

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ, CAMPUS DE UNIÃO DA VITÓRIA

BEATRIZ WIERZBICKI

ANÁLISE COMPORTAMENTAL E EVIDÊNCIAS DE EFEITOS DE
NEUROTOXICIDADE NO MODELO BIOLÓGICO *Danio rerio* (Hamilton, 1822) A
PARTIR DA EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO

UNIÃO DA VITÓRIA, 2024

BEATRIZ WIERZBICKI

ANÁLISE COMPORTAMENTAL E EVIDÊNCIAS DE EFEITOS DE
NEUROTOXICIDADE NO MODELO BIOLÓGICO *Danio rerio* (Hamilton, 1822) A
PARTIR DA EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial de obtenção do título de licenciada em Ciências Biológicas da, Universidade Estadual do Paraná, Campus de União da Vitória.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina de Deus Bueno Krawczyk.

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Otávio Ribeiro

UNIÃO DA VITÓRIA, 2024



Anexo VII - ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos oito dias do mês de fevereiro de 2024, a acadêmica BEATRIZ WIERZBICKI apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “ANÁLISE COMPORTAMENTAL E EVIDÊNCIAS DE EFEITOS DE NEUROTOXICIDADE NO MODELO BIOLÓGICO *Danio rerio* (Hamilton, 1822) A PARTIR DA EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO”, para avaliação da banca composta por Ana Carolina de Deus Bueno Krawczyk (orientadora), Izonete Cristina Guiloski e Alan Deivid Pereira. Após apresentação do TCC pela acadêmica e arguição pela banca, a mesma deliberou pela:

Quadro de notas:

AVALIADOR	NOTA FINAL
1	98
2	98.5
3	97.6
MÉDIA FINAL	98

Aprovação

Aprovação com reformulações

Reprovação

A nota final do(a) acadêmico(a) foi igual a 9,8.

União da Vitória, 08 de fevereiro de 2024.

Documento assinado digitalmente
gov.br ANA CAROLINA DE DEUS BUENO KRAWCZYK
Data: 04/03/2024 10:46:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Presidente da banca – Orientadora(o)

Membro Avaliador 1

Membro Avaliador 2

“Dedico o presente trabalho ao meu amado namorado Tayllor, cuja presença sublime e apoio tornaram esta jornada ainda mais especial e significativa.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por todas as inúmeras bênçãos que têm permeado a minha vida, por todas as oportunidades que me concedeu e por ter me dado forças durante esta jornada desafiadora.

Sou profundamente grata aos meus pais, verdadeiros guerreiros, que sempre estiveram ao meu lado na busca pelo conhecimento, não poupando esforços para me ajudar da maneira que fosse necessária. Sempre afirmarei que tenho os melhores pais do mundo, pois são minha fonte inesgotável de amor, encorajamento e sabedoria.

Agradeço ao meu namorado, o amor da minha vida, Tayllor, por ser meu porto seguro, por sempre me incentivar e me animar nos momentos mais desafiadores. Me sinto muito abençoada por tê-lo todos os dias ao meu lado, compartilhando sonhos, alegrias e superações. Sinto um imenso orgulho da pessoa incrível e do coração maravilhoso que você tem. Te amo imensamente!

Agradeço aos meus irmãos Rosane e Alberto, de uma maneira ou de outra vocês sempre me apoiaram a seguir em frente.

Quero expressar toda a minha gratidão à minha querida orientadora, professora Ana Carolina, por me acolher como sua orientanda. Sinto imensa gratidão por todas as oportunidades que me concedeu, pela sua infinita paciência, cuidado, carinho e atenção. Agradeço por ter me incentivado e me introduzido na área da Ecotoxicologia. Guardarei para sempre no meu coração cada ensinamento e experiência vivenciada. Sinto uma enorme admiração pela profissional incrível que é.

Agradeço à minha parceira de Iniciação Científica, Luana Costa, por estar sempre presente, se comprometendo e me auxiliando nos bioensaios, na rotina de laboratório, e na elaboração de trabalhos científicos. Sua companhia trouxe leveza nos momentos mais desafiadores. Levarei sua amizade eternamente no meu coração.

Agradeço também à minha querida amiga Karine. Durante este último ano, nossas conversas e os momentos de chá que compartilhamos foram especiais e reconfortantes para mim. Seu incentivo, carinho e auxílio foram muito importantes nessa etapa acadêmica.

Agradeço ao professor Marcos Otávio Ribeiro por todas as palavras de apoio e incentivo. Sua orientação e encorajamento foram fundamentais para o progresso e sucesso deste trabalho.

Agradeço à Taimara Mikieta de Paula e à professora Maria Ivete Basniak que, sem medir esforços, elaboraram e confeccionaram o modelo tridimensional do peixe utilizado no teste comportamental, contribuindo para o sucesso e a realização do experimento.

Agradeço ao professor Everton Carlos Crema por nos disponibilizar sua câmera para a filmagem do comportamento dos peixes. Sua solidariedade e apoio foram essenciais para a realização e registro do experimento.

Ao Renan da Piscicultura, pelo empréstimo de materiais essenciais.

Aos meus colegas de turma, que tornaram essa trajetória mais leve e significativa.

Aos meus professores, verdadeiros profissionais incrivelmente capacitados, que foram fundamentais na minha formação acadêmica, transmitindo não apenas conteúdo, mas também inspiração e orientação para o meu crescimento pessoal e profissional.

E a todos que direta e indiretamente contribuíram para a conclusão dessa pesquisa.

*“Bendiga ao Senhor ó minha alma, e não se esqueça de nenhuma das
suas bênçãos!”
Salmos 103:2*

RESUMO

Em ambientes naturais, os organismos sofrem pressão seletiva e demonstram, a partir de suas características fisiológicas, a potencialidade para a sobrevivência. Desta forma, aumentar a pressão seletiva, por meio de poluição química, para organismos aquáticos, pode representar um déficit no potencial para predação e exploração de recursos. Peixes são um ótimo modelo biológico para investigar os efeitos das substâncias químicas no ambiente aquático devido à sua diversidade e abundância, à ocupação de diversos nichos e ao seu uso na alimentação humana. Tendo em vista a problemática da poluição ocasionada pela deposição de agrotóxicos em ambientes aquáticos, o presente trabalho visa à análise de possíveis efeitos ecotoxicológicos do herbicida glifosato, um dos componentes químicos mais comercializados no Brasil. Sua concentração máxima em água potável (águas de classe 1) é de 65 µg/L estabelecida pela Resolução CONAMA nº 375 de 2005. No presente trabalho avaliamos sua toxicidade nos comportamentos de predação, preferência de luz e comportamento anti-predador em *Danio rerio* expostos por 48h ao composto. Ademais, foi realizada análise de atividade da enzima Acetilcolinesterase (AChE) em peixes expostos a tal concentração por um período de 96 horas. Os resultados demonstraram que indivíduos do grupo experimental necessitaram estar mais próximos à presa para então, moverem-se em sua direção. Além disso, os peixes apresentaram uma tendência a permanecerem por mais tempo no compartimento claro e escaparam mais lentamente de um ataque simulado, indicando sinais de vulnerabilidade à predação. A análise de atividade da enzima AChE revelou aumento significativo da atividade no cérebro, o que difere do esperado, uma vez que o glifosato é frequentemente considerado um inibidor da AChE. Já a atividade da AChE muscular não demonstrou diferença significativa. Os achados sugerem que o glifosato, mesmo na concentração abaixo do permitido pela legislação brasileira, causa danos ao modelo biológico.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; agrotóxico; Comportamento; Acetilcolinesterase, bioindicador.

ABSTRACT

In natural environments, organisms suffer selective pressure and demonstrate their potential for survival through their physiological characteristics. In this way, increasing selective pressure on aquatic organisms through chemical pollution can represent a deficit in the potential for predation and exploitation of resources. Fish are an excellent biological model for investigating the effects of chemical substances in the aquatic environment due to their diversity and abundance, their occupation of various niches and their use in human food. In view of the problem of pollution caused by the deposition of pesticides in aquatic environments, this study aims to analyze the possible ecotoxicological effects of the herbicide glyphosate, one of the most widely marketed chemical components in Brazil. Its maximum concentration in drinking water (class 1 water) is 65 µg/L, as established by CONAMA Resolution No. 375 of 2005. In this study, we evaluated its toxicity on predation behavior, light preference and anti-predator behavior in *Danio rerio* exposed to the compound for 48 hours. In addition, the activity of the enzyme Acetylcholinesterase (AChE) was analyzed in fish exposed to this concentration for a period of 96 hours. The results showed that individuals from the experimental group needed to be closer to the prey in order to move towards it. In addition, the fish tended to remain in the light compartment for longer and escaped more slowly from a simulated attack, indicating signs of vulnerability to predation. Analysis of AChE enzyme activity revealed a significant increase in activity in the brain, which differed from what was expected, since glyphosate is often considered an AChE inhibitor. Muscle AChE activity showed no significant difference. The findings suggest that glyphosate, even at concentrations below those permitted by Brazilian legislation, causes damage to the biological model.

Keywords: Ecotoxicology; agrochemicals; Behavior; Acetylcholinesterase, bioindicator.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural do glifosato.....	21
Figura 2: Modelo biológico: peixe da espécie <i>Danio rerio</i>	22
Figura 3: Mecanismo clássico de inibição da AChE por organofosforados.....	26
Figura 4: Ação da AChE e alterações fisiológicas que ocorrem nos peixes resultantes da inibição por organofosforados.....	27
CAPÍTULO 1:	
Figura 1: Disposição dos aquários para o bioensaio.....	41
Figura 2: Esquema visual dos tratamentos e disposição dos organismos no aquário para teste de distância de reação.....	42
Figura 3: Materiais e reagentes utilizados para análises físico-químicas da água.....	43
Figura 4: Estúdio montado para realização das filmagens com o aquário-teste.....	43
Figura 5: Marcação manual do olho do peixe até a larva de Chironomidae, com o <i>software</i> Image J.....	44
CAPÍTULO 2:	
Figura 1: Configuração para teste de caixa clara/escuro usada para avaliar o comportamento de evitação de detecção em <i>Danio rerio</i>	55
Figura 2: Ilustração utilizada como modelo para a confecção do peixe fictício tridimensional.....	56
Figura 3: Impressão do peixe fictício tridimensional.....	57
Figura 4: Modelo 3D do predador (Peixe folha-da-índia, <i>Nandus nandus</i>) pronto.....	58
Figura 5: Esquema visual dos tratamentos e disposição dos organismos no aquário para análise de comportamento anti-predador.....	58
CAPÍTULO 3:	
Figura 1: Disposição dos aquários com aeradores e revestimento ao redor com papel Kraft..	72

LISTA DE SIGLAS

3D - tridimensional;

ABNT – Associação Brasileira de Normas e Técnicas;

AChE - Acetilcolinesterase;

ACh - Acetilcolina;

AFNOR – *Association Française de Normalisation*;

ANOVA - *Analysis Of Variance*;

ASTM – *American Society for Testing and Materials*;

AWWA – *American Water Work Association*;

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente;

DDD - dicloro difenil dicloroetano;

DIN – *Deutsches Institut für Normung*;

HD - High Definition;

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente;

ICSU – *Committee of the International Council of Scientific Unions*;

ISO – *International Organization for Standardization*;

UE - União Européia;

Vigiagua - Programa Nacional de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano;

OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico;

PCP - pentaclorofenol;

pH - potencial hidrogeniônico;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 ECOTOXICOLOGIA.....	16
2.2 CONTAMINAÇÃO DO AMBIENTE AQUÁTICO.....	17
2.3 BIOENSAIOS DE TOXICIDADE.....	18
2.4 HERBICIDAS.....	19
2.5 MODELO BIOLÓGICO - Danio rerio.....	22
2.6 INTERAÇÕES ECOLÓGICAS: PREDACÃO.....	23
2.7 BIOMARCADORES.....	24
2.7.1 Acetilcolinesterase.....	25
3. CAPÍTULO 1.....	38
4. CAPÍTULO 2.....	52
5. CAPÍTULO 3.....	69
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é considerado o maior consumidor de agrotóxicos desde 2008, segundo relatórios divulgados em 2020 pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (Boletim 2022 - IBAMA). No ano de 2021, o país alcançou o recorde de agrotóxicos registrados na história, com um total de 562 componentes liberados para uso e para comercialização (Brasil, Ministério da Agricultura e Pecuária, 2022), a fim de serem utilizados para controle de diferentes espécies-alvo. Entre as preocupações geradas por esse excesso de produtos liberados, cabe o destaque trazido por Karen Friedrich *et al.* (2021) de que do montante de ingredientes ativos de agrotóxicos liberados no Brasil, 81% são proibidos em pelo menos três países da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), como é o caso da Atrazina, um herbicida, que segundo Critério de classificação – Diretiva nº 1.272/2008, provoca sensibilização dérmica e alergia, é tóxico com exposição repetida e tóxico para a vida aquática (agudo e crônico). Além desse exemplo pode citar-se ainda o Acefato (Acaricida e Inseticida), a Malationa (Acaricida e Inseticida), o Tetraconazol (Fungicida), o Carbendazin (Fungicida) e o Picloram (herbicida) (Friedrich *et al.*, 2021).

Frente à liberação de produtos como agrotóxicos e fertilizantes somados ao crescimento populacional, o cenário de poluição aquática se estabelece (Jesus; Carvalho, 2008). A contaminação de água por agrotóxicos recebe atenção da academia há alguns anos. Grandraß *et al.* (1995) demonstraram que o inseticida diazinon era encontrado acima do limite permitido na Alemanha para água potável. Ainda, o número crescente de relatos de contaminação de mananciais hídricos subsuperficiais por atrazina, acima do limite de potabilidade ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$), levou à redução da dose máxima recomendada na França e a proibição de seu uso na Alemanha (Dousset *et al.*, 1997). Marques *et al.* (2002) encontraram os compostos Triclorfon e Fenvalerato acima dos limites permitidos pela Lei Internacional. Dores e De-Lamonica-Freire (2001) concluíram que, dentre os compostos detectados em suas pesquisas, atrazina, metribuzina e metaclor representavam os princípios ativos com maior mobilidade e eram detectados frequentemente em ecossistemas aquáticos de diversos países.

Embora o transporte e a concentração destes compostos nos ambientes aquáticos representem mecanismos complexos, já foi verificado que as substâncias percorrem longas distâncias a partir das fontes poluidoras. Gregor e Gummer (1989) constataram a presença de agrotóxicos organoclorados na neblina sobre o oceano no Canadá, e Schomburg e Glotflely (1991) verificaram a presença de tais compostos na neve do Ártico. Estas evidências deixam

claro que uma vez disponíveis no ambiente, a dispersão e a influência sobre a biota são inevitáveis.

A qualidade da água potável desempenha um papel fundamental na proteção da saúde pública. O perfil de compostos químicos detectados nesse recurso natural tem gerado preocupações significativas sobre potenciais interações aditivas ou sinérgicas entre os agrotóxicos. Considerando que a maioria das pessoas está exposta a uma mistura desses agentes químicos, é fundamental avaliar o risco representado por essa exposição para a saúde pública. Em um panorama traçado por Panis *et al.* (2022), a partir da análise de água de beber em 326 cidades do Paraná, a relação entre a incidência de câncer em moradores é positivamente correlacionada à presença de agrotóxicos na água. Além disso, os autores discutem o quanto os níveis regulatórios de agrotóxicos na água potável estão acima dos níveis estipulados para a União Europeia, variando de 20 vezes mais altos para atrazina e alacloro a 5.000 vezes mais altos para glifosato (Bombardi, 2019).

Lopes e Albuquerque (2018) realizaram uma revisão sistemática no período de 2011 a 2017 a respeito dos efeitos da exposição à agrotóxicos para a saúde humana e ambiental, destacando a intoxicação, principalmente em trabalhadores rurais. Os autores pontuaram que estes trabalhadores são mais suscetíveis a apresentar transtornos mentais, dores de cabeça, náuseas, e distúrbios respiratórios. Gaboardi (2021) analisou amostras de urina de indivíduos de dez municípios do Sudoeste do Paraná, constatando a contaminação de glifosato em 58,3% dos casos e em 34,7% das amostras analisadas a contaminação pelo herbicida de 2,4-D. Camiccia *et al.* (2022) detectaram, no município de Francisco Beltrão, o glifosato em 100% das amostras coletadas no leite materno durante o período de pulverização de milho e soja no ano de 2018.

A fim de analisar a integridade ambiental dos recursos hídricos, bem como do seu potencial para o abastecimento público, a consideração de bioindicadores como ferramenta de análise é bastante relevante. Isto porque as complexas interações das comunidades biológicas em ambientes aquáticos afetados por compostos químicos resultam em mudanças na densidade e diversidade desses organismos nos ecossistemas. Além disso, as alterações analisadas, sejam comportamentais, abundância, diversidade, ou mesmo fisiológicas, possibilitam identificar, eficientemente, os efeitos das ações humanas ou as variações naturais no ambiente, permitindo uma avaliação biológica dos fatores em ação (Chalar, 1994).

Em uma comunidade aquática natural, organismos enfrentam forças de pressão seletiva para sobreviver, necessitando de estratégias tanto para forragear, quanto na aptidão de defesa contra seus predadores. À medida que tais organismos são expostos continuamente a

substâncias químicas enfrentam ainda a pressão seletiva exercida pelos compostos químicos. Uma vez que são um fator de estresse aos organismos, os compostos químicos acarretam em um comprometimento de processos biológicos como, por exemplo, a predação acompanhada de uma menor taxa de alimentação (Barton, 2002).

Peixes desempenham um papel crucial como modelos biológicos em pesquisas na área de ecotoxicologia devido à sua ampla diversidade e abundância, à ocupação de uma variedade de nichos e ao seu papel significativo na cadeia alimentar humana (Bueno-Krawczyk, 2016). *Danio rerio* (Hamilton, 1822), conhecido como peixe-zebra, é considerado um indicador confiável em estudos genéticos, comportamentais e toxicológicos devido à sua alta sensibilidade, facilidade de manipulação em laboratório e similaridades genéticas com o genoma humano, apresentando um elevado grau de homologia de genes ortólogos, que equivale a cerca de 70% (Howe *et al.*, 2013).

Evidências sobre alterações resultantes da exposição a substâncias químicas no desenvolvimento, no padrão comportamental, sobretudo na natação e na predação de peixes já foram registrados na literatura. Khan *et al.* (2016) demonstraram que *Cyprinus carpio* (carpa-comum) quando exposto à glifosato e atrazina, a diferentes concentrações, resultou em alterações no comportamento e num declínio nas concentrações de glicose no plasma. Bridi *et al.* (2017) constaram que a exposição a glifosato nas concentrações 0,01 µg/L, 0,065 µg/L e 0,5 mg/L em estágios iniciais de desenvolvimento do peixe *Danio rerio* diminuíram o comprimento corporal e alteraram o comportamento natatório de larvas, reduzindo distância percorrida. Sandoval-Herrera *et al.* (2019), expuseram o tetra *Astyanax aeneus* (lambari) expostos a um pesticida organofosforado e perceberam que a espécie teve um comportamento de evitação alterado e uma menor capacidade de escapar de um ataque predador. Grzesiuk *et al.* (2023) estudaram o impacto da fluoxetina, em *Carassius carassius* (carpa cruciana) concluindo que o comportamento de predação de *Carassius carassius* foi alterado com a exposição ao fármaco resultando em uma distância de reação menor e taxa de alimentação mais lenta comparada ao grupo que não exposto.

Como observado por Goulart (2019), o comportamento desempenha um papel importante como elo entre processos fisiológicos e ecológicos. Esse aspecto é influenciado por estímulos externos que atuam por meio de redes neurais. Conforme discutido por Weber e Spieler (1994), interromper tais sequências antes da conclusão provavelmente levará a mudanças adversas no comportamento dos peixes. Efeitos de neurotoxicidade advindos da exposição a glifosato já foram evidenciados em *Perna perna* (mexilhão marrom), *Danio rerio* (Peixe-zebra) e *Poecilia reticulata* (barrigudinho) (Sandrini *et al.*, 2013).

Um biomarcador altamente utilizado para a avaliação da neurotoxicidade de substâncias químicas é a Acetilcolinesterase (AChE), uma enzima que, em peixes, é encontrada no cérebro, músculos e eritrócitos (Klemz, 2005), desempenhando um papel crucial em várias funções fisiológicas, incluindo a localização de presas, a evasão de predadores e a orientação em direção ao alimento (Gluszczak *et al.*, 2006). Organofosforados, como o glifosato, são conhecidos por inibirem a AChE. Eles bloqueiam a ação da enzima que é responsável por quebrar a acetilcolina (ACh) (um neurotransmissor), resultando em um aumento nos níveis e na duração da ação da ACh (Colovic *et al.*, 2013) na fenda sináptica.

A compreensão sobre a alteração no padrão comportamental de diferentes espécies frente à contaminação da água por agrotóxicos é essencial. Com base em tais fundamentos, o presente trabalho visou analisar os possíveis efeitos ecotoxicológicos do glifosato em concentração ambiental permitida em águas naturais, conforme Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Como forma de verificar os efeitos, o trabalho foi dividido em três capítulos. No primeiro capítulo, o foco foi a análise do comportamento de predação de *D. rerio* comparando o grupo experimental ao grupo controle. O segundo capítulo buscou verificar as diferenças comportamentais entre os grupos experimental e controle de *D. rerio* quanto à preferência por iluminação (claridade ou escuridão), além das respostas de fuga diante de um predador fictício. Por fim, o terceiro capítulo concentrou-se na análise da atividade da enzima AChE em *D. rerio*, comparando o grupo experimental com o grupo controle.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ECOTOXICOLOGIA

Com as várias doenças e mortes provocadas pelo uso inadequado de substâncias químicas no meio ambiente, muitos países deram início ao monitoramento ambiental e a pesquisas para avaliação do nível de contaminação em efluentes de vários ramos industriais (Zagatto; Bertoletti, 2008). Um fato a se citar é a contaminação de todo o ecossistema de Clear Lake, um ponto turístico da Califórnia, sendo a área aquática povoada por milhares aves piscívoras, os mergulhões (*Aechmophorus occidentalis*). No final da década de 1940, a presença abundante de mosquitos (*Chaoborus astictopus*) incomodava os que aproveitavam os momentos de lazer à beira do lago e como método de controle dos insetos foram realizadas três aplicações controladas do inseticida DDD (dicloro difenil dicloroetano), o que resultou em uma contaminação DDD em todo o ecossistema dizimando a população de mergulhões em poucos anos devido a falhas reprodutivas (Vasseur; Jean-François Masfaraud; Blaise, 2020).

O termo Ecotoxicologia surge pela primeira vez em uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions* (ICSU) em junho de 1969, quando a ecotoxicologia é definida como a “ciência que estuda os efeitos dos agentes químicos e físicos sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais, plantas ou microorganismos, dentro de ecossistemas definidos, compreendendo assim a interação das substâncias com o meio (Plaa, 1982).

No ano de 1980, as agências ambientais do mundo começaram a determinar protocolos padronizados de bioensaios de toxicidade utilizando organismos aquáticos (Zagatto; Bertoletti, 2008). O chamado “*Clean Water Act*” foi um marco regulatório que concedeu a Agência de Proteção Ambiental Americana o poder de implantar programas de controle da poluição, abrangendo padrões de qualidade de efluentes industriais, e requerimentos para a fixação de parâmetros de qualidade da água para todos os compostos químicos de águas superficiais (Magalhães; Ferrão-Filho, 2008).

