

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ, CAMPUS DE UNIÃO DA VITÓRIA
COLEGIADO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LUANA COSTA

ANORMALIDADES MORFONUCLEARES CAUSADAS POR HERBICIDA
COMERCIAL À BASE DE GLIFOSATO EM PEIXES DA ESPÉCIE *Danio rerio*
(HAMILTON, 1822)

UNIÃO DA VITÓRIA

2024

LUANA COSTA

ANORMALIDADES MORFONUCLEARES CAUSADAS POR HERBICIDA
COMERCIAL À BASE DE GLIFOSATO EM PEIXES DA ESPÉCIE *Danio rerio*
(HAMILTON, 1822)

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Otávio Ribeiro.

UNIÃO DA VITÓRIA

2024



ANEXO X - ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos cinco dias do mês de dezembro de 2024, a acadêmica LUANA COSTA apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: ANORMALIDADES MORFONUCLEARES CAUSADAS POR HERBICIDA COMERCIAL À BASE DE GLIFOSATO EM PEIXES DA ESPÉCIE *Danio rerio* (HAMILTON, 1822) para avaliação da banca composta por Marcos Otávio Ribeiro, Ana Carolina de Deus Bueno Krawczyk e Alan Deivid Pereira. Após apresentação do TCC pela acadêmica e arguição pela banca, a mesma deliberou pela:

Quadro de notas:

Avaliador	Nota
1	9.2
2	9.5
3	9.6
Média Final	9.4

(X) Aprovação

() Aprovação com reformulações

() Reprovação

A nota final da acadêmica foi igual a 9.4.

União da Vitória, 04 de fevereiro de 2025.

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCOS OTAVIO RIBEIRO
Data: 04/02/2025 19:05:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Presidente da banca – Orientador

Membro Avaliador 1

Documento assinado digitalmente
gov.br ALAN DEIVID PEREIRA
Data: 05/02/2025 10:07:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro Avaliador 2



ePROTOCOLO

DECLARAÇÃO 003/2025.

Documento: **Anexo_X_ata_final_TCC_Luana_Costa_assinado.pdf.**

Assinatura Simples realizada por: **Ana Carolina de Deus Bueno Krawczyk (XXX.288.159-XX)** em 05/02/2025 09:11.

Inserido ao documento **1.106.390** por: **Ana Carolina de Deus Bueno Krawczyk** em: 05/02/2025 09:11.



Documento assinado nos termos do Art. 38 do Decreto Estadual nº 7304/2021.

A autenticidade deste documento pode ser validada no endereço:

<https://www.eprotocolo.pr.gov.br/spiweb/validarDocumento> com o código:
a46fad6c8dda93c4e2811d7b9fb3d1ca.

Dedico este trabalho aos meus pais, Ivete e Anselmo, cujo empenho em me educar sempre veio em primeiro lugar. Aqui estão os resultados de seus esforços. Com muita gratidão!

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, por tudo o que fizeram por mim para que hoje eu pudesse viver essa conquista. Agradeço por todas as noites em que esperaram à minha volta para casa depois de um longo dia na Universidade, pela preocupação, pelos valores me ensinados, pelo cuidado, por me encorajarem e me fortalecerem. Diante de pais tão maravilhosos, tenho força e sabedoria para seguir batalhando na vida!

Aos meus queridos irmãos, Larissa e Arthur, minha fonte inesgotável de força. Meu amor por vocês me motivou a chegar até aqui.

Agradeço imensamente ao meu namorado, Michael, pela incansável parceria e apoio durante todo o processo de elaboração deste trabalho. Sua presença constante e palavras de incentivo foram fundamentais para superar os desafios e alcançar esse objetivo. Obrigada pela leveza que me trouxe. Te amo mais a cada dia.

Às minhas queridas amigas, Celi, Fernanda e Maria Eduarda, vocês não foram apenas apoio nos momentos mais difíceis, mas também uma dose de alegria que eu precisei para seguir em frente. Estudar ao lado de vocês foi divertido, inspirador e, acima de tudo, cheio de significado.

Agradeço carinhosamente o meu orientador, professor Marcos, por me acolher como sua orientanda. Sua orientação foi imprescindível, agradeço por se fazer presente sempre que possível. Seus conselhos e incentivos foram pilares fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui com confiança e determinação. Guardarei com muito carinho na minha memória.

À professora Ana Carolina, meu sincero agradecimento pelo apoio fundamental na elaboração deste trabalho. Admiro não apenas seu profissionalismo e vasta experiência na área, mas também a pessoa generosa e inspiradora que você é. Suas palavras de incentivo e carinho foram a minha fonte de força e motivação ao longo dessa jornada. Obrigada, de coração, por tudo.

Agradeço à minha companheira de Iniciação Científica, Beatriz, por todos os momentos que compartilhamos, entre desafios e conquistas. A rotina no laboratório e a elaboração de trabalhos científicos se tornaram muito mais especiais com a sua companhia. Sua amizade é um presente e tem um lugar especial no meu coração.

Aos meus professores, minha mais profunda gratidão. Cada um de vocês, com sua dedicação e competência, contribuiu de maneira única para minha formação acadêmica e pessoal. Mais do que transmitir conhecimento, vocês me ensinaram a pensar de forma crítica, a questionar, a buscar sempre o melhor e a acreditar no meu potencial.

Aos meus colegas de turma, agradeço de coração por todo o apoio, companheirismo e troca de experiências ao longo dessa jornada. Foi um privilégio dividir esse caminho com todos!

Ao Renan do Centro de Pesquisas e Extensão em Aquicultura, pelo empréstimo de materiais essenciais.

À Universidade Estadual do Paraná, pela oportunidade de proporcionar um ambiente acadêmico enriquecedor.

À Fundação Araucária, pelo apoio por meio de sua agência de fomento.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

“O Homem é parte da natureza e a sua guerra contra a natureza é, inevitavelmente, uma guerra contra si mesmo”.

(Rachel Carson, 1962).

RESUMO

A intensificação da agricultura industrial, marcada pelo crescente uso de agrotóxicos proporciona em uma série de distúrbios ambientais. O glifosato é um herbicida mundialmente utilizado no controle de ervas daninhas. No Brasil, esse herbicida é regulamentado pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente, resolução nº 357, de 17 de março de 2005, que permite o limite máximo de 65 µg/L de glifosato em águas doces de classe 1. Embora haja conhecimento da exposição aguda de organismos a pesticidas, o entendimento sobre seus efeitos nos limites permitidos nos ecossistemas aquáticos ainda é pouco compreendido. Diante o exposto, o presente estudo objetivou analisar os possíveis efeitos ecotoxicológicos causados pelo herbicida glifosato comercial (Roundup®), em peixes da espécie *Danio rerio* expostos a concentração regulamentada no Brasil, a partir da análise dos eritrócitos. Um lote de 40 peixes adultos da espécie foi distribuído em dois aquários, cada um contendo 20 litros de água mineral comercializada, sendo que em um foi adicionado o herbicida e no outro não houve adição do composto. Após 96 horas de exposição, os peixes foram anestesiados e realizou-se a coleta de sangue para confecção de lâminas. A técnica permitiu a análise e contagem de 2000 eritrócitos de 30 indivíduos em microscópio óptico, com aumento de 400x. As análises demonstraram uma frequência significativa de alterações morfonucleares encontradas no grupo experimental, enquanto o grupo controle não apresentou alteração. Dentre as alterações observadas, a mais frequente foi do tipo Binúcleo ($p < 0.05$), seguida de núcleos entalhados e lobados, o que sugere danos ao DNA e possível genotoxicidade. Os resultados demonstraram que o glifosato, mesmo em concentração regulamentada pelo CONAMA, pode causar danos morfonucleares, sugerindo assim, uma revisão de tais valores definidos atualmente pela legislação brasileira.

Palavras-chave: Ecotoxicologia. Glifosato. Zebrafish.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Contaminação do solo por glifosato, processos de transporte e fluxo através de cadeias alimentares aquáticas.....	19
Figura 2 - Modelo biológico <i>D. rerio</i>	22
Figura 3 - Ordem sequencial de respostas aos poluentes dentro de um sistema biológico.....	23
Figura 4 - Alterações morfológicas nucleares. <i>Blebbbed, Bud, Condensed, Notched, Lobed, Micronúcleo e Vacuolated</i>	24
Figura 5 - Aquários revestidos com papel kraft.....	25
Figura 6 - Coleta de sangue para a técnica do esfregaço sanguíneo.....	27
Figura 7 - Gráfico com as frequências de variações encontradas na análise das alterações morfológicas celulares. As barras mostram o desvio padrão. No total, 30 peixes foram utilizados nas análises. * Alteração estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.....	28
Figura 8 - Classificação das alterações morfológicas nucleares registradas. A - Células normais; B - Binúcleos; C - núcleo entalhado; D - núcleo lobado; E - núcleo com bolhas. As alterações foram identificadas de acordo com a descrição de Carrasco <i>et al.</i> (1990).....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas e Técnicas

ACs - Aberrações Cromossômicas

AMNs - Alterações Morfológicas Nucleares

ADAPAR - Agência de Defesa Agropecuária do Paraná

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento do Estado de São Paulo

CEUA - Comitê de Ética em Pesquisa-Animal

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DNA - Ácido desoxirribonucleico

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente

ISO - *International Organization for Standardization*

LPO - Peroxidação Lipídica

MNP - Micronúcleo Písceo

MS - Ministério da Saúde

NBR - Norma Brasileira

pH - Potencial Hidrogeniônico

SCE - Troca de Cromátide Irmã

UE - União Europeia

UNESPAR - Universidade Estadual do Paraná

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 CONTAMINAÇÃO DO AMBIENTE AQUÁTICO.....	15
2.2 HERBICIDAS.....	16
2.3 BIOENSAIOS.....	18
2.4 A ESPÉCIE <i>Danio rerio</i>	20
2.5 BIOMARCADORES.....	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 MODELO BIOLÓGICO: <i>Danio rerio</i>	24
3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA.....	25
3.3 EXPOSIÇÃO AO CONTAMINANTE.....	25
3.4 ANÁLISES DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES.....	25
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	26
4 RESULTADOS.....	27
4.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA.....	27
4.2 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES.....	27
5 DISCUSSÃO.....	29
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
REFERÊNCIAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

Historicamente, a comercialização e o uso de agrotóxicos foi intensificado ao fim da Segunda Guerra Mundial, na qual indústrias químicas utilizavam de estruturas governamentais, acadêmicas e midiáticas, bem como a fragilidade e tensão social em meio aos conflitos de guerra, para persuadir retoricamente ao uso de tecnologia química para o controle de insetos em culturas de alimentos, afirmando haver uma “guerra entre a humanidade e os insetos”, promovendo os agrotóxicos como indispensáveis “defensivos agrícolas” (Abreu, 2014). No território brasileiro, os agrotóxicos foram introduzidos durante o período da chamada modernização da agricultura nacional, entre 1945 e 1985, com apoio oficial do Estado e sob o argumento de elevar a produção de alimento e facilitar o trabalho no campo (Salomão; Ferro; Ruas, 2020).

