



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE

FABIANA DIAS LOPES

**AVALIAÇÃO DA EMBRIOTOXIDADE DE HERBICIDA À
BASE DE GLIFOSATO, PRINCÍPIO ATIVO E
SURFACTANTE SOBRE ZEBRAFISH (*Danio Rerio*)**

JATAÍ
2018

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

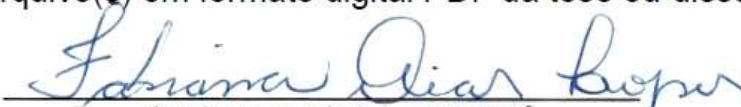
Nome completo do autor: Fabiana Dias Lopes

Título do trabalho: AVALIAÇÃO DA EMBRIOTOXIDADE DE HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO, PRINCÍPIO ATIVO E SURFACTANTE SOBRE ZEBRAFISH (Danio Rerio).

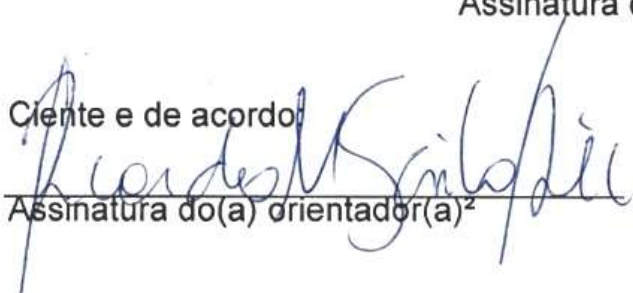
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 08 / 10 / 18

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

FABIANA DIAS LOPES

**AVALIAÇÃO DA EMBRIOTOXIDADE DE HERBICIDA À
BASE DE GLIFOSATO, PRINCÍPIO ATIVO E
SURFACTANTE SOBRE ZEBRAFISH (*Danio Rerio*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, da Universidade Federal de Goiás - Regional Jataí como requisito para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE.

Área de Concentração: Novos Materiais e Metodologias Aplicadas à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Mattos Santa Rita.

Co-orientadora: Profa. Dra. Mônica Rodrigues Ferreira Machado.

JATAÍ

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

LOPES, FABIANA DIAS

AVALIAÇÃO DA EMBRIOTOXIDADE DE HERBICIDA À BASE DE
GLIFOSATO, PRINCÍPIO ATIVO E SURFACTANTE SOBRE
ZEBRAFISH (Danio Rerio) [manuscrito] / FABIANA DIAS LOPES,
RICARDO DE MATTOS SANTA RITA, MÔNICA RODRIGUES
FERREIRA MACHADO. - 2018.

65 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. DR. RICARDO DE MATTOS SANTA RITA;
co-orientadora DRA. MÔNICA RODRIGUES FERREIRA .

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade
Acadêmica Especial de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, Jataí, 2018.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas,
lista de figuras, lista de tabelas.

1. DANIO RERIO. 2. ZEBRAFISH. 3. GLIFOSATO. 4.
TOXICIDADE. I. SANTA RITA, RICARDO DE MATTOS. II.
MACHADO, MÔNICA RODRIGUES FERREIRA. III. SANTA RITA, DR.
RICARDO DE MATTOS, orient. IV. , DRA. MÔNICA RODRIGUES
FERREIRA, co-orient. V. Título.

CDU 615



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
CAMPUS JATAÍ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE

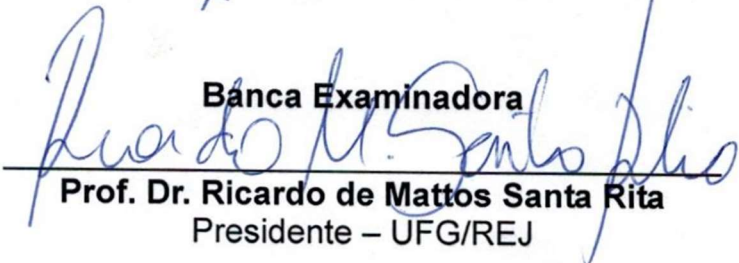
Rod. BR 364, km 192, n. 3800, Setor Industrial
75.801.615 – Jataí/GO- Brasil

ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

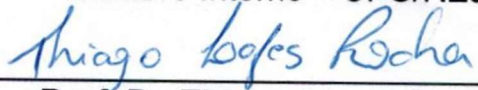
Ao vigésimo segundo dia do mês de setembro do ano de dois mil e dezoito às 08:30 horas no Prédio da Pós-Graduação, Unidade Jatobá, Regional Jataí da Universidade Federal de Goiás, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação, intitulada **“AVALIAÇÃO DA EMBRIOTOXIDADE DE HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO, PRINCÍPIO ATIVO E SURFACTANTE SOBRE ZEBRAFISH (*Danio Rerio*)”**, de autoria da candidata: **FABIANA DIAS LOPES**, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, em nível de Mestrado. A Comissão Examinadora foi constituída pelos professores: Prof. Dr. Ricardo de Mattos Santa Rita (Presidente/Orientador), Profª. Drª. Michele Rocha Parise (Membro Interno) e Prof. Dr. Thiago Lopes Rocha (Membro Externo). Foi concedido ao mestrando, um prazo máximo de 30 dias a partir da data de defesa para efetuar as correções sugeridas pela Comissão Examinadora e entregar o trabalho em redação definitiva, sob pena de não expedição do Diploma. E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão.

Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, os membros da banca consideraram a discente: ☒ **Aprovada** () **Reprovada**

Banca Examinadora


Prof. Dr. Ricardo de Mattos Santa Rita
Presidente – UFG/REJ


Profª. Drª. Michele Rocha Parise
Membro Interno – UFG/REJ


Prof. Dr. Thiago Lopes Rocha
Membro Externo – UFG/Goiânia

RESUMO

O Brasil vem ocupando uma posição de destaque no agronegócio desde 2008, considerado um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo. Dentre estes, os herbicidas a base de Gly (HGLY) tem sido os herbicidas mais utilizados. O HGLY é capaz de inibir a enzima 5-enolpiruvato-xiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), enzima presente nas plantas, porém ausente nos animais. O HGLY Roundup Transorb® (RTR) vem apresentando grandes efeitos tóxicos e sua ação sobre diferentes organismos apontam para a inibição da enzima acetilcolinesterase em animais. Estudos sugerem que o Gly (Gly) e RTR são bastante tóxicos para os animais, porém alguns estudos sugerem que a toxicidade esteja relacionada com os surfactantes, tal como o POEA – poli-oxietilenoamina, presentes na formulação comercial de RTR. Neste estudo avaliamos o efeito tóxico do herbicida Gly, do surfactante POEA e de RTR, através do teste de embriotoxidade com o Zebrafish, *Danio rerio*. Os embriões foram expostos e avaliados em placa de 24 poços por um período de até 96 horas observando seus parâmetros vitais e de desenvolvimento através do microscópio Leica AZ. A atividade embriotóxica observada sobre *D. rerio* dos compostos (RTR, Gly e POEA) demonstrou ser concentração e tempo dependente. O RTR foi o mais embriotóxico apresentando CL₅₀ 24h 44,6 vezes maior que o Gly e 6 vezes maior que POEA. Todos os compostos levaram a alterações na formação dos olhos e presença de edema de pericárdio, nas concentrações eleitas como sub-letais; 3,75, 30 e 25 µg/mL, para respectivamente RTR, Gly e POEA, em período de até 96h. A análise da taxa de batimentos cardíacos (batimentos por minuto - bpm) evidenciou embriotoxidade para os compostos expostos. A exposição ao RTR apresentou diminuição dos bpm nos tempos de 24 e 48 h para as concentrações de 7,5 e 3,75 µg/mL. No tempo de 96h as concentrações de 3,75 e 1,87 µg/mL, foram igualmente significativas. O Gly apresentou efeito sobre os bpm com diferença somente nos tempos de 24 e 48h, de modo mais evidente nas concentrações de 120 e 60 µg/mL. O POEA, diferentemente do Gly, apresentou alteração no bpm nos tempos de 48 e 72 h para as concentrações de 50, 25 e 12,5 µg/mL. As alterações morfológicas observadas foram edemas de pericárdio, curvatura espinhal, que com o avançar da exposição, em especial em concentrações sub-letais, se intensificaram; com o surgimento de associações como retardo de eclosão e morte. É possível que os resultados obtidos quanto a taxa de batimentos cardíacos e mortalidade de embriões e larvas de *D. rerio* com RTR sejam o resultado sinérgico de Gly e POEA, demonstrando grande preocupação para a saúde humana e ambiental, utilizando o modelo experimental *D. rerio*.

Palavras-chave: *Danio rerio*, Glifosato, Surfactante, *Zebrafish*.

ABSTRACT

Brazil has been occupying a prominent position in agribusiness since 2008, considered one of the largest consumers of agrochemicals in the world. Among these, herbicides based on glyphosate (HGLY) have been the most used herbicides. H is able to inhibit the enzyme 5-enolpyruvoylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), an enzyme present in plants, but absent in animals. 5-enolpyruvyl-xykimate-3-phosphate synthase (Gly) and RTR are quite toxic to animals, but some studies suggest that the toxicity is related to the surfactants, as well as the POEA-polyoxyethyleneamine present in the commercial formulation of RTR. In this study we evaluated the toxic effect of the herbicide Gly, the POEA adjuvant and the RTR, through the acute exposure on *D. rerio* embryos. The embryos were exposed and evaluated in a 24-well plate for up to 96 hours observing their vital and developmental parameters through the Leica AZ microscope. The embryotoxic activity on *D. rerio* of the compounds (RTR, Gly and POEA) is of the concentration-time dependent type. The RTR was the most embryotoxic, presenting LC50 / 24h were 44.6 times higher than Gly and 6 times higher than POEA. All compounds led to changes in eye formation and presence of pericardial edema at concentrations chosen as sub-lethal; 3.75, 30 and 25 µg / mL, respectively, for RTR, Gly and POEA for up to 96 hours. Heart rate analysis (beats per minute - bpm) showed embryotoxicity for the compounds tested. Exposure to RTR showed a decrease of bpm at the 24 and 48 h times for the concentrations of 7.5 and 3.75 µg / mL. At 96 h the concentrations of 3.75 and 1.875 µg / mL were equally significant. Gly had an effect on bpms with difference only at 24 and 48h times, most evident at concentrations of 120 and 60 µg / mL. The POEA, unlike Gly, presented a change in bpm at 48 and 72 h for the concentrations of 50, 25 and 12.5 µg / mL. The morphological changes observed were pericardial edema, spinal curvature, which, with advancing exposure, especially in sub-lethal concentrations, intensified; and associations such as hatching delay and death arose. Finally, the results showed high toxicity of RTR compared to Gly and POEA and a great concern for human health, using the experimental model *D. rerio*.

Key words: *Danio rerio*, Glyphosate, Surfactant, Zebrafish.

“A Deus pelo dom da vida e da sabedoria, em especial, aos meus pais pelo incentivo e carinho e às pessoas com quem convivi nesses espaços ao longo desse período. A experiência de uma produção compartilhada na comunhão com amigos nesses espaços, foram a melhor experiência do mestrado acadêmico”.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que por vezes pensei em desistir, por ter segurado a minha mão e confortado meu coração nos momentos mais ansiosos e difíceis durante esta jornada.

Ao meu professor e orientador Dr. Ricardo de Mattos Santa Rita expresso gratidão. Obrigada pelo carinho, orientação, paciência pelo seu desprendimento em ajudar-me sem desmotivar e uma amizade sincera. Obrigada por me ajudar a compreender que existe mais que pesquisadores por trás de uma dissertação, mas seres humanos. Obrigada por ter acreditado em mim e por me ajudar a superar os meus medos e dificuldades.

Desejo agradecer a professora e coorientadora Dra. Mônica Rodrigues Ferreira Machado, pela sabedoria, boa vontade e parceria, com a disponibilização do Labfish para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao professor e colaborador Dr. Thiago Lopes Rocha pela contribuição do material necessário para a pesquisa, sempre muito educado e prestativo.

Agradeço à equipe do Laboratório de Morfofisiologia, ao Labfish, aos professores, alunos e especialmente a Universidade Federal de Goiás Regional Jataí, pela oportunidade de aprender e crescer no mundo acadêmico. Em especial aos amigos Silênio, Michele e Larise pelo incentivo e grande ajuda com as explicações e contribuições durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos ao Hospital da Unimed de Jataí e a minha equipe da Farmácia, especialmente à Marília, que com todo carinho e compreensão souberam entender as minhas ausências.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Saúde da Universidade Federal de Jataí, juntamente com todos os professores, alunos e colaboradores. A UFG é referência em educação e me sinto orgulhosa de ter feito parte dela.

Agradeço, também, à FAPEG pelo apoio financeiro.

Meu agradecimento para Lucas Peres pelo incentivo e apoio durante a caminhada.

Obrigada a todos pelo carinho!

EPÍGRAFE

“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da Criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante”.

Albert Schweitzer

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE – Acetilcolinesterase

AMPA – Ácido aminometil fosfônico

ATP – Trifosfato de Adenosina

Bpm – Batimentos por minuto

CDNB – 1-cloro – 2,4 – dinitrobenzeno

CL₅₀ – Concentração Média Letal

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPSPS – (5-enolpyruvoylshikimate-3-phosphate synthase) 5-enolpiruvoil-xikimato-3-fosfato sintase

EROS – Espécie reativa de Oxigênio

Gly – Gly puro

GPx – Glutathione Peroxidase

HCL – Ácido clorídrico

HGLY – Herbicidas à base de Gly

IC₅₀ – Concentração média inibitória

LPO – Peroxidação lipídica

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

N-fosfonometil glicina – Gly

NaOH – Hidróxido de Sódio

OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

pH – Potencial de Hidrogênio

POEA – Poli-oxietileno amina

PPM – Partes por milhão

RTR – Roundup Transorb[®]

SOD – Superóxido dismutase

StAR – Proteína regulatória esteroidogênica aguda

LISTA DE SÍMBOLOS

μL = Microlitro

mL = Mililitro

cm = centímetro

λ = comprimento de onda

g = gramas

L = litro

® = marca registrada

μm = micrômetro

mg = miligrama

nm = nanômetros

Kg = quilograma

s = segundos

bpm = batimentos/minuto

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação e efeitos e/ou sintomas agudos e crônicos dos agrotóxicos.....	17
Tabela 2 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos para mamíferos.....	18
Tabela 3 - Classificação dos agrotóxicos, segundo a CL ₅₀ para organismos aquáticos.....	19
Tabela 4 - Propriedades física e química do Gly e o primeiro metabólito AMPA.....	22
Tabela 5 - CL ₅₀ do RTR, Gly e POEA para embriões do <i>D. rerio</i> expostos de 24 a 96 h.....	40
Tabela 6 - Parâmetros de desenvolvimento sub-letal para embriões do <i>D. rerio</i> expostos de 24 a 96 h.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Via do Chiquimato.....	20
Figura 2 - Degradação do GLY no solo	21
Figura 3 - Espécime macho (esquerdo) e fêmea (direito) <i>D. rerio adulto</i>	25
Figura 4 - Desenvolvimento embrionário de <i>D.rerio</i> no período 0,2 a 4,7h	27
Figura 5 - Desenvolvimento embrionário de <i>D.rerio</i> no período 5,3 a 19,5h	28
Figura 6 - Desenvolvimento embrionário de <i>D.rerio</i> no período 22 a 72h	29
Figura 7 - Sistema para manutenção do Zebrafish em condições laboratoriais, a- rack de manutenção dos reprodutores; b- Aquários de reprodução com criadeiras.	33
Figura 8 - Fotos do desenvolvimento embrionário de <i>D rerio</i> : a- Zigoto, logo após fecundação; b - Zigoto, com pólo animal – 1 célula; c - Clivagem: primeira divisão celular – 2 células....	33
Figura 9 - Microplaca de 24 poços de fundo chato com exemplificação do procedimento experimental da atividade biológica dos compostos sobre embriões de <i>D. rerio</i>	34
Figura 10 - Taxa de mortalidade dos embriões de <i>D. rerio</i> após exposição de 24 a 96h ao RTR	36
Figura 11 - Taxa de mortalidade dos embriões de <i>D. rerio</i> após exposição de 24 a 96h ao Gly	37
Figura 12 - Taxa de mortalidade dos embriões de <i>D. rerio</i> após exposição de 24 a 96h ao POEA	38
Figura 13 - Representação da Mortalidade (Probit) da exposição de <i>D. rerio</i> à seis concentrações de RTR e controle, em função do log da concentração nos ensaios em triplicata, por 24h (a), 48h (b), 72h (c) e 96h (d).....	41
Figura 14 - Representação da Mortalidade (Probit) da exposição de <i>D. rerio</i> à seis concentrações de GLY e POEA e controle, respectivamente, em função do log da concentração nos ensaios em triplicata, GLY 24h (A), GLY 48h (B), GLY 72h (C), GLY 96h (D), POEA 24h (E), POEA 48h (F), POEA 72h (G), POEA 96h (H).....	42
Figura 15 - Taxa de batimentos cardíacos (bpm) dos embriões de <i>D. rerio</i> após exposição de 24 a 96h a RTR (A), Gly (B) e POEA (C)	46
Figura 16 - Embriões de <i>D. rerio</i> expostos por 24 h com POEA, Gly, RTR, Controle (A), Gly 240 µg/mL (B), RTR 0,781 µg/mL (C) e POEA 50 µg/mL (D). Cabeça de seta vermelha: embrião coagulado; cabeça de seta branca: malformação de cabeça; Seta preta: edema de pericárdio	48

Figura 17 - Embriões de <i>D. rerio</i> expostos por 48 h com POEA, Gly, RTR, Controle (A), POEA 0,781 µg/mL (B), RTR 0,396 µg/mL (C) e Gly 120 µg/mL (D). Cabeça de seta vermelha: embrião coagula; cabeça de seta preta larga: curvatura espinhal; Seta preta: edema de pericárdio	49
Figura 18 - Embriões de <i>D. rerio</i> expostos por 72 h com POEA, Gly e RTR. Controle (A), RTR 0,781 µg/mL (B), RTR 50 µg/mL (C) e Gly 3,75 µg/mL (D). Seta preta fina: edema de pericárdio; seta preta larga: curvatura espinhal	50
Figura 19 - Embriões de <i>D. rerio</i> expostos por 96 h com POEA, Gly e RTR. Controle (A), RTR 0,781 µg/mL (B), Gly 60 µg/mL (C), Gly 30 µg/mL (D), RTR 0,391 µg/mL (E), POEA 25 µg/mL (F) e POEA 0,313 µg/mL (G). Cabeça de seta vermelha: embrião coagulado; cabeça de seta preta larga: curvatura espinhal; Seta preta: edema de pericárdio; estrela branca: retardo na eclosão	52

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
1.1 Defensivos agrícolas: Legislação e Classificação	16
2 GLIFOSATO - (N-(fosfonometil glicina)	19
2.1 Mecanismo de ação e toxicidade do Gly para os peixes	22
2.2 Danio rerio como modelo experimental	25
2.3 Embriogênese de <i>D. rerio</i>	26
2.4 Teste de embriotoxicidade sobre <i>Zebrafish</i> – (ZET)	30
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Compostos e princípios ativos	32
4.2 Aspectos éticos.....	32
4.3 Modelo experimental.....	32
4.4 Bioensaios ou testes de embriotoxicidade.....	34
4.5 Avaliação da Concentração Média Letal (CL ₅₀)	35
4.6 Avaliação de teratogenia do RTR, do Gly e do POEA sobre <i>D. rerio</i>	35
4.7 Análise estatística	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Taxa de mortalidade	36
5.2 Concentração Média Letal - CL ₅₀	39
5.3 Avaliação da embriotoxicidade e teratogenia do RTR, do Gly e do POEA sobre <i>D. rerio</i>	43
5.4 Alterações morfológicas de embriões de <i>D. rerio</i> expostos ao RTR, Gly e POEA por período de 24 a 96h.....	47
CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa posição de destaque no mercado mundial do agronegócio desde 2008, sendo considerado um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo. Ocupando o segundo lugar no consumo de agrotóxicos no mercado mundial, está somente atrás dos Estados Unidos da América (OLIVEIRA, 2016). A produção brasileira de grãos apresentou significativo aumento no período de 2002 a 2011; as culturas de milho, soja, cana-de-açúcar, corresponderam à aproximadamente 60% da produção das lavouras brasileiras, e a região Centro Oeste ganhou espaço nessa produção. (CARNEIRO et al., 2015; IBGE, 2015a; IBGE, 2015b; SEGPLAN, 2015).

