

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL
CURSO DE AGRONOMIA

ANÁLIA CRISTINA BENTO SANTOS

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA POR HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO
EM PEIXE *Poecilia reticulata* (PETER, 1859), COM ENFÂSE EM MORTALIDADE E
MARCADORES BIOQUÍMICOS**

LARANJEIRAS DO SUL

2022

ANÁLIA CRISTINA BENTO SANTOS

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA POR HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO EM PEIXE *Poecilia reticulata* (PETER, 1859), COM ENFÂSE EM MORTALIDADE E MARCADORES BIOQUÍMICOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silvia Romão

LARANJEIRAS DO SUL

2022

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Santos, Anália Cristina Bento
EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA POR HERBICIDA À BASE DE
GLIFOSATO EM PEIXE *Poecilia reticulata* (PETER, 1859),
COM ENFÂSE EM MORTALIDADE E MARCADORES BIOQUÍMICOS /
Anália Cristina Bento Santos. -- 2022.
41 f.:il.

Orientadora: Dra. Silvia Romão

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Agronomia, Laranjeiras do Sul, PR, 2022.

1. Efeitos da exposição por herbicida à base de
glifosato em peixe *P. reticulata*. 2. Marcadores
bioquímicos. 3. Toxicidade. I. Romão, Silvia, orient.
II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

ANÁLIA CRISTINA BENTO SANTOS

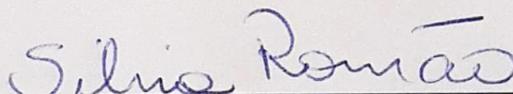
EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA POR HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO EM PEIXE *Poecilia reticulata* (PETER, 1859), COM ENFÂSE EM MORTALIDADE E MARCADORES BIOQUÍMICOS

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia linha de formação em Agroecologia pela Universidade Federal da Fronteira Sul- *Campus* Laranjeiras do Sul (PR)

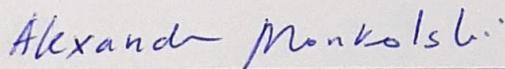
Orientador: Dra. Silvia Romão

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 07/04/2022.

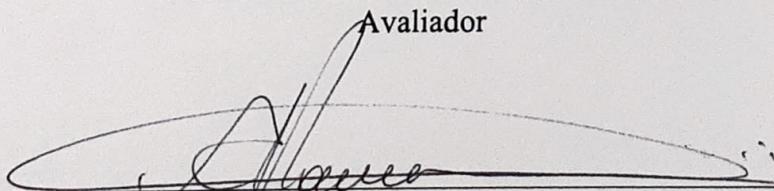
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Silvia Romão – UFFS
Orientadora



Prof. M.e. Alexandre Monkolski – UFFS
Avaliador



Prof. Dr. Carlos Jose Raupp Ramos - UFFS
Avaliador

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar e conduzir o meu caminho, me concedendo muita saúde, força e perseverança para que eu chegasse até aqui.

Agradeço a minha amada mãe Ivete, que está sempre comigo, e que em todos os momentos dessa graduação me agraciou com muito amor, cuidado, apoio para me dar forças, positividade para enfrentar todos os dias e que com suas orações, mensagens e ligações diárias me fizeram percorrer esse caminho de uma forma muito mais leve. Gratidão aos meus avós Santana e Pedro, aos meus tios e padrinhos, a toda minha família pela força e suporte para concluir meus estudos.

A todos os meus amigos que estiveram comigo, demonstrando apoio, companheirismo e que me proporcionaram muitos momentos bons e inesquecíveis.

Aos meus professores que contribuíram com seus ensinamentos para minha formação, vida profissional e também pessoal, especialmente a minha Prof.^a orientadora Silvia, a qual dedicou muita paciência ao transmitir seus ensinamentos e que esteve sempre acompanhando e ajudando em tudo que precisei para desenvolver essa pesquisa.

Gratidão à banca examinadora por se dispor a fazer parte deste momento tão importante e especial.

Meus agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram para realização deste trabalho.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
acreditar no sonho que se tem
ou que seus planos nunca vão dar certo
ou que você nunca vai ser alguém
tem gente que machuca os outros
tem gente que não sabe amar

mas eu sei que um dia a gente aprende
se você quiser alguém em quem confiar
confie em si mesmo
quem acredita sempre alcança...”
(Renato Russo).

RESUMO

Utilizado a nível mundial, o glifosato é um organofosforado do grupo químico das glicinas modificadas, caracterizado por ser um herbicida de amplo espectro, com indicação de baixa toxicidade para animais. Porém, há controvérsias quanto à segurança de seu uso devido a vários estudos que demonstram interferências em atividades enzimáticas, defesa antioxidante, sistema nervoso, sistema endócrino, efeitos embriotóxicos, citotóxicos, histopatológicos, carcinogênicos e distúrbios reprodutivos. Este herbicida atua bloqueando a via do chiquimato ao inibir a EPSPS, resultando na diminuição do desenvolvimento da planta. A ação do glifosato associada à baixa toxicidade para seres humanos e animais está associada ao fato de que a via do chiquimato e de biossíntese de aminoácidos aromáticos é de exclusividade de plantas e determinadas bactérias. Os efeitos do produto comercial ROUNDUP® WG foram avaliados em dois ensaios crônicos de exposição de peixes da espécie *Poecilia reticulata*, e respectivos grupos controles. O primeiro ensaio teve duração de 46 dias, sendo utilizada uma concentração de 7 mg/L do produto, não sendo possível realizar análises bioquímicas devido a alta mortalidade dos animais. O segundo ensaio crônico teve duração de 82 dias, com animais expostos a 1,5 mg/L do produto e peixes em ambiente controle, ocorrendo, também mortalidade durante este período. Foram utilizados marcadores bioquímicos para avaliar parâmetros de estresse oxidativo e atividade de enzimas. Após exposição ao glifosato as amostras foram coletadas, respectivamente fígado e músculo dos animais para análise, sendo utilizados: marcador de estresse oxidativo (dano celular - peroxidação lipídica - LPO), enzima da defesa antioxidante (glutathione S transferase - GST), marcador enzimático da biotransformação de xenobióticos e neurotóxica (colinesterase) e marcador do metabolismo de aminoácidos (glutamato desidrogenase – GLDH). Nos peixes submetidos à exposição de 7 mg/L de ROUNDUP® WG foram observadas 90% de mortalidade dos animais em 46 dias. No segundo ensaio, com peixes submetidos a 1,5 mg/L do produto, foram observadas 32,14% de mortalidade em 82 dias e não foram identificadas alterações nas atividades das enzimas de defesa antioxidante (GST), biotransformação de xenobióticos e neurotóxica (colinesterase), de marcadores do metabolismo de aminoácidos (GLDH) e também não houve indicação de danos relacionados ao estresse oxidativo (marcador LPO) no fígado e músculo dos animais.

Palavras-chave: ecotoxicologia; toxicidade; poluição da água.

ABSTRACT

Used worldwide, glyphosate is an organophosphate from the chemical group of modified glycines, characterized by being a broad-spectrum herbicide, with indication of low toxicity for animals. However, there are controversies regarding the safety of its use due to several studies that demonstrate interference in enzymatic activities, antioxidant defense, nervous system, endocrine system, embryotoxic, cytotoxic, histopathological, carcinogenic and reproductive disorders effects. This herbicide works by blocking the shikimate pathway by inhibiting EPSPS, resulting in reduced plant development. The action of glyphosate associated with low toxicity for humans and animals is associated with the fact that the shikimate and aromatic amino acid biosynthesis pathway is plant-specific and has specific characteristics. The effects of the commercial product ROUNDUP® WG were evaluated in two chronic exposure trials of *Poecilia reticulata* fish and respective control groups. The first test lasted 46 days, using a concentration of 7 mg/L of the product, not being possible to carry out biochemical analyzes due to the high mortality of the animals. The second chronic trial lasted 82 days, with animals exposed to 1.5 mg/L of the product and fish in a control environment. Biochemical markers were used to evaluate parameters of oxidative stress and enzyme activity. After exposure to glyphosate, the samples were collected, respectively liver and muscle from the animals for analysis, using: oxidative stress marker (cellular damage - lipid peroxidation - LPO), antioxidant defense enzyme (glutathione s transferase - GST), enzyme marker of xenobiotic and neurotoxic biotransformation (cholinesterase) and amino acid metabolism marker (glutamate dehydrogenase – GLDH). In fish subjected to contamination of 7 mg/L of ROUNDUP® WG, 90% of animal mortality was observed in 46 days. In the second trial, with fish submitted to 1.5 mg/L of the product, 32.14% mortality was observed in 82 days and no changes were identified in the activities of antioxidant defense enzymes (GST), xenobiotic biotransformation and neurotoxicity (cholinesterase), amino acid metabolism markers (GLDH) and there was also no indication of damage related to oxidative stress (LPO marker) in the liver and muscle of the animals.