Autores como Rachel Carson (1982), René Truhaut (1977), Aldo Leopold (1935), e David Peakall (1992) são reconhecidos por contribuíram para o desenvolvimento e compreensão da ecotoxicologia. Havendo nos dias atuais inúmeros trabalhos publicados que contribuem para a conhecimento dos efeitos de substâncias químicas em organismos não alvo (Bordin *et al.*, 2023; Bridi *et al.*, 2017; Faria *et al.*, 2021; Grzesiuk *et al.*, 2023; Khan *et al.*,

2016; Martínez *et al.*, 2020; Pavan *et al.*, 2021; Pereira, 2018; Sandoval-Herrera *et al.*, 2019; Sandrini *et al.*, 2013).

A Ecotoxicologia Aquática vem ganhando cada vez mais destaque devido à crescente poluição de corpos hídricos, principalmente por contaminantes emergentes (Ramírez-Malule; Quiñones-Murillo; Manotas-Duque, 2020). O ambiente aquático está repleto de substâncias tóxicas presentes em concentrações suficientes para causar danos significativos às espécies que ali vivem. As respostas a esses compostos químicos podem ser letais ou subletais. Respostas letais estão relacionadas às taxas de mortalidade, já respostas subletais são aquelas que não resultam em morte, mas afetam a alimentação, reprodução, mobilidade e podem causar alterações fisiológicas, morfológicas e comportamentais nos organismos aquáticos (Sparling, 2016). Tais estudos se fazem necessários, para que seus riscos potenciais possam ser minimizados e medidas saneadoras possam ser efetivadas com o intuito de diminuir seus prováveis impactos (Costa *et al.*, 2008; Stützer; Guimarães, 2003; Walker *et al.*, 2019).

2.2 CONTAMINAÇÃO DO AMBIENTE AQUÁTICO

Os herbicidas são especialmente propensos a contaminação de águas, visto que são aplicados diretamente no solo e podem lixiviar para lençóis freáticos, córregos, rios e lagos (Buser, 1990). Embora muitos produtos químicos possam permanecer parcialmente localizados, alguns fenômenos físicos e até mesmo biológicos são capazes de levar a sua disseminação para partes distantes do globo (Plaa, 1982). No processo de transporte os compostos químicos, sofrem alterações na concentração, onde podem diluir, aumentar sua concentração ou sofrer transferência de fase. Além de serem molecularmente alterados devido a degradação ou diversas reações químicas que podem aumentar, diminuir, ou mesmo inativar seu poder tóxico (Zagatto; Bertolletti, 2008).

Conforme a Resolução CONAMA nº 01, de 23/01/86, a definição de impacto ambiental abrange quaisquer modificações nas características físicas, químicas e biológicas do meio ambiente, resultantes de atividades humanas que tenham influência direta ou indireta na saúde, segurança e bem-estar da população. Isso inclui também as implicações nas atividades sociais e econômicas, a biota, nas condições sanitárias e estéticas do ambiente, assim como na qualidade dos recursos ambientais.

A diferenciação entre os conceitos de contaminação e poluição é crucial. A contaminação ocorre quando uma substância está presente em um local onde não deveria estar ou em concentrações acima do nível natural. Já a poluição é caracterizada pela contaminação

que resulta ou pode resultar em efeitos biológicos prejudiciais para as comunidades presentes. Todos os poluentes são considerados contaminantes, porém nem toda substância contaminante é necessariamente considerada poluente (Chapman, 2007).

Dentre as fontes de poluição aquática observam-se fontes pontuais, sendo aquelas que são identificáveis no espaço e no tempo, e fontes não pontuais ou difusas, onde não é possível identificar o ponto de lançamento dos compostos químicos no meio aquático (Zagatto; Bertoletti, 2008). Devido à sua natureza aberta e dinâmica, os sistemas aquáticos naturais estão sujeitos a mudanças constantes em sua composição química (Costa *et al.*, 2008). No Brasil a Resolução CONAMA 357/05, estabelece os padrões de qualidade de águas continentais, estuarinas e marinhas, bem como classifica seus tipos e o uso preponderante das águas superficiais, regulamentando o lançamento de efluentes em corpos d'água (Zagatto; Bertoletti, 2008).

A contaminação aquática por agrotóxicos persistentes é uma preocupação constante. Panis *et al.* (2022) em seu trabalho discutem dados divulgados entre o período de 2014-2017 no relatório SISAGUA do Programa Nacional de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (Vigiagua). 326 dos 399 municípios do estado do Paraná, tiveram sua água de beber analisada e informada no relatório. Destes, 127 municípios, que correspondem a uma taxa de cobertura de 50% da população do estado apresentaram pelo menos um agrotóxico listado pela *International Agency for Research on Cancer* como possível cancerígeno. Apresentando ainda certas concentrações de agrotóxicos acima dos limites permitidos pela legislação brasileira.

2.3 BIOENSAIOS DE TOXICIDADE

Os bioensaios de toxicidade são realizados com organismos bioindicadores, que graças a seus pequenos limites de tolerância ecológica, quando expostos a certas substâncias químicas, apresentam alterações, sendo elas fisiológicas, morfológicas ou comportamentais (Magalhães; Ferrão-Filho, 2008). Segundo Gary M. Rand (1995) e a AWWA - *American Water Works Association* (1995), para que um organismo seja classificado como bioindicador, deve apresentar as seguintes características: seletividade constante e elevada aos compostos químicos, disponibilidade e abundância, uniformidade e estabilidade genética nas populações, representatividade de seu nível trófico, ampla distribuição e importância comercial e, facilidade de cultivo e de adaptação às condições laboratoriais (Costa *et al.*, 2008). Neste

sentido, a utilização de peixes em bioensaios, para verificar os efeitos ecotoxicológicos com compostos encontrados em ambientes aquáticos, é comum.

A utilização de tais bioensaios é importante para avaliar o efeito nocivo de compostos químicos lançados no ambiente, sendo expressos por concentrações letais, efetivas ou inibidoras, que podem acarretar, respectivamente, em mortalidade, anormalidade ou inibição a 50% dos organismos expostos (Jesus; Carvalho, 2008). As exposições são realizadas em diferentes concentrações de substâncias, amostras de efluentes ou água bruta, por um determinado período de tempo (Magalhães; Ferrão-Filho, 2008). A exposição de organismos teste a um agente tóxico pode ser aguda, quando a concentração de uma substância tóxica é liberada em um único episódio e absorvida rapidamente, ou crônica, quando o agente tóxico é liberado em episódios frequentes, em concentrações subletais, durante um longo período de tempo (Schvartsman, 1991). Efeitos crônicos no ambiente aquático são comumente observados devido ao fato de haver intensa descarga de efluentes que diluem-se facilmente nos corpos hídricos atingem organismos não-alvos, causando efeitos a longo prazo relacionados ao comportamento e aspectos fisiológicos (Magalhães; Ferrão-Filho, 2008; Silva; Pompêo; Paiva, 2015; Zagatto; Bertolletti, 2008).

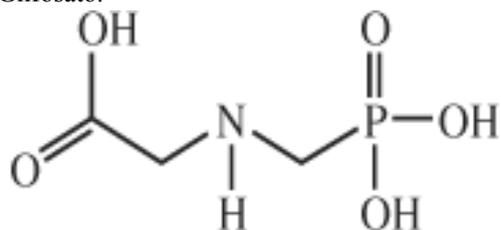
A realização de bioensaios de toxicidade apresenta uma série de normas e procedimentos padronizados que devem ser seguidos, se fazendo necessário monitorar condições ambientais específicas como pH, temperatura, oxigênio dissolvido para que estes não interfiram nos resultados. Atualmente, vários ensaios de toxicidade são estabelecidos nacionalmente e internacionalmente por organizações ou associações de normalização, como Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT), *Association Française de Normalisation* (AFNOR), *American Water Work Association* (AWWA), *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *Deutsches Institut für Normung* (DIN), *International Organization for Standardization* (ISO) e *Organization for Economic Co-Operation and Development* (OECD). Suas diretrizes padronizam métodos de exposição, condições experimentais, seleção de organismos, observações e relatórios posteriores, definindo os critérios de validade do estudo. Essa padronização possibilita a comparação entre estudos e é útil para avaliações de variabilidade intra e interlaboratoriais (Butler *et al.*, 2020; Zagatto; Bertolletti, 2008;).

2.4 HERBICIDAS

O termo erva daninha, ou praga, leva em consideração plantas que em um determinado momento estão indo contra os interesses do homem, causando danos à culturas agrícolas ou à alguma outra atividade econômica, de forma direta ou indireta. Para Salomon (1996), não existe nenhuma “praga” na natureza, sendo essa consideração feita pelo homem e sua percepção social (Salomon, 1996 apud Zagatto; Bertoletti, 2008). O uso de herbicidas tornou-se muito comum em países em desenvolvimento, sendo sua aplicação feita no solo com finalidade controlar tais plantas daninhas. Esses compostos agem em locais específicos da planta denominados “sítios de ação”, e ao ligarem-se a estes inibem funções vitais na planta. Porém, sua ação pode atingir além da planta-alvo espécies nativas e organismos não-alvo acarretando em impactos negativos sobre tais organismos (Barros *et al.*, 2017; Haggblade *et al.*, 2017; Gianessi; Williams, 2011; Rodenburg; Johnson, 2013; Roman *et al.*, 2005).

O glifosato (N-(fosfonometil) glicina), número de registro [CAS 1071-83-6], cuja fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ (Figura 1) é um herbicida não-seletivo pertencente ao grupo dos organofosforados, com atividade pós-emergência e sistêmica. Possui comportamento zwitteriônico, apresentando duas cargas neutras de pH, uma carga positiva no grupo amino e uma negativa no grupo fosfonato. Por ser uma molécula polar, o glifosato é altamente solúvel em água (12 g/L) e insolúvel na maioria dos solventes orgânicos (Veiga *et al.*, 2001). Apresenta em sua formulação, surfactantes como a polioxietileno amina, que tem como ação o aumento da absorção e translocação do herbicida na planta-alvo. Na planta sua ação afeta as vias do chiquimato ao inibir a enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), tal inibição resulta em uma redução dos níveis dos aminoácidos tirosina, fenilalanina e triptofano, além de possível diminuição de segundos metabólitos, como flavonoides, lignina e fitoalexinas, gerando uma série de distúrbios metabólicos, levando a planta a morte (Coutinho; Mazo, 2005; Duke *et al.*, 2012; Jayasumana *et al.*, 2014; Matozzo *et al.*, 2020; Mertens *et al.*, 2018; Schönbrunn *et al.*, 2001; Steinrücken; Amrhein, 1980).

Figura 1: Fórmula estrutural do Glifosato.



Fonte: COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H. Metallic complexes with glyphosate: a review. São Paulo: Química Nova, v. 28, n. 6, 2005. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000600019. Acesso em: 01 ago. 2022.

As propriedades herbicidas do glifosato foram descobertas em 1970, sendo logo em 1974 lançada a primeira formulação comercial sob o nome de Roundup® (Annett; Habibi; Hontela, 2014; Zhang *et al.*, 2017; Smith; Vera; Bhandari, 2019). Atualmente, os herbicidas à base de glifosato são os produtos químicos agrícolas mais utilizados em todo o mundo, sendo que em 2022 mais de 246 toneladas comercializadas apenas no Brasil, segundo dados do IBAMA (2022). Tais herbicidas à base de glifosato são reconhecidos entre os produtos químicos agrícolas mais importantes de todos os tempos em decorrência do desenvolvimento de culturas resistentes (Annett; Habibi; Hontela, 2014).

No Brasil, os limites para quantidade de glifosato na água são estabelecidos conforme resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357/2005, sendo o valor máximo permitido em água classe I (água potável) de até 65 µg glifosato L⁻¹, já em águas de classe II (consumo de peixes, recreação, propagação e manutenção da saúde), a concentração permitida é de 280 µg de glifosato L⁻¹ (Brasil, 2005). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária considera o glifosato um produto de baixa toxicidade ao meio ambiente, embora haja muitos estudos demonstrando a sua toxicidade (Bordin *et al.*, 2023; Bridi *et al.*, 2017; Faria *et al.*, 2021; Khan *et al.*, 2016; Martínez *et al.*, 2020; Pavan *et al.*, 2021; Sandrini *et al.*, 2013; Silva, Barp, Armiliato, 2017). Em países como Sri Lanka, França, Itália, El Salvador, Holanda e Bermudas o uso do glifosato é proibido (Malkanathi *et al.*, 2019).

Dentro os efeitos tóxicos do glifosato em *Danio rerio* evidenciam-se o aumento de estresse oxidativo no cérebro (Faria *et al.*, 2021), maior frequência de micronúcleos nos eritrócitos (Carmo; Silva; Armiliato, 2020), comprometimento da memória (Bridi *et al.*, 2017), modificações transcricionais de genes (Altenhofen *et al.*, 2017), efeitos subletais nos ovários (Silva; Barp; Armiliato, 2017) e toxicidade reprodutiva (Uren Webster *et al.*, 2014).

2.5 MODELO BIOLÓGICO - *Danio rerio*

Peixes desempenham um papel crucial como modelos biológicos em pesquisas ecotoxicológicas devido à sua diversidade e abundância, à ocupação de diversos nichos e ao seu uso na alimentação humana. Uma vez que habitam os corpos hídricos representam juntamente com esses ambientes, os receptores finais das múltiplas fontes de poluição (Bueno-Krawczyk, 2016).

Danio rerio (Figura 2) também conhecido como paulistinha ou zebrafish, foi descrito por Hamilton Buchanan em 1822 é um peixe tropical de água doce, pertencente à família Cyprinidae pertencente à Classe Actinopterygii (Eschmeyer; Fricke, 2015). O nome *Danio* deriva do nome bengali “dhani”, que significa “do campo de arroz” (Talwar; Jhingran, 1991).

Figura 2: Modelo biológico: peixe da espécie *Danio rerio*.



Fonte: A autora, 2023.

Comumente conhecido como zebrafish ou paulistinha, *Danio rerio* é originário do Himalaia no sul da Ásia, como Índia, Nepal, Butão, Paquistão, Bangladesh e Mianmar (Barman, 1991; Spence *et al.*, 2008). Em sua fase adulta possui tamanho corpóreo entre 2 a 3 cm. Seu corpo é esguio e alongado com um padrão de cor distinto baseado em listras horizontais escuras e claras alternadas, que podem ser divididas em manchas ou barras (Spence *et al.*; 2008). Possui boca terminal oblíqua voltada para cima, sua mandíbula inferior se projeta mais longe do que a parte superior, e os olhos são centrais e não visíveis de cima. As características de diagnóstico para a espécie são uma linha lateral incompleta que se estende até a nadadeira pélvica base, dois pares de barbilhões e cinco a sete listras longitudinais azuis escuras que se estendem por trás do opérculo na nadadeira caudal (Barman, 1991).

O zebrafish é uma espécie gregária e nada em pequenos cardumes (5-20 indivíduos). Demonstra padrões de hierarquia de domínio, a qual não está relacionada ao sexo, podendo

ambos os sexos estabeleceram esses padrões, e até que as relações de dominância sejam estabelecidas podem apresentar interações agressivas. O indivíduo dominante pode apresentar cores mais fortes, enquanto os subordinados mais pálidos e, além disso, o dominante ocupa áreas maiores que os subordinados (Lawrence, 2007; Spence *et al.*, 2008).

Sua atual proeminência como organismo modelo decorre do trabalho de Streisinger *et al.* (1981), que foi pioneiro em seu uso para aplicar a genética molecular ao estudo de vertebrados. Atualmente *D. rerio* é um modelo biológico indispensável na pesquisa científica pelo fato de ser um peixe de pequeno porte, de fácil manutenção, economicamente viável para criação, possuindo alta taxa de reprodução e seu genoma sequenciado (Silveira; Schneider; Hammes, 2012). Suas informações hereditárias encontram-se codificadas, apresentando um elevado grau de homologia com cerca de 70% de genes ortólogos aos contidos no genoma humano, esses genes são oriundos de uma especiação a partir de um ancestral comum entre as duas espécies (Howe *et al.*, 2013).

2.6 INTERAÇÕES ECOLÓGICAS: PREDACÃO

O estudo das interações ecológicas faz parte da área da Ecologia conhecida como Ecologia de Comunidades. De maneira natural, organismos sofrem pressão seletiva uma vez que fazem parte de uma comunidade, e possuem seu padrão de desenvolvimento regulado pelas condições disponíveis no meio, sendo que com condições favoráveis o indivíduo explora os recursos disponíveis para obter eficiência no crescimento e reprodução, exibindo assim seu melhor desempenho. O aumento na quantidade de alimento consumido leva a uma elevação das taxas de crescimento, desenvolvimento e natalidade, assim como diminuição nas taxas de mortalidade (Begon, 2007).

Em ambientes aquáticos, assim como em outros ecossistemas, segundo as teorias dominantes, a importância dos recursos exerce força de baixo para cima (efeito *bottom up*), e de maneira contrária o papel dos consumidores exerce força de cima para baixo (efeito *top down*) (Horppila *et al.*, 1998). Uma das metas da ecologia de comunidades é identificar através de diferentes níveis tróficos quais populações são limitadas por recursos e quais limitam-se através do consumo e pressão exercida pelos níveis tróficos superiores (Del-Claro; Silingardi, 2006).

A interação ecológica de predação pode ser representada em modelos de cascatas tróficas, que são definidas como o efeito bilateral entre predador-presa, modificando a abundância, biomassa ou produtividade de uma comunidade populacional ou nível trófico

(Pace *et al.*, 1999). Pode-se considerar a predação como um processo biológico importante para a compreensão das inter-relações entre as comunidades, principalmente a partir da compreensão dos diferentes mecanismos utilizados pelos consumidores (Little e Kitching, 2000).

À medida que um organismo é exposto a algum estresse ambiental, seja uma condição de pressão seletiva ou a um agente tóxico que o leve para fora de sua faixa ótima, algum processo biológico é comprometido (Magalhães; Ferrão Filho, 2008). Sandoval-Herrera *et al.* (2019) constataram em seu estudo que *Astyanax anaeus* expostos à etoprofós, um pesticida organofosforado, respondem mais lentamente ao ataque simulado de um predador, comparados a peixes não expostos. Já Grzesiuk *et al.* (2023) constataram que *Carassius carassius* expostos à fluoxetina, um fármaco comumente prescrito como antidepressivo, tiveram sua eficácia de predação sobre *Daphnia magna* reduzida, comparados a organismos não expostos.

Respostas subletais como mudanças comportamentais podem ter efeitos ecológicos na população, bem como a nível de comunidade, visto que em um ambiente contaminado tanto predador como presa estão expostos, e um pode ser mais suscetível que outro. A capacidade reduzida de evitar predadores pode aumentar as taxas de mortalidade afetando o tamanho da população e a estrutura da comunidade. As presas expostas a compostos químicos ficam mais vulneráveis a um predador, estando suscetíveis à falha na detecção de predador, risco ao deixar refúgios para encontrar comida, ter um baixo desempenho e resistência, e hiperatividade. (Mesa *et al.*, 1994; Scott; Sloman, 2004; Weis; Candelmo, 2012).

2.7 BIOMARCADORES

O termo biomarcador surgiu em 1897, sendo estabelecido como “indicadores que assinalavam eventos em sistemas ou amostras biológicas sob exposição a compostos químicos”. A ênfase inicial estava centrada nos efeitos em seres humanos. Posteriormente, Adams (1990) modificou a definição original para abranger respostas não apenas em seres humanos, mas também em organismos, populações e comunidades aquáticas em 1994, Depledge ampliou a definição, incorporando respostas comportamentais e outras perspectivas ecotoxicológicas críticas, como diversidade genética (Jesus; Carvalho, 2008).

Atualmente biomarcadores são definidos como respostas biológicas adaptativas a estressores englobando indicadores bioquímicos, fisiológicos, histológicos, celulares ou

comportamentais (Depledge, 1992; Depledge, 1994; Forbes; Annemette Palmqvist; Bach, 2006).

Os biomarcadores podem ser classificados como de i) exposição, ii) efeito ou iii) suscetibilidade. i) Biomarcadores de exposição são mudanças biológicas mensuráveis que indicam a exposição dos organismos a um composto químico. Um exemplo de biomarcador de exposição inclui parâmetros bioquímicos que têm sido estudados em peixes para avaliar suas respostas a substâncias tóxicas. ii) Biomarcadores de efeito são caracterizados pela presença de estresse que pode ser revertido assim que o agente estressor cessa sua influência. Tais biomarcadores são identificados pela ativação de mecanismos de defesa celular, que têm início como respostas adaptativas a nível molecular e bioquímico. Um exemplo de tais bioindicadores são enzimas que são lançadas na corrente sanguínea após a lesão tecidual. iii) Biomarcadores de suscetibilidade são indicadores de processos que provocam variações de respostas ao longo do tempo e entre exposição e efeito. Tais bioindicadores determinam condições como: indivíduo saudável, compensação do metabolismo, perturbação das funções, alterações morfológicas e morte. (Barrett *et al.*, 1997; Jesus; Carvalho, 2008; Winzer *et al.*, 2001).

Alguns autores como Fossi e Leonzio (1993) propõem uma classificação adicional que engloba os biomarcadores de exposição e efeito. Estes indicam a ocorrência de exposição a determinados compostos químicos e podem estabelecer uma ligação específica entre essa exposição e o efeito, caracterizando-o de forma mais precisa. Um exemplo notável é a inibição da acetilcolinesterase - AChE (Jesus; Carvalho, 2008; Nascimento; Pereira; Leite, 2006);

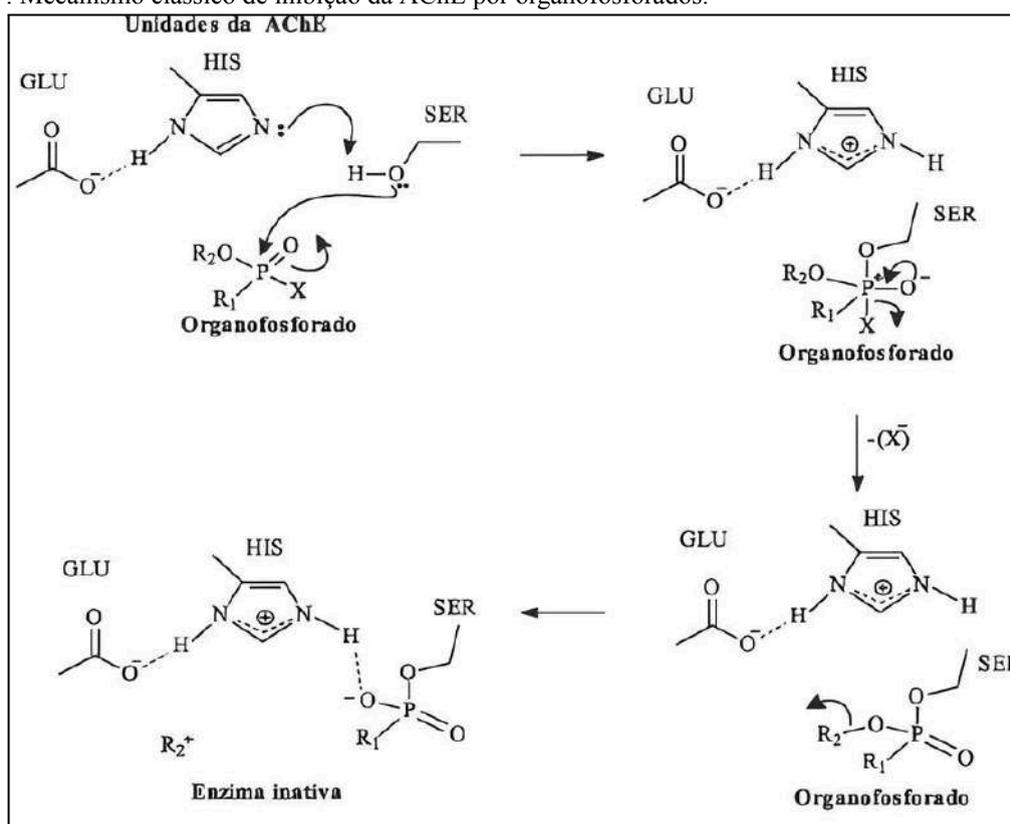
2.7.1 Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima, que em peixes, é encontrada no cérebro, músculos e eritrócitos (Klemz, 2002). É importante para a ativação cortical, atenção, memória e aprendizagem, recompensa e dor (Herlenius; Lagercrantz, 2004). A AChE catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético, uma reação essencial que permite que um neurônio colinérgico retorne ao seu estado de repouso após sua ativação (Colovic *et al.*, 2013). A ACh permanece na fenda sináptica por poucos milissegundos, tempo suficiente para produzir um potencial de ação. Dessa forma, a ação da AChE é a hidrólise da ACh que se dissocia dos receptores, eliminando a acumulação e religação deletérias, impedindo assim, que este neurotransmissor excite novamente a célula

pós-sináptica (Blotnick-Rubin; Anglister, 2018).

