



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ**  
**PRO-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**POTENCIAL DE TOXICIDADE DOS HERBICIDAS GLIFOSATO  
E IMAZETAPIR EM *Collossoma macropomum* (PISCES)**

**RÚBIA CONCEIÇÃO ARANHA**

**Santarém, Pará**  
**Setembro, 2013**

**RÚBIA CONCEIÇÃO ARANHA**

**POTENCIAL DE TOXICIDADE DOS HERBICIDAS  
GLIFOSATO E IMAZETAPIR EM *Colossoma macropomum*  
(PISCES)**

**ORIENTADOR: PROF. DR. LUIS REGINALDO RIBEIRO RODRIGUES  
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. RUY BESSA LOPES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, área de concentração Estudos e Manejo de Ecossistemas Amazônicos junto ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia.

Linha de Pesquisa: Genética e Conservação da Biodiversidade

**Santarém, Pará  
Setembro, 2013**

POTENCIAL DE TOXICIDADE DOS HERBICIDAS  
GLIFOSATO E IMAZETAPIR EM *Colossoma macropomum*  
(PISCES)

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais, área de concentração Estudos de Ecossistemas Amazônicos. Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia, nível de mestrado, da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, em 26 de setembro de 2013.

Prof. Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues (UFOPA)  
Coordenador do PGRNA

Apresentada à Comissão Examinadora, integrada pelos Professores:

---

Prof(a). Dr(a). Amauri Gouveia Jr. (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ)  
Examinador 1

---

Prof(a). Dr(a). Delaine Sampaio (UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO  
PARÁ)  
Examinadora 2

---

Prof(a). Dr(a). Rosa Helena Veras Mourão (UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE  
DO PARÁ)  
Examinadora 3

---

Prof. Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues (UFOPA)  
Orientador

---

Prof. Dr. Ruy Bessa Lopes (UFOPA)  
Co-orientador

Santarém, Setembro, 2013

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Maria Alice, por estar sempre tão presente em minha vida, por não medir esforços pra me ajudar, por me incentivar a jamais desistir dos meus objetivos, por seu amor incondicional. A senhora é meu exemplo de vida.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida maravilhosa, pelas oportunidades, pela força nos momentos difíceis e pelas pequenas vitórias que me ajudaram a ter esperança e não desistir nessa jornada.

Ao meu orientador, prof. Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues, por ter me aceito e confiado em mim, mesmo sabendo que não poderia dedicar-me exclusivamente ao mestrado. Agradeço pela paciência, pelos sábios conselhos, pelo esforço. O senhor é um exemplo pra mim, não só pelo conhecimento, mas pela dedicação, disciplina e ética com que conduz as atividades acadêmicas e a vida. Aprendi muito com o senhor. Obrigada pela oportunidade.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Ruy Bessa Lopes, muito obrigada pelos sábios conselhos, pelo encorajamento, por mostra-se sempre disposto a me ajudar, por ser sempre tão positivo. Aprendi muito com o senhor.

Aos colegas do Laboratório de Genética e Biodiversidade, Fabíola, Beatriz e Jamile, pela ajuda, pelos momentos agradáveis de convívio. Ao Marcos Paulo Alho, companheiro de jornada, apesar de termos projetos totalmente diferentes compartilhamos muitos momentos. A estagiária do ICTA, Andreia, que muito me ajudou na manutenção dos peixes e na condução dos experimentos. Acredito que Deus coloca anjos em nossa vida. A estagiária do ICTA, Naira, que colaborou muito na fase final dos experimentos. Muito obrigada pela dedicação.

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, especialmente ao Sr. Hugo Américo Rubert Scheadler, pela oportunidade e incentivo. Serei eternamente grata! Aos colegas de trabalho da Gerência Executiva de Santarém, obrigada pela paciência.

À minha mãe, Dona Alice, pelo apoio incondicional, pelas palavras de incentivo e coragem. Se cheguei a essa etapa de minha vida, certamente foi graças à senhora. Essa conquista é nossa.

A todos os professores do PGRNA pela contribuição para minha formação. Aos colegas da turma 2011. Ao prof. Marcos Prado, pela inestimável ajuda na execução do projeto. Ao Laboratório de Biologia Ambiental - Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas - ICTA - da Universidade Federal do Oeste do Pará, pela realização de análises laboratoriais. Aos colegas do Laboratório de Bioprospecção, em especial à Juliana.

A Secretaria de Estado de Pesca e Aquicultura - Baixo Amazonas, em especial ao Sr. Zacarias Marques de Oliveira, Coordenador da Base Física Santa Rosa. A técnica em aquicultura da UFOPA, Waldinete de Fátima Feitas Lobato. A Azul Tapajós Ração pela doação da ração.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente, para que este trabalho se realizasse.

## EPÍGRAFE

**“Aprenda como se você fosse viver para sempre.  
Viva como se você fosse morrer amanhã.”**

Mahatma Gandhi

ARANHA, Rúbia Conceição. **Potencial de toxicidade dos herbicidas glifosato e imazetapir em *Colossoma macropomum* (Pisces)**. 2013. 69 p.

Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais, área de concentração Estudos de Ecossistemas Amazônicos. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2013.

## RESUMO

O ambiente aquático é um dos ambientes que mais vem sofrendo impactos causados pela ação humana. A atividade agrícola, fortemente dependente do uso de agrotóxicos, tem se mostrado uma importante fonte de contaminação desse meio. O uso de peixes como espécie sentinela tem sido um procedimento comum para investigação dos efeitos genotóxicos de poluentes aquáticos. Neste trabalho foi analisado o efeito tóxico dos herbicidas imazetapir e glifosato em alevinos de tambaquis, *Colossoma macropomum*, através do teste de toxicidade aguda ( $CL_{50-96hs}$ ). O valor da ( $CL_{50-96hs}$ ) determinado para o imazetapir foi de  $185 \text{ m.L}^{-1}$ , enquanto para glifosato foi de  $92,90 \text{ mg.L}^{-1}$ . O potencial mutagênico e genotóxico do glifosato foi avaliado em juvenis de tambaqui expostos a três concentrações sub-letais do glifosato: C1 ( $1/50 CL_{50} = 1,86 \text{ mg.L}^{-1}$ ), C2 ( $1/100 CL_{50} = 0,93 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e C3 ( $1/1000 CL_{50} = 0,093 \text{ mg.L}^{-1}$ ). O tratamento C1 mostrou aumento das células micronucleadas após 7 dias de exposição e aumento nos danos ao DNA após 5 e 7 dias do início do experimento. Ambos os herbicidas foram classificados como pouco tóxicos, mas apresentam risco potencial a vida aquática.

Palavras Chave: Teste de Micronúcleo, Ensaio Cometa, Teste de toxicidade aguda, *Colossoma macropomum*

ARANHA, Rúbia Conceição. **Toxicity potencial of herbicides Glifosate and Imazetapyr in *Colossoma macropomum* (Pisces)**. 2013. 69 p. Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais, área de concentração Estudos de Ecossistemas Amazônicos. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2013.

## **ABSTRACT**

The aquatic environment is one the most impacted environment due to human pressure. The agriculture practice, strongly dependent of agrotoxic compounds, has shown as important source of environmental contamination. The use of fishes as sentinel species is a common procedure for investigation of genotoxic potential of aquatic pollutants. In the present study we analyze the mutagenic and genotoxic potential of the herbicides Imazetapyr and Glifosato on blood cells of tambaqui, *Colossoma macropomum*. Juvenile tambaqui were exposed to three sub lethal concentrations of Glifosato: C1 (1/50 CL50 = 1,86 mg.L-1), C2 (1/100 CL50 = 0,93 mg.L-1) e C3 (1/1000 CL50 = 0,093 mg.L-1). The toxic effects of these molecules had been availed based on acute toxicity test (CL50-96hs) and micronucleus and comet assays.

The CL50-96hs of Imazetapyr was observed at concentration of 185 mg.L-1, while Glifosato was 92,90 mg.L-1. The treatment C1 showed increasing of micronucleated cells after seven days exposure and DNA damage after five to seven days from the experiment starting. Both herbicides were classified as little toxic but presents potential risk to aquatic life.

**Key-Words:** Comet assay, micronucleus test, acute toxicity, *Colossoma macropomum*.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
1.1.1 Expansão da fronteira agrícola na Amazônia: região de Santarém.....	2
1.1.2. Agricultura como atividade potencialmente poluidora.....	4
1.1.3 Ecotoxicologia aquática - Bioindicadores de poluição do meio aquático.....	6
1.1.4 Testes de toxicidade aguda.....	8
1.1.5 O Testes de Micronúcleos.....	9
1.1.6 Ensaio Cometa.....	13
1.1.7 Estudos prévios com os Agrotóxicos Glifosato e Imazetapir .....	16
1.1.8 Gli-Up 480 SL <sup>®</sup> .....	17
1.1.9 Imazetapir Plus Nortox <sup>®</sup> .....	20
1.1.10 <i>Colossoma macropomum</i> (Cuvier, 1818) como organismo experimental .....	21
1.2 OBJETIVOS.....	23
1.2.1 Objetivo Geral.....	23
1.2.2 Objetivos Específicos.....	23
2. CAPÍTULO I .....	24

3. SÍNTESE INTEGRADORA.....	44
4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	46
ANEXO 1.....	56

## **LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS**

ANE – Alteracoes Nucleares Eritrocitarias

CAS - Chemical Abstracts Service

CL50 – Concentracao média letal

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

EC – Ensaio Cometa

FISPQ – Ficha de informacoes de seguranca de produtos químicos

MN – Micronúcleo

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Em um cenário mundial de crescente demanda pela produção de alimentos e, conseqüentemente de maiores áreas para cultivo, o uso de mecanismos para potencializar a atividade agrícola tem se tornado cada vez mais necessário (Jurado et al., 2011). Nesse contexto o uso de defensivos agrícolas em grandes áreas de cultivo e, na maioria das vezes, em quantidades maiores que as necessárias tem se tornado uma problemática ambiental.

A contaminação do meio aquático por esses compostos compromete a sanidade dos ecossistemas locais e pode trazer prejuízos a população humana que faz uso desses recursos. Vários estudos têm demonstrado a existência e persistência de agrotóxicos em corpos hídricos próximos a áreas de cultivo (Veiga et al., 2006; Morais, 2009; Queiroz et al., 2011).

Os herbicidas são os agrotóxicos mais empregados na agricultura moderna, são substâncias utilizadas para combater ervas daninha que são prejudiciais à lavoura. A contaminação dos corpos hídricos por essas substâncias ocorre principalmente através de processos de carreamento e lixiviação (Queiroz et al., 2011).

Embora alguns tipos de agrotóxicos não tenham potencial bioacumulativo, portanto não representam risco de biomagnificação ao longo da cadeia trófica, pouco se conhece a respeito dos efeitos tóxicos que os mesmos possam causar a ictiofauna local, mesmo não causando efeitos letais as alterações comportamentais causadas pela exposição a esses xenobiontes podem comprometer a estabilidade da espécie no ecossistema afetado. Essas substâncias podem causar efeitos genotóxicos sobre o material genético de organismos expostos, e tais efeitos em longo prazo podem conduzir a mutagenicidade, carcinogenicidade ou letalidade (Nwani et al., 2011).

O Brasil tem se destacado no cenário mundial de produção de alimentos. Dentre as principais *comodities* produzidas a soja tem ocupado lugar cada vez mais representativo. Essa monocultura mecanizada exige grandes áreas de cultivo e de defensivos agrícolas. A partir do final da década de 90 a expansão da fronteira agrícola, a partir de áreas do cerrado do centro-oeste, alcançou áreas de floresta e de pastos

abandonados da Amazônia (Carvalho e Tura, 2006). Desde então, o estado do Pará tem se tornado um dos maiores produtores desse grão na região norte.

A região de Santarém – Oeste do Pará, nos últimos anos, tornou-se área de avanço da fronteira agrícola, principalmente das monoculturas de soja e arroz. Além da possibilidade de contaminação nas proximidades das áreas de cultivo, devido à ramificação da malha hídrica dessa região, existe risco potencial de moléculas usadas na agricultura serem carregadas ou lixiviadas para o meio aquático em locais que até então não apresentava histórico desse tipo de contaminação.

O avanço da fronteira agrícola fez com que ambientes que até recentemente eram pouco impactados passassem a enfrentar novos componentes de degradação ambiental, como o desmatamento de grandes áreas, perda da diversidade e a poluição causada por agrotóxicos. Vários estudos tem demonstrado o efeito de poluentes sobre a fauna aquática em diversos locais (Bombail et al., 2001; Valdes, 2007; Bony et al. 2008; Mitchelmore e Chipman, 1998; Grisolia et al., 2009). Entretanto, na região amazônica, poucos trabalhos têm investigado as reações da ictiofauna autóctone frente a esses novos desafios ambientais.

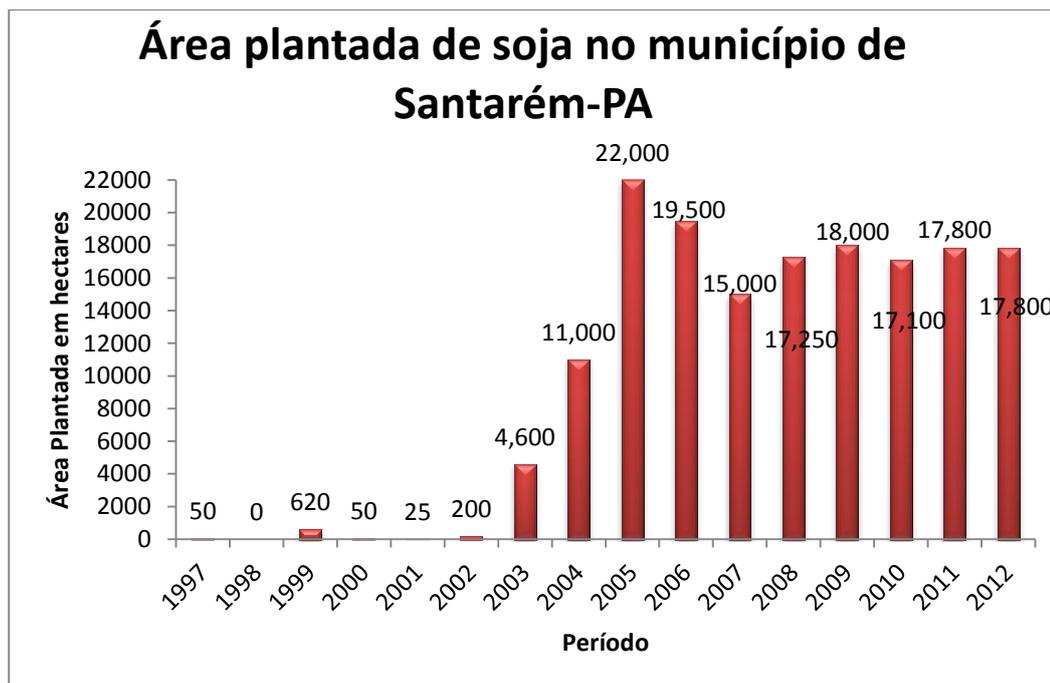
O uso de representantes da ictiofauna local para testes de toxicidade aguda e genotoxicidade tem demonstrando ser uma ferramenta aplicável para avaliação dos efeitos de substancias sobre os organismos-modelo. O objetivo do presente estudo foi determinar a concentração média letal ( $CL_{50-96\text{hs}}$ ) e avaliar os possíveis efeitos genotóxico de dois herbicidas em células sanguíneas de peixes.