Keywords: ecotoxicology; toxicity; water pollution.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 – Níveis de LPO em fígado de <i>P. reticulata</i> expostos a 1,5 mg/L de ROUNDUP® WG durante 82 dias.....	25
Gráfico 2 – Níveis de LPO em músculo de <i>P. reticulata</i> expostos a 1,5 mg/L de ROUNDUP® WG durante 82 dias.....	26
Gráfico 3 – Atividade da Colinesterase em fígado de <i>P. reticulata</i> expostos a 1,5 mg/L de ROUNDUP® WG durante 82 dias.....	27
Gráfico 4 – Atividade da Colinesterase em músculo de <i>P. reticulata</i> expostos a 1,5 mg/L de ROUNDUP® WG durante 82 dias.....	27
Gráfico 5 – Atividade da GST em fígado de <i>P. reticulata</i> expostos a 1,5 mg/L de ROUNDUP® WG durante 82 dias.....	28
Gráfico 6. Atividade da GST em músculo de <i>P. reticulata</i> expostos a 1,5 mg/L de ROUNDUP® WG durante 82 dias.....	29
Gráfico 7– Atividade GLDH em fígado de <i>P. reticulata</i> expostos a 1,5 mg/L de ROUNDUP® WG durante 82 dias.....	30
Gráfico 8 – Atividade GLDH em músculo de <i>P. reticulata</i> expostos a 1,5 mg/L de ROUNDUP® WG durante 82 dias.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE – Acetilcolinesterase
BChE – Butirilcolinesterase
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
EPSPS: 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase
ERO – Espécie Reativa de Oxigênio
CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
CL50 – Concentração Letal 50%
GLDH – Glutamato Desidrogenase
GSSG – Glutathiona oxidada
GST – Glutathiona S Transferase
H₂O – Água
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
LPO – Lipoperoxidação
MDA – Malondialdeído
mg – Miligrama
mL – Mililitro
mM – Milimolar
NADH – Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo
NADP – Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
nm – Nanômetro
O₂⁻ – Radical superóxido
-.OH – Radical hidroxila
TBA – Ácido tiobarbitúrico
μL – Microlitro
± – Desvio Padrão
UFFS – Universidade Federal da Fronteira Sul

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1	INTERAÇÕES DOS PESTICIDAS COM O ECOSSISTEMA AQUÁTICO	14
3.2	BIOLOGIA DA ESPÉCIE <i>POECILIA RETICULATA</i>	14
3.3	COMPLEXO ENZIMÁTICO ASSOCIADO À TOXICIDADE	15
3.4	BIOENSAIOS	17
4	MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1	CULTIVO E ENSAIOS	18
4.2	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	19
4.2.1	Método de Bradford (BRADFORD, 1976)	19
4.2.2	Marcador de Dano- LPO- Peroxidação lipídica (TBARS).....	20
4.2.3	Defesa antioxidante- Glutathione S Transferase – GST.....	20
4.2.4	Marcador enzimático da biotransformação de xenobióticos e neurotóxicos: Acetilcolinesterase	21
4.2.5	Marcador de metabolismo de aminoácidos: Glutamato Desidrogenase (GLDH)	21
4.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	21
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1	MARCADOR DE DANO- LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO).....	24
5.2	ACETILCOLINESTERASE.....	26
5.3	GLUTATHIONE S TRANSFERASE – GST	27
5.4	GLUTAMATO DESIDROGENASE –GLDH	29
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
	REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um dos países com maior produção e exportação agropecuária do mundo, sendo fundamental para a economia local. A elevada demanda de produção estimula o uso intensivo de sementes transgênicas, fertilizantes e pesticidas (PIGNATI *et al.*, 2017). Essa concepção de produção faz com que o Brasil assumira desde 2008 a posição de maior consumidor de pesticidas do mundo (CARNEIRO *et al.*, 2015).

Na atual Legislação (BRASIL, 2002), são caracterizados por agrotóxicos, as substâncias, ou mistura de substâncias químicas que tem por objetivo a prevenção, destruição ou ação repelente dos agentes patogênicos ou vida animal/vegetal que possam vir a ser nocivos para plantas, animais, produtos, e aos seres humanos. Essa definição indica que estes compostos são capazes de destruir a vida animal ou vegetal (PERES *et al.*, 2003). Atualmente o termo “agrotóxico” é levado em pauta em diferentes discussões e trabalhos (BARONAS, 2019), ao sugerir ou não à substituição por outras palavras como “pesticidas”, “defensivos agrícolas”, “produtos fitossanitários”, entre outros.

Cada classe de pesticida possui um princípio ativo, modo de ação e níveis de toxicidade (MODESTO, 2009). Como exemplo disso, há os herbicidas, fungicidas, nematicidas, rodenticidas/raticidas, moluscicidas, acaricidas, reguladores, inibidores de crescimento, fumigantes, desfoliantes, entre outros (PERES *et al.*, 2003). Dentre eles, os herbicidas são os mais utilizados para fins da agricultura (MODESTO, 2009).

Os herbicidas são introduzidos nos ambientes aquáticos por fontes difusas que inclui a lavagem do solo recém pulverizados por escoamento superficial, ou por fontes pontuais quando entram acidentalmente por pulverização aérea ou diretamente pela aplicação com fins de eliminação de organismos indesejáveis como algas, plantas e vetores de doenças (RAND *et al.* 1995 apud. MODESTO, 2009). Há uma grande preocupação sobre a contaminação de ambientes naturais e de produção de organismos aquáticos por pesticidas, uma vez que áreas de preservação e viveiros de produção geralmente encontram-se em ambientes próximos a atividade agropecuária, e, portanto, expostas a estes compostos. São inúmeros dos dados reportados na literatura sobre o efeito de atividades agrícolas em sistemas aquáticos e comunidades aquáticas (DAMALAS; ELEFTHEROHORINOS, 2011; DIAMOND *et al.*, 2017; SOBJAK *et al.*, 2017, SOBJAK *et al.*, 2018; BASTOS, 2013; BOIARSKI *et al.*, 2020).

O glifosato é classificado como organofosforado do grupo químico das glicinas modificadas (WILLIAMS *et al.*, 2000), amplamente utilizado devido ao fato de não ser

seletivo, possuir ação sistêmica, ser um pós-emergente, com amplo espectro de atuação (ANDRIGHETTI *et al.*, 2014), rápida degradação do solo (BOHM *et al.*, 2011), baixa mobilidade e persistência no solo e em águas superficiais e apresenta baixa toxicidade para mamíferos (DUKE; POWLES, 2008). A funcionalidade como herbicida está relacionada ao bloqueio da via do chiquimato por inibição da enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3 fosfato-sintase (EPSPS), com conseqüente bloqueio da produção do precursor corismato, necessário para produção de aminoácidos essenciais como triptofano, fenilalanina e tirosina e reduzindo a capacidade de desenvolvimento da planta (TONI *et al.*, 2006). Como a via do chiquimato e de biossíntese de aminoácidos aromáticos é exclusivo de plantas e algumas bactérias não se observa efeitos tóxicos significativos do glifosato em animais (BOHM; ROMBALDI, 2010; BOHM *et al.*, 2011).

Os herbicidas à base de glifosato são os mais comercializados mundialmente, com cerca de 750 produtos comerciais diferentes, utilizados não só na agricultura, como em usos urbanos e domésticos (GUYTON *et al.*, 2015). Esse status está associado ao fato do glifosato oferecer um amplo espectro de ação (ANDRIGHETTI *et al.*, 2014) aliada a baixa toxicidade para mamíferos (DUKE; POWLES, 2008). Embora os dados comerciais apresentados para produtos com base nesse agroquímico destaquem essas vantagens, há algumas incertezas relacionadas a extensão dos efeitos tóxicos para organismos animais.

Relatos na literatura indicam efeitos indesejáveis como inibição da atividade da ChE (GLUSZAK *et al.*, 2006; MODESTO; MARTINEZ, 2010), danos oxidativos e interferência no sistema de defesa antioxidante (CATTANI *et al.* 2014; SOBJAK *et al.*, 2017; GALLEGOS *et al.*, 2018; SOBJAK *et al.* 2018; TEIXEIRA, *et al.*, 2018; WILKENS *et al.*, 2017), distúrbios neurodegenerativos (HERNANDEZ-PLATA *et al.*, 2015; GALLEGOS *et al.*, 2018, NISHIYORI *et al.*, 2014), distúrbios reprodutivos (LOPES *et al.*, 2012; CAVALLI *et al.*, 2013), embriotóxicos (ZEBRAL *et al.*, 2017) e desregulação endócrina (ROMANO *et al.*, 2009; PIRES, 2013; DEFARGE *et al.* 2016; DRUART *et al.*, 2017; WILKENS *et al.*, 2017).

Alterações no estado de saúde dos animais no ambiente aquático podem estar associadas com efeitos da exposição ao glifosato. A avaliação dessas interações toxicológicas torna-se relevante para o desenvolvimento de metodologias e tecnologias que mantenham a integridade de áreas destinadas à reprodução de peixes e produção de alevinos. Diante dessas suposições o foco do trabalho se estrutura na avaliação dos marcadores fisiológicos para detecção dos efeitos neurotóxicos, dano oxidativo, defesa antioxidante e alteração do metabolismo de aminoácidos em parentais da espécie *P. reticulata* submetidos à exposição por glifosato.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar alterações na saúde de peixes da espécie *P. reticulata* após exposição crônica por glifosato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I) Estudar o efeito da exposição por glifosato em peixes da espécie *P. reticulata* utilizando marcador de estresse oxidativo (dano celular - peroxidação lipídica - LPO) e enzima da defesa antioxidante (glutathione S transferase - GST);
- II) Estudar o efeito da exposição por glifosato em peixes da espécie *P. reticulata* utilizando marcador enzimático da biotransformação de xenobióticos e neurotóxicos (colinesterase);
- III) Estudar o efeito da exposição por glifosato em peixes da espécie *P. reticulata* utilizando marcador do metabolismo de aminoácidos (glutamato desidrogenase – GLDH);
- IV) Identificar o percentual de mortalidade dos indivíduos após exposição crônica por glifosato;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 INTERAÇÕES DOS PESTICIDAS COM O ECOSISTEMA AQUÁTICO

O uso de pesticidas está relacionado à proteção da produção de alimentos, constantemente atacados por pragas agrícolas (FLORES *et al.*, 2004, MORLEY, 2019) evitando a ação danosa e nociva através da aplicação de compostos desfolhantes, dessecantes ou inibidores de crescimento (BRASIL, 1989). Inúmeros efeitos negativos ao equilíbrio ambiental e a saúde animal e humana são descritos para diferentes compostos químicos usados na agricultura e pecuária (SINGH; WALKER, 2006). O Brasil se destaca como um dos maiores consumidores desses compostos no mundo, por ser uma das grandes potências de commodities agrícolas (REBELO *et al.*, 2010; VASCONCELOS 2018). Importante frisar que os agrossistemas estão de alguma forma associados aos corpos d'água cuja finalidades podem estar relacionadas a dessedentação animal, irrigação, proteção de espécies vegetais e animais, aquicultura e recreação. Usualmente os produtos químicos da agricultura tem como destino final os sistemas aquáticos gerando reações em cadeia, que alteram a integridade ecológica destes ambientes (SANTIAGO-MOREIRA *et al.*, 2013). Os pesticidas podem ser inseridos de maneira direta em sistemas aquícolas quando são empregados no controle de agentes patogênicos (TAVECHIO *et al.*, 2009), de ervas daninhas em tanques de piscicultura (VICK, 2010), ou ainda de forma indireta por escoamento superficial a partir da drenagem de áreas agrícolas (RESENDE, 2002)