Os Organofosforados exercem seus principais efeitos toxicológicos através da fosforilação não reversível de esterases no sistema nervoso central. Por serem análogos da acetilcolina, assim como o substrato natural, eles entram no sítio ativo com uma serina ativa no fundo (Sussman *et al.*, 1991). Similar à acetilação, o inseticida é dividido e a enzima é fosforilada. Embora a enzima ACh seja rapidamente hidrolisada para regenerar a enzima livre, a desfosforilação é um processo muito lento, com um período de vários dias com isso a enzima fosforilada não consegue hidrolisar o neurotransmissor. A inibição da enzima leva ao acúmulo de ACh na fenda sináptica, resultando em superestimulação dos receptores nicotínicos e muscarínicos de ACh e interrompendo a neurotransmissão (Aldridge e Reiner., 1972; Boublik *et al.*, 2002; Colovic *et al.*, 2013). A figura 3 demonstrada como é a interação da acetilcolinesterase com seu inibidor organofosforado.

Figura 3 : Mecanismo clássico de inibição da AChE por organofosforados.

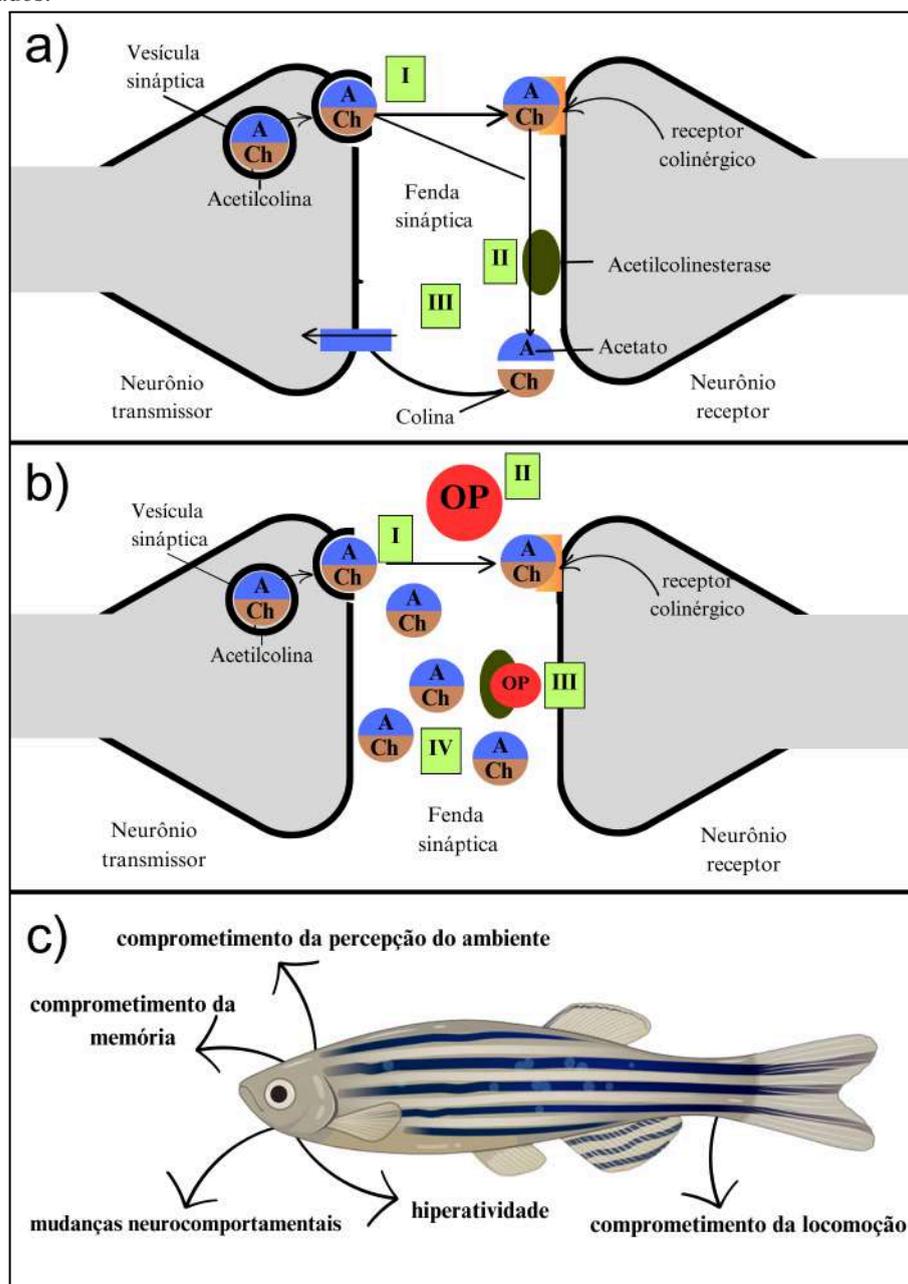


Fonte: SANTOS, V. M. R. DOS *et al.* Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. Química Nova, v. 30, n. 1, p. 159–170, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/bdm98jCvGnrqt5dfqG6P3J/#ModalFigesq20>

A atividade da AChE é extremamente importante para muitas funções fisiológicas dos peixes, como localização de presas, evasão de predadores e orientação em direção ao alimento

(Gluszczak *et al.*, 2006). Os inibidores da AChE, ou anticolinesterásicos, bloqueiam a ação da enzima colinesterase que normalmente quebra a ACh, resultando em um aumento nos níveis e na duração da ação do neurotransmissor, comprometendo funções fisiológicas do organismo (Figura 4). Um dos grupos conhecidos pela inibição da AChE são os organofosforados (Colovic *et al.*, 2013).

Figura 4: Ação da AChE e alterações fisiológicas que ocorrem nos peixes resultantes da inibição por organofosforados.



a- Transmissão do impulso nervoso com ação normal da acetilcolinesterase na fenda sináptica; I) O neurotransmissor difunde-se através da fenda sináptica e se liga aos receptores na célula pós-sináptica; II) Ação da enzima acetilcolinesterase sobre a acetilcolina presente na fenda sináptica; III) degradação da acetilcolina em acetato e colina. A colina então é transportada de volta para o terminal axonal da membrana pré-sináptica; b - presença de organofosforado causando inibição da acetilcolinesterase na fenda sináptica. I) difusão da

acetilcolina através da fenda sináptica ligando-se aos receptores na célula pós-sináptica. II) presença de organofosforado (OP) na célula. III) Inibição da acetilcolinesterase por conta da presença do organofosforado. IV) acúmulo da acetilcolina na fenda sináptica; c- efeitos da inibição da acetilcolinesterase no peixe: comprometimento da percepção do ambiente, comprometimento da memória, mudanças neurocomportamentais, hiperatividade e comprometimento da locomoção. Fonte: A autora, 2023. Adaptado de: MOYES, CHRISTOPHER D. SCHULTE, P. M. Princípios de Fisiologia animal [recurso eletrônico]; tradução: Adriane Belló Klein [*et al.*]. – 2. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre: Artmed, 2010.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, S. M. Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. **American Fisheries Societies Symposium**, v. 8, p. 1–8, 1990.

ALDRIDGE, W. N., REINER, E. **Enzyme Inhibitors as Substrates**, North-Holland/American Else vier, Amsterdam and New York, 1972.

ALTENHOFEN, S.; NABINGER, D. D.; WIPRICH, M. T.; PEREIRA, T. C. B.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D. Tebuconazole alters morphological, behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 180, p. 483–490, 2017.

ANNETT, R.; HABIBI, H. R.; HONTELA, A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 5, p. 458–479, 2014.

APHA. American Water Works Association and Water Environment Federation, “**Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**” (21st Ed). American Public Health Association, Washington DC, USA, 1995.

BARMAN, R. P. A. taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio rerio*. **Record of the Zoological Survey of India Occasional Papers**, v. 137, p. 1–91, 1991.

BARRETT, J.C.; VAINIO, H.; PEAKALL, D. & GOLDSTEIN, B.D. 12TH Meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemical: susceptibility to environmental hazards. **Environmental Health Perspective**, v 105, p. 699–737, 1997.

BARROS, A. P. O.; AMÂNCIO, L. C. S.; MICHEREFF, S. J. Interação entre herbicidas e patógenos radiculares, com especial referência a Rhizoctonia. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 25, p. 99-111, 2017.

BARTON, B. A. Stress in Fishes: A Diversity of Responses With Particular References to Changes in Circulating Corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, p. 517-525, 2002.

BEGON, M; COLIN, R; TOWNSEND, J. L. **Ecologia de indivíduos a Ecosistemas**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

BLOTNICK-RUBIN, E.; ANGLISTER, L. Fine Localization of Acetylcholinesterase in the Synaptic Cleft of the Vertebrate Neuromuscular Junction. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, 2018.

BOMBARDI, L. M. **A Geography of Agrotoxins use in Brazil and its Relations to the European Union**. Universidade de São Paulo. Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, 2019.

BORDIN, E. R. YAMAMOTO, F. Y.; MANNES, T.; MUNHOZ, R. C.; MUELBERT, J. R. E.; A. M. DE.; CESTARI, M. M.; RAMSDORF. W. A. Sublethal effects of the herbicides atrazine and glyphosate at environmentally relevant concentrations on South American catfish

(*Rhamdia quelen*) embryos. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 98, p. 104057, 2023.

BOUBLIK, Y.; SAINT-AGUET, P.; LOUGARRE, A.; ARNAUD, M.; VILLATTE, F.; ESTRADA-MONDACA, S.; FOURNIER, D. Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues. **Protein Engineering**, v. 15, n. 1, p. 43–50, 2002.

BRASIL, Ministério da Agricultura e Pecuária. Registro de agrotóxicos e afins. Informações Técnicas 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrototoxicos/informacoes-tecnicas>>

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357, de 15 de junho de 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 01, de 23 de janeiro de 1986.

BRIDI, D.; ALTENHOFEN, S.; GONZALEZ, J. B.; REOLON, G. K.; BONAN, C. D. Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 392, p. 32-39, 2017.

BUENO-KRAWCZYK, A. C. DE D. Biomonitoramento da bacia hidrográfica do médio Rio Iguaçu em União da Vitória, PR, utilizando biomarcadores de contaminação ambiental. Curitiba. Tese (Doutorado em Ecologia e Conservação). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

BUSER, H. R. Atrazine and other s-triazine herbicides in lakes and in rain in Switzerland. **Environmental Science & Technology**, v. 24, n. 7, p. 1049–1058, 1990.

BUTLER, J. D.; VARGHESE, L.; DEB, N.; THORNHILL, B. Extending international toxicity testing guidance to middle eastern test species. **Science of The Total Environment**, v. 716, p. 136343, 2020.

CAMICCIA, M.; CANDIOTTO, L. Z. P.; GABOARDI, S. C.; PANIS, C.; KOTTWITZ, L. B. M. Determination of glyphosate in breast milk of lactating women in a rural area from Paraná state, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 55, n. 1, p. 12194, 2022.

CARMO, K. B. DO; SILVA, T. F. DA; ARMILIATO, N. Análise dos efeitos do glifosato e sua formulação Roundup® nas células e gônadas dos peixes *Danio rerio* (Cyprinidae). **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 41, n. 2Supl, p. 389, 2020.

CARSON, R. **Primavera Silenciosa**. São Paulo: Gaia, 2010, 305p.

CHALAR, G. Composición y abundancia Del zoobentos Del Arroyo Toledo (Uruguay) y su relación com La calidad de água. **Revista Chilena de História Natural**, v. 67, p. 129- 141, 1994.

CHAPMAN, P. M. Determining when contamination is pollution — Weight of evidence determinations for sediments and effluents. **Environment International**, v. 33, n. 4, p. 492–501, 2007.

COLOVIC, M. B.; KRSTIĆ, D. Z.; LAZAREVIĆ-PAŠTI, T. D.; BONDŽIĆ, A. M.; VASIĆ, V. M.; Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315–335, 2013.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H. Complexos metálicos com o herbicida glifosato; Revisão. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1038-1045, 2005.

DEL-CLARO, K.; TOREZAN-SILINGARDI, H. M. **Comportamento animal, interações ecológicas e conservação**. In: ROCHA, C. F. D. R.; SLUYS, M. V.; BERGALLO, H. G. *Biologia da Conservação: Essências*. Rio de Janeiro: Instituto Biomas. Editora Rima, p. 399-410, 2006.

DEPLEDGE, M. H. **Conceptual paradigms in marine ecotoxicology**. In: **Proceedings of the 12 TH Baltic Marine Biologists Symposium**. Olsen & Olsen, Fredensborg, Denmark, p. 47-52, 1992.

DEPLEDGE, M.H. Genotypic toxicity implications for individuals and populations. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, p. 101–104, 1994.

DORES, E. F. G. C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso - análise preliminar. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 27-36, 2001.

DOUSSET, S.; MOUVET, C.; SCHIAVON, M. Degradation of [14C] Terbutylazine and [14C] Atrazine in laboratory soil macrocosms. **Pesticide Science**, v. 49, n. 1, p. 9-16, 1997.

DUKE, S. O. LYDON, J.; KOSKINEN, WC; MOORMAN, TB; CHANEY, RL; HAMMERSCHMIDT, R. Glyphosate Effects on Plant Mineral Nutrition, Crop Rhizosphere Microbiota, and Plant Disease in Glyphosate-Resistant Crops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 42, p. 10375–10397, 2012.

ESCHMEYER, W. N.; FRICKE R. (eds). **Catalog of Fishes: Genera, Species, References**. [This version was edited by Bill Eschmeyer]. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>>. versão eletrônica acessada em 08/08/2023.

FARIA, M.; BEDROSSIANTZ, J.; RAMÍREZ, J. R. R.; MAYOL, M.; GARCÍA, G. H.; BELLOT, M.; PRATS, E.; GARCIA-REYERO, N.; GÓMEZ-CANELA, C.; GÓMEZ-OLIVÁN, L. M.; RALDÚA, D. Glyphosate targets fish monoaminergic systems leading to oxidative stress and anxiety. **Environment International**, v. 146, p. 106253, 2021.

FORBES, V. E.; ANNEMETTE P.; BACH, L. THE USE AND MISUSE OF BIOMARKERS IN ECOTOXICOLOGY. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 272–272, 2006.

FOSSI, M. C.; CASINI, S.; MARSILI, L.; ANCORA, S.; MORI, G.; NÉRI, G.; ROMEO, T.; AUSILI, A. Evaluation of ecotoxicological effects of endocrine disrupters during a fouryear survey of the Mediterranean population of swordfish (*Xiphias gladius*). **Marine Environmental Research**, v. 48, p. 425–429, 2004.

FRIEDRICH, K.; SILVEIRA, G. R.; AMAZONAS, J. C.; GURGEL, A. M.; ALMEIDA, V. E. S.; SARPA, M. Situação regulatória internacional de agrotóxicos com uso autorizado no Brasil: potencial de danos sobre a saúde e impactos ambientais. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, n. 4, p. e00061820–e00061820, 2021.

GABOARDI, S. C. **O uso de agrotóxicos no Sudoeste do Paraná a partir de uma perspectiva geográfica multiescalar**. Francisco Beltrão. Tese (Doutorado em Geografia). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Francisco Beltrão, 2021.

GIANESSI, L.; WILIAMS, A. Overlooking the obvious: The opportunity for herbicides in Africa. **Outlooks on Pest Management**, v. 22, n. 5, p. 211–215, 2011.

GLUSCZAK, L.; MORON, D. DOS S.; CRESTANI, M.; FONSECA, M. B. DA; PEDRON, F. DE. A. DUARTE, M. F.; VIEIRA, V. L. P. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, n. 2, p. 237–241, 2006.

GOULART, A. M. A. **Aspectos toxicológicos do inseticida Dimilin® : efeitos no comportamento, na hematologia e na morfologia testicular do lambari *Astyanax bimaculatus***. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2019. 85 f.

GRANDRAß, J.; BORMANN, G.; WILKEN, R. D.; FREZENIUS J. N-/P-pesticides in the Czech and German part of the river Elbe — Analytical methods and trends of pollution. **Journal of Analytical Chemistry**. n. 353, p. 70-74, 1995.

GREGOR, D. J.; GUMMER, W. D. Evidence of atmospheric transport and deposition of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in Canadian arctic snow. **Environmental Science & Technology**, v. 23, n. 5, p. 561-565, 1989.

GRZESIUK, M.; GRYGLEWICZ, E.; BENTKOWSKI, P.; PIJANOWSKA, J. Impact of Fluoxetine on Herbivorous Zooplankton and Planktivorous Fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 42, p. 385-392, 2023.

HAGGBLADE, S. B.; MINTEN, B.; PRAY, C.; REARDON, T.; ZILBERMAN, D. The herbicide revolution in developing countries: patterns, causes, and implications. **The European Journal of Development Research**, v. 29, n. 3, p. 533-559, 2017.

HERLENIUS, E.; LAGERCRANTZ, H. Development of neurotransmitter systems during critical periods. **Experimental Neurology**, v. 190, p. 8–21, 2004.

HORPPILA, J.; PELTONEN, H.; MALINEN, T.; LUOKKANEN, E.; KAIRESAALO, T. Top-down or bottom-up effects by fish: issues of concern in biomanipulation of lakes. **Restoration Ecology**, v. 6, n. 1, p. 20-28. 1998.

HOWE, K.; CLARK, M. D.; TORROJA, C. F.; TORRANCE, J.; BERTHELOT, C.; MUFFATO, M.; COLLINS, J. E.; HUMPHRAY, S.; MCLAREN, K.; MATTHEWS, L.; MCLAREN, S.; SEALY, I.; CACCAMO, M.; CHURCHER, C.; SCOTT, C.; BARRETT, J. C.; KOCH, R.; RAUCH, G.-J.; WHITE, S.; CHOW, W. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, n 496, p. 498- 503, 2013.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. **Boletim 2022**. Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil. Disponível em:<<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializa-cao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>>. Acesso em: dez. 2021.

JAYASUMANA, C.; GUNATILAKE, S.; SENANAVAKE, P. Glyphosate, hard water and nephrotoxic metals: are they the culprits behind the epidemic of chronic kidney disease of unknown etiology in Sri Lanka? **International Journal Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 2, p. 2125-2147, 2014.

JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 4, p. 680-693, 2008.

KHAN, A.; SHAH, N.; GUL, A.; SARAH, N. U.; ISMAIL, A.; MUHAMMAD; AZIZ, F.; FAROOQ, M.; ADNAN, M.; RIZWAN, M. Comparative Study of Toxicological Impinge of Glyphosate and Atrazine (Herbicide) on Stress Biomarkers; Blood Biochemical and Hematological Parameters of the Freshwater Common Carp (*Cyprinus carpio*). **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 25. n. 5. p. 1995-2001. 2016.

KLEMZ, C.; SILVA DE ASSIS, H. C. Efeitos do Endossulfano na atividade da acetilcolinesterase de cascudo (*Ancistrus multispinnis*, fish, Teleostei).Rev. Acad., Curitiba, v.3 , n.4, p. 51-58, 2005.

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

LEOPOLD, A. **A sand county almanac**. Oxford University Press, 2020.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate** [online], v. 42, n. 117, p. 518-534, 2018.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MALKANTHI, S. H.; SANDAREKA, U. G.; WIJERATHNE, A. W.; SIVASHANKAR, P. Banning of Glyphosate and its Impact on Paddy Cultivation: A study in Ratnapura District in Sri Lanka. **Journal of Agricultural Sciences – Sri Lanka**, v. 14, n. 2, p. 129, 2019.

MARTÍNEZ, M. A.; RODRÍGUEZ, J. L.; LOPEZ-TORRES, B.; MARTÍNEZ, M.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R. MAXIMILIANO, J. E.; ANADÓN, A. Use of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to evaluate glyphosate-induced effects on oxidative stress, neuronal development and cell death signaling pathways. **Environment International**, v. 135, p. 105414, 2020.

MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. S.; QUEIROZ, M. E. R.; ORLANDA, J. F. F.; SOUSA, H. S. Análise de pesticidas em amostras ambientais oriundos da barragem de Boa Esperança (PI/MA BRASIL): avaliação preliminar. **Pesticidas**, v. 12, p. 13-30, 2002.

MATOZZO, V.; FABRELLO, J.; MARIN, M. G. The Effects of Glyphosate and Its Commercial Formulations to Marine Invertebrates: A Review. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 8, n. 6, p. 399, 2020.

MERTENS, M. HÖSS, S.; NEUMANN, G.; AFZAL, J.; REICHENBECHER, W. Glyphosate, a chelating agent—relevant for ecological risk assessment? **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 6, p. 5298–5317, 2018.

MESA, M. G.; GASOMSKI, T. P.; PETERSON, J. H. Are all prey created equal? A review and synthesis of differential predation on prey in substandard condition. **Journal of Fish Biology**, n. 45 (Suppl A), p. 81–96, 1994.

MOYES, CHRISTOPHER D. SCHULTE, P. M. **Princípios de Fisiologia animal** [recurso eletrônico]; tradução: Adriane Belló Klein [et al]. – 2. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre: Artmed, 2010.

NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A.; LEITE, M. B. **Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição**. Pp. 413-431. In: P.A Zagatto & E. Bertoletti. (eds.). *Ecotoxicologia Aquática- Princípios e Aplicações*. São Paulo, 2006 , 478p.

PACE, M. L.; COLE, J.; CARPINTEIRO, S. R.; KITCHELL, J. F. Trophic cascades revealed in diverse ecosystems. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 14, n. 12, p. 483-488, 1999.

PANIS, C.; CANDIOTO, L. Z. P.; GABOARDI, S.C.; GURZENDA, S.; CRUZ, J.; CASTRO, M.; LEMOS, B. Widespread pesticide contamination of drinking water and impact on cancer risk in Brazil. **Environmental International**, v. 165, n. 1, p. 107321, 2022.