No Brasil, os agrotóxicos são regulamentados de acordo com a Lei nº 14.785, de 27 de dezembro de 2023, a qual rege todos os processos de pesquisa, comercialização, destino final de resíduos e embalagens, classificação, controle, inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, de controle ambiental, de seus produtos técnicos e afins. Os herbicidas estão entre a classificação destes compostos, e são amplamente comercializados e utilizados na agricultura devido a sua eficiência em inibir o desenvolvimento de espécies específicas, como as plantas daninhas (Roman *et al.*, 2007). O glifosato é um princípio ativo presente nas formulações de herbicidas, sendo vendido em concentrações de 48% (m/v), com dosagens recomendadas de 10 a 20 ml/L (Amarante-Junior; Santos, 2002). No Brasil, a concentração máxima permitida de glifosato em águas doce de classe 1 (destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado) é de 65 µg/L e 280 µg/L em águas de classe 3 (destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado), sendo regulamentado pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), no qual há previsão de valores de referência para as concentrações de agrotóxicos permitidos em água (CONAMA, 2005). No ano de 2019, houve uma flexibilização da comercialização de novos agrotóxicos no Brasil, entre eles, o Sulfoxaflor, Fluopiram e Dinotefuran, compostos químicos reconhecidos pela União Europeia e Estados Unidos devido a sua alta toxicidade (Grigori, 2020).

Quando utilizados na agricultura, esses compostos podem atingir rios, lagos e oceanos, diante de diversos mecanismos de transporte, seja por correntes atmosféricas, despejo inadequado de restos de soluções e processo natural de lixiviação (Braga *et al.*, 2005).

A permanência destes compostos químicos no ambiente aquático oferece riscos às espécies de animais por seus efeitos ecotoxicológicos e possibilidade de bioacumulação ao longo da cadeia alimentar, visto que a biota aquática é continuamente atingida por esses compostos químicos que alcançam o ambiente do qual dependem. Em geral, os agrotóxicos pertencem a famílias de substâncias químicas muito diversas, e a generalização dos efeitos é complexa, levando a considerar cada caso com particularidade e mais estudos ecotoxicológicos e toxicológicos (Milhome *et al.*, 2009).

A comercialização de compostos agrícolas representa um importante nicho de mercado, impulsionando a circulação desses produtos em escala global. De acordo com o recente Relatório de Comercialização de Agrotóxicos do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA), no ano de 2022, foi registrada a venda de 800.652 toneladas de ingredientes ativos de Produtos Formulados (químicos e bioquímicos), o que representa um aumento de aproximadamente 11% em relação ao ano anterior (2021), cujas vendas foram de 720.870 toneladas. Neste mesmo período de levantamento dos dados, os dez ingredientes ativos mais comercializados no país, em toneladas, foram: Glifosato e seus sais; 2,4-D; Atrazina, Mancozebe; Acefato; Clorotalonil, Dibrometo de Diquat, Glufosinato – Sal de Amônio, Clorpirifós e Metomil. Conforme rege a Lei nº 14.785/2023, a comercialização desses compostos foi aprovada e liberada. Determinados ingredientes ativos com alta taxa de comercialização no Brasil já foram banidos em regiões estrangeiras, como na União Europeia (UE). A Atrazina e o Glufosinato, por exemplo, não são mais comercializados na UE desde 2004 e 2009, respectivamente, devido ao fato de estes compostos possuírem associação a distúrbios na saúde humana, como danos citogenéticos em linfócitos do sangue, danos a células hepáticas, câncer de próstata, câncer de tireóide, entre outras enfermidades (Abass; Turpeinen; Pelkonen, 2009; Mostafalou; Abdollahi, 2017; Rohden, 2022; Ruiz-Guzmán *et al.*, 2017)

Diante da crescente comercialização e uso destes compostos químicos na agricultura, somado ao fato de que os recursos hídricos são o depósito do aporte desses resíduos, métodos de análises surgiram em decorrência da necessidade de conhecer quais são os efeitos sobre a biota aquática (Silva; Campos; Bohm, 2013; Zagatto; Bertoletti, 2006). Entre os métodos, os bioensaios ganham notoriedade no meio científico, pois possibilitam o reconhecimento de compostos que apresentam baixos e altos riscos de impacto ambiental e toxicidade aos organismos (Silva, 2015). Os efeitos tóxicos são avaliados a partir de organismos bioindicadores que apresentam alta sensibilidade às alterações ambientais, manifestando

respostas comportamentais e fisiológicas mensuráveis que refletem a qualidade do ambiente (Prestes; Vincenci, 2019).

Espécies de peixes são utilizadas como bioindicadores em bioensaios, como o popularmente denominado peixe zebra ou peixe paulistinha (Costa, 2008). As características gerais de *Danio rerio* (Hamilton, 1822) o tornam uma alternativa viável para ensaios de avaliação de toxicidade, justamente pela sua sensibilidade e a capacidade de absorver rapidamente os compostos presente na água e acumulá-los em diferentes tecidos (Fukushima *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2022). Ainda, sua homologia genética com mamíferos e praticidade no manejo em laboratório, contribuem para o interesse de sua utilização em estudos (Fukushima *et al.*, 2020; Howe *et al.*, 2013; Lopes-Ferreira *et al.*, 2021; Silveira; Schneider; Hammes, 2012). No Brasil, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), responsável pelo desenvolvimento de protocolos de testes de toxicidade, padronizou o uso de peixes pertencentes à família Cyprinidae em 2016 como *Pimephales promelas* (Rafinesque, 1820) e *Danio rerio* (Norma Brasileira - NBR 15088:2022) para testes de toxicidade aguda (Lopes-Ferreira *et al.*, 2021). Dessa forma, a avaliação dos efeitos ecotoxicológicos causados pela exposição a contaminantes em peixes é de fundamental importância para a preservação e conservação das espécies (Silva, 2021).

A Ecotoxicologia é uma área de enfoque aos estudos de monitoramento ambiental, fundamentada principalmente na resposta de organismos a estressores químicos (Magalhães; Ferrão-Filho, 2008). Ramade (1977), define a Ecotoxicologia como a ciência que objetiva avaliar as formas e níveis de contaminação do ambiente que se dá por poluentes naturais ou sintéticos, produzidos por atividades humanas, bem como compreender seus mecanismos de ação e seus efeitos sobre o conjunto de seres vivos que habitam a biosfera.

Entre os estudos de toxicidade, são relatadas as alterações morfológicas nucleares (AMNs) como um dos efeitos decorrentes da exposição de peixes a contaminantes, nos quais desempenham como biomarcadores em bioensaios. Entre as alterações, o teste de Micronúcleo Písceo (MNP) consiste na análise da formação de micronúcleos durante a divisão celular, decorrente de fragmentos cromossômicos não incorporados pelo núcleo, onde são visualizados nas células filhas como uma estrutura similar ao núcleo principal, porém, de tamanho reduzido (Schmid, 1975; Thomé; Silva; Santos, 2016; Valentin-Severin *et al.*, 2003). Outros tipos de alterações são caracterizados de acordo com a deformidade sobre a membrana nuclear. Em um estudo desenvolvido por Cherednichenko *et al.* (2024), diferentes anormalidades morfonucleares foram registradas em células de variadas espécies de animais, incluindo peixes, anfíbios, répteis e pássaros, vivendo em condições de poluição por

pesticidas, combustível de foguete, derivados de petróleo, metais pesados e radionuclídeos. As análises demonstraram o aparecimento de micronúcleos, células de núcleo ausente, invaginação nuclear, núcleo binucleado e vacuolizado.

A presença de AMNs em células permite inferir sobre efeitos genotóxicos, mutagênicos e citotóxicos de determinadas substâncias (Barbosa *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2009). Esta ferramenta de análise é utilizada tanto para peixes em monitoramento ambiental quanto em bioensaios (Lechinovski *et al.*, 2022; Silva, 2021). Tais biomarcadores demonstram as implicações de poluentes ambientais sobre os organismos vivos a nível celular e genético, pois sabe-se que compostos capazes de interagir com o DNA induzem mutações, lesões na fita de DNA, síntese de DNA não programada e trocas entre cromátides irmãs (SCE) (Azevedo, 2003; Bianchini, 2008; Smaka-Kincl *et al.*, 1996). Ainda que existam efeitos passíveis de reparo, como os efeitos genotóxicos, outros são persistentes e inalteráveis (efeitos mutagênicos), pois ocasionam uma mudança definitiva na estrutura ou no conteúdo do material genético de um organismo (Deerfield *et al.*, 2002). Segundo Athira e Jaya (2018), mutações, envelhecimento celular rápido e dificuldades adaptativas relacionadas às condições ambientais em peixes podem ser desencadeadas a partir da interação de pesticidas e outros contaminantes com o sistema biológico.

Considerando a extensa e contínua comercialização do glifosato e a possibilidade de interação desse composto com a biota quando presente em água, justifica-se o desenvolvimento deste estudo como uma ferramenta importante para evidenciar os efeitos da contaminação em organismos expostos ao glifosato comercial (Roundup®). Nesse contexto, objetivou-se analisar as possíveis anomalias morfonucleares em eritrócitos de *D. rerio* quando expostos ao herbicida comercial a base de glifosato. O objetivo geral converge aos seguintes objetivos específicos: i) Verificar se a concentração de glifosato, regulamentada pelo CONAMA (65 µg/L), causa alterações morfonucleares em eritrócitos de *D. rerio*; ii) Classificar os principais tipos de anomalias morfonucleares encontradas em *D. rerio* quando expostos ao glifosato; iii) Discutir os resultados apresentados com dados existentes na literatura científica sobre anomalias morfonucleares do glifosato em espécies de peixes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONTAMINAÇÃO DO AMBIENTE AQUÁTICO

A urbanização e as atividades antropogênicas, somado ao rápido crescimento populacional, tem contribuído com a deterioração dos ecossistemas aquáticos (Fia *et al.*, 2015). Considerado um dos principais problemas existentes nas últimas décadas, a contaminação aquática tem como decorrência diferentes fontes de contaminação, como o descarte de lixo, esgoto doméstico e resíduos tóxicos (Ibrahin; Ibrahin; Cantuária, 2015). A desenfreada urbanização reuniu populações de baixo poder aquisitivo em áreas periféricas com pouco ou nenhum serviço de saneamento básico. Isto contribuiu para gerar poluição concentrada a partir da deposição de lixo e assoreamento dos corpos d'água (Magalhães, 1995). Outro fator de grande impacto sobre os recursos hídricos é o modelo de produção de alimentos adotado pelo Brasil e outros países. Este método convencional de uso de agrotóxicos na agricultura tem se mostrado ineficiente, pois, a longo prazo, mesmo com o uso intensivo de compostos químicos, as chamadas pragas agrícolas conseguem desenvolver mecanismos para persistir nos campos. Consequentemente, a indústria química busca aprimorar e desenvolver novas formulações para eliminar os organismos indesejados que possam acometer as plantações (Londres, 2011).