O herbicida ROUNDUP® WG possui em sua composição 792,5 g/kg de Sal de Amônio de N-(phosphonomethyl) glycine (Glifosato), 720,0 g/kg equivalente ácido de N-(phosphonomethyl) glycine (Glifosato) e 207,5 g/kg de outros ingredientes. Sua classificação toxicológica é de categoria V, em que é caracterizado por ser um produto improvável de causar dano agudo, e quanto ao perigo ambiental é de classe III, sendo um produto perigoso ao meio ambiente (MONSANTO, 2010). De acordo com a portaria brasileira de potabilidade de água é admitido 500µg/L de glifosato na água para o consumo, para União Europeia é de 0,1µg/L e para o Japão 2000µg/L (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

3.2 BIOLOGIA DA ESPÉCIE *Poecilia reticulata*

A espécie *Poecilia reticulata*, também conhecido como lebiste/guppy, compõe a família

Poeciliidae, nativo de riachos de água doce tropical, lagos e águas salobras e pântanos de Trinidad, Venezuela, Guiana, Barbados e Nordeste do Brasil (MAGURRAN *et al.*, 1995; HILBIG e MAKRAKIS, 2009). A espécie apresenta fertilização interna, desenvolvimento vivíparo, com nascimento de indivíduos já em fase juvenil, com desenvolvimento embrionário de aproximadamente 20 dias (WOURMS, 1981). Existe ainda dimorfismos sexual na espécie, onde os machos são menores e apresentam padrão de coloração mais desenvolvido (SHADDOCK, 2008). A alimentação de membros da família Poeciliidae é de larvas de insetos, especialmente dípteros (BRITSKI *et al.*, 2007 apud. NUNES, 2012).

Em condições de laboratório, os lebistes possuem boa manutenção, reprodução e resistência (ANDRADE *et al.*, 2005 apud. MONTEIRO, 2016). Demonstrando boa versatilidade para seu uso em pesquisas.

O fenótipo sexual da espécie *P. reticulata* pode ser determinado através da visualização de suas características, sendo que as fêmeas apresentam-se mais arredondadas, com tamanho superior ao do macho, geralmente apresentando coloração cinza/castanho. Já os machos são menores, apresentam nadadeira caudal bifurcada, são mais coloridos e possuem a nadadeira anal diferenciada na forma de gonopódio, utilizado para a reprodução.

3.3 COMPLEXO ENZIMÁTICO ASSOCIADO À TOXICIDADE

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas com elevado grau de instabilidade, altamente reativas, contendo elétrons desemparelhados (radicais livres) ou não (não radicais) (GUTTERIDGE, HALLIWELL, 2000). Em condições normais, no metabolismo aeróbico, ROS são produzidas pelas células, gerando como principais intermediários o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($\cdot OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), todos altamente reativos e com possibilidade de causar dano celular devido ao potencial de reação com proteínas, lipídeos de membranas e ácidos nucleicos (HERMES-LIMA, 2004). O estresse oxidativo é estabelecido quando há desequilíbrio entre a formação e a remoção das espécies reativas, decorrente do aumento da geração de espécies oxidantes ou da diminuição dos antioxidantes endógenos, gerando um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares (GUTTERIDGE, 1993, GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000). A condição de estresse oxidativo pode ser atingida quando o organismo é submetido ao contato com pesticidas, e os níveis de dano

celular podem ser avaliados com o uso de marcadores como o Lipoperoxidação-LPO (LUSHCHAK *et al.*, 2009).

O sistema de defesa antioxidante está presente em todos os organismos (HERMES-LIMA, 2004) e reúne um conjunto de enzimas que operam numa transformação, oxidação e redução do peróxido de hidrogênio. A superóxido dismutase atua na dismutação do superóxido a H_2O_2 (CROUCH *et al.*, 1981), enquanto a catalase neutraliza o H_2O_2 formando H_2O (AEBI, 1984). Já o conjunto de enzimas glutathiona atuam de formas diferentes em reações de redução e oxidação. Assim a glutathiona peroxidase promove a ação de redução do H_2O_2 e oxidação da GSH gerando H_2O , O_2 e glutathiona oxidada (GSSG) (WENDEL, 1981). Por outro lado, a glutathiona redutase reduz a GSSG novamente a GSH repondo os níveis de glutathiona com capacidade antioxidante (SIES *et al.*, 1979). Em outro tipo de reação, a glutathiona S transferase- GST forma conjugados de uma série de substratos endógenos e exógenos com a GSH (KEEN *et al.*, 1976). A GSH é importante molécula da defesa antioxidante por participar das reações com enzimas antioxidantes e detoxificantes, mas também por atuar ligando-se, de forma espontânea a ROS, na proteção de grupos sulfidrilas de proteínas e na transdução de sinal (LUSHCHAK, BAGNYUKOVA, 2006).

O estresse oxidativo é caracterizado quando o sistema de defesa antioxidante não consegue suprir os compostos oxidantes que são gerados no organismo do indivíduo, o qual seria responsável por diminuir danos advindos de espécies reativas de oxigênio, radicalares e não radicais livres (BARBOSA *et al.*, 2010), esse estresse pode ser ocasionados por exposição a herbicidas (MODESTO; MARTINEZ, 2009 apud. AHMAD *et al.*, 2004).

Indução de estresse oxidativo e respostas antioxidantes foram identificadas em inúmeros ensaios de contaminação de peixes com glifosato. Distúrbios do sistema antioxidantes foram descritos em espécies *Prochilodus lineatus* (LANGIANO e MARTINEZ, 2008), *Anabas testudineus* e *Heteropneustes fossilis*, (PALAS *et al.*, 2014), *P. lineatus* (MODESTO, 2009), *Astyanax* sp (ROSSI, 2007), *Rhamdia quelen* (FERREIRA, 2010), *Piaractus mesopotamicus* (SHIOGIRI, 2011), *Rhamdia quelen* SOBJAK, 2017).

A atividade da acetilcolinesterase está relacionada à quebra do neurotransmissor acetilcolina em acetato e colina, atuando na transmissão do sinal nervoso. Colinesterases, acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) são reconhecidas pela sua ação detoxificante, ligando ou hidrolisando compostos xenobióticos como os organofosforados (RADIC *et al.*, 2013). Em adição a butirilcolinesterase também atua na proteção contra a contaminação por organofosforados (KLAASSEN; WATKINS III, 2012). Outras funções não clássicas da AChE, distintas da sua capacidade hidrolítica foram identificadas, no papel

de formação de neurite, na adesão celular, formação de sinapses, atividade autócrina, ativação de neurônios dopaminérgicos, reunião de fibras amiloides, hematopoiese e trombopoiese (SOREQ; SEIDMAN, 2001).

Os aminoácidos são importantes substratos para produzir energia em peixes, os quais são oriundos da dieta ou da quebra de proteínas dos tecidos (BEVER *et al.* 1981; JIA *et al.* 2017; YANG *et al.* 2020 apud. RESENDE, 2021). A Glutamato Desidrogenase é uma enzima mitocondrial, importante no metabolismo de aminoácidos e na desintoxicação de amônia, podendo ser encontrada principalmente no fígado, mas também em outros órgãos, integrando os tecidos renais e nervosos. A presença dessa enzima na circulação é capaz de indicar necrose celular, pode se aumentar a atividade plasmática da GLDH quando há danos no fígado decorrentes de substâncias químicas com envolvimento de danos mitocondriais (GOMES, 2014). Sendo essa enzima responsável por interligar o metabolismo dos hidratos de carbono com o de proteínas. Podendo resultar na oxidação do glutamato a α -cetoglutarato e amônio ou a síntese de glutamato dependendo do tecido que se encontra (PINTO, 2019).

3.4 BIOENSAIOS

Os ensaios crônicos são aqueles em que os organismos são observados por um período de tempo maior, acompanhando grande parte da vida dos organismos após exposição a determinadas substâncias. Os efeitos causados por exposições crônicas podem perdurar por longo tempo. Esse teste se diferencia de ensaios agudos, pois em testes agudos os efeitos ocasionados são determinados em um período de tempo menor, de até 14 dias, sob apenas uma dose de substância testada ou várias doses em um período de 24 horas (DUFFUS, 1993).

Em ambientes aquáticos é comum a exposição de organismos a diferentes substâncias químicas, as quais não levam a letalidade, mas que em períodos extensos podem levar a distúrbios na fisiologia ou comportamento desses organismos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006 apud. ARENZON *et al.*, 2013). Assim, os efeitos dessas substâncias podem ser identificados em ensaios crônicos (ARENZON *et al.*, 2013).

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia aplicada nesse experimento de peixes da espécie *P. reticulata* submetidos à exposição por ROUNDUP® WG foi aprovada pela CEUA-Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Fronteira Sul, protocolo CEUA Nº 7233310720 e as análises bioquímicas foram desenvolvidas de acordo com o protocolo utilizado no laboratório de bioquímica da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Laranjeiras do Sul*.

4.1 CULTIVO E ENSAIOS

O experimento foi conduzido no laboratório de Experimentação Animal da Universidade Federal da Fronteira Sul - *Campus Laranjeiras do Sul*. Os ensaios do experimento consistiram em duas fases para análise de peixes da espécie *P. reticulata* submetidos à exposição por glifosato (produto comercial: ROUNDUP® WG), durante período de crescimento e desenvolvimento gonadal e reprodutivo, sendo os animais utilizados no ensaio, descendentes de animais obtidos em estabelecimento comercial.

A primeira fase do experimento consta de ensaio de exposição de machos e fêmeas de *P. reticulata* com glifosato durante a fase de maturação gonadal e reprodução. A fase de exposição dos parentais com glifosato teve duração de 46 dias, onde os animais foram expostos ao glifosato, em concentração de 7 mg/L, que corresponde aproximadamente a 10 % da CL50 por 96 horas de 70,55 mg/L estimada para a espécie por Pires (2013). Os animais foram separados em 4 aquários de 5 L (11 animais por aquário), sendo 2 aquários controles e 2 aquários com glifosato. Os animais foram mantidos em temperatura em torno de 27 e 28 °C com um aquecedor com termostato em cada aquário, oxigenação constante, pH e amônia monitorados semanalmente, foram alimentados diariamente com ração comercial e realizado a troca de 30% da água dos aquários contendo a mesma concentração de glifosato semanalmente.