## **1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1.1 Expansão da fronteira agrícola na Amazônia: região de Santarém**

Em meados da década de 90 teve início o plantio de soja no estado do Pará, motivado principalmente por incentivos governamentais, como pesquisas realizadas pela Embrapa Amazônia Oriental visando à adaptação de cultivares, especialmente soja, nas regiões de solo favoráveis. De acordo com Carvalho e Tura (2006) em 2002 devido

a grande expansão da área plantada e da quantidade produzida com a monocultura da soja, o Município de Santarém tornou-se o principal produtor desse grão no Pará. A monocultura de soja na região do baixo amazonas vem ganhando cada vez mais espaço na economia em âmbito nacional e internacional trazendo grandes transformações para os setores da economia local, sociedade e para o meio ambiente da região (Cardoso, 2006). O gráfico abaixo mostra as áreas plantadas para o cultivo de soja no município de Santarém-PA no período de 1997 a 2012 (Figura 1).



**Figura 1:** Evolução das áreas plantadas (hectares) para o cultivo de soja no município de Santarém-PA no período de 1997 a 2012 (Fonte: IBGE - Produção Agrícola Municipal).

Em função das condições edafoclimáticas apropriadas ao desenvolvimento da soja e a necessidade de mais áreas para plantio do grão, devido ao aumento da demanda mundial por essa *commodity*, a soja vem se tornando uma das principais atividades agrícolas em alguns municípios do Estado do Pará, dos quais se destacam como principais produtores os municípios de Redenção, Paragominas, Santarém e Belterra (Cardoso, 2006). Atualmente a cidade de Santarém – Oeste do Pará, localizada às margens da BR-163, vem se destacando entre os municípios do Pará como um dos maiores produtores de soja. Provavelmente a implantação do terminal portuário da Cargill, em 2003 no município de Santarém, contribuiu para esse aumento de produção de grãos no município (Torres, 2005).

A monocultura de soja é tipicamente mecanizada e necessita de grandes áreas para o cultivo, normalmente o plantio ocorre em sistema de rotação com a cultura de arroz (Carvalho e Tura, 2006). De acordo com dados do Instituto de Pesquisa Ambiental da Amazônia (IPAM, 2011) as áreas utilizadas para o cultivo de soja localizam-se principalmente na região de planalto e no entorno da BR-163.

Os municípios de Santarém e Belterra fazem parte de uma das últimas fronteiras de reservas florestais do Pará, com grandes Unidades de Conservação, como a Floresta Nacional do Tapajós e a Reserva Extrativista Tapajós-Arapiuns. Esses dois municípios representam atualmente os maiores produtores de soja do Estado do Pará (IBGE, 2012). O avanço da fronteira agrícola sobre essa região aumenta os riscos de poluição e degradação ambiental em uma área que faz parte de mosaico de áreas protegidas, com elevada biodiversidade.

### **1.1.2 Agricultura como atividade potencialmente poluidora**

Atualmente a agricultura é altamente dependente do uso de agrotóxicos. A demanda cada vez maior desses produtos tem sido fomentada principalmente pela necessidade crescente de produção de alimentos gerada pela expansão da população mundial (Jurado et al., 2011). Os agrotóxicos podem ser divididos em três principais grupos: fungicidas, inseticidas e herbicidas. Esses últimos representam cerca de 45% dos agrotóxicos comercializados no mundo (Quasem, 2011). Nesse contexto, o abandono ou redução do uso desses produtos causaria queda na produção agrícola, aumento nos custos de produção, elevação dos preços e, em alguns locais, fome e desnutrição (Townsend e Begon, 2008).

De acordo com a Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989:

(...) agrotóxicos são os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento dos produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (Brasil, 1989).

Os agrotóxicos podem se tornar importante fonte de poluição ambiental quando são liberados sobre as áreas de cultivo, mas somente uma porção muito pequena atinge o alvo. Além disso, muitas vezes tais produtos são usados indiscriminadamente em quantidades maiores do que o recomendado pelo receituário agrônômico, como garantia para a eficácia do tratamento (Hayashi et al., 1998; Ferraro, 2009)

A água é um recurso indispensável para praticamente todas as atividades humanas, das quais se destaca o abastecimento doméstico e industrial, a irrigação agrícola, a geração de energia elétrica, além de outras atividades como lazer e recreação (Ribeiro, 2010). O ambiente aquático é um dos ecossistemas que mais tem sofrido impactos causados pela ação antropogênica, uma vez que constituem os compartimentos finais de vários subprodutos derivados da atividade humana (Ribeiro, 1997).

A contaminação do meio aquático por agrotóxicos ocorre com frequência através do processo de carreamento do solo contaminado, lixiviação, pela lavagem dos equipamentos de pulverização ou ainda por derivação quando da aplicação por via aérea (Ferraro, 2009). Uma vez nesse ambiente, os agrotóxicos, podem reduzir a qualidade ambiental e influenciar funções essenciais do ecossistema aquático através da redução na diversidade de espécies, modificação na cadeia alimentar e modificações nos padrões de fluxo de energia e ciclagem de nutrientes, gerando alterações na estabilidade e resiliência do ecossistema (Pérez et al., 2011).

Existe ainda o risco dos agrotóxicos contaminarem mananciais hídricos subterrâneos. Nesse ambiente não existem condições favoráveis para a degradação das moléculas devido a baixas temperaturas, falta de oxigênio, baixa atividade dos microorganismos e ausência de luminosidade, agravando a possibilidade de acumulação desses compostos e conseqüentemente a chance de contaminação de populações humanas usuárias desse recurso (Silva et al., 2011).

Vários estudos recentes têm evidenciado a presença de moléculas de agrotóxicos em águas superficiais próximo a áreas de cultivo (Veiga et al., 2006; ; Morais, 2009; Queiroz et al., 2011). Na região do Arroio Passo do Pilão (RS), observou-se a presença de Glifosato em alta concentração (>100 ppb) em amostras de água coletadas próximo a lavoura de milho, e verificou-se a persistência desse agrotóxico no meio aquático por até 60 dias após sua aplicação (Silva et al., 2003). Outra evidência de que agrotóxicos utilizados na lavoura alcançam os sistemas hídricos foi observada no município de Paty

do Alferes (RJ). Neste caso, demonstrou-se que 70% das amostras de água coletadas nas proximidades da lavoura de tomate apresentaram contaminação por agrotóxicos organofosforados e carbamatos e, além disso, os níveis mensurados em duas amostras estiveram acima dos limites permitidos pela legislação brasileira (Veiga et al., 2006).

Bortoluzzi et al. (2006) demonstraram a contaminação de águas por moléculas de agrotóxicos nas proximidade de área de cultivo de fumo, com exceção de um local que apresentava mata ciliar próxima ao córrego, sugerindo que essa formação vegetal poderia servir como barreira para o escoamento dos agrotóxicos diretamente nos córregos.

### **1.1.3 Ecotoxicologia aquática - Bioindicadores de poluição do meio aquático**

Dentre as diferentes substâncias químicas produzidas pela humanidade, apenas uma pequena parcela tem sido estudada quanto aos seus possíveis efeitos nos seres vivos (Ferraro, 2004). Na água superficial, os agrotóxicos podem continuar dissolvidos ou serem adsorvidos pelos sedimentos, representando uma potencial fonte de contaminação em longo prazo. Uma vez incorporadas ao ecossistema aquático tais substâncias podem alterar funções ecossistêmicas do meio físico e interferir sobre a adaptabilidade da biota.

Estudos sobre a toxicidade de substâncias e elementos químicos permitem determinar as respostas de um dado organismo à contaminação por estes elementos, bem como avaliar o impacto e o efeito destes sobre células, tecidos e órgãos, e ainda inferir sobre possíveis perturbações metabólicas (Pandurangi et al., 1995). Os padrões de acumulação de xenobióticos são distintos para diferentes organismos e dependem do balanço entre a taxa de assimilação e as taxas de metabolização e eliminação dos compostos químicos (Vicari, 2009).

Algumas substâncias, mesmo que presentes na água esporadicamente podem sofrer processos de bioacumulação e induzir danos ao material genético ou celular (Ferraro et al., 2004). Os efeitos de muitos poluentes podem ser examinados diretamente em vários organismos, normalmente através da análise de células, tecidos ou órgãos. Sob o ponto de vista genético os efeitos mutagênicos destas substâncias podem não se manifestar por várias gerações, mas em um dado momento de sua história, passar a ter impacto significativo no *pool* gênico da população (Padurangi et al.,

1995). Por essa razão tem havido interesse crescente no uso de bioindicadores no estudo dos efeitos de poluentes a nível genômico (Russo et al., 2004).

Os agrotóxicos que se dissolvem na água podem ser degradados por fatores químicos, biológicos e/ou físicos, ou ainda permanecer como potenciais contaminantes, tornando-se disponíveis para peixes e outros organismos (Morais, 2009). Os peixes podem entrar em contato com moléculas nocivas presentes no ambiente aquático por quatro vias: alimentação, ingestão de água, pela pele e/ou através das brânquias (Heath, 1995). Segundo Val e Almeida-Val (1999) peixes amazônicos são mais susceptíveis pelas vias de alimentação e tomada branquial.

Os peixes fornecem um modelo adequado para o monitoramento da genotoxicidade aquática e da qualidade das águas residuais, devido à sua capacidade de metabolização de xenobióticos e acumulação de poluentes (Grisólia e Cordeiro, 2000). Devido a essas características podem ser escolhidos como organismos bioindicadores, ou seja, espécies sentinelas que serão utilizadas como primeiros indicadores de efeito do estresse causado por agentes contaminantes.

Uma espécie de peixe teoricamente ideal para avaliar a genotoxicidade de um tipo de substância poluente deve obedecer aos seguintes critérios: (1) deve ser difundida em diferentes ecossistemas, de preferência cosmopolita, a fim de ser empregada para levantamentos *in situ*; (2) apresentar sensibilidade para a detecção de genotoxicidade de uma ampla gama de poluentes em baixas doses; (3) deve ser adaptável às condições de cultivo, para realização de experimentos laboratoriais; (4) possuir grandes populações naturais, a fim de impedir predação de indivíduos e não colocar a espécie em risco, ou impedir sua conservação (Sanchez-Galan et al., 1999).

Muitas das substâncias químicas lançadas ao ambiente são agentes causadores de mutações gênicas e de alterações cromossômicas. Algumas destas substâncias são chamadas de aneugênicas, pois atuam provocando alterações na distribuição dos cromossomos durante o processo de divisão celular dando origem às aneuploidias. Outras são chamadas de clastogênicas e induzem quebras e alterações na estrutura dos cromossomos. Em qualquer dos casos é possível, através de testes citogenéticos, avaliar os efeitos mutagênicos de um determinado composto, o que torna estes tipos de testes imprescindíveis nestas avaliações (Rabello-Gay et al., 1991).

A avaliação do potencial mutagênico de poluentes aquáticos tem sido frequentemente conduzida utilizando-se peixes como organismos teste e adotando-se as seguintes metodologias: Teste de toxicidade aguda, Teste de Micronúcleos e Ensaio Cometa. A seguir será feita uma breve revisão dos principais aspectos que norteiam esses métodos.

### 1.1.5 Testes de toxicidade aguda

Devido à complexidade de interações físico-químicas e biológicas existentes no ambiente aquático, torna-se difícil extrapolar para a escala ambiental as informações obtidas através de testes realizados em laboratório. Também se deve levar em consideração que não existe nenhum organismo específico que possa ser usado para avaliar todos os efeitos possíveis de determinado xenobionte sobre o ecossistema, devido à complexidade de interações bióticas e abióticas existentes nesse meio. Entretanto, os testes de toxicidade aguda são imprescindíveis para prever possíveis efeitos tóxicos dos contaminantes no ambiente (Costa et al., 2008).

Os testes de toxicidade aguda têm sido amplamente empregados para avaliação do potencial tóxico de moléculas em espécies não padronizadas. Esses testes baseiam-se na relação existente entre os efeitos biológicos observáveis e a concentração do toxicante no ambiente (Connell, 1997). São conduzidos por curto período de tempo em relação ao período de vida do organismo-teste, geralmente são realizados de 24 a 96 horas, podendo ser realizados sob sistema estático, semi-estático ou de fluxo contínuo (Lopes, 2005). Esse método proporciona resposta rápida em estudos sobre efeitos tóxicos letais, em que o objetivo é determinar a concentração Média Letal ( $CL_{50}$ ) de determinada substância sobre organismos experimentais (Costa et. al., 2008).

Exemplares de tambaqui têm sido empregados em testes de toxicidade aguda para diversas substâncias, desde metais (Menezes, 2005) até herbicidas (Chapadense et al, 2009). Moura (2009) avaliou a resposta de alevinos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Carpa-comum (*Cyprinus carpio*) e Tambaqui (*Colossoma macropomum*) quanto à concentração média letal ( $CL_{50-96\text{hs}}$ ) para uma formulação comercial a base de glifosato, o herbicida Roundup. Os resultados obtidos 21,63, 15,33 e 20,06  $\text{mg.L}^{-1}$  evidenciaram discreta diferença entre as concentrações estabelecidas para as espécies testadas e indicam que a formulação apresenta potencial levemente tóxico para as mesmas.