Como resultado do comportamento desses compostos químicos no ambiente, bem como o transporte natural por lixiviação, a água passa a ser o depósito de substâncias, muitas vezes nocivas e de concentrações tóxicas, atingindo os sistemas biológicos (Tonissi, 2009). Uma vez no ambiente aquático, dependendo das características físico-químicas do composto, ocorre a interação com materiais em suspensão, bem como a deposição em sedimentos ao fundo, e a absorção por organismos, podendo ser detoxificados ou acumulados (Tomita; Beyruth, 2002). Os resíduos quando absorvidos levam a um fenômeno ecológico chamado de biomagnificação, resultando no aumento de suas concentrações de acordo com aumento do nível trófico (Begon; Townsend; Harper, 2007).

O CONAMA considera em sua resolução de nº 357 que, “a saúde e o bem-estar humano, bem como o equilíbrio ecológico aquático, não devem ser afetados pela deterioração da qualidade das águas”. Entretanto, o estudo realizado por Bueno-Krawczyk *et al.* (2015), contestou alterações no estado de saúde dos peixes da bacia do Médio Iguaçu, com probabilidades de a biota estar em contato com agentes anticolinesterásicos e oxidantes. Os autores destacam ser um fator preocupante, pois a população local usufrui da pesca e água

potável. Os resultados da pesquisa realizada por Branco *et al.* (2021), sugeriram que as 16 bacias hidrográficas localizadas na região Sul e Sudeste podem ser as mais afetadas pela presença de contaminantes emergentes, entre eles estão os pesticidas. Em outro estudo realizado por Panis *et al.* (2022), foi registrado níveis elevados de 11 agrotóxicos presentes na água que abastece 127 cidades do Paraná, onde vivem 5,5 milhões de pessoas. Segundo o estudo, o problema está associado, pelo menos, a 542 casos de câncer diagnosticados em moradores da região. Os autores ainda afirmam que o risco enfrentado é devido à ingestão contínua de água, e que os níveis regulatórios de agrotóxicos na água potável possivelmente estão muito acima quando comparado com outras regiões do mundo. Berti, Düsman e Soares (2009) afirmam que a poluição proveniente da atividade agrícola é considerada do tipo difusa, de difícil identificação, monitoramento e, conseqüentemente, controle.

2.2 HERBICIDAS

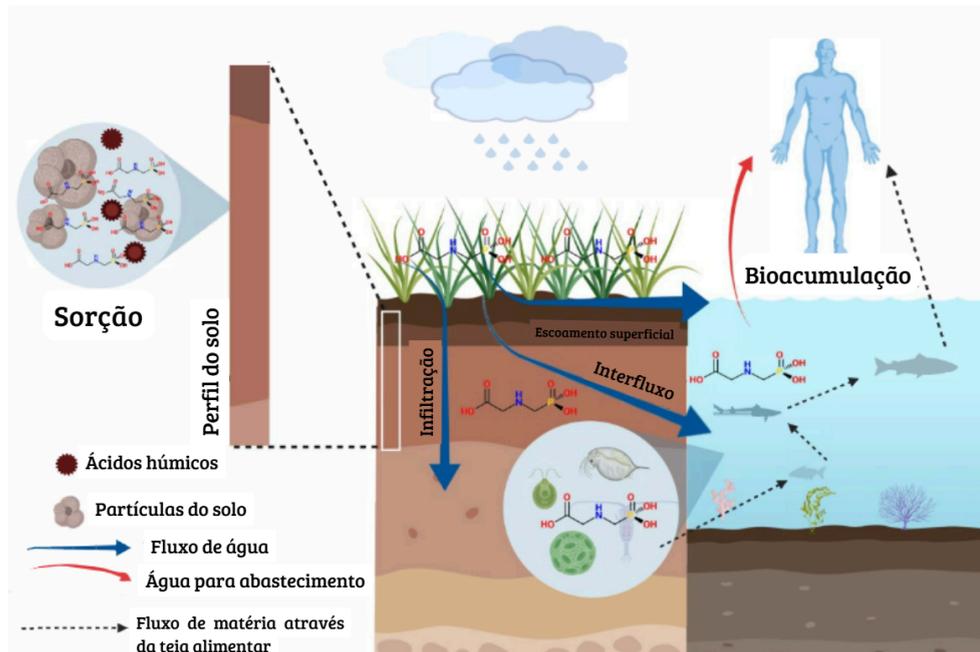
Herbicida é um produto químico que tem a finalidade de inibir o desenvolvimento das plantas daninhas. Essas plantas são consideradas como interferências nas culturas agrícolas, tanto pela competição por água, nutrientes, luz e espaço, como pela liberação de substâncias químicas, os aleloquímicos, que podem comprometer o desenvolvimento das plantas cultivadas (Correia, 2018). O comportamento e o destino dos herbicidas no ambiente são determinados por fatores externos, sendo eles: temperatura e umidade, tipo de solo, presença de matéria orgânica, modo de aplicação, dentre outros (Gebler; Spadotto, 2004). Mas há, também, outras características fundamentais que irão determinar a sua distribuição, como a conformação da estrutura molecular do princípio ativo e as características físico-químicas. Plimmer (1992), propõe que, dependendo das condições ambientais e características físico-químicas do composto químico, 5% do produto se perde por escoamento artificial, 1% por lixiviação e de 40% a 80% passa pelo processo de volatilização. Gebler e Spadotto (2004), afirmam a importância de compreender as rotas dos agrotóxicos após a sua aplicação, justamente porque é certo de que ele se distribuirá pelos diversos compartimentos do ecossistema, sendo necessário avaliar e monitorar seu comportamento e destino no ambiente.

O glifosato é um herbicida não seletivo, sistêmico e pós-emergente que atua inibindo a síntese de aminoácidos cruciais, como tirosina, triptofano e fenilalanina, acometendo o enfraquecimento de plantas em desenvolvimento (Alves *et al.*, 2023; Coutinho; Mazo, 2005). Esse químico foi classificado como herbicida no ano de 1971, e desde lá, houve a

comercialização de três tipos de glifosato, sendo eles: glifosato-isopropilamônio, glifosato-sesquisódio (Roundup®), e glifosato-trimesium (Amarante-Junior; Santos, 2002). As formulações comerciais contêm, geralmente, entre 36 e 48% de glifosato, assim como água, sais minerais e adjuvantes, como a Polioxietilenoamina, que tem como ação o aumento da absorção e translocação do herbicida na planta-alvo (Mesnage *et al.*, 2015). O Glifosato (N-fosfometil glicina), cuja fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$, é classificado como um organofosforado, mais especificamente, um fosfonato. Quimicamente, é um derivado da glicina, sendo considerado um aminoácido artificial (Castro, 2005). Molecularmente, apresenta comportamento zwitteriônico, ou seja, há separação de duas cargas em pH neutro, uma positiva no grupo amino e uma negativa no grupo fosfonato (Coutinho; Mazo, 2005).

No solo, o glifosato é degradado por microrganismos e adsorvido por partículas, como a matéria orgânica, hidróxidos amorfos de ferros e alumínio e óxidos férricos (Day *et al.*, 1997; Coutinho; Mazo, 2005). Esse herbicida não é metabolizado pela planta, e por essa razão praticamente toda a concentração do ingrediente ativo aplicado chega ao solo na sua forma original (Cardoso; Hartwig, 2022). Em água, tanto glifosato quanto seus sais são sólidos cristalinos muito solúveis (12 g/L a 25 °C), e apresentam meia vida longa, variando de 49 a 70 dias (Amarante-Junior; Santos, 2002). Diante de sua alta solubilidade e baixa volatilidade, as moléculas são lixiviadas do solo quando não adsorvidas pelas partículas (Figura 1) (Lima; Boëchat; Gücker, 2021). A legislação brasileira regulamenta os valores permitidos desse composto no ambiente aquático. A Portaria nº 2.914 de 2011, do Ministério da Saúde (MS), estabeleceu em 500 µg/L a concentração máxima de Glifosato permitida na água potável. Para águas doces superficiais, segundo o CONAMA, na Resolução nº 357/2005, a concentração máxima do glifosato é 65 µg/L para águas de classe 1, e 280 µg/L para águas de classe 3. A Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR) classifica o glifosato quanto ao seu perigo para o meio ambiente em classe III: Perigoso ao meio ambiente.

Figura 1 - Contaminação do solo por glifosato, processos de transporte e fluxo através de cadeias alimentares aquáticas.



Fonte: LIMA, Igor Barbosa; BOËCHAT, Iola Gonçalves; GÜCKER, Björn. Glifosato no Brasil: uso, contaminação aquática, efeitos ambientais e perigos para a saúde humana. *Caderno de Geografia*, v. 31, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.5752/P.2318-2962.2021v31nesp1p90>. Acesso em: 10 de set. 2024.

Na agricultura, esse herbicida é pulverizado nos mais diversos tipos de cultivo, para então ser absorvido através das folhas das plantas e seus caulículos. Posteriormente, o herbicida é transportado por toda a planta, agindo nos vários sistemas enzimáticos e inibindo o metabolismo de aminoácidos, ocasionando a morte em poucos dias ou semanas (Amarante-Junior; Santos, 2002). A partir do uso contínuo do glifosato, Brito e Yada (2019) relatam a necessidade de aplicar doses cada vez maiores do herbicida, pois desencadeou-se a propagação de ervas daninhas resistentes e tolerantes ao produto. Gazziero *et al.* (2012) também afirmam a resistência contra o glifosato e a demanda de um conjunto de ações e combinações de diferentes tipos de agroquímicos para a aniquilação das espécies de ervas daninhas em áreas de cultivo.