Os animais foram monitorados diariamente para identificação e registros de mortalidade, sendo os indivíduos em óbito retirados do aquário. Devido a alta mortalidade na primeira fase do experimento, novas buscas na literatura foram realizadas para iniciar a segunda fase, relatos de Rocha (2015) foram acessados, indicando a CL50, 96 horas, estimada em $3.6 \pm 0.4 \text{ mg.L}^{-1}$ de glifosato (produto comercial ROUNDUP® WG) para *P. reticulata*,

assim, foi reduzida para 1,5 mg/L. A partir da readequação da concentração teste, o experimento foi realizado com 4 aquários de 5 L, com 7 animais por aquário, sendo 2 aquários contaminados e 2 aquários controles, com animais na fase de maturação gonadal, seguindo a manutenção dos animais e ambiente da fase anterior, mas com duração de 82 dias.

4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As análises bioquímicas foram executadas no laboratório de Bioquímica/Genética da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Laranjeiras do Sul. Após os 82 dias de experimentos, os 19 indivíduos sobreviventes que apresentavam o fenótipo sexual definido foram analisados, sendo 7 animais expostos ao glifosato e 12 animais controle. Os animais foram anestesiados e sacrificados para extração dos órgãos (fígado, intestino, brânquias, músculo, rim e gônada), através da técnica de aprofundamento da anestesia sob absorção branquial com benzocaína (100 mg/L). Os órgãos foram extraídos com auxílio de pinças anatômicas e tesouras cirúrgicas, separados em microtubos de centrifugação (tipo eppendorf) para cada animal. Esses foram então homogeneizados em tampão fosfato 7,2 em gelo e centrifugados em 11.000 *xg*, a 4 °C para realização de análises de atividade das enzimas colinesterase (ELLMAN *et al.*, 1961), glutamato desidrogenase (GLDH) (CIARDIELLO *et al.*, 2000) e Glutathione S transferase - GST (HABING *et al.*, 1974) e marcador de estresse oxidativo (dano celular - peroxidação lipídica - LPO). As enzimas alocadas em microplacas foram avaliadas por leitura espectrofotométrica. O método de Bradford (1976) foi usado para estimativa da concentração de proteínas e padronização da expressão dos resultados bioquímicos

4.2.1 Método de Bradford (BRADFORD, 1976)

Método utilizado para determinar a quantidade de proteína nos órgãos (fígado, intestino, brânquias, músculo, rim e gônadas) dos parentais de *P. reticulata* desse estudo. O método consiste em vincular o reagente Azul Brilhante de Coomassie G-250 com a proteína da amostra, ao se ligarem, corante e proteína, a coloração vermelho-castanha é convertida para azul. Esta ligação possui grande sensibilidade para determinação de proteína e as leituras são realizadas com espectrofotômetro a 595 nm (BRADFORD, 1976). A determinação da proteína pelo método de Bradford requer o preparo da curva padrão de albumina, sendo utilizados microtubos (tipo eppendorf) para diluição da solução com água destilada,

garantindo uma concentração de albumina de 0; 0,02; 0,05; 0,12; 0,25; 0,5; 0,75 mg/dl para curva padrão. Em microplacas de 96 poços foram pipetadas em triplicata 10 μ L das amostras homogeneizadas, 10 μ L da solução de homogeneização (branco), 10 μ L da curva padrão de albumina e em todos os poços 250 μ L de reativo de Bradford. Mantendo a placa protegida da luz com papel alumínio por 5 minutos para posteriormente medir absorbância a 595 nm no espectrofotômetro. A expressão dos resultado foi realizada em mg de proteína.mL⁻¹.

4.2.2 Marcador de Dano- LPO- Peroxidação lipídica (TBARS)

A determinação da peroxidação lipídica (estresse oxidativo em órgãos/tecidos) foi avaliada através do Método TBARS, caracterizado pela reação de molondialdeído (MDA) e ácido 2- tiobarbitúrico (TBA). O procedimento consistiu em pipetar em duplicata 40 μ L do sobrenadante da amostra de órgãos homogeneizados, 40 μ L de H₂Omq (branco), 40 μ L de diferentes concentrações de MDA para preparação de curva padrão de MDA, 10 μ L de BHT em todos os poços da microplaca com micropipeta multicanal, 140 μ L de tampão PBS, 50 μ L de TCA 50% com multicanal e pipetar 75 μ L de TBA 1,3% em NaOH 0,3% com micropipeta multicanal. A microplaca permaneceu em banho maria por 1 hora a 60°C. E após resfriar a placa, foi medido absorbância no espectrofotômetro a 535 nm, com resultados expressos em μ mol MDA. mg de proteína⁻¹ (FEDERICI; SHAW; HANDY, 2007).

4.2.3 Defesa antioxidante- Glutathione S Transferase – GST

Através do Método de Habing *et al.* (1974) foi determinado a atividade da enzima de defesa antioxidante Glutathione S Transferase (GST). Em microplacas de 96 poços foi pipetado 10 μ L das amostras homogeneizados em duplicata, 20 μ L de tampão fosfato de potássio (branco) pH 6,5, com pipeta multicanal foi pipetado 180 μ L do sistema de reação. Logo em seguida medida a absorbância a 340 nm no espectrofotômetro durante 5 minutos, com intervalos de 30 segundos. O sistema de reação (125 poços) é caracterizado por conter tampão fosfato de potássio pH 6,5 com 100 mM, GSH 1,5 mM , CDNB em etanol 2 mM, sendo os resultados expressos em μ moles de tio éter formado .min⁻¹.mg de proteína⁻¹= U.mg de proteína⁻¹.

4.2.4 Marcador enzimático da biotransformação de xenobióticos e neurotóxica: Acetilcolinesterase

A análise foi desenvolvida de acordo com o método colorimétrico de Ellman *et al.* (1961). O procedimento consistiu primeiramente em normalizar a proteína das amostras dos órgãos através da diluição em tampão fosfato de potássio 0,1, pH 7,5. Em microplaca de 96 poços foram pipetadas em duplicata 20 μL do tampão (branco), também 20 μL do sobrenadante da amostra, 130 μL de solução de DTNB (Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico) e imediatamente foi pipetado com multicanal 50 μl de iodeto de acetilcolina. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca com absorvância de 405 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{moles de 2-nitrobenzoato-5-mercaptotocolina.minuto}^{-1} .\text{mg de proteína}^{-1} = \text{U. mg de proteína}^{-1}$.

4.2.5 Marcador de metabolismo de aminoácidos: Glutamato Desidrogenase (GLDH)

A análise desenvolvida nesse estudo está de acordo com Bidigare *et al.* (1981) e Ciardiello *et al.* (2000). A GLDH é caracterizada por ser uma enzima presente nas mitocôndrias e importante na síntese de amônia. Sua atividade é cinética por meio da formação de NADH ou NADPH, com conversão de glutamato em α -cetoglutarato, com aumento de absorvância em 340 nm. O procedimento consistiu em pipetar 10 μL da amostra do sobrenadante em duplicata, pipetar 15 μL de tampão Tris-HCl 50 mM (branco) e 65 μL do sistema de reação com micropipeta multicanal. A absorvância foi de 340 nm, durante 8 minutos com intervalos de 30 segundos. O sistema de reação foi constituído por Tampão Tris-HCl pH 7,4 100 mM, ; NADP2 mM,; ADP 0,08 mM,; L-Glutamato 40 mM. Os resultados foram expressos em $\mu\text{moles de NAD}^+ \text{reduzido} \times \text{min}^{-1} .\text{mg de proteína}^{-1} = \text{U.mg de proteína}^{-1}$.

4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados bioquímicos de fígados e músculos de *P. reticulata* foram expressos com as médias e barras de desvio padrão, sendo esses submetidos aos testes de normalidade e homocedasticidade para aplicação ou não de estatística paramétrica. Na ausência de atendimento desses pressupostos teóricos foi estabelecido o uso do teste de Kruskal-Wallis, (1952) para análise não paramétrica. Desse modo, a avaliação de diferenças significativas dos

resultados para LPO, GST, GLDH foi efetuada com a ANOVA e da colinesterase com o teste de Kruskal-Wallis (1952).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período dos ensaios houve um bom controle das variáveis físicas e químicas da água, de forma que nos aquários foram mantidos níveis considerados normais para padrões estabelecidos em água doce. Os resultados expressos em média e desvio padrão demonstraram uma variação do pH de 7.40 ± 0.198 , e de amônia de $0.003 \text{ mg/L} \pm 0.001 \text{ mg/L}$ para a água dos animais em teste, e pH 7.77 ± 0.204481 , amônia de $0.006 \text{ mg/L} \pm 0.003281 \text{ mg/L}$ para a água do aquário controle. Do mesmo modo os níveis de aeração promoveram uma boa disponibilidade de oxigênio dissolvido e a temperatura se manteve estável em todo o período, com variação de $27,7 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,61$.

Em ambas as fases do experimento foram observadas mortalidades de animais, contudo, na primeira fase a contaminação com 7 mg/L (produto comercial ROUNDUP® WG) foi suficiente para causar o decréscimo da sobrevivência aos 12 dias e a mortalidade de 90% dos indivíduos em 46 dias. Esse evento inviabilizou a realização de análises bioquímicas para identificar vias metabólicas e órgãos que pudessem estar associados com esse resultado.

ROCHA *et al.*, (2015) indicam que a CL50 de 96 horas para *P. reticulata* contaminado com Roundup foi estimada em $3.6 \pm 0.4 \text{ mg GLI L}^{-1}$. PIRES, (2013) traz a CL50 por 96 horas de $70, 55 \text{ mg/L}$ estimada para fêmeas de *P. reticulata*. ANTUNES, *et al.* 2017, com CL50 de 96 horas de $70,87 \text{ mg l}^{-1}$ de glifosato para fêmeas da espécie. Ensaios por SOBJAK *et al.*, (2017) sobre o desenvolvimento embrionário em *Rhamdia quelen*, foram elaborados com valores de $6,5 \text{ mg.L}^{-1}$, e a concentração de 25 mg/L de glifosato foi recomendada pelo Programa de Pesticidas da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), para ensaios crônicos em peixes. Os resultados encontrados, assim como os relatos da literatura, demonstram que há grande variação do efeito tóxico de contaminação por glifosato em peixes. Aparentemente estas variações de efeitos podem estar relacionados a diferenças de resistência das espécies estudadas, ou ainda da idade dos indivíduos, porém, outra suposição é que os efeitos provocados nas espécies estão associados ao uso de diferentes produtos comerciais a base glifosato e não especificamente ao princípio ativo glifosato.