PAVAN, F. A.; SAMOJEDEN, C. G.; RUTKOSKI, C. F.; FOLADOR, A.; FRE, S. P. DA;MÜLLER, C.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. Morphological, behavioral and genotoxic effects of glyphosate and 2,4-D mixture in tadpoles of two native species of South American amphibians. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 85, p. 103637, 2021.

PEAKALL, D. W. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. **Toxicology Ecotoxicology News**, v. 1, p. 55-60, 1992.

PEREIRA, B. V. R. **Efeitos agudos e crônicos dos fármacos paracetamol e propranolol em diferentes biomarcadores de uma espécie de peixe neotropical**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Centro de Ciências e Tecnologias para a

Sustentabilidade, Programa De Pós-Graduação em Biotecnologia E Monitoramento Ambiental – UFSCAR, Sorocaba, 100p. 2018.

PLAA, G. L. Present status: toxic substances in the environment. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, n. 7, p. 1010-1016, 1982.

RAMÍREZ-MALULE, H.; QUIÑONES-MURILLO, D. H.; MANOTAS-DUQUE, D. Emerging contaminants as global environmental hazards. A bibliometric analysis. **Emerging Contaminants**, v. 6, p. 179–193, 2020.

RAND, G. M. (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment**. CRC press, 1995

RODENBURG, J.; JOHNSON, D. E. Managing weeds of rice in Africa. In: M.C.S. Wopereis (ed.) **Realizing Africa's Rice Promise**. **Bouake: Africa Rice**, p. 204–212, 2013.

ROMAN, E. S.; VARGAS, L.; RIZZARDI, M. A.; HALL, L.; BECKIE, H.; WOLF, T. M. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. Passo Fundo : Gráfica Editora Berthier, p. 152, 2005.

SANDOVAL-HERRERA, N.; MENA, F.; ESPINOZA, M.; ROMERO, A. Neurotoxicity of organophosphate pesticides could reduce the ability of fish to escape predation under low doses of exposure. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

SANDRINI, J. Z.; ROLA, R. C.; LOPES, F. M.; BUFFON, H. F.; FREITAS, M. M.; MARTINS, C. D. M. G.; ROSA, C. E. Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: in vitro studies. **Aquatic Toxicology**, v. 130-131, p. 171-173, 2013.

SANTOS, V. M. R. DOS et al. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 159–170, 2007.

SCHOMBURG, C. J.; GLOTFLELTY, D. E. Pesticide occurrence and distribution in fog collected near Monterey, California. **Environmental Science & Technology**, v. 25, n. 1, p. 155-160, 1991.

SCHONBRUNN, E.; ESCHENBURG, S.; SHUTTLEWORTH, W. A.; SCHLOSS, J. V.; AMRHEIN, N.; EVANS, J. N. S.; KABSCH, W. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 4, p. 1376–1380, 2001.

SCHVARTSMAN, S. **Intoxicações agudas**. 4. ed. São Paulo: Sarvier. p. 355, 1991.

SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic Toxicology**, v. 68, n. 4, p. 369–392, 2004.

SILVA, D. C. V. R.; POMPÊO, M.; PAIVA, T. C. B. A Ecotoxicologia no contexto atual no Brasil. **Ecologia de reservatórios e interfaces**. Tradução. São Paulo: Instituto de Biociências. p. 460, 2015.

SILVA, T. F. DA; BARP, E. A.; ARMILIATO, N. Avaliação da toxicidade celular do glifosato sobre as gônadas de *Danio rerio* (Cyprinidae). **Saúde e meio ambiente: revista interdisciplinar**, v. 6, n. 1, p. 85, 14 jul. 2017.

SILVEIRA, T. R.; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2, p. 4-5, 2012.

SMITH, C. M.; VERA, M. K. M.; BHANDARI, R. K. Developmental and epigenetic effects of Roundup and glyphosate exposure on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Aquatic Toxicology**, v. 210, p. 215–226, 2019.

SPARLING, D. W. **Ecotoxicology essentials: environmental contaminants and their biological effects on animals and plants**. Índia: Academic press, 2016.

SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C.; SMITH, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**. n. 83, v. 1, p. 13-34, 2008.

STÜTZER, G.; GUIMARÃES, G. Aspectos toxicológicos e ambientais relacionados com o uso de produtos fitossanitários. In: ZAMBOLIM L, CONCEIÇÃO M. Z.; SANTIAGO T. (org). **O que os engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários**. Viçosa: UFV, p. 69-84, 2003.

STEINRÜCKEN, H.; AMRHEIN, N. O herbicida glifosato é um potente inibidor da 5-enolpiruvilshikimic ácido-3-fosfato sintase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 94, n. 04, p. 1207–1212, 1980.

SUSSMAN, J.; HAREL, M.; FROW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L.; SILMAN, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, v. 253, n. 5022, p. 872–879, 23 ago. 1991.

TALWAR, P. K.; JHINGRAN, A. G. **Inland fishes of India and adjacent countries**. Oxford & I. B. H. Publishing, Calcutta, 1991.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 1, n. 2, p. 151–173, 1977.

VASSEUR, P.; JEAN-FRANÇOIS MASFARAUD; BLAISE, C. Ecotoxicology, revisiting its pioneers. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 4, p. 3852–3857, 19 out. 2020.

VEIGA, F.; ZAPATA, J.; MARCOS.; ÁLVAREZ, E. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. **Science of The Total Environment**. v. 271, n. 1-3, p. 135–144, 23 abr. 2001.

WALKER, D. B.; BAUMGARTNER, D. J.; GERBA, C. P.; FITZSIMMONS, K. Surface Water Pollution. **Environmental And Pollution Science**, [S.L.], p. 261-292, 2019.

WEBER, D.N.; SPIELER, R. E.; **Behavioral mechanisms of metal toxicity in fishes**. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. CRC Press, London, UK. p. 421–467, 1994.

WEIS, J. S.; SMITH, G.; ZHOU, T.; SANTIAGO-BASS, C.; WEIS, P. Effects of Contaminants on Behavior: Biochemical Mechanisms and Ecological Consequences. **BioScience**, v. 51, n. 3, p. 209, 2001.

ZAGATTO, A. P.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: Editora RiMa, 2008.

ZHANG, S.; XU, J.; KUANG, X.; LI, S.; LI, X.; CHEN, D.; ZHAO, X.; FENG, X. Biological impacts of glyphosate on morphology, embryo biomechanics and larval behavior in zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 181, p. 270–280, 2017.

3. CAPÍTULO 1: ANÁLISE DE TEMPO DE REAÇÃO DE PREDACÃO EM PEIXES *Danio rerio* EXPOSTOS AO HERBICIDA GILFOSATO

3.1 INTRODUÇÃO

A água é um recurso essencial para a sobrevivência, historicamente valorizada, motivo de disputas territoriais e desenvolvimento civilizatório às margens de grandes rios. Esforços para a conservação dos recursos hídricos têm sido empenhados, mas a alta demanda da sua utilização aumenta as possibilidades de poluição e impossibilita, ainda que um recurso essencial para a sobrevivência humana (Barbosa, Paiva, Adame, 2017; Silva, Mello, Almeida, 2019), a manutenção da sua integridade. Isto porque os ambientes aquáticos são suscetíveis aos constantes aportes de poluição, aportes estes oriundos de imensas descargas de esgoto doméstico, resíduos industriais e agrícolas (Walker *et al.*, 2019). Conseqüentemente, à medida que este recurso é contaminado, os esforços de mitigação de poluição bem como de restauração tornam-se inviáveis, visto o alto custo para a remoção de compostos químicos, além do fato de alguns compostos ainda não terem possibilidade de remoção dos ambientes.

Um dos grupos de compostos que mais polui os ambientes aquáticos, a partir dos resíduos lixiviados, é o dos agrotóxicos (Choudhury *et al.*, 2008). Embora esses compostos auxiliem na manutenção do cultivo de diferentes monoculturas na agricultura brasileira, seus resíduos chegam aos corpos hídricos e são incorporados à água e, como consequência, à biota residente. Dentre os agrotóxicos, o glifosato é um dos herbicidas mais utilizados na agricultura brasileira e, frequentemente, empregado para o controle de ervas daninhas urbanas e residenciais (Tang *et al.*, 2020).

Segundo o Painel de Informações sobre a Comercialização de Agrotóxicos e Afins no Brasil – série histórica 2009 - 2022, disponível no endereço eletrônico do IBAMA, em 2022, do total de 800,5 mil toneladas de agrotóxicos comercializadas no país, 266,09 mil toneladas foram de glifosato, o que representou um aumento de 20,07 toneladas quando comparado ao ano de 2021. Em 2021 a comercialização de glifosato foi de 246,02 mil toneladas. Estudos realizados por Panis *et al.* (2022), ao analisarem a água de beber de 127 cidades do Paraná, constataram a presença do glifosato e seu metabólito AMPA em todas as cidades consideradas no estudo. Embora os valores encontrados estivessem abaixo dos limites máximos estabelecidos pelos órgãos reguladores brasileiros, foram identificados como 747,9 vezes superiores aos limites determinados pela União Europeia. No ano de 2023, o uso do

glifosato nos países da UE foi objeto de discussão sobre sua possível proibição, porém, devido à falta de consenso, seu uso foi prorrogado por mais 10 anos (AgenciaBrasil, 2023; Euronews, 2023; National Geographic Portugal, 2023; Uol, 2023).

Estudos que investigam a integridade ambiental diante da poluição por compostos químicos são cruciais para entender o impacto dessas substâncias nos ecossistemas. Pesquisas utilizando bioindicadores de ambientes aquáticos traçam um panorama tanto sobre a qualidade do recurso disponível quanto do seu potencial para o abastecimento público. Muitos compostos químicos, cada vez mais presentes nos ambientes aquáticos, têm o potencial de prejudicar os animais, afetando negativamente suas funções cognitivas e, por conseguinte, provocando mudanças no comportamento (Lucon-Xiccato *et al.*, 2023). O desenvolvimento de tais pesquisas é essencial para avaliar os potenciais riscos para que se possam adotar medidas de preservação dos ecossistemas.

Organismos bioindicadores, por possuírem estreitos limites de tolerância ecológica, (Magalhães; Ferrão-Filho, 2008) são potenciais indicadores de poluição aquática, e as suas alterações comportamentais representam sinais da neurotoxicidade dos compostos presentes no ambiente. Neste sentido, os padrões de comportamento são essenciais para a aptidão e sobrevivência do organismo no meio em que vive, visto que é necessário desempenhar tarefas como o acasalamento, forrageamento e a fuga de possíveis riscos. Estímulos externos desencadeiam sequências fisiológicas específicas por meio de redes neurais, promovendo o comportamento normal dos indivíduos. A interferência dessas sequências por substâncias químicas que alteram a fisiologia do animal pode resultar em mudanças comportamentais prejudiciais à sobrevivência do indivíduo (Weber; Spieler, 1994). Uma vez que o comportamento serve de ligação entre os processos fisiológicos e ecológicos, é uma resposta de bioindicador ideal para estudar os efeitos dos compostos ambientais. Em estudos comportamentais, os peixes são importantes modelos biológicos devido à sua presença em diversos nichos, relevância na cadeia alimentar humana e ao amplo conhecimento disponível sobre sua fisiologia. Além disso, são facilmente observados e permitem a quantificação de muitos comportamentos ecológicos relevantes em um ambiente controlado (Scott; Sloman, 2004).

Peixes são amplamente utilizados como bioindicadores a fim de investigar os efeitos das substâncias químicas no ambiente aquático (Bueno-Krawczyk, 2016). *Danio rerio* é uma espécie que vem sendo amplamente utilizada devido ao fato de possuir fácil manutenção, ser economicamente viável para criação, e possuir seu genoma sequenciado (Silveira; Schneider; Hammes, 2012). É um excelente modelo para indicar toxicidade ambiental devido ao fato de

possuir grande sensibilidade a substâncias químicas, absorvendo rapidamente os compostos presentes na água e acumulando-os em diferentes tecidos, como no Sistema Nervoso Central demonstrado em estudos com o cobre (Grossel & Wood, 2002).

Cada vez mais pesquisas são desenvolvidas para investigar como a exposição de organismos a substâncias químicas afeta seu comportamento de predação. Grzesiuk *et al.* (2023) ao estudarem o impacto da fluoxetina, na predação de *Carassius carassius* concluíram que o comportamento de predação foi alterado com a exposição ao fármaco, resultando em uma distância de reação menor e taxa de alimentação mais lenta comparada ao grupo que não foi exposto.

Diante do exposto, a hipótese norteadora deste capítulo é de que a exposição de *D. rerio* ao herbicida glifosato (concentração ambiental de 65 µg/L) altera seu comportamento de predação. Nesse contexto, o objetivo deste capítulo consiste em comparar possíveis alterações nas respostas comportamentais relacionadas ao tempo de reação predador/presa em indivíduos expostos ao herbicida glifosato em vs o grupo controle.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 ANÁLISE DE PREDACÃO

3.2.1.1 MODELO BIOLÓGICO: *Danio rerio*

Para o presente trabalho utilizou-se um lote padrão de 15 peixes da espécie *Danio rerio* adultos, com peso médio de $\pm 0,180\text{g}$ ($dp=0,08$) e comprimento médio de $\pm 3,107\text{cm}$ ($dp=0,26$), adquiridos em loja comercial na cidade de União da Vitória- Paraná, o qual foi transportado para o Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa do Curso de Ciências Biológicas, na Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR), Campus de União da Vitória, Paraná, para a realização do bioensaio. Todos os protocolos envolvendo os animais foram submetidos à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa-Animal (CEUA) – UNESPAR, nº 007/2023.

Os peixes ficaram em aclimatação por um período de 48 horas após chegarem ao laboratório. Para isso, os organismos foram distribuídos aleatoriamente, em dois aquários ($n=7$) com 20 litros de água mineral, previamente ajustada quanto a seu pH, e com aeração constante. Os aquários foram revestidos ao seu redor com papel Kraft para diminuição de

fatores externos de estresse, como a movimentação de pessoas e outras possíveis interferências visuais. A alimentação dos peixes foi realizada diariamente em horário fixo às 09h da manhã *ad libitum* (alimentação à vontade) com larvas congeladas de Chironomidae.

3.2.1.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após o período de aclimação, um dos aquários contendo *Danio rerio* foi contaminado com 65 µg/L de glifosato (*Roundup*®), na concentração comercial, caracterizando o grupo experimental (GE). A determinação da concentração 65 µg/L foi segundo a Resolução CONAMA nº 357 de 2005, que preconiza sendo valor máximo permitido em águas doces de classe 1 (Brasil, 2005) e considerando que em 2022, Lechinovski e colaboradores constataram que essa concentração demonstrou potencial toxicidade, evidenciando alterações morfológicas nucleares significativas em *Danio rerio*.

O outro aquário permaneceu sem adição de herbicida, caracterizando o grupo controle (GC). Após a exposição os aquários foram cobertos com plástico filme para evitar contaminação externa (Figura 1).

Figura 1: Disposição dos aquários para o bioensaio.

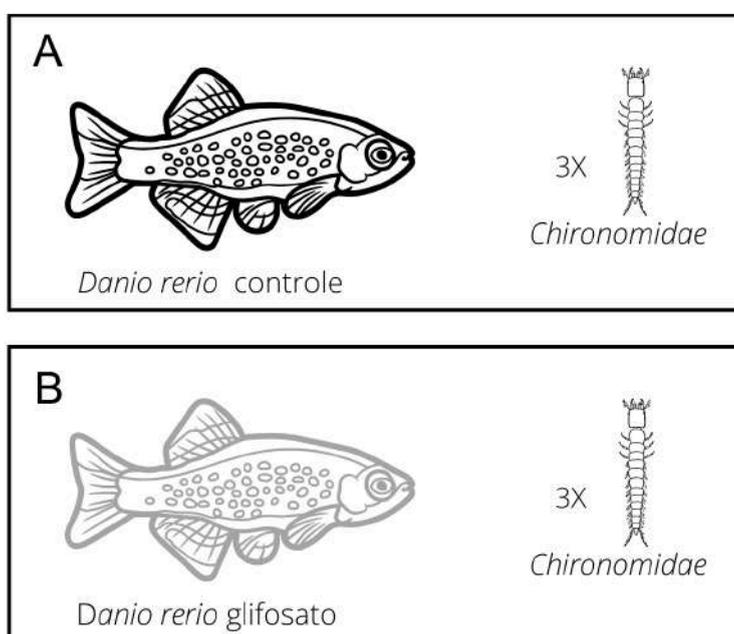


Fonte: A autora, 2023.

O período de exposição ao herbicida foi de 48h antes da observação efetiva, caracterizando uma exposição aguda. Os peixes não foram alimentados 24 horas antes dos ensaios de predação.

Traçou-se um delineamento para análise de distância de reação que seria realizada após o período de 48 horas de exposição. O cenário consistiu em dois tratamentos: A) Disposição individual no aquário teste de *D. rerio* não contaminado com três larvas de Chironomidae; B) Disposição individual no aquário teste de *D. rerio* contaminado com três larvas de Chironomidae (Figura 2).

Figura 2: Esquema visual dos tratamentos e disposição dos organismos no aquário para teste de distância de reação.

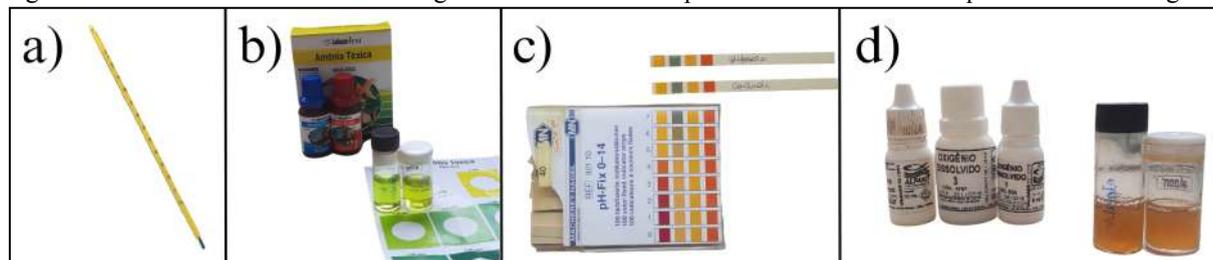


Fonte: A autora, 2023.

3.2.1.3 ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DA ÁGUA

Durante a exposição as seguintes variáveis limnológicas foram mensuradas: temperatura, amônia, pH e oxigênio dissolvido (Figura 3). A temperatura foi mensurada com um termômetro químico de Escala Externa -10+150:1C (Figura 3-a); a amônia foi testada por um kit comercial (Amônia Tóxica - LabconTeste) (Figura 3-b); o pH foi determinado através de fitas indicadoras de pH (pH-FIX 0-14 - MACHEREY-NAGEL) (Figura 3-c); e o oxigênio dissolvido foi mensurado por kit comercial (Alfa-kit) (Figura 3-d).

Figura 3: Materiais e reagentes utilizados para análises físico-químicas da água.



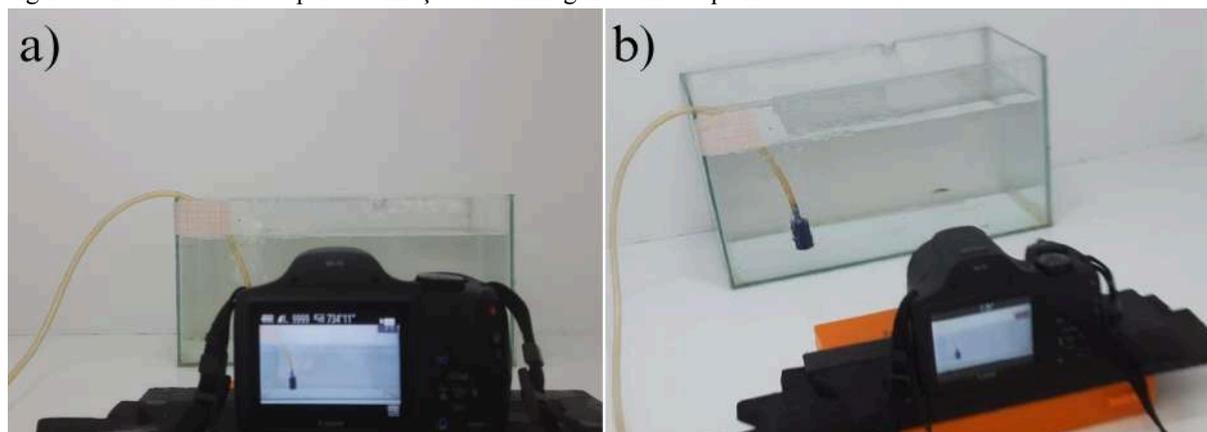
a - Termômetro químico utilizado para aferir a temperatura da água; b - Kit comercial labcon para análise de amônia tóxica; c - Fitas indicadoras de pH utilizadas para determinar o pH da água dos aquários; d - Kit comercial Alfacit para análise de oxigênio dissolvido. Fonte: A autora, 2023.

3.2.1.4 DISTÂNCIA DE REAÇÃO

Para a observação de predação e distância de reação utilizou-se um aquário teste de dimensões 30x15x16 de comprimento, altura e largura respectivamente, contendo água mineral não contaminada, previamente ajustada quanto a seu pH.

Foi construído um pequeno estúdio com fundo branco contendo uma câmera (Canon PowerShot SX530 HS) ajustada paralelamente ao aquário-teste, para filmagem do comportamento e caça dos peixes. Um papel contendo quadrados milimetrados foi colado ao canto do aquário para servir como padrão para a futura calibração de imagem (Figura 4).

Figura 4: Estúdio montado para realização das filmagens com o aquário-teste.



Fonte: A autora, 2023.

Um peixe por vez foi disposto no aquário-teste, permanecendo 3 minutos aclimatando ao novo ambiente. Após esse período procedeu-se à inserção de três larvas de Chironomidae no lado direito do aquário. Realizou-se então o monitoramento e filmagem do peixe por 5

minutos após a retirada da rede para observação da predação e distância de reação. Após o período de 5 minutos, o peixe era retirado do aquário, juntamente com as larvas restantes de Chironomidae.

