membrana íntegra em comparação com o número total de células analisadas.

O laranja de acridina fluorescente (LA), método descrito por Tejada et al. (1984), foi usado para avaliar a Integridade do DNA em células espermáticas de *J multidentata*. Foi feito um esfregão do esperma em lâmina, esperou-se secar ao ar e o material foi fixado em solução Carnoy (3 partes de metanol:1 parte de ácido acético glacial). As lâminas foram lavadas com ácido acético (0,1M; pH 2,5) e coradas com solução de LA (0,2 mg.mL⁻¹ dissolvida em água destilada) durante 5

min. O esfregaço foi novamente lavado com água destilada e coberto por lamínula (Gandini et al., 2006). Para a análise quantitativa, 200 células foram contadas usando microscópio de epifluorescência à 400x de aumento (Olympus BX 51, America, São Paulo, SP, Brazil). As células espermáticas com fluorescência verde foram considerados como células com DNA normal e aquelas que mostraram fluorescência vermelha, laranja ou amarela foram considerados como células com DNA danificado. Os dados expressos como porcentagem de células com DNA integro pelo número total de células contadas (200).

6.3.5- Medidas de glifosato na água

Concentrações de glifosato nas amostras de água foram determinadas por cromatografia iônica (IC Compact 881, Merohn, Herisau, Suíça, Switzerland) com condutor condutimétrico, utilizando troca coluna de troca iônica (Metrosep A Supp 5 150/4.0) e supressor químico. A fase móvel foi feita com 9,6 mmol.L⁻¹ de ácido sulfúrico. Foi preparada uma curva de calibração (0,05 – 2,0 mg.L⁻¹ de glifosato), utilizada para determinar a concentração de glifosato nas amostras experimentais. Todas as injeções foram realizadas com um ciclo de injeção de 20µL. O limite de quantificação e detecção foi de 0,05 e 0,01 mg.L⁻¹, respectivamente. O método apresentou linearidade para a curva de calibração tanto em água ultrapura ($r^2 = 0,999$) e na matriz (meio experimental) ($r^2 = 0,998$) (Amarante et al., 2002; Queiroz et al., 2011). A coleta e o tratamento dos dados foi realizada utilizando o Software MagicNet 2,3 (Metrohm, Herisau, Suíça).

6.3.6- Análises dos dados

Os dados foram expressos como média ± erro padrão. As comparações entre os valores médios foram feitas por análises de variância de uma via (ANOVA – *one way*) seguido de teste *a posteriori* de Tukey. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$). Os parâmetros de distribuição normal e homocedasticidade foram testados previamente. As análises estatísticas foram feitas usando o programa Sigma-Plot 11.0.

6.4- RESULTADOS

Os resultados de mortalidade são apresentados na Tabela 1 e indicam que apenas na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de glifosato não houve mortalidade em nenhuma das formulações testadas. Esta concentração foi então a escolhida para avaliação de parâmetros oxidativos e para avaliação da qualidade espermática. Em ambos os testes, foram medidas as concentrações de

glifosato na água, sendo que os resultados foram: $0,53 \pm 0,01$; $0,59 \pm 0,02$ e $0,93 \pm 0,09$ mg.L⁻¹ (valores médios \pm erro padrão) de glifosato para as formulações RO, RT e RWG, respectivamente. As concentrações de glifosato nos experimentos com as formulações RO e RT não diferiram entre os testes e, portanto, o resultado apresentado é uma média das medidas de ambos os experimentos. Por outro lado, na água dos tratamentos controle, o glifosato não foi detectado. Caso houvesse glifosato na água controle, ele estaria em concentrações inferiores à 0,05 mg.L⁻¹, que é o limite de detecção do equipamento.

Tabela 1. Percentual de mortalidade de *J. multidentata* (n=5) expostas por 96 h às concentrações de 0,5, 1 e 5 mg.L⁻¹ de glifosato nas formulações Roundup Original[®] (RO), Roundup Transorb[®] (RT) e Roundup WG[®] (RWG).

<i>Tratamento</i>	<i>RO</i>	<i>RT</i>	<i>RWG</i>
Controle	0%	0%	0%
0,5 mg.L ⁻¹	0%	0%	0%
1 mg.L ⁻¹	0%	40%	20%
5 mg.L ⁻¹	0%	60%	20%

Quanto às medidas bioquímicas dos parâmetros oxidativos, a Fig. 5 mostra um aumento significativo na quantidade de EROs ao longo do tempo, sendo que nos animais do grupo controle e RO este aumento foi em torno de 4 x e ocorreu no tempo 24 h em relação às 6 h, mantendo-se estável em 96 h. Em contrapartida, nos animais expostos à RT, a quantidade de EROs permaneceu inalterada em 6 e 24 h de experimento, mas sofreu um aumento de cerca de 1000 x em 96 h de exposição. Ainda, comparando-se os grupos experimentais, os animais expostos ao RT apresentaram maior quantidade de EROs em 96 h quando comparados aos controles e expostos ao RO, que não diferiram entre si em nenhum tempo experimental. Os resultados expressos na Fig. 6 mostram uma redução de ACAP no fígado dos animais controle e expostos ao RO às 24 h de teste. No entanto, os animais destes 2 tratamentos tentam recuperar sua capacidade antioxidante às 96 h, o que só ocorre significativamente para os indivíduos do grupo controle. Já, nos animais expostos ao RT não houve alteração de ACAP entre os tempos de amostragem, e a quantidade de ACAP também não variou significativamente entre os tratamentos para todos os tempos amostrais.

Ainda no escopo da capacidade antioxidante, a Fig. 7 mostra que atividade da GST aumenta progressivamente em todos os grupos experimentais, mas este aumento é significativo apenas em 96 h, momento mais crítico do teste onde houve um grande aumento de EROs nos animais expostos ao RT. Além disso, as variações observadas na atividade da GST parecem se dar em função do tempo

de exposição, já que não diferiu entre os tratamentos. O aumento significativo da atividade da GST em 96 h de teste, pode também ser um reflexo do aumento das EROs observados na Fig. 5, principalmente nos animais expostos ao RT. Estas variações entre EROs, ACAP e GST estão ligadas aos resultados de peroxidação lipídica (LPO) apresentados na Fig. 8.

Observando-se os animais do grupo controle, o aumento na geração de EROs e redução de ACAP em 24 h de experimento refletiu numa alta taxa de LPO no tempo experimental correspondente. No entanto, às 96 h de teste, a recuperação nos níveis de ACAP e o aumento na atividade da GST levaram a uma redução na LPO nos fígados destes animais. Este quadro foi diferente para os animais expostos aos herbicidas. De fato, os animais expostos ao RO, apresentaram aumento de EROs em 24 e 96 h de teste com concomitante baixa da capacidade antioxidante e, mesmo com o aumento da atividade da GST, os animais não conseguiram evitar o dano oxidativo pronunciado em 96 h que inclusive foi maior que o observado para os grupos controle e RT. Já, para os animais expostos ao RT, a manutenção dos níveis de ACAP e aumento da GST conseguiram, possivelmente, neutralizar o aumento da quantidade EROs em 96 h de forma que não foram detectadas diferenças na LPO nestes animais entre 24 e 96 h. Assim, mesmo que o herbicida RT tenha incrementado fortemente a geração de EROs, ele não foi tão danosos quanto o RO que apresentou maior dano oxidativo (LPO).

Em relação às análises espermáticas, houveram diferenças significativas apenas nas análises de motilidade espermática (Fig. 10), funcionalidade mitocondrial (Fig. 11) e integridade de DNA (Fig. 13). Todos os herbicidas reduziram a motilidade dos espermatozoides de *J. multidentata* em 24 e 96 h de teste com relação ao tempo 0 h e seus respectivos controles temporais. No que compete à concentração de espermatozoides (Fig. 9), foi observada queda deste parâmetro para todos os tratamentos no tempo 24 h, mas esta não foi estatisticamente significante (Fig. 9). Nas análises de funcionalidade mitocondrial observou-se queda no percentual de células com mitocôndrias funcionais apenas no grupo tratado com RT e após 24 h de teste com recuperação às 96 h. Por outro lado, o único herbicida que reduziu o percentual de células com DNA íntegro foi o RWG também às 24 h de experimento. Os resultados indicam que os herbicidas podem provocar alterações iniciais na qualidade espermática, sendo que algumas como funcionalidade mitocondrial e integridade de DNA se normalizam posteriormente.