Na segunda fase do experimento optou-se pela redução de glifosato para $1,5 \text{ mg/L}$ (produto comercial ROUNDUP® WG), foi possível identificar mortalidade dos animais a partir do vigésimo oitavo dia, mas com uma taxa de sobrevivência maior ao longo do tempo, com 67,86% de sobrevivência em 82 dias de ensaio. Os marcadores bioquímicos foram usados nesse momento para compreender a taxa de mortalidade da espécie em resposta a

concentração de glifosato, e suas possíveis interferências nas vias de metabolismo de aminoácidos (marcador GLDH), defesa antioxidante (marcador GST), estresse oxidativo (marcador LPO) ou efeitos neurotóxicos (marcador colinesterase) em fígado e músculo dos animais.

O glifosato é identificado como agente que altera a fisiologia e comportamento animal, há registros na literatura que apresentam alteração na locomoção, comportamento e morfologia dos animais (BRIDI, 2017), efeitos citotóxicos (TUREK *et al.*, 2017), inibição da atividade da ChE (GLUSCZAK *et al.*, 2006; MODESTO AND MARTINEZ, 2010), danos oxidativos e interferência no sistema de defesa antioxidante (CATTANI *et al.* 2014; SOBJAK *et al.*, 2017; GALLEGOS *et al.*, 2018; SOBJAK *et al.* 2018; TEIXEIRA, *et al.*, 2018; WILKENS *et al.*, 2017), distúrbios neurodegenerativos (HERNANDEZ-PLATA *et al.*, 2015; GALLEGOS *et al.*, 2018, NISHIYORI *et al.*, 2014), distúrbios reprodutivos (LOPES *et al.*, 2014; CAVALLI *et al.*, 2013), embriotóxicos (ZEBRAL *et al.*, 2018), desregulação endócrina (ROMANO *et al.*, 2009; PIRES, 2013; DEFARGE *et al.*, 2016; DRUART *et al.*, 2017; WILKENS *et al.*, 2017).

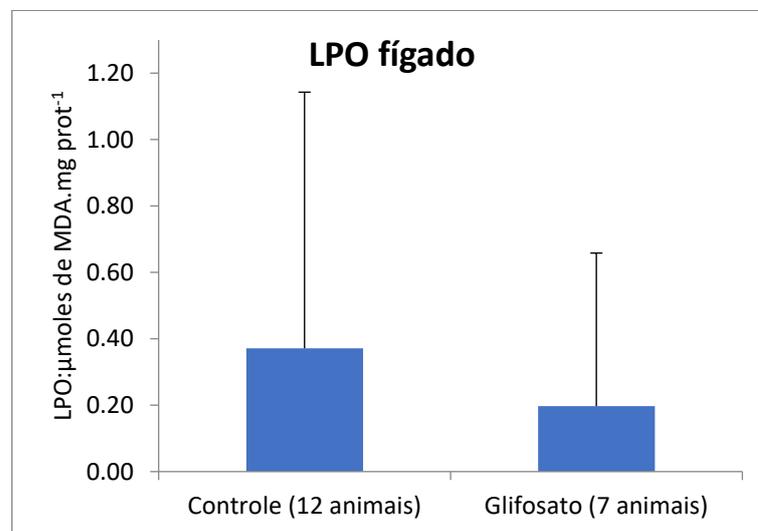
Algumas limitações podem ser observadas com relação ao uso de peixes de tamanho pequeno como a espécie *P. reticulata*. Embora possa se fazer ensaios com volumes reduzidos de contaminantes em laboratório, há simultaneamente uma redução da quantidade de amostra para análise em função das maiores taxas de mortalidade ao longo do ensaio. Outro detalhe é que a variação dos dados é tão grande, que os resultados de desvio padrão para respostas bioquímicas podem se aproximar dos valores de média, inviabilizando o uso de testes paramétricos.

5.1 MARCADOR DE DANO- LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO)

Espécies reativas de oxigênio ao se conectarem com lipídios de membranas podem causar danos significativos, como a desestruturação da configuração membranar, resultando na morte das células (NELSON; COX, 2014). O fígado é o órgão responsável pela desintoxicação dos animais, diante disso, as concentrações de EROs e componentes antioxidantes são parâmetros importantes para indicar situações de estresse (SANCHEZ, 2015). Assim a insuficiência de vias antioxidantes pode levar a ocorrência de peroxidação lipídica (MODESTO; MARTINEZ, 2009), e por isso a LPO é frequentemente usada como marcador de estresse oxidativo (LUSHCHAK *et al.*, 2009).

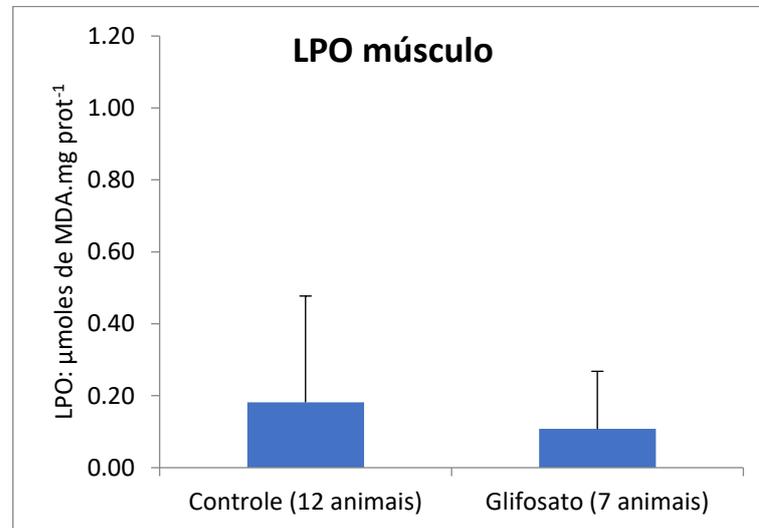
Os dados encontrados no Gráfico 1 e Gráfico 2 demonstram que não foi possível identificar alterações de LPO em fígado e músculo de *P. reticulata* submetidos ao tratamento com glifosato e controle nesse estudo. Em contraposição Modesto e Martinez (2009) perceberam respostas de liperoxidação no fígado caracterizados pelo aumento de MDA em peixes da espécie *Prochilodus lineatus*, quando esses foram submetidos a exposição de 10 mg.L⁻¹ de Roundup®, registrando aumento de LPO após 24 e 96 horas nos indivíduos. Por outro lado Gluczak *et al.* (2009) identificaram aumento de MDA nos músculos da espécie de peixe *Rhamdia quelen* expostos a concentração de Roundup® de 0,2 e 0,4 mg.L⁻¹ por 96 horas. Dados de Harayashiki *et al.* (2013) evidenciaram que a redução de LPO em fígado de peixes machos de *P. vivípara* ocorreram a exposição de de 0,70 mg.L⁻¹ de Roundup®, não havendo efeito algum nas brânquias e músculos. Nesse estudo não foram observados respostas significativas da concentração de LPO tecidual em fêmeas, nos animais contaminados e expostos ao Roundup®.

Gráfico 1 – Níveis de LPO em fígado de *P. reticulata* expostos a 1,5 mg/L de ROUNDUP® WG durante 82 dias



Fonte: Santos, 2022.

Gráfico 2 – Níveis de LPO em músculo de *P. reticulata* expostos a 1,5 mg/L de ROUNDUP® WG durante 82 dias



Fonte: Santos, 2022.

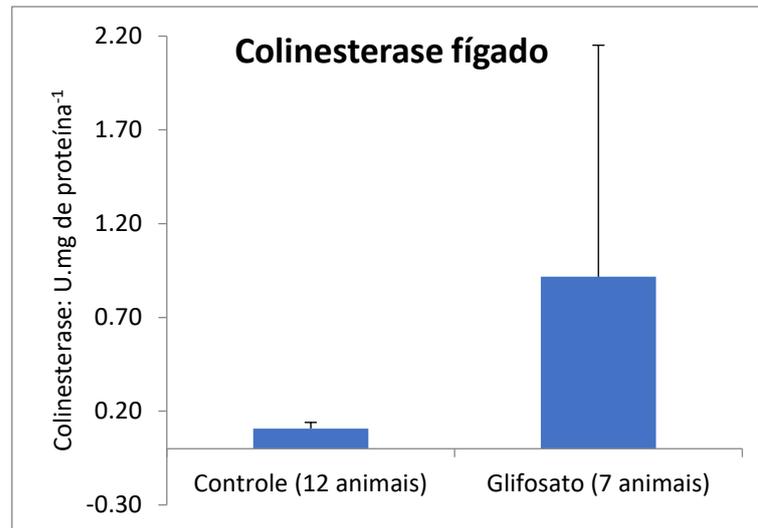
5.2 ACETILCOLINESTERASE

A acetilcolinesterase é caracterizada por ser uma enzima importante na transmissão do impulso nervoso (MOTA, 2012). A indução ou inibição da colinesterase pode influenciar no processo de neurotransmissão colinérgica e promover efeitos de letargia ou nado errático (MIRON *et al.*, 2005), e quando altos níveis de inibição são estabelecidos a paralisia pode causar a morte do animal (CATTANEO *et al.*, 2011).