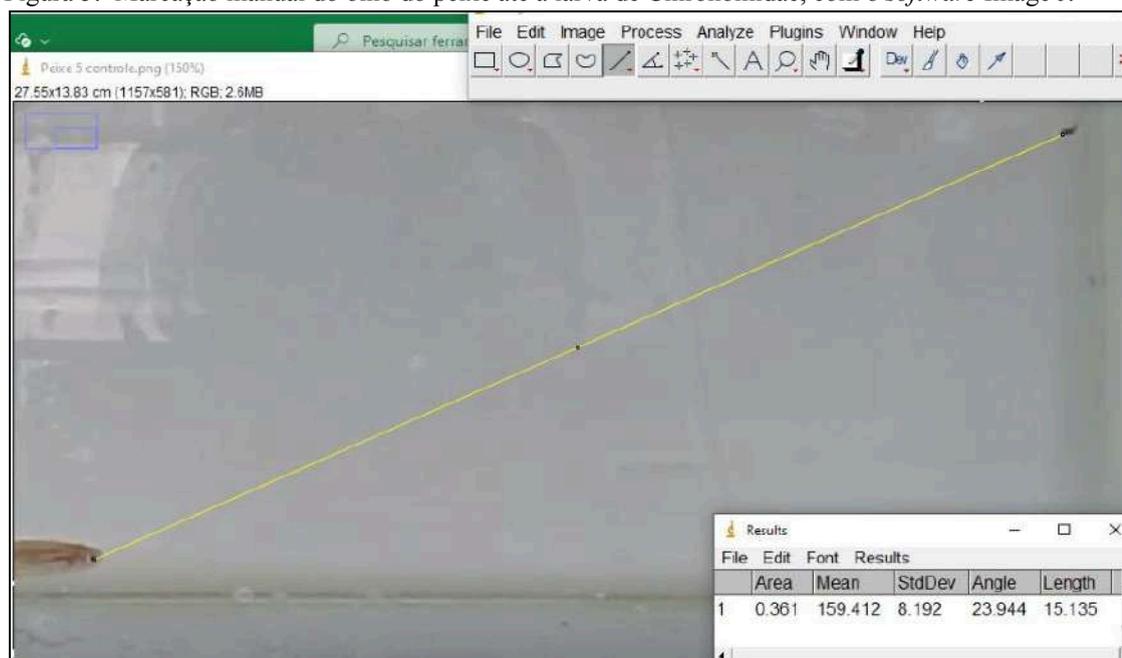
Posteriormente a gravação, os peixes foram anestesiados com óleo de cravo, realizando se a aferição de comprimento corporal com auxílio de uma régua e pesagem em uma balança digital. Em seguida os indivíduos foram eutanasiados através de secção medular.

3.2.1.5 ANÁLISE DAS IMAGENS

As filmagens foram analisadas individualmente, sendo realizado congelamento da imagem por uma fração de segundos para identificar o momento exato em que o predador avistou sua presa e começou a se mover em sua direção. A distância de reação foi determinada como a distância máxima entre o olho do peixe e a larva de Chironomidae no instante antecedente da movimentação até a presa. A distância de reação dos peixes analisada foi no momento do primeiro ataque (Grzesiuk *et al.*, 2023).

As imagens foram analisadas com o *software* Image J 1.37 for Windows® (Schneider; Rasband; Eliceiri, 2012) com a imagem previamente calibrada em relação às dimensões do aquário, utilizando marcação manual do olho do peixe até a larva de Chironomidae (Figura 5).

Figura 5: Marcação manual do olho do peixe até a larva de Chironomidae, com o *software* Image J.



Fonte: *print screen* da aplicação no *software* Image J.

3.2.1.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos dos 7 peixes do grupo controle e 6 peixes do grupo experimental foram analisados estatisticamente através do *software* estatístico *Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis - Past* (Hammer *et al.*, 2001), com o objetivo de avaliar se houveram diferenças significativas na atividade de predação em indivíduos contaminados por glifosato e indivíduos não contaminados. Para verificar se os dados obtidos eram paramétricos, ou seja, possuíam uma distribuição normal, utilizou-se o teste Shapiro-Wilk, analisado com nível de significância de 0,05.

Uma vez que os dados seguiram os pressupostos estatísticos, a comparação foi realizada pelo teste t de student para amostras independentes, que consiste em comparar as médias entre dois grupos, não havendo necessidade de comparações múltiplas, pois é observado um valor de *p* único (McDonald, 2014).

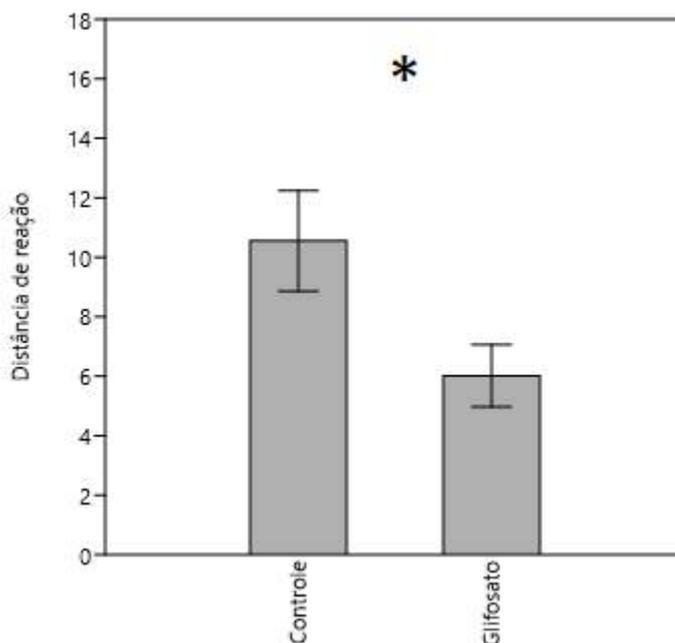
3.3 RESULTADOS

As variáveis de qualidade de água de pH (7,0), temperatura ($18^{\circ}\text{C} \pm 0.89$), oxigênio dissolvido (9,0 mg/L) e amônia (NH_3) ($0.25 \text{ mg/L} \pm 0.14$) mantiveram-se dentro de padrões para o cultivo dos organismos.

Um dos peixes do grupo experimental exposto a glifosato veio a óbito. Além disso, outro peixe desse mesmo grupo, ao ser submetido ao teste de predação, não exibiu comportamento de predação.

Através da comparação de distância de reação, foi possível observar diferença estatística significativa entre o grupo experimental e o grupo controle ($F= 5,207$; $df= 9,757$; $p= 0,05$). O grupo controle apresentou uma distância de reação maior se comparado ao grupo experimental (Gráfico 1).

GRÁFICO 1: Comparativo em relação à distância de reação verificada entre o grupo experimental e grupo controle.



As barras de erro mostram o desvio padrão da média. Fonte: A autora, 2023

3.4 DISCUSSÃO

Peixes expostos ao glifosato apresentaram uma distância de reação menor em relação à larva de Chironomidae, e precisaram aproximar-se mais da presa para começar a se mover em sua direção do que os peixes do controle. Além disso, o grupo experimental apresentou morte e inércia em relação à presa. Os resultados sugerem que o composto químico disponibilizado na água do grupo experimental contribuiu para alterar o padrão comportamental para a captura e posterior alimentação destes animais. Gaworecki e Klaine (2008) conduziram testes de predação com o robalo híbrido (*Morone saxatilis* × *M. chrysops*) a partir da exposição a fluoxetina e constataram uma diminuição na capacidade de capturar presas, diminuição que foi observada em relação à concentração e à duração da exposição. Durante essa pesquisa, os autores observaram que um aumento no tempo para capturar a presa estava relacionado com a redução nos níveis de serotonina cerebral (Gaworecki e Klaine, 2008). A serotonina é um neurotransmissor e hormônio que regula diversos comportamentos, como atividade alimentar, interações agressivas e comportamento sexual (Fent; Weston; Caminada, 2006). Resultados similares foram evidenciados por Hedgspeth, Nilsson e Berglund (2014) ao expor *Perca fluviatilis* ao inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRS) sertralina, onde notaram uma diminuição na alimentação que era

dependente da exposição e das concentrações crescentes de sertralina. Adicionalmente, Relyea e Edwards (2010) relataram que a exposição a Carbaril (inseticida carbamato) e malatíão (inseticida organofosforado) reduziu a taxa de predação de tritões em uma espécie de girino.

Os resultados obtidos da exposição ao glifosato demonstraram semelhanças com os observados de Grzesiuk *et al.* (2023), no estudo sobre o impacto da fluoxetina na predação de *Carassius carassius*, pois os autores concluíram que a exposição ao fármaco resultou em uma alteração no comportamento de predação desses peixes, levando a uma diminuição na distância de reação. Essa comparação sugere que a exposição ao glifosato pode ter efeitos semelhantes nos padrões de predação, embora os compostos químicos e seus mecanismos de ação sejam distintos.

A predação é um comportamento de extrema relevância do ponto de vista ecológico, uma vez que está diretamente associado ao crescimento e à sobrevivência dos animais predadores. Considerando os resultados obtidos neste trabalho, se torna evidente que os compostos químicos possuem potencial de prejudicar o comportamento alimentar, afetando a motivação para se alimentar ou diminuindo a eficácia na busca e captura de presas (Weis *et al.*, 2001). Brown *et al.* (1985) em seus estudos observaram que peixes expostos ao pentaclorofenol (PCP) realizaram menos investidas na captura de presas, sugerindo uma diminuição na motivação para se alimentar. Já Little *et al.* (1990) constataram que a frequência dos ataques não era tão afetada por certas substâncias tóxicas quanto a eficácia real na captura da presa, sugerindo que a coordenação estava mais prejudicada do que a motivação durante o processo de alimentação. Já no presente trabalho constatamos uma alteração negativa na percepção da presa com a exposição a glifosato. Tais diferenças podem refletir diferentes mecanismos de neurotoxicidade desencadeados por substâncias tóxicas específicas (Weis *et al.*, 2001).

Em ecossistemas estáveis, predadores e presas desenvolvem estratégias para manter um equilíbrio populacional. As interações entre predador e presa desempenham um papel crucial na organização das comunidades e podem servir como elos importantes entre os efeitos das substâncias tóxicas nos indivíduos e os impactos nos níveis mais amplos de organização. Alterações nas taxas e nos padrões de predação podem resultar em mudanças populacionais significativas, como redução do crescimento, da sobrevivência e da reprodução nas espécies predadoras (Weis *et al.*, 2001). Se torna evidente no presente estudo que a exposição de organismos aquáticos a organofosforados, como o glifosato, pode perturbar as

interações entre predador e presa, causando impactos negativos na estabilidade das comunidades aquáticas.

3.5 CONCLUSÕES

A observação da distância de reação no grupo experimental após exposição à concentração permitida pela resolução CONAMA em águas de classe 1, revelou a toxicidade do glifosato para a espécie *D. rerio*. Isso se evidenciou na alteração do padrão comportamental de distância de reação, no qual peixes expostos apresentaram uma distância de reação menor em relação à larva de Chironomidae. Esses resultados demonstram a necessidade de discussão sobre novos parâmetros de concentração do composto a serem permitidos no ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR 15088: ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda: método de ensaio com peixes**. 4. ed. Rio de Janeiro, 2022.

BARBOSA, D. C.; PAIVA, G.S.; ADAME, A. O uso de agrotóxicos e a contaminação dos recursos hídricos: custo benefício econômico e social. v. 01, 2016.

BECKER, J. L. **Estatística básica : transformando dados em informação** [recurso eletrônico]. Porto Alegre: Bookman, 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357, de 15 de junho de 2005. Cetesb, São Paulo, 2008.

BROWN, J. A.; JOHANSEN, P. H.; COLGAN, P. W.; MATHERS, R. A. Changes in the predator-avoidance behaviour of juvenile guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to pentachlorophenol. **Canadian Journal of Zoology**, v. 63, n. 9, p. 2001–2005, 1985.

BUENO-KRAWCZYK, A. C. DE D. **Biomonitoramento da bacia hidrográfica do médio Rio Iguaçu em União da Vitória, PR, utilizando biomarcadores de contaminação ambiental**. Curitiba. Tese (Doutorado em Ecologia e Conservação). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

CHOWDHURY, A.; PRADHAN, S.; SAHA, M.; SANYAL, N. Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 114–127, 2008.

FENT, K.; WESTON, A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 122–159, 2006.

GAWORECKI, K. M.; KLAINE, S. J. Behavioral and biochemical responses of hybrid striped bass during and after fluoxetine exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 88, n. 4, p. 207–213, 2008.

GLIFOSATO, o controverso herbicida autorizado pela UE. **National Geographic Portugal**. 4 dez. 2023. Disponível em: https://www.nationalgeographic.pt/meio-ambiente/glifosato-herbicida-portugal-uniao-europeia_4463. Acessado em: 12 dez. 2023.

GROSELL, M.; WOOD, C. M. Copper uptake across rainbow trout gills. **Journal of Experimental Biology**, v. 205, n. 8, p. 1179–1188, 2002.

GRZESIUK, M.; GRYGLEWICZ, E.; BENTKOWSKI, P.; PIJANOWSKA, J. Impact of Fluoxetine on Herbivorous Zooplankton and Planktivorous Fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 42, p. 385-392, 2023.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 178, 2001.

HEDGESPEETH, M. L.; NILSSON, P. A.; BERGLUND, O. Ecological implications of altered fish foraging after exposure to an antidepressant pharmaceutical. **Aquatic Toxicology**, v. 151, p. 84–87, 2014.

LECHINOVSKI, L.; BADOS, M.; ROSA J.; MODA, D. B.; BUENO KRAWCZYK, A. C. D. Ecotoxicological effects of conventional herbicides and a natural herbicide on freshwater fish (*Danio rerio*). **Journal of Environmental Science and Health, Part B.**, v. 57 n. 10, p. 812-820, 2022.

LITTLE, E. E.; ARCHESKI, R. D.; FLEROV, B.; KOZLOVSKAYA, V. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 19, n. 3, p. 380–385, 1990.

LUCON-XICCATO, T.; SAVAŞCI, B. B.; MEROLA, C.; BENEDETTI, E.; CAIONI, G.; ALIKO, V.; BERTOLUCCI, C.; PERUGINI, M. Environmentally relevant concentrations of triclocarban affect behaviour, learning, and brain gene expression in fish. **Science of The Total Environment**, v. 903, p. 166717–166717, 2023.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

NEVES, A. Comissão Europeia autoriza uso de glifosato na UE por mais 10 anos. **Agência Brasil**. EBC - Brasília, 16 nov. 2023. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/internacional/noticia/2023-11/comissao-europeia-autoriza-uso-de-glifosato-na-ue-por-mais-10-anos>. Acessado em: 12 dez. 2023.

PANIS, C.; CANDIOTO, L. Z. P.; GABOARDI, S.C.; GURZENDA, S.; CRUZ, J.; CASTRO, M.; LEMOS, B. Widespread pesticide contamination of drinking water and impact on cancer risk in Brazil. **Environmental International**, v. 165, n. 1, p. 107321, 2022.

RELYEA, R. A.; EDWARDS, K. What Doesn't Kill You Makes You Sluggish: How Sublethal Pesticides Alter Predator–Prey Interactions. **Copeia**, v. 2010, n. 4, p. 558–567, 2010.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.

SILVA, A. L. A.; MELLO, M. M. C.; ALMEIDA, R. M. Por onde andam os rios de Salvador. **Revista Brasileira de Assuntos Regionais e Urbanos. Goiânia**, v. 5, n. 2, p. 297-311, 2019.

SILVEIRA, T. R.; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2, p. 4-5, 2012.

SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic Toxicology**, v. 68, n. 4, p. 369–392, 2004.

TANG, Q.; TANG, J.; REN, X.; LI, C. Glyphosate exposure induces inflammatory responses in the small intestine and alters gut microbial composition in rats. **Environmental Pollution**, v. 261, p. 114129, 2020.

TIDEI, A. Bruxelas autoriza a utilização de glifosato na UE por mais 10 anos. **Euronews**. 16 nov. 2023. Disponível em: <https://pt.euronews.com/my-europe/2023/11/16/bruxelas-autoriza-a-utilizacao-de-glifosato-na-ue-por-mais-10-anos>. Acessado em: 12 dez. 2023.

UE aprova prorrogação de uso do glifosato por mais 10 anos, após países não chegarem a acordo. **UOL**, 16 nov. 2023. Disponível em: <https://noticias.uol.com.br/ultimas-noticias/rfi/2023/11/16/ue-aprova-prorrogacao-de-uso-do-glifosato-por-mais-10-anos-apos-paises-nao-chegarem-a-acordo.htm?cmpid=copiaecola>. Acessado em; 12 dez. 2023.

WALKER, D. B.; BAUMGARTNER, D. J.; GERBA, C. P.; FITZSIMMONS, K. Surface Water Pollution. **Environmental And Pollution Science**, [S.L.], p. 261-292, 2019.

WEBER, D.N.; SPIELER, R. E.; **Behavioral mechanisms of metal toxicity in fishes**. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. CRC Press, London, UK. p. 421–467, 1994.

WEIS, J. S.; SMITH, G.; ZHOU, T.; SANTIAGO-BASS, C.; WEIS, P. Effects of Contaminants on Behavior: Biochemical Mechanisms and Ecological Consequences. **BioScience**, v. 51, n. 3, p. 209, 2001.

4. CAPÍTULO 2: ANÁLISE DE RESPOSTA ANTI-PREDADOR E COMPORTAMENTO DE EVITAÇÃO DE DETECÇÃO EM PEIXES (*Danio rerio*), EXPOSTOS AO HERBICIDA GLIFOSATO

4.1 INTRODUÇÃO

A presença de compostos químicos em rios e lagos representa uma ameaça à sobrevivência de espécies não-alvo. Para avaliar os impactos da contaminação ambiental em espécies não alvo, são conduzidos bioensaios de toxicidade utilizando organismos bioindicadores, que devido aos seus estreitos limites de tolerância ecológica, revelam alterações fisiológicas, morfológicas ou comportamentais quando expostos a certas substâncias químicas (Magalhães; Ferrão-Filho, 2008), favorecendo o entendimento sobre os efeitos destas substâncias para os ambientes aquáticos.

O glifosato é um herbicida não seletivo, pertencente ao grupo dos organofosforados, apresentando atividade pós-emergente e sistêmica. Devido aos seus potenciais efeitos adversos em organismos não alvo, este herbicida tem sido objeto de debate e preocupação no domínio ambiental, inclusive com recentes discussões na União Europeia sobre sua proibição (AgenciaBrasil, 2023; Euronews, 2023; National Geographic Portugal, 2023; Uol, 2023) Alguns autores, ao estudarem o efeito comportamental do glifosato em peixes, mencionam aumento no comportamento rotacional em que os indivíduos passam menos tempo na área tratada, com prejuízos de memória e redução do comportamento agressivo (Bridi *et al.*, 2017; Da Costa Chaulet *et al.*, 2019)

É importante ressaltar que o glifosato existe em diversas formulações comerciais e, embora compartilhem o mesmo princípio ativo, diferem em concentração, surfactantes, sais e outros ingredientes (geralmente não identificados pelos fabricantes). Os efeitos destes compostos não estão, portanto, limitados a um único modo de ação neurotóxico padronizado e conhecido e nem sempre conduzem ao mesmo fenótipo comportamental (Lopes; Moraes; Martins, 2022), por isso os estudos com as diferentes formulações são interessantes, a fim de que se amplie o entendimento sobre os possíveis efeitos ecotoxicológicos dos compostos quando disponíveis no meio ambiente.

Segundo Scott e Sloman (2004), ainda que os efeitos diretos da contaminação em um animal possam não ser uma ameaça à sua saúde física, a alteração do comportamento normal pode ter consequências significativas para a sua capacidade de sobrevivência e interação com o ambiente. Weber e Spieler (1994) afirmam que o desempenho do comportamento normal de

peixes individuais é governado por sequências fisiológicas específicas sendo desencadeadas por estímulos externos que atuam por meio de redes neurais. A interrupção dessas sequências antes da conclusão provavelmente resultará em alterações comportamentais prejudiciais aos peixes. O comportamento, portanto, desempenha um papel fundamental como uma ligação entre os processos fisiológicos e ecológicos, tornando-se uma ferramenta ideal para investigar os efeitos dos compostos ambientais (Goulart, 2019).

Considerando o comportamento de evitação de predação, é importante observar que diversas substâncias químicas podem também interferir na habilidade de presas de evitar a predação. Vamosi e Schluter (2002) indicam que a influência dos predadores nas espécies de presas varia consideravelmente, dependendo da capacidade das presas em evitar a predação. Ao interferir nesta habilidade, as substâncias químicas têm o potencial de perturbar as comunidades aquáticas (Scott; Sloman, 2004), por conta das flutuações populacionais induzidas por tais substâncias. Díaz-Martín *et al.* (2021) enfatizam que, ao longo do processo evolutivo, os peixes desenvolveram uma variedade de comportamentos anti-predatórios, que incluem imobilidade no fundo ou nas paredes do ambiente - conhecido como comportamento de tigmotaxia (Colwill e Creton, 2011), camuflagem e preferência por áreas escuras ou ambientes mais protegidos (Kelley e Magurran, 2003; Steenbergen *et al.*, 2011). A falta ou falha desse comportamento pode favorecer os predadores, reduzir a sobrevivência das espécies de presas e, portanto, afetar a dinâmica das cadeias alimentares (Colwill e Creton, 2011; Stewart *et al.*, 2013;).

A hipótese norteadora deste capítulo é que a exposição de *D. rerio* ao glifosato altera seus padrões comportamentais de resposta anti-predatória e de preferência à luz devido a possíveis disfunções fisiológicas no organismo, resultantes da exposição ao composto químico. Portanto, o objetivo deste capítulo é comparar e analisar as possíveis alterações da resposta de fuga diante a um predador (fictício) de espécimes de *D. rerio* expostos ao glifosato em relação a um grupo controle.

4.2 METODOLOGIA

4. 2.1 MODELO BIOLÓGICO: *Danio rerio*

Para o presente trabalho utilizou-se um lote padrão de 15 peixes da espécie *Danio rerio* adultos, com comprimento médio de $\pm 2,955$ cm (dp=0,28) e peso médio de $\pm 0,319$ g (dp=0,12), adquiridos em loja comercial. Os peixes foram levados para o Laboratório

Multidisciplinar de Pesquisa do Curso de Ciências Biológicas, na Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR), Campus de União da Vitória, Paraná, para a realização do bioensaio. Todos os protocolos envolvendo os animais foram submetidos à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa-Animal (CEUA) – UNESPAR, nº 007/2023.

Os peixes ficaram em aclimatação por um período de 24 horas após chegarem ao laboratório. Para isso, os organismos foram distribuídos aleatoriamente, em dois aquários (n=7) com 20 litros de água mineral, previamente ajustada quanto a seu pH, e com aeração constante. Os aquários foram revestidos ao seu redor com papel Kraft para diminuição de fatores externos de estresse. A alimentação dos peixes foi realizada diariamente *ad libitum* (alimentação à vontade) com larvas congeladas de Chironomidae.

4.2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após a aclimatação, um dos aquários contendo *Danio rerio* teve adição de 65µg/L de glifosato (Roundup®) na concentração comercial. A determinação da concentração 65µg/L foi segundo a Resolução CONAMA nº 357 de 2005, que preconiza este como sendo o valor máximo permitido em águas doces de classe 1 (Brasil, 2005). O outro aquário permaneceu sem adição de herbicida, caracterizando o grupo controle.

O período de exposição da espécie ao herbicida foi de 48 horas (exposição aguda) antes da observação efetiva no aquário experimental.

4.2.3. ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DA ÁGUA

Durante a exposição as seguintes variáveis limnológicas foram mensuradas: temperatura, amônia e pH. A temperatura foi mensurada com um termômetro químico de Escala Externa -10+150:1C, a amônia foi testada por um kit comercial (Amônia Tóxica - LabconTeste), e o pH foi determinado através de fitas indicadoras de pH (pH-FIX 0-14 - MACHEREY-NAGEL).