2.3 BIOENSAIOS

A primeira iniciativa em termos metodológicos na realização de bioensaios, para monitoramento e avaliação da qualidade da água, se deu em 1975 em um programa internacional de padronização de testes de toxicidade aguda em peixes, desenvolvido pelo

Comitê Técnico de Qualidade das Águas da *International Organization for Standardization* (ISO), com participação da Companhia de Tecnologia de Saneamento do Estado de São Paulo (CETESB) a convite da ABNT (Zagatto; Bertolotti, 2006). A partir do ano de 1975, foram elaborados e adaptados diferentes métodos de ensaios de toxicidade aguda e crônica, com o uso de alguns grupos e espécies de organismos, dentre os quais se destacam as algas (ABNT, 2023), microcrustáceos (ABNT, 2022) e peixes (ABNT, 2022) de águas continentais e marinhas e testes com sedimentos (Zagatto; Bertolotti, 2006). O uso de organismos caracteriza os biomarcadores em um bioensaio, no qual expressam respostas biológicas quando expostos a contaminantes. A partir do contato com poluentes, os organismos ativam mecanismos de defesa molecular e celular para eliminá-los. Esses mecanismos de defesa podem impactar a expressão gênica e a atividade enzimática, permitindo a realização de análises moleculares e bioquímicas, além das repostas a nível fisiológico e comportamental (Aizpurua-Olaizola *et al.*, 2018; Gómez-Oliván *et al.*, 2019; Van Der Oost; Beyer; Vermeulen, 2003).

Os bioensaios, também denominados ensaios ecotoxicológicos, consistem na exposição de organismos padronizados expostos a diferentes concentrações de compostos químicos, substâncias químicas e efluentes, por um determinado período de tempo, sendo possível determinar o potencial de toxicidade (Cesar; Silva; Santos, 1997; Kapusta, 2008). Os ensaios podem ser caracterizados como um grande controle de qualidade na pesquisa, que busca utilizar testes padronizados, onde vários já foram desenvolvidos e padronizados no mundo todo. Por exemplo, no território brasileiro há métodos normalizados pela ABNT e pela CETESB (Kapusta, 2008). Eles compõem processos de licenciamentos solicitados pela própria CETESB na avaliação de risco em áreas contaminadas, no controle de efluentes, na autorização do uso de produtos em corpos hídricos e avaliações de acidentes ambientais (CETESB, 2017).

Há dois principais métodos de bioensaios utilizados no meio científico. O método do tipo agudo busca identificar os efeitos imediatos vivenciados pelo organismo exposto, em um curto período. O efeito observado é a mortalidade ou imobilidade, geralmente no intervalo de 0 a 96 horas. Os testes agudos contribuem para a estimativa e/ou determinação de limites de concentração permissível, regulados por legislação, para um determinado grupo de organismos em diferentes tipos de ambientes aquáticos. Além de proporcionar a comparação do nível de sensibilidade de diferentes espécies a um mesmo xenobiótico (Silva, 2015). Já o teste crônico avalia os efeitos sobre funções biológicas, como a reprodução e crescimento, buscando respostas a um estímulo contínuo que pode abranger parte ou todo ciclo de vida do

organismo (Kapusta, 2008). Para os ensaios de toxicidade, são utilizados organismos sensíveis a uma diversidade de agentes químicos. Quando a sensibilidade é constante, possibilita a obtenção de resultados mais precisos. Junto a isso, para que o estudo de toxicidade tenha uma maior confiabilidade, aconselha-se o uso de mais de um organismo-teste e de diferentes níveis tróficos, pois cada organismo possui uma sensibilidade diferente a tais compostos (Silva; Pompêo; Paiva, 2015). Estudos revelam o uso de minhocas em contaminações do solo (Vicente; Fernandes; David, 2021), peixes e microcrustáceos em contaminações aquáticas (Lechinovski *et al.*, 2022; Yuan *et al.*, 2020) e outros tipos de organismos-teste. Outro fator importante a ser considerado é a posição trófica, pois como descreve Andréa (2008), os bioindicadores devem ter uma relevância biológica para informar sobre a possível contaminação do respectivo ecossistema. Sendo assim, quanto mais baixo for seu nível trófico e quanto mais ele servir de alimento para os níveis superiores da cadeia trófica, maior é a relevância biológica do organismo (Andréa, 2008).

Em avaliações de contaminação aquática são empregadas análises químicas, sendo essa uma medida importante, no entanto, Ribeiro *et al.* (2022) afirma que é necessário também estudar o impacto dos xenobióticos em organismos vivos para avaliar os efeitos ecotoxicológicos mais complexos a médio e longo prazo. Silva, Pompêo e Paiva (2015) corroboram com o fato de que as análises químicas por si só não retratam o impacto ambiental causado pelos poluentes sobre o ecossistema como um todo. Ainda, somente os sistemas biológicos (organismos ou parte deles) podem detectar os efeitos tóxicos das substâncias (Magalhães; Ferrão-Filho, 2008).

2.4 A ESPÉCIE *Danio rerio*

A espécie *D. rerio* (Figura 2), popularmente conhecido como paulistinha ou *Zebrafish*, é um peixe tropical de água doce, pertencente à família Cyprinidae, e descrita por Hamilton Buchanan no ano de 1822 (Eschmeyer; Fricke, 2015). *D. rerio* é originário do Himalaia no sul da Ásia, como Índia, Nepal, Butão, Paquistão, Bangladesh e Mianmar (Barman, 1991; Spence *et al.*, 2008). Seu corpo é 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). Na população, demonstra padrões de hierarquia no qual o indivíduo dominante pode apresentar cores mais fortes e pode ocupar áreas maiores (Lawrence, 2007; Spence *et al.*, 2008).

Figura 2 - Modelo biológico *D. rerio*.



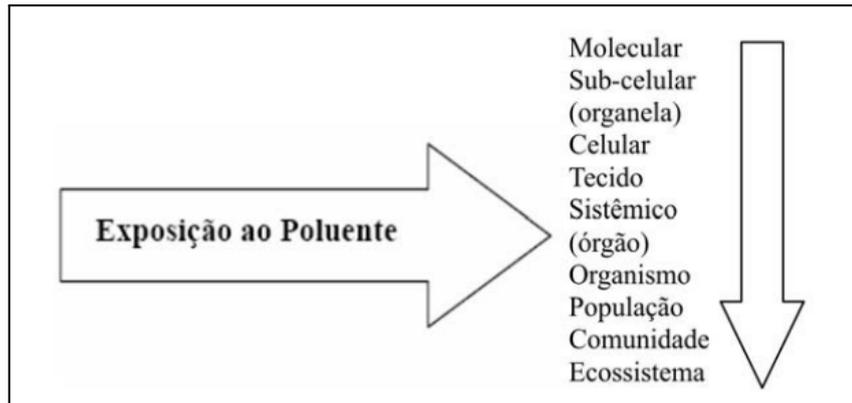
Fonte: A autora, 2024.

Nas últimas décadas, a comunidade científica utiliza desta espécie como modelo biológico pela sua homologia genética com mamíferos e facilidade de manejo em laboratório (Fukushima *et al.*, 2020; Howe *et al.*, 2013; Lopes-Ferreira *et al.*, 2021). O sequenciamento do seu genoma em 2013 demonstrou que o *Zebrafish* possui mais de 70% de homologia genética em relação aos humanos (Howe *et al.*, 2013; Lopes-Ferreira *et al.*, 2021). Os principais benefícios do uso desta espécie como modelo toxicológico em relação a outras espécies de vertebrados são: o seu tamanho, a facilidade de manejo e criação e o desenvolvimento precoce. O pequeno tamanho do peixe juvenil (14 mm) e adultos (de 4 a 5 cm) reduz muito o espaço de acomodação e os custos de criação para as pesquisas científicas (Lopes-Ferreira *et al.*, 2021). As características gerais de *D. rerio* o tornam uma alternativa viável para ensaios de avaliação de toxicidade, como por exemplo, de compostos em desenvolvimento, justamente pela grande sensibilidade e a capacidade de absorver rapidamente os compostos presente na água e acumulá-los em diferentes tecidos (Fukushima *et al.*, 2020). No Brasil, a ABNT, responsável pelo desenvolvimento de protocolos de testes de toxicidade, padronizou o uso de peixes pertencentes à família Cyprinidae em 2016 como *Pimephales promelas* e *D. rerio* (NBR 15088:2022) para testes de toxicidade aguda.

2.5 BIOMARCADORES

Os biomarcadores podem ser definidos como alterações biológicas mensuráveis que estão associadas à exposição do organismo a agentes estressores. As alterações podem ser observadas em diferentes níveis em um sistema biológico (Oliveira; Baldan, 2022) (Figura 3).

Figura 3 - Ordem sequencial de respostas aos poluentes dentro de um sistema biológico.



Fonte: JESUS, Taíse Bomfim de; CARVALHO, Carlos Eduardo Veiga de. 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. Acesso em 12 set. 2024.

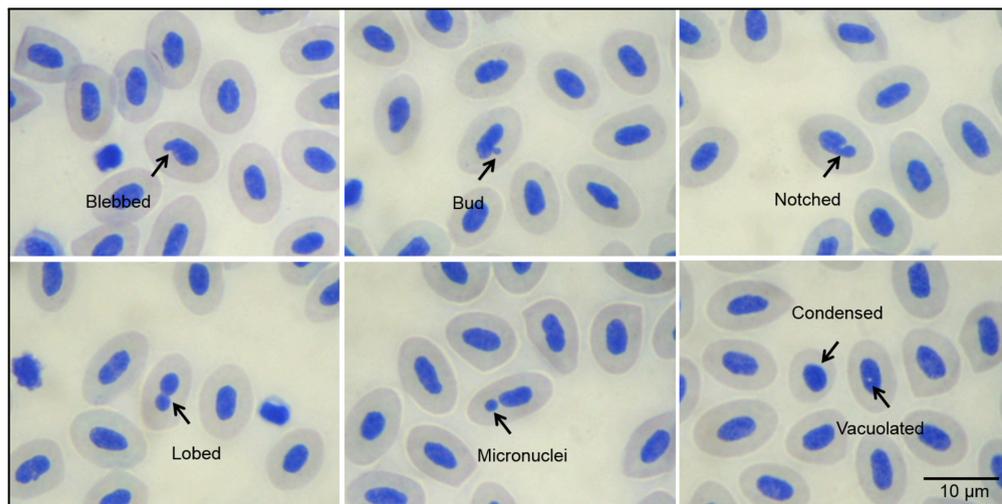
Estudos revelam danos genotóxicos em peixes quando expostos a diferentes classes de agrotóxicos (Carmo; Silva; Amiliato, 2020; Da Rosa Neto; Gehlen; Basso Da Silva, 2022; Santos-Filho, 2022; Soares; Silva, 2023). A preocupação da exposição a esses compostos se deve ao fato desses agentes serem capazes de interagir com o material genético das células, causando lesões que não são possíveis de serem reparadas (Parvan *et al.*, 2020). Alguns ensaios de avaliação de genotoxicidade são capazes de detectar aberrações cromossômicas (ACs), troca de cromátides irmãs (SCE), micronúcleos (MN) e mutações pontuais e oncogênicas (Valente *et al.*, 2017).