Os testes de toxicidade determinam parâmetros que servem para se estabelecer limites permissíveis de várias substâncias químicas, além de possibilitar a avaliação do impacto de misturas de poluentes sobre os organismos aquáticos dos corpos hídricos receptores, dessa forma a concentração média letal é uma forma de avaliação da qualidade da água e na medição de possíveis impactos ambientais (Zagato, 2006).

### **1.1.5 O Teste de Micronúcleos**

Os efeitos de substâncias ou produtos químicos sobre o genoma de peixes têm sido objeto de muitos estudos, em especial daqueles que buscam estabelecer a resposta dos genes aos estímulos ambientais. Uma vez que os seres humanos são expostos ao longo da vida a uma série de xenobiontes presentes tanto na água como em alimentos obtidos desse meio, organismos que possam indicar a presença de ação genotóxica de poluentes aquáticos são ferramentas importantes para o diagnóstico ambiental (Udroiu, 2006).

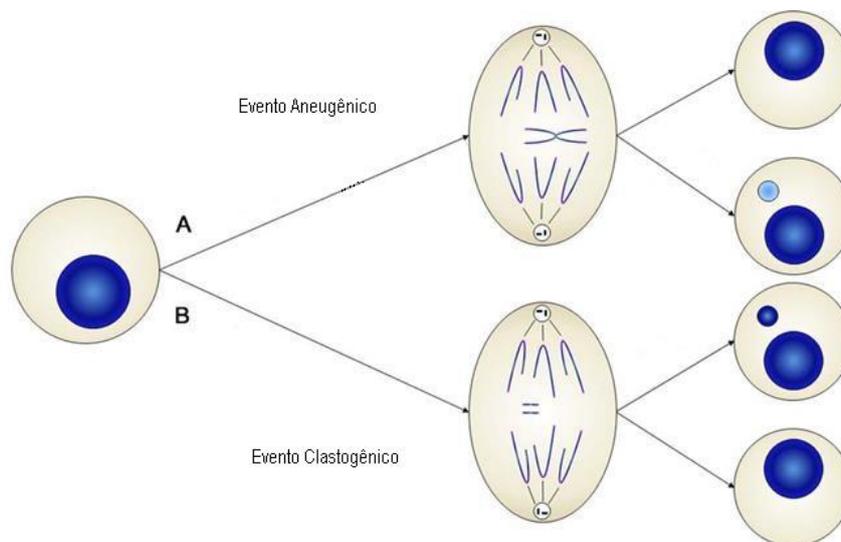
A análise de alterações no DNA de organismos aquáticos tem se mostrado uma ferramenta útil para avaliar contaminação ambiental por substâncias genotóxicas, sendo capaz de detectar efeitos de exposição a pequenas concentrações de contaminantes em uma vasta gama de espécies. Esses métodos apresentam a vantagem de quantificar impactos genotóxicos sem a necessidade de conhecimentos detalhados sobre as propriedades físico químicas dos contaminantes (Frenzilli et al., 2009).

O Teste de Micronúcleos (MN) permite avaliar de forma rápida e confiável danos cromossômicos causados por perda de cromossomos inteiros ou por quebras cromossômicas (Fenech, 2000). Esse teste tem sido largamente empregado para avaliar ação genotóxica induzida por agentes químicos ou físicos. Primeiramente utilizado em roedores este teste tem demonstrado aplicabilidade em outros grupos como plantas e peixes, nesse último caso tem demonstrado ser uma ferramenta sensível e de fácil execução para identificar propriedades genotóxicas de compostos presentes no ambiente aquático (Udroiu, 2006).

Esse método foi originalmente desenvolvido por para células de medula óssea de camundongos (Schmid, 1975) e mais tarde adaptado por Hooftman e Raat (1982), para o estudo de células sanguíneas de peixes, sendo conhecido como Teste do Micronúcleo Píscico (Vicari, 2009). Uma vez que peixes teleósteos possuem eritrócitos nucleados, o

teste de micronúcleos mostrou ser uma ferramenta viável para análise de efeitos clastogênicos e aneugênicos causados por poluentes. Antes da implementação dessa ferramenta, técnicas de análise de cromossomos em metáfase, como teste de aberrações cromossômicas e troca entre cromátides irmãs para análise de danos genéticos causados por contaminantes eram inviáveis para praticamente todas as espécies de peixes devido ao tamanho reduzido e grande número de cromossomos, fatores esses que não alteram o desempenho do teste de micronúcleos (Al-Sabti e Metcalfe, 1995; Hayashi et al., 1998).

Os micronúcleos são estruturas citoplasmáticas encontradas em populações celulares em divisão conhecidos pelos hematologistas como corpúsculo de Howell-Jolly. Surgem quando cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos não são incorporados às células filhas durante o processo de divisão celular (Figura 2). Podem ocorrer tanto em células somáticas quanto em células germinativas. Sua formação pode ocorrer devido a vários mecanismos como formação de fragmentos de cromossomos acêntricos, cromossomos multicêntricos, danos no cinetócoro e defeitos nas fibras de fuso (Müller et al., 1996; Udroi, 2006; Vicari, 2009).



**Figura 2:** Formação de micronúcleo em célula mononucleada (Fonte: Terradas et al, 2010).

O Teste dos micronúcleos detecta tanto os eventos clastogênicos, danos que ocorrem diretamente no cromossomo e seus componentes, principalmente no DNA, produzindo quebras nessa estrutura, como os defeitos no fuso celular e outros componentes envolvidos na formação do fuso, conhecidos como mecanismos aneugênicos (Müller et al., 1996).

São considerados micronúcleos clássicos aquelas estruturas circulares de mesma refração que o núcleo, não ligadas a esse, e que possuam um tamanho que corresponda de 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo principal da célula. No caso específico dos peixes, devido ao tamanho normalmente reduzido dos cromossomos, a proporção de tamanho passa para a faixa de 1/10 a 1/30 do tamanho do núcleo (Al-Sabti e Metcalfe, 1995).

Além da formação dos micronúcleos podem ocorrer outras anomalias celulares, formadas quando determinada quantidade de material fica levemente atrasada na mitose fazendo com que o núcleo resultante não seja oval, mas apresente uma saliência de cromatina (Bombail et al., 2001). Carrasco et al. (1990) descreveram as alterações morfológicas encontradas em núcleos de eritrócitos de peixes em: *Blebbbed*: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina (mais escuro); *Lobed*: núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os *blebbbed*. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas; *Vacuolated*: núcleos que apresentam uma região parecida com os vacúolos encontrados em células vegetais; *Notched*: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Esses cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pela membrana nuclear.

A ausência de micronúcleos não necessariamente significa a ausência de efeitos genotóxicos da substância testada. Em alguns casos o efeito citotóxico da substância testada pode levar a morte celular em grande escala, causando um efeito falso negativo. Nesse sentido, os resultados obtidos através das alterações morfológicas nucleares devem ser consideradas como manifestações dos efeitos genotóxicos da maioria dos contaminantes em peixes (Vicari, 2009).

Apesar do teste de micronúcleo ser largamente empregado como biomarcador de agentes genotóxicos, ainda existem muitas controvérsias sobre a biologia básica dos micronúcleos e os possíveis impactos dessa estrutura para a célula. Não se sabe ao certo quais os mecanismos apresentados pela célula diante da formação de micronúcleos, se os mesmos poderiam ser inseridos no núcleo celular ou degradados independentemente de processos de divisão celular ou mesmo apoptose. Em alguns tipos celulares a formação de micronúcleos parece indicar perda de material genético para célula,

enquanto em outros o DNA micronuclear parece ser transcrito e os genes completamente expressos (Terradas et al., 2010).

Guisi (2010) buscando desenvolver uma padronização para o número de células a serem computadas no Teste de Micronúcleos, uma vez que a literatura registrava trabalhos com análise de mil a dez mil células, comparou estatisticamente os resultados de contagens de mil, duas mil, três mil e quatro mil células, concluindo que a contagem de apenas mil células mostra resultados satisfatórios.

Em estudo para avaliar a existência de contaminação aquática no rio Paranaíba, MG, Costa e Silva e Nepomuceno (2010), utilizando teste do micronúcleo em mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) observaram alta frequência de micronúcleos nos peixes do rio quando comparados aos peixes usados como controle, tais resultados indicam exposição dos animais a substâncias e/ou a condições ambientais de potencial genotóxico. Porto et al. (2005) demonstraram aumento na frequência de MN em três espécies de peixes *Prochilodus nigricans* (detritívoro), *Mylossoma duriventris* (onívoro) e *Hoplias malabaricus* (piscívoro) coletados em área poluída quando comparados a peixes das mesmas espécies coletados em outra área sem histórico de poluição.

Além das análises de contaminação ambiental, vários experimentos conduzidos em laboratório têm demonstrado a existência de efeitos genotóxicos em peixes expostos a agrotóxicos utilizados nas mais diversas culturas (Ferraro, 2003; Lopes, 2005; Bony, et al., 2008; Ferraro, 2010; Guisi, 2010). Chapadense et al. (2009) demonstraram aumento significativo no número de micronúcleos eritrocitários em tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos ao herbicida atrazina, sugerindo ação genotóxica do herbicida na espécie avaliada.

Da mesma forma, estudos realizados através da exposição de peixes a metais têm evidenciado a existência de danos celulares nos organismos expostos a esses estressores (Cestari et al., 2004; Lopes-Polenza, 2004; Vicari, 2009). Ferraro et al. (2004), através do teste do micronúcleo, demonstraram que tributilestanho (TBT) e o chumbo inorgânico são potencialmente mutagênicos, induzindo um grande número de alterações morfológicas nucleares em *Hoplias malabaricus*. Experimentos demonstraram o potencial genotóxico do metilmercúrio (MeHg) em *H. malabaricus* através do teste do micronúcleo e ensaio cometa (Lopes-Poleza, 2004; Vicari, 2009).

O potencial genotóxico de metilmercúrio (MeHg) foi testado em *C. macropomum* por Silva et al. (2010). Os resultados se assemelharam aos obtidos para *H. malabaricus* (Lopes-Poleza, 2004; Vicari, 2009) evidenciando pouca alteração no número de micronúcleos, mas presença significativa de alterações nucleares. Da Rocha et al. (2009) avaliaram o potencial mutagênico do metilmercúrio em *C. macropomum* através de MN e alterações nucleares eritrocitárias. Os resultados corroboram com a aplicação e importância do teste de MN como indicador de genotoxicidade em peixes, assim como seu uso para monitoramento ambiental.

### 1.1.6 Ensaio Cometa

O ensaio do cometa, ou técnica da eletroforese celular em micro-gel (*Single Cell Gel Electrophoresis*, SCGE), é um teste largamente empregado para avaliação de danos e reparos de DNA em diferentes tipos celulares (Frenzilli et al., 2009). Esse teste não detecta mutações e sim lesões genômicas, ainda passíveis de correção pelo aparato celular, que somente após processadas podem resultar em mutações (Gontijo e Tice, 2003). O nome cometa refere-se à formação de uma longa cauda com os fragmentos de DNA deixados após a passagem da corrente elétrica (Bombail et al., 2001).

Seu princípio básico é o da lise de membranas celulares e extração das proteínas nucleares seguida pela indução da migração eletroforética do DNA liberado em matriz de agarose (Cotelle, 1999). Quando vista ao microscópio, a célula migrada adquire a forma aparente de um cometa, com cabeça, a região nuclear, e cauda, que contém fragmentos ou fitas de DNA que migraram na direção do ânodo. A análise dos cometas baseia-se no grau de fragmentação do DNA e sua migração pela microeletroforese. Medidas como o comprimento total da “cauda” e a densidade de DNA fornecem dados indiretos sobre o estado do DNA da amostra (Brianezi et al., 2009).

Variações de pH durante a lise de membranas e eletroforese afetam os tipos de quebra nas fitas de DNA detectáveis (Klaude et al., 1996). Em condições neutras apenas quebras em fitas duplas são detectadas. Sob pH de 12.3 são detectadas quebras de fitas simples e duplas, já sob condições extremamente alcalinas, pH > 13, além das quebras anteriormente mencionadas também são detectadas lesões em sítios álcali-lábeis, sítios incompletos de reparo e excisão e *crosslinks* (Lee e Steinert, 2003).

O processo de coloração do material é feito tradicionalmente através de técnica de fluorescência com o uso de brometo de etídeo, iodeto de propídio e *SYBR green* (Gontijo e Tice, 2003). As técnicas de fluorescência apresentam certas limitações como a necessidade de microscópio próprio para análise de material fluorescente e a impossibilidade de armazenamento das lâminas para observação posterior, porque a coloração desbota-se em um dia. Outra desvantagem da coloração fluorescente é a toxicidade de alguns reagentes, como o brometo de etídeo, que é mutagênico e, sob exposição crônica, pode ser cancerígeno (Nadin et al., 2001). Coloração feita por histotécnica convencional com sal de prata apresenta a vantagem da utilização de microscópio óptico convencional e armazenagem das lâminas para análise posterior. Quando comparadas, as duas colorações não diferem com relação aos resultados das imagens obtidas (Nadin et al., 2001; Garcia et al., 2007).

Atualmente, esse método é amplamente usado como ensaio de genotoxicidade de produtos industriais, farmacêuticos e agroquímicos, para detectar danos e reparos do DNA em células individuais. É considerado um método rápido, de baixo custo, seguro e de execução relativamente fácil (Brianezi et al., 2009). Devido à simplicidade, sensibilidade e necessidade de pequeno número de células esse teste tem se mostrado apropriado para biomonitoramento ambiental (Rojas et al., 1999).

O ensaio Cometa tem sido utilizado como ferramenta altamente confiável para monitoramento de genotoxicidade aquática devido à simplicidade e alta sensibilidade, sendo capaz de detectar danos celulares devido a baixas concentrações de contaminantes em uma grande variedade de espécies, além da vantagem de detectar e quantificar impactos genotóxicos sem a necessidade de conhecimento detalhado das propriedades físicas ou químicas dos contaminantes. Apresenta ainda as vantagens de detectar danos genotóxicos a nível celular, ter aplicabilidade em qualquer tipo celular eucariote, utilização de pequeno número de células para o teste, rapidez e sensibilidade dessa técnica quando comparada a outros métodos disponíveis para avaliar quebras no DNA e, ainda, poder ser utilizada como primeiro parâmetro para avaliar a resposta de um organismo a exposição a agentes genotóxicos com a vantagem de não necessitar de conhecimento prévio do cariótipo (Frenzilli et al., 2009).