Segundo DEFARGE et al. (2018), os herbicidas são tema bastante controverso dentro da comunidade científica em relação as dosagens padrão, o mesmo ocorre para herbicida à base de Gly (HGLY) e riscos ao meio ambiente. Por serem os HGLY bastante ativos em plantas, sua utilização vem causando polêmica entre a Organização Mundial de Saúde (OMS), Agência Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) e a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) (PORTIER et al., (2016) *apud* DEFARGE et al. (2018). A OMS baseia-se na regulação de dosagens e exposição, a EFSA não classifica o Gly como tóxico e a IARC relaciona o alto potencial carcinogênico do herbicida (GUYTON et al, (2017) *apud* DEFARGE et al. (2018). O posicionamento da IARC não tem somente como base estudos regulatórios de fabricação, mas baseia-se em estudos epidemiológicos realizados após o uso de formulações completas de HGLY, assim como estudos sobre ação do Gly puro (GLY) através da alimentação animal (DEFARGE et al. 2018).

O aumento do uso dos agrotóxicos tem gerado grande impacto na saúde humana, no ambiente e nos animais. É comprovada que a exposição aos agrotóxicos afeta a saúde humana, o desenvolvimento embrionário, o sistema reprodutor, o sistema endócrino e aumentam as chances de desenvolvimento de neoplasias (CARNEIRO et al. 2015; GALLEGOS et al., 2016, SAMSEL e SENEFF 2015). Sabe-se que as legislações que regulamentam o uso dos agrotóxicos não estão bem fundamentadas e não demonstram se a toxicidade de formulações comerciais de HGLY, como o Roundup Transorb® (RTR) é mais tóxica do que o GLY (CARNEIRO et al., 2015). Dentre as legislações, muitas são atuais, entretanto devido aos interesses do mercado, informações sobre a toxicidade são ocultadas (CARNEIRO et al., 2015).

Mundialmente os HGLY são os mais utilizados, empregados em áreas agrícolas e não agrícolas, representando 60% do mercado mundial de herbicidas (WHO, 1994). Somente o

consumo brasileiro representa 38,5% desse total (AMARANTE JR et al., 2002; ANVISA, 2012; IBGE, 2012; WHO, 1994). Este herbicida torna-se ativo a partir do contato direto com a folhagem; a degradação do Gly ocorre por ação de microrganismos e pelo metabolismo das plantas, resultando na formação de dois principais metabólitos importantes: o ácido aminometil fosfônico (AMPA) e a sarcosina.

Diariamente ambientes aquáticos são expostos a compostos químicos como o Gly, por lixiviação, escape ou aplicação direta, mesmo em concentrações menores do que as permitidas pela literatura que podem chegar a aproximadamente 10 a 15 µg/L em rios e lagos (WEBSTER et al., 2014; ROY et al., 2016). Embora vários estudos tenham comprovado a toxicidade do Gly e das formulações comerciais, a caracterização de seus efeitos agudos, subcrônicos e crônicos, com o auxílio de modelos animais, são fundamentais para avaliação de risco real do uso destes herbicidas (VAN DER OOST et al., 2003).

A poluição é fator preocupante de risco para o meio ambiente, em especial para os ecossistemas aquáticos, os quais são considerados os mais relevantes receptores de contaminantes, tais como compostos orgânicos, metais pesados e agrotóxicos (BOGONI et al., 2014). Dentre os agrotóxicos que potencialmente contaminam estes ambientes, estão herbicidas, fungicidas e inseticidas (GUILHERME et al., 2012). A exposição dos ambientes aquáticos aos agrotóxicos levou grandes pesquisadores a optarem pela utilização de embriões de *D. rerio* em testes ecotoxicológicos. Este teleosteo de água doce, possui vantagem de se reproduzir rapidamente e por ser ótimo bioacumulador de compostos químicos. São praticamente homólogos ao organismo humano, tornando-se promissores para a pesquisa toxicológica e ambiental (KIMMEL, 1998). É um modelo experimental viável pois, permite saber se os efeitos letais são dos compostos químicos, como também entender o modo de ação desses xenobióticos nos organismos aquáticos (ZHANG et al. 2017; (LINNEY et al. 2004)

Embora os agrotóxicos venham causando polêmica dentro da comunidade científica, em relação as consequências na saúde humana e dos animais, se fazem necessárias novas pesquisas com diferentes modelos para avaliação toxicológica. No presente estudo avaliamos a atividade do Gly, do surfactante o Poli-oxietileno amina (POEA) e da formulação comercial Roundup Transorb® (RTR), sobre o desenvolvimento de embriões de *Danio rerio*.

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Defensivos agrícolas: Legislação e Classificação

O uso de defensivos agrícolas, teve impulso no século XX, quando o químico Paul Hermann Müller em 1939, comprovou a eficiência do pesticida Diclorodifeniltricloroetano – (DDT) em insetos. A Legislação brasileira até a Constituição de 1988, definia esses agentes químicos como defensivos agrícolas, excluindo os demais das campanhas sanitárias. A Norma Regulamentadora Rural nº 5 (NRR 5) da Legislação, que trata da utilização de produtos químicos no trabalho rural, da portaria 3.214 de 8 de junho de 1978, aprova as Normas Regulamentadoras (NRs) relativas à Segurança e Medicina do Trabalho, foi alterada e definiu que os defensivos agrícolas passassem a ser chamados de agrotóxicos (NUNES, RIBEIRO, 1999; TAVELLA et al., 2011; PERES, MOREIRA, DUBOIS, 2003).

Assim, a NRR 5 (1978) acompanha a mencionada Lei Federal e passa à regulamentação dos agrotóxicos, ali definidos da seguinte maneira:

Entende-se por agrotóxicos as substâncias, ou mistura de substâncias, de natureza química quando destinadas a prevenir, destruir ou repelir, direta ou indiretamente, qualquer forma de agente patogênico ou de vida animal ou vegetal, que seja nociva às plantas e animais úteis, seus produtos e subprodutos e ao homem.

O Brasil é líder mundial desde 2008 no consumo de agrotóxicos e cerca de vinte por cento destes são utilizados em nosso país, onde vinte e oito por cento contêm substâncias não autorizadas (CARNEIRO, 2015). No dia vinte e cinco de junho de dois mil e dezoito na Câmara dos Deputados, estava sob análise a retomada do Projeto de Lei (PL) 6299/02 mais conhecido como PL do veneno. Trata-se de um Projeto de Lei que visa modificar o sistema de aprovação, fiscalização, medição e venda de agrotóxicos no Brasil. O objetivo é em permitir o uso de pesticidas sem a prévia autorização por parte dos órgãos de fiscalização, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Ministério da Saúde e o Instituto Nacional do Câncer (INCA). Nesse projeto, caberia apenas ao Ministério da Agricultura a função de autorizar o uso de pesticidas e demais produtos agressivos à saúde e ao meio ambiente sem terem concluídos seus efeitos tóxicos. A permissão do uso de agrotóxicos sem autorização em favor dos interesses econômicos do agronegócio desperta na sociedade a luta para reprovação do PL na Câmara dos Deputados (MACHADO, 2018; VALENTE, BUFALO, 2018).

A classificação dos agrotóxicos baseia-se na tipificação do controle de pragas e ao grupo químico que pertencem (Tabela 1). As substâncias químicas mais utilizadas nas lavouras são: os herbicidas (utilizados no controle de plantas daninhas), inseticidas (controle de insetos/pragas), fungicidas (controle de fungos e leveduras) e fumigantes (no combate a bactérias do solo). Popularmente, são chamados pelos trabalhadores rurais de venenos ou remédios, e essas definições trazem uma reflexão sob os efeitos colaterais e os problemas de saúde que poderão afetar as próximas gerações (PERES, MOREIRA, DUBOIS, 2003).

Tabela 1 - Classificação e efeitos e/ou sintomas agudos e crônicos dos agrotóxicos em seres humanos.

Praga que controla	Grupo químico	Sintomas de intoxicação aguda	Sintomas de intoxicação crônica
Inseticidas	Organofosforados e carbamatos	Fraqueza, cólicas abdominais, vômitos, espasmos musculares e convulsões	Efeitos neurotóxicos retardados, alterações cromossomais e dermatites de contato
	Organoclorados	Náuseas, vômitos, contrações musculares involuntárias	Lesões hepáticas, arritmias cardíacas, lesões renais e neuropatias periféricas
	Piretroides sintéticos	Irritações das conjuntivas, espirros, excitação, convulsões	Alergias, asma brônquica, irritações nas mucosas, hipersensibilidade
Fungicidas	Ditiocarbamatos	Tonteiras, vômitos, tremores musculares, dor de cabeça	Alergias respiratórias, dermatites, doença de Parkinson, cânceres
	Fentalamidas	-----	Teratogênese
Herbicidas	Dinitroferóis e pentaclorofenol	Dificuldade respiratória, hipertermia, convulsões	Cânceres (PCP-formação de dioxinas), cloroacnes
	Fenoxiacéticos	Perda de apetite, enjoo, vômitos, fasciculação muscular	Indução da produção de enzimas hepáticas, cânceres, teratogêneses
	Dipiridilos	Sangramento nasal, fraqueza, desmaios, conjuntivites	Lesões hepáticas, dermatites de contato, fibrose pulmonar

Fonte: Adaptado de CARNEIRO *et al.* (2015).

Dados demonstram que, no Brasil, quarenta e cinco por cento dos agrotóxicos são herbicidas, destes os HGLY e seus sais, correspondem à trinta e oito por cento e meio do consumo mundial (AMARANTE JR *et al.*, 2002; ANVISA, 2012; IBGE, 2012).

O mercado cresceu de maneira expansiva, principalmente na agricultura brasileira, onde com a abertura de mercado e incentivo do governo federal, proporcionou ao Brasil tornar-se um dos seis maiores consumidores de agrotóxicos no mundo (NUNES, RIBEIRO, 1999; TAVELLA *et al.*, 2011). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), junto ao Ministério da Saúde, divulgou a classificação toxicológica a partir da concentração média letal (CL₅₀) (Tabela 2), que define os níveis de toxicidade dos agrotóxicos. A classificação que vai de extremamente tóxico a pouco tóxico é baseada nas concentrações e na bula do produto. Todos esses parâmetros de toxicidade são dependentes de muitos fatores como: modo de exposição do agrotóxico, dose, vias de administração, idade, sexo e a dose necessária que causa mortalidade em cinquenta por cento dos animais expostos.

Tabela 2 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos para mamíferos.

Classe toxicológica	Toxicidade	CL ₅₀ (mg/kg)	Faixa colorida
I	Extremamente tóxico	≤ 5	Vermelha
II	Altamente tóxico	5 a 50	Amarela
III	Mediamente tóxico	50 a 500	Azul
IV	Pouco tóxico	500 a 5000	Verde

Fonte: Adaptado de BRAIBANTE, ZAPPE (2012).

O herbicida Gly apresenta classificação toxicológica IV. Sabe-se que os agrotóxicos de classes I e II devem ser evitados, porém a utilização dos níveis III e IV são mais indicados sob a supervisão do profissional responsável (BRAIBANTE, ZAPPE, 2012; ANVISA, 2011).

Em 1990, foi relatado por um grupo de consultores do IBAMA a CL₅₀ para organismos aquáticos, quando iniciada a atividade de avaliação do potencial de periculosidade ambiental para agrotóxicos no Brasil (Tabela 3) (MACHADO, 1999).

Tabela 3 - Classificação dos agrotóxicos, segundo a CL₅₀ para organismos aquáticos.

CL ₅₀ (PPM)	FATOR	CLASSIFICAÇÃO
> 100	4	Praticamente não tóxico
10 – 100	3	Pouco tóxico
0,1 – 10	2	Moderadamente tóxico
< 0,1	1	Altamente tóxico

Fonte: Machado (1999).

MACHADO (1995) (*apud* MACHADO, 1999), afirma que a CL₅₀ é um dado preliminar que apenas oferece uma ideia a respeito da toxicidade de um agrotóxico aos peixes e outros organismos. O teste de Mentox 600 CE, que apresenta como princípio ativo o Paration metílico, sobre as brânquias do pacu *Metynnis roosevelti*, uma espécie nativa de rios brasileiros; apresentaram alterações epiteliais, hiperplasia e hipersecreção mucosa. Estes resultados foram observados em concentrações de 7 partes por milhão (ppm) 1 ppm, demonstrando atividade concentração/tempo-dependente. Mesmo em concentrações inferiores a CL₅₀, o organofosforado lesou o epitélio e levou a transtornos em decorrência das trocas gasosas.

O tratamento das intoxicações por Gly é basicamente sintomático e de manutenção das funções vitais, e deve ser implementado paralelamente às medidas de descontaminação, determinada a partir da CL₅₀ para mamíferos. A classificação quanto à exposição aos agrotóxicos baseia-se na sintomatologia aguda e crônica como supracitado na Tabela 1.

2 GLIFOSATO - (N-(fosfonometil glicina))

As propriedades do herbicida Gly (N-(fosfonometil glicina)) foram descobertas por pesquisadores da Monsanto CompanyTM em 1970 nos Estados Unidos, sendo introduzido no mercado americano pela primeira vez em 1974, para controle de plantas daninhas (WILLIAMS et al., 2000; VEREECKEN, 2005). No Brasil, suas vendas foram iniciadas em 1978, e sua fabricação no país em 1984 (IBGE, 2012). Atualmente o consumo estimado de agrotóxicos no Brasil aumentou consideravelmente na agricultura brasileira. De um volume total de agrotóxicos utilizados nas lavouras, 45% são herbicidas. Dentre os herbicidas utilizados, o Gly é o mais expressivo. A produção anual global de Gly tem superado um milhão de toneladas e

seu uso ainda é pouco reduzido pela alta resistência das plantas daninhas; o consumo elevou-se com o cultivo de soja transgênica (CUHRA et al., 2016).

O Gly é um herbicida utilizado tanto em áreas agrícolas como não agrícolas em todo o mundo (WHO, 1994). Atua inibindo a enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintase (EPSPS), enzima chave da via chiquimato, que envolve a biossíntese de aminoácidos aromáticos. Esta via está presente em plantas e microrganismos, porém ausente em animais (SANDRINI et al., 2013) (Figura 1).

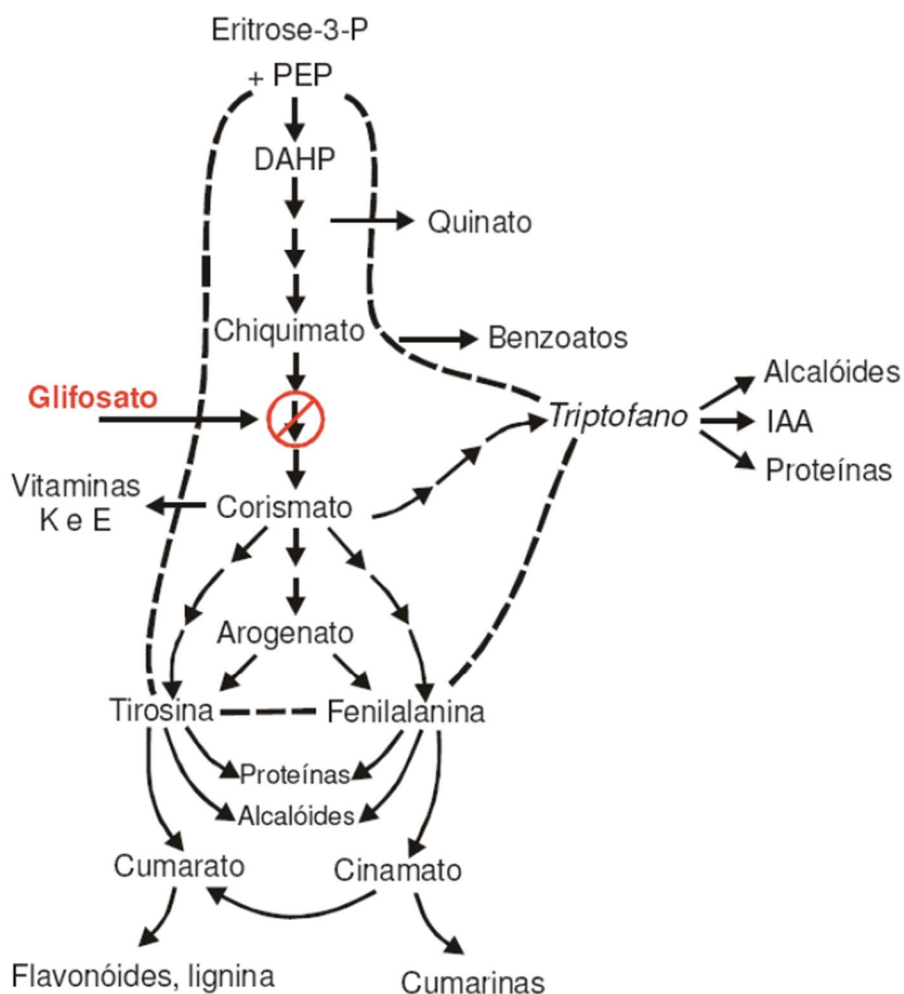


Figura 1- Via do Chiquimato. Fonte: YAMADO, CASTRO (2004).

No solo a degradação é muito rápida realizada por uma grande variedade de microrganismos que utilizam o composto como fonte de energia, fosforo, nitrogênio e carbono; que por meio de rotas metabólicas produzem o ácido aminometil fosfônico (AMPA) como principal metabólico e sarcosina como metabólito intermediário na rota alternativa (DICK, QUINN, 1995 apud MORAES, ROSSI, 2010) (Figura 2 e Tabela 3).

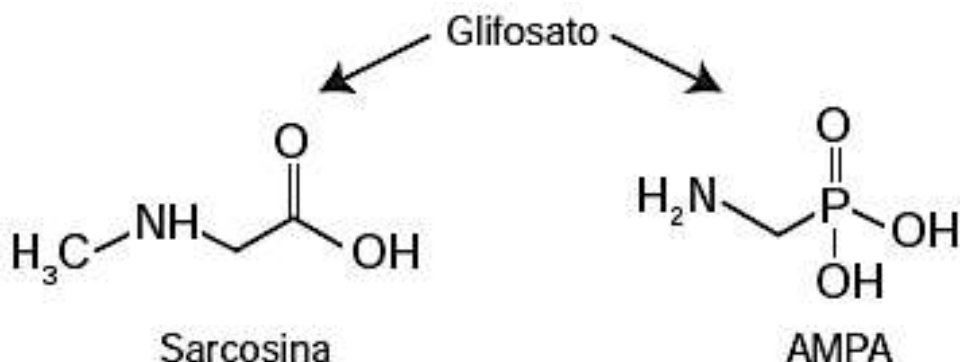


Figura 2 - Degradação do GLY no solo. Fonte: AMARANTE (2002).

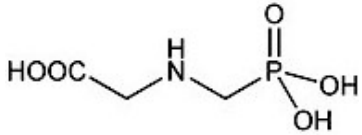
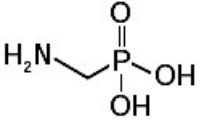
Este herbicida é eficiente a partir do contato direto com a folhagem e subsequente translocação para o interior da planta. A degradação metabólica do Gly nas plantas, resulta em dióxido de carbono e AMPA (WILIANS *et al.*, 2000).

GOLDSBOROUGH e BROWN (1993) demonstraram que o Gly apresenta meia vida de 11,2 dias, sendo que 14 dias após o tratamento ainda era possível identificar AMPA. Já na coluna de água foi possível observar duas fases de contaminação, uma rápida e outra lenta, principalmente dependente do tipo de diluidor utilizado para dissipação; sendo que a máxima concentração de Gly encontrada por estes autores foi de $1,7\mu\text{g/L}$ de água.