A avaliação das anomalias nucleares e o teste de micronúcleo písceo são reconhecidos na investigação de efeitos genotóxicos de poluentes ambientais em peixes (Al-Sabti, 1986). O teste de micronúcleo foi adaptado por Hooftman e Raat (1982), para o estudo de células sanguíneas de peixes mantidos em laboratório, com base no teste de micronúcleo originalmente desenvolvido por Schmid (1975) para células da medula óssea de camundongos. O teste de MN está relacionado a alterações cromossômicas, na qual o micronúcleo é formado durante o processo de divisão celular (meiose ou mitose), compondo uma pequena massa nuclear delimitada por uma membrana, sendo encontrado separado do núcleo principal (Giardini, 2016). Sua formação decorre de alterações estruturais cromossômicas ocasionadas por fatores ambientais ou, ainda, de falhas no fuso mitótico, sendo, portanto, excluído do novo núcleo formado na telófase (Giardini, 2016; Rieger; Michaelis; Green, 1968). Para as alterações derivadas de fatores ambientais, os pesquisadores Al-Sabti e Metcalfe (1995) afirmam que o teste de micronúcleo em peixes apresenta efetividade para detectar a presença de substâncias clastogênicas no meio aquoso, uma vez

que os peixes teleósteos apresentam eritrócitos nucleados, a presença de micronúcleos nestas células pode ser analisada e usada como medida da atividade clastogênica de substâncias no ambiente aquático. Como os micronúcleos são formados durante a meiose ou mitose, os danos causados no DNA somente serão expressos em MN após um ciclo de divisão celular (Fenech, 1997).

Além de MN, outras alterações morfológicas nucleares já foram registradas (Figura 4), e são descritas e classificadas pelos autores Carrasco, Tylbury e Myers (1990), sendo: i) *Blebbled*: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina. Os tamanhos das evaginações situam-se na faixa de pequenas protuberâncias até estruturas completamente circunscritas, semelhantes aos micronúcleos, mas ainda ligadas ao núcleo principal; ii) *Lobed*: núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os *Blebbled*. Não há tanta definição como a citada anteriormente. Alguns núcleos apresentam várias desta estrutura; iii) *Vacuolated*: núcleos que apresentam uma região semelhante a vacúolos no seu interior. Os vacúolos apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior; iv) *Notched*: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Esses cortes não possuem nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pela membrana nuclear.

Figura 4 - Alterações morfológicas nucleares. *Blebbled*, *Bud*, *Condensed*, *Notched*, *Lobed*, Micronúcleo e *Vacuolated*.



Fonte: GOMES, Juliana M. M *et al.* What the Erythrocytic Nuclear Alteration Frequencies Could Tell Us about Genotoxicity and Macrophage Iron Storage? **Plos One**, v. 10, n. 11, 2015. Acesso em: 13 de set. 2024.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MODELO BIOLÓGICO: *Danio rerio*

Utilizou-se um lote padrão de 40 peixes da espécie *D. rerio* adultos, medindo em média $2,77 \pm 0,46$ cm, adquiridos em loja comercial na cidade de União da Vitória - Paraná. Os protocolos envolvendo os animais foram submetidos à avaliação e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa-Animal (CEUA) - UNESPAR, nº 007/2023. 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.

O lote foi distribuído aleatoriamente em dois aquários, contendo 20 indivíduos em cada um. Inicialmente, os peixes foram aclimatados por um período de 60 horas, sob aeração constante e alimentados diariamente com larvas congeladas de Chironomidae. Os aquários foram externamente revestidos com papel kraft para a diminuição de fatores externos que pudessem ser estressantes aos peixes, como a própria movimentação de pessoas no laboratório (Figura 5).

Figura 5 - Aquários revestidos com papel kraft.



Fonte: Autora, 2024.

Os aquários continham um volume total de 20L de água mineral, com o pH previamente ajustado, conforme as especificações da ABNT NBR 15088 de 2022. A água mineral continha a seguinte formulação química: $\text{HCO}_3^- = 3.98$ mg/L; $\text{K} = 1.493$ mg/L;

Sr=1,012 mg/L; SO₄²⁻=1.01 mg/L; Na=0.681 mg/L; Ca=0.297 mg/L; Cl=0.20 mg/L; NO₃⁻=0.14 mg/L; Mg=0.123 mg/L; Ba=0.068 mg/L.

3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA

Durante o bioensaio, as seguintes variáveis físico-químicas da água foram mensuradas: temperatura, amônia, pH e oxigênio dissolvido. Para a mensuração da temperatura, foi utilizado um termômetro químico de escala externa; para o teste da amônia um kit comercial (Labcon Teste); o pH foi analisado com fitas indicadoras de pH; e o oxigênio dissolvido foi mensurado por kit comercial (Alfakit).

3.3 EXPOSIÇÃO AO CONTAMINANTE

Após o período de aclimação, um dos aquários foi contaminado com 65µg/L de glifosato na formulação original *Glyphosate Roundup*®, contendo Sal de Di-amônio de N-(phosphonomethyl)glycine (Glifosato) a 445 g/L (44,5% m/v), Equivalente ácido de N-(phosphonomethyl)glycine (Glifosato) a 370 g/L (37,0% m/v) e outros ingredientes a 751 g/L (75,1% m/v). O aquário sem adição de glifosato caracterizou o grupo controle do estudo. O uso da concentração regulamentada foi de acordo com a Resolução CONAMA n° 357 de 2005, que determina 65µg/L como o valor máximo permitido em águas doce de classe 1 (Brasil, 2005).

O bioensaio é caracterizado do tipo agudo (96 horas de exposição ao contaminante) e semi estático devido a renovação do meio após 48 horas da exposição (ABNT NBR 15088:2022).

3.4 ANÁLISES DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES

Posteriormente ao período de exposição, o grupo experimental e o grupo controle foram retirados dos aquários e sedados em uma solução contendo água e óleo de cravo, seguido da eutanásia via secção medular para a coleta de sangue. A partir de algumas gotas de sangue sobre a lâmina (Figura 6), aplicou-se a técnica de esfregaço sanguíneo.

Após o esfregaço, as lâminas foram secas por um período de 24 horas, fixadas em etanol 96% por 30 minutos e novamente secas ao ar. As amostras foram coradas com Giemsa

a 10% diluída em tampão fosfato (pH 6,8) por 10 minutos, e posteriormente foram observadas sob ampliação de 400x no microscópio óptico. A técnica permitiu a análise, contagem de 2000 eritrócitos para cada indivíduo, identificação e classificação das alterações morfológicas nucleares, conforme descreve Carrasco *et al.* (1990).

Figura 6 - Coleta de sangue para a técnica do esfregaço sanguíneo.



Fonte: Autora, 2024.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises estatísticas, o nível de diferença significativa em relação ao controle com o grupo experimental foi analisado com o teste T (distribuição normal dos dados) e o teste de Wilcoxon (Wilcoxon 1945) (distribuição não normal dos dados), assumindo o nível de significância de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas no ambiente R usando o pacote Vegan (versão 4.4-1, R Core Team 2022).

4 RESULTADOS

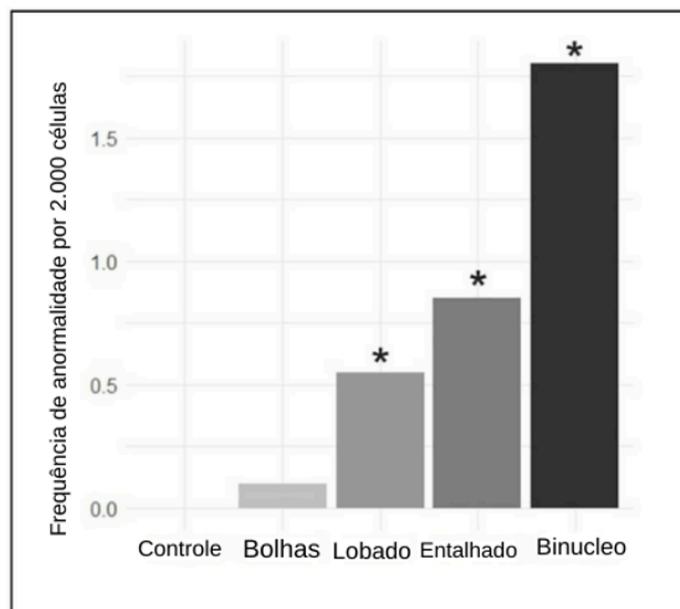
4.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA

As variáveis de qualidade de água de pH ($7,6 \pm 0,1$), temperatura ($19^{\circ}\text{C} \pm 0,4$), oxigênio dissolvido ($9,0 \text{ mg/L} \pm 0,5$) e amônia (NH_3) ($0,006 \text{ mg/L} \pm 0,2$) mantiveram-se dentro dos padrões para o cultivo dos organismos estabelecidos pela ABNT NBR 15088 de 2022.