Em peixes, a ação do glifosato sobre a atividade da AChE ainda é controversa. No presente estudo não houve alterações em fígado (gráfico 3) e músculo (gráfico 4) dos parentais de *P. reticulata* submetidos ao glifosato e ao controle. Entretanto, em outras espécies a inibição da AChE foi observada em músculo (SANCHEZ, 2015) e em *Cnesterodon decemmaculatus* houve redução da atividade em homogenato do corpo animal (MENÉNDEZ-HELMAN *et al.*, 2012), porém uma ausência de interferência em tecido muscular e uma redução, dependente da concentração em tecido nervoso foi observada em animais da espécie *Leporinus obtusidens* (GLUSCZAK *et al.*, 2006). Outros estudos demonstraram que a AChE não sofre interferência do glifosato, *Danio rerio* (LOPES; ROSA 2012), ou ainda induz aumento de atividade, como em *Anabas testudineus* e *Heteropneustes fossilis* (PALAS *et al.*, 2014) e em músculo de *Leporinus obtusidens* (SALBEGO *et al.*, 2016). Em embriões de *Rhamdia quelen* submetidos ao glifosato foi observado ausência de interferência em 6 horas,

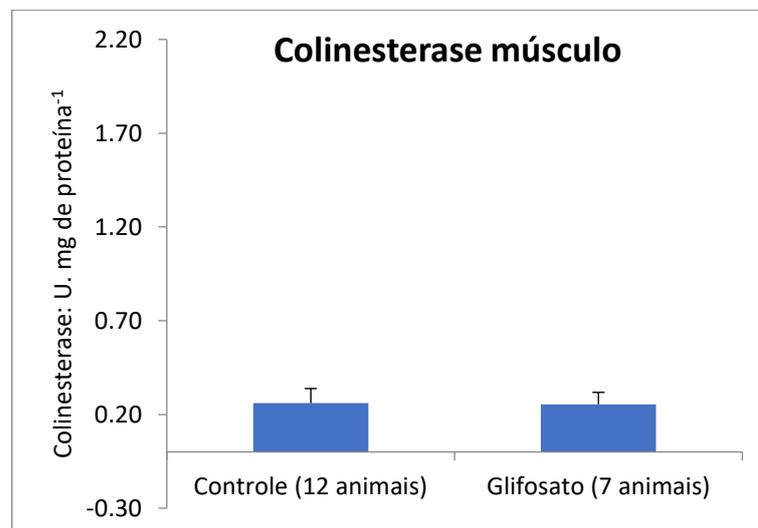
indução da atividade da acetilcolinesterase em 12 horas e inibição em 24 horas de contaminação (SOBJAK *et al.*, 2017).

Gráfico 3 – Atividade da Colinesterase em fígado de *P. reticulata* expostos a 1,5 mg/L de ROUNDUP® WG durante 82 dias



Fonte: Santos, 2022.

Gráfico 4 – Atividade da Colinesterase em músculo de *P. reticulata* expostos a 1,5 mg/L de ROUNDUP® WG durante 82 dias



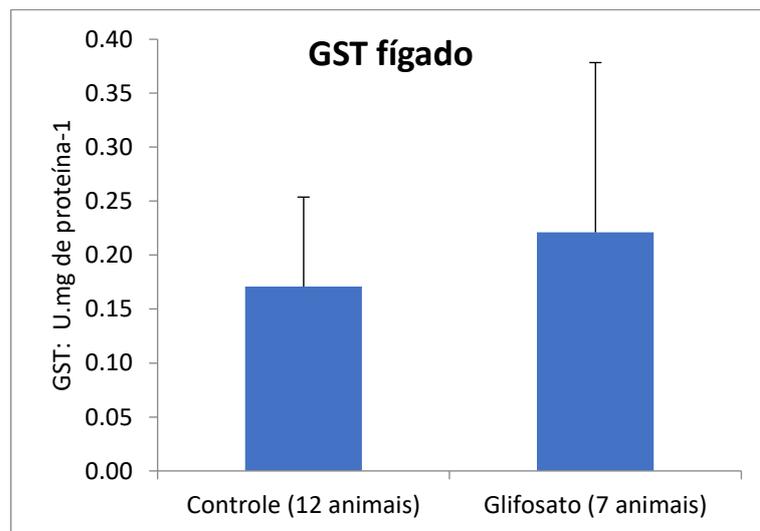
Fonte: Santos, 2022.

5.3 GLUTATIONA S TRANSFERASE – GST

A Glutathione S-Transferase compõe uma família de enzimas multifuncionais (HUBER *et al.*, 2008), sendo capaz de catalisar a conjugação de compostos exógenos com Glutathione Reduzida (GSH) (OLIVEIRA, 2012) e remover eletrófilos reativos para proteger proteínas e ácidos nucleicos dos organismos (NUNES *et al.*, 2006 apud. FERREIRA *et al.*, 2010). Desse modo pode ser utilizada como um eficiente marcador fisiológico, especialmente em exposição a elementos contaminantes.

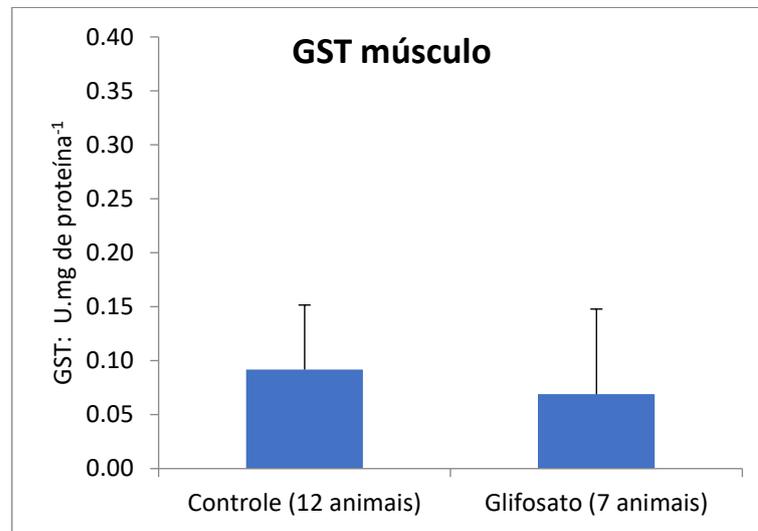
Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram a não alteração da atividade da GST na exposição de *P. reticulata* a 1,5mg/L de ROUNDUP® WG em fígado (gráfico 5) e músculo (gráfico 6) em um período de 82 dias. Modesto; Martinez (2010) trazem estudos que abordam o aumento da atividade da GST após 24 e 96 horas dos peixes na espécie *Prochilodus lineatus* expostos a Roundup®. Já Luschchak *et al.* (2009) trazem em seus estudos a diminuição de 29-34% da atividade da GST em fígado de *Carassius auratus L.* após 96 horas de contaminação por Roundup® em concentrações de 2,5-20 mg L⁻¹. Harayashiki *et al.*, (2013) apresenta em seus estudos nenhum efeito significativo na atividade de GST em músculo, brânquias e fígado de machos e fêmeas da espécie *Poecilia vivipara* expostos a Roundup. Além disso, nos estudos de Menezes *et al.*, (2011) essa enzima se encontrou reduzida em *Rhamdia quelen*.

Gráfico 5 – Atividade da GST em fígado de *P. reticulata* expostos a 1,5 mg/L de ROUNDUP® WG durante 82 dias



Fonte: Santos, 2022.

Gráfico 6 – Atividade da GST em músculo de *P. reticulata* expostos a 1,5 mg/L de ROUNDUP® WG durante 82 dias



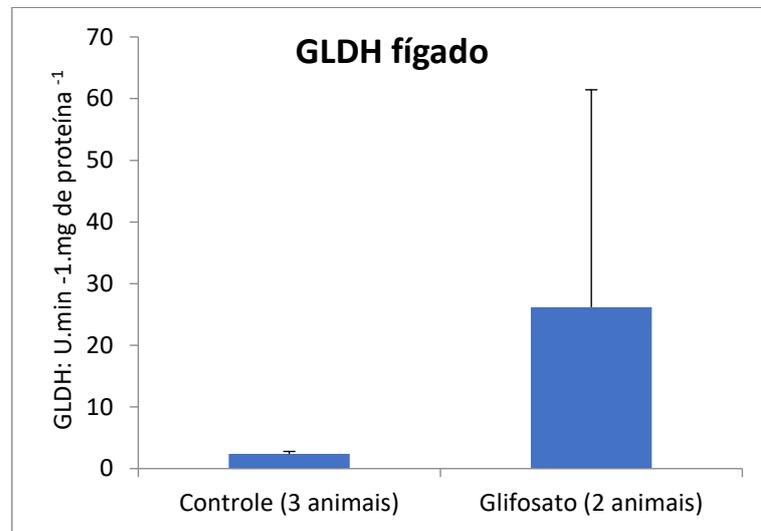
Fonte: Santos, 2022.

5.4 GLUTAMATO DESIDROGENASE –GLDH

Levando em consideração que o fígado é um órgão muito importante no metabolismo de aminoácidos nas células de animais (MELLO, 2011), muitos sintomas de intoxicação podem ser percebidos através da redução ou aumento de alguns compostos teciduais. A GLDH, por exemplo, é uma enzima presente especialmente no fígado dentro das mitocôndrias, mas pode ser encontrada em outros tecidos (GONZALEZ, 2000 apud. BATISTA, 2016), que tem potencial de indicação de processo toxicológico.

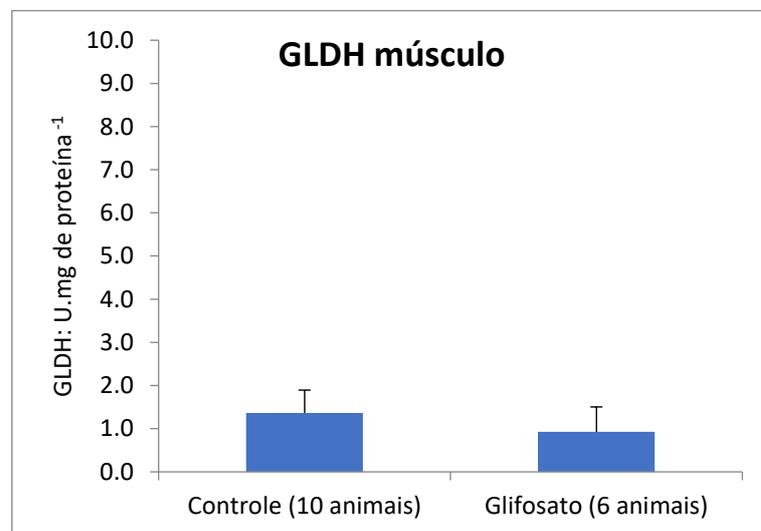
Como apresentado no gráfico 7 e gráfico 8, não foi possível identificar alterações nessa enzima na exposição de *P. reticulata* a 1,5mg/L de ROUNDUP® WG em um período de 82 dias. Não sendo encontrado na literatura resultados acerca do presente estudo em outras espécies de peixes contaminados por glifosato.

Gráfico 7 – Atividade GLDH em fígado de *P. reticulata* expostos a 1,5 mg/L de ROUNDUP® WG durante 82 dias



Fonte: Santos, 2022.