À técnica são atribuídas as seguintes limitações: incapacidade de detecção de aneuploidias, possibilidade de gerar resultado falso positivo em análise de tecidos

sólidos, que exigem adoção de tratamento prévio para separação das células, esse tratamento pode gerar danos adicionais ao material genético; possibilidade de ocorrência de resultados falso positivo devido a eventos celulares naturais como a apoptose. Nesse sentido Rundell et al. (2003) desenvolveram um experimento para verificar se os “cometas” resultantes do ensaio seriam realmente danos genéticos, quebras na molécula de DNA, passíveis de reparação ou se seriam eventos resultantes da desfragmentação da molécula resultante de apoptose. Para tal utilizaram células de ovário de *hamsters* chineses tratadas com etilmetanosulfonato, 2-acetoxilo acetilaminofluoreno, ou peróxido de hidrogênio. Um conjunto de lâminas foi submetido à técnica do ensaio cometa enquanto outro conjunto passou por processos que possibilitariam a recuperação do material genético. Os resultados desse experimento apoiam a conclusão de que danos reparáveis na molécula de DNA é a principal causa dos danos detectados no Ensaio Cometa.

Uma vez que quebras no DNA são indicadores sensíveis de exposição a poluentes, a técnica de Ensaio Cometa tem se mostrado uma ferramenta imprescindível em programas de biomonitoramento ambiental através uso de organismos aquáticos como sentinelas para avaliação de risco (Lee e Steinert, 2003; Da Rocha et al., 2009). Embora vários tipos de tecido possam ser usados para essa técnica o sangue tem sido utilizado com maior frequência devido à facilidade de obtenção, já que é uma técnica pouco invasiva e devido à homogeneidade desse tecido, uma vez que é composto por cerca de 97% de eritrócitos nucleados (Mitchelmore e Chipman, 1998).

Vários trabalhos tem utilizado essa técnica como ferramenta de monitoramento ambiental e evidenciado a aplicabilidade e sensibilidade desse teste para detectar efeitos genotóxicos utilizando espécies da ictiofauna local. Kochhann et al. (2013) analisaram o efeito do petróleo em tambaquis (*Colossoma macropomum*) através de ensaios bioquímicos, hematológicos e genotóxicos; Ferraro et al. (2004) analisaram o efeito do chumbo inorgânico (PbII) e do tributilestanho (TBT) em traíras (*Hoplias malabaricus*) e Cestari et al. (2004) também utilizaram a mesma espécie; Ferraro (2009) analisando o efeito do Roundup e Folicur, herbicida e fungicida utilizados na agricultura, em três espécies *Rhamdia quelem*, *Astyanax bimaculatus* e *Cyprinus carpio*; Kumar et al. (2010) analisaram o efeito de Malathion, um inseticida organofosforado em *Channa punctatus*; Nwani et al. (2011) analisando um herbicida a base de atrazina na mesma

espécie demonstraram a grande eficiência do ensaio no monitoramento de águas através dos peixes.

Considerando que o impacto de agentes genotóxicos sobre a integridade do DNA celular é um dos primeiros eventos em organismos expostos a contaminantes, a técnica do ensaio cometa tem sido amplamente utilizada para detectar lesões no DNA em análises eco-genotóxicas. Danos cromossômicos expressos após a replicação celular representam efeito acumulado associados à exposição por longo período. Dessa forma enquanto o ensaio cometa detecta lesões recentes que podem ser reparadas pelo aparato celular, a técnica de micronúcleo detecta danos não reparados, como lesões clastogênicas e aneugênicas (Frenzilli et al., 2009).

Devido à capacidade de detectar diferentes aspectos de eventos genotóxicos e clastogênicos e à variedade de possíveis efeitos de um xenobiótico, as duas técnicas costumam ser empregadas em conjunto para avaliar a atuação deste sobre um ser vivo (Buschini et al. (2004), Russo et al. (2004), Bucker et al. (2006), Villela et al. (2006), Ahmed et al. (2011)). Também se deve considerar que os efeitos encontrados podem ficar restritos a espécie estudada bem como possibilidade de efeitos sinérgicos ou antagônicos com outras substâncias disponíveis no meio (Rabello-Gay et al., 1991; Frenzilli et al., 2009).

### **1.1.7 Estudos prévios com os agrotóxicos Glifosato e Imazetapir**

Estudos feitos com os dois agrotóxicos que terão seu potencial genotóxico avaliado no presente trabalho têm demonstrando a existência de risco de contaminação do meio aquático e toxicidade. Em experimento realizado para estudar o transporte de glifosato pelo escoamento superficial e por lixiviação em um solo agrícola submetido à simulação de chuva, Queiroz et al. (2011), obtiveram resultados indicando que nessas condições, o glifosato poderia representar um risco de contaminação de águas subterrâneas, principalmente, quando o nível do lençol freático estiver próximo da superfície e chuvas intensas ocorrerem imediatamente após a aplicação da substância.

De acordo com Amarante Júnior et al. (2002), devido à rápida adsorção do glifosato no solo, ele não é facilmente lixiviado, sendo pouco provável a contaminação de águas subterrâneas. Entretanto, conforme Silva et al. (2003), o herbicida glifosato

tem sido detectado em águas superficiais até 60 dias após a aplicação do produto. Indicando o potencial contaminante desse herbicida através de lixiviação e a capacidade de persistência no ambiente por determinado período de tempo.

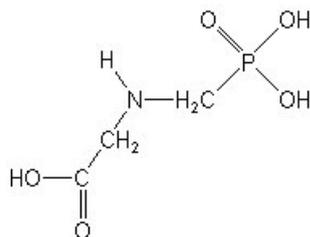
Análises da ocorrência de agrotóxicos em áreas subterrâneas próximas a cultivo de arroz irrigado evidenciaram a presença de imazetapir durante o desenvolvimento da lavoura, após a drenagem da água das lavouras para a colheita, e nos períodos sem cultivo, indicando a persistência desse agrotóxico nas águas subterrâneas. Tal fato pode ser explicado pela alta mobilidade desse agrotóxico no solo em pH próximo ao alcalino, a tendência de lixiviação para camadas mais profundas do perfil do solo e a baixa degradação microbiana em condições de anaerobiose (Silva et al., 2011).

De acordo com Moraes (2009) estudos realizados na região das nascentes do Rio Araguaia, divisa dos estados de Goiás e Mato Grosso, evidenciaram que o imazetapir pode ser considerado potencial contaminante de águas e solos. O agrotóxico demonstrou ter baixa afinidade pelo solo estudado, uma vez que apenas uma pequena quantidade desse herbicida ficou adsorvida ao solo, o restante ficou disponível para movimentação podendo lixiviar para outras camadas e até para o lençol freático.

Moraes (2008) analisou o efeito tóxico de uma mistura formulada dos herbicidas imazetapir e imazapic, pertencentes ao grupo das imidazolinonas, amplamente utilizados para controlar arroz-vermelho em cultivos de arroz irrigado, através de parâmetros enzimáticos, de estresse oxidativo e metabólicos em juvenis de carpa húngara (*Cyprinus carpio* L. 1758). Os resultados do estudo evidenciaram potencial toxicológico da formulação sobre a espécie analisada.

### **1.1.8 GLI-UP 480 SL®**

GLI-UP 480 SL®, fabricado pela CropChem Ltda®, tem como princípio ativo a substância denominada genericamente de glifosato ( $C_3H_8NO_5P$ ) (Figura 2) adicionado de sal de isopropilamônio,  $(CH_3)_2CHNH_3$ . Tecnicamente chamado de Sal de Isopropilamina de N-(fosfometil) glicina pela CAS (Chemical Abstracts Service) com número de registro 038641-94-0. Na composição, estão presentes 480 g/L de sal de isopropilamina de N-(fosfometil) glicina, 360 g/L de equivalente ácido e 684 g/L de ingredientes inertes.



**Figura 4** – Fórmula estrutural da molécula de glifosato. Fonte: Bula do fabricante.

O produto é um herbicida sistêmico, de ação total, não seletivo, comumente utilizado em vários tipos de cultura. Essa substância possui solubilidade em água de  $1,0 \text{ E} + 006 \text{ mg/L}$ , ponto de fusão de  $149 \text{ }^\circ\text{C}$ , Ph 4,9 (1% de diluição); pressão de vapor:  $1,58\text{E} - 008 \text{ mm Hg}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $\log K_{ow} -3,87$ . Tem sua meia vida no solo estimada em mais de 365 dias e em ambiente aquoso este período foi estimado em 28 dias com pH 5 a 9 e  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em pH 7 e a  $20^\circ\text{C}$  é estável (IUPAC-<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/2395.htm>; PAN-[www.pesticideinfo.org/Index.html](http://www.pesticideinfo.org/Index.html)).

É apresentado na forma de concentrado solúvel em água e insolúvel em solventes orgânicos como acetona, etanol e xileno, apresenta coloração amarelada, pH 4,9 (1% diluição) e densidade de  $1,17 \text{ g/mL}$  a  $20^\circ\text{C}$ . A molécula de glifosato apresenta-se bastante estável em presença de luz, inclusive em temperaturas superiores a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  (Amarante Júnior et al., 2002).

De acordo com a classificação do potencial de periculosidade ambiental ( $C_{PPA}$ ) baseada nos parâmetros de bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico (Daros, 2009), o Gli-Up é classificado como Perigoso ao Meio Ambiente – Classe III, não sendo considerado bioacumulativo. Quanto à classificação toxicológica é descrito como Medianamente Tóxico – Classe III.

Considerando-se todos os produtos usados como agrotóxicos ou defensivos agrícolas o glifosato puro e suas formulações é o produto mais vendido no mundo para a agricultura moderna (Peixoto, 2005). O glifosato é o princípio ativo de vários herbicidas de amplo espectro, isto significando que atingem uma grande variedade de plantas. Este herbicida vem sendo largamente utilizado desde a década de 70 do século passado no controle pós-emergente em vários tipos de culturas em praticamente todas as partes do mundo (Galli e Montezuma, 2005).

O glifosato e suas formulações é utilizado na agricultura no pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de algodão, ameixa, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, coco, feijão, fumo, maçã, mamão, milho, nectarina, pastagem, pêra, pêssego, seringueira, soja, trigo e uva e no pós-emergência das plantas infestantes em florestas de eucalipto e pinus. Podendo ser utilizado como maturador de cana-de-açúcar e dessecante nas culturas de aveia preta, azevém e soja. Além de aplicações em margens de rodovias e ferrovias, áreas sob a rede de transmissão elétrica, pátios industriais, oleodutos e aceiros e na jardinagem amadora.

Esse herbicida tem sido comercializado em três formulações: glifosato-isopropilamônio, glifosato-sesquisódio, e glifosato-trimesium. Na forma de sal de amônio ou sódio, glifosato é um organofosfato que não afeta o sistema nervoso da mesma maneira que outros organofosforados (em geral inseticidas inibidores da enzima colinesterase), por isso a baixa toxicidade encontrada em mamíferos (Amarante Júnior et al., 2002).

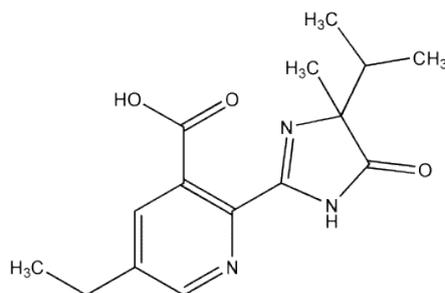
Uma vez em contato com as folhas e caulículos da planta o glifosato é absorvido e transportado por toda a planta, atua como um potente inibidor da atividade da 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), que é catalisadora de uma das reações de síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, influencia também outros processos, como a inibição da síntese de clorofila, estimula a produção de etileno e reduz a síntese de proteínas (Galli e Montezuma, 2005). A morte das plantas sensíveis ocorre no período de 4 a 20 dias após o tratamento (Vargas, 2003).

O glifosato é vendido sob diversos nomes comerciais, diferenciados entre si pela formulação e concentrações do princípio ativo, além de outras substâncias presentes na formulação comumente chamadas “ingredientes inertes”, principalmente surfactantes, solventes e compostos anti-espuma (Pérez et al., 2011). Ferraro (2009) demonstrou o potencial genotóxico do *Roundup*, cujo princípio ativo é o glifosato, em peixes através de exposição por via hídrica. Efeitos tóxicos e genotóxicos do glifosato foram descritos para células de *Allium cepa* por Krüger (2009).

O glifosato puro e suas formulações têm sido amplamente utilizados em culturas de soja e milho (Galli e Montezuma, 2005). Queiroz et al. (2011) demonstraram que a presença de glifosato em águas superficiais pode ser detectada até 60 dias após a aplicação, indicando que essa substância é capaz de persistir no ambiente.

### 1.1.9 Imazetapir

O Imazetapir é um herbicida seletivo pertencente ao grupo químico das imidazolinonas ( $C_{15}H_{19}N_3O_3$ ) (Figura 3) utilizado nas plantas infestantes das culturas de soja, arroz e milho. Atua controlando o crescimento de gramíneas e plantas daninhas de folhas largas através da inibição da enzima acetolacto sintase, interferindo na síntese de DNA e crescimento celular (Yassumoto et al., 2007).



**Figura 5** – Fórmula estrutural do imazetapir. Fonte: [www.pesticideinfo.org](http://www.pesticideinfo.org)

Na forma de Sal de Amônio ácido é registrado na CAS com o número 81335-77-5. Na composição, estão presentes 106 g/L de Sal de amônio do ácido (RS)-5-etil-2-(isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolinona-2-yl)nicotínico, 100 g/L de equivalente ácido e 948,9 g/L de outros ingredientes não especificados. Apresenta solubilidade em água de 1400 mg/L, ponto de fusão de 171 °C, Ph 5,9; pressão de vapor: 2,15E – 008 mm Hg a 25 ° C; log Kow 1,49

Quanto à classificação do potencial de periculosidade ambiental ( $C_{PPA}$ ) é considerado Perigoso para o meio ambiente – Classe III. Esse produto é classificado toxicologicamente pelo Ministério da Saúde como CLASSE I - Extremamente tóxico. O imazetapir apresenta coloração castanho claro, odor característico, pH 5,90, é solúvel em água e outros solventes como acetona e metanol (FISPQ do Imazetapir Plus Nortox). Ainda de acordo com a Ficha de informações de segurança de produtos químicos, o produto não é bioacumulativo em organismos aquáticos.