Em análise posterior à colheita (2 anos) de amostras de soja expostas ao RTR, observou-se a presença de GLY e resíduo de metabólito AMPA em concentrações de $3,3\text{ mg/kg}$ de Gly e $5,7\text{ mg/kg}$, respectivamente. O que correspondeu a 63% do total do Gly, o que evidencia a lentidão de sua degradação em relação ao AMPA (CUHRA *et al.*, 2016).

Diversas formulações de HGLY tem apresentado efeitos tóxicos sobre diferentes organismos. A toxicidade destes compostos em animais aquáticos aponta para a inibição da acetilcolinesterase (AChE), como observado em *Prochilodus lineatus* expostos ao RTR por 96h (MODESTO, MARTINEZ, 2010). O mecanismo de ação sobre a enzima é sugerido pelo surfactante e surfactante presente na formulação comercial, o Poli-oxietileno amina (POEA). O POEA tem demonstrado maior toxicidade do que outras formulações contendo Gly (BAER, 2005; SANTOS *et al.*, 2005; WHO, 1994).

Tabela 4 - Propriedades física e química do Gly e o primeiro metabólito AMPA

Nome comum	Gly	AMPA
Nome IUPAC	N-fosfonometil glicina	Ácido aminometil fosfônico
Fórmula química	$C_3H_8NO_5P$	CH_6NO_3P
Estrutura química		
Número CAS	1071-83-6 (ácido)	1066-51-9
Peso molecular	169.09 g mol ⁻¹	111.04 g mol ⁻¹
Cor e estado físico	Pó cristalino branco	Pó cristalino branco
Ponto de fusão	200° - 230°C	120°C
Solubilidade em água	10,000 – 15,700 mg l ⁻¹ a 25°C	—
Coefficiente de partição água/octanol (log Kow)	- 4.59 a 1.70	—
Meia vida	7 – 142 dias em água	7 – 14 dias na água

Fonte: Adaptado de Giesy et al., (2000).

Segundo SOLOMON & THOMPSON (2003), os ambientes aquáticos podem ser expostos ao Gly por lixiviação, aplicação direta ou escape durante a aplicação. Além de ser utilizado em grandes monoculturas ou policulturas, o Gly também tem sido usado popularmente em jardins e gramados, sem os cuidados necessários, contribuindo para contaminação das superfícies e lençóis freáticos (HANKE, et al., 2010).

2.1 Mecanismo de ação e toxicidade do Gly para os peixes

SANDRINI et al. (2003) encontraram concentrações médias inibitórias (IC₅₀) para AChE de *D. rerio* na faixa de 2,19 a 7,08 mM. Embora as concentrações sejam menores do que as encontradas na água, é importante salientar que o Gly tem efeito bioacumulativo, e a

exposição prolongada pode incorrer em danos à fauna aquática (WANG et al., 1994; WHO, 1994).

Avaliando os efeitos do Gly sobre a reprodução do guppy (*Poecilia reticulata*), Harayashiky et al. (2013) observaram que os machos expostos a 700 µg/L de Gly, apresentaram redução da integridade de DNA e diminuição da atividade mitocondrial espermática. WALSH et al. (2000) observaram diminuição da esteroidogênese pelas células de Leydig, via redução de proteína regulatória esteroidogênica aguda (StAR), promovendo diminuição da atividade reprodutiva em ratos machos intoxicados com RTR.

Fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*) expostas a 3,6 mg/L RTR em lagoas contaminadas apresentaram disfunção na esteroidogênese, caracterizada por diminuição dos níveis de estradiol, responsável pela vitelogênese durante o desenvolvimento folicular (SOSO et al., 2007). Também, foi observado diminuição da atividade sexual, número de cópulas e fertilização em *Jenynsia multidentata* após exposição a 0,5 mg/L após o período de 28 dias ao RTR (HUED et al., 2012).

Em *D. rerio* exposto à 5 e 10 mg/L de Gly por 24 e 96 horas, foi observado no sêmen destes peixes adultos danos no DNA, redução da integridade da membrana mitocondrial, funcionalidade e diminuição na duração da motilidade espermática. Estas variações na integridade espermática convergem para uma diminuição na fertilidade dos machos adultos (LOPES et al., 2014).

Em linhagem de hepatócitos de *D. rerio*, Goulart et al. (2015) observaram perda da integridade da membrana celular, atividade sobre a mitocôndria com inibição da produção de ATP e redução da atividade lisossomal a partir da exposição ao herbicida RTR a 67,7µg/L, durante 6 horas. A atividade do RTR testadas nas concentrações 0,05, 0,1, 0,5, 1 a 5 mg/L também foi observada em *Lumbriculus variegates*, levando ao aumento da atividade da glutathione transferase (GST) (CONTARDO-JARA et al., 2009), principalmente na formulação contendo POEA. Este mesmo padrão de aumento da GST foi observado em fígado de *P. lineatus* após exposição aguda com RTR em 1mg e 5mg por 24 a 96 horas, além de aumento no hematócrito e níveis de glicose (MODESTO, MARTINEZ, 2010b; LANGIANO, MARTINEZ, 2008). A diminuição de reservas glicogênicas hepáticas e musculares foram observada em *Leporinus obtusidens* após exposição ao RTR a 0, 1 ou 5 mg/L por 90 dias (GLUSCZAK et al., 2006; SALBEGO et al., 2010). Alterações histopatológicas hepáticas em *Jenynsia Multidentata* expostos a 0,5 mg/L por 7 a 28 dias ao RTR , sugerem ativação de metabolização deste composto (HUED et al., 2012).

Fêmeas de *P. Reticulata* expostas a 1,8mg/L por até 24 horas ao herbicida RTR, apresentaram alterações hepatotóxicas, focos de hemorragias, dilatação de vasos e necrose em relação ao tempo de exposição e frequência ao RTR. Análises proteômicas mostraram que o mesmo herbicida alterou 18 proteínas envolvidas na motilidade, transporte e morte celular, proteínas consideradas como biomarcadores potenciais de nível molecular. A toxicidade do Gly também foi testada em brânquias e fígado de fêmeas e machos *P. Reticulata*. Resultados mostraram que a CL₅₀ foi igual para ambos os sexos em 96h para GLY nas concentrações de 68,78 e 70,87 mgL⁻¹ e AMPA em 180 e 164,32 mgL⁻¹. Porém, as análises histopatológicas apresentaram diferenças entre os sexos, ou seja, alterações regressivas, como esteatose, núcleos picnóticos e alta distribuição de fibras colágenas e hepatócitos como células degeneradas também foram observados (DOS SANTOS, 2017; ANTUNES et al. 2017).

Efeitos tóxicos de HGLY foram observados em *P. reticulata* e pode ser comprovada usando abordagem proteômica. A CL_{5096h} foi determinada e os valores encontrados foram de 3,6 ± 0,4 mg de RTR. Os peixes expostos a concentração de 1,82mg de RTR demonstraram alterações nas proteínas das brânquias, vias metabólicas e proteínas do citoesqueleto. Esses resultados demonstram que o CL_{50,96h} da formulação do herbicida Roundup Transorb®, contendo 480 g / l de equivalente ácido de N- (fosfonometil) glicina, mostrou-se tempo-dependente (ROCHA et al. 2015).

Estudo com *Anguila gills* demonstraram aumento da atividade da catalase e diminuição da atividade da superóxido dismutase (SOD) em fígado, observada também uma quebra de DNA dependente do tempo de exposição ao RTR (GUILHERME et al., 2012). As evidências convergem para aumento do estresse oxidativo como mecanismo da toxicidade em animais, especialmente em peixes, levando à morte celular e diminuição dos parâmetros reprodutivos (BAGCHI et al., 1995).

O mecanismo de ação de inibição do RTR sobre a AChE em peixes pode estar relacionado ao bloqueio do sistema neuromuscular, que é principalmente controlado pela acetilcolina. A inibição desta promove alterações no comportamento e nos músculos podendo levar a uma hiperestimulação das fibras musculares, causando tetânia, paralisia e/ou morte (KIRBY et al., 2000). A ação inibidora do RTR sobre AChE já foi demonstrada por outros herbicidas como organofosforados e carbamato. O herbicida demonstrou atividade similar sobre a enzima em cérebro e músculo de *P. lineatus*, onde a exposição por 96 h leva a uma inibição de AChE no cérebro em 11,7-17,9% e no músculo em 21,3%. (PAYNE et al., 1996; GLUSCZAK et al., 2007; MODESTO, MARTINEZ, 2010). Espécies expostas ao RTR

apresentaram alterações como aumento na atividade das enzimas SOD, glutathione peroxidase (GPx), redução na atividade da CAT e peroxidação lipídica (LPO) e alterações nos estágios iniciais de vida de *D. rerio* (DOS SANTOS, MARTINEZ, 2014; ROY et al., 2016).

2.2 *Danio rerio* como modelo experimental

O Zebrafish é um peixe tropical de água doce proveniente dos rios do Sul da Ásia, principalmente do Norte da Índia, Paquistão, Butão e Nepal (Figura 2). Pertence à família *Cyprinidae*, classe *Actinopterygii*, e ordem *Teleostei*. Essa espécie é conhecida popularmente no mundo como zebrafish por suas listras no corpo, e no Brasil como paulistinha (GRUNWALD, EISEN, 2002).



Figura 3 - Espécime macho (esquerdo) e fêmea (direito) *D. rerio* adulto - Fonte: <<http://naturalresourcereport.com/2017/06/9287/>>.

D. rerio torna-se o organismo-modelo de predileção nas pesquisas biomédicas, a partir da década de 2000. Diversas são as características que o tornaram um excelente sistema-modelo de estudo em toxicologia e reprodução, como as condições simples de manuseio e a forma cíclica de reprodução. A cada 9-10 semanas aproximadamente, a fêmea pode desovar cerca de 200-300 ovos. A fertilização é externa, apresenta córion translúcido, resistência dos embriões à manipulação, genoma sequenciado extensa homologia com outras espécies de vertebrados inclusive humanos (KIMMEL et al., 1995; LONG et al., 1997; BRIGGS, 2002; GRUNWALD, EISEN, 2002; AMARANTE JR et al., 2004; DAMMSKI et al., 2011; HUSZNO, KLAG, 2012).

A grande sensibilidade do *D. rerio* à exposição a produtos químicos, bem como a capacidade de absorver de forma rápida os compostos que são diretamente adicionados na água e acumulá-los em diferentes tecidos, confirmam este como modelo experimental (CARVAN et al., 2005). Estudos toxicológicos utilizando peixes, especificamente *D. rerio*, têm sido conduzidos desde a década de 1980, para investigar fármacos e também poluentes ambientais, especialmente os disruptores endócrinos que afetam a ligação de receptores de estrógenos (LAW, 2001; PARNG et al., 2002; GROSELL, WOOD, 2002).

2.3 Embriogênese de *D. rerio*

O período conhecido como embriogênese do *D. rerio* tem início na fertilização do ovo e término na eclosão, a qual ocorre entre 48 a 96 horas pós fertilização (hpf) (Figura 2, 3 e 4). A primeira clivagem ocorre 40 minutos após a fertilização e inicia as divisões mitóticas no pólo animal. A fase de blástula ou esfera ocorre por formação de espaços irregulares entre as células, constituindo o blastoderma. As clivagens continuam, porém em um ritmo menos acelerado e entram em evidência as oscilações ou movimentos celulares (KIMMEL et al, 1995).

A epibolia é o primeiro e crucial movimento, onde células do blastoderma recobrem totalmente a superfície do vitelo. O processo de gastrulação, no qual é formada a placa neural, os somitos, cartilagem vertebral e vesículas ópticas inicia-se com cinquenta por cento de epibolia. Na fase de segmentação, o embrião apresenta a histogênese da maioria dos sistemas completos (24 hpf) (KIMMEL et al., 1995).

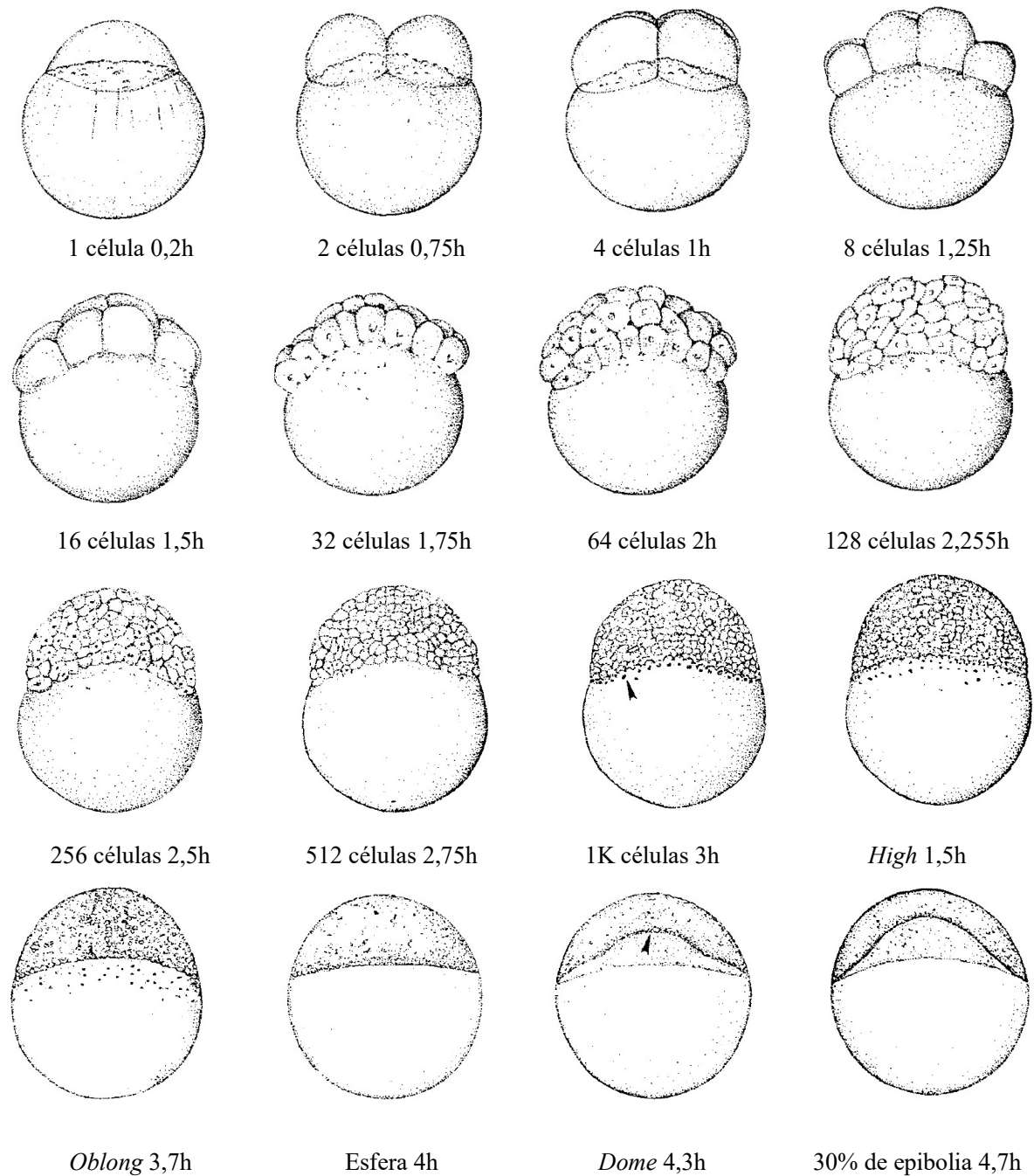


Figura 4 - Desenvolvimento embrionário de *D. rerio* no período 0,2 a 4,7h. Fonte: Modificado de KIMMEL et al., 1995.

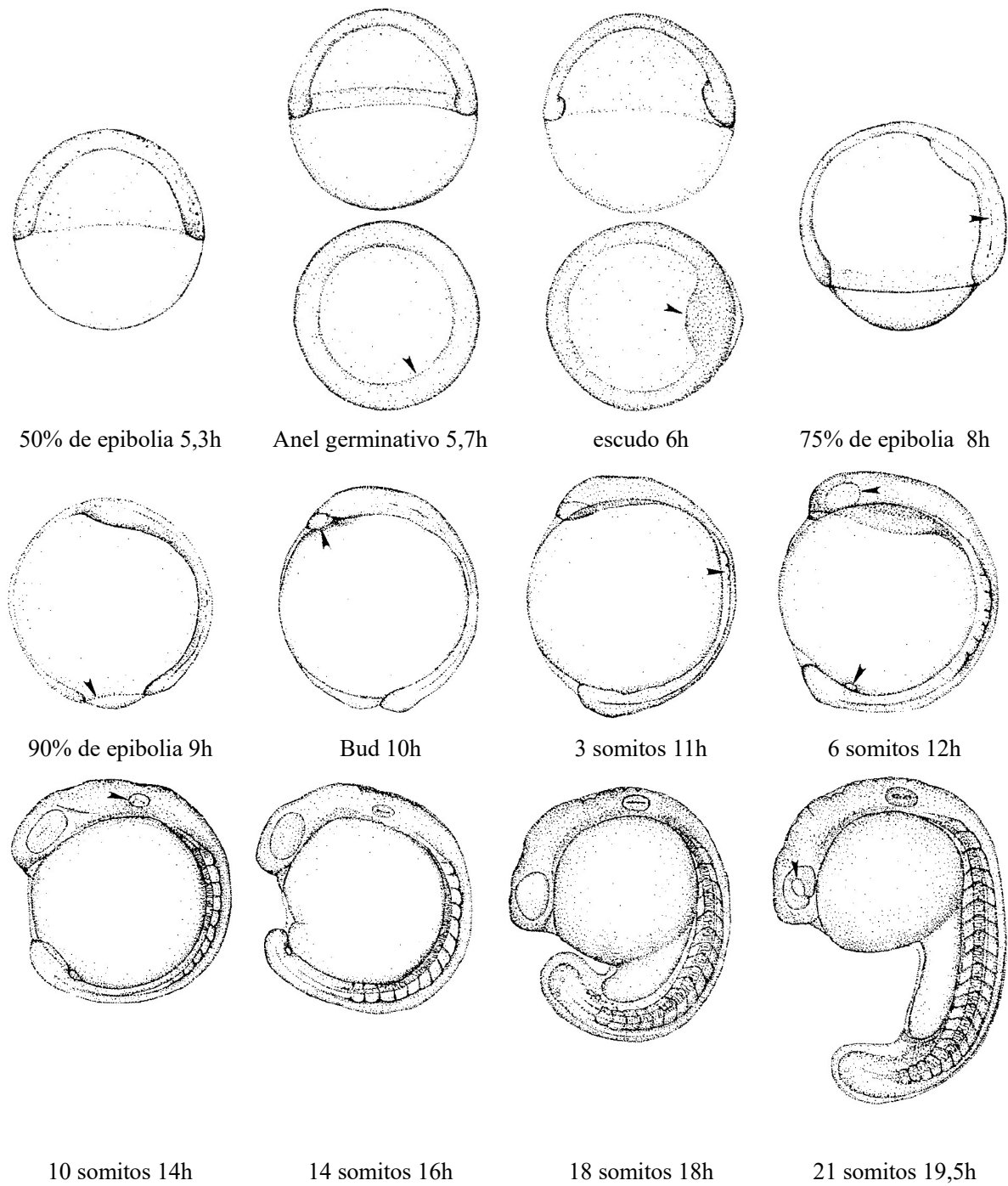


Figura 5 - Desenvolvimento embrionário de *D.rerio* no período 5,3 a 19,5h. Fonte: Modificado de KIMMEL et al., 1995.