4.2 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES

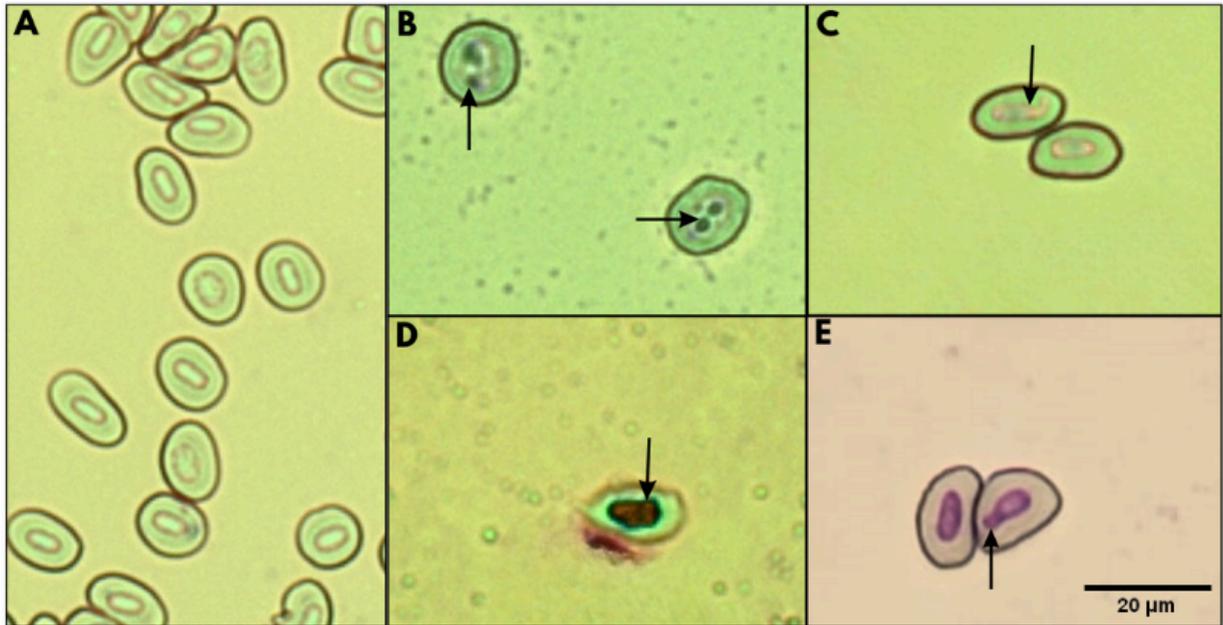
A partir dos dados obtidos, observou-se uma frequência significativa de alterações morfológicas nucleares ($p < 0,05$) nas amostras testadas do grupo experimental em relação ao controle (Figura 7). No grupo controle não houve a presença de qualquer alteração na membrana nuclear. Os núcleos apresentaram bolhas, aspecto lobado e entalhado, e núcleos binucleados (Figura 8), sendo esta a alteração mais frequente, seguida de núcleos entalhados e lobados. Núcleos com bolhas foi uma alteração que não apresentou frequência significativa ($p > 0,05$). No grupo experimental não houve mortalidade, visto que a concentração utilizada não se aproxima da concentração letal para esta espécie.

Figura 7 - Gráfico com as frequências de variações encontradas na análise das alterações morfológicas celulares. As barras mostram o desvio padrão. No total, 30 peixes foram utilizados nas análises. * Alteração estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.



Fonte: Autora, 2024.

Figura 8 - Classificação das alterações morfológicas nucleares registradas. A - Células normais; B - Binúcleos; C - núcleo entalhado; D - núcleo lobado; E - núcleo com bolhas. As alterações foram identificadas de acordo com a descrição de Carrasco *et al.* (1990).



Fonte: Autora, 2024.

5 DISCUSSÃO

Os resultados suportados pela diferença estatística significativa do grupo experimental em relação ao grupo controle permite inferir a capacidade do herbicida glifosato em interagir com o núcleo celular de eritrócitos, conhecido como efeito genotóxico, visto as diferentes alterações morfológicas nucleares registradas no presente estudo. Dentre as alterações nucleares identificadas, a do tipo Binúcleo foi a mais frequente neste estudo. As células binucleadas são caracterizadas por uma duplicação nuclear, onde dois núcleos, com tamanhos e intensidades de coloração semelhantes, podem ser observados em uma única célula (Gonçalves, 2022). Sua formação acontece principalmente através do bloqueio da citocinese, que impede a divisão completa da célula após a mitose. Isso resulta na formação de células que completaram a divisão nuclear, mas não a divisão citoplasmática, levando à presença de dois núcleos em uma única célula (Fenech *et al.*, 2011). Essa alteração também foi observada por Jindal e Verma (2015) em um estudo experimental com o peixe *Carpa rohu*. Estudos com diferentes espécies reforçam o potencial genotóxico do glifosato para este grupo. No estudo de Turek (2017), ao testarem duas concentrações do herbicida Roundup® (1,58 mgL⁻¹ e 5,0 mgL⁻¹) com espécimes de Lambari, maiores da estabelecida pela legislação, em cinco dias, os resultados indicaram que os indivíduos expostos à concentração de 5 mgL⁻¹ foram os que apresentaram significativo índice de AMNs. Em concentrações menores (3,7, 7,4, 11, 15µg/L), como estudado por Andrade *et al.* (2024), foram relatados vários tipos de alterações no núcleo em todas as concentrações testadas nas espécimes de Lambari-do-rabo-amarelo. Na concentração regulamentada pelo CONAMA, Carmo, Silva e Armiliato (2020) registraram aumento significativo de micronúcleos (MNP) na exposição de *D. rerio* ao Roundup®. O padrão de aumento da frequência das AMNs é explicado por Khatun *et al.* (2021), no qual afirma ser um fator dependente do tempo e da dose do composto químico presente na água. Ao analisar os dados existentes na literatura científica, percebe-se que, independentemente da concentração, o glifosato comercial possui a capacidade de interagir com o material genético dos eritrócitos.

Embora no presente estudo não tenhamos observado o aparecimento de MNP, isso não implica necessariamente a ausência de efeitos genotóxicos da substância, pois foram registrados outros tipos de AMNs. O teste de MNP confere quebras cromossômicas que derivam de danos ao DNA, mas para serem detectadas é necessário que as células realizem o processo de mitose e que ocorra pelo menos um ciclo celular (Udroiu, 2006).

O mecanismo de ação responsável pela genotoxicidade do glifosato não é completamente compreendido, mas na literatura são descritos muitos processos que ocasionam as irregularidades no núcleo celular. Alberts *et al.*, (2017) afirma que o aparecimento de anormalidades no núcleo celular pode ter relação devido à influência dos compostos genotóxicos sobre a integridade da lâmina nuclear, proteína responsável por conferir estabilidade e o formato oval regular do núcleo. Bombail *et al.*, (2001) descreve sobre um atraso do material nuclear na mitose, o que resulta em um núcleo não oval, mas apresenta cromatina preeminente. Ainda, Larmarcovai *et al.*, (2008) comenta que por se tratar de um efeito que acontece durante a atividade mitótica das células, ocorre a quebra de cromossomos devido a lesões não reparadas, mal reparadas ou mal segregação de cromossomos devido a disfunções mitóticas, ocasionando anormalidades no núcleo. Em estudos de avaliação bioquímica a partir da influência do glifosato, foi observado um aumento da peroxidação lipídica (LPO), o que também ocasiona perda do material genético, e eventualmente compromete a função celular (Guéraud *et al.*, 2010; Gentile *et al.*, 2017; Taso *et al.*, 2019). Outro fator relevante, do tipo citotóxico, pode mascarar a indução de lesões nucleares por agentes genotóxicos, por promover a apoptose de eritrócitos ao invés de formar danos celulares não letais (Brunetti *et al.*, 1988).

A longo prazo, dependendo das células afetadas, surgem diferentes efeitos. Costa e Teixeira (2012) apontam que os efeitos genotóxicos em células somáticas podem culminar na divisão descontrolada e anormal de células (formação de tumores). O aparecimento de alterações morfológicas nucleares reflete uma perda de estabilidade no genoma, que pode comprometer a capacidade do organismo de manter a integridade celular (Fenech *et al.*, 2011). O impacto desse dano genético sobre um indivíduo varia de acordo com a sua natureza, a capacidade de reparo celular, a expressão e a capacidade do organismo de reconhecer e suprimir a multiplicação de células aberrantes (Silbergeld, 1998).

O aparecimento de AMNs a partir da interação de um organismo com o glifosato é discutido entre autores que afirmam haver relação a partir da exposição a esse contaminante, mas principalmente as suas complexas formulações comerciais, diante da adição de surfactantes, sendo a etilamina a mais usada, cuja finalidade é facilitar a penetração do glifosato na superfície foliar (Amarante-Junior; Santos, 2002; Ghisi; Oliveira; Prioli, 2016; Kier; Kirkland, 2013). Dessa forma, a associação com o glifosato torna possível a formulação de um agente químico mais tóxico e com efeitos ainda mais significativos sobre a biota aquática. Ainda que o glifosato seja considerado um agente com baixa toxicidade, como define o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

(IBAMA), alguns autores sugerem que os peixes estão entre os animais mais sensíveis à exposição deste herbicida, confirmando o que foi avaliado neste estudo (Amarante-Junior; Santos, 2002). É importante considerar que por se tratar de um herbicida não seletivo, sua ampla aplicação leva a danos ao ambiente natural e a saúde dos mais variados tipos de organismos além de peixes, como microcrustáceos, anfíbios e abelhas (Antunes *et al.*, 2023; Herek, 2017; Pereira *et al.*, 2022).

Considera-se emergente garantir a integridade ambiental dos corpos d'água, visto que os peixes estão entre os grupos de animais afetados pela presença de contaminantes. Isso deve-se a suscetibilidade que estes organismos se encontram, devido à possibilidade de absorção via superfície do corpo, pelos tecidos respiratórios, e quando associados aos sedimentos, também podem vir a ser ingeridos e conseqüentemente absorvidos pelos tecidos (Costa *et al.*, 2008).

Diante dos mecanismos complexos que envolvem os efeitos genotóxicos dos agrotóxicos, cabe reforçar a necessidade de mais estudos que busquem esclarecer os fatores já evidenciados, mas também, àqueles ainda não compreendidos por completo ou desconhecidos, na perspectiva de que os valores permitidos em águas brasileiras do glifosato e de outros compostos químicos que apresentam riscos à biota aquática sejam revisados, na garantia da proteção dos corpos d'água.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A interação do herbicida comercial glifosato com o núcleo celular pôde ser observada a partir do aparecimento de deformidades sobre a membrana nuclear, que são caracterizadas por irregularidades que não obedecem a morfologia oval do núcleo em eritrócitos de peixes. A presença dessas alterações demonstra variadas interferências sobre a realização de funções básicas celulares, como disfunções mitóticas e lesões não reparadas sobre o material genético. A concentração testada, permitida pela resolução CONAMA em águas doces de classe 1, não garante ausência de danos à biota aquática, sendo necessário reavaliar a regulamentação vigente sobre a concentração máxima permitida de glifosato em ambientes aquáticos.

O uso do bioensaio e do modelo biológico *D. rerio* foram elementos promissores nos resultados obtidos, e demonstram ser uma importante ferramenta na avaliação dos efeitos de contaminantes sobre organismos vivos. Considerando a exposição constante de organismos a esses compostos em ambientes naturais, e a formulação de substâncias ainda mais tóxicas, os resultados sugerem que mais pesquisas são necessárias para avaliar os efeitos crônicos e a longo prazo de baixas doses de glifosato, com o objetivo de compreender de forma completa as implicações ecológicas dessa exposição.