De acordo com o fabricante do IMAZETAPIR PLUS NORTOX®, testes de toxicidade estabeleceram a DL50 oral aguda e dérmica para ratos, maior que 2000 mg/kg de peso vivo. A CL 50 inalatória, no Teste de Toxicidade Inalatória Aguda, para o produto foi superior a 20 mg/L, em ratos. O herbicida não é considerado tóxico para aves e

praticamente não tóxico para peixes, sendo estabelecida a CL50-96hs em 017,12 mg/L (95% LC = 15,73 18,64) mg/L para *Brachydanio rerio*.

Devido à carência de registros sobre possíveis danos ao material genético causados pelas imidazolinonas, assim como de informações sobre toxicidade em outras espécies de peixes, estudos sobre o potencial tóxico dessa molécula sobre peixes se fazem necessários, uma vez que esse herbicida é amplamente utilizado podendo contaminar corpos hídricos.

#### **1.1.10 *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) como organismo experimental**

Para o presente estudo foram utilizados peixes da espécie *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), popularmente conhecidos como tambaqui. Essa espécie de Characidae é o maior representante da ordem Characiforme e o segundo maior peixe de escamas da América do Sul, chegando até 100 cm de comprimento e mais de 30 kg (Goulding e Carvalho, 1982). É uma espécie endêmica das bacias do Amazonas e Orinoco, sendo muito comum em lagos de várzea (Santos et al.,2006).

A coloração nos adultos é bastante variável com a cor da água, sendo mais escura nos indivíduos que vivem em rios de água preta e mais clara nos de água barrenta (Santos et al.,2006). Em ambientes naturais, a dieta dos tambaquis é caracterizada por alterações conforme a fase de desenvolvimento. Na fase larval, a alimentação consiste de zooplâncton e outros invertebrados maiores conforme o crescimento do peixe (Araújo-Lima e Goulding, 1998). Na fase juvenil continuam a pregar invertebrados, mas passam a incorporar pequenas sementes e frutas em sua dieta (Araújo-Lima e Gomes, 2005).

A dieta dos adultos é baseada em frutos e sementes, tendo zooplâncton como complemento. A atividade alimentar dessa espécie é baixa no período de vazante e seca, quando ela empreende migrações ascendentes de dispersão e utiliza suas reservas de gordura, alimentando-se ocasionalmente de folhas e animais; por outro lado, a atividade alimentar é muito alta no período da enchente, quando ocupa as florestas inundadas nas margens dos rios e lagos e onde há maior disponibilidade de itens alimentares, nessa época penetra nos afluentes de menor porte para explorar as matas alagadas e se desloca para os rios de águas barrentas para desovar (Santos et al.,2006). O tambaqui

apresenta destacada relevância econômica sendo considerado o peixe mais importante na pesca e piscicultura da região amazônica. Por ter elevado valor comercial e ser bastante apreciado pela culinária local os estoques naturais estão sendo sobre – explorados (Araújo –Lima e Goulding, 1998).

O tambaqui apresenta características de acordo com os critérios estabelecidos por Sanchez e Galan et al. (1999), para utilização em testes de genotoxicidade: é uma espécie cuja resposta a diversos tipos de estressantes é conhecida, demonstrando ter sensibilidade a uma vasta gama de xenobiontes; apresenta fácil manuseio, manutenção em laboratório e aquisição de alevinos; tem ampla distribuição geográfica, sendo encontrado nas bacias do Orinoco e Amazonas e existe em grandes estoques naturais (Santos et al., 2006). Alguns experimentos utilizando tambaqui indicam que essa espécie não é apenas importante na pesca e aqüicultura da região, mas também um modelo experimental adequado para o monitoramento da poluição de ecossistemas aquáticos da Amazônia, tendo sido utilizado freqüentemente como espécie-modelo para o entendimento de processos fisiológicos modulados por variáveis ambientais na Amazônia (Casanova, 2008; Silva et al., 2010).

Vários estudos tem demonstrado a sensibilidade de tambaquis para uma vasta gama de xenobiontes, corroborando com o uso dessa espécie para estudos de genotoxicidade e toxicidade ambiental. Kochhann et al. (2013) analisaram o efeito do petróleo em tambaquis (*Colossoma macropomum*) através de ensaios bioquímicos, hematológicos e genotóxicos; Groff et al. (2010) avaliaram o efeito genotóxico da radiação UVA/UVB nessa espécie; Menezes (2005) e Casanova (2008) analisaram o potencial genotóxico do cobre e cádmio; Moura (2009) analisou a toxicidade do herbicida Roundup e, Chapadense et al. (2009) estudando a toxicidade do herbicida atrazina em tambaquis evidenciaram a aplicação dessa espécie em ensaios ecotoxicológicos.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de toxicidade dos agrotóxicos GLIZ 480 SL® e IMAZETAPIR PLUS NORTOX® através da determinação da Concentração Média Letal e dos ensaios cometa e micronúcleos no sangue periférico de *Colossoma macropomum*.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer a concentração média letal (CL<sub>50-96 hs</sub>) das formulações comerciais dos herbicidas glifosato e imazetapir em alevinos de *Colossoma macropomum*;
- Avaliar e comparar as frequências de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares em hemácias periféricas dos peixes expostos à contaminação pelos herbicidas;
- Avaliar e comparar os danos no DNA através do ensaio cometa de hemácias periféricas em peixes expostos à contaminação pelos herbicidas;
- Comparar as respostas obtidas através da frequência de micronúcleos, incluindo as Alterações Morfológicas Nucleares, e os danos causados ao DNA diante das diferentes concentrações dos herbicidas;

## CAPÍTULO I

### AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E POTENCIAL GENOTÓXICO DOS HERBICIDAS GLIFOSATO E IMAZETAPIR EM TAMBAQUI, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818).

Rúbia Conceição Aranha

Ruy Bessa Lopes

Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues

---

Capítulo escrito de acordo com as normas da revista Chemosphere ISSN: 0045–6535 ([www.elsevier.com/locate/chemosphere](http://www.elsevier.com/locate/chemosphere)) para o qual o artigo será submetido após correções finais e tradução para a língua inglesa.

Avaliação da toxicidade aguda e potencial genotóxico dos herbicidas glifosato e imazetapir em tambaqui, *Colossoma macropomum* (cuvier, 1818).

Rúbia Conceição Aranha <sup>a</sup>

Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues<sup>a,b\*</sup>

Ruy Bessa Lopes<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós - Graduação em Recursos Naturais da Amazônia - PPGRNA, Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA - Rua Vera Paz, s/n – Campus Tapajós - Bairro Salé - CEP: 68135110 - Santarém, Pará, Brasil

<sup>b</sup>Laboratório de Genética e Biodiversidade-LGBio, Instituto de Ciências da Educação, Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA - Rua Vera Paz, s/n – Campus Tapajós - Bairro Salé - CEP: 68135110 - Santarém, Pará, Brasil

<sup>c</sup>Instituto de Ciência e Tecnologia das Águas – ICTA, Universidade Federal do Oeste do Pará, Rua Vera Paz, s/n – Campus Tapajós - Bairro Salé - CEP: 68135110 - Santarém, Pará, Brasil

\*Corresponding author:

Tel.: + 55 (93) 21014943; fax: + 55 (93) 30649052

Rua Vera Paz, s/n – Universidade Federal do Oeste do Pará, Campus Tapajós - Bairro Salé - CEP: 68135110 - Santarém, Pará, Brazil

E-mail address: [luisreginaldo.ufpa@hotmail.com](mailto:luisreginaldo.ufpa@hotmail.com)

## RESUMO

O ambiente aquático é um dos ambientes que mais vem sofrendo impactos causados pela ação humana. A atividade agrícola, fortemente dependente do uso de agrotóxicos, tem se mostrado uma importante fonte de contaminação desse meio. O uso de peixes como espécie sentinela tem sido um procedimento comum para investigação dos efeitos genotóxicos de poluentes aquáticos. Neste trabalho foi analisado o efeito tóxico dos herbicidas imazetapir e glifosato em alevinos de tambaquis, *Colossoma macropomum*, através do teste de toxicidade aguda ( $CL_{50-96hs}$ ). O valor da ( $CL_{50-96hs}$ ) determinado para o imazetapir foi de  $185 \text{ m.L}^{-1}$ , enquanto para glifosato foi de  $92,90 \text{ mg.L}^{-1}$ . O potencial mutagênico e genotóxico do glifosato foi avaliado em juvenis de tambaqui expostos a três concentrações sub-letais do glifosato: C1 ( $1/50 CL_{50} = 1,86 \text{ mg.L}^{-1}$ ), C2 ( $1/100 CL_{50} = 0,93 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e C3 ( $1/1000 CL_{50} = 0,093 \text{ mg.L}^{-1}$ ). O tratamento C1 mostrou aumento das células micronucleadas após 7 dias de exposição e aumento nos danos ao DNA após 5 e 7 dias do início do experimento. Ambos os herbicidas foram classificados como pouco tóxicos, mas apresentou risco potencial a vida aquática.

Palavras Chave: Teste de Micronúcleo, Ensaio Cometa, Teste de toxicidade aguda, *Colossoma macropomum*

## 1. Introdução

O uso de agrotóxicos no controle de pragas é uma atividade comum no setor agrícola brasileiro (Ferment et al., 2010). Apesar de serem benéficos ao manejo das lavouras, os agrotóxicos podem conter moléculas danosas à saúde humana e do meio ambiente (Veiga et al., 2006). Os herbicidas representam o principal grupo químico utilizados na agricultura e seu uso tem sido associado à contaminação dos solos e de sistemas aquáticos superficiais e subterrâneos (Jurado et al., 2011).

O ambiente aquático corresponde ao compartimento final de vários subprodutos químicos derivados da atividade humana, como despejos de esgotos industriais e domésticos, assim como de agrotóxicos (Ribeiro, 1997; Akaishi, 2003; Morais, 2009; Queiroz et al., 2011). Após serem aplicados na lavoura, os agrotóxicos podem atingir o meio aquático por processos de lixiviação, carreamento e infiltração da água intersticial, além disso, não se descarta outros modos, como pela lavagem de equipamentos de pulverização e por derivação quando aplicados por via aérea (Ferraro, 2009; Ribeiro e Vieira, 2010).

Com o avanço da fronteira agrícola na Amazônia visando-se o estabelecimento de grandes áreas de monocultura de soja e arroz; e considerando-se à imensa malha hídrica que drena a vasta extensão territorial desse bioma, há conseqüentemente, o risco potencial de contaminação de corpos d'água, tais como igarapés adjacentes às áreas de cultivo, pelo carreamento de agrotóxicos utilizados na lavoura. Na região de Santarém, oeste do estado do Pará, enormes áreas de floresta amazônica foram recentemente convertidas em lavouras para o cultivo de grãos. Essa atividade produtiva é fortalecida pelo setor governamental, visando o desenvolvimento econômico da região; e pelo setor privado que busca o crescimento da produtividade agrícola brasileira (Torres, 2005). Esse novo cenário sócio econômico traz novas possibilidades de modificações do meio aquático em que ambientes que até pouco tempo não tinham contato com moléculas danosas, tais como agrotóxicos, ficam expostos ao risco de contaminação.

Vários estudos recentes têm evidenciado a presença de agrotóxicos em águas superficiais próximo a áreas de cultivo (Veiga et al., 2006; Queiroz et al., 2011). Na região do Arroio Passo do Pilão (RS), observou-se a presença de Glifosato em alta concentração (>100 ppb) em amostras de água coletadas próximo a lavoura de milho, e no município de Paty do Alferes (RJ) demonstrou-se que 70% das amostras de água coletadas nas proximidades da lavoura de tomate apresentaram contaminação por

agrotóxicos organofosforados e carbamatos e, além disso, os níveis mensurados em duas amostras estiveram acima dos limites permitidos pela legislação brasileira (Veiga et al., 2006).

Os efeitos genotóxicos de moléculas poluentes do meio aquático têm sido frequentemente investigados com base no teste de micronúcleo (MN) e ensaio cometa (Buschini et al., 2004; Russo et al., 2004; Bücken et al., 2006 e Ahmed et al., 2011). Essas metodologias tem se mostrado eficientes para avaliar contaminação ambiental por substâncias genotóxicas, sendo capazes de detectar efeitos de exposição a pequenas concentrações de contaminantes em uma vasta gama de espécies, com a vantagem de permitir quantificar o potencial genotóxico sem a necessidade de conhecimentos detalhados sobre as propriedades físico químicas dos contaminantes (Frenzilli et al., 2009). Os peixes têm sido os organismos aquáticos preferenciais para execução de tais estudos, devido à sua capacidade de metabolização de xenobióticos e acumulação de poluentes (Grisólia e Cordeiro, 2000).

Os testes de toxicidade aguda têm sido amplamente empregados para avaliação do potencial tóxico de moléculas ou formulações comerciais em espécies não padronizadas, trazendo a vantagem de permitir analisar e comparar a resposta de organismos nativos de determinado habitat quando comparados aos organismos tradicionalmente utilizados nesse tipo de testes. Tais ensaios baseiam-se na relação existente entre os efeitos biológicos observáveis e a concentração do toxicante no ambiente (Connell, 1997).

O glifosato é o princípio ativo de vários herbicidas amplamente comercializados como defensivo agrícola de diferentes culturas, principalmente soja, arroz e milho (Peixoto, 2005; Galli e Montezuma, 2005). A presença de glifosato em águas superficiais pode ser detectada até 60 dias após sua aplicação (Silva et al. 2003; Queiroz et al. 2011). Trata-se de um herbicida sistêmico, de ação total, não seletivo, comumente utilizado em vários tipos de cultura. Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sob nº 013507, recebe Classificação do Potencial de Periculosidade Ambiental III (produto perigoso ao ambiente) e Classificação Toxicológica III (Medianamente tóxico).

A legislação ambiental brasileira estabelece limites aceitos de glifosato em corpos d'água e de acordo com a Resolução CONAMA 357/2005 esse limite em águas da classe 3 é de 0,28 mg.L<sup>-1</sup>. Em águas potáveis para consumo humano a concentração limite de glifosato é de 500µg/L, conforme a Portaria Nº 518/2004 do Ministério da

Saúde. Deve-se levar em consideração que tais instrumentos normativos referem-se apenas ao componente principal das formulações comerciais.