4.2.4. COMPORTAMENTO DE EVITAÇÃO DE DETECÇÃO

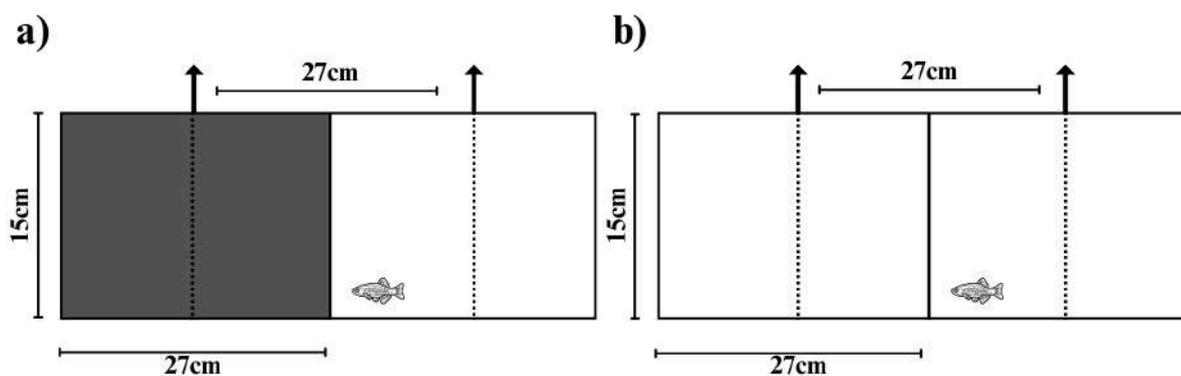
4.2.4.1 MODELO DE CAIXA DE LUZ ESCURA

A configuração do teste consistiu em um tanque de 20 L (40 cm de comprimento x 25 cm de altura x 20 cm de largura) igualmente dividido para caracterização em cor, sendo metade do aquário branco e metade, preto. Esta caracterização em cor foi denominada como configuração claro-escuro (Figura 1) (Sandoval-Herrera *et al.*, 2019).

Os peixes foram colocados em um compartimento de interseção, localizado entre um compartimento claro e outro escuro. Este compartimento de interseção era fechado por duas portas deslizantes, que foram removidas após um intervalo de habituação de 5 minutos. O peixe foi então, liberado a explorar o tanque livremente. O comportamento dos peixes expostos e não expostos foi registrado por 10 minutos usando uma câmera do *smartphone* Samsung M31 posicionada por cima do tanque com gravação em HD (*high definition*), filmando 30 quadros por segundo.

Um tanque teste todo branco foi usado como controle negativo e foi denominado configuração luz-luz, o qual foi gravado com uma câmera do *Smartphone* Samsung Galaxy S9 com gravação em HD. A preferência de iluminação foi definida como o tempo médio que cada indivíduo permaneceu em um compartimento específico do tanque experimental (Sandoval-Herrera *et al.*, 2019).

Figura 1: Configuração para teste de caixa clara/escuro usada para avaliar o comportamento de evitação de detecção em *Danio rerio*.



a - Projeto de aquário para claro/escuro; b - Projeto do tanque de peixes para a luz/luz. Fonte: A autora, 2023.

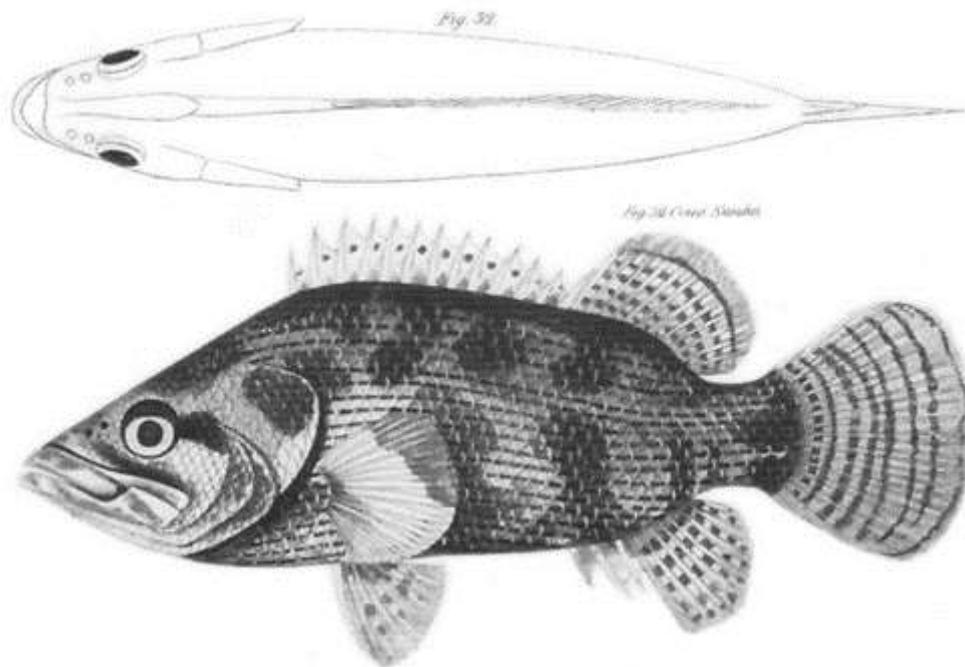
4.2.5. ANÁLISE DE RESPOSTA A FUGA DE PREDADOR FICTÍCIO

4.2.5.1. MODELO 3D DE PREDADOR: *Nandus nardus*

Para o teste com o predador, utilizou-se um modelo fabricado em 3D (peixe fictício) do Peixe folha-da-Índica (*Nandus nandus*), um conhecido predador simpátrico de *Danio rerio* (Bass; Gerlai, 2008; Gerlai; Fernandes; Pereira, 2009;). A escolha da espécie levou-se em consideração o estudo de Bass e Gerlai (2008), em que *D. rerio*, sem exposição prévia ao estímulo de um predador, demonstraram uma resposta de medo significativamente maior (aumento do número de saltos) quando expostos ao seu predador natural, o Peixe-folha-da-Índia.

Para construir o modelo tridimensional utilizado, foram selecionadas imagens que melhor representassem o formato e as características do peixe. Assim, foi possível a visualização do objeto de três perspectivas diferentes: lateral, frontal e superior. A pesquisa das imagens nessas três perspectivas foi realizada em sites de busca utilizando o nome científico do peixe-folha-da-índia (*Nandus nandus*). A melhor ilustração encontrada (Figura 2) foi a realizada por Hamilton em 1822 em seu livro “Um relato dos peixes encontrados no rio Ganges e seus braços”, a qual favoreceu a visualização da parte superior e lateral do peixe.

Figura 2: Ilustração utilizada como modelo para a confecção do peixe fictício tridimensional.

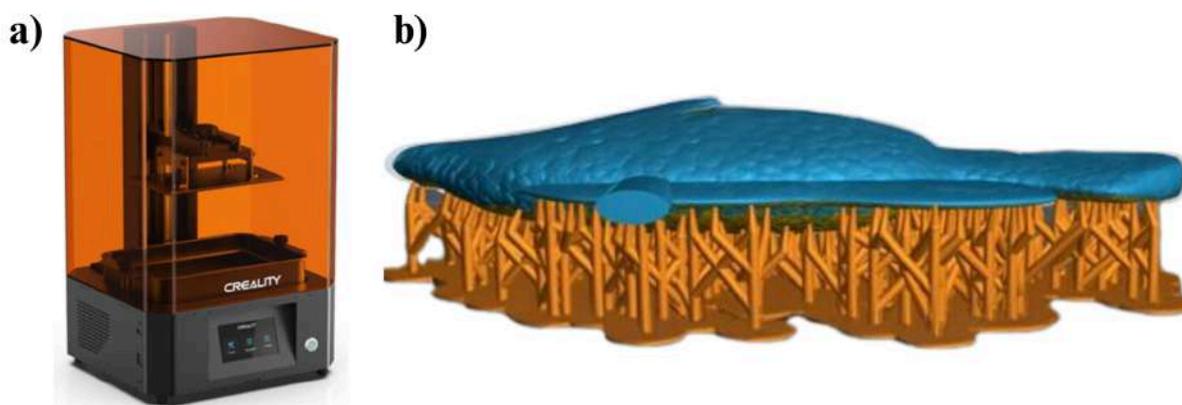


Fonte: HAMILTON, F. An account of the fishes found in the river Ganges and its branches. Edinburgh: Printed for A. Constable and company; 1822. Disponível em: <https://www.biodiversitylibrary.org/page/33425366#page/34/mode/1up>

A modelagem 3D foi realizada utilizando o *software ZBrush®* que utiliza abordagem de escultura digital, permitindo a modelagem 3D como se estivesse trabalhando com argila ou massa.

Para a impressão utilizou-se uma impressora de resina Creality LD-006 (Figura 3-a). A impressora imprimiu o modelo na posição horizontal, demandando de 463 camadas e 293 suportes, utilizando cerca de 30,65 ml de resina, correspondendo a 1h45min de impressão (Figura 3-b).

Figura 3: Impressão do peixe fictício tridimensional.



a - Impressora utilizada na impressão do modelo de peixe fictício tridimensional. Fonte: Creality Store, 2023. Disponível em: <https://www.crealitystore.com.br/impressora-3d-creality-ld-006-tela-monocromatica>; b - modo como foi realizada a impressão com todos os suportes e camadas. Fonte: *software Lychee Slicer Resin*, arquivo com preenchimento de 50%.

Após a conclusão da impressão, o modelo foi retirado da plataforma e submetido a um enxágue com água morna para a remoção dos suportes que foram removidos com o auxílio de um alicate. Posteriormente, a peça foi emergida em etanol e logo após levada para a cabine de cura, onde o processo de cura do material foi realizado. Uma haste foi encaixada na parte superior do peixe tridimensional. O modelo foi colorido com tinta spray marrom (Figura 4).

Figura 4: Modelo 3D do predador (Peixe folha-da-índia, *Nandus nandus*) pronto.

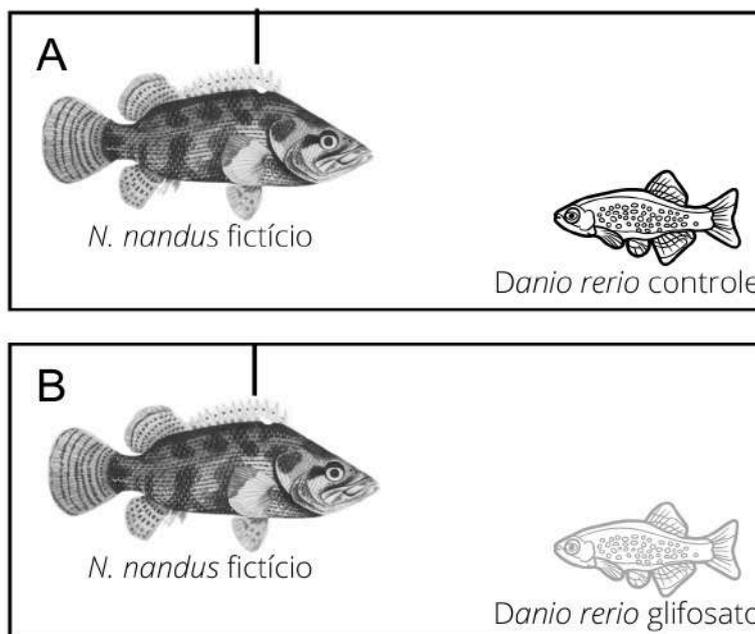


Fonte:A autora, 2023.

4.2.5.2 COMPORTAMENTO ANTI-PREDADOR

A análise de resposta à fuga de predador foi realizada após a análise do comportamento de evitação de detecção. O cenário consistiu em dois tratamentos: A) Um *Danio rerio* não contaminado (do grupo controle) em contato com o modelo 3D de *Nandus nandus*; B) Um *Danio rerio* contaminado (do grupo experimental) em contato com o modelo 3D de *Nandus nandus* (Figura 5). O procedimento foi realizado sete vezes com o grupo experimental e oito vezes com o grupo controle, levando em consideração a realização de um teste por indivíduo.

Figura 5: Esquema visual dos tratamentos e disposição dos organismos no aquário para análise de comportamento anti-predador.



a - Teste com peixe não contaminado, b - teste com peixe contaminado com 65µg/L de glifosato. Fonte: A autora, 2023.

Para a observação do comportamento anti-predador utilizou-se um aquário experimental de dimensões 30x15x16 de comprimento, altura e largura respectivamente, contendo água mineral não contaminada, previamente ajustada quanto a seu pH.

Foi construído um pequeno estúdio com fundo branco, contendo um tripé ajustado paralelamente ao aquário experimental, para filmagem do comportamento. Um peixe era disposto por vez no lado esquerdo do aquário experimental, sendo simulado um ataque de um predador. O estímulo aplicado para desencadear a resposta de fuga foi uma vibração gerada pelo fluxo da onda da proa quando o peixe manequim se aproximava repentinamente. O ataque do predador e a resposta dos peixes foram registrados utilizando a câmera do *smartphone* Samsung M31 com gravação em 4K HD, gravando 28 quadros por segundo (fps). Os vídeos foram analisados individualmente, por meio do *software* *Movavi Video Converter*, utilizando a ferramenta câmera lenta com velocidade a 10% que permitiu quantificar com maior precisão o momento em que o ataque começou e a subsequente resposta de fuga de *D. rerio*.

O tempo de reação de *D. rerio* ao potencial ataque ou interação com o predador (*N. nandus*) foi definido como o período de tempo entre o início do evento e o sinal de fuga (ou seja, flexão do pedúnculo caudal de *D. rerio*) (Sandoval-Herrera *et al.*, 2019).

4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente através do software estatístico *Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis - Past* (Hammer *et al.*, 2001), com o objetivo de avaliar se houveram diferenças significativas nos comportamentos de preferência por iluminação e anti-predador em indivíduos contaminados por glifosato e indivíduos não contaminados.

Para verificar se os dados obtidos eram paramétricos, ou seja, possuíam uma distribuição normal, utilizou-se o teste Shapiro-Wilk, analisado com nível de significância de 0,05.

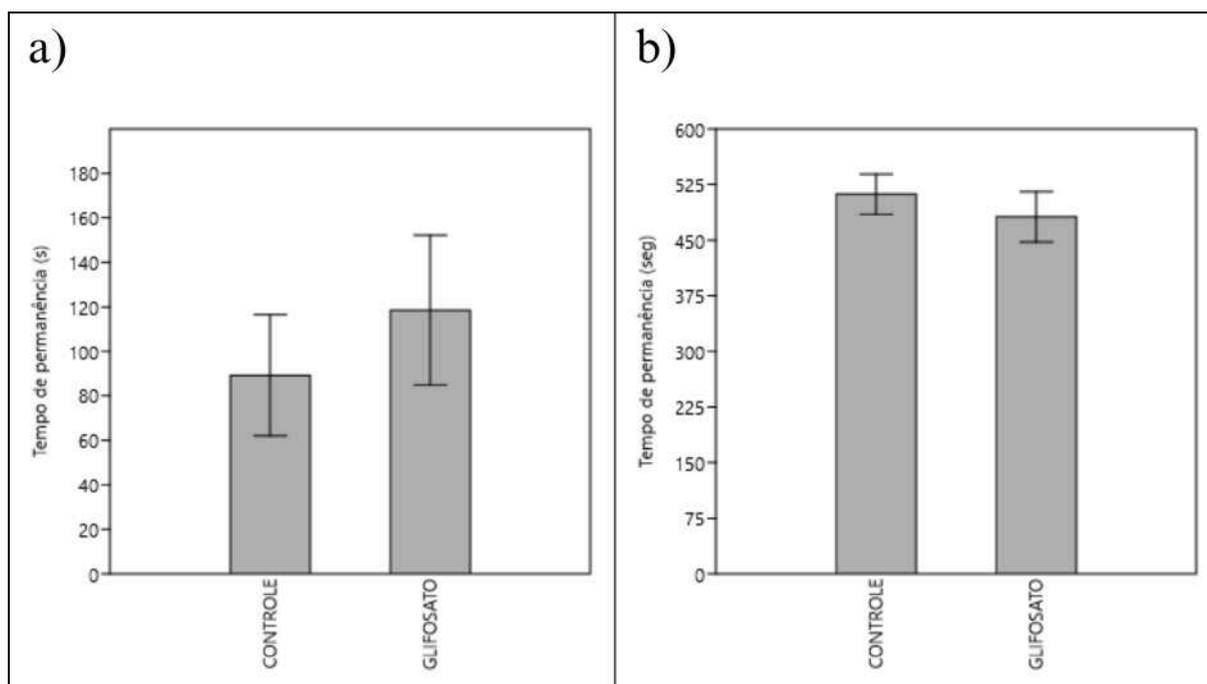
Uma vez que os dados seguiram os pressupostos estatísticos, a comparação foi realizada pela análise de variância ANOVA – unidirecional, que consiste em comparar as variâncias entre as medianas, na qual a variável preditora é categórica e a variável resposta é contínua (Gotelli; Ellison, 2011). Trata-se de um teste sobre a igualdade (ou não) dos valores esperados (médias) da variável de interesse nas k subpopulações de interesse (Becker, 2015).

4.4 RESULTADOS

As variáveis de qualidade de água de pH (7.0), temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 0.89$) e amônia tóxica (NH_3) ($0.25 \text{ mg/L} \pm 0.14$) mantiveram-se dentro de padrões para o cultivo dos organismos.

O comportamento de evitação de detecção quando comparado à permanência do grupo controle e experimental no compartimento claro não foi significativo ($F= 0,4569$; $df=11,51$; $p>0,05$) (Gráfico 1-a). O mesmo ocorreu quando comparada a permanência do grupo controle e experimental no compartimento escuro ($F= 0,5048$; $df=11,48$; $p>0,05$) (Gráfico 1-b).

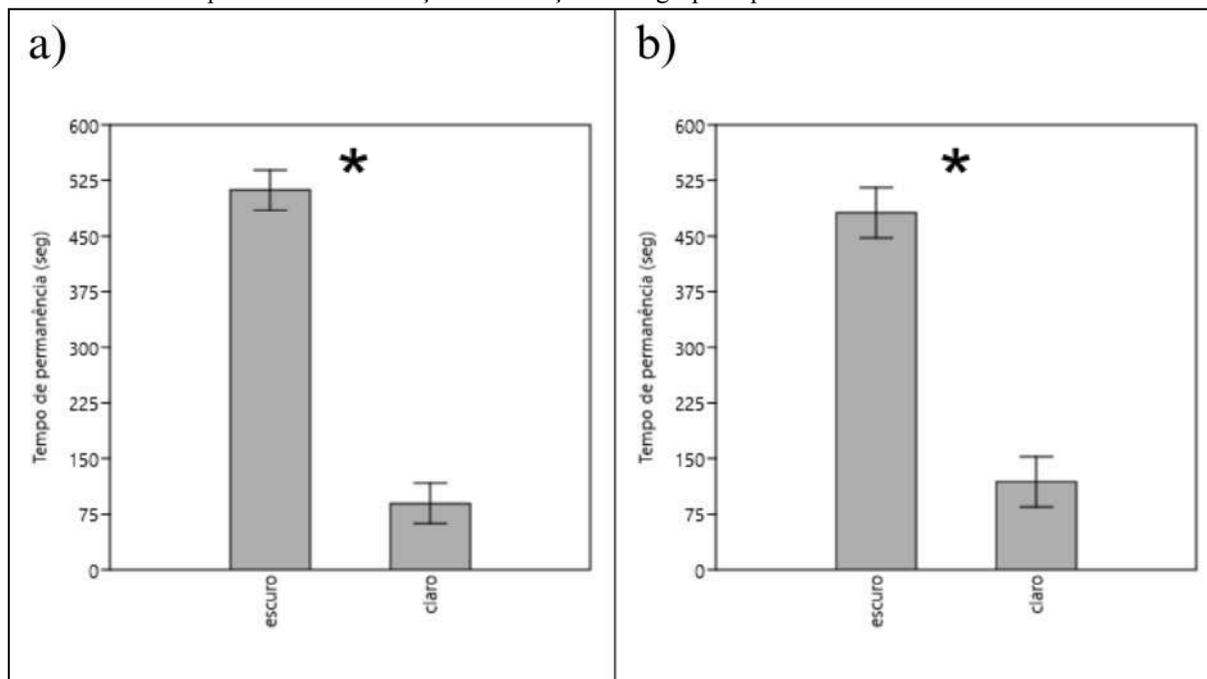
GRÁFICO 1: Comportamento de evitação de detecção entre grupo experimental e controle.



a - Tempo de permanência do grupo controle e grupo experimental no compartimento claro; b - Tempo de permanência do grupo controle e grupo experimental no compartimento escuro. As barras de erro mostram o desvio padrão da média. Fonte: A autora, 2023.

Já o comportamento de evitação de detecção quando comparado à permanência do grupo controle no compartimento claro e escuro, demonstrou que indivíduos do grupo controle permaneceram um tempo significativamente maior no compartimento escuro ($F=120,8$; $df=12$; $p=0,000000127$) (Gráfico 2-a) indicando sinais de vulnerabilidade a predadores. O mesmo ocorreu quando comparado à permanência do grupo experimental no compartimento claro e escuro ($F=58,11$; $df=12$; $p=0,00000614$) (Gráfico 2-b).

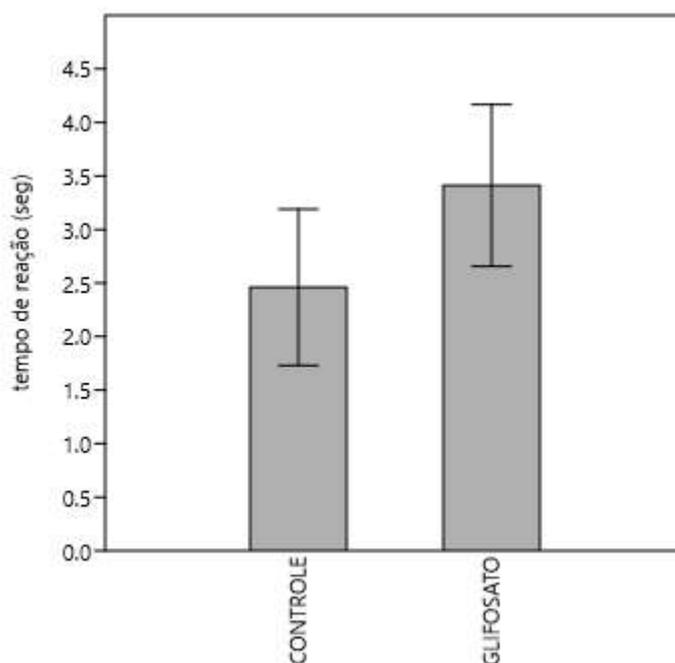
GRÁFICO 2: Comportamento de evitação de detecção entre grupo experimental e controle.



a - Tempo de permanência do grupo controle nos compartimentos claro e escuro; b - Tempo de permanência do grupo experimental nos compartimentos claro e escuro. As barras de erro mostram o desvio padrão da média. Fonte: A autora, 2023.

O tempo de reação como resposta à fuga do predador fictício foi mais longo no grupo experimental (Gráfico 3) se comparado ao grupo controle, no entanto os valores não demonstraram diferenças significativas ($F= 0,8207$; $df=11,99$; $p>0,05$).

GRÁFICO 3: Comparação do tempo de reação ao predador fictício entre o grupo controle e o grupo experimental.



As barras de erro mostram o desvio padrão da média. Fonte: A autora, 2023.

4.4 DISCUSSÃO

A partir do desenvolvimento da pesquisa, nossos resultados demonstram que, indivíduos do grupo experimental apresentaram uma tendência a permanecer mais tempo no compartimento claro, em comparação com indivíduos do grupo controle. Sandoval-Herrera *et al.* (2019), ao analisarem o comportamento de evitação de *Astyanax aeneus* exposto à 0,014 mg/L de etoprofós, concluíram que peixes não expostos evitaram o compartimento claro do aquário (como esperado), enquanto peixes expostos não mostraram preferência por um dos compartimentos, explorando ambas as áreas do tanque por tempo semelhante.