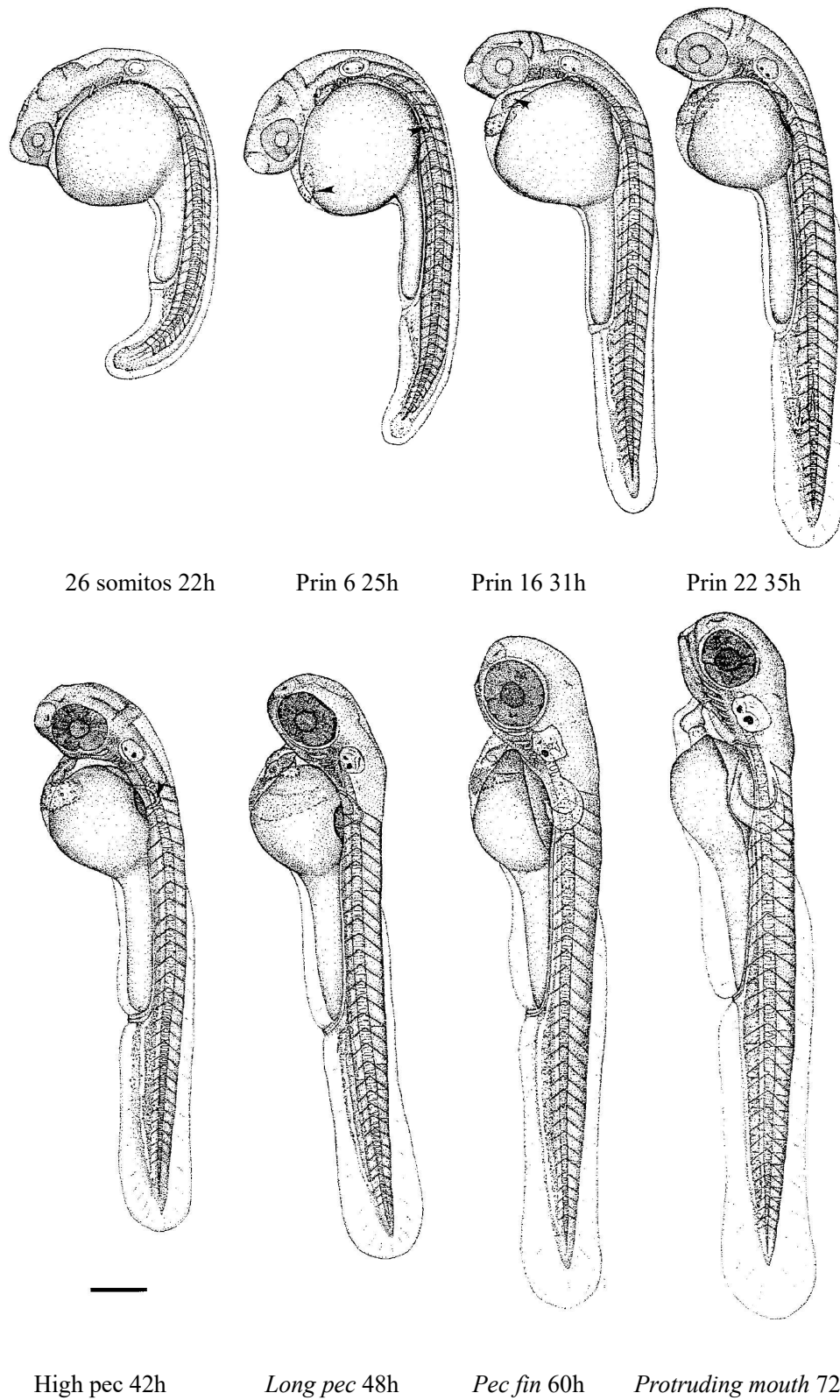


Figura 6 - Desenvolvimento embrionário de *D. rerio* no período 22 a 72h. Fonte: Modificado de KIMMEL et al., 1995.

2.4 Teste de embriotoxidade sobre Zebrafish – (ZET)

Pesquisa de ecotoxicidade tem sido realizada utilizando uma importante ferramenta para análise de contaminantes aquáticos, o ZET (BABIC et al. 2017). Este tipo de ensaio, tem proporcionado bons resultados em análises de ecotoxicidade que vem reduzindo o risco ambiental aquático. Vários toxicologistas utilizam o modelo experimental *D. rerio* em substituição as outras espécies vertebradas como camundongos, pela facilidade de manuseio e alta similaridade com o genoma humano e de animais. Com o teste é possível verificar taxas de mortalidade, embriões coagulados, ausência de batimentos cardíacos, retardo de crescimento e presença de edema de pericárdio em embriões expostos a compostos químicos (BABIC et al., 2017).

A exposição de embriões de espécies de peixes, de acordo com OECD (1992), são expostos nos estágios iniciais de vida dos animais e tem como princípio definir os efeitos letal e sub-letal de produtos químicos. Testes agudos que comparam embriões livres com embriões de peixes na espécie *D. rerio* no contexto da Legislação Européia, demonstraram correlação de 0,87 com inclinação de 1,09 e intervalo de confiança de 95% de resultados semelhantes para ZET. Essa comparação tem sido importante para os testes nos embriões, visto que são capazes de proporcionar se há diferença na exposição de compostos químicos. Pesquisa com embriões parece ser bastante promissora no campo da ciência, porém, ainda se faz necessário aprofundar pesquisas para testes toxicológicos avaliando alternativas de substituição de peixes adultos por embriões (LAMMER, et al. 2009).

Diante do exposto, os efeitos tóxicos dos compostos RTR, Gly e POEA são avaliados usando o ZET onde os resultados obtidos, permitirão esclarecer se o composto associado RTR é mais tóxico para o embrião do que os compostos POEA e Gly isoladamente.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito tóxico do herbicida à base de Gly (RTR), do princípio ativo (Gly), do surfactante POEA sobre o desenvolvimento embrionário de *D. rerio*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a taxa de mortalidade após exposição ao RTR, Gly e do POEA em embriões de *D. rerio* no período de 24 à 96 h;
- Determinar a concentração média letal (CL₅₀) do RTR, Gly e do POEA, sobre embriões de *D. rerio* no período de 24 à 96 h;
- Analisar o efeito teratogênico pela exposição ao RTR, Gly e do POEA em embriões de *D. rerio* no período de 24 à 96 h;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Compostos e princípios ativos

A formulação comercial Roundup Transorb® (RTR) é fabricado pela titular Monsanto do Brasil Ltda, registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA nº 04299; CAS 1071-83-6. Tem como composição o Sal de Potássio de GLY 58,8 % m/v (588 g/L); equivalente ácido de N – (fosfonometil) glicina (GLY) 48,0 % m/v (480 g/L) e ingredientes inertes 82,0 % m/v (820 g/L).

A formulação de Gly, Gly Pestanal® é fabricado pela Sigma-Aldrich e tem como composição o sal N-fosfonometil glicina (99,7%). CAS: 1071-836. Já o analítico POEA, CAS 61791-26-2 com (99,5%) de pureza.

A diluições das soluções estoque e de trabalho, foram realizadas em água reconstituída, com concentração inicial de µg/mL para Gly, 15 a 480 µg/mL, para POEA 6,25 a 200 µg/mL e para RTR 0,93 a 30 µg/mL (MARIANI, 2018).

4.2 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFG (CEUA/UFG), aprovado sob Protocolo nº: 002/17, com aprovação em: 25/08/2017 (ANEXO A).

4.3 Modelo experimental

Neste trabalho foram utilizados embriões de peixes da espécie *D. rerio* obtidos no Laboratório de Morfofisiologia/LabFish do Instituto de BioCiências, Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí. Foram alocados 80 espécimes em aquários de reprodução, com sistema de recirculação de água, na proporção de 1 fêmea para 3 machos para reprodução natural. Os peixes foram mantidos por 24h em fotoperíodo de 14:10h claro/escuro, com temperatura média de 28°C. Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia com ração comercial flocular (FlakesFood) e uma vez ao dia com micro vermes e artêmia. Todos os procedimentos experimentais, como a reprodução e os testes toxicológicos, seguiram especificações da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico OECD (1992).

As fêmeas depositaram os ovos logo ao raiar do dia, ou com a luz se acendendo. Os machos liberaram os espermatozoides na água, e os ovos foram fecundados, permanecendo no fundo do aquário (MARIANI, 2018) (Figura 7b).



Figura 7 - Sistema para manutenção do Zebrafish em condições laboratoriais, a- rack de manutenção dos reprodutores; b- Aquários de reprodução com criadeiras.

Após a reprodução, os ovos foram coletados, selecionados e classificados, com auxílio de microscópio (OLYMPUS CX31), entre bons, ruins, intermediários e não fertilizados. Para o experimento utilizou-se apenas embriões classificados como bons. Embriões não fecundados permanecem com aparência de zigoto pós-fecundação (Figura 8a); já nos ovos fecundados é possível observar mais de uma célula no pólo animal (Figura 8c).

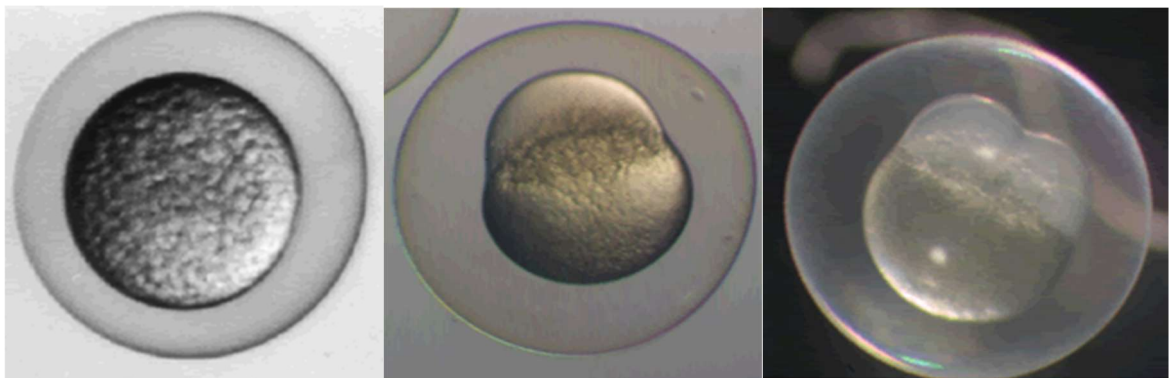


Figura 8 - Fotos do desenvolvimento embrionário de *D rerio*: a- Zigoto, logo após fecundação; b - Zigoto, com pólo animal – 1 célula; c - Clivagem: primeira divisão celular – 2 células. Fonte: Adaptado de MARIANI, 2018.

4.4 Bioensaios ou testes de embriotoxicidade

Os bioensaios ou testes ecotoxicológicos foram realizados utilizando três compostos: RTR, Gly e POEA. Todas as diluições e controles, foram realizadas com água reconstituída (MARIANI, 2018). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata, utilizando-se a metodologia de microdiluição em placas de 24 poços de fundo plano, onde os compostos foram diluídos seriadamente, na proporção 1:2, com concentrações nominais de $\mu\text{g/mL}$ para Gly na faixa de 15 a 480 $\mu\text{g/mL}$, para POEA 6,25 a 200 $\mu\text{g/mL}$, e para RTR na faixa de 0,93 a 30 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 8).

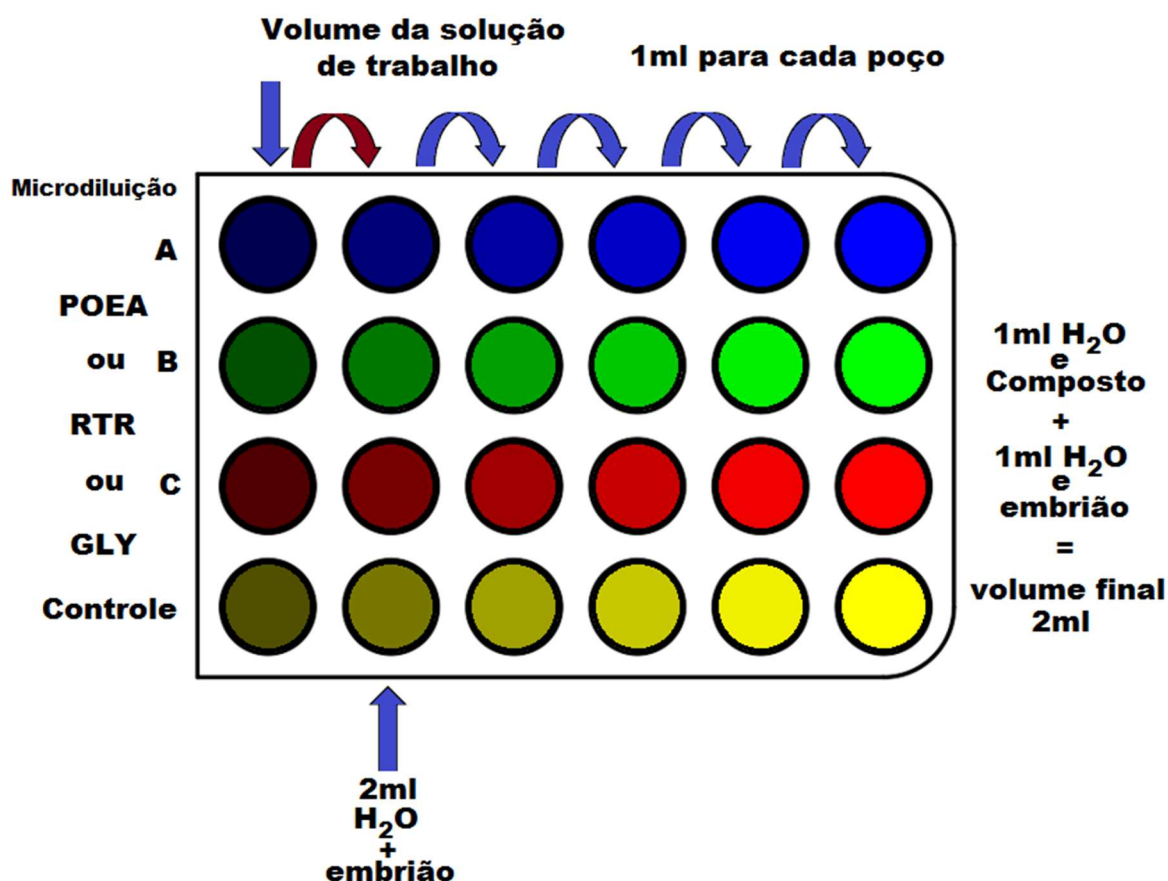


Figura 9 - Microplaca de 24 poços de fundo chato com exemplificação do procedimento experimental da atividade biológica dos compostos sobre embriões de *D. rerio*.

O volume final da placa foi de 2 ml. Os compostos químicos foram expostos utilizando cinco embriões por poço. Cada concentração correspondeu um total de 15 embriões todos em triplicata, utilizando no final do experimento 45 embriões por concentração para RTR, Gly e POEA. Após a diluição e adição dos embriões, as placas foram mantidas sob temperatura 26,0

$\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, em fotoperíodo de 14:10h claro/escuro, por 96h. As análises foram realizadas a cada 24 h, avaliando-se os parâmetros vitais para determinação da mortalidade embrionária e fetal.

4.5 Avaliação da Concentração Média Letal (CL_{50})

Com base nos dados obtidos de mortalidade e concentrações, utilizou-se regressão logística binária Probit, no programa Origin 7.0 para a estimativa dos valores da concentração média letal (CL_{50}) (COLOSIMO, 2018). Os limites superior e inferior foram analisados sendo: $CL_{50\ 24,48,72\ e\ 96h}$ para RTR: limite superior: 9,58 e inferior: 6,41; limite superior: 20,4 e inferior: 9,16; limite superior: 5,35 e inferior: 3,41; limite superior: 4,83 e inferior: 3,10. Para o composto Gly resultaram em valores de $CL_{50\ 24,48,72\ e\ 96h}$; limite superior: 391,5 e inferior: 308,9; limite superior: 120,9 e inferior: 100,9; limite superior: 71,2 e inferior: 61,6; limite superior: 66,3 e inferior: 57,7. Já a $CL_{50\ 24,48,72\ e\ 96h}$ respectivamente para POEA: limite superior: 52,7 e inferior: 41,3; limite superior: 51,8 e inferior: 30,3; limite superior: 33,8 e inferior: 22,6; limite superior: 65,6 e inferior: 29,4.

4.6 Avaliação de teratogenia do RTR, do Gly e do POEA sobre *D. rerio*

Para a avaliação do efeito tóxico o RTR, o Gly e o POEA foram testados sobre *D. rerio* a cada 24h até o período de 96h, os embriões foram avaliados a cada 24h, quanto aos parâmetros: ausência de somitos, edema de pericárdio e saco vitelino, presença de otólito, presença arterial, formação nos olhos, e taxa de batimentos cardíacos (batimentos por minuto – bpm) e alterações morfológicas (KIMMEL, 1995). Utilizou-se para a observação, análise e obtenção das fotomicrografias, microscópio de luz Leica DM750 acoplado à câmera digital ICC50 HD.

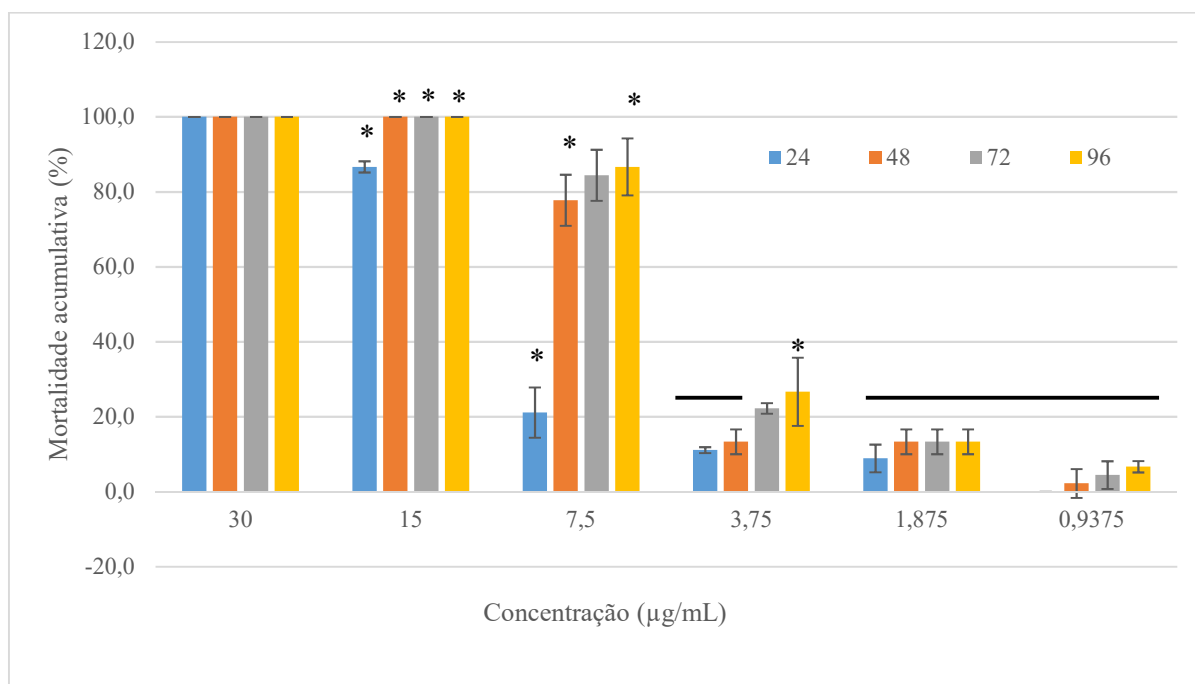
4.7 Análise estatística

Os resultados foram submetidos utilizando o programa Excel 2018 & Origin 70 para a obtenção dos valores de CL_{50} e representação de mortalidade (Probit). A análise dos dados de mortalidade e dos parâmetros de desenvolvimento sub-letal, seguiu-se da regressão linear a um nível de 5% de probabilidade utilizando o teste exato de Fisher $p<0,05$. O Teste T student foi utilizado para as análises sobre taxa de batimentos cardíacos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Taxa de mortalidade

Analisando o percentual de mortalidade de embriões de *D. rerio* expostos por até 96 horas ao composto RTR, observa-se que os dados apontam para a letalidade de 85 a 100% nas concentrações 15 e 30 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, em 24h (Figura 10). Na concentração de 7,5 $\mu\text{g/mL}$ evidencia-se a atividade concentração e tempo dependente quando comparados ao controle ($p < 0,05$). Quando analisamos a concentração 3,75 $\mu\text{g/mL}$, somente os tempos de 72 e 96h apresentam diferença estatística quando comparado aos controles ($p < 0,05$). Concentrações inferiores não apresentaram diferenças significativas.