O Imazetapir é um herbicida seletivo pertencente ao grupo químico das imidazolinonas ( $C_{15}H_{19}N_3O_3$ ) amplamente utilizado no controle de plantas infestantes das culturas de soja, arroz e milho (Yassumoto, Osajima e Takashima, 2007). É considerado perigoso para o meio ambiente – Classe III (FISPQ do Imazetapir Plus Nortox). De acordo com o fabricante, o Imazetapir não é tóxico para aves e praticamente não tóxico para peixes. Entretanto, estudos sobre o potencial tóxicos dessa molécula em peixes nativos são necessários, uma vez que esse herbicida tem sido largamente utilizado em monoculturas. Além disso, as legislações brasileiras, normatizadas pela portaria nº 518 de 2004 do Ministério da Saúde e pela resolução nº 357/2005 do CONAMA, não instituem limites de concentração de Imazetapir em águas destinadas ao consumo humano.

Alguns experimentos utilizando tambaqui indicam que essa espécie não é apenas importante na pesca e aqüicultura da região, mas também um modelo experimental adequado para o monitoramento da poluição de ecossistemas aquáticos da Amazônia, sendo utilizado para o entendimento de processos fisiológicos modulados por variáveis ambientais na Amazônia (Silva et al., 2010).

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer a toxicidade média letal,  $CL_{50-96hs}$ , dos herbicidas Imazetapir® e Gli-Up®, além de verificar a existência de potencial mutagênico e genotóxico do Gli-Up® em eritrócitos de *Colossoma macropomum* (tambaqui).

## 2. Material e métodos

### 2.1 Organismo-teste e herbicidas utilizados

Tambaquis, *Colossoma macropomum*, (Cuvier, 1818,) foram obtidos da Estação de Aqüicultura Santa Rosa, Santarém – Pará. Os alevinos utilizados nos testes de toxicidade aguda apresentaram em média ( $\pm$  DP) peso de  $1,3 \pm 0,2$  g e comprimento total de  $1,38 \pm 0,21$ cm. Enquanto que os juvenis de tambaqui utilizados nos testes de genotoxicidade apresentaram em média ( $\pm$  DP) peso de  $9,39 \pm 0,93$  g e comprimento total de  $11,09 \pm 3,43$  cm.

Todos os peixes utilizados no experimento foram recebidos na fase de alevinos, em média com 30 dias, aclimatados em tanques com aeração artificial e alimentados

com ração comercial (tipo extrusada). Para a realização dos testes de toxicidade aguda a alimentação foi suspensa 24 horas antes do início do experimento e a relação massa volume foi mantida próximo de 1g/L, em conformidade com as recomendações das normas de ensaio de toxicidade aguda com peixes, contidas na Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT NBR 15088:2011 (ABNT, 2011).

No presente trabalho foram utilizadas a formulação comercial de glifosato com o nome comercial GLI-UP 480 SL®, concentrado solúvel 480 g/L, fabricado pela CropChem Ltda® e IMAZETAPIR PLUS NORTOX®, adquiridos no comércio local de Santarém . As concentrações teste utilizadas no experimento foram calculadas com base na quantidade do princípio ativo constante na formulações comerciais.

## *2.2 Testes de toxicidade aguda e concentrações sub-letais*

Foram realizados testes preliminares com cinco concentrações diferentes até ser determinada a menor concentração dentre as que geram 100% de mortalidade e a maior concentração dentre as quais não geram mortalidade alguma. Os testes foram repetidos várias vezes para que as faixas de concentrações adequadas fossem determinadas com precisão. Nesses testes, além da observação da mortandade, também foram observados variações comportamentais como: permanência no fundo, agitação, batimento opercular alterado, presença na superfície, imobilidade e natação errática.

A partir da determinação dos intervalos, foram estabelecidas as cinco concentrações utilizadas no teste definitivo de toxicidade aguda. Para o herbicida a base de glifosato foram estabelecidas as concentrações 40, 80, 120, 160 e 220 mg.L<sup>-1</sup>, com três repetições e quatro peixes por repetição. Para o controle negativo, quatro alevinos foram dispostos em recipiente com o mesmo volume de água e sem adição do herbicida. Para o herbicida a base de imazetapir as concentrações estabelecidas foram 48, 144, 288, 432 e 576 mg.L<sup>-1</sup> do produto comercial. Foram utilizados 3 peixes por recipiente, perfazendo um total de 12 peixes por tratamento, exceção do controle negativo onde foram utilizados 3 peixes, uma repetição.

Os testes foram conduzidos em potes de vidro com 3L de água, em sistema estático, sem substituição e sifonagem de água durante o período de exposição (96 horas) dos peixes. Os animais foram mantidos sem alimentação, sendo utilizada nos testes a água da rede de abastecimento do campus Tapajós da Universidade Federal do Oeste do Pará, proveniente de poço artesiano.

Avaliou-se a mortalidade a cada 24 horas com a retirada dos peixes mortos dos recipientes. Foram realizadas coletas de informações sobre temperatura, pH, amônia, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica da água. Os dados obtidos dessas variáveis foram analisados por análise de variância a fim de detectar possíveis variações significativas ao longo do experimento.

O valor da  $CL_{50-96hs}$  do herbicida em alevinos de *C. macropomum* foi determinado através do software PROBIT (Versão 1.5), desenvolvido pela *United States Environmental Protection Agency* (EPA), com base no método de análise de probitos desenvolvido por Finney (1971), para 24, 48, 72 e 96 horas. Com base no valor estabelecido, para o herbicida a base de glifosato, três concentrações sub-letais foram determinadas para os testes de mutagênese e genotoxicidade em juvenis de tambaqui.

### 2.3 Exposição ao agrotóxico GLI-UP® e testes genotóxicos

Os peixes foram expostos a três concentrações sub-letais do produto testado C1 ( $1/50 CL_{50} = 1,86 \text{ mg.L}^{-1}$ ), C2 ( $1/100 CL_{50} = 0,93 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e C3 ( $1/1000 CL_{50} = 0,093 \text{ mg.L}^{-1}$ ). As concentrações foram escolhidas levando-se em consideração a legislação vigente e resultados de experimentos que avaliaram a quantidade de glifosato em corpos d'água (Silva et al., 2003; Queiroz et al., 2011). As concentrações adotadas equivalem a cerca de 6X, 3X e um terço do limite permitido pela legislação brasileira, em C1, C2 e C3, respectivamente.

Para cada concentração foram utilizados 6 animais e feitas 3 réplicas. Os animais foram mantidos em sistema estático, com sifonagem de material fecal e outros resíduos a cada dois dias para evitar o aumento do teor de amônia no meio. O experimento foi conduzido por 14 dias. As coletas foram feitas nos seguintes períodos a contar o início do tratamento: 1 dia (24 hs), 3, 5, 7 e 14 dias. Uma caixa mantida com seis peixes sem adição do herbicida foi utilizada como controle negativo.

Em cada intervalo amostral, um espécime de cada réplica dos grupos tratados com glifosato e um do controle negativo foram retirados para coleta de sangue. O sangue foi coletado através de punção na veia caudal com seringa heparinizada. Após a coleta, os animais foram sacrificados. As propriedades físico-químicas da água, tais

como temperatura, Ph, condutividade e oxigênio dissolvido foram amostradas nos períodos das coletas.

Para o teste de Micronúcleo aproximadamente 5 µL de sangue periférico, obtido através de punção na veia caudal, foi colocado em lâmina de vidro, previamente limpa, para confecção de esfregaço sanguíneo. As lâminas foram fixadas em metanol PA por 10 minutos, lavadas, deixadas para secar a temperatura ambiente e coradas com corante Giemsa a 5% em solução tampão fosfato (pH 6,8) por 8 minutos. Foram analisados 1.500 eritrócitos por animal em microscópio óptico em aumento de 1000X (Nwani et al., 2011). Foram considerados micronúcleos estruturas circulares que apresentaram mesma refringência que o núcleo, não ligadas a esse, e que possuísem tamanho que correspondia a 1/10 a 1/30 do tamanho do núcleo (Al-Sabti e Metcalfe, 1995). Também foram consideradas para cômputo total de MN as alterações nucleares eritrocitárias (ANEs) conforme descrito por Carrasco et al. (1990).

Os dados obtidos do teste de micronúcleo entre os grupos controle e experimental foram comparados através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguindo do teste *a posteriori* de Student-Newman-Keuls. Para ambos os testes foi considerado o nível de significância  $p < 0,05$ .

A análise de indução de danos ao DNA foi realizada de acordo com protocolo descrito originalmente por Singh et al., em 1988 com modificações sugeridas por Silva (2007) e algumas adaptações. Foram analisadas 100 células para cada animal, observadas em aumento 400X usando microscópio óptico convencional, totalizando 300 células por concentração. A avaliação foi feita visualmente de acordo com comprimento da cauda em relação à cabeça do nucleóide, sendo os mesmos classificados em cinco classes conforme (Miyamae *et al.*, 1998), com modificação apenas quanto ao valor atribuído a cada classe.

Os nucleóides receberam a seguinte classificação: 0 – sem dado aparente (ausência de cauda); 1 – cometas com cauda pequena (comprimento da cauda menor que um quarto do diâmetro da cabeça); 2 – cometas com cauda média (comprimento da cauda entre um quarto e o diâmetro completo da cabeça); 3 – cometas com cauda grande (comprimento da cauda maior que um quarto da cabeça) e 4 – dano máximo (cometas com cabeça pouco definida). A quantificação dos tipos de danos para cada espécime foi feita pela atribuição de escores em cada classe, obtidos através da

multiplicação do número de cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe, sendo o valor mínimo 0, correspondente a nenhum dano encontrado, e o valor máximo 400, correspondendo a todas as células com grau máximo de dano (Ferraro, 2009).

Para os dados resultantes do ensaio cometa, os valores referentes à soma dos escores para cada tratamento e controle receberam o mesmo tratamento estatístico do teste de Micronúcleo. Ambos os testes foram realizados com o programa BIOESTAT versão 5.0 (Ayres et al., 2007).

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Testes de toxicidade aguda ( $CL_{50-96hs}$ )

##### *GLI-UP®*

Nos testes de toxicidade aguda a temperatura variou entre 25,5 e 27,7 ° C, o Oxigênio dissolvido de 4,6 a 7,8 mg.L<sup>-1</sup> e a condutividade elétrica da água variou de 239,5 a 300,6  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , análise de variância mostrou que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os períodos de amostragem e entre as concentrações ao longo do experimento.

Os índices de amônia variaram de 0,92 a 2,99 mg.L<sup>-1</sup>, o pH da água variou de 3,9 a 6,25. Análise de variância não demonstrou diferença significativa nesses dois parâmetros quando comparadas as amostras e o Controle Negativo durante o experimento. Entretanto evidenciou-se que os níveis de amônia e pH tornavam-se mais elevados a medida que o tempo passava. Mostrando uma relação tempo dependente, no caso do pH a partir de 48 hs do início do experimento. Os parâmetros físico-químicos avaliados mantiveram-se dentro dos limites conhecidos para manutenção de tambaquis (Araújo-Lima e Gomes, 2005).

A concentração letal média,  $CL_{50-96hs}$  do Gli-Up® em alevinos de tambaqui foi estabelecida em 92,90 mg.L<sup>-1</sup>, com  $R^2 = 0,8579$  (Figura 1). Esse valor é cerca de 4 vezes a  $CL_{50-96hs}$  da formulação comercial Roundup®, determinada entre 19,94 mg.L<sup>-1</sup> e 20,06 mg.L<sup>-1</sup> (Miyazaki et al. 2004; Moura 2009). De acordo com a classificação de Frich et al. (1996) que estabelece seis categorias de toxicidade dos agrotóxicos baseada nos valores de  $CL_{50}$ : Mínima, Leve, Moderada, Alta, Extrema e Super extrema; os resultados encontrados no presente estudo permite classificar o Gli-Up® na categoria Leve (11 a 100 mg.L<sup>-1</sup>).

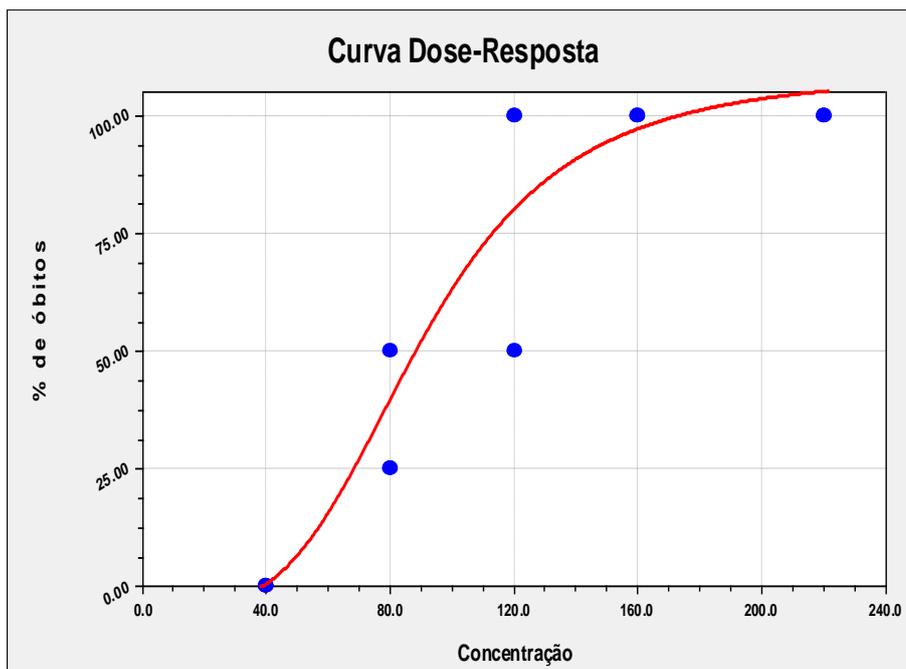


Figura 1: Curva dose-resposta da exposição aguda ( $CL_{50-96h}$ ) do herbicida Gli-UP480 em alevinos de tambaqui.

De acordo com a World Health Organization (1994) o valor da  $CL_{50-96hs}$  para o glifosato varia entre 2 a  $55 \text{ mg.L}^{-1}$ , sendo esta variação atribuída as diferentes espécies de peixes e as condições dos testes. Segundo Gluszczak (2008), alguns estudos tem evidenciado que formulações comerciais de glifosato podem variar quanto a  $CL_{50-96hs}$  dentro de uma mesma espécie. De acordo com esse autor tais divergências podem ser causadas pelos ingredientes adicionados nas formulações de cada produto que podem contribuir na potencialização de sua ação tóxica.