REFERÊNCIAS

- ABASS, Khaled.; TURPEINEN, Miia; PELKONEN, Olavi. An evaluation of the cytochrome P450 inhibition potential of selected pesticides in human hepatic microsomes. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 44, n. 6, p. 553–563, 2009.
- ABREU, Pedro Henrique Barbosa de. **O agricultor familiar e o uso (in)seguro de agrotóxicos no município de Lavras, MG**. 2014. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva), Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas. Campinas, São Paulo, 2014.
- ABNT. **NBR 15088**: ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda: método de ensaio com peixes. 4. ed. Rio de Janeiro, 2022.
- _____. **NBR 12648**: ecotoxicologia aquática: toxicidade crônica: método de ensaio com algas Chlorophyceae. 5. ed. Rio de Janeiro, 2023.
- _____. **NBR 12713**: ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda: método de ensaio com *Daphnia* spp. 5. ed. Rio de Janeiro, 2022.
- AIZPURUA-OLAIZOLA, Oier. *et al.* Mass spectrometry for glycan biomarker discovery. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 100, p. 7-14, 2018.
- ALBERTS, Bruce *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- AL-SABTI, K. Clastogenic effects of live carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 85, n. 1, p. 5-9, 1986.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, v. 343, p. 121-135, 1995.
- ALVES, Liliane Evangelista *et al.* Resíduos de glifosato em amostras de água de comunidades agrícolas de Planaltina-DF de Santarém-PA. *In: XIV Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental*, vol. 14, 2023. **ANAIS - Congressos Brasileiros de Gestão Ambiental**. Natal-RN, 2023.
- AMARANTE-JUNIOR, Ozelito Possidônio de.; SANTOS, Teresa Cristina Rodrigues dos. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.
- ANDRADE, Camila Oliveira de *et al.* The Effect of Acute Exposure of Yellowtail Tetra Fish *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875) to the Glyphosate-Based Herbicide Templo®. **Mutation Research Genetic Toxicology Environmental Mutagenesis**, v. 897, 2024.
- ANDRÉA, Mara Mercedes de. **Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos**. 2008. Artigo em Hipertexto. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/Bioindicadores/index.htm.

ANTUNES, Bianca Caroline *et al.* Can the glyphosate herbicide cause behavioral changes in worker bees? **Research, Society and Development**, v. 12, n. 6, 2023.

ATHIRA, Naire; JAYA, D. Samuel. The use of fish biomarkers for assessing textile effluent contamination of aquatic ecosystems: a review. **Nature Environment and Pollution Technology**, v. 17, n. 1, p. 25–34, 2018.

AZEVEDO, João Lúcio de. A importância da Mutagênese ambiental: Prefácio. *In*: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Orgs.) **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003.

BARMAN, Ram Proshad. 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.

BARBOSA, José Silveira *et al.* Genotoxicity assessment in aquatic environments impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 320-325, 2010.

BEGON, Michael; TOWNSEND, Colin R.; HARPER, John L. **Ecologia de indivíduos a Ecossistemas**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

BERTI, Alessandra Paim; DÜSMAN, Elisângela; SOARES, Lilian Capelari. Efeitos da contaminação do ambiente aquático por óleos e agrotóxicos. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 4, n. 1, 2009.

BIANCHINI, Jaqueline. **Análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida malation, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e células de mamíferos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

BOMBAIL, Vincent *et al.* Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v. 44, n. 3, p. 383-392, 2001.

BRASIL. Lei N° 14.785, de 27 de dezembro de 2023. **Diário Oficial da União**, Brasília, 27 dez. 2023.

_____. **Resolução CONAMA N° 357, de 17 de março de 2005**. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

_____. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. [S. l.]: IBAMA, 24 nov. 2022. Atualizado em 27 ago. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>.

_____. **Portaria nº 2.914/2011**. Ministério da Saúde. Procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília-DF: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2012.

BRAGA, Benedito *et al.* **Introdução à Engenharia Ambiental**. 2. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005.

BRANCO, Felipe Ohade Lopes *et al.* Contaminantes Emergentes nas Bacias Hidrográficas Brasileiras e seus potenciais efeitos a espécies ameaçadas de extinção. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 9, n. 2, p. 140-174, 2021.

BRITO, Mariele Azevedo; YADA, Marcela Midori. Impactos do herbicida glifosato na saúde humana. **Simpósio de Tecnologia da Fatec Taquaritinga**, v. 5, n. 1, p. 349-360, 2019.

BRUNETTI, Ricardo *et al.* The micronucleus test: examples of application to marine ecology. **Marine Ecology - Progress Series**, v. 44, p. 65-68, 1988.

BUENO-KRAWCZYK, Ana Carolina de Deus *et al.* Multibiomarcador em peixes para avaliar um rio usado para abastecimento público de água. **Quimiosfera**, v. 135, p. 257-264, 2015.

CASTRO, Andréa Souza. **Avaliação pontual da degradação e transporte do herbicida Glifosato no solo da bacia do Arroio Donato – Pejuçara (RS)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

CARDOSO, Thuany Cardozo e; HARTWIG, Carla de Andrade. **Glifosato e meio ambiente: um panorama das principais pesquisas relacionadas ao tema**. In: Open Science Research III, Editora Científica Digital, v. 3, p. 1325-1339, 2022.

CARMO, Kamilla Bleil do; SILVA, Tainan Filipe da; ARMILIATO, Neide. 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. 2, p. 389-402, 2020.

CARRASCO, Kenneth R.; TILBURY, Karen L.; MYERS, Mark S. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in Situ Biological Indicator of Chemical Contaminant Effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, p. 2123-2136, 1990.

CESAR, Augusto; SILVA, Sergio Luiz R. da.; SANTOS, Aldo Ramos. **Testes de toxicidade aquática no controle da poluição**. 4. ed. Universidade Santa Cecília, Santos, São Paulo, 1997.

CHEREDNICHENKO, Oksana *et al.* Cytome analysis (micronuclei and nuclear anomalies) in bioindication of environmental pollution in animals with nuclear erythrocytes. **Heliyon**, v. 10, 2024.

COSTA, Carla Regina *et al.* A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

COSTA, Carla; TEIXEIRA, João Paulo. Efeitos genotóxicos dos pesticidas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 2, p. 19-31, 2012.

CORREIA, Núbia Maria. **Comportamento dos herbicidas no ambiente**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2018.

COUTINHO, Cláudia F. B.; MAZO, Luiz Henrique. Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1038-1045, 2005.

DA ROSA NETO, Emitério; GEHLEN, Günther; BASSO DA SILVA, Luciano. Avaliação da qualidade da água do Rio Ijuí utilizando o teste de micronúcleo em peixes. **Revista Thema**, v. 21, n. 4, p. 1008–1015, 2022.

DAY, Geoff M. *et al.* Influence of Natural Organic Matter on the Sorption of Biocides onto Goethite, II. Glyphosate. **Environmental Technology**, v. 18, 1997.

DEARFIELD, Kerry L. *et al.* Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 521, p. 121-135, 2002.

ESCHMEYER, Willian N.; FRICKE Ronald (eds). **Catalog of Fishes: Genera, Species, References**. [This version was edited by Bill Eschmeyer]. Disponível em: <https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>.

FENECH, Michael. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**, v. 392, p. 11-18, 1997.

FENECH, Michael *et al.* Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, p. 125–132, 2011.

FIA, Ronaldo *et al.* Qualidade da água de um ecossistema lótico urbano. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v.20, n.1, p.267-275, 2015.

FUKUSHIMA, Hirla *et al.* Potenciais usos do modelo animal Zebrafish *Danio rerio* em pesquisas na Medicina Veterinária. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v.18, n. 1, 2020.

GAZZIERO, Dionisio Luiz Pisa *et al.* Um alerta sobre a resistência de plantas daninhas ao glifosato. *In*: VI Congresso Brasileiro de Soja, Cuiabá. **Soja: integração nacional e desenvolvimento sustentável: anais**, v. 6. Brasília, DF: Embrapa, 2012.

GEBLER, Luciano; SPADOTTO, Claudio Aparecido. Comportamento ambiental dos herbicidas. *In*: VARGAS, L. ROMAN, E. S. **Manual de manejo e controle de plantas daninhas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p. 57-87, 2004.

GENTILE, Fabrizio *et al.* DNA damage by lipid peroxidation products: implications in cancer, inflammation and autoimmunity. **AIMS Genetics**, v. 4, n. 2, p.103–137, 2017.

GHISI, Nédia de Castilhos; OLIVEIRA, Elton Celton de; PRIOLI, Alberto José. Does

exposure to glyphosate lead to an increase in the micronuclei frequency? A systematic and meta-analytic review. **Chemosphere**, v. 145, p. 42-54, 2016.

GIARDINI, Isabela. **Avaliação dos efeitos genotóxicos associados à exposição ao benzeno em trabalhadores de postos de combustíveis no município do Rio de Janeiro**. 2016. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária), Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, 2016.

GRIGORI, Pedro. 20% dos agrotóxicos liberados em 2019 são extremamente tóxicos. **Repórter Brasil**, São Paulo, 16 de jan. de 2020. Disponível em: <https://reporterbrasil.org.br/2020/01/20-agrotoxicos-liberados-em-2019-sao-extremamente-toxicos/>.

GOMES, Juliana M. M *et al.* What the Erythrocytic Nuclear Alteration Frequencies Could Tell Us about Genotoxicity and Macrophage Iron Storage? **Plos One**, v. 10, n. 11, 2015.

GÓMEZ-OLIVÁN, Leobardo Manuel *et al.* Oxidative Stress Induced by Water from a Hospital Effluent of the City of Toluca, Mexico, on *Hyaella azteca*. p. 79-95. In: GÓMEZ-OLIVÁN, Leobardo Manuel. **Pollution of Water Bodies in Latin America: Impact of Contaminants on Species of Ecological Interest**. Springer Nature Switzerland AG, 2019.

GONÇALVES, Vanessa Fonseca. 2022. **Anomalias nucleares eritrocitárias como ferramentas de biomonitoramento por aves no Cerrado**. Tese (Doutorado em Ecologia, Conservação e Biodiversidade) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022.

GUÉRAUD, Frédéric. *et al.* Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. **Free Radical Research**, v. 44, n. 10, p. 1098–1124, 2010.

HEREK, Jéssica Samara. **Glifosato e seus efeitos sobre duas espécies de anfíbios nativos da América do Sul *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis***. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental), Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, 2017.

HOOFTMAN, Ria N.; RAAT, W. K. de. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, v. 104, p. 147-152, 1982.

HOWE, Kerstin *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, p. 498- 503, 2013.