*diferença estatística ($P < 0,05$) em relação ao controle, — sem diferença estatística

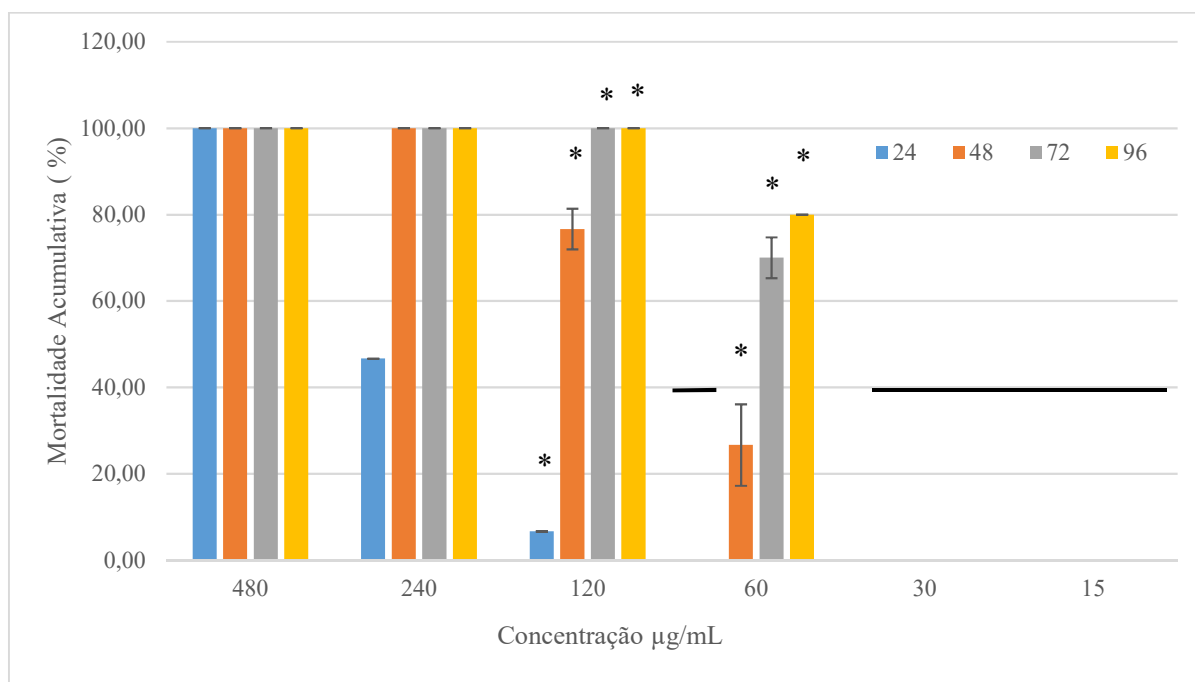
Figura 10 - Taxa de mortalidade dos embriões de *D. rerio* após exposição de 24 a 96h ao RTR.

Corroborando nossos achados, BRIDI et al. (2017), nas concentrações de 0,01 a 0,1 $\mu\text{g/mL}$ não observaram efeito quando comparados aos grupos expostos com RTR e GLY e o grupo controle, quanto a mortalidade de larva e adultos de *D. rerio*.

Soldado et al. (2016) mostraram que embriões de *D. rerio* expostos nas concentrações (2,5 a 50 $\mu\text{g/mL}$) completaram o estágio de mórula e gástrula, indicando que a exposição ao

RTR e ao Gly não tiveram efeito no início do desenvolvimento embrionário, sugerindo que a mortalidade tenha como causa os níveis aumentados de estresse oxidativo.

Os dados obtidos da exposição ao Gly apontam para letalidade de 100 % na concentração de 480 $\mu\text{g/mL}$ em 24h e de 240 $\mu\text{g/mL}$ a partir de 48h. Em 120 $\mu\text{g/mL}$ observou-se atividade concentração e tempo dependente com diferença estatística quando comparadas ao controle ($p < 0,05$) (Figura 11).



*diferença estatística ($P < 0,05$) em relação ao controle, — sem diferença estatística

Figura 11 - Taxa de mortalidade dos embriões de *D. rerio* após exposição de 24 a 96h ao Gly.

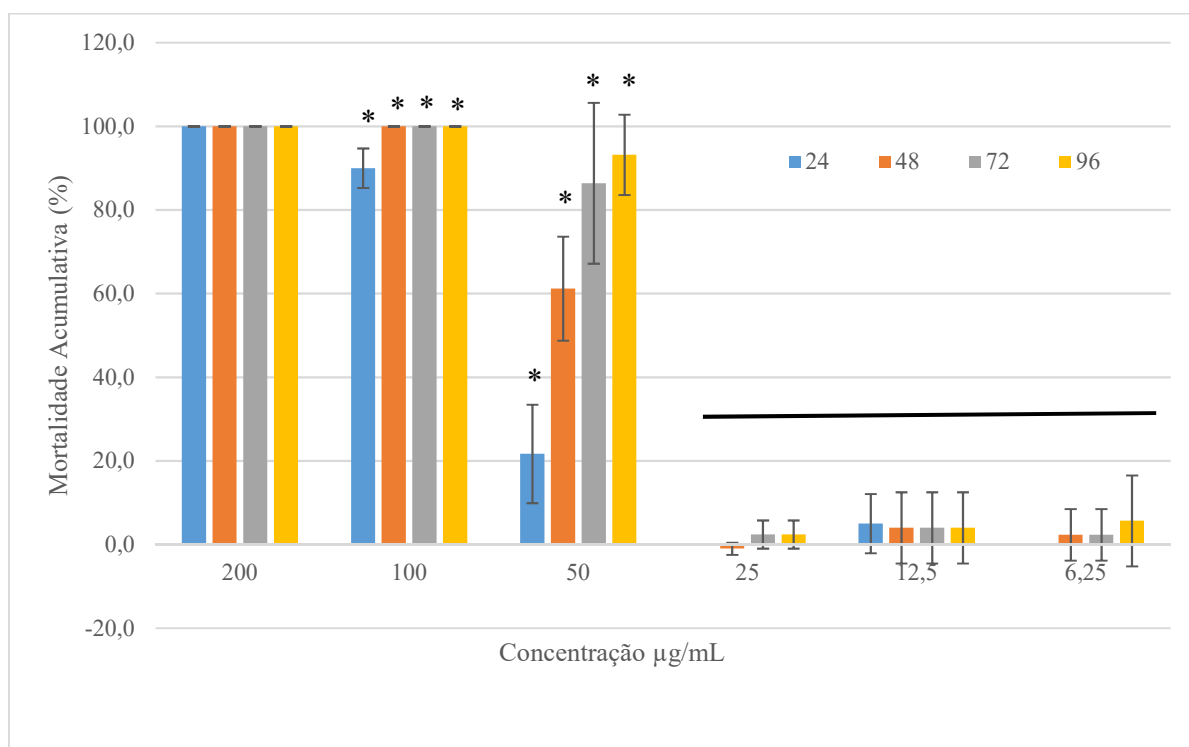
Vários autores têm demonstrado alta mortalidade nos estágios iniciais de vida dos peixes quando expostos aos HGLY, especialmente ao Gly (FIORINO, 2017). YUSOF et al. (2014) observaram que apenas 50% dos embriões de *Oryzias javanicus* expostos a 100 $\mu\text{g/mL}$ de Gly sobreviveram após 16 dias de exposição.

ZHANG et al. (2017) observaram mortalidade de embriões expostos a 600 $\mu\text{g/mL}$ após 6 horas pós fertilização, entretanto em concentrações de 100 a 400 $\mu\text{g/mL}$, não observaram atividade tempo-dependente a partir de 24h. Os dados de mortalidade na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ (cerca de 40%) aproxima-se do observado neste estudo (240 $\mu\text{g/mL}$ - $46,67 \pm 0,0$).

A concentração máxima permitida do CONAMA (2009) de Gly, para água doce é 65 $\mu\text{g/L}$, entretanto sem referência de tempo de exposição. Observamos em nosso estudo para a concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$, bem próximo ao relatado pelo CONAMA, diferença significativa

com 48 horas de exposição em relação aos controles. Apesar dos achados sobre toxicidade neste trabalho apontarem para o efeito não-tóxico em concentrações inferiores a 30 µg/mL em até 96h de exposição, o Gly apresenta efeito bio-cumulativo, podendo incorrer em danos ao ecossistema aquático pela exposição prolongada (WAND et al., 1994; WHO, 1994; SANDRINI et al., 2003). Em um estudo de ZHANG et al. (2017) demonstraram diferença significativa somente nas concentrações superiores a 100 µg/mL de Gly.

A análise da média percentual de mortalidade pela exposição ao POEA aponta para letalidade de 100% em concentrações superiores a 200 µg/mL, e para 100 µg/mL para todos os tempos exceto 24h de experimentação, mas ainda assim a mortalidade ultrapassa 93% (Figura 12).



*diferença estatística ($P < 0,05$) em relação ao controle, — sem diferença estatística

Figura 12 - Taxa de mortalidade dos embriões de *D. rerio* após exposição de 24 a 96h ao POEA.

Na concentração de 50 µg/mL observa-se o efeito tempo-dependente do composto sobre os embriões, com diferenças significativas quando comparadas ao controle ($p < 0,05$). Quando comparamos as concentrações superiores, principalmente no tempo de 24 h, podemos inferir uma atividade também concentração-dependente. As concentrações inferiores às 25 µg/mL, apresentaram efeito sub-letal na faixa de 2,4 a 5,6 %, entretanto não havendo diferença

estatística significativa nos períodos de 24 a 96h de exposição ($p > 0,05$) em relação aos controles.

Não há referencial teórico acerca de concentrações ou dosagens para POEA e formulações comerciais. Mesmo o RTR tendo ampla utilização e dispersão comercial, suas especificações são ausentes mesmo na Resolução nº 357 do CONAMA. Esses achados só reforçam a necessidade de atualização das legislações envolvidas, Organização Mundial da Saúde (OMS), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), entre outros, pela regularização e controle dos agrotóxicos, por uma fiscalização mais incisiva quanto a sua liberação e desse modo, permissão de níveis de concentrações mais seguras (SOUZA-FILHO, 2011).

Inúmeros autores têm sugerido que a toxicidade do RTR pode ser derivada do efeito sinérgico entre o Gly e outros produtos da formulação, como os surfactantes que aumentam a penetração do Gly através da cutícula da planta (CUHRA et al., 2013). JANSSENS e STOKS (2017) relataram em estudo feito com *Coenagrion pulchellum* expostos ao Gly e RTR na concentração de 2 µg/mL, redução na taxa de crescimento larval e menor desenvolvimento muscular apenas nos expostos ao RTR; o que poderia indicar que a redução se relaciona com a presença do surfactante POEA na formulação comercial. Esses resultados indicaram consistentemente a maior toxicidade do RTR quando comparado ao Gly, sobre a taxa de sobrevivência, comportamento e na maioria das características fisiológicas desses animais.

Esses achados corroboram os dados de mortalidade deste estudo, onde a embriotoxicidade do RTR foi maior que dos compostos (Gly e POEA), separadamente.

5.2 Concentração Média Letal - CL₅₀

Os dados obtidos pelo cálculo da CL₅₀ para os compostos testados demonstram maior toxicidade do RTR quando comparado aos demais, cerca de 44,6 vezes maior que o Gly e 6 vezes maior que POEA (Tabela 5).

A CL₅₀ 24,48,72 e 96h para RTR foi de: $7,8 \pm 0,51$ - limite superior: 9,58 e inferior: 6,41; $13,7 \pm 0,38$ - limite superior: 20,46 e inferior: 9,16; $4,3 \pm 0,68$ - limite superior: 5,35 e inferior: 3,41; $3,9 \pm 0,28$ - limite superior: 4,83 e inferior: 3,10, respectivamente.

A CL_{50} 24,48,72 e 96h para Gly resultou em valores de: $347,8 \pm 1,20$; limite superior: 391,5 e inferior: 308,9; $110,5 \pm 1,31$; limite superior: 120,9 e inferior: 100,9; $66,2 \pm 2,25$; limite superior: 71,2 e inferior: 61,6; $61,9 \pm 0,28$; limite superior: 66,3 e inferior: 57,7, respectivamente.

A CL_{50} 24,48,72 e 96h respectivamente para POEA: $46,7 \pm 1,28$ - limite superior: 52,7 e inferior: 41,3; $39,7 \pm 0,48$ - limite superior: 51,8 e inferior: 30,3; $27,7 \pm 0,23$ - limite superior: 33,8 e inferior: 22,6; $43,9 \pm 0,27$ - limite superior: 65,6 e inferior: 29,4, respectivamente.

Os dados obtidos neste estudo de CL_{50} , assim como sugerido por CUHRA et al., (2013) e JANSSENS e STOKS (2017), sugere possível efeito sinérgico entre o Gly e POEA.

Tabela 5 - CL_{50} do RTR, Gly e POEA para embriões do *D. rerio*.

Composto s ($\mu\text{g/mL}$)	Tempo de exposição (h)			
	24	48	72	96
RTR	$7,8 \pm 0,51$	$13,7 \pm 0,38$	$4,3 \pm 0,68$	$3,9 \pm 0,28$
GLY	$347,8 \pm 1,2$	$110,5 \pm 1,3$	$66,2 \pm 2,2$	$61,9 \pm 2,3$
	0	1	5	8
POEA			$27,7 \pm 0,2$	$43,9 \pm 0,2$
	$46,7 \pm 1,28$	$39,7 \pm 0,48$	3	7

Concentração ($\mu\text{g/mL}$) – Resultados obtidos utilizando o programa Excel 2018 & Origin 7.0

A regressão logística binária Probit, utilizadas para a estimativa dos valores de CL_{50} segundo COLOSIMO (2018), pode ser observada nas figuras 12 e 13.

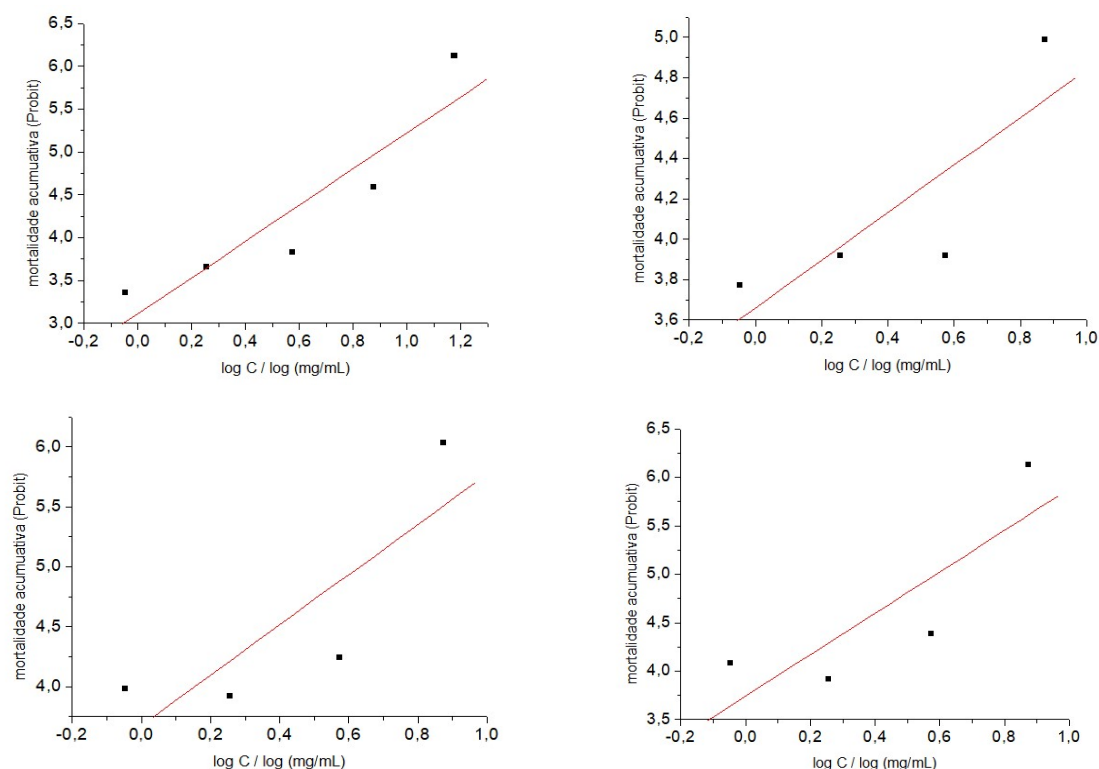


Figura 13 - Representação da Mortalidade (Probit) da exposição de *D. rerio* à seis concentrações de RTR e controle, em função do log da concentração nos ensaios em triplicata, por 24h (a), 48h (b), 72h (c) e 96h (d).

Há uma correlação muito expressiva encontrada em nosso estudo do tempo de exposição do composto RTR com a taxa de mortalidade. Verificou-se que o valor de R^2 para CL_{50} com 72h de exposição era (0,83219). SOUZA-FILHO (2011), encontrou valores para R^2 de (0,7719), sugerindo que quanto maior o tempo de exposição ao herbicida RTR, menor o valor da CL_{50} . Os resultados encontrados em nosso estudo corroboram a encontrada pelo autor.

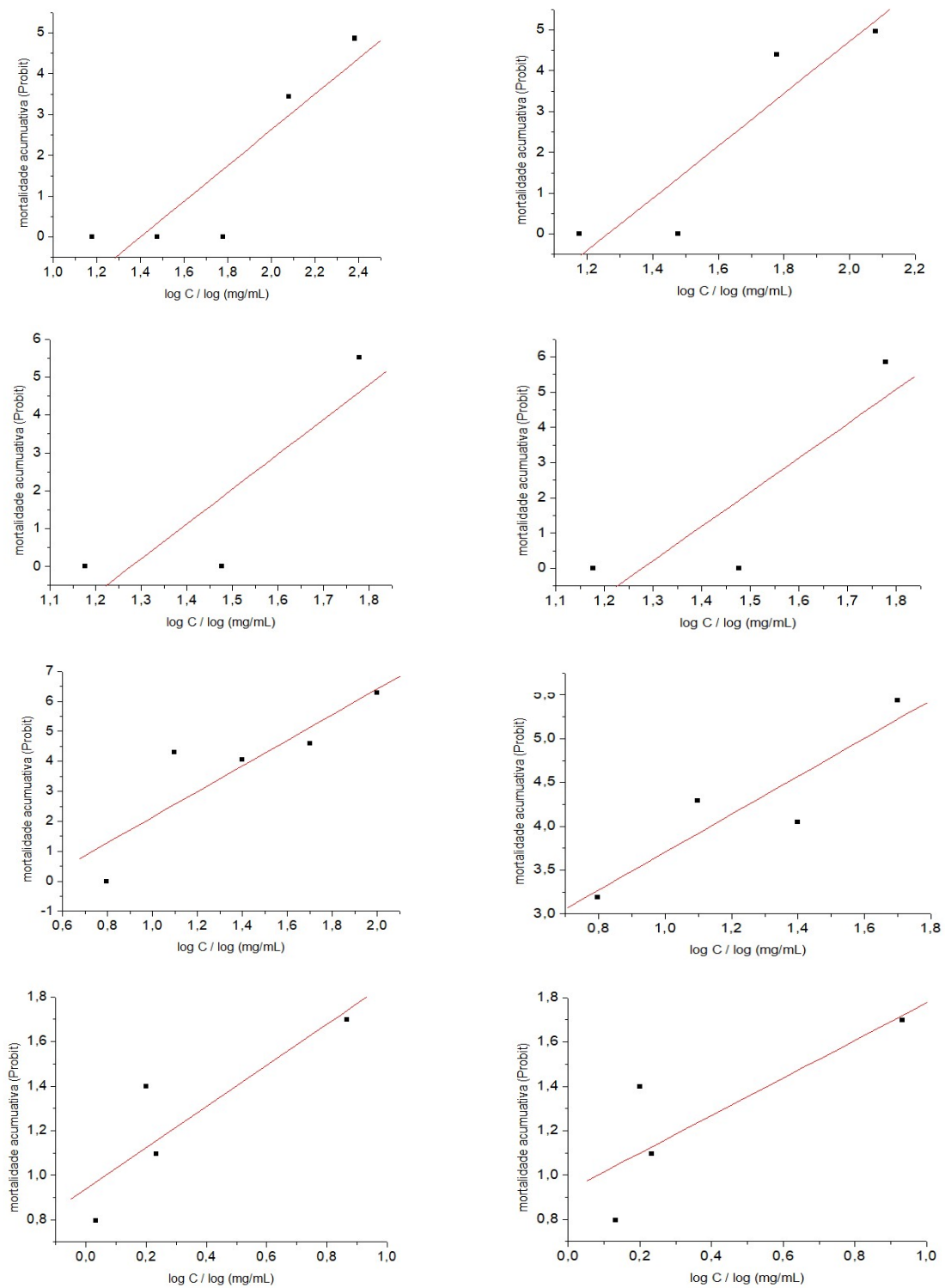


Figura 14 - Representação da Mortalidade (Probit) da exposição de *D. rerio* à seis concentrações de GLY e POEA e controle, respectivamente, em função do log da concentração nos ensaios em triplicata, GLY 24h (A), GLY 48h (B), GLY 72h (C), GLY 96h (D), POEA 24h (E), POEA 48h (F), POEA 72h (G), POEA 96h (H).