Os surfactantes, compostos químicos que auxiliam o glifosato a aderir e penetrar nas folhas das plantas, podem apresentar toxicidade aguda maior do que o próprio glifosato (Freitas, 2006; Tsui e Chu, 2003; Modesto e Martinez, 2010). Segundo Modesto e Martinez (2010) na formulação comercial Roundup-RDT, o surfactante existente nessa formulação, uma mistura contendo 15% de polioxietileno amina – POEA, e outros surfactantes não especificados apresenta toxicidade maior que a formulação original do Roundup. Tsui e Chu (2003) estabeleceram em ordem de toxicidade a seguinte relação entre herbicidas baseados em glifosato para diferentes espécies de organismos: POEA > Roundup > glifosato ácido > sal de glifosato isopropilamina. Evidenciando a importância toxicológica das formulações adicionadas

ao sal de glifosato. Piola et al. (2013) reforçam a importância da realização de estudos ecotoxicológicos baseados não apenas nos ingredientes ativos, mas também nas diferentes formulações utilizadas na agricultura.

A variação encontrada nos valores de  $CL_{50}$  dos herbicidas a base de Glifosato, Gli-Up® e Roundup®, pode ter sido influenciada por diferenças na formulação comercial desses produtos. Outros fatores também podem ter influenciado nos resultados obtidos como tamanho, peso e idade dos alevinos utilizados nos experimentos quando comparados aos outros experimentos.

#### *IMAZETAPIR PLUS NORTOX®*

Os parâmetros ambientais monitorados durante o experimento mantiveram-se dentro dos limites aceitáveis para sobrevivência dos peixes sem ocorrência de variações significativas, o que evitou a ocorrência de mortalidade causada por mudanças severas nesses parâmetros. Os valores de concentração da amônia variaram de 1,1 a 3,4, enquanto que a alcalinidade total variou de 0 a 8.

A temperatura variou entre 23,9 e 24,9° C, o Oxigênio dissolvido de 4,6 a 8,1  $mg.L^{-1}$  e a condutividade elétrica da água variou de 240,3 a 345,7  $\mu S cm^{-1}$ , análise de variância também mostrou que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os períodos de amostragem e entre as concentrações ao longo do experimento.

Os peixes expostos às duas maiores concentrações do herbicida apresentaram nas horas iniciais de exposição, comportamento diferente do grupo controle e das demais concentrações, tais como: natação errática, mudança na coloração, além de formação de muco. De acordo com Moura (2009) os efeitos não letais de determinado composto que tragam alterações comportamentais ou fisiológicas podem tornar os peixes sobreviventes vulneráveis a doenças e predadores naturais em seus habitats.

Após 24 horas de exposição observou-se a mortalidade de todos os indivíduos do grupo da concentração mais elevada ( $576mg.L^{-1}$ ) e após 48 horas do grupo da concentração mais elevada ( $432mg.L^{-1}$ ). A concentração letal  $CL_{50-96hs}$  do herbicida Imazetapir observada em alevinos de *C. macropomum* foi de  $184.915 mg.L^{-1}$ , com  $R^2 = 0,9255$  (Figura 2).

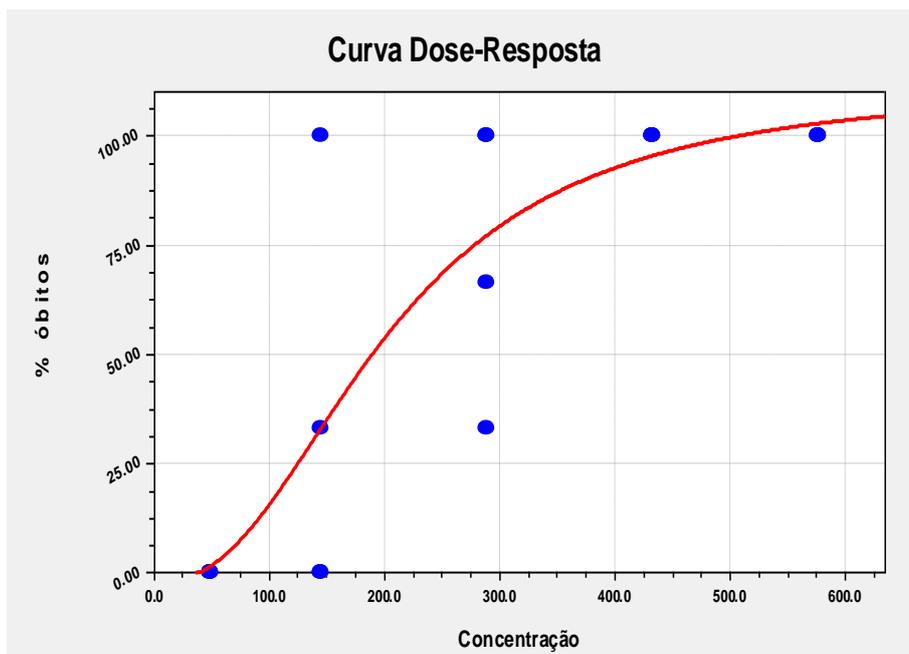


Figura 2: Curva dose-resposta da exposição aguda ( $CL_{50-96h}$ ) do herbicida Imazetapir em alevinos de tambaqui.

De acordo com a classificação proposta por Helfrich et al (2006), baseada nos valores da  $CL_{50}$  em mg/L, a toxicidade da formulação comercial a base de Imazetapir foi considerada mínima. Conforme a Ficha de informações de segurança de produtos químicos da formulação testada – FISPQ nº 16/2002, a  $CL_{50-96hs}$  foi estimada em 17,12 mg/L (95%  $CL_{50}$  entre 15,73 e 18,64 mg/L) para *Danio rerio*. O valor da  $CL_{50-96hs}$  estabelecido indica menor sensibilidade de *C. macropomum* à formulação testada em relação a *D. rerio*.

### 3.2 Testes de genotoxicidade para GLI-UP®

Durante os testes de genotoxicidade os parâmetros físico-químicos apresentaram a seguinte variação: a temperatura da água variou entre 23 e 25,2° C, o oxigênio dissolvido variou de 5,3 a 7,7 mg.L<sup>-1</sup>, o pH apresentou variação entre 3,92 a 6,32.

A análise de frequência de MN e ANEs indicou que os juvenis de tambaqui expostos a concentração de 1,858 mg.L<sup>-1</sup> do agrotóxico GLI-UP® apresentaram aumento significativo na frequência de micronúcleos em comparação com o grupo controle negativo após 7 dias de exposição ( $p= 0,0055$ ), **Tabela 1**.

**Tabela 1** – Frequência de MN e ANE's em eritrócitos de sangue periférico de *C. macropomum* expostos a períodos e concentrações diferentes da formulação comercial a base do herbicida glifosato ( $n = 4.500$ )

células analisadas por intervalo/concentração. Exceção do Controle negativo, em que foram analisadas 1.500 células por intervalo).

Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	% de frequência de MN (Média ± DP)									
	1 dia		3 dias		5 dias		7 dias		14 dias	
CN	0.067	±0.000	0.067	±0.000	0.200	±0.000	0.067	±0.000	0.067	±0.000
1,86	0.111	±0.038	0.111	±0.077	0.178	±0.102	<b>*0.244</b>	±0.077	0.178	±0.102
0,93	0.133	±0.000	0.133	±0.000	0.133	±0.067	0.133	±0.067	0.133	±0.067
0,093	0.222	±0.039	0.155	±0.039	0.155	±0.039	0.133	±0.000	0.156	±0.102

\* diferença significativa dentro de cada tempo de amostragem entre as concentrações.

De acordo com Al-Sabtit e Metcalfe (1995) a máxima indução de MN ocorre normalmente entre o 1º e 5º dia de exposição ao agente mutagênico. Da Rocha et al., (2009) mostraram aumento significativo na quantidade de MN e alterações nucleares eritrocitárias em *Colossoma macropomum* expostos a 2 mg/L de metilmercúrio por 5 dias. Nossos resultados mostraram aumento significativo de células micronucleadas após sete dias de exposição ao GLI-UP<sup>®</sup>, sugerindo certa resistência de *C. macropomum* à ação mutagênica da formulação testada para efeitos aneugênicos e clastogênicos detectáveis pelo teste de Micronúcleos.

As médias e desvio padrão dos escores obtidos no Ensaio Cometa são mostrados na **Tabela 2**. Apenas a maior concentração (1,86 mg.L<sup>-1</sup>) foi capaz de ocasionar danos significativos quando comparados ao grupo controle, detectados no 5º e 7º dias de ensaio. Não se evidenciou diferença significativa dentro de cada concentração ao longo do período experimental.

A concentração do herbicida GLI-UP que apresentou efeito mutagênico e genotóxico é cerca de 6 vezes maior que o limite estabelecido na Resolução Conama 357/2005 para corpos d'água classe 3, e cerca de 3 vezes maior que o previsto na Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde para águas potáveis destinadas ao consumo humano.

**Tabela 2:** Média e Desvio Padrão dos escores de danos no DNA em eritrócitos de *C. macropomum* expostos a diferentes concentrações de glifosato (n= 300 células por concentração)

Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Escores de danos no DNA (Média ± DP)									
	1 dia		3 dias		5 dias		7 dias		14 dias	
CN	50	± 0.00	n.a.		26	±0.00	22	± 0.00	12	± 0.00
1,86	56.67	±22.19	58.33	±30.44	<b>58.33*</b>	±6.43	<b>52.33*</b>	±21.73	43.00	±35.51
0,93	52.00	±46.94	32.67	±10.79	45.00	±9.17	37.00	± 3.61	24.33	±13.01
0,093	46.33	± 8.62	30.50	± 9.19	36.33	±5.51	20.67	± 3.21	24.67	±27.43

\* indica diferença significativa dentro de cada tempo de amostragem entre as concentrações.

Ferraro (2009) avaliando o potencial uso de três espécies de peixes *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus* como bioindicadores de contaminação pelo produto comercial Roundup®, nas concentrações 1,58 e 3,16 mg.L<sup>-1</sup>, por 5, 10 e 15 dias, através do teste MN e ensaio cometa concluiu que as concentrações testadas pareciam não exercer papel aneugênico ou clastogênico sobre os eritrócitos nas concentrações e períodos de exposição, entretanto, o Ensaio Cometa evidenciou potencial genotóxico da formulação testada para as três espécies nas duas concentrações a partir do 5º dia.

Vários trabalhos tem demonstrado a eficiência do teste de micronúcleos e ensaio cometa no biomonitoramento de ambientes aquáticos (Pandurangi et al., 1995; (Hayashi et al., 1998; Buschini et al., 2004; Frenzilli, Nigro e Lyons, 2009; Galindo et al., 2010; Ahmed et al., 2011). Esses trabalhos indicam relação entre a frequência de micronúcleos e danos no DNA com a qualidade da água, comprovando a aplicabilidade de bioensaios de genotoxicidade para avaliação de sistemas aquáticos sujeitos a impactos causados por poluição (Groff et al, 2010).

*Colossoma macropomum* tem sido utilizada em vários estudos como organismo teste (Da Rocha et al., 2011; Groff et al., 2010; Kochhann et al., 2013). Nossos resultados demonstram a sensibilidade do tambaqui para ensaios de genotoxicidade e reforçam sua importância para monitoramento ambiental em ecossistemas amazônicos expostos a contaminação por agrotóxicos.

#### 4. Conclusão

A CL<sub>50-96h</sub> do herbicida GLI-UP® em tambaqui (*Colossoma macropomum*) foi de 92,90 mg.L<sup>-1</sup> e do herbicida IMAZETAPIR PLUS NORTOS® foi de 185 m.L<sup>-1</sup>,

ambos são considerados levemente tóxicos segundo a classificação proposta por Helfrich *et al.* (1996).

O herbicida GLI-UP® provoca aumento da frequência de danos ao DNA e de eritrócitos micronucleados em tabaqui após cinco a sete dias de exposição à concentração de 1,858 mg.L<sup>-1</sup>.

O Ensaio Cometa demonstrou maior sensibilidade a ação genotóxica da concentração de 1,858 mg.L<sup>-1</sup> que o Teste de Micronúcleos.

A formulação comercial do Glifosato GLI-UP® parece ser menos genotóxica aos eritrócitos de tabaqui do que a formulação ROUNDUP®.

## Referências

- Ahmed, M. K. et al., 2011. Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. *Chemosphere*, v. 84, n. 1, p. 143-9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21382637>>.
- Al-Sabti, K.; Metcalfe, C. D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research – Genetic Toxicology*. v. 343, p. 121-135.
- Araújo-Lima, C. A. R. M.; e Gomes, L. de C. 2005. Tabaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDESSEROTTO, Bernardo.; GOMES, Levi de Carvalho. (Org.) *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: Ed. Da UFSM, 468p.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2011. ABNT NBR 15088:2011: *Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes*. Rio de Janeiro, 22 p.
- Ayres, M.; Ayres Junior, M.; Ayres, D.L.; Santos, A.A.S. 2007. *BioEstat 5.0.: Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas*. Sociedade Civil Mamirauá: Belém, Pará-Brasil. 324p.
- Bortoluzzi, E.C.; Rheinheimer, D. S.; Gonçalves, C. S.; Pellegrini, J.B.R. ; Zanella, R.; Copetti, A.C.C. 2006. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* v.10, n.4, p.881-887.
- Brianezi, G.; Viana de Camargo, J. V.; Miot, H. A. 2009. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. *J Bras Patol Med Lab*, v. 45, n. 4, p. 325-334.

- Bucker, A. Carvalho, W. Lves-Gomes, J. A. 2006. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnitiiformes) expostos ao benzeno. Acta Amaz. Manaus, v. 36. Nº 3.
- Buschini, A. et al. 2004. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 557, n. 2, p. 119-129.
- Carrasco, K. R.; Tilbury, K. L.; Myers, M.S. 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, v. 47, p. 2123 -2136.
- Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. 2005. Resolução CONAMA nº 357. Disponível em :< [www.mma.conama.gov.br/conama](http://www.mma.conama.gov.br/conama)> Acesso em 12/01/2013.
- Connell, D. W. 1997. Basic concepts of environmental chemistry. Boca Raton: Lewis Publishers, 506 p.
- Costa, C. R.; Olivi, P.; Botta, C. M.; Espindola, E. L. G. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação – Quím. Nova, Vol 31, Nº 7, 1820-1830.
- Da Rocha, C. A. M. et al. 2011. Studies of micronuclei and other nuclear abnormalities in red blood cells of *Colossoma macropomum* exposed to methylmercury. Genetics and molecular biology, v. 34, n. 4, p. 694-7. Disponível em: < <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3229127&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> >.
- EPA, 1999. LC50 Software Program, Version 1.50. Ecological Monitoring Research Division, Environmental Monitoring Systems Laboratory, EPA, Cincinnati, Ohio 45268.
- Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. Mutation Research 455 - 81-95.
- Ferment, G.; Zanoni, M.; Nodari, R. O. Estudo de caso: Sojas convencionais e transgênicas no planalto do Rio Grande do Sul .Brasília : MDA, 2010.
- Ferraro, M.2009. Avaliação de três espécies de peixes – *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: Cometa e dos Micronúcleos. 2009. 189 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas área de concentração Genética) - Curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- Freitas, R. S. 2006. O glifosato nosso de cada dia nos dai hoje... Revista Eco.21 – Editora Tricontinental. Edição 116. Disponível em: <http://www.eco21.com.br/textos/textos.asp?ID=1376>. Acesso: março, 2013.