IBAMA. Coordenação de controle ambiental de substâncias e produtos perigosos. Certificado de Registro nº 3817597, Brasília, 2018. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/component/phocadownload/file/6380-glifosato>.

IBRAHIN, Francini Imene Dias; IBRAHIN, Fábio José; CANTUÁRIA, Eliane Ramos. **Análise Ambiental: Gerenciamento de Resíduos e Tratamento de Efluentes**. 1. ed. São Paulo: Érica, 2015.

JESUS, Taíse Bomfim de; CARVALHO, Carlos Eduardo Veiga de. 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.

JINDAL, Rajinder; VERMA, Sakshi. In vivo genotoxicity and cytotoxicity assessment of cadmium chloride in peripheral erythrocytes of *Labeo rohita* (Hamilton). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 118, n. 1, p. 1–10, 2015.

KAPUSTA, Simone Caterina. **Curso Técnico em Meio Ambiente: Bioindicação Ambiental**. Porto Alegre: Escola Técnica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 88 p. 2008.

KATHUN, Mt. Marufa *et al.* Distortion of micronuclei and other peripheral erythrocytes caused by fenitrothion and their recovery assemblage in zebrafish. **Toxicology Reports**, v. 8, p. 415-421, 2021.

KIER, Larry D.; KIRKLAND, David J. Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations. **Critical reviews in toxicology**, v. 43, n. 4, p. 283-315, 2013.

LARMARCOVAI, G. *et al.* Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 658, n. 3, p. 215-233, 2008.

LAWRENCE, Christian. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. **Aquaculture**, v. 269, p. 1-20, 2007.

LECHINOVSKI, Larissa *et al.* Ecotoxicological effects of conventional herbicides and a natural herbicide on freshwater fish (*Danio rerio*). **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 57, 2022.

LIMA, Igor Barbosa; BOËCHAT, Iola Gonçalves; GÜCKER, Björn. Glifosato no Brasil: uso, contaminação aquática, efeitos ambientais e perigos para a saúde humana. **Caderno de Geografia**, v. 31, n. 1, 2021.

LOPES-FERREIRA, Monica *et al.* O Modelo Zebrafish e sua Contribuição ao Meio Ambiente. In: SILVA, D.C. V. R. *et al.* **Recurso Água - Tecnologias e pesquisas para o uso e a conservação de ecossistemas aquáticos**. 1. ed. cap. 6. p.188-219. São Carlos: Editora Cubo, 2021.

LONDRES, Flavia. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. – Rio de Janeiro: Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.

MAGALHÃES, Danielly de Paiva; FERRÃO-FILHO, Aloysio da Silva. A Ecotoxicologia como Ferramenta no Biomonitoramento de Ecossistemas Aquáticos. Universidade Federal do Rio de Janeiro. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, n.3, p.355-381, 2008.

MAGALHÃES, Tânia. Perigo de morte (ou risco de vida). **Revista Bio**, v. 7, n. 7, p. 4-9, 1995.

MESNAGE, R. *et al.* Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p. 133-153, 2015.

MILHOME, Maria Aparecida Liberato *et al.* Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 14, n. 3, p. 363-372, 2009.

MOSTAFALOU, Sara; ABDOLLAHI, Mohammad. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 2, p. 549-599, 2017.

PANIS, Carolina *et al.* Widespread pesticide contamination of drinking water and impact on cancer risk in Brazil. **Environment international**, v. 165, 2022.

PARANÁ. Agência de Defesa Agropecuária do Paraná. **Roundup Original Di**. Disponível em:
https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2023-02/rounduporiginaldi.pdf.

PARVAN, Lais Gonçalves *et al.* Bioensaio com *Allium cepa* revela genotoxicidade de herbicida com flumioxazina. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 11, 2020.

PEREIRA, Júlio César Rodrigues *et al.* Análise de toxicidade do herbicida glifosato em *Artemia salina* (Linnaeus, 1758). **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v.5, n. 3, p. 3229-3238, 2022.

PLIMMER, John R. Dissipation of pesticides in the environment. *In*: SCHNOOR, J. L. **Fate of pesticides & chemicals in the environment**. New York: John Wiley & Sons, p. 79-90, 1992.

PRESTES, Rosi Maria; VINCENCI, Kelin Luiza. Bioindicadores como avaliação de impacto ambiental. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 2, n. 4, p. 1473-1493, 2019.

RAMADE, Francisco. **Ecotoxicologia**. Paris: Masson, 1977.

RIBEIRO, Ondina Martins *et al.* O peixe-zebra (*Danio rerio*) como modelo emergente na ecotoxicologia. **Revista Ciência Elementar**, v. 10, n. 2, 2022.

RIEGER, Rigomar; MICHAELIS Arnd; GREEN, Melvin M. **A Glossary of Genetics and Cytogenetics**. 3. ed. London: Allen and Unwin, p. 507, 1968.

ROCHA, Paula Soares *et al.* Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): In vitro comet assay versus in situ micronucleus assay studies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 7, p. 1842-1848, 2009.

ROMAN, Erivelton Scherer *et al.* **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. Passo Fundo, RS: Berthier, 2007.

ROHDEN, Júlia. Banidos na Europa, feitos na China e usados na soja: os agrotóxicos aprovados por Bolsonaro. **Repórter Brasil**, São Paulo, 19 set. 2022. Disponível em:

<https://reporterbrasil.org.br/2022/09/banidos-na-europa-feitos-na-china-e-usados-na-soja-os-agrotoxicos-aprovados-por-bolsonaro/>.

RUIZ-GUZMÁN, Javier Alonso *et al.* Cytogenetic damage in peripheral blood lymphocytes of children exposed to pesticides in agricultural areas of the department of Cordoba, Colombia. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 824, p. 25-31, 2017.

SALOMÃO, Pedro Emílio Amador; FERRO, Antônio Max Souza; RUAS, Wilson Ferreira. Herbicidas no Brasil: uma breve revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 2, 2020.

SANTOS-FILHO, Itamar Dutra. **Análise da frequência de micronúcleos em peixes *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Characiformes: Characidae) após exposição ao fungicida ELATUS®.** 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde, 2022.

SÃO PAULO. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Ensaio ecotoxicológicos com organismos aquáticos: Atendimento à legislação Ambiental - Orientações para realização de ensaios e apresentação dos resultados nos documentos encaminhados à CETESB.** São Paulo, 2017.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 31, p. 9–15, 1975.

SILBERGELD, E. K. Toxicologia. *In*: OIT (Ed.). **Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo.** Madrid, Oficina Internacional del Trabajo, 1998.

SILVA, Marlene Rodrigues; CAMPOS, Ana Caroline Estrope de; BOHM, Franciele Zanardo. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v.8, n.2, p. 46-58, 2013.

SILVA, Mariana Fedocci. **Análise histopatológica de fígado de tilápias (*Oreochromis Niloticus*) expostas ao herbicida 2,4-D comercial.** 2015. Trabalho de conclusão de curso (Ecologia) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2015.

SILVA, Stella Bicalho. **Efeitos toxicológicos do herbicida atrazina sobre o balanço oxidativo, regulação hormonal e desempenho produtivo de juvenis *Astyanax altiparanae*.** 2021. Dissertação (mestrado em Ciências), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2021.

SILVA, José Rodolfo de Lima e. **Sazonalidade de impacto ambiental decorrente do fluxo turístico em Porto de Galinhas – Ipojuca (PE), avaliada por danos genômicos em *Abudefduf saxatilis*.** 2021. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2021.

SILVA, Daniel Clemente Vieira Rêgo da; POMPÊO, Marcelo; PAIVA, Teresa Cristina Brazil de. A Ecotoxicologia no Contexto Atual no Brasil. *In*: POMPÊO, Marcelo *et al.* **Ecologia de**

reservatórios e interfaces, São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2015. Cap. 22, p. 340-353.

SILVEIRA, Themis Reverbel da; SCHNEIDER, Ana Claudia; HAMMES, Thais Ortiz. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2, p. 4-5, 2012.

SMAKA-KINCL, Vesna *et al.* The evaluation of waste, surface and ground water quality using the Allium test procedure. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 368, p. 171-179, 1996.

SOARES, Emily Catarine da Silva; SILVA, Francijara Araújo da. Investigação de alterações genotóxicas em *Hoplosternum littoralle*, frente a contaminação ambiental, com o uso do teste do micronúcleo. **Journal of Education, Science and Health**, v. 3, n. 3, 2023.

SPENCE, Rowena *et al.* The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, v. 1, n. 83, p. 13-34, 2008.

STREIT, Bruno. Bioaccumulation of contaminants in fish. **Fish Ecotoxicology**, v. 86, p. 353-387, 1998.

TASO, Orjona V. *et al.* Lipid peroxidation products and their role in neurodegenerative diseases. **Annals of Research Hospitals**, v. 3, n. 2, 2019.

THOMÉ, Ralph Gruppi; SILVA, Priscyla Martins da; SANTOS, Hélio Batista. Avaliação de Genotoxicidade da Água de um Rio Urbano Utilizando Estudo de Células Sanguíneas de *Danio rerio*. **Revista Conexão Ciência**, v. 11, n. 2, p. 9-16, 2016.

TONISSI, Fabiano Botta. **Bioensaios com metais (Cd, Cu e Zn) e as alterações em marcadores do estresse oxidativo em brânquias, fígado e rim de *Oreochromis niloticus***. 2009. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

TOMITA, Rúbia Yuri; BEYRUTH, Zuleika. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**, v. 64, n. 2, p.135-142, 2002.

TUREK, Juliana Aparecida dos *et al.* Efeitos citotóxicos de um herbicida a base de glifosato no peixe *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000). **Luminária**, v.19, n. 2, p. 06-12, 2017.

UDROIU, Ion. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 79, p. 201-204, 2006.

VALENTE, Daniel *et al.* Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, 2017.

VAN DER OOST, Ron; BEYER, Jonny; VERMEULEN, Nico P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VALENTIN-SEVERIN, Isabelle *et al.* Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 536, p. 79-90, 2003.

VICENTE, Mariana Canutti Mariano; FERNANDES, Patrick Faria; DAVID, José Augusto de Oliveira. Avaliação da toxicidade do fungicida fox e herbicidas glifosato e haloxyfop utilizando teste de fuga em minhocas. **Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente**, v. 2, n. 2, p. 64-64, 2021.

YUAN, Wenke *et al.* Toxicological effects of microplastics and heavy metals on the *Daphnia magna*. **Science of the Total Environment**, v. 746, 2020.

ZAGATTO, Pedro Antonio; BERTOLETTI, Eduardo. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: Editora RiMa, 2008.