5.3 Avaliação da embriotoxicidade e teratogenia do RTR, do Gly e do POEA sobre *D. rerio*

As alterações embrionárias em *D. rerio* foram observadas durante o estudo e classificadas de acordo com DIN 38415-T6 (DIN, 2001) e ISO 15088 (ISO, 2007). Dentre as analisadas, podemos ressaltar os “parâmetros de desenvolvimento sub-letal,” a formação do olho, edema de pericárdio e taxa de batimentos cardíacos; como indicadores de alterações observadas nas concentrações sub-letais dos compostos.

Para todos os compostos foi possível observar alterações na formação dos olhos e presença de edema de pericárdio, nas concentrações eleitas como sub-letais; 3,75, 30,0 e 25,0 µg/mL, para RTR, Gly e POEA respectivamente, em período de até 96h (Tabela 6).

Na concentração de 3,75 µg/mL de RTR todos os tempos houve diferença significativa quando comparado aos controles ($p < 0,05$), com valores de 75,56 a 64,44 %. O Gly apresentou diferença estatística somente nos tempos de 24 e 96h, e o POEA em todos os tempos, sem significância quando comparados aos controles. O edema de pericárdio observado na exposição sub-letal de RTR e POEA apresentou uma queda nos valores percentuais diretamente proporcional ao aumento do tempo de exposição, entretanto comportamento oposto foi observado na exposição ao Gly (Tabela 6).

Embriões de *Odontesthes humensis* expostos ao RTR (0,36-5,43 µg/mL/96h) apresentaram alterações no tamanho do olho e redução de medidas na distância entre os olhos, demonstrando claramente que a exposição ao RTR mesmo em baixas concentrações é tóxica para o ambiente aquático (ZEBRAL et al., 2017). Neste estudo, RTR demonstrou possuir um parâmetro morfológico dependente da concentração apresentando um valor de $p < 0,001$. Os autores observaram também mortalidade embrionária em 48, 72 e 96 e 246 h com uma interação significativa entre tempo de exposição e taxa de mortalidade embrionária. A porcentagem de mortalidade embrionária no controle e nos grupos experimentais diminuíram com o tempo de exposição, exceto em embriões expostos a 5,43 mg/L, onde não foram observadas diferenças significativas entre 48 e 72 h de exposição ao RTR (ZEBRAL et al., 2017).

Tabela 6 - Parâmetros de desenvolvimento sub-letal para embriões do *D. rerio* expostos de 24 a 96 h.

Parâmetros de desenvolvimento Sub-letal	Composto	Tempo de exposição	Concentração	%
Formação do olho	RTR	24	3,75	75,56±8,87*
	Gly		30	93,33±10,33*
	POEA		25	58,33±9,62
	RTR	48	3,75	70,00±0,0*
	Gly		30	76,67±2,45
	POEA		25	58,33±9,62
	RTR	72	3,75	64,44±7,43*
	Gly		30	75,56±2,41
	POEA		25	57,47±10,62
	RTR	96	3,75	66,67±8,0*
	Gly		30	58,8±1,44*
	POEA		25	57,47±10,62
Edema de pericárdio	RTR	24	3,75	28,89±3,44*
	Gly		30	0,0±0,0
	POEA		25	23,33±3,85*
	RTR	48	3,75	20,00±5,96*
	Gly		30	2,22±3,44
	POEA		25	10,00±3,85*
	RTR	72	3,75	4,44±3,44
	Gly		30	6,67±0,1*
	POEA		25	13,33±0,0
	RTR	96	3,75	2,22±3,44
	Gly		30	13,33±0,0*
	POEA		25	13,33±0,0*

*diferença estatística ($P < 0,05$) em relação ao controle

FIORINO (2018) verificou malformações como edema de pericárdio, saco vitelino, hematoma e nenhuma alteração foi observada em embriões de *D. rerio* expostos ao Gly a 5 µg/mL por 48 horas. O surgimento da presença significativa de edema em *D. rerio*, mesmo em concentrações sub-letais pode estar ligada ao tempo de exposição e a bioacumulação deste nos tecidos.

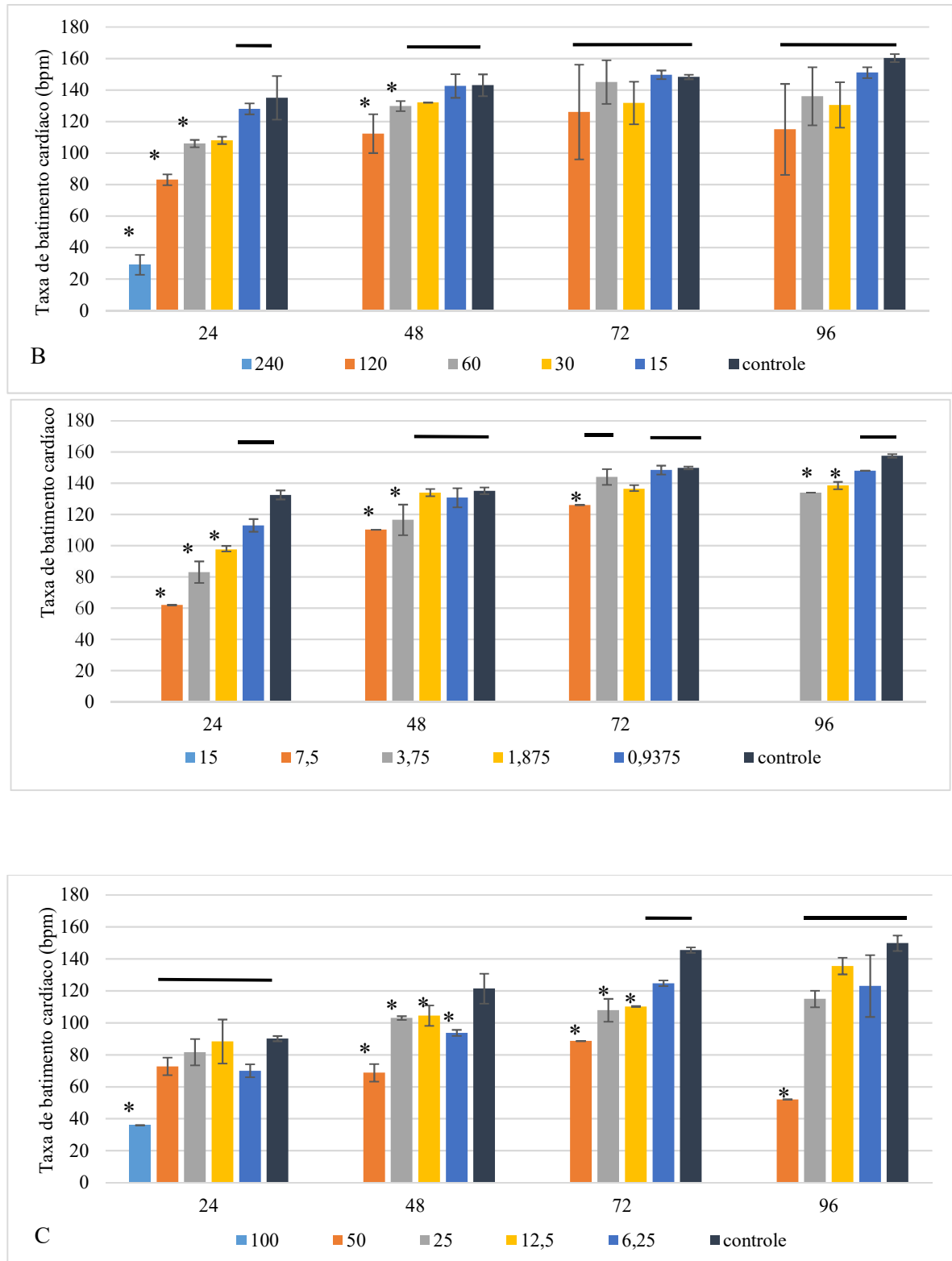
Em estudo feito por BONFANTI (2017), comparando o HGLY, Roundup Power® 2.0 com Gly usando embriões de rã, observou edema pronunciado nas concentrações de 50 µg/mL expostos ao Gly, enquanto o RTR Power® mostrou CL_{50 96h} de 24,78 µg/mL. As malformações observadas com RTR Power foram: alterações crânio faciais, microftalmia, olhos estreitos observados por análise histopatológica. Essas alterações segundo o autor, só podem estar

relacionadas ao surfactante POEA que tem característica embrioletal com $CL_{50/96h}$ de 9,3 $\mu\text{g/mL}$. Nossos achados também foram diferentes do autor, porém o POEA apresentou $CL_{50/96h}$ de 43,9 $\mu\text{g/mL}$.

Existem poucos dados sobre toxicidade cardiovascular ao Gly em estágios de desenvolvimento. Foram somente descritas malformações como cauda, gônadas e desenvolvimento cerebral alteradas (HOW et al., 2004; PAGANELLI, 2010 *apud* ROY, 2016).

A análise da taxa de batimentos cardíacos (bpm) evidenciou que a embriotoxicidade é observada através deste parâmetro para os compostos expostos neste estudo (Figura 14). A exposição ao RTR apresentou diminuição dos bpm nos tempos de 24 e 48 h para as concentrações de 7,5 e 3,75 $\mu\text{g/mL}$. No tempo de 96h as concentrações de 3,75 e 1,875 $\mu\text{g/mL}$, foram igualmente significativas ($p < 0,05$). O Gly apresentou efeito sobre os bpm com diferença estatística quando comparada ao controle ($p < 0,05$) somente nos tempos de 24 e 48h, de modo mais evidente nas concentrações de 120 e 60 $\mu\text{g/mL}$. O POEA, diferentemente do Gly, apresentou alteração no bpm nos tempos de 48 e 72 h para as concentrações de 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$.

Os dados sobre a toxicidade cardiovascular em resposta à exposição ao Gly, são limitados especialmente durante o desenvolvimento embrionário. Alterações induzida por Gly na cauda, desenvolvimento de gônadas e cérebro foram descritas (HOWE et al., 2004; PAGANELLI et al., 2010), mas há pouco na literatura investigando os efeitos cardíacos. Um estudo concluído sobre o desenvolvimento de girinos de rã-touro, enquanto exposto ao Roundup[®], demonstrou geração de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo. Eles também concluíram que o Roundup[®] induziu taquicardia muito provavelmente devido à atividade adrenérgica induzida pelo estresse oxidativo (COSTA et al., 2008).



*diferença estatística ($P < 0,05$) em relação ao controle, — sem diferença estatística

Figura 15 - Taxa de batimentos cardíacos (bpm) dos embriões de *D. rerio* após exposição de 24 a 96h a RTR (A), Gly (B) e POEA (C).

Neste estudo não encontramos uma resposta taquicárdica e sim uma diminuição da taxa de batimentos cardíacos. Segundo BORTAGARAY et al. (2010) e ROY et al. (2016) o tratamento com 50 µg/mL de Gly resultou na diminuição da frequência cardíaca em 48h. Foram observadas anormalidades estruturais no átrio e no ventrículo, irregularidade cardíaca, situs inversus, além da diminuição da frequência cardíaca em 48h. Os resultados destes estudos corroboram com nossos achados na concentração de 60 µg/mL, e explicaria a atividade em concentração maior de 120 µg/mL.

Nossos experimentos, assim como o de ROY et al. (2016), utilizaram embriões logo no início da gastrulação ao longo da embriogênese, enquanto COSTA et al. (2008) trataram rãs pós-embrionárias no estágio de girinos. Um estudo recente que investigou os efeitos do Gly nos estágios iniciais da vida de Java medaka demonstrou alterações morfológicas na cauda, abdome, nadadeira e cabeça, bem como alterações na frequência cardíaca (YUSOF et al., 2014). Estes mesmos autores atribuem o aumento da frequência cardíaca ao estresse, as flutuações na taxa de batimentos cardíacos à adaptação ao meio ambiente e o abrandamento da frequência cardíaca à ruptura celular na parede do coração, levando a menos bombeamento.

Enquanto uma exposição mais longa a uma concentração mais baixa causou o aumento inicial da taxa de batimentos cardíacos, uma exposição aguda mais curta com uma concentração mais alta causou uma diminuição na taxa de batimentos cardíacos (ROY et al., 2016). Nos dados sobre a atividade/toxidade de POEA sobre *D. rerio*, assim como o desenvolvimento cardiovascular e taxa de batimentos cardíacos e outra qualquer espécie é possível que os resultados obtidos quanto a taxa de batimentos cardíacos de embriões e larvas de *D. rerio*, com RTR sejam o resultado sinérgico de Gly e POEA, como sugerido para a mortalidade.

Quando analisamos os dados de presença de edema pericárdico e alteração de taxa de batimentos cardíacos pela exposição ao Gly; o edema de pericárdio ocorre em concentração (30 µg/mL) sub-letal anterior a alteração da frequência. O mecanismo de ação do composto sobre o sistema cardiovascular pode incitar-se com alterações morfológicas que resultarão em efeitos fisiológicos.

5.4 Alterações morfológicas de embriões de *D. rerio* expostos ao RTR, Gly e POEA por período de 24 a 96h

Após 24 h de tratamento ao Gly, observou-se embriões coagulados na concentração de 240 µg/mL. Para as concentrações sub letais de 0, 781 µg/mL de RTR e 50 µg/mL de POEA

foram observados evidentes edemas de pericárdio (Figura 15).

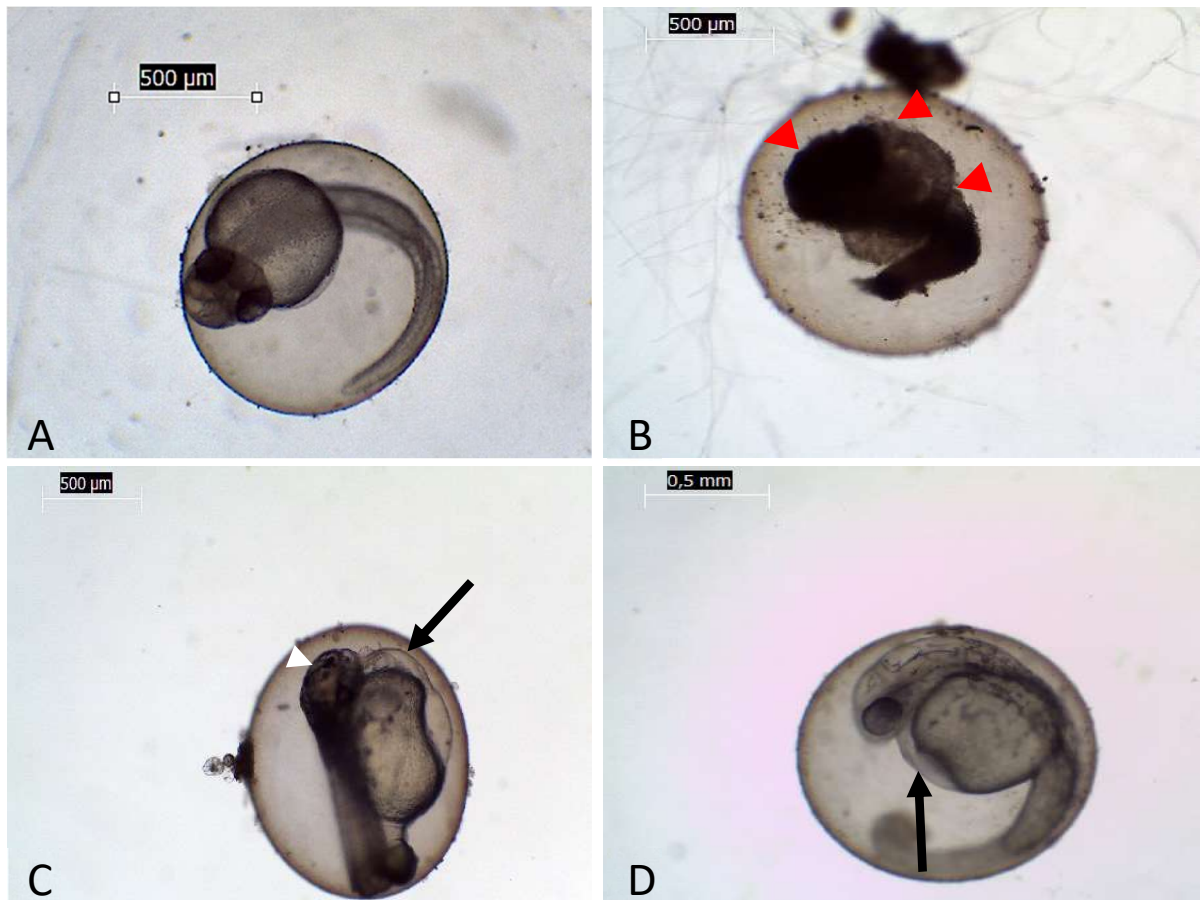


Figura 16 - Embriões de *D. rerio* expostos por 24 h com POEA, Gly, RTR, Controle (A), Gly 240 µg/mL (B), RTR 0,781 µg/mL (C) e POEA 50 µg/mL (D). Cabeça de seta vermelha: embrião coagulado; cabeça de seta branca: malformação de cabeça; Seta preta: edema de pericárdio.

No tratamento de 48h, em 0,781 µg/mL de POEA, observamos edema de pericárdio; na concentração de 0,396 µg/mL de RTR eram frequentes malformações (curvatura espinhal) e na

concentração 120 $\mu\text{g/mL}$ de Gly embrião coagulados (Figura 16).