Frenzilli, G.; Nigro, M.; Lyons, B. P. 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation research*, v. 681, n. 1, p. 80-92. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18439870> >.

Galli, A. J. B.; Montezuma, M. C. 2005. Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. Ed. ACADCOM. Disponível em: <<http://www.monsanto.com.br/roundup/glifosato/indice.asp>>. Acessado em: 30/05/2011.

Galindo, B. A. et al. 2010. Genotoxic Effects of Aluminum on the Neotropical Fish *Prochilodus lineatus*. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 212, n. 1-4, p. 419-428.

Gluszczak, L. 2008. Parâmetros toxicológicos em piavas (*Leporinus obtusidens*) e jundiás (*Rhamdia quelen*) após exposição a uma formulação comercial de glyphosate. 2008. 94 pag. Tese (Doutorado em Bioquímica Toxicológica), Universidade Federal de Santa Maria. RS.

Grisolia, C. K.; M, C.; Cordeiro, T. 2000. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. v. 239, p. 235-239.

Grisolia, C. K., 2005. Agrotóxicos : mutações, câncer & reprodução. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 392p.

Groff, A. A.; et al., 2010. UVA/UVB-induced genotoxicity and lesion repair in *Colossoma macropomum* and *Arapaima gigas* Amazonian fish. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* Volume 99, Issue 2, 3.

Hayashi, M. et al., 1998. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutation research*, v. 399, n. 2, p. 125-33. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9672655> >

Helfich, L. A., 1996. Pesticides and aquatic animals: a guide to reducing impacts on aquatic systems. Disponível em: < [www.ext.vt.edu/pubs/waterquality/420-013/420-013.pdf](http://www.ext.vt.edu/pubs/waterquality/420-013/420-013.pdf)> Acesso em Março, 2013.

Kochhann, D. et al. 2013. Linking Hematological, Biochemical, Genotoxic, and Behavioral Responses to Crude Oil in the Amazon Fish *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 65, n. 2, p. 266-275.

Lopes, R. B., 2005. Análise ecotoxicológica dos xenobióticos Triclofon e Diflufenuron empregados na aquicultura continental. 2005. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração Energia Nuclear na Agricultura) - Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba-SP.

Miyamae, Y. et al., 1998. Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. *Mutation research*, v. 418, n. 2-3, p. 131-40.

Miyazaki, D. M. Y.; Machado Neto, J. G.; Castagnolli, N., 2004. Toxicidade aguda de triclorfon, parition metílico e glifosato para alevinos de tambaqui (*Colossoma macroporum*) e tambacu (*C. macroporum* X *Piaractus mesopotamicus*). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS (ENBRAPOA), 8., 2004, Laguna Anais...Maringá. p.203.

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

Moura, E. E. S., 2009. Determinação da toxicidade aguda e caracterização de risco ambiental do herbicida Roundup (glifosato) sobre três espécies de peixes. 2009. 58 f. Dissertação (Mestrado em Bioecologia Aquática – Área de concentração: Ecotoxicologia). Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Nwani, C. D. et al. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. ***Environmental toxicology and pharmacology***, v. 31, n. 2, p. 314-22, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21787700> >.

Pandurangi, R.; Petras, M.; Ralph, S.; Vrzoc, M., 1995. Alkaline single cell (comet): assay and genotoxicity monitoring using bullhead and carp. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 26, p. 345-356.

Peixoto, F., 2005. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *CHEMOSPHERE*, V. 61, p. 1115–1122.

PAN – Pesticide database. Disponível em <http://www.pesticideinfo.org/Index.html>. Acesso em 12/09/2011

Piola, L.; Fuchs, J.; Oneto, M.; Basack, S.; Kesten, E.; Casabe, N. 2013. Comparative toxicity of two glyphosate-based formulations to *Eisenia andrei* under laboratory conditions. *Chemosphere* 91, 545–551

Queiroz, G. M. P.; Silva, M. R.; Bianco, R. J. F.; Pinheiro, A.; Kaufmann, V. 2011. Transporte de glifosato pelo escoamento superficial e por lixiviação em um solo agrícola. *Quim. Nova*, Vol. 34, No. 2, 190-195.

Ribeiro, D.H.B.; Vieira, E., 2010. Avaliação do potencial de impacto dos agrotóxicos no meio ambiente. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2010\\_2/agrotoxicos/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2010_2/agrotoxicos/index.htm)>. Acesso em: 8/9/2011

- Rojas, E.; Lopez, M.C.; Valverde, M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B*, 722, p.225-254.
- Russo, C.; Rocco, L.; Morescalchi, M. A.; Stingo, V., 2004. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 168–174.
- Silva, M. D.; Peralba, M. C. R.; Mattos, M. L. T., 2003. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do arroio Passo do Pilão. In: *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 13, p. 19-28, jan./dez.
- Silva, R. B.; Rocha, C. A. M.; Saliba, I. L. S.; Pena, S. A.; Pinheiro, R. H. S.; Tocantins, T. A. 2010. Avaliação citogenética de eritrócitos de tabaquais (*Colossoma macropomum*) sob exposição ao Metilmercúrio. 62ª Reunião Anual da SBPC. Disponível em < <http://www.sbpcnet.org.br/livro/62ra/resumos/resumos/5017.htm>>. Acesso em: 28 out. 2011
- Terradas, M. Martin, M.; Tussel, L. Genescà, A. 2010. Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutation Research* 705 - 60–67.
- Torres, M. (Org.) **Amazonia revelada: os descaminhos ao longo da BR-163**. Brasília: CNPQ. 2005. 496 p.
- Townsend, C. & Begon, M. 2008. Fundamentos em ecologia. Parte IV; Cap. 12.4 – A agricultura de monoculturas. ARTIMED.
- Tsui, M. T. K.; Chu, L. M. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulation: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52 - 1189 -1197.
- Veiga, M. M.; Silva, D. M.; Veiga, L. B. E.; Castro, M. V. 2006. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 22(11):2391-2399, Nov.
- Villela, I. V. et al. 2006. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutation research*, v. 605, n. 1-2, p. 78-86.
- World Health Organization (WHO). 1994. Glyphosate. *Environmental Health Criteria*. Publication N° 159, Geneva, Switzerland.
- Yassumoto, L.; Osajima, J. A.; Takashima, K. 2007. Efeitos de oxidantes e sais inorgânicos na degradação fotocatalítica do herbicida imazetapir mediada por dióxido de titânio. v. 32, p. 27-32.

## SÍNTESE INTEGRADORA

A atividade agrícola destaca-se como uma importante fonte de contaminação do meio aquático. O avanço das grandes monoculturas, como soja, milho e arroz, tem exposto ambientes até então pouco impactados a novas fontes de contaminação.

Vários testes têm sido empregados para avaliar a resposta de determinado organismo a estressores ambientais. Os testes de toxicidade aguda objetivam estabelecer os limites a partir do qual determinada substância pode causar mortalidade na espécie analisada. Nesse tipo de teste, o emprego de espécies nativas tem sido cada vez mais empregado a fim de tentar se estabelecer limites mais próximos à realidade local.

Ensaio genotóxicos, como o Ensaio Cometa e Teste de Micronúcleos tem se mostrado ferramentas sensíveis e confiáveis para uso em monitoramento ambiental, tanto em coletas de campo como em ensaios laboratoriais. Tais testes avaliam a existência de efeitos genotóxicos/mutagênicos de determinada substância sobre o organismo avaliado.

No presente trabalho foram utilizados dois herbicidas amplamente comercializados localmente, Gli-Up 480 SL e Imazetapir Plus Nortox, para testes de toxicidade aguda e ensaios genotóxicos, no caso do primeiro herbicida.

Os resultados do teste de toxicidade aguda para o herbicida a base de glifosato mostraram que essa formulação parece ser menos tóxica que outras formulações testadas na mesma espécie. A formulação comercial a base de imazetapir também mostrou ser pouco tóxica, considerando o valor estabelecido para a  $CL_{50}$ . Entretanto, percebeu-se alterações comportamentais nos animais expostos as maiores concentrações testadas, indicando que em condições ambientais esse herbicida poderia comprometer a estabilidade dos organismos afetados em seu habitat natural. Os ensaios genotóxicos com o herbicida Gli-Up demonstraram potencial genotóxico e mutagênico diante da maior concentração testada, ao longo do 5º e 7º dia de exposição.

Uma vez que os herbicidas testados, mesmo não sendo bio cumulativos, podem permanecer por até 60 dias no ambiente aquático, a contaminação desse meio por esses compostos pode acarretar sérios prejuízos a homeostase dos ecossistemas atingidos.

Ante os resultados obtidos sugerimos que sejam realizadas novas linhas de pesquisa utilizando a ictiofauna local dos corpos d'água diretamente impactados por esses compostos a fim de avaliar a possibilidade de ocorrência de danos nesses organismos.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, M. K. et al. Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. **Chemosphere**, v. 84, n. 1, p. 143-9.2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21382637> >.

ALBINATI, A.C.L.; MOREIRA, E. L.T.; ALBINATI, R. C. B.; CARVALHO, J. V., SANTOS, G. B.; LIRA, A.D. Toxicidade aguda do herbicida roundup® para piaçu (*Leporinus macrocephalus*). **Rev. Bras Saúde Prod. An.**, v.8, n.3, p. 184-192, jul/set, 2007.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research – Genetic Toxicology**. v. 343, p. 121-135. 1995.

AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. **BioEstat 5.0.: Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas.** Sociedade Civil Mamirauá: Belém, Pará-Brasil. 324p. 2007.

AMARANTE JÚNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. GLIFOSATO: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, Vol. 25, No. 4, 589-593, 2002

ARAÚJO-LIMA, C.; GOLDING, M. So Fruitful a Fish: Ecology, Conservation and Aquaculture of the Amazon's Tambaqui. **Environmental Conservation** 25 (3): 279–289. 1998. Foundation for Environmental Conservation

ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; GOMES, L. C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil.** – Santa Maria. Ed. UFSM, 2005. p.175 - 202.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR 15088:2011: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro, 22 p. 2011.

AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D.L.; Santos, A.A.S. **BioEstat 5.0.: Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas.** Sociedade Civil Mamirauá: Belém, Pará-Brasil. 324p. 2007.

BRASIL. Lei Nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. Disponível em: < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L7802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm) >. Acesso em: 03 out. 2011.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterflyfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v.44, p.383-392, 2001.

BONY, S.; GILLET, C.; BOUCHEZ, A.; MARGOUM, C.; DEVAUX, A. Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: Field and mesocosm surveys. **Aquatic Toxicology** 89 (2008) 197–203.

BORTOLUZZI, E.C.; RHEINHEIMER, D. S.; GONÇALVES, C. S.; PELLEGRINI, J.B.R. ; ZANELLA, R.; COPETTI, A.C.C. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v.10, n.4, p.881-887, 2006.

BRIANEZI, G.; VIANA De CAMARGO, J. V.; MIOT, H. A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **J Bras Patol Med Lab**, v. 45, n. 4, p. 325-334, agosto 2009.

BUCKER, A. CARVALHO, W. LVES-GOMES, J. A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnitiiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amaz.** Manaus, v. 36. Nº 3. 2006.

BUSCHINI, A. et al. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 557, n. 2, p. 119-129. 2004.

CARDOSO, G. C. Aspectos da produção da soja no estado do Pará. **Instituto de Estudos Superiores da Amazônia**. 2006. 16 p.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, p. 2123 -2136, 1990.

CARVALHO, V.; TURA, L. **A expansão do monocultivo de soja em Santarém e Belterra: injustiça ambiental e ameaça a segurança alimentar**. Belém: FASE. 2006.

CASANOVA, F. M. **Caracterização *in silico* de biossensores em *Colossoma macropomum*: diagnóstico molecular e monitoramento de ambientes impactados**. 2008. 121 f. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva). Instituto de Pesquisas da Amazônia, 2008.

CESTARI, M. M.; LEMOS, P. M. M.; RIBEIRO, C. A. O.; COSTA, J. R. M.A.; PELLETIER, E.; FERRARO, M. V. M.; MANTOVANI. M.S. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, 27, 2, 270-274 (2004).

CHAPADENSE, P. F. G.; CASTRO, F. J.; ALMEIDA, J. A.; MORON, S. E. Toxicidade do herbicida atrazina em *Colossoma macroporum*. **Ver. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 10, n.2, p. 398-405, abr/jun, 2009.

Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. 2005. Resolução CONAMA nº 357. Disponível em :< [www.mma.conama.gov.br/conama](http://www.mma.conama.gov.br/conama)> Acesso em 12/01/2013.

CONNELL, D. W. **Basic concepts of environmental chemistry**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1997. 506 p.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M.; ESPINDOLA, E. L. G.. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação – **Quím. Nova**, Vol 31, Nº 7, 1820-1830, 2008.

COSTA E SILVA, A. e NEPOMUCENO, J.C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. PERQUIRÈRE - **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM**. Patos de Minas: UNIPAM, n. 7, vol. 1: 167-179, ago. 2010 (ISSN 1806-6399).

COTELLE, S.; FERARD, J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. **Environ. Mol. Mutagen.** 34 (1999) 246–255.

DA ROCHA, C. A. M. DE LIMA, P. D. L.; DOS SANTOS, R. A.; BURBANO, R. M. R. Evaluation of Genotoxic Effects of Xenobiotics in Fishes Using Comet Assay—A Review. **Reviews in Fisheries Science**, v. 17, n. 2, p. 170-173, 2009. ISSN 10641262. Disponível em: <  
<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=66907948&lang=pt-br&site=ehost-live> >.

DA ROCHA, C. A. M.; DA CUNHA, L. A.; PINHEIRO, R. H. S. BAHIA, M. O