Conforme resultados apresentados do experimento com o predador fictício, embora as diferenças entre o grupo controle e experimental não tenham alcançado significância estatística, observa-se uma alteração na resposta de fuga do predador fictício induzida pelo glifosato. Os peixes expostos ao contaminante escaparam mais lentamente de um ataque simulado. Sandoval-Herrera *et al.* (2019), ao expuserem o tetra *Astyanax aeneus* a 0,014 mg/L de um pesticida organofosforado, o etoprofós, perceberam que a espécie também demonstrou uma menor capacidade de escapar de uma ataque predador fictício. Ao realizarem uma comparação com a atividade da AChE dos peixes, os autores sugerem que a inibição da AChE induzida por pesticidas reduz a capacidade de fuga dos peixes.

O padrão comportamental dos animais, que inclui sua capacidade de interagir com o meio ambiente, e responder a diversas condições, é controlado por vias genéticas, bioquímicas e fisiológicas. Conforme destacado por Petersen *et al.* (2022), os traços comportamentais são o resultado funcional da atividade neural, sendo assim, mudanças no sistema nervoso decorrentes da exposição a substâncias químicas acabam por se manifestar através de alterações nos padrões comportamentais.

Neste sentido, o teste claro/escuro é baseado na preferência natural de muitos organismos por ambientes escuros em comparação aos ambientes claros. Esse comportamento é denominado *scototaxis* e é uma estratégia de defesa utilizada para evitar predadores. A preferência por ambientes escuros funciona como uma estratégia adaptativa, uma vez que locais escuros dificultam a distinção do organismo em relação ao substrato, oferecendo um meio de camuflagem e reduzindo a visibilidade perante os predadores. Essa preferência por ambientes escuros é observada em muitas espécies como uma maneira de

minimizar o risco de predação e aumentar a probabilidade de sobrevivência. (Sandoval-Herrera *et al.*, 2019). É importante observar que a preferência por um ambiente claro ou escuro em uma câmara experimental está relacionada à idade no peixe zebra. Os espécimes adultos são caracterizados por uma preferência por ambientes escuros em relação aos claros (Maximino *et al.*, 2010).

A resposta de fuga na maioria dos peixes é conhecida como reflexo de sobressalto C. Esse comportamento de evitação é mediado pelas células de Mauthner, também conhecidas como células M. Esses neurônios de comando recebem estímulos acústicos ou vibracionais e desencadeiam uma contração muscular contralateral em resposta. Isto permite que o peixe se curve rapidamente e fuja de um estímulo potencialmente perigoso, contribuindo para a sua resposta de evitação. Esta resposta é essencial para a sobrevivência dos peixes, pois auxilia na sua capacidade de escapar de ameaças imediatas no ambiente aquático (Stevens, 2011).

Pompermaier *et al.* (2020) ao exporem *D. rerio* a glifosato na concentração 4,8 µg/L e de ácido 2,4-diclorofenoxiacético à concentração de 3,4 µg/L, concluíram que peixes expostos aos herbicidas permaneceram em uma área de risco de predação após a simulação de um ataque de predador aviário, uma observação que não foi observada nos peixes não expostos ao herbicida que, por sua vez, evitaram a área de risco. Wibe, Nordtug, e Jenssen (2001) ao exporem *Gasterosteus aculeatus L.* à 3, 9 e 27 ppb de bis (tributilestanho) óxido, constataram que os peixes escolheram zonas mais expostas da coluna de água, cessavam seu comportamento de predadores mais cedo e exibiam tempos de latência mais longos antes de efetuarem comportamentos anti-predadores quando lhes era mostrado um bico de garça fictício.

Saaristo *et al.* (2017) ao exporem *Poecilia reticulata* à 4 ng/L e 16 ng/L de fluoxetina, observaram que após uma simulação de colisão com pássaros, os peixes expostos à fluoxetina congelaram por mais tempo, passaram mais tempo sob a cobertura vegetal e ficaram menos ativos. Um estudo com a exposição de *Poecilia reticulata* à 500 e 700 g/L de pentaclorofenol durante 1-4 semanas, demonstrou diminuição do número de ataques necessários efetuados pelo predador *Micropterus salmoides* para capturar uma presa, o número necessário de perseguições e o tempo de perseguição comparação com as presas expostas a concentrações mais baixas (Brown *et al.*, 1985).

O herbicida Glifosato foi descrito como um desregulador endócrino do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HPI) (Cericato *et al.* 2009) como um indutor de estresse oxidativo (Gluszczak *et al.* 2006; Langiano e Martinez 2008; de Moura *et al.* 2017) e também é conhecido por induzir a inibição da acetilcolinesterase (AChE) (Cattaneo *et al.*, 2011; De

Moura *et al.*, 2017; Gholami-Seyedkolaei *et al.*, 2013; Gluszczak *et al.*, 2006; Modesto e Martín Salbego *et al.*, 2010; Sandrini *et al.*, 2013). Sandoval-Herrera *et al.* (2019) sugerem que o acúmulo de acetilcolina no SNC, causado pela inibição da AChE, pode funcionar como um agente ansiolítico em peixes expostos e explicar as alterações comportamentais observadas. Outro aspecto importante a se considerar é de que o glifosato pode causar aversão e desconforto em *D. rerio*, o que pode resultar em diversas alterações no seu comportamento. (Jiraungkoorskul *et al.*, 2002).

Presas expostas a compostos químicos podem enfrentar dificuldades em detectar predadores, correr mais riscos ao sair de seus refúgios em busca de alimentos, apresentar um desempenho reduzido em situações que exigem movimentos rápidos, resistência diminuída, dificuldade em se locomover, mudanças nos padrões de atividade e aumento da visibilidade (hiperatividade). Todos esses fatores contribuem no aumento da vulnerabilidade das presas aos predadores (Scott; Sloman, 2004; Mesa *et al.*, 1994). À medida que indivíduos com maiores concentrações de compostos químicos forem mais facilmente capturados pelos predadores, os compostos químicos são transferidos para níveis tróficos superiores (Weis; Candelmo, 2012). Isto sugere uma revisão nas concentrações ambientais permitidas pela regulamentação brasileira.

4.5 CONCLUSÃO

A análise do comportamento de preferência por luz e da resposta de fuga ao predador, após exposição à concentração permitida pela Resolução CONAMA em águas de classe 1, não revelou resultados estatisticamente significativos sobre a toxicidade do glifosato para a espécie *D. rerio*, mas os efeitos biológicos ficaram claros. Isto porque, apesar da ausência de diferenças estatísticas, observou-se que o grupo experimental permaneceu por mais tempo no compartimento claro do aquário em comparação com o grupo controle, indicando sinais de vulnerabilidade a predadores. Da mesma forma, o tempo de reação à resposta de fuga do predador fictício foi mais longo no grupo experimental em comparação com o grupo controle. Esses resultados sugerem a necessidade de mais investigações sobre o impacto da exposição crônica a baixas concentrações no comportamento dos peixes. Embora difícil de efetuar, estes estudos são mais realistas do ponto de vista ambiental, pois permitem a evidência do que ocorre no ambiente natural quando os organismos são expostos a estes compostos químicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR 15088: ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda: método de ensaio com peixes**. 4. ed. Rio de Janeiro, 2022.

BASS, S. L. S.; GERLAI, R. Zebrafish (*Danio rerio*) responds differentially to stimulus fish: The effects of sympatric and allopatric predators and harmless fish. **Behavioural Brain Research**, v. 186, n. 1, p. 107–117, 2008.

BECKER, J. L. **Estatística básica: transformando dados em informação** [recurso eletrônico]. Porto Alegre: Bookman, 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357, de 15 de junho de 2005. Cetesb, São Paulo, 2008.

BRIDI, D.; ALTENHOFEN, S.; GONZALEZ, J. B.; REOLON, G. K.; BONAN, C. D. Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 392, p. 32-39, 2017.

BROWN, J. A.; JOHANSEN, P. H.; COLGAN, P. W.; MATHERS, R. A. Changes in the predator-avoidance behaviour of juvenile guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to pentachlorophenol. **Canadian Journal of Zoology**, v. 63, n. 9, p. 2001–2005, 1985.

CATTANEO, R.; LORO, V. L.; SPANEVELLO, R.; SILVEIRA, F. A. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 92, n. 3, p. 133–137, 2008.

CERICATO, L., NETO, J. G. M., KREUTZ, L. C., QUEVEDO, R. M., DA ROSA, J. G. S., KOAKOSKI, G., CENTENARO, L., POTTKER, E., MARQUEZE, A., & BARCELLOS, L. J. G. Responsiveness of the interrenal tissue of Jundiá (*Rhamdia quelen*) to an in vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 3, p. 363–367, 2009.

COLWILL, R. M.; CRETON, R. Locomotor behaviors in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. **Behavioural Processes**, v. 86, n. 2, p. 222–229, 2011

DA COSTA CHAULET, F.; DE ALCANTARA BARCELLOS, H. H.; FIOR, D.; POMPERMAIER, A.; KOAKOSKI, G.; DA ROSA, J. G. S.; FAGUNDES, M.; BARCELLOS, L. J. G. Glyphosate- and Fipronil-Based Agrochemicals and Their Mixtures Change Zebrafish Behavior. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 77, n. 3, p. 443–451, 2019.

DE MOURA, F. R.; BRENTGANI, K. R.; GEMELLI, A.; SINHORIN, A. P.; SINHORIN, V. D. G. Oxidative stress in the hybrid fish jundiara (*Leiarius marmoratus* × *Pseudoplatystoma reticulatum*) exposed to Roundup Original®. **Chemosphere**, v. 185, p. 445–451, 2017.

DÍAZ-MARTÍN, R. D.; CARVAJAL-PERAZA, A.; YÁÑEZ-RIVERA, B.; BETANCOURT-LOZANO, M. Short exposure to glyphosate induces locomotor, craniofacial, and bone disorders in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 87, p. 103700–103700, 2021.

GERLAI, R.; FERNANDES, Y.; PEREIRA, T. Zebrafish (*Danio rerio*) responds to the animated image of a predator: Towards the development of an automated aversive task. **Behavioural Brain Research**, v. 201, n. 2, p. 318–324, 2009.

GHOLAMI-SEYEDKOLAEI, S. J.; MIRVAGHEFI, A.; FARAHMAND, H.; KOSARI, A. A. Effect of a glyphosate-based herbicide in *Cyprinus carpio*: Assessment of acetylcholinesterase activity, hematological responses and serum biochemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 98, p. 135–141, 2013.

GLIFOSATO, o controverso herbicida autorizado pela UE. **National Geographic Portugal**. 4 dez. 2023. Disponível em: https://www.nationalgeographic.pt/meio-ambiente/glifosato-herbicida-portugal-uniao-europeia_4463. Acessado em: 12 dez. 2023.

GLUSCZAK, L.; MORON, D. DOS S.; CRESTANI, M.; FONSECA, M. B. DA; PEDRON, F. DE. A. DUARTE, M. F.; VIEIRA, V. L. P. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, n. 2, p. 237–241, 2006.

GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M. **Princípios de estatística em ecologia** [recurso eletrônico]. Porto Alegre : Artmed, 2011.

GOULART, A. M. A. **Aspectos toxicológicos do inseticida Dimilin® : efeitos no comportamento, na hematologia e na morfologia testicular do lambari *Astyanax bimaculatus***. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2019. 85 f.

HAMILTON, F. **An account of the fishes found in the river Ganges and its branches**. Edinburgh: Printed for A. Constable and company; 1822.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 178, 2001.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E. S.; KRUATRACHUE, M.; Histopathological effects of Roundup, a Glyphosate Herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Sci Asia** 28:121–127, 2002.

KELLEY, J. L.; MAGURRAN, A. E. Learned predator recognition and antipredator responses in fishes. **Fish and Fisheries**, v. 4, n. 3, p. 216–226, 2003.

LANGIANO, V. DO C.; MARTINEZ, C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 147, n. 2, p. 222–231, 2008.

LOPES, A. R.; MORAES, J. S.; MARTINS, C. DE M. G. Effects of the herbicide glyphosate on fish from embryos to adults: a review addressing behavior patterns and mechanisms behind them. **Aquatic Toxicology**, v. 251, p. 106281, 2022.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MAXIMINO, C. DE BRITO, T. M.; COLMANETTI, R.; PONTES, A. A.; DE CASTRO, H. M.; DE LACERDA, R. I.; MORATO, S.; GOUVEIA, A. J. R. Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. **Behavioural Brain Research**, v. 210, n. 1, p. 1–7, 2010.

NEVES, A. Comissão Europeia autoriza uso de glifosato na UE por mais 10 anos. **Agência Brasil**. EBC - Brasília, 16 nov. 2023. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/internacional/noticia/2023-11/comissao-europeia-autoriza-uso-de-glifosato-na-ue-por-mais-10-anos>. Acessado em: 12 dez. 2023.

PETERSEN, B. D.; BERTONCELLO, K. T.; BONAN, C. D. Standardizing Zebrafish Behavioral Paradigms Across Life Stages: An Effort Towards Translational Pharmacology. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 2022.

POMPERMAIER, A.; KIRSTEN, K.; SOARES, S. M.; FORTUNA, M.; KALICHAK, F.; IDALENCIO, R.; KOAKOSKI, G.; BARRETO, R. E.; BARCELLOS, L. J. G. Waterborne agrichemicals compromise the anti-predatory behavior of zebrafish. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 31, p. 38559–38567, 2020.

SAARISTO, M.; MCLENNAN, A.; JOHNSTONE, C. P.; CLARKE, B. O.; WONG, B. B. M. Impacts of the antidepressant fluoxetine on the anti-predator behaviours of wild guppies (*Poecilia reticulata*). **Aquatic Toxicology**, v. 183, p. 38–45, 2017.

SANDOVAL-HERRERA, N.; MENA, F.; ESPINOZA, M.; ROMERO, A. Neurotoxicity of organophosphate pesticides could reduce the ability of fish to escape predation under low doses of exposure. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

SANDRINI, J. Z.; ROLA, R. C.; LOPES, F. M.; BUFFON, H. F.; FREITAS, M. M.; MARTINS, C. D. M. G.; ROSA, C. E. Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: in vitro studies. **Aquatic Toxicology**, v. 130-131, p. 171-173, 2013.

SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic Toxicology**, v. 68, n. 4, p. 369–392, 2004.

STEENBERGEN, P. J.; RICHARDSON, M. K.; CHAMPAGNE, D. L. Patterns of avoidance behaviours in the light/dark preference test in young juvenile zebrafish: A pharmacological study. **Behavioural Brain Research**, v. 222, n. 1, p. 15–25, 2011.

STEVENS, E. D. **Buoyancy, locomotion, and movement in fishes: an introduction**. In A. P. Farrell (Ed.), *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment* (pp. 516-519). San Diego: Academic Press, 2011.

TIDEI, A. Bruxelas autoriza a utilização de glifosato na UE por mais 10 anos. **Euronews**. 16 nov. 2023. Disponível em: <https://pt.euronews.com/my-europe/2023/11/16/bruxelas-autoriza-a-utilizacao-de-glifosato-na-ue-por-mais-10-anos>. Acessado em: 12 dez. 2023.

UE aprova prorrogação de uso do glifosato por mais 10 anos, após países não chegarem a acordo. **UOL**, 16 nov. 2023. Disponível em: <https://noticias.uol.com.br/ultimas-noticias/rfi/2023/11/16/ue-aprova-prorrogacao-de-uso-do-glifosato-por-mais-10-anos-apos-paises-nao-chegarem-a-acordo.htm?cmpid=copiaecola>. Acessado em; 12 dez. 2023.

VAMOSI, S. M.; SCHLUTER, D. Impacts of trout predation on fitness of sympatric sticklebacks and their hybrids. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 269, n. 1494, p. 923–930, 2002.

WEBER, D.N.; SPIELER, R. E.; **Behavioral mechanisms of metal toxicity in fishes**. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. CRC Press, London, UK. p. 421–467, 1994.

WEIS, J .S.; CANDELMO, A. Pollutants and fish predator/prey behavior: A review of laboratory and field approaches. **Current Zoology**, n. 58, p 9–20, 2012.

WIBE, Å. E.; NORDTUG, T.; JENSSEN, B. M. Effects of bis(tributyltin)oxide on antipredator behavior in threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. **Chemosphere**, v. 44, n. 3, p. 475–481, 2001.

5. CAPÍTULO 3: ANÁLISE DE POSSÍVEIS EFEITOS DE NEUROTOXICIDADE EM PEIXES (*Danio rerio*), EXPOSTOS AO HERBICIDA GLIFOSATO

4.1 INTRODUÇÃO

Em ambientes aquáticos a importância da qualidade da água desempenha um papel importante na ecologia da biota residente. A contaminação destes ambientes tem causado sérios danos que prejudicam a saúde dos animais, o que pode resultar na extinção de espécies vulneráveis, e acarretar em mudanças na produtividade, estrutura de habitat e estabilidade, repercutindo no funcionamento do ecossistema e, conseqüentemente, na perda de outras espécies (Flores-Lopes; Thomaz, 2011a; Flores-Lopes; Thomaz, 2011b; Worm; Duffy, 2003;).

Considerando a contaminação dos recursos hídricos, a ecotoxicologia emerge como uma ferramenta essencial para avaliar a toxicidade de tais recursos para os organismos aquáticos (Magalhães; Ferrão-Filho, 2008). A utilização de organismos bioindicadores é útil à medida que algumas espécies exibem pequena tolerância a variações ambientais e, quando presentes em determinada área, revelam a integridade do ambiente no qual estão presentes. Tais espécies, consideradas "modelos" auxiliam na identificação dos possíveis efeitos danosos advindo da exposição a determinados compostos químicos, ou da interação sinérgica entre eles (Arias *et al.*, 2007; Callisto; Moreno, 2006; Costa *et al.*, 2008).

Tendo em vista que o controle da poluição está intrinsecamente ligado à preservação da saúde, à garantia de um ambiente ecologicamente equilibrado e à melhoria da qualidade de vida, padrões de qualidade da água são estabelecidos por entidades públicas com o propósito de assegurar que a água usada para uma finalidade específica não contenha impurezas que possam causar efeitos prejudiciais aos organismos aquáticos, como alterações no desenvolvimento cerebral, mudanças neurocomportamentais, alterações histopatológicas, dentre outras disfunções que venham ocasionar uma diminuição da saúde e qualidade de vida animal (Horzmann *et al.*, 2021; Melvin *et al.*, 2017; Shuman-Goodier; Propper, 2016).

A Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005, estabelece os padrões para a classificação dos corpos de água e as diretrizes ambientais para o seu enquadramento. Tal resolução estabelece limites individuais para cada substância química em cada classe de água, como por exemplo a concentração máxima permitida de 65 µg/L de glifosato que em águas de classe 1, águas doces que podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato

primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho; à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película; e à proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas (CONAMA, 2005).

É de extrema importância discutir os efeitos de uma concentração ambiental permitida de uma determinada substância química para as espécies da biota residente, à medida que certas substâncias exercem efeitos adversos em diferentes organismos, como danos oxidativos, inibição da atividade da acetilcolinesterase, alterações histopatológicas, danos neurológicos, mudanças comportamentais, decréscimo nas taxas de crescimento, desordem reprodutiva, mutagênese e carcinogenicidade (Montanha; Pimpão, 2012; Santana; Cavalcante, 2016). A expressão de tais efeitos dependerá da toxicidade específica para cada substância química, que é definida pela dose necessária para produzir um efeito toxicológico nos organismos (Briggs, 1992).

A contaminação aquática por herbicidas pode ocorrer como resultado de pulverização direta, ou durante chuvas fortes ou lixiviação de campos agrícolas (Benachour; Seralini, 2009; Roy *et al.*, 2016). O glifosato tem sido detectado regularmente em diversos corpos d'água (Mercurio *et al.*, 2014), e sua presença em águas superficiais foi constatada 60 dias após a aplicação da formulação, o que indica que esse composto pode persistir no meio ambiente (Roy *et al.*, 2016). Além disso, foi relatada a ocorrência de até aproximadamente 0,04 mg/L de glifosato em rios próximos ao escoamento urbano e aos efluentes do tratamento de águas residuais. Portanto, a exposição a organismos não-alvo é inevitável e está relacionada à alta solubilidade do glifosato em água, contaminando a microbiota aquática, animais e peixes. (Roy *et al.*, 2016).

A biota aquática é o aporte final dos resíduos da monocultura, dentre tais resíduos destacam-se os agrotóxicos, aplicados ao solo com finalidade de controlar as chamadas “pragas”, que possam vir prejudicar o rendimento das culturas. A exposição aos agrotóxicos é um importante agente estressor a diversos organismos aquáticos, acarretando letalidade e/ou mudanças metabólicas e bioquímicas nos tecidos de animais expostos a estes compostos químicos (Nwani *et al.*, 2010). Nesse sentido, o uso de biomarcadores é amplamente vantajoso por ser considerado um indicador de resposta biológica a compostos químicos ou estressores ambientais. Os efeitos dos compostos químicos em níveis biológicos mais fundamentais, tais como respostas moleculares e bioquímicas, tendem a se manifestar de maneira mais rápida e a especificidade dessas respostas proporciona uma compreensão mais completa dos impactos dos compostos químicos nos níveis mais elementares da organização

biológica. Tais respostas podem ser empregadas como biomarcadores de contaminação inicial, pois, mesmo em níveis baixos, são capazes de desencadear efeitos fisiológicos (Arias *et al.*, 2007).

A enzima acetilcolinesterase (AChE) desempenha um papel crucial como um biomarcador nos organismos, influenciando várias funções fisiológicas dos peixes, como a localização de presas, a evasão de predadores e a orientação em direção ao alimento (Gluszczak *et al.*, 2006). Diversos estudos demonstram a inibição deste biomarcador em peixes expostos a diferentes concentrações de agrotóxicos organofosforados (como é o caso do glifosato) característicos de bloquear irreversivelmente a ação da enzima acetilcolinesterase, uma vez que o tempo necessário para libertar a enzima da inibição pode exceder o tempo necessário para a síntese de nova AChE. Além disso, no peixe-zebra, a AChE foi identificada como a única enzima responsável pela hidrólise da ACh (Behra *et al.*, 2002, Bertrand *et al.*, 2001).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi analisar a atividade de AChE em *Danio rerio* expostos a concentração de 65 µg/L de glifosato, concentração essa permitida em águas de Classe 1 segundo a Resolução CONAMA nº 375/05. Parte-se do pressuposto de que peixes expostos ao glifosato terão alteração na atividade da AChE em comparação a peixes não expostos ao composto.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 MODELOS BIOLÓGICOS: *Danio rerio*

Para o presente trabalho utilizou-se um lote padrão de 40 peixes da espécie *Danio rerio* adultos, medindo aproximadamente 3cm, adquiridos em loja comercial. A espécie foi transportada para o laboratório Multidisciplinar de Pesquisa do Curso de Ciências Biológicas, na Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR), Campus de União da Vitória, Paraná, para a realização do bioensaio. Todos os protocolos envolvendo os animais foram submetidos à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa-Animal (CEUA) – UNESPAR, nº 007/2023.