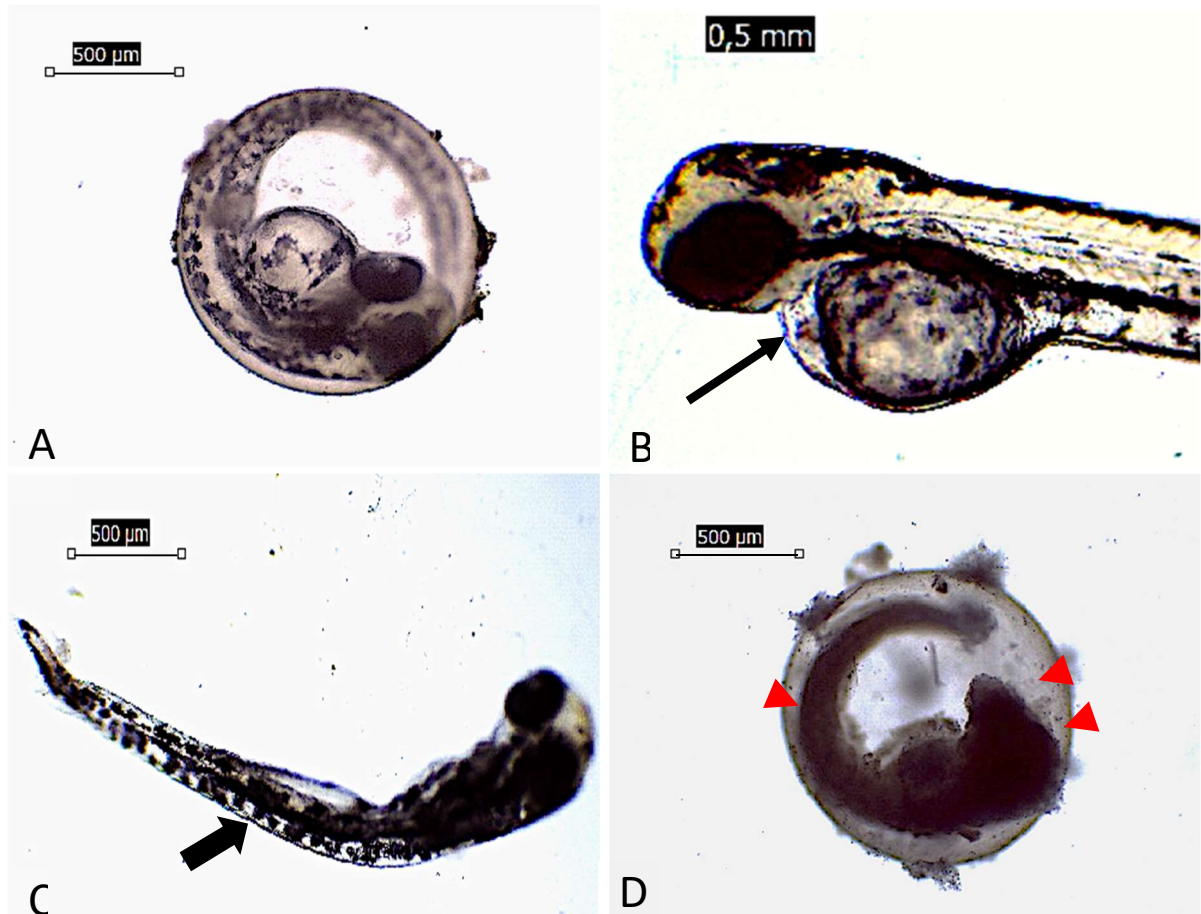


Figura 17 - Embriões de *D. rerio* expostos por 48 h com POEA, Gly, RTR, Controle (A), POEA 0,781 $\mu\text{g/mL}$ (B), RTR 0,396 $\mu\text{g/mL}$ (C) e Gly 120 $\mu\text{g/mL}$ (D). Cabeça de seta vermelha: embrião coagula; cabeça de seta preta larga: curvatura espinhal; Seta preta: edema de pericárdio.

Compostos como organofosforados e o Gly podem induzir alterações nos organismos (YANG et al., 2011; FARIA et al., 2015; ZHANG et al., 2017), demonstraram que concentrações superiores a 100 $\mu\text{g/mL}$ levam ao atraso do desenvolvimento do *D. rerio* a partir de três hpf, e principalmente morte embrionária em 24 hpf; apontando que o Gly em concentrações mais elevadas pode afetar o desenvolvimento inicial do *D. rerio*.

SULUKAN (2017) relatou edema de pericárdio e curvatura espinhal em *D. rerio* em concentrações de Gly 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$. É possível, segundo FIORINO (2018), em concentrações menores (0,005 $\mu\text{g/mL}$) encontrar Gly no ambiente que levem a alterações em *C. comum* e *D. rerio*, reduzindo assim a biodiversidade. Este mesmo autor também observou uma tolerância menor de sensibilidade ao Gly do *D. rerio* comparado a *C. comum*. Acredita-se que essa observação seja característica natural das espécies.

Embriões de *O. humensis* expostos ao RTR (0,36-5,43 $\mu\text{g/mL}$ 96h) apresentaram alterações no tamanho do olho e redução de medidas na distância entre os olhos, demonstrando claramente que a exposição ao RTR, mesmo em baixas concentrações, é tóxica para o ambiente aquático (ZEBRAL et al., 2017).

Estudo com embriões expostos ao Gly puro por 48 hpf com concentração inicial de 50 $\mu\text{g/mL}$, apresentaram toxicidade cardiovascular com aproximadamente 20% de alterações fenotípicas normal. Enquanto 40% demonstraram átrios e ventrículos anormais e pequenos, juntamente com uma perda de *heart looping* angular, embriões expostos demonstraram também uma perda dos átrios em 27% dos embriões e nos casos mais graves diminuiu o tamanho dos átrios e ventrículo reduzindo seu tamanho quando comparadas aos embriões controles com átrios e ventrículos grandes e normais como também redução na taxa de batimentos cardíacos (ROY et al., 2016).

Na exposição com 72 h ao RTR as alterações foram mais frequentes na concentração de 0,781 $\mu\text{g/mL}$, assim como para Gly 3,75 $\mu\text{g/mL}$, foi a curvatura espinhal e edema de pericárdio (Figura 18).

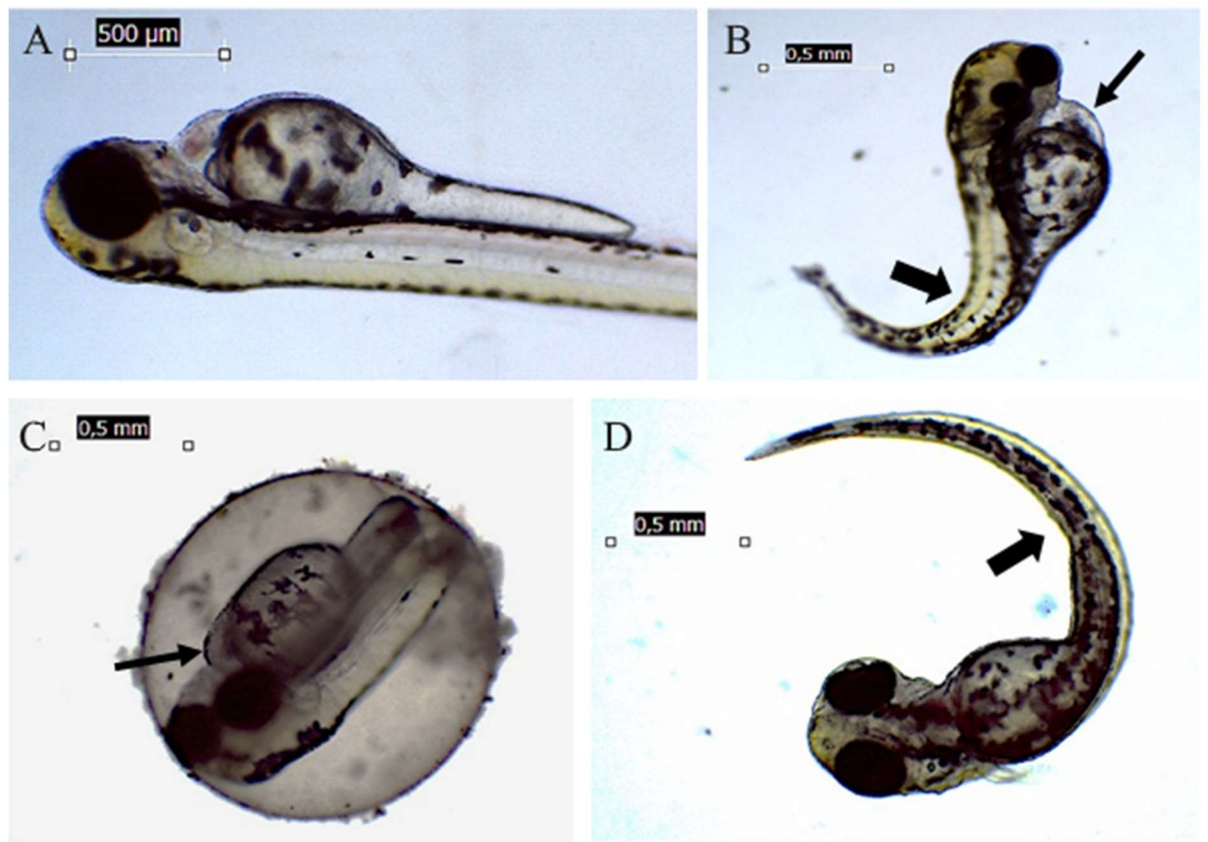


Figura 18 - Embriões de *D. rerio* expostos por 72 h com POEA, Gly e RTR. Controle (A), RTR 0,781 $\mu\text{g/mL}$ (B), RTR 50 $\mu\text{g/mL}$ (C) e Gly 3,75 $\mu\text{g/mL}$ (D). Seta preta fina: edema de pericárdio; seta preta larga: curvatura espinhal.

WEBSTER et al. (2014) demonstraram que a exposição a 10 µg/mL de Gly leva a fertilidade reduzida em *D. rerio*. PAGANELLI et al. (2010) mostraram que HGLY (1,35 e 2,03 mg/L) prejudicam a sinalização do ácido retinóico, levando a deformidades craniofaciais dos embriões de galinha e *Xenopus laevis*. Da mesma forma, já demonstraram que a exposição ao HGLY (3,07 e 7,50 mg/L) induz à disfunção craniofacial, alterações nos girinos de *Scinax nasicus* (LAJMANOVICH et al., 2003) e em embriões do peixe *O. humensis* (0,36 e 5,43 mg a.a./L) (ZEBRAL et al., 2017).

A exposição por 48 e 72h pelo RTR (0,36 a 5,43 µg/mL) de embriões de *O. humensis*, não foram observadas pigmentação significativa, considerando que os embriões se encontravam em estágio embrionário de nêurula em todas as concentrações; as alterações na formação somitos e no atraso de desenvolvimento embrionário, foram mais evidentes após 96h de tratamento. A elevação de taxas de mortalidade embrionária foi observada após tratamento nas concentrações de 5,43 µg/mL RTR, evidenciando o potencial tóxico do RTR (ZEBRAL et al., 2017).

O desenvolvimento da notocorda não é afetado pelo Gly de 10 e 100 µg/mL. A pequena expressão de *ntl* (um dos genes importantes que são necessários para a formação precoce da notocorda – (ODENTHAL et al., 1996) sugeriu apenas que o Gly em concentrações de 100 µg/mL causaram uma epibolia retardada. A expressão normal do *shh* na notocorda em embriões nas mesmas concentrações, estão de acordo com o comprimento do corpo em embriões, sugerindo que o Gly nestas concentrações não tem efeito sobre o comprimento do corpo (ZHANG et al., 2017).

Com 96h de tratamento, novamente observou-se para RTR alteração de curvatura espinhal e edema de pericárdio (0,781 µg/mL), além de edema e morte para Gly (60 µg/mL) e morte e retardo na eclosão para POEA (0,313 µg/mL) (Figura 18).

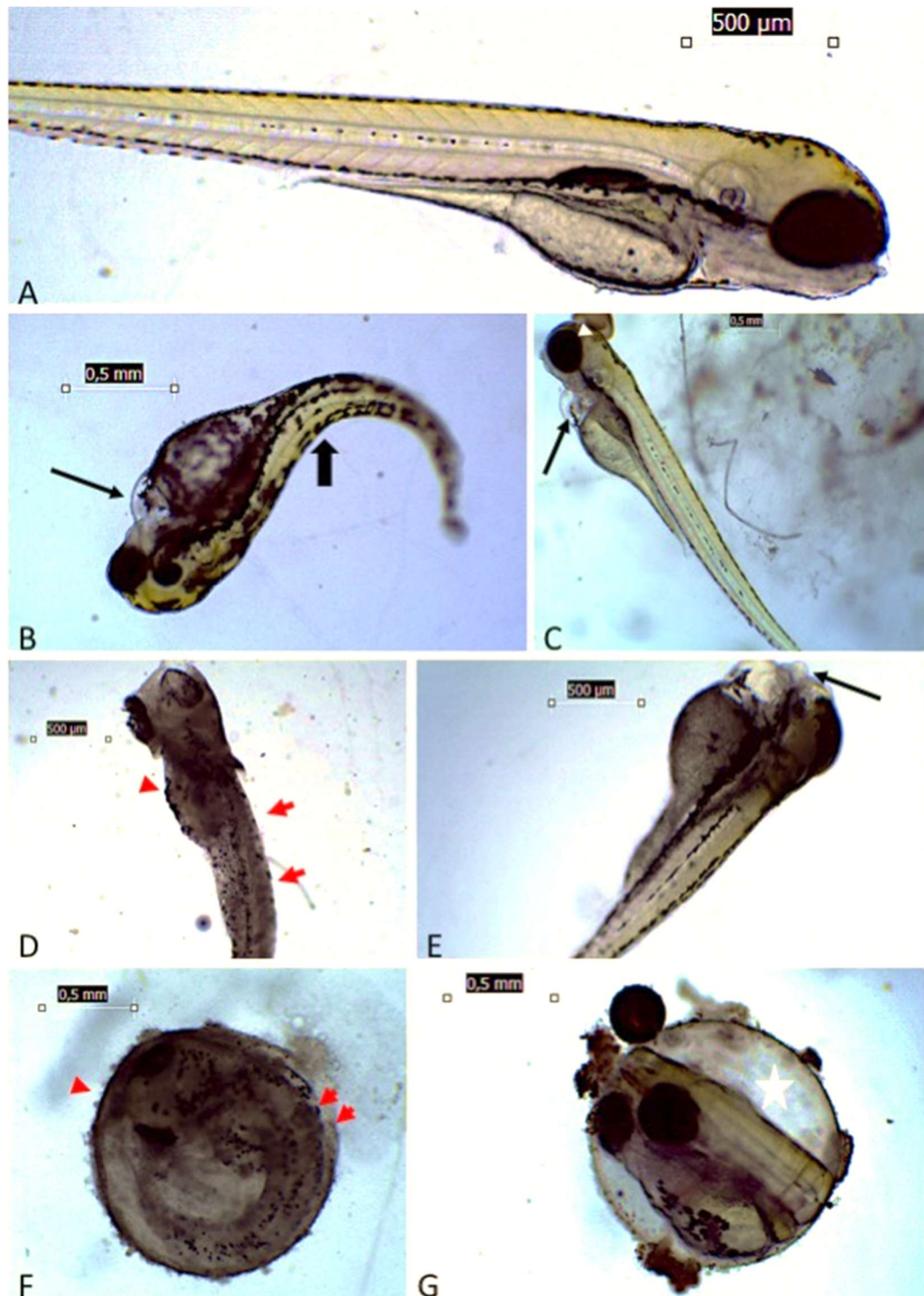


Figura 19 - Embriões de *D. rerio* expostos por 96 h com POEA, Gly e RTR. Controle (A), RTR 0,781 $\mu\text{g/mL}$ (B), Gly 60 $\mu\text{g/mL}$ (C), Gly 30 $\mu\text{g/mL}$ (D), RTR 0,391 $\mu\text{g/mL}$ (E), POEA 25 $\mu\text{g/mL}$ (F) e POEA 0,313 $\mu\text{g/mL}$ (G). Cabeça de seta vermelha: embrião coagulado; cabeça de seta preta larga: curvatura espinhal; Seta preta: edema de pericárdio; estrela branca: retardo na eclosão.

O Gly pode alterar o comportamento dos organismos e aumentar o movimento espontâneo. Com o aumento das concentrações de Gly, foram observados severos danos em motoneurônios primários que podem estar correlacionados com as alterações das atividades

locomotivas (ZHANG et al., 2017). É relatado que o aumento das taxas de eclosão pode ser causado pelo aumento da espontaneidade do movimento no estágio inicial (JIN et al., 2009).

BRIDI et al. (2017), avaliaram os efeitos da exposição ao Gly e ao RTR sobre parâmetros morfológicos e comportamentais do *D. rerio* durante as fases larval e adulta. Ao comparar a forma ativa isolada com a formulação comercial os resultados obtidos foram alterações comportamentais e locomotivas das larvas expostas à concentração 0,01 e 0,5 µg/mL. As alterações apresentaram-se diminuídas significativamente quando comparado ao grupo controle, assim como comprimento reduzido da larva em todas as concentrações.

Embriões de *D. rerio* expostos ao Gly (2,5, 5,5, 12, 25 e 50 µg/mL) completaram o estágio embrionário de mórula e gástrula (SOLDADO et al., 2016). A exposição ao Gly (1, 5, 10 e 100 µg/mL) inibiram a atividade da anidrases carbônicas (AC), causaram a produção de ROS especialmente as regiões branquiais, desencadeou a apoptose celular e causou vários tipos de malformações (SULUKAN et al., 2017). Estudos anteriores mostram que a atividade de CA inibida resultou em uma diminuição de extração de CO₂ e desenvolve uma acidose respiratória (GILMOUR et al., 2009). Esta pode ser uma das razões para a observação de ROS em regiões branquiais. É que a abundância de ROS desencadeia a apoptose celular (BAGCHI et al., 1995; TOPAL et al., 2014) resultando malformações embrionárias (ZHAO, REECE, 2005). SULUKAN et al. (2017) associaram às malformações do corpo de larvas de *D. rerio* com apoptose celular causada por ROS e inibição de CA, como resultado do tratamento com Gly.

Experimentos avaliando a reprodução por casais de *Austrolebias nigrofasciatus*, por 96 h demonstraram alterações significativas em exposição a 0,36 mg /L do herbicida, reduzindo o número de embriões fertilizados e elevação no diâmetro, sem mortalidade (ZEBRAL et al., 2018).

O presente estudo pretendeu fornecer dados sobre a atividade de RTR, Gly e POEA, sobre o desenvolvimento embrionário *D. rerio*, através da comparação das atividades dos compostos separadamente, permitindo analisar e inferir o possível efeito sinérgico da mistura de Gly e POEA, explicando assim a atividade de RTR. O reconhecimento da atividade e faixa toxicológica do Gly e POEA no desenvolvimento de *D. rerio* contribuirão para estudos a cerca do mecanismo de ação dos herbicidas.

CONCLUSÕES

- A atividade embriotóxica sobre *D. rerio*, dos compostos (RTR, Gly e POEA) demonstra algumas concentrações serem do tipo concentração e tempo dependente;
- O RTR foi o mais tóxico em relação ao Gly e POEA, mesmo em concentrações baixas como 0,937 µg/mL, apresentando CL_{50/24h} 44,6 vezes maior que o Gly e 6 vezes maior que POEA;
- O POEA é mais embriotóxico para *D. rerio* que o composto Gly;
- A exposição ao Gly apontam para letalidade até de 30 µg/mL no período de 24 a 96h. Apesar da não letalidade, a faixa de concentração a partir desta apresenta alteração sub-letais;
- A exposição ao POEA aponta para letalidade de 100% em concentrações superiores a 100 µg/mL;
- Todos os compostos levaram a alterações na formação dos olhos e presença de edema de pericárdio, nas concentrações eleitas como sub-letais; 3,75, 30 e 25 µg/mL, para respectivamente RTR, Gly e POEA, em período de até 96h;
- O edema de pericárdio observado na exposição sub-letal de RTR e POEA apresentou uma queda nos valores percentuais diretamente proporcional ao aumento do tempo de exposição, com maior intensidade nos períodos de 24 e 48h;
- A análise da taxa de batimentos cardíacos (bpm) evidenciou que a embriotoxicidade é observada através deste parâmetro para os compostos expostos neste estudo;
- A exposição ao RTR apresentou diminuição dos bpm nos tempos de 24 e 48 h para as concentrações de 7,5 e 3,75 µg/mL. No tempo de 96h as concentrações de 3,75 e 1,875 µg/mL, foram igualmente significativas.
- O Gly apresentou efeito sobre os bpms com diferença estatística quando comparada ao controle somente nos tempos de 24 e 48h, sendo mais evidente nas concentrações de 120 e 60 µg/mL.
- O POEA, diferentemente do Gly, apresentou alteração no bpm nos tempos de 48 e 72 h para as concentrações de 50, 25 e 12,5 µg/mL.
- As alterações morfológicas observadas foram edemas de pericárdio, curvatura espinhal, que com o avançar da exposição, em especial em concentrações sub-letais, se intensificaram; e surgindo associações como retardo de eclosão e morte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKINGBEMI, B.T. et al. *Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, p. 775-780, 2004.