Gráfico 8 – Atividade GLDH em músculo de *P. reticulata* expostos a 1,5 mg/L de ROUNDUP® WG durante 82 dias



Fonte: Santos, 2022.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo traz a importância de otimizar o manejo do agroecossistema de forma a minimizar impactos ocasionados a espécies do ambiente aquático. Ao serem registradas mortes de animais no primeiro e segundo ensaio de exposição dos animais ao glifosato (ROUNDUP® WG), pode se identificar o potencial tóxico do glifosato nas concentrações de 7 e 1,5 mg/L de glifosato para a espécie *P. reticulata*. Assim, foram selecionados marcadores que pudessem identificar vias metabólicas e órgãos relacionados à mortalidade nos ensaios.

A exposição crônica por ROUNDUP® WG sob concentração de 1,5 mg/L em peixes da espécie *Poecilia reticulata* não resultou em alterações nas atividades das enzimas de defesa antioxidante (GST), biotransformação de xenobióticos e neurotóxica (colinesterase), de marcadores do metabolismo de aminoácidos (GLDH) e também não houve interferência nas vias metabólicas de estresse oxidativo (marcador LPO) no fígado e músculo dos animais.

Os resultados das análises bioquímicas não foram capazes de elucidar quais as interferências fisiológicas que causaram a morte dos animais expostos ao herbicida à glifosato. Entretanto, após o período de ajuste comportamental de tolerância pode haver uma reorganização metabólica, induzindo resposta das enzimas e depois uma modificação tecidual que pode se manifestar na estrutura celular, o que poderia ser averiguado através de estudos histológicos dos órgãos para explicar o fenômeno de mortalidade.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Oxygen Radicals in Biological Systems. **Methods Enzymol**, New York. v. 105, p. 121-126, 1984.
- ANDRIGHETTI, M.S. *et al.* Biodegradação de glifosato pela microbiota de solos cultivados com macieira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 5, p. 1643-1653, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832014000500029>. Acesso em: 18 maio 2021.
- ANTUNES, A. M. *et al.* Gender-specific histopathological response in guppies *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate or its metabolite aminomethylphosphonic acid. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 9, p. 1098–1107, 2017. Disponível em: <<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jat.3461>>. Acesso em: 12 maio 2021.
- ARENZON, A. *et al.* A determinação da toxicidade crônica para peixes baseada apenas na sobrevivência é suficiente? **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 8, n. 2, p. 65–68, 2013. Disponível em: <<https://siaiap32.univali.br/seer/index.php/eec/article/viewFile/4523/2723>>. Acesso em: 2 Mar. 2022.
- BARONAS, R. L. Agrotóxico versus pesticida: notas de leitura sobre polêmica e amemória discursiva. **Bakhtiniana: Revista de Estudos do Discurso**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 62-87, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2176-457339267>. Acesso em: 26 mar. 2022.
- BATISTA, C. **Indicadores de lesão e função hepática**. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 10, 2016.
- BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010 . Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>. Acesso em: 20 mar. 2021.
- BASTOS, D. N. **Toxidade do herbicida glifosato em *Daphnia magna* e pós-larvas de *Rhamdia quelen***. 2013. 39 f. Dissertação - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2013.
- BIDIGARE, R. R.; KING, F. D. The measurement of glutamate dehydrogenase activity in pranus flexuosus and its role in the regulation of ammonium excretion*comp.biochem. physiol. v. 70b, p. 409-413. 1981.
- BOHM, G.M.B.; ROMBALDI. C.V. Transformação genética e aplicação de Glifosato na microbiota do solo, fixação biológica de nitrogênio, qualidade e segurança de grãos de soja geneticamente modificada. **Ciência Rural**, v.40, n.1, p. 213-221, 2010.
- BOHM, G.M.B. *et al.* **Controle de plantas daninhas, biomassa e metabolismo microbiano do solo em função da aplicação de glifosato ou imazetapir na cultura da soja**. Semina:

Ciências Agrárias, Londrina, v. 32, n. 3, p. 919-930, 2011. Disponível em: <file:///C:/Users/aanal/Downloads/4502-35511-1-PB.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2021.

BOIARSKI, D.R. *et al.* Assessment of antioxidant system, cholinesterase activity and histopathology in *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to water from an urban stream. **Ecotoxicology**, London, England. v. 29,3, p. 314-326, 2020.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/942051/>>. Acesso em: 2 Mar. 2022.

BRASIL, Constituição, Lei nº 7.802, 11 DE JULHO DE 1989. Lei dos Agrotóxicos. Brasília, DF, 1989.

BRASIL. DECRETO Nº 4.074, 4 DE JANEIRO DE 2002. Decreto dos Agrotóxicos. Brasília, DF, 2002.

BRIDI, Daiane. **Efeitos da exposição ao glifosato sobre parâmetros comportamentais em peixe-zebra (Danio rerio)**. 71 f. Dissertação (Pós Graduação em Biotecnologia Farmacêutica) da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2017.

CARNEIRO, F. F. *et al.* . **Dossiê ABRASCO**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde., Rio de Janeiro / São Paulo, 2015. Disponível em: https://www.abrasco.org.br/dossieagrotoxicos/wp-content/uploads/2013/10/DossieAbrasco_2015_web.pdf. Acesso em: 12 maio 2021

CATTANI, D. *et al.* Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: Involvement of glutamate excitotoxicity. **Toxicology**, v. 320, n. 1, p. 34-45, 2014.

CATTANEO, R. *et al.* Toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposed to a commercial formulation containing glyphosate. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, New York, Springer Verlag, v. 87, p. 597–602. 2011.

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

CIARDIELLO, M. A. *et al.* L-Glutamate dehydrogenase from the Antarctic fish *Chaenocephalus aceratus*. Primary structure, function and thermodynamic characterisation: relationship with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta**, NY, Elsevier, v. 1543,1 p. 11-23, 2000.

CROUCH R.K. *et al.* The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 30, p. 235-241, 1981.

DAMALAS, C.A.; ELEFTHEROHONIOS, I. G. Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk

Assessment Indicators, **International Journal of Environmental Research and Public Health**, MDPI, v. 8, p. 1402–1419, 2011.

DEFARGE, N. *et al.* Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels. **Int J Environ Res Public Health**, MDPI, v.13, p. 1-17, 2016.

DIAMOND, B. J. J. *et al.* **Acquired Brain Injury: Clinical essentials for neurotrauma and rehabilitation professional**, New York, Springer Publishing Company, p. 348 , 2017.

DRUART, C. *et al.* A full life-cycle bioassay with *Cantareus aspersus* shows reproductive effects of a glyphosate-based herbicide suggesting potential endocrine disruption. **Environmental Pollution**, v. 226, p. 240–249, 2017.

DUFFUS, J.H. Glossary for chemists of terms used in toxicology. (IUPAC Recommendations), 1993. **Pure and Applied Chemistry**, v. 65, p. 2003-2122, 1993.

DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, v. 64, n. 1, p. 319–325, 2008.

ELLMAN , G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Iochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 7, ed. 2, p. 88-95, Julho 1961. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0006295261901459?via%3Dihub>. Acesso em: 4 jan. 2022.

FEDERICI, G.; SHAW, B.J., HANDY, R.D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v.84, p.415-430, 2007.

FERREIRA, Daiane. **Parâmetros de Estresse Oxidativo e Estudo de Lesões Histopatológicas em Jundiás (*Rhamdia Quelen*) Expostos a Agroquímicos**. 2010. 55 f. Dissertação – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

FERREIRA, L. S.V. **Efeitos histopatológicos dos agrotóxicos deltametrina, imidacloprido, glifosato e diuron nas brânquias de quatro espécies de peixes amazônicos**. 42 f. Dissertação(Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2016.

FERREIRA, T. **BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS E ECOTOXICIDADE POR COBRE EM *Eisenia andrei* (Bouché 1972)**. 68 f. Dissertação- Curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração em Organismos do Solo e Insumos Biológicos à Agricultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), 2015.

FLORES, A. V. *et al.* Organoclorados: um problema de saúde pública, **Ambiente & Sociedade**, v.7, nº. 2, 2004.

GALLEGOS, C.E *et al.* Perinatal Glyphosate-Based Herbicide Exposure in Rats Alters Brain Antioxidant Status, Glutamate and Acetylcholine Metabolism and Affects Recognition Memory. **Neurotoxicity research**, v. 34, p. 363-374, 2018.

GLUSCZAK, L. *et al.* Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 65, p. 237–241, 2006.

GOMES, D. L. F. **Biomarcadores para Avaliação da Lesão Hepática Induzida por Fármacos**. 60 f. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Departamento de Química, Bioquímica e Farmácia. Universidade do Algarve, 2014.

GONZALEZ, F. H. D., SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 3ª edição. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

GUYTON, K. Z. *et al.* Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **The Lancet Oncology**, v. 16, p. 490–491, 2015.

GUTTERIDGE, J.M.C. Freeradicals in disease processes: A compilation of cause and consequence. **Free Rad. Res. Commum.**, v.19, p.141-1583, 1993.

HABING, W. H. *et al.*, Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

GUTTERIDGE, J. M., HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 899, p. 136–147, 2000.

HARAYASHIKI, C.A.Y. *et al.* Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. **Aquat. Toxicol.** Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press, v. 142–143, p. 176–184, 2013.

HERNANDEZ-PLATA *et al.* The herbicide glyphosate causes behavioral changes and alterations in dopaminergic markers in male Sprague-Dawley rat. **NeuroToxicology**, v. 46, p. 79–91, Jan. 2015.

HERMES-LIMA, M., Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In: Storey, K.B. **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**, Hoboken, John Wiley & Sons, cap. 12. 1., p. 319–368, 2004.

HILBIG, C. C.; MAKRAKIS. S. **POTENCIAL DE INTRODUÇÃO DE ESPÉCIES DE PEIXES ORNAMENTAIS NÃO-NATIVAS NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ**. Anais do I Seminário Internacional de Ciência, Tecnologia e Ambiente, UNIOESTE, Cascavel – Paraná – Brasil, 2009.

HUBER, P. C. *et al.* Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, Brasil, PubliSBQ, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500046>. Acesso em: 2 mar. 2022.

KEEN, J.H. *et al.* Mechanism for Several Activities of the Glutathione S transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183-6188, Oct. 1976.

KLAASSEN C. D., WATKINS III, J. B. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull**. 2. ed. Porto Alegre, Artmed, 2012.