6.5- DISCUSSÃO

Apesar de sua ação herbicida, muitos estudos têm demonstrado que o glifosato e suas formulações são tóxicas para peixes (Giesy et al., 2000; Glusczak et al., 2007; Modesto e Martinez, 2010a, 2010b; Hued et al., 2012; Sandrini et al., 2013). As formulações RO e RT são compostas

pelo sal de isopropilamina de glifosato, diferindo da formulação RWG que contem sal de amônia de glifosato. Uma das particularidades das formulações é sua velocidade de translocação (Molin & Hirase, 2005). O sal de amônia da formulação RWG, por exemplo, estimula a atividade de ATPases, acelerando a aderência do herbicida nas folhas das plantas e, promovendo uma absorção mais eficiente do produto. No caso do RT, a translocação é mais rápida e concentra-se, principalmente, nas raízes. Estas três formulações (RO, RT, RWG) foram as primeiras formulações comerciais lançadas no mercado mundial pela empresa Monsanto, e são as mais usadas pelos agricultores por sua segurança e resultado na erradicação de ervas daninhas (Rodrigues, 2005). No Brasil, elas também são amplamente usadas, inclusive, nas culturas de arroz irrigado do Rio Grande do Sul. Apesar da variedade de formulações no mercado, a maioria dos estudos ecotoxicológicos adota apenas um herbicida, sendo os mais comuns as variações RO e RT. Neste contexto, o presente trabalho apresenta um diferencial que é fazer uma análise comparativa entre as formulações de RO, RT e RWG. De acordo com suas bulas, o RO, RT e RWG variam entre si no conteúdo de sal de isopropilamina (IPA) ou sal de amônia de glifosato, ácido equivalente de glifosato e ingredientes “inertes”. Neste último entram os surfactantes, como o POEA (sintetizado a partir de ácidos graxos derivados de animais), adicionado para facilitar a penetração do herbicida na superfície da planta e, conseqüentemente, melhorar sua efetividade (Williams et al., 2000). Entretanto, o surfactante POEA não é um componente inerte, pois eleva a toxicidade do herbicida para animais, provocando alterações nas suas membranas lipídicas e, conseqüentemente, na estrutura e funções das células (Cooper e Hausman, 2007). Tsui e Chu (2003) mostraram que a CL_{50} (concentração letal mediana para 50% dos animais) do surfactante POEA e da formulação Roundup[®] para os crustáceos *Ceriodaphnia dubia* e *Acartia tonsa* é cerca de 40 x menor do que a CL_{50} do ácido equivalente de glifosato ou IPA. Os autores ainda reportam que o POEA é responsável por mais de 86 % da toxicidade do Roundup[®] nestes animais e que a contribuição do POEA para esta toxicidade é espécie-dependente. Em peixes teleósteos, também observam-se variações entre a CL_{50} (96 h) do glifosato, do Roundup[®] e do surfactante. Por exemplo, Geisy et al. (2000) em sua revisão reporta que a CL_{50} (96 h) de glifosato, Roundup[®] e do POEA para o peixe Bluegill *Lepomis macrochirus* foram calculadas em 24, 5,8 e 1,3 mg.L⁻¹, respectivamente. Já, para o salmão *Oncorhynchus tshawytscha*, a CL_{50} (96 h) foi de 30 mg.L⁻¹ para o glifosato, 20 mg.L⁻¹ para o Roundup[®] e 2,8 mg.L⁻¹ para o POEA (Geisy et al, 2000). Além disso, os valores de CL_{50} (96 h) de Roundup[®] ainda variam amplamente entre as espécies com resultados que vão de 2 a 50 mg.L⁻¹ (Geisy et al., 2000; Hued et al., 2012; Folmar et al., 1979; WHO, 1994; Mitchell et al., 1987; Abdelghani et al., 1997; Jiraungkoorskul et al., 2002) do herbicida. Segundo Hued et al. (2012), a CL_{50} (96 h) do Roundup Max Granular[®], outra variação do glifosato, calculada para *J. multidentata* é de 19,02 mg.L⁻¹, o que classifica esta espécie como moderadamente sensível ao Roundup[®]. Com a finalidade de se fazer

esta análise comparativa dos herbicidas e indicar o mais tóxico aos animais, escolheu-se uma concentração fixa de glifosato não letal à *J. multidentata* nas formulações de interesse RO, RT e RWG para performar os testes agudos de análise de parâmetros oxidativos e qualidade espermática (96 h). Para tanto, os peixes foram submetidos à um teste de mortalidade onde foram expostos à 3 concentrações de glifosato: 0,5, 1, 5 mg.L⁻¹ calculadas com base na concentração de ácido equivalente de glifosato em cada formulação. A concentração onde não houve letalidade e, portanto, a escolhida para avaliação dos parâmetros oxidativos e espermáticos foi a de 0,5 mg.L⁻¹ de glifosato. Esta concentração, ainda, pode ser considerada como ambientalmente relevante, uma vez que Guilherme et al. (2010) detectaram concentrações de 0,01 a 0,7 mg.L⁻¹ de glifosato em naturais de Aveiro (Portugal), sendo que, em situações extremas, depois da aplicação direta do herbicida na água, os autores detectaram o glifosato na concentração 1,7 mg.L⁻¹. No entanto, segundo os dados de mortalidade, a formulação RT é a mais tóxica seguida pela RWG. Apesar de conterem menor proporção de componentes “inertes” que a formulação RO, elas podem estar variando em outros compostos não revelados ou não conhecidos que aumentam sua toxicidade para espécies não-alvo.

Os parâmetros oxidativos medidos nos peixes expostos aos herbicidas mostram claramente um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a geração de EROs com conseqüente dano, e essa situação foi bem evidenciada nos fígados dos animais expostos ao RO que apresentaram aumento de EROs e redução na capacidade antioxidante total às 24 h de teste (Fig. 5 e 6) o que se refletiu num aumento expressivo de LPO às 96 h tanto com relação ao grupo exposto ao RO em 24 h, quanto em comparação ao controle do respectivo tempo experimental (96 h) (Fig. 8); e mesmo com aumento da atividade da GST às 96 h, o aumento na LPO não foi evitado. Já os peixes expostos ao RT tiveram aumento expressivo de EROs em seus fígados às 96 h de teste, mas a manutenção da capacidade antioxidante (Fig. 5, 6 e 7, respectivamente) parece ter evitado um aumento na LPO de 24 para 96 h (Fig. 8), que ainda assim foi maior que no grupo controle do respectivo tempo experimental. Tais resultados indicam a formulação RO, em concentrações não letais, é mais danosa à *J. multidentata*. Cabe salientar que as medidas de quantificação de EROs e ACAP foram escolhidas com o objetivo de se obter uma situação geral da condição oxidativa do animal e, a atividade da GST por ser uma enzima multifuncional que não apenas catalisa a conjugação de xenobióticos com a GSH para sua eliminação, mas que reage diretamente com os lipídeos peroxidados, neutralizando-os e evitando dano oxidativo de membrana.

Diversos são os trabalhos que mostram efeitos do Roundup[®] sobre parâmetros oxidativos em peixes. No que compete às defesas antioxidantes, Modesto e Martinez (2010b) mostraram que o RT provocou redução transitória na atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido desmutase (SOD) e que inibiu a enzima GST em fígado do peixe curimbatá *Prochilodus lineatus*. Na mesma linha, Lushchak et al. (2009) observaram uma redução de 29 a 34% na

atividade de GST no fígado do peixe dourado *Carassius auratus L.* após exposição ao Roundup[®] (96 h) e indicaram também situação de estresse oxidativo nestes animais não apenas induzida pela redução na atividade da GST, mas também por uma redução do complexo enzimático antioxidante total. No entanto, no primeiro trabalho os animais apresentaram aumento de LPO que foi revertido às 96 h de teste, ficando com os mesmos níveis dos animais do grupo controle, enquanto que no segundo trabalho não se observou LPO após exposição ao herbicida. Em contrapartida, existem estudos demonstrando que o Roundup[®] não afeta a atividade da GST, como é o caso do trabalho de Harayashiki et al., (2013) que mostra queda nos níveis LPO no fígado do barrigudinho *Poecilia vivípara* exposto à 0,70 mg.L⁻¹ de glifosato na formulação RO, concentração muito semelhante a utilizada no presente estudo. Com base neste dado, podemos sugerir que a *J. multidentata* é mais sensível ao RO que a espécie de Poecilídeo *Poecilia vivípara*.

Em relação à qualidade espermática apenas as análises de motilidade (Fig. 10), funcionalidade mitocondrial (Fig. 11) e integridade de DNA (Fig. 13) dos espermatozoides apresentaram-se sob efeito dos herbicidas, sendo a motilidade o parâmetro mais sensível, pois foi inibida pelo glifosato nas 3 formulações experimentais (RO, RT e RWG) em 24 e 96 h de exposição. Lopes et al. (2014) reportam um caso similar com espermatozoides de machos de zebrafish *Danio rerio* expostos à 5 mg.L⁻¹ de glifosato puro, onde detectaram uma redução na motilidade e concentração espermática após 24 h de exposição, entretanto, estes parâmetros voltam ao normal após 96 h de experimento. No mesmo trabalho, quando os peixes são expostos à 10 mg.L⁻¹ de glifosato, a motilidade não sofre alteração alguma. A motilidade é um parâmetro de extrema importância para o sucesso da fertilização do oócito (Rurangwa et al., 2004). Entretanto, para haver motilidade é necessária atividade mitocondrial intensa produzindo energia, por este motivo uma alteração na funcionalidade mitocondrial das células espermáticas também prejudica o sucesso reprodutivo. Neste contexto, observou-se um efeito negativo do RT no percentual de espermatozoides com boa funcionalidade mitocondrial, mas este quadro foi revertido em 96 h de teste. Já, Lopes et al. (2014), observaram uma redução tempo-dependente neste percentual em células espermáticas de zebrafish expostas à 5 e 10 mg.L⁻¹ de glifosato. Os resultados de Lopes et al. (2014) corroboram com os de Harayashiki et al. (2013) que observaram redução significativa no percentual de espermatozoides com funcionalidade mitocondrial em *P. vivípara* expostos ao RO nas concentrações de 0,13 e 0,70 mg.L⁻¹ de glifosato em 96 h de teste. Resultados correspondentes à integridade do DNA observados em *J. multidentata* também foram afetados pela exposição ao Roundup[®], mas na formulação RWG em 24 h com recuperação às 96 h de teste. Lopes et al. (2014) apresentam um padrão parecido com o deste trabalho para espermatozoides de zebrafish expostos à 5 mg.L⁻¹ de glifosato. Alguns trabalhos mostram que o dano de DNA nos espermatozoides resultam numa menor taxa de fertilidade e/ou problemas de fecundação (Agarwall e Allamaneni, 2004;

Bakos et al., 2007). Em termos gerais, os resultados de qualidade espermática apresentados para a *J. multidentata*, indicam que os herbicidas afetam a fertilidade destes animais o que pode inclusive influenciar no seu comportamento de corte apresentando baixa atividade sexual, menor eficácia no momento da copula e alto investimento de energia para o acasalamento como o já observado por Hued et al. (2012) para machos desta expostos agudamente à 0,5 mg.L⁻¹ de Roundup®.

Por fim, este trabalho reforça a preocupação com o lançamento de herbicidas nos corpos d'água em função das alterações biológicas aqui observadas. Ainda, os resultados avigoram o uso da *J. multidentata* como espécie com grande potencial biomonitor regional para locais contaminados com herbicidas e poluentes que atingem o meio ambiente (Ferreira et al., 2012; Pinto et al., 2015) sendo que os parâmetros LPO e motilidade espermática parecem ser os biomarcadores que melhor respondem à contaminação aquática por Roundup® no âmbito da espécie em estudo.

6.6- CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados podemos concluir que os herbicidas à base de glifosato RO, RT e RWG causam danos à espécie de peixe *J. multidentata*, induzindo o estresse oxidativo e influenciando negativamente a reprodução da espécie por afetar a qualidade espermática dos machos. No que compete à análise comparativa das formulações, o RT parecer ser o mais tóxico com base nos dados de mortalidade, mas quando o glifosato encontra-se em concentrações não-letais e ambientalmente relevante, a formulação RO se mostra mais danosa, visto o aumento na LPO no fígado dos animais expostos à esta formulação. Quanto à qualidade espermática, as 3 formulações influenciam igualmente. Por fim, os resultados deste trabalho reforçam o uso da *J. multidentata* como um bom biomonitor regional para locais contaminados com herbicidas, sendo que os parâmetros LPO e motilidade espermática parecem ser os biomarcadores que melhor respondem à contaminação aquática por Roundup® no âmbito da espécie em estudo.

6.7- AGRADECIMENTOS

Agradecemos a MSc. Sergine Caldas pelas análises de glifosato / LACOM - FURG. Agradecemos à CAPES e a OEA pela bolsa da Jessica Andrea Albañil Sánchez. O presente trabalho possui como suporte fomento do CNPq (Processo 449695/2014-0).

6.8- REFERENCIAS

- Amarante Jr, O.P., Santos, T.C.R., Brito, N.M., Ribeiro, M.L., 2002. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quím. Nova.*, 589-593
- Agarwall, A., Allamaneni, S.S.R., 2004. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. *Minerva Ginecol.*, 56, 235–245
- Bakos, H.W., Thompson, J.G., Feil, D. and Lane, M., 2007. Sperm DNA damage is associated with assisted reproductive technology pregnancy. *Int. J. Androl.*, 31(5), 518–526
- Ballesteros ML, Bianchi G, Carranza M, Bistoni M., 2007. Endosulfan acute toxicity and histomorphological alterations in *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *J Environ Sci Health B.*, 42, 351–357
- Cazenave J, Wunderlin DA, Bistoni MA, Amé MV, Krause E, Pflugmacher S., 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*: a field and laboratory study. *Aquat Toxicol.*, 15, 178–190
- Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman., 2007. Livro: A célula - uma abordagem molécula. 3ª ed. 716
- Folmar LC, Sanders HO, Julin AM., 1979. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Arch Environ Contam Toxicol.*, 8, 269–278
- Galli, A. J. B.; Montezuma, M. C., 2005. Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. São Paulo: Monsanto do Brasil., 60
- Gandini, L., Lombardo, F., Lenzi, A., Spanò, M., Dondero, F., 2006. Cryopreservation and sperm DNA integrity. *Cell Tissue Bank.*, 7, 91–98
- Giesy, J.P., Dobson, S., Slolomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roudup herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 167, 35-120
- Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A., Pacheco, M., 2010. European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup® - a glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis.*, 25, 523-530.

- Gluszczak, 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. Part C Toxicol. Pharmacol.*, 146, 519 – 524
- Gluszczak, 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 obtusidenus*). *Ecotox. Environ. Safe.*, 65, 237-241
- Harayashiki, C.A.Y., Varela Junior, A.S., Machado, A.A.S., Cabrera, L.C., Primel, E.G., Bianchini, A., Corcini, C.D, 2013. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. *Aquat. Toxicol.*, 142–143,176–184
- Harrison, R.A.P., Vickers, S.E., 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 88, 343–352
- Hayes, J. D., & Pulford, D. J., 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.*, 30(6), 445-600
- He, S., Woods, C., 2004. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology.*, 48, 254–262
- Hermes-Lima, M .Oxygen in Biology and Biochemistry. 2004. In: Storey, K.B. (Ed) *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey. Cap., 12, 319-368
- Hued AC, Caruso MN, Wunderlin DA, Bistoni MA., 2006. A Field and in vitro evaluation of ammonia toxicity on native fish species of the central region of Argentina. *B Environ Contam Tox.*, 76, 984–991
- Hued, A. O., 2012. Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup®) alters normal Gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Environ. Contam. Toxicol.*, 62, 107 – 117

Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., 2003. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ. Toxicol.*, 18, 260-267

Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S., Pokethitiyook, P., 2002. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Sci. Asia.*, 28, 121-127

Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.*, 251, 6183–6188

Lopes, F. M., Varela Junior A. S., Corcini, C. D., Silva, A. C., Guazzelli, V. G., Tavares, G., Rosa, C. E., 2014. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. *Aquat. Toxicol.*, 155, 322 – 326

Lushchak, O.V., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2009. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere.*, 76, 932-937

Marionnet, D., Deschaux, P., & Reynaud, S., 2006. Possible implication of macrophages in the regulation of cytochrome P450 activities in carp (*Cyprinus carpio*). *Fish shellfish immunology.*, 21(1), 80-91

Mitchell, D.G., P.M. Chapman, T.J. Long., 1987. Acute toxicity of Roundup and Rodeo herbicides to rainbow trout, Chinook, and coho salmon. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 39, 1028 – 1035

Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010(a). Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere.*, 78, 294-299

Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010(b). Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere.*, 81, 781–787

- Molin, W. T., Hirase, K., 2005. Effects of surfactants and simulated rainfall on the efficacy of the engane formulation of glyphosate in johnsongrass, prickly sida and yellow nutsedge. *Weed Biol. Manag.*, 5, 123-127
- Narendra., M., Bhattacharyulu, N. C., Padmavathi, P., Varadacharyulu, N. C., 2007. Prallethrin induced biochemical changes in erythrocyte membrane and red cell osmotic haemolysis in human volunteers. *Chemosphere.*, 67 (6), 1065 - 1061
- Oakes, K.D., Van Der Kraak, G.J., 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology* 63., 447–463
- Pinto, D. P., Chivittz, C. C., Ferreira, R. S., Sopezki, M. S., Zanette, J., 2015. Beta-naphthoflavone-induced CYP1A expression in the guppy *Jenynsia multidentata*: Time-dependent response, anesthetic MS-222 effect and fin analysis. *Ecotox. Environ. Safety.* 113, 38-44
- Primel, E.G. et al., 2005. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande Do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. *Química Nova.*, 28, 605-609
- Queiroz, G.M.P., Silva, M.R., Bianco, R.J.F., Pinho, A., Kaufmann, V., 2011. Transportede glifosato pelo escoamento superficial e por lixiviação em um solo agrícola. *Quím. Nova.*, 34, 190–195
- Rodrigues, B. N.; Almeida, F. S., 2005. Guia de herbicidas. 5. ed. Londrina: Grafmarke., 591
- Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F., Nash, J.P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234, 1–28
- Sandrini, J. Z., Rola, R. C., Lopes, F. M., Hermeson, F. B., Milene M. F., Camila M. G. M., Carlos E. R., 2013. Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: In Vitro studies, *Aquat. Toxicol.*, vol. 130-131, 171–173
- Sevgiler, Y., Oruç, E.O., Üner, N., 2004. Evaluation of etoxazole toxicity in the liver of *Oreochromis niloticus*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 78, 1–8.

- Sun, C., Huang, C., Su, X., Zhao, X., Dong, Q., 2010. Optimization of handling and refrigerated storage of guppy *Poecilia reticulata* sperm. *J. Fish Biol.* 77, 54–66.
- Storey, K. B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian journal of medical and biological research.*, 29(12), 1715-33.
- Tejada, R.I., Mitchell, J.C., Norman, A., Marik, J.J., Friedman, S., 1984. A test for the practical evaluation of males fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil.Steril.* 42, 87–91
- Tsui, M.T.K., Chu, L.M., 2004. Comparative toxicity of glyphosatebased herbicides: aqueous and sediment porewater exposures. *Arch. of Envir. Contam. and Toxic.* 46, 316 – 323
- US-EPA - United States Environmental Protection Agency., 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 5^a Ed. 275
- Varela Junior, A.S., Corcini, C.D., Gheller, S.M.M., Jardim, R.D., Lucia Jr., T., Streit Jr., D.P., Figueiredo, M.R.C., 2012. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Collossoma macropomum*. *Theriogenology* 78, 244–251
- Williams GM, Kroes R, Munro IC. 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingot humans. *Regulatory toxicology and pharmacology.*, 31(2), 117 – 165
- WHO - World Health Organization., 2005. Glyphosate and AMPA in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. WHO, Geneva

6.9- LEGENDA PARA FIGURAS

Fig 5. Espécies reativas de oxigênio (EROs) em fígado de *J. multidentata* mantidos em condições de controle ou expostos por 6, 24 e 96 h às formulações Roundup Original® (RO) e Roundup Transorb® (RT) na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de glifosato. Os dados estão expressos como média ± erro padrão. Letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) para o mesmo tratamento em diferentes tempos experimentais. Letras maiúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos a cada tempo amostral.

Fig 6. Capacidade antioxidante total (ACAP) em fígado de *J. multidentata* mantidos em condições de controle ou expostos por 6, 24 e 96 h às formulações Roundup Original® (RO) e Roundup Transorb® (RT) na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de glifosato. Os dados estão expressos como média ± erro padrão. Letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) para o mesmo tratamento em diferentes tempos experimentais. Letras maiúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos a cada tempo amostral.

Fig 7. Atividade da Glutathione-S-transferase (GST) em fígado de *J. multidentata* mantidos em condições de controle ou expostos por 6, 24 e 96 h às formulações Roundup Original® (RO) e Roundup Transorb® (RT) na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de glifosato. Os dados estão expressos como média ± erro padrão. Letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) para o mesmo tratamento em diferentes tempos experimentais. Letras maiúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos a cada tempo amostral.

Fig 8. Peroxidação lipídica (LPO) em fígado de *J. multidentata* mantidos em condições de controle ou expostos por 24 e 96 h às formulações Roundup Original® (RO) e Roundup Transorb® (RT) na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de glifosato. Os dados estão expressos como média ± erro padrão. Letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) para o mesmo tratamento em diferentes tempos experimentais. Letras maiúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos a cada tempo amostral.

Fig 9. Concentração de células espermáticas em 1 ml de esperma de machos de *J. multidentata* mantidos em condições de controle ou expostos por 0, 24 e 96 h, às formulações Roundup Original® (RO), Roundup Transorb® (RT) e Roundup WG® (RWG) na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de glifosato. Os dados estão expressos como média ± erro padrão. Letras minúsculas representam

diferenças significativas ($p < 0,05$) para o mesmo tratamento em diferentes tempos experimentais. Letras maiúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos a cada tempo amostral.

Fig 10. Percentual de células espermática de machos de *J. multidentata* apresentando motilidade em animais mantidos em condições controle ou expostos por 0, 24 e 96 h, às formulações Roundup Original[®] (RO), Roundup Transorb[®] (RT) e Roundup WG[®] (RWG) na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de glifosato. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. Letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) para o mesmo tratamento em diferentes tempos experimentais. Letras maiúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos a cada tempo amostral.

Fig 11. Percentual de células espermática de machos de *J. multidentata* apresentando funcionalidade mitocondrial em animais mantidos em condições controle ou expostos por 0, 24 e 96 h, às formulações Roundup Original[®] (RO), Roundup Transorb[®] (RT) e Roundup WG[®] (RWG) na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de glifosato. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. Letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) para o mesmo tratamento em diferentes tempos experimentais. Letras maiúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos a cada tempo amostral.

Fig 12. Percentual de células espermática de machos de *J. multidentata* apresentando integridade de membrana em animais mantidos em condições controle ou expostos por 0, 24 e 96 h, às formulações Roundup Original[®] (RO), Roundup Transorb[®] (RT) e Roundup WG[®] (RWG) na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de glifosato. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. Letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) para o mesmo tratamento em diferentes tempos experimentais. Letras maiúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos a cada tempo amostral.

Fig 13. Percentual de células espermática de machos de *J. multidentata* apresentando integridade de DNA em animais mantidos em condições controle ou expostos por 0, 24 e 96 h, às formulações Roundup Original[®] (RO), Roundup Transorb[®] (RT) e Roundup WG[®] (RWG) na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de glifosato. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. Letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) para o mesmo tratamento em diferentes tempos experimentais. Letras maiúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos a cada tempo amostral.

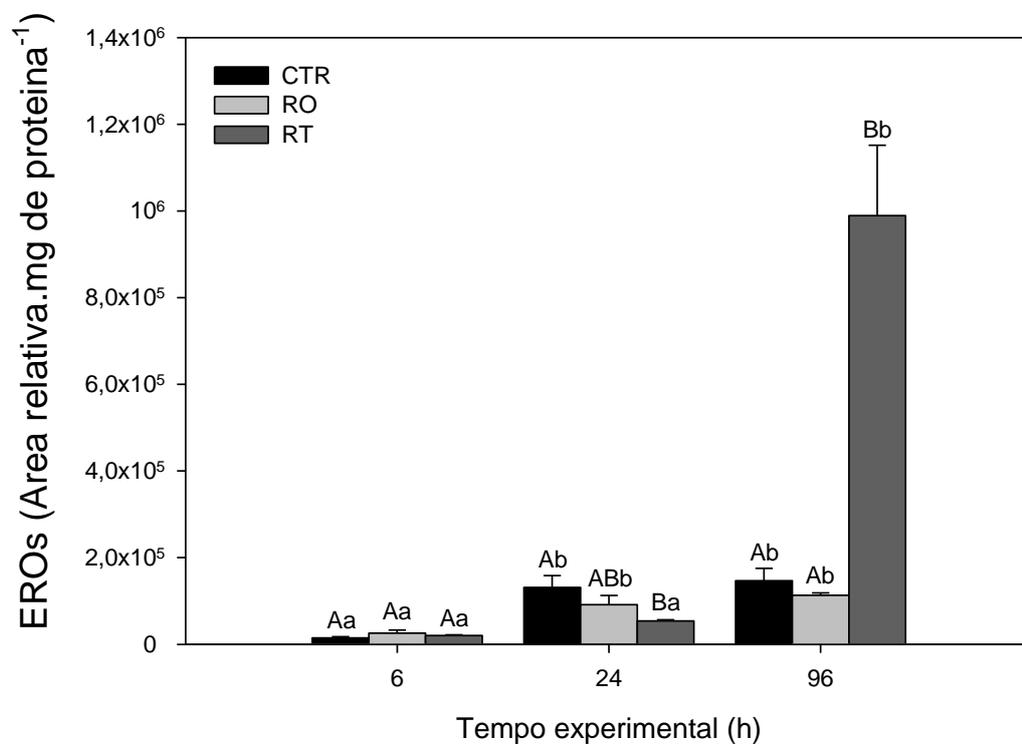


Figura 5

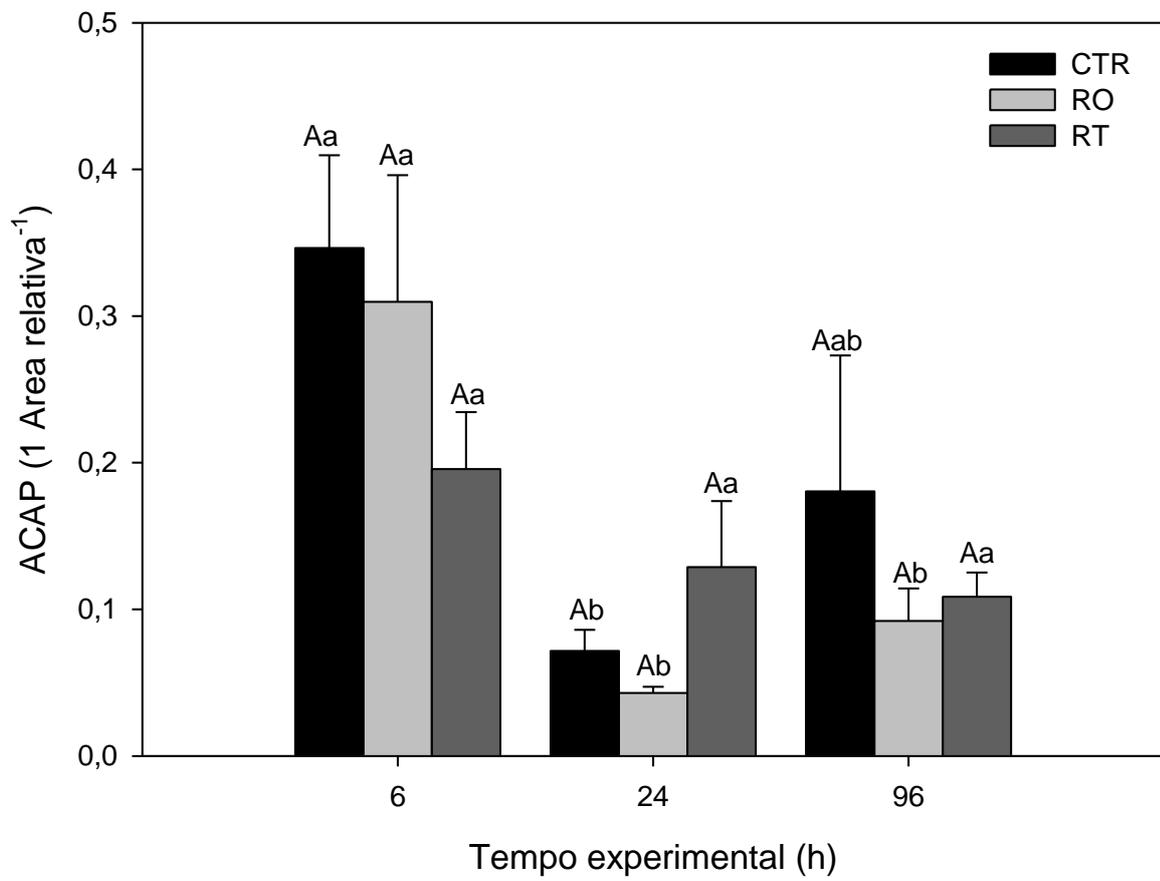


Figura 6

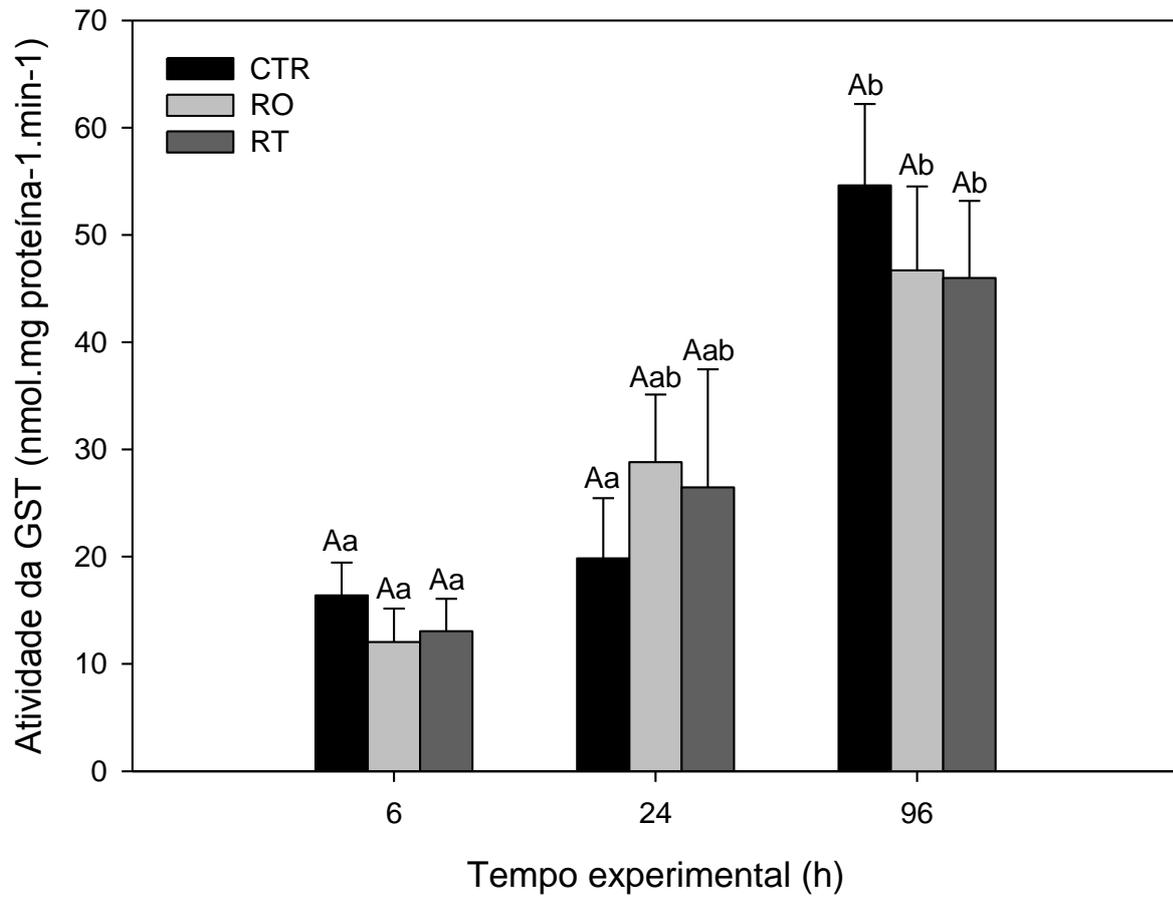


Figura 7

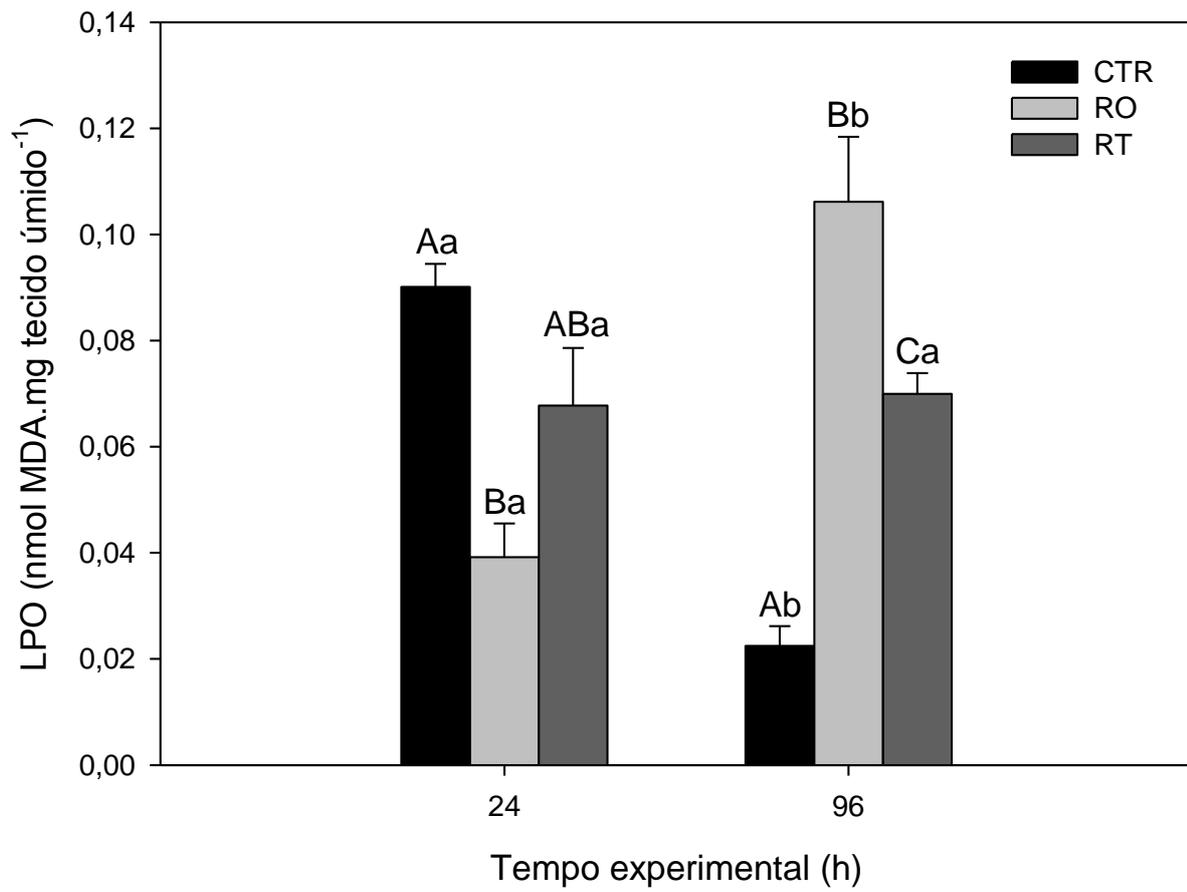


Figura 8

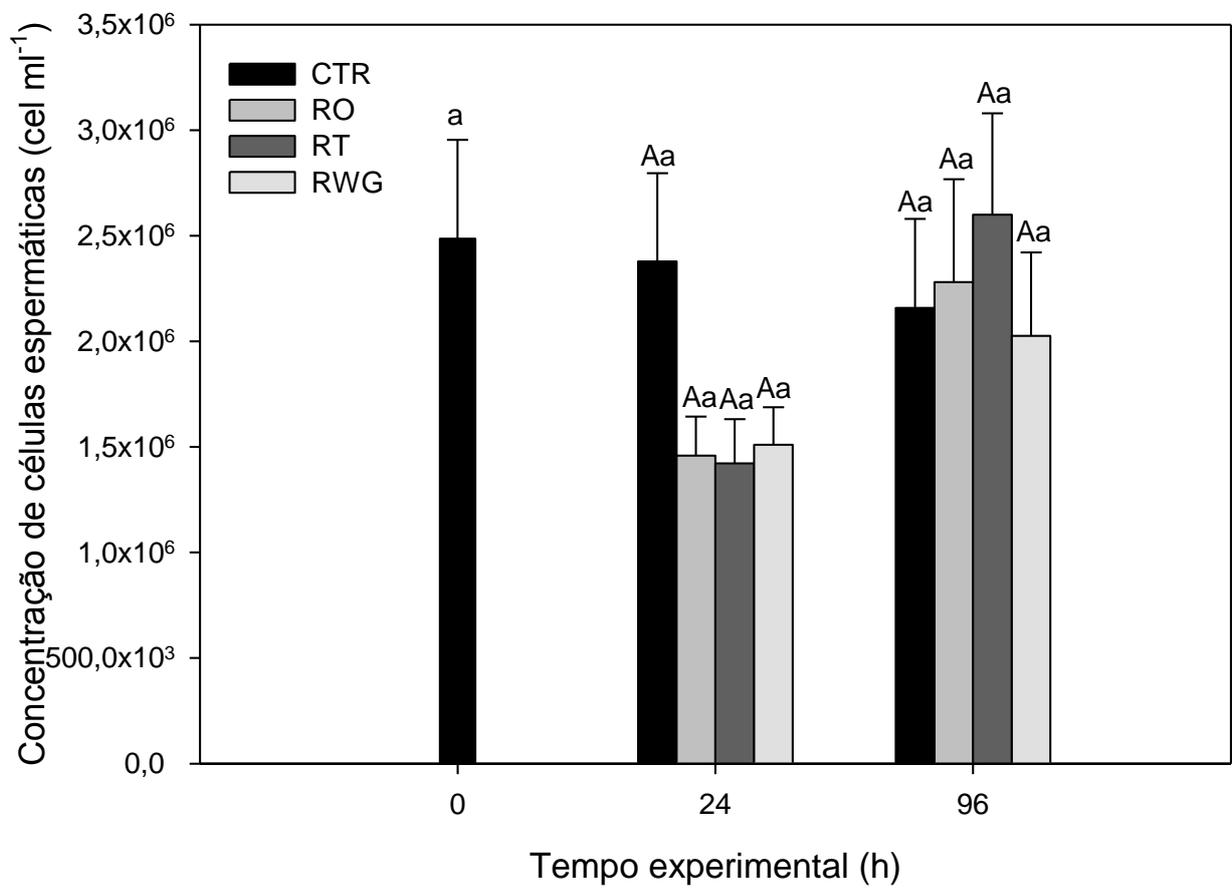


Figura 9

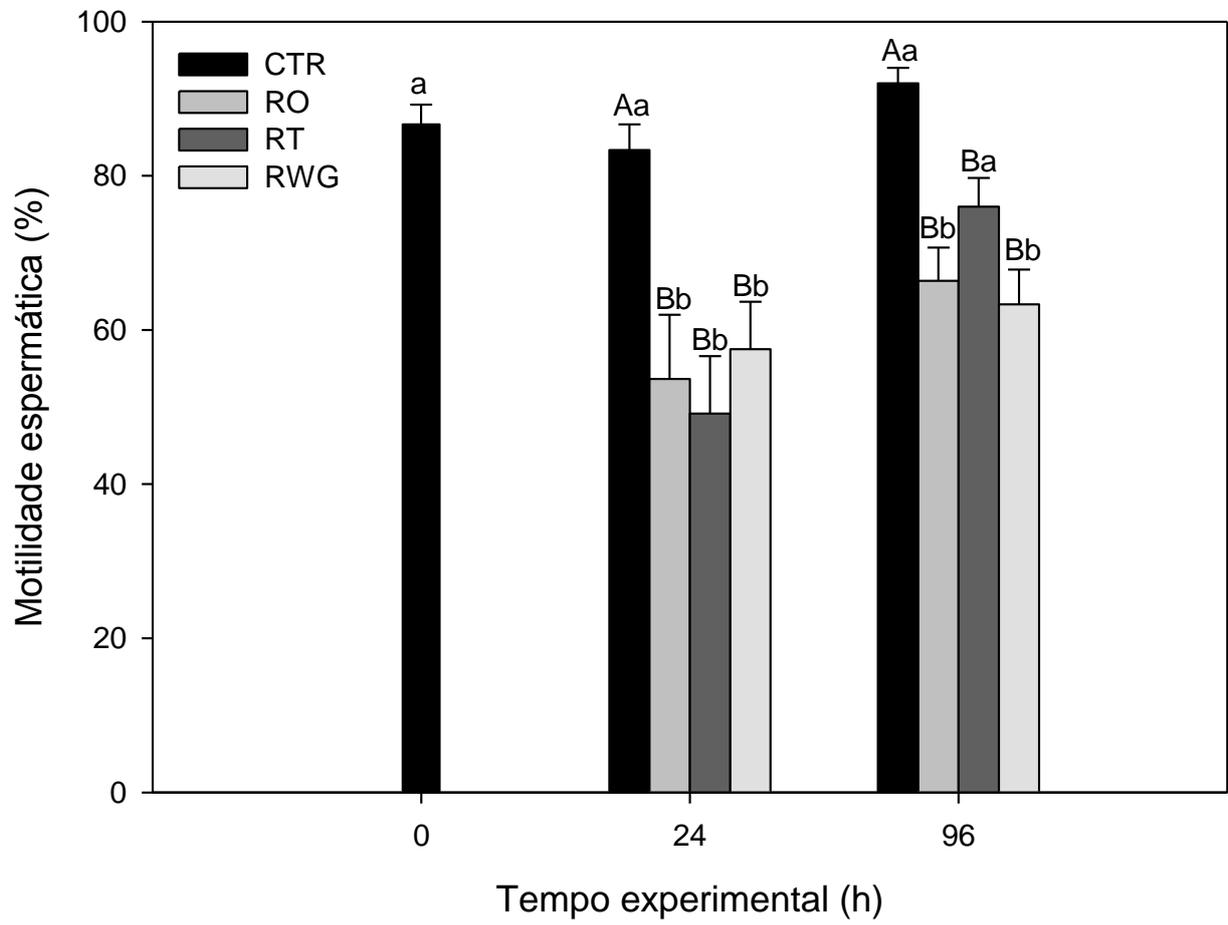


Figura 10

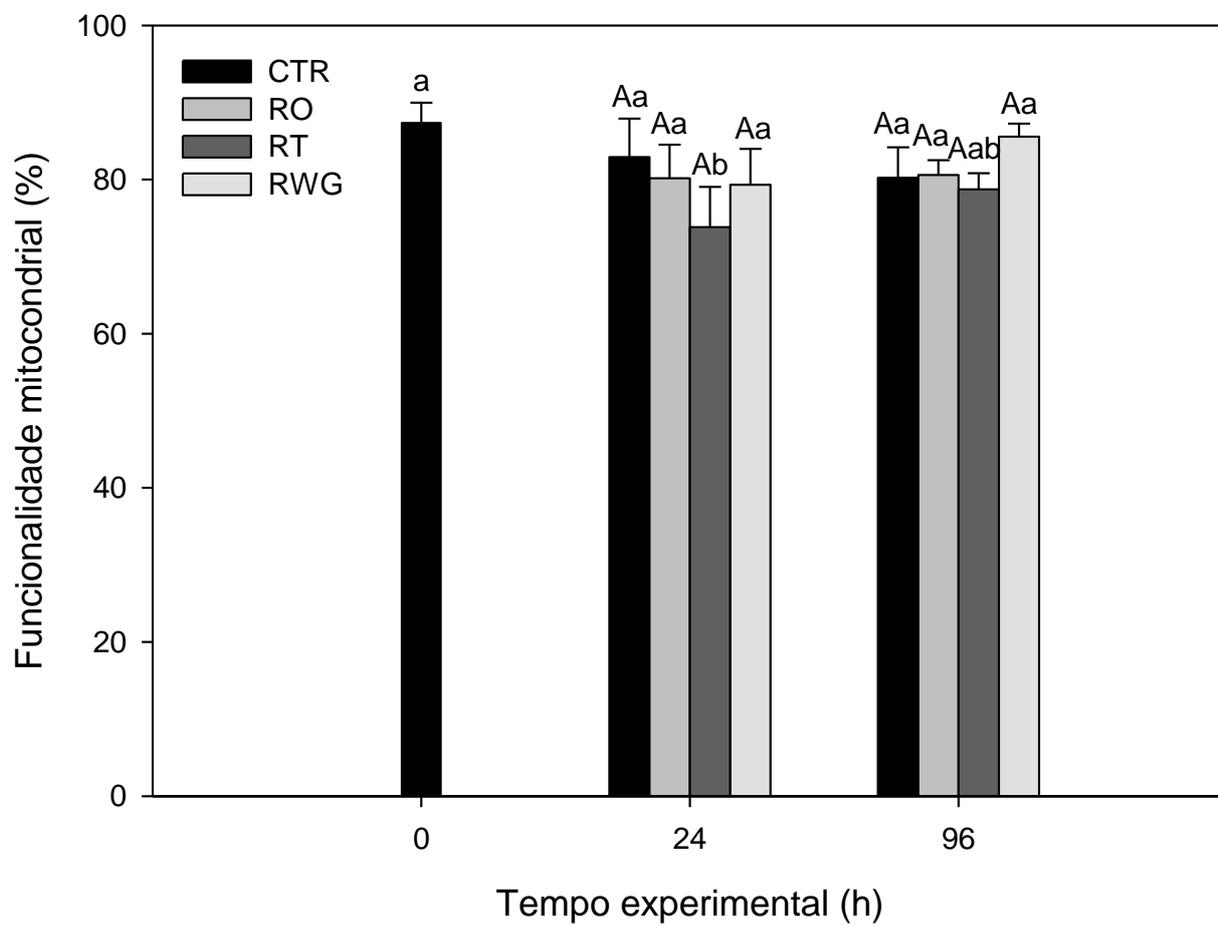


Figura 11

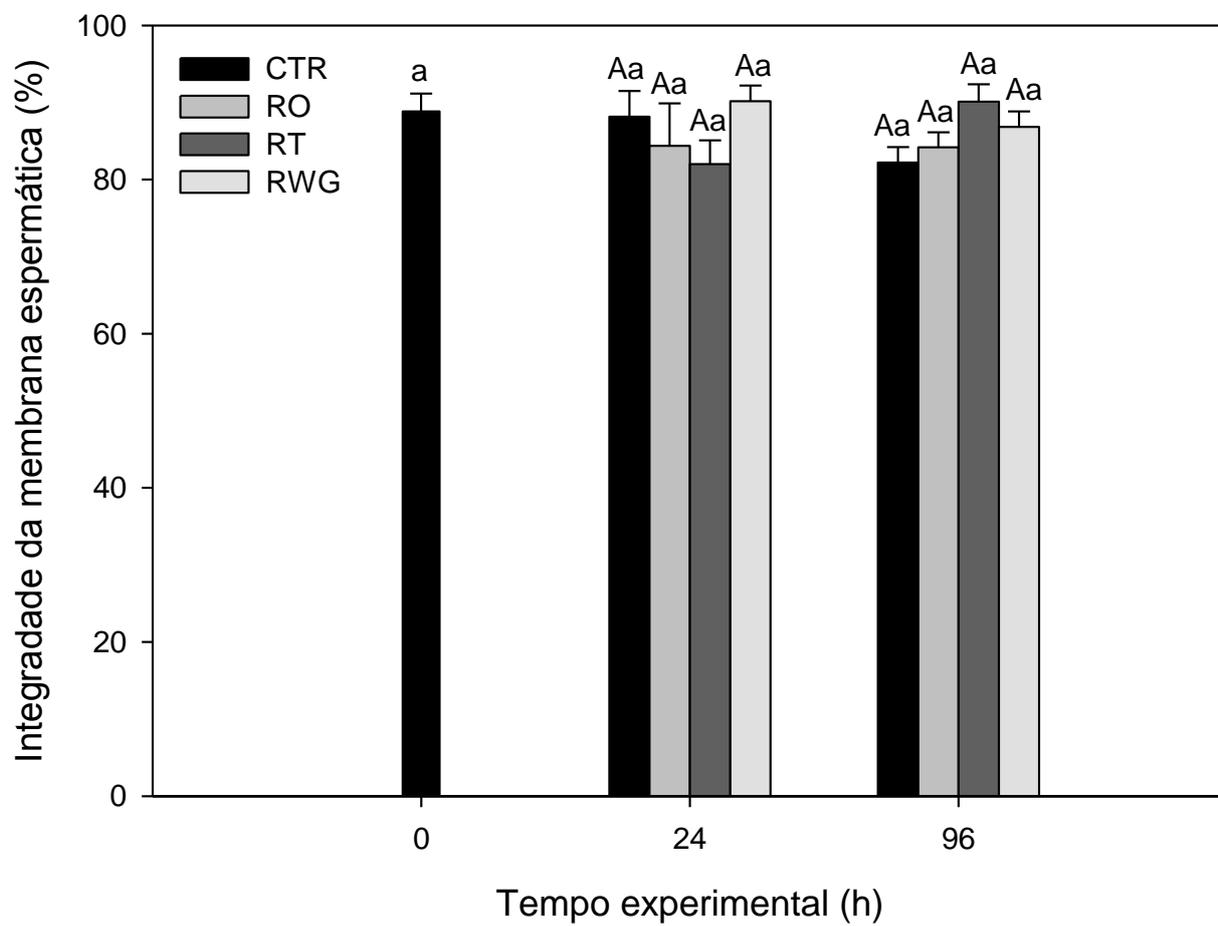


Figura 12

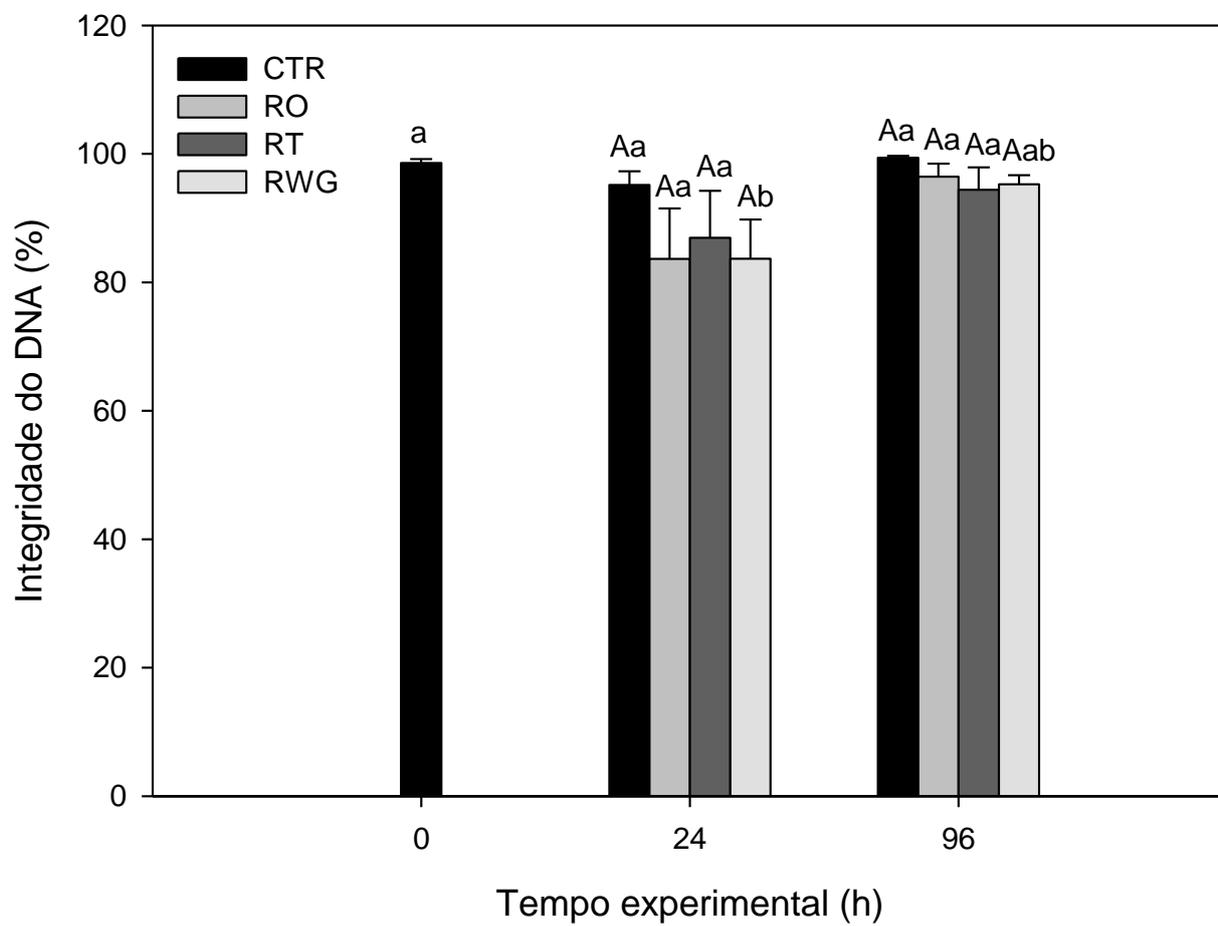


Figura 13

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of paper

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Short Communications
4. Letters to the Editor

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required of no more than 400 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

AUTHOR INFORMATION PACK 27 Mar 2014 www.elsevier.com/locate/aqtox 9

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive**

information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data

will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;

2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;

3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

If journal names are abbreviated, the abbreviations should follow the List of Title Word Abbreviations:

<http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present: One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address

- Full postal address
- Telephone

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.