AMARANTE JR et al. **Gly**: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quim. Nova*, Vol. 25, No. 4, 589-593, 2002.

ANTUNES, A. M. et al. *Gender-specific Histopathological response in guppies *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate or its metabolite aminomethylphosphonic acid*. *J. Appl. Toxicol.* 2017.

ANVISA. **Cartilha sobre agrotóxicos**. 2011. Disponível em: <file:///C:/Users/bia_d/OneDrive/%C3%81rea%20de%20Trabalho/mestrado%20ufg/artigos%20do%20projeto/Cartilha%20sobre%20Agrot%C3%B3xicos%20S%C3%A9rie%20Trilhas%20do%20Campo.pdf>. Acessado em: 10 abr. 2018.

ANVISA. **2º Seminário Mercado de Agrotóxicos e Regulação**. 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia>>. Acessado em: 29 abr. 2017.

BABIC, S. et al. *Embryotoxic and genotoxic effects of sewage effluents in zebrafish embryo using multiple endpoint testing*. *Water Research*, 2017.

BAER, K. N. **Glyphosate**. In: *Wexler, P. (Ed.), Encyclopedia of Toxicology. second ed. Elsevier Inc.*, New York, p. 455–456, 2005.

BAGCHI D. et al. *In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides*. *Toxicology*. 104 (1-3), p. 129-140, 1995.

BOGONI, J. A. et al. *Genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* (Twospot *Astyanax*) Exposed to the Waters of Engano River (Brazil) as Determined by Micronucleus Tests in Erythrocytes*. *Arch Environ Contam Toxicol*. 66, p. 441-449, 2014.

BONFANTI, P. et al. *A glyphosate micro-emulsion formulation displays teratogenicity in *Xenopus laevis**. *Aquatic Toxicology*. 195: 103-113, 2018.

BORTAGARAY, V. et al., 2010. *Embryotoxicity and teratogenesis in zebrafish embryos exposed in vitro to glyphosate-type herbicides*. J. Dev. Toxic. 2010.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A química dos agrotóxicos. **Revista Química Nova na Escola**. Vol. 34, N° 1, p. 10-15, fevereiro 2012. Disponível em: <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc34_1/03-QS-02-11.pdf>. Acessado em: 10 set. 2017.

BRIDI, D. et al. *Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish*. *Toxicology*. 1 (392), p. 32-39, 2017.

BRIGGS, J. P. *The zebrafish: a new model organismo for integrative physiology*. *American Journal Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative*, Bethesda, v.282, n.1, p. 3-9, Apr. 2002.

CARNEIRO, F. F. et al. **Dossiê ABRASCO**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro (RJ): Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, p. 628, 2015.

CARVAN, M. J.; HEIDEN, T. K.; TOMASIEWICZ, H. *The utility of zebrafish as a model for toxicological research*. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. 6, p. 3-4, 2005.

CATTANI, D., de CAVALLI, L. O.; V.L., H.R., C.E., DOMINGUES, J.T., DAL-CIM, T., 2014. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity. *Toxicology* **320**, 34e45.

COLOSIMO, E. A. **Análise de dados categóricos**: modelo de regressão logística. Departamento de estatística. UFMG. 2018. Disponível em: <http://www.est.ufmg.br/~enricoc/pdf/categoricos/aula_logistica.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2018.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Ministério do Meio Ambiente. **RESOLUÇÃO Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005 Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005** p. 58-63. Alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2018.

CONTARDO J. V, KLINGELMANN E., WIEGAND C. *Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup ultra in Lumbriculus variegatus and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes*. *Environ. Pollut.* 157 (1), p. 57-63, 2009.

COSTA, M. J. et al. *Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to roundup original*. **Ecotoxicology**. 17 (3), p. 153-163, 2008.

CUHRA, M.; BOHN, T.; CUHRA, P. *Glyphosate: Too Much of a Good Thing?* **Front. Environ. Sci.** 4, p. 28, 2016.

DAMMSKI, A. P.; MULLER, B. R.; GAYA, C. **Zebrafish - Manual de Criação em Biotério**. 1 ed. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

DEFARGE, N.; SPIROUX de VENDOMOIS, J.; SERALINIA, G. E. *Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides*. *Toxicology Reports*, 5 p. 156–163, 2018.

DICK, R. E.; QUINN, J. P. *Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 43:545-550, 1995.

DIN. *German standard methods for the examination of water, waste water and sludge—Subanimal testing (group T) —Part 6: Toxicity to fish. Determination of the Non-acute-Poisonous Effect of Waste Water to Fish Eggs by Dilution Limits (T 6)*. DIN 38415-6. German Standardization Organization. 2001.

DOS SANTOS, A. P. R. et al. *A glyphosate-based herbicide induces histomorphological and protein expression changes in the liver of the female guppy *Poecilia reticulata**. *Chemosphere*. 168, p. 933-943, 2017.

FARIA, M. et al. *Zebrafish models for human acute organophosphorus poisoning*. *Sci. Rep.* 5, 15591, 2015.

FIORINO, E. et al. *Effects of glyphosate on early life stages: comparison between *Cyprinus carpio* and *Danio rerio**. *Environ Sci Pollut Res Int*. 25(9), p. 8542-8549, 2018.

GALLEGOS, C. E. et al. *Exposure to a glyphosate-based herbicide during pregnancy and lactation induces neurobehavioral alterations in rat offspring*. *Neurotoxicology* 53, p. 20–28, 2016.

GIESY J. P.; DOBSON S.; SOLOMON, K. R. *Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide*. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.** 167, p. 35–120, 2000.

GILMOUR, K. M. et al. *Carbonic anhydrase expression 421 and CO₂ excretion during early*

development in zebrafish *Danio rerio*. **J. Exp. Biol.** 212, 422, p. 3837-3845, 2009.

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

GLUSCZAK L. et al. *Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (Rhamdia quelen)*. **Comp. Biochem. Physiol.** 146C, p. 519–524, 2007.

GOLSBOROUGH L. G., BROWN D. S. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and sediments of boreal forest ponds. *Environmental toxicology and chemistry*. Vol 12, p. 1139-1147, 1993.

GOULART R. T.; BOYLE M. M. S. *Cytotoxicity of the association of pesticides Roundup TransorbÒ and Furadan 350 SCÒ on the zebrafish cell line, ZF-L*. T.L.S. **Toxicology in Vitro** 29, p. 1377-1384, 2015.

GROSELL, M.; WOOD, C. M., **Copper uptake across rainbow trout gills mechanisms of apical entry**. *Journal of Experimental Biology* 205, 1179-1188, 2002.

GRUNWALD, D. J.; EISEN, J. S. *Headwaters of the zebrafish— emergence of a new model vertebrate*. **Nature Reviews Genetics**. 3, p. 717-724, 2002.

GUILHERME, S.; I. GAIVAO, M. A. SANTOS; M. PACHECO. *DNA damage in fish (Anguilla anguilla) exposed to a glyphosate-based herbicide elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress*. **Mutation. Res. - Gen. Toxicol. Environ. Mutagen** 743, p. 1-9, 2012.

GUILHERME, S. et al. **Differential genotoxicity of Roundup formulation and its constituents in blood cells of fish (Anguilla anguilla): considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms**. *Ecotoxicology* 21, p. 1381–1390, 2012.

GUYTON, K .Z. D. et al. **Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate**. *Lancet Oncol.* 16 (5), p. 490–491, 2017.

HANKE I. et al. **Relevance of urban glyphosate use for surface water quality**. *Chemosphere* 81, p. 422-429, 2010.

HARAYASHIKI C. A. Y. et al. *Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy Poecilia vivipara acclimated to fresh water. Aquatic Toxicology.* p. 176–184, 2013.

HOWE, C.M. et al. *Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. Environ. Toxicol. Chem.* 23 (8), p. 1928–1938, 2004.

HOWE, K. et al. *The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature.* 496 (7446), p. 498–503, 2013.

HUED A. C.; OBERHOFER S.; BISTONI M. D. *Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup®) alters normal gill and liver histology and affects male sexual activity of Jenynsia multidentata (Anablepidae, Cyprinodontiformes). Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 62 (1), p. 107-117, 2012.

HUSZNO, J.; KLAG, J. *The reproductive cycle in the male gonads of Danio rerio (Teleostei, Cyprinidae). Stereological analysis. Micron.* 43, p. 666-672, 2012.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE:** Estatística da Produção Agrícola - Setembro de 2015. Brasília (DF), 2015a. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 27 out. 2015a.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA.** Banco de Dados Agregados. Brasília (DF), 2015b. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/default.asp?z=t&o=1&i=P>>. Acesso em: 27 out. 2015b.

IBGE. **Indicadores de desenvolvimento Sustentável - Brasil.** Estudos e Pesquisas - Informações Geográficas. 9, 2012.

ISO. *Water Quality — Determination of the Acute Toxicity of Waste Water to Zebrafish Eggs (Danio rerio).* ISO 15088, 2007.

JANSSENS, L; STOKS, R. *Stronger effects of Roundup than its active ingredient glyphosate in damselfly larvae. Aquatic Toxicology.* 193, p. 210–216, 2017.

JIN, M. et al. *Developmental toxicity of bifenthrin in embryo-larval stages of zebrafish. Aquat. Toxicol.* 95, p. 347-354, 2009.

KIMMEL, C. B. et al. *Stages of Embryonic Development of the Zebrafish*. Institute of Neuroscience, University of Oregon, Eugene, Oregon 97403-1254. 1995. [Department of Biology, Dartmouth College, Hanover, NH 03755 (W.W.B.). **DEVELOPMENTAL DYNAMICS** 2032553'10 (1995).

KIRBY M.F. et al. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. *Mar. Pollut. Bull.* 40, p. 780-791, 2000.

LAJMANOVICH, R.C.; SANDOVAL, M.T.; PELTZER, P.M. *Induction of mortality and malformation in Scinax nasicus tadpoles exposed to glyphosate formulations*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 70, p. 612-618, 2003.

LAMMER; C. et al. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C 149, p. 196–209, 2009.

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

LAW, J. M. *Mechanistic considerations in small fish carcinogenicity testing*. **ILAR Journal**. 42, p. 274-284. 2001.

LINNEY, E., UPCHURCH, L., DONERLY, S. *Zebrafish as a neurotoxicological model*. *Neurotoxicol Teratol.* 26 (6) p. 709-718, 2004.

LONG, Q. et al. *GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene*. *Development, Cambridge*. 124 (20), p. 4105-4111, 1997.

LOPES F. M. et al. *Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish Danio rerio*. **Aquatic Toxicology**. 155, p. 322-326, 2014.

MACHADO, M. R. **Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas**. NOPAR, Científica, 1 (1), p. 63-76, 1999.

MACHADO, R. **Comissão especial aprova parecer que muda legislação brasileira sobre agrotóxicos**. Câmara dos Deputados. 2018. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/camaranoticias/noticias/AGROPECUARIA/559559-OMISSAO-ESPECIAL-APROVA-PARECER-QUE-MUDA-LEGISLACAO-BRASILEIRA-SOBRE->

AGROTOXICOS.html>. Acessado em: 13 ago. 2018.

MARIANI, C.F. Ecotoxicologia. **Portal de ecologia aquática**. Departamento de Ecologia, IB, USP. Disponível em: <http://ecologia.ib.usp.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=143&Itemid=419>. Acessado em: 15 ago. 2018.

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

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

_____. *Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**. 78, p. 294-299, 2010.

NUNES, G. S.; RIBEIRO, M. L. **Pesticidas: Uso, Legislação e Controle**. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, p. 31-44, 1999.

ODENTHAL, J. et al. **Mutations affecting the formation of the notochord in the zebrafish. *Danio rerio***. Dev. 123, p. 103-115, 1996.

OECD (1992) Test Guideline No. 301. **OECD Guideline for Testing of Chemicals**. Ready Biodegradability. Disponível em: <http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html>. Acessado em: 22 abr. 2017.

OLIVEIRA, J. S. **Blocos no poder, aparelhos de estado e o consumo de agrotóxicos no Brasil**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Economia da Faculdade de Economia da Universidade Federal da Bahia. 151 fls, 2017.

PAGANELLI, A. et al. *Glyphosate-based herbicides produceteratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling*. **Chem.Res. Toxicol.** 23 (10), p. 1586-1595, 2010.

PARNG, C. et al. **Zebrafish: a preclinical model for drug screening**. Assay and Drug Development Technologies 1, p. 41-48, 2002.

PAYNE J. F. et al. *Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland*. Mar. Pollut. Bull. 32, p. 225-231, 1996.

PERES, F. et al. Agrotóxicos, Saúde e Ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C., orgs. **É Veneno ou é remédio?:** agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro (RJ): Editora FIOCRUZ, 2003. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/sg3mt/03>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

PORTIER, C. J. et al. *Differences in the carcinogenic evaluation of glyphosate between the International Agency for Research on Cancer (IARC) and the European Food Safety Authority (EFSA)*, **Epidemiol. Commun. Health**. 70, p. 741-745, 2016.

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

ROY, N. M.; CARNEIRO, B.; OCHS, J. *Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish*. **Environ. Toxicol. Pharmacol**. 46, p. 292-300, 2016.

SALBEGO J. et al. *Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in Piava (Leporinus obtusidens)*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol**. 58 (3), p. 740-745, 2010.

SANDRINI J. Z. et al. *Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel Perna perna and the fish Danio rerio and Jenynsia multidentata: In vitro studies*. **Short communication Aquatic Toxicology**. p. 171-173, 2013.

SANTOS, J. B. et al. *Tolerance of Brady rhizobium strains to glyphosate formulations*. **Crop Protect**. 24, p. 543-547, 2005.

SEGPLAN - SECRETARIA DE ESTADO DE GESTÃO E PLANEJAMENTO DO ESTADO DE GOIÁS. **Produção goiana de grãos de 2013 atinge 18,1 milhões de toneladas, Goiânia (GO): Instituto Mauro Borges de Estatística e Estudos Socioeconômicos, 2015**. Disponível em: <<http://www.imb.go.gov.br/down%5Cpam2013.pdf>>. Acessado em: 05 set. 2017.

SIES H. *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. **Exp. Physiol**. 82, p. 291-295, 1997.

SOLDADO, N.A. et al. *Toxic effects of glyphosate in the embryonic development of the zebrafish (Danio rerio)*. Abstracts /Toxicology Letters. 258, p. 62–324, 2016.

SOLOMON K.R.; THOMPSON D.G. *Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate*. *Toxicol. Environ. Health- Part B-Crit. Rev.* 6 (3), p. 289-324, 2003.

SOSO, A.B. et al. *Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (Rhamdia quelen)*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23, p. 308-313, 2007.

SULUKAN, E. et al. *An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (Danio rerio)*. *Chemosphere*.180, p. 77-85, 2017.

TASCA, C. I.; MENA BARRETO SILVA, F. R.; ZAMONER, A. *Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity*. *Toxicology*. 320, p. 34-45, 2014.

TAVELLA, L. B. et al. *O Uso de Agrotóxicos na Agricultura e suas Consequências Toxicológicas e Ambientais*. *Agropecuária Científica no Semi-Árido*. 7 (2), p. 6-12, 2011.

TOPAL, A. et al. *Apoptotic effects and 533 glucose-6-phosphate dehydrogenase responses in liver and gill tissues of rainbow trout 534 treated with chlorpyrifos*. *Tissue and Cell*. 46, p. 490-496, 2014.

VALENTE, I.; BUFALO, P. *PL do veneno vai contaminar ainda mais os alimentos consumidos pelo brasileiro*. Carta Campinas **In Economia e Política, Manchete**. Disponível em: <<http://cartacampinas.com.br/2018/07/pl-do-veneno-vai-contaminar-ainda-mais-os-limentos-Consumidos-pelo-brasileiro/>>. Acessado em: 20 ago. 2018.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. *Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review*. *Environmental toxicology and pharmacology*. 13, p. 57-149, 2003.

VERECKEN, H. *Mobility and leaching of glyphosate: a review*. *Pest Management Science*. 61, p. 1139-1159, 2005.

WALSH, L. P. et al. *Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute*

regulatory (StAR) protein expression. *Environ. Health Perspect.* 108, p. 769-776, 2000.

WANG Y.S. et al. **Dissipation of 2,4-d glyphosate and paraquat in river water.** *Water Air Soil Pollut.* 72 (1-4), p. 1–7, 1994.

WEBSTER, U. et al. *Effects of glyphosate and its formulation, roundup, on reproduction in zebrafish (Danio rerio).* ***Environ. Sci. Technol.*** 48, p. 1271-1279, 2014.

WEBSTER, U. T. M.; PERRY, M. H.; SANTOS, E. M. *The herbicide linuron inhibits cholesterol biosynthesis and induces cellular stress responses in brown trout.* ***Environ. Sci. Technol.*** 49, p. 3110-3118, 2015.

WHO-International Programme on Chemical Safety Glyphosate. ***Environmental Health. Criteria 159–Glyphosate. IPCS, World Health Organization, Geneva, 1994.***

WILLIAMS G. M.; KROES R.; MUNRO I. C. *Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans Regulatory.* ***Toxicology and Pharmacology.*** 31, p. 117-165, 2000.

YAMADA, T. e CASTRO, P.R.C. **Gly, herbicida com singular modo de ação:** efeitos secundários e implicações fisiológicas e agrônômicas. 1º Simpósio sobre Sistema agrícola sustentável com colheita econômica máxima – SASCEM. Potafo e Esalq, 2004. Disponível em:

<[http://brasil.ipni.net/ipniweb/region/brasil.nsf/e0f085ed5f091b1b852579000057902e/4cf47afbcbfdd0d683257b08003b56b4/\\$FILE/Yamada%20e%20Castro%20Slides%20palestra.pdf](http://brasil.ipni.net/ipniweb/region/brasil.nsf/e0f085ed5f091b1b852579000057902e/4cf47afbcbfdd0d683257b08003b56b4/$FILE/Yamada%20e%20Castro%20Slides%20palestra.pdf)>. Acessado em: 05 ago. 2018.

YANG, D. et al. *Chlorpyrifos-oxon disrupts zebrafish axonal growth and motor behavior.* ***Toxicol. Sci. official J. Soc. Toxicol.*** 121, p. 146-159, 2011.

YUSOF, S.; ISMAIL, A.; ALIAS, M. S. **Effect of glyphosate-based herbicide on early life stages of Java medaka (*Oryzias javanicus*): a potential tropical test fish.** *Mar Pollut Bull.* 85 (2), p. 494-498, 2014.

ZEBRAL, Y.D. et al. *Effects of a glyphosate-based herbicide in pejerrey *Odontesthes humensis* embryonic development.* ***Chemosphere.*** 85, p. 860-867, 2017.

ZHANG, X. J. et al. *Biological impacts of glyphosate on morphology, embryo biomechanics and larval behavior in zebrafish (Danio rerio).* ***Chemosphere.*** 181, p. 270-280, 2017.

ZHAO, Z.; REECE, E. A. *Nicotine-induced embryonic malformations mediated by apoptosis from increasing intracellular calcium and oxidative stress.* ***Birth Defects Research*** (P.art B), 74, p. 383-39, 2005.

ANEXO A



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL JATAÍ
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**Protocolo de aprovação nº002/17**

Título do Projeto: Embriotoxidade de herbicida a base de glifosato em zebrafish (*danio rerio*).

Protocolo nº: 002/17

Data de aprovação na CEUA: 25/08/2017

Data de início: 01/09/2017

Data de Término: 30/03/2018

Prazo para entrega do Relatório Final: até 29/04/2017

Prof.^a Dra. Mirian Machado Mendes
Coordenadora da CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
UFG/Regional Jataí