KRUSKAL, W. H; WALLIS, W. A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, v. 47, n. 260, p. 583–621, 1952.

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

LOPES, F.M., ROSA, C. E. Efeito da Exposição ao Herbicida Glifosato Sobre a Atividade da Enzima Acetilcolinesterase do Peixe Danio rerio. **XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**, Porto de Galinhas – PE, 2012.

LUSHCHAK, O.V *et al.* Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. **Chemosphere**, Oxford, Elsevier Science, v. 76, p. 932-937, 2009.

LUSHCHAK, V. I; BAGNYUKOVA, T. V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 144 p. 283-289, 2006.

MAGURRAN, A. E. *et al.* The Behavioral Diversity and Evolution of Guppy, *P. reticulata*, Populations in Trinidad. **Advances in The Study of Behavior**. San Diego, CA, Academic Press, v. 24, p. 155 – 202, 1995.

MELLO, Sandra Regina. **CLONAGEM DO cDNA E SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE QUE CODIFICA A ENZIMA GLUTAMATO DESIDROGENASE HEPÁTICA DE OVINO**. 53 f. Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Estado de Santa Catarina, 2011.

MENÉNDEZ-HELMAN, R. J. *et al.* Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. **Bull Environ Contam Toxicol**. v.88, n. 1, p. 6-9, Jan. 2012.

MENEZES, C. C. *et al.* Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol**, v. 60, n. 4, p. 665-671, 2011.

MIRON, D. *et al.* Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicol Environ. Saf**, v. 61, p. 398-403, 2005.

MODESTO, K.A., MARTINEZ, C.B.R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, Oxford, Elsevier Science, v. 78, p. 294-299, 2010.

MODESTO, Kathya Assmann. **Efeitos de dois herbicidas à base de glifosato para um peixe neotropical, com enfoque nos biomarcadores bioquímicos**. 2009. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Área de Concentração Zoológica). Universidade Estadual de Londrina: Paraná, 2009.

MONTEIRO, André Luiz Viard Walsh. **Desempenho do Guppy (*Poecilia reticulata*) em modelos de ansiedade: campo aberto, preferência claro-escuro e labirinto em cruz com rampa**. 2016. 85 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento. Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento, Belém, 2016.

MORLEY, T. **Pesticides, while not perfect, have been major contributors to our current state of food abundance**. Dez. 2019. Disponível em: <https://www.humanprogress.org/stuff-of-progress-pt-5-chemical-pesticides/>. Acesso em: 25 abril 2020.

MOTA, W.M. *et al.* Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Brasil, v. 14, n. 4, p. 624-628, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516->. Acesso em: 12 fev. 2022.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NISHIYORI, Y. *et al.* Unilateral hippocampal infarction associated with an attempted suicide: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–4, 2014.

OLIVEIRA, D. M. *et al.* GLIFOSATO NAS PORTARIAS DE POTABILIDADE DA ÁGUA DOS DEZ PAÍSES MAIS CONSUMIDORES DE AGROTÓXICOS, **Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde da UNIARP**, Brasil, v. 10, n.1 (20), 2021. Disponível em: <https://periodicos.uniarp.edu.br/index.php/ries/article/view/2686/1334>. Acesso em: 2 mar. 2022.

OLIVEIRA, D. M. de. **Atividade quimiossensibilizante e antitumoral in vitro do 8-metoxipsoraleno, um novo inibidor da glutathione S-transferase- π** . 164 f. Tese (Doutorado em Patologia Humana) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.

PALAS, S.; SANDIPAN, P.; ALOKE, K. M.; APURBA, R.G. Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 107, p. 120-125, September, 2014.

PERES, Frederico *et al.* AGROTÓXICOS, SAÚDE E AMBIENTE: uma introdução ao tema. *In*: PERES, Frederico. **É veneno ou é remédio?**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. cap. 01, p. 21-41. Disponível em: https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/cap_01_veneno_ou_remedio.pdf. Acesso em: 12 maio 2021.

PIGNATI, Wanderlei Antonio *et al.* Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciênc. saúde coletiva**, Brasil, vol.22, n.10, p. 3281-3293, 2017.

PINTO, Íris Nadine da Rosa. **Função e disfunção da glutamato desidrogenase: regulação metabólica e patologias associadas**. Trabalho Final de Mestrado Integrado, Ciências Farmacêuticas, Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia, 2019.

PIRES, F. S. **DISRUPÇÃO ENDÓCRINA EM TESTÍCULOS DE *Poecilia reticulata* CAUSADA PELO HERBICIDA GLIFOSATO**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia, área de concentração Biologia Celular e Molecular. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. 2013.

RADIC, Z. *et al.* Catalytic detoxification of nerve agent and pesticide organophosphates by butyrylcholinesterase assisted with non-pyridinium oximes. **Biochem. J**, v. 450, p. 231–242. 2013.

ROCHA, T. L. *et al.* Proteomic and histopathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 40, n. 1, p. 175-186, 2015.

REBELO, R.M. *et al.* **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental**. Brasília. 2010. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/livros/produtosagrotoxicoseafinscomercializadosem2009nobrasildigital.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2021.

RESENDE, Á. V. **Agricultura e qualidade da Água : Contaminação da Água por Nitrato**. Planaltina, DF. 2002. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAC-2009/24718/1/doc_57.pdf. Acesso em: 2 mar. 2022.

RESENDE, Anna Carolina. **Efeitos do choque térmico de alta temperatura em *Psalidodon bifasciatus* (Garavello e Sampaio, 2010)**. 83 f. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, 2021.

ROMANO R.M. *et al.* Glifosato como desregulador endócrino químico. **Ambiência - Rev do Set Ciências Agrárias e Ambient**, v. 5, p. 359-372. 2009.

ROSSI, P.; XAVIER, E. G.; RUTZ, F. Nucleotídeos na nutrição animal. **Revista brasileira de agrociencia**, v. 13, p. 5-12. 2007.

ROUNDUP® WG [Bula]. São Paulo: MONSANTO DO BRASIL LTDA. Disponível em: http://www.roundup.com.br/videos/pdf/roundup_wg/roundup-wg-bula.pdf. Acesso em 19 nov. 2021.

SANTIAGO-MOREIRA, M.R. *et al.* **Estudo do inseticida carbofurano em solo e sedimento de área de produção de arroz irrigado e controle do gorgulho aquático *Oryzophagus oryzae***, Taubaté, São Paulo. V. 80, n. 1, pp. 125-128. 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/ZDcCfxwnfs4d8zPMhpPY3MP/abstract/?lang=pt#ModalArticle> s>. Acesso em: 12 dez. 2021.

SALBEGO, J., LORO, V. L. Exposure to diferente glyphosato formulations on the oxidative and histological status of *Rhamdia quelen*. **Fish Physiol biochem** v. 42, p. 445-455, 2016.

SANCHEZ, Jessica Andrea Albañil. **Efeitos comparativos de herbicidas à base de glifosato sobre parâmetros oxidativos e qualidade espermática no peixe estuarino *Jenynsia multidentata***. 2015. 63 f. Dissertação - Universidade Federal do Rio Grande, Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Rio Grande, 2015.

SHADDOCK, P. Guppy Color Bank. Primeira edição, 2008. edição eletrônica disponível em: <http://www.petbh.com.br/guppy/wp-content/uploads/2017/12/08-Guppy-Color-Bank.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2019.

SHIOGIRI, Natália Sayuri. **Toxicidade e Alterações Morfofuncionais em Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Exposto ao Herbicida Roundup Ready**. 2011. 80 f. Dissertação – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2011.

SIES, H. *et al.* Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBS Let.**, v. 103, n. 2, p. 287-290, 1979.

SINGH, B. K.; WALKER, A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 3, p. 428–471, 2006.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. **NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE**. v. 2 , p. 294-302, 2001.

SOBJAK, T. M. *et al.* Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of Rhamdia quelen fish. **Chemosphere**. 2017.

SOBJAK, T.M. *et al.* Evaluation of the antioxidant system and neurotoxic effects observed in Rhamdia branneri (Teleostei: Heptapteridae) sampled from streams of the lower Iguazu River basin. **Ecotoxicol Environ Saf.** v. 155, p. 162-170, 2018.

SINGH, B. K.; WALKER, A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 3, p. 428–471, 2006.

TAVECHIO, W. L. G. *et al.* ALTERNATIVAS PARA A PREVENÇÃO E O CONTROLE DE PATÓGENOS EM PISCICULTURA. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 2, p. 335–341, 2009.

TEIXEIRA, J.M. DOS SANTOS. *et al.* Acute toxicity and effects of Roundup Original® on pintado da Amazônia. **Environmental Science and Pollution Research**, p.1-7, 2018.

TONI, L.R.M. *et al.* Adsorção de Glifosato sobre solos e minerais. **Química Nova**, Brasil, PubliSBQ, v. 29, n. 4, p. 829-833, 2006.

TUREK, J. A. *et al.* Efeitos citotóxicos de um herbicida a base de glifosato no peixe *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000. **Luminária**, União da Vitória, v.19, n.02, p. 06 – 12, 2017.

VASCONCELOS, Y. Pesticides in the balance. **Pesquisa Fapesp**, v. 271, 2018. Disponível em: https://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2018/09/018-027_CAPA-Agrot%C3%B3xicos_271.pdf. Acesso em: 25 de maio de 2021.

VICK, B. **Glyphosate application in aquaculture United States Patent Application Publication**. EUA, 2010. Disponível em: <https://patentimages.storage.googleapis.com/9c/25/26/788c059acfad56/US20100022393A1.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2021.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 77, p. 325–333, 1981.
[https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(81\)77046-0](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(81)77046-0)

WILKENS, A. L. L. **Efeito dos Herbicidas Boral® 500 Sc e Glifosato® Isolados em Mistura Sobre o Balanço Oxidativo, os Níveis de Glicose e de Corticosterona de Rana catesbeiana**. 2017. 83 f. Dissertação - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2017.

WILLIAMS, G. M. *et al.* Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.

WOURMS, J. P. Viviparity: the maternal-fetal relationship in fishes. **American Zoologist**, v. 21, n. 2, p. 473-515, 1981.

ZEBRAL, Y. D. *et al.* Effects of a glyphosate-based herbicide in pejerrey *Odontesthes humensis* embryonic development. **Chemosphere**, v. 185, p. 860-867, 2017.