Os peixes ficaram em aclimação por um período de 60 horas após chegarem ao laboratório. Para isso, os organismos foram distribuídos aleatoriamente, em dois aquários (n=20) com 20 litros de água mineral, previamente ajustada quanto a seu pH, e com aeração constante. Os aquários foram revestidos ao seu redor com papel Kraft para diminuição de

fatores externos de estresse, como a movimentação de pessoas e outras possíveis interferências visuais (Figura 1). A alimentação dos peixes foi realizada diariamente *ad libitum* (alimentação à vontade) com *D. magna* viva e larvas congeladas de Chironomidae.

Figura 1: Disposição dos aquários com aeradores e revestimento ao redor com papel Kraft.



Fonte: A autora, 2023.

4.2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após a aclimatação, um dos aquários contendo *Danio rerio*, foi contaminado com 65 µg/L de glifosato (*Roundup*®) na concentração comercial. A determinação da concentração 65 µg/L foi segundo a Resolução Conama nº 357 de 2005, que preconiza sendo valor máximo permitido em águas doces de classe 1 (BRASIL, 2005). O outro aquário permaneceu sem adição de herbicida, caracterizando o grupo controle.

O período de exposição da espécie ao herbicida foi de 96 horas antes da observação efetiva no aquário experimental, sendo esta uma exposição aguda. Realizou-se reposição de $\frac{1}{3}$ da solução após 48 horas da exposição, caracterizando o ensaio como semiestático (ABNT NBR 15088:2022).

Após 96 horas de exposição os peixes foram anestesiados com óleo de cravo e eutanasiados por secção medular. Imediatamente ocorreu a coleta de cérebro e uma amostra de músculo axial colocados em criotubos e armazenados em nitrogênio líquido. As amostras

foram transportadas do laboratório da Universidade Estadual do Paraná, Campus de União da Vitória para o Instituto de Pesquisas Pelé Pequeno Príncipe, Curitiba, Paraná, onde seguiram-se as análises de AChE.

4.2.3 BIOMARCADORES

Amostras de cérebro e músculo axial foram homogeneizadas em tampão fosfato (0,1M) em pH 7,5 na proporção de 1:10 (massa/volume) e centrifugadas a 10.000x g durante 20 minutos, a 4°C. A atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi medida espectrofotometricamente a 405 nm, conforme proposto em Ellman *et al.* (1961), modificado para microplaca de Silva de Assis (1998). Cada ensaio enzimático foi realizado em triplicata.

A concentração de proteína homogeneizada em tecido de cérebro e músculo axial foi realizada de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976), usando albumina sérica bovina como padrão.

4.2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente através do *software* estatístico *Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis* - PaSt (Hammer, 2012), com o objetivo de avaliar se houveram diferenças significativas na atividade da AChE no cérebro e no músculo em indivíduos contaminados por glifosato.

Para verificar se os dados obtidos eram paramétricos, ou seja, possuíam uma distribuição normal, utilizou-se o teste Shapiro-Wilk, analisado com nível de significância de 0,05.

Uma vez que os dados seguiram os pressupostos estatísticos, a comparação foi realizada pela análise de variância ANOVA – unidirecional, que consiste em comparar as variâncias entre as medianas, na qual a variável preditora é categórica e a variável resposta é contínua (Gotelli; Ellison, 2011). Trata-se de um teste sobre a igualdade (ou não) dos valores esperados (médias) da variável de interesse nas k subpopulações de interesse (Becker, 2015). Para complementar o teste ANOVA, utilizou-se o teste de Dunn, teste de comparação múltipla a posteriori. Testes complementares são utilizados caso o *p-value* seja estatisticamente significativo. o Teste de Dunn não assume que os seus resíduos provêm de uma distribuição específica. Sua utilização é importante para averiguar quais as médias que

são significativamente distintas quando existe uma diferença entre três ou mais médias (Botelho *et al.*, 2021).

4.3 RESULTADOS

As variáveis de qualidade de água de pH (7,60), temperatura (26,7°C), oxigênio dissolvido (9,0 mg/L) e amônia (NH₃) (0.006 mg/L) mantiveram-se dentro de padrões para o cultivo dos organismos.

Obteve-se a atividade de AChE do cérebro (Tabela 1) e do músculo (Tabela 2) de oito indivíduos do grupo controle e oito indivíduos do grupo experimental.

Tabela 1: Atividade da AChE em nmol.min⁻¹.mg de proteína⁻¹ no cérebro de *D. rerio*.

INDIVÍDUO	CONTROLE	GLIFOSATO
PEIXE 1	70,89349183	115,5723381
PEIXE 2	91,30234372	122,6480891
PEIXE 3	81,58460013	106,8904361
PEIXE 4	76,76361483	90,80719574
PEIXE 5	97,65247322	79,64180758
PEIXE 6	64,14835616	90,47748032
PEIXE 7	90,69018357	94,73823199
PEIXE 8	59,39763293	102,4039753
PEIXE 9	95,65681943	

Fonte: A autora, 2023.

Tabela 2: Atividade da AChE em nmol.min⁻¹.mg de proteína⁻¹ no músculo de *D. rerio*.

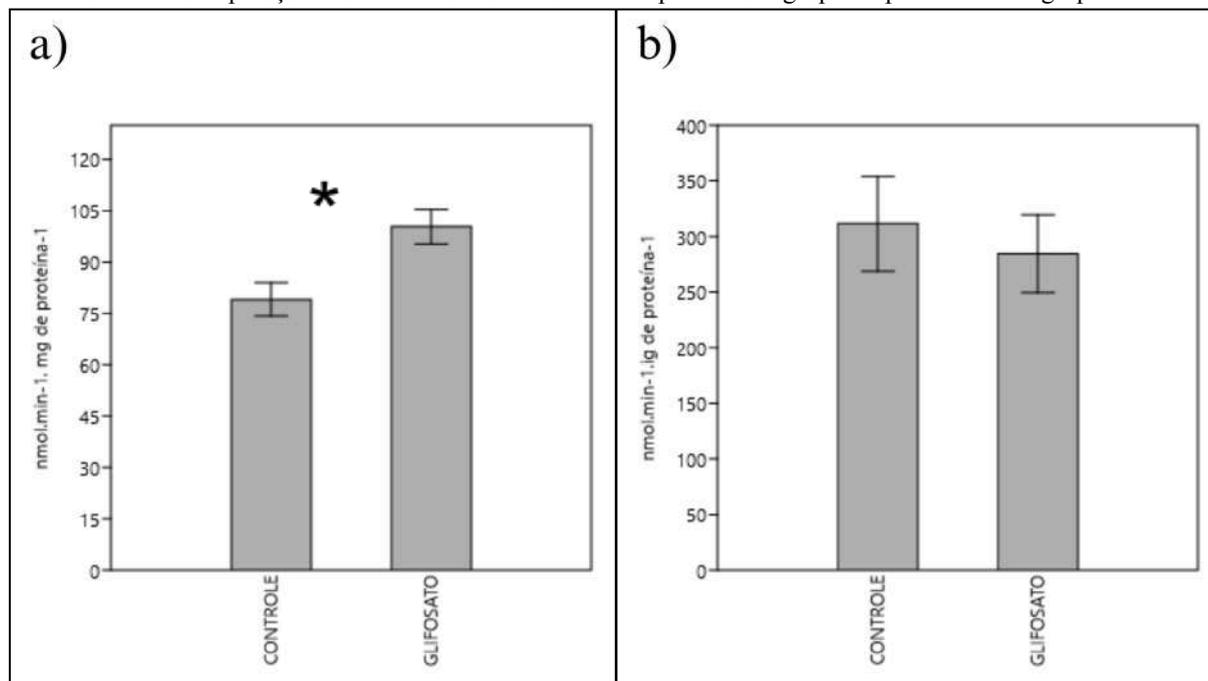
INDIVÍDUO	CONTROLE	GLIFOSATO
PEIXE 1	266,2271805	316,3776543
PEIXE 2	114,7451905	193,4651763
PEIXE 3	351,1304688	187,6384681
PEIXE 4	317,6541375	424,7118695
PEIXE 5	251,2780863	211,7339082
PEIXE 6	530,001003	434,9584661
PEIXE 7	270,3009224	258,9565713
PEIXE 8	391,004966	246,6947691
PEIXE 9	261,6836208	

Fonte: A autora, 2023.

A atividade de AChE no cérebro (Gráfico 1-a) foi significativamente maior em indivíduos expostos a glifosato quando comparada com indivíduos do grupo controle ($F=9,301$; $df=13,98$; $p=0,008668$).

A atividade de AChE no músculo (Gráfico 1-b) não demonstrou diferença significativa em indivíduos expostos ao glifosato quando comparada com indivíduos do grupo controle ($F= 0,233$; $df=13,48$; $p>0,05$).

GRÁFICO 1: Comparação da atividade de AChE em peixes do grupo experimental e grupo controle.



a - Atividade de AChE ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$) no cérebro em indivíduos do grupo controle e grupo experimental; b - Atividade de AChE ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$) no músculo em indivíduos do grupo controle e grupo experimental. As barras de erro mostram o desvio padrão da média. Fonte: A autora, 2023.

4.4 DISCUSSÃO

Conforme resultados apresentados percebe-se um aumento significativo na atividade de AChE no cérebro de peixes expostos, o que difere do esperado, uma vez que estudos anteriores com organofosforados como o glifosato, obtiveram uma diminuição da atividade da AChE. Tal aumento da atividade da AChE pode sugerir uma resposta dos peixes a um eventual estresse causado pelo contaminante. Resultados semelhantes foram discutidos por Cattaneo *et al.* (2008) em peixes da espécie *Rhamdia quelen* quando exposto por 96 horas a 600 e 700 mg/L do herbicida 2,4-D, os autores também constataram um aumento da atividade de AChE no cérebro, sugerindo que os animais possivelmente estariam compensando o estresse metabólico através do aumento da atividade da AChE cerebral. Cattaneo *et al.* (2008) argumentam que o estresse gerado pelo 2,4-D pode aumentar a produção de espécies reativas no cérebro e, assim, promover efeitos indesejáveis, como a ativação enzimática. Em 2021, Le

Du-Carrée *et al.*, expuseram *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris) a glifosato nas concentrações 360 e 420 g/L por 96 horas, observando ativação da AChE em peixes expostos. Em outro estudo mais recente utilizando *Danio rerio*, Galiciolli *et al.* (2023) ao exporem por 24 horas os organismos a uma mistura de timerosal (7,5 mg/kg; EMT) + alumínio (175,0 mg/kg; Al) também observaram um aumento significativo na atividade de AChE no cérebro.

Estudos distintos do nosso apresentam resultados de inibição da enzima AChE no cérebro, como por exemplo em *Leporinus obtusidens* expostos ao glifosato nas concentrações 3, 6, 10 e 20 mg/L por 96h (Gluszczak *et al.*, 2006), *Prochilodus lineatus* expostos a Roundup® na concentração de 10 mg/L por 96h (Modesto; Martinez, 2010), *Cnesterodon decemmaculatus* expostos a glifosato na concentração de 1 mg/L por 96h (Menéndez-Helman *et al.*, 2012), *Cyprinus carpio* expostos a glifosato nas concentrações 0.5, 2.5, 5 e 10 mg/L por 96 horas (Cattaneo *et al.*, 2011).

Diversos estudos têm demonstrado que a atividade da AChE nos tecidos de peixes pode variar dependendo da espécie, do período de exposição, das condições experimentais em que o peixe é mantido e do tipo de substância tóxica à qual o peixe é exposto (Crestani *et al.*, 2006; Da Fonseca *et al.*, 2008; Dos Santos Miron *et al.*, 2005; Gluszczak *et al.*, 2006; Moraes *et al.*, 2007). Tais estudos fornecem uma base para compreender os resultados alcançados neste trabalho.

Outro aspecto relevante a ser considerado nos resultados deste trabalho é o efeito do glifosato na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), conforme discutido por Larsen *et al.* (2016). De acordo com os autores esse efeito varia consideravelmente dependendo do tratamento e da área cerebral analisada. No entanto, em todos os casos observados e conforme comprovado no presente estudo, é notável que, ao contrário de outros agrotóxicos organofosforados, o glifosato age como um inibidor fraco da AChE. Dessa forma, seria necessária uma concentração muito superior aos níveis ambientais de glifosato para causar uma inibição eficaz da atividade dessa enzima no cérebro (Larsen *et al.*, 2016).

No que concerne aos resultados observados na atividade da enzima AChE no músculo, observa-se que os dados apresentaram uma tendência de redução de atividade no grupo experimental. Tal redução também foi observada em *Prochilodus lineatus* após 96 horas de exposição à concentração de 10 mg/L de Roundup® (Modesto; Martinez, 2010) e em *Rhamdia quelen* quando expostos por 96 horas a 600 e 700 mg/L do herbicida 2,4-D. Já trabalho de Gluszczak *et al.*, (2006), *Leporinus obtusidens* expostos ao glifosato nas concentrações 3, 6, 10 e 20 mg/L por 96h não apresentaram alterações significativas na

atividade de Acetilcolinesterase no músculo de peixes expostos. O mesmo ocorreu no estudo de Lopes *et al.* (2017), em que a atividade da AChE não foi alterada nos músculos de *Danio rerio* expostos à concentração 5 ou 10 mg/L de glifosato por 24 e 96 horas.

Dos estudos citados até aqui, as concentrações utilizadas de glifosato que inibem a atividade da AChE são, em sua maioria, superiores às encontradas no ambiente. No presente estudo, ao utilizar a concentração máxima permitida de glifosato em águas de classe 1, constatamos que essa altera significativamente a atividade de AChE no cérebro de *Danio rerio*. Isso sugere que os níveis máximos aceitáveis desse composto precisam ser reconsiderados pelos órgãos ambientais.

4.5 CONCLUSÕES

Após a exposição à concentração permitida pela Resolução CONAMA em águas de classe 1, observou-se um aumento significativo na atividade da AChE no cérebro do grupo experimental, indicando a toxicidade do glifosato para a espécie *D. rerio*. Contudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na atividade da AChE no músculo em comparação com o grupo controle. Esses resultados sugerem uma possível necessidade de revisão dos limites permitidos de glifosato na água, visando a saúde dos ecossistemas aquáticos bem como mais investigações sobre o impacto da exposição crônica a baixas concentrações no sistema nervoso de peixes.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a exposição à concentração permitida pela resolução CONAMA em águas de classe 1, ficou evidenciado efeito de toxicidade do glifosato para a espécie *D. rerio*.

No teste de predação, os indivíduos do grupo experimental alteraram seu padrão comportamental, apresentando uma distância de reação menor em relação a sua presa. No teste de preferência por luz, observou-se que indivíduos do grupo experimental permaneceram por mais tempo no compartimento claro do aquário, embora não tenham sido diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle. No teste anti-predador o grupo experimental exibiu maior tempo de reação à resposta à fuga do predador fictício se comparado com o grupo controle. Quanto à análise da atividade da AChE no cérebro, foi observado um aumento significativo da atividade no grupo experimental em comparação com o grupo controle, embora na análise da atividade no músculo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Os resultados obtidos indicam a necessidade de revisão dos limites permitidos de glifosato na água, a partir das possibilidades de impactos identificados no comportamento, resposta anti-predador e atividade da AChE no cérebro dos peixes *D. rerio*.

Esses resultados sugerem ainda a realização de mais investigações sobre o efeito da exposição crônica desses organismos a baixas concentrações de glifosato, representando do ponto de vista ambiental, o que ocorre no ambiente natural quando os organismos são expostos a esses compostos químicos constantemente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIAS, A. R. L. BUSS, D. F., ALBURQUERQUE, C. DE., INÁCIO, A. F., FREIRE, M. M., EGLER, M., MUGNAI, R., BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 61–72, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR 15088: ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda: método de ensaio com peixes**. 4. ed. Rio de Janeiro, 2022.

BEHRA, M.; XAVIER, P.; BERTRAND, C.; VONESCH, J. L.; BIELLMANN, D.; CHATONNET, A.; STRÄHLE, U. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 2, p. 111–118, 2002.

BECKER, J. L. **Estatística básica : transformando dados em informação** [recurso eletrônico]. Porto Alegre: Bookman, 2015.

BENACHOUR, N.; SÉRALINIG.-E. Glyphosate Formulations Induce Apoptosis and Necrosis in Human Umbilical, Embryonic, and Placental Cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, n. 1, p. 97–105, 2009.

BERTRAND, C.; CHATONNET, A.; TAKKE, C.; YAN, Y. L.; POSTLETHWAIT, J.; TOUTANT J.P.; COUSIN, X. 2001. Zebrafish Acetylcholinesterase is encoded by a single gene localized on linkage group 7. **Journal of biological Chemistry**. v. 276, p. 464-474.

BOTELHO, A.; FIALHO, A. C.; FERREIRA, C.; PEREIRA, D.; PEREIRA, R.; FERREIRA, S.; Chapter 15: **Testes de comparações múltiplas à posteriori. Ecologia numérica 2020/2021: Trabalho 4**, 2021.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357, de 15 de junho de 2005. Cetesb, São Paulo, 2008.

BRIGGS, R. P. An assessment of nets with a square mesh panel as a whiting conservation tool in the Irish Sea Nephrops fishery. **Fisheries Research**, v. 13, n. 2, p. 133–152, 1992.

CALLISTO, M.; MORENO, P. **Bioindicadores como ferramenta para o manejo, gestão e conservação ambiental**. In: 11º SIMPÓSIO SUL DE GESTÃO E CONSERVAÇÃO, Erechim/RS, 2006.

CATTANEO, R.; LORO, V. L.; SPANEVELLO, R.; SILVEIRA, F. A. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 92, n. 3, p. 133–137, 2008.

CATTANEO, R.; CLASEN, B.; LORO, V. L.; MENEZES, C. C. DE.; PRETO, A.; BALDISEROTTO, B.; SANTI, A.; ÁVILA, L. A. DE. Toxicological Responses of *Cyprinus carpio* Exposed to a Commercial Formulation Containing Glyphosate. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 87, n. 6, p. 597–602, 2011.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

CRESTANI, M.; MENEZES, C.; GLUSCZAK, L.; MIRON, D.; LAZZARI, R.; DUARTE, M. F.; MORSCH, V. M.; PIPPI, A.L.; VIEIRA, V. P. Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.65, p.48-55, 2006.

DA FONSECA, M. B.; GLUSCZAK, L.; SILVEIRA MORAES, B.; DE MENEZES, C. C.; PRETTO, A.; TIERNO, M. A.; ZANELLA, R.; GONÇALVES, F. F.; LÚCIA LORO, V. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, n. 3, p. 416–420, 2008.

DOS SANTOS MIRON, D.; CRESTANI, M.; ROSA SHETTINGER, M.; MARIA MORSCH, V.; BALDISSEROTTO, B.; ANGEL TIERNO, M.; MORAES, G.; VIEIRA, V. L. P. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, n. 3, p. 398–403, 2005.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. DIANE.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

FLORES-LOPES, F.; THOMAZ, A. T. Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 1, p. 179–188, 2011.

FLORES-LOPES, F.; THOMAZ, A. T. Assessment of environmental quality through analysis of frequency of the black spot disease in an assemblage of fish, Guaíba lake, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, p. 915–923, 2011.

GALICIELLI, M. E. A.; SILVA, J. F.; PRODÓCIMO, M. M.; LAURENO, H. A.; CALADO, S. L. DE M.; OLIVEIRA, C. S.; GUILOSKI, I. C.; Toxicological Effects of Thimerosal and Aluminum in the Liver, Kidney, and Brain of Zebrafish (*Danio rerio*). **Metabolites**, v. 13, n. 9, p. 975, 2023.

GLUSCZAK, L.; MORON, D. DOS S.; CRESTANI, M.; FONSECA, M. B. DA; PEDRON, F. DE. A. DUARTE, M. F.; VIEIRA, V. L. P. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, n. 2, p. 237–241, 2006.

GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M. **Princípios de estatística em ecologia** [recurso eletrônico]. Porto Alegre : Artmed, 2011.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 178, 2001.

HORZMANN, K. A.; LIN, L. F.; TASLAKJIAN, B.; YUAN, C.; FREEMAN, J. L. Embryonic atrazine exposure and later in life behavioral and brain transcriptomic, epigenetic, and pathological alterations in adult male zebrafish. **Cell Biology And Toxicology**, v. 37(3), p. 421–439, 2021.

LARSEN, K. E.; LIFSCHITZ, A.L.; LANUSSE, C. E.; VIRKEL, G. L. The herbicide glyphosate is a weak inhibitor of acetylcholinesterase in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 41–44, 2016.

LE DU-CARRÉE, J.; CABON, J.; MORIN, T.; DANION, M. Immunological and metabolic effects of acute sublethal exposure to glyphosate or glyphosate-based herbicides on juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Science of The Total Environment**, v. 784, p. 147162, 2021.

LOPES, F. M. CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G.; ROSA, C. E. DA.; Glyphosate Adversely Affects *Danio rerio* Males: Acetylcholinesterase Modulation and Oxidative Stress. **Zebrafish**, v. 14, n. 2, p. 97–105, 2017.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MELVIN, S. D.; MELVIN, S. D.; PETIT, M. A.; DUVIGNACQ, M. C.; SUMPTER, J. P. Towards improved behavioural testing in aquatic toxicology: acclimation and observation times are important factors when designing behavioural tests with fish. **Chemosphere**, v. 180, p. 430-436, 2017.

MENÉNDEZ-HELMAN, R. J. FERREYROA, G. V.; AFONSO, M. DOS S. SALIBIAN, A. Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 88, n. 1, p. 6–9, 2012.

MERCURIO, P.; FLORES, F.; MUELLER, J. F.; CARTER, S.; NEGRI, A. P. Glyphosate persistence in seawater. **Marine Pollution Bulletin**, v. 85, n. 2, p. 385–390, 2014.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**, v. 81, n. 6, p. 781–787, 2010.

MONTANHA, F. P.; PIMPÃO, C. T. EFEITOS TOXICOLÓGICOS DE PIRETRÓIDES (CIPERMETRINA E DELTAMETRINA) EM PEIXES - Revisão. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 9, n. 18, p. 1-58, 2012.

MORAES, B. S.; LORO, V. L.; GLUSCZAK, L.; PRETTO, A.; MENEZES, C.; MARCHEZAN, E.; DE OLIVEIRA MACHADO, S. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**, v. 68, n. 8, p. 1597–1601, 2007.

NWANI, C. D.; LAKRA, W. S.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; SRIVASTAVA, S. K. Toxicity of the Herbicide Atrazine: Effects on Lipid Peroxidation and

Activities of Antioxidant Enzymes in the Freshwater Fish *Channa punctatus* (Bloch). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 8, p. 3298–3312, 2010.

ROY, N. M.; CARNEIRO, B.; OCHS, J. Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 42, p. 45–54, 2016.

SANTANA, L. M. B. M.; CAVALCANTE, R. M. Transformações Metabólicas de Agrotóxicos em Peixes: uma revisão. *Orbital - The Electronic Journal Of Chemistry*, v. 8, n. 4, p. 257-268, 2016.

SHUMAN-GOODIER, M. E.; PROPPER, C. R. A meta-analysis synthesizing the effects of pesticides on swim speed and activity of aquatic vertebrates. **Science Of The Total Environment**, v. 565, p. 758-766, 2016.

SILVA DE ASSIS, H. C. Der Einsatz von Biomarkern zur Summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen. 99 p. Tese de Doutorado. Universidade Técnica de Berlim, Alemanha, 1998.

WORM, B.; DUFFY, J. E. Biodiversity, productivity and stability in real food webs. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 12, p. 628–632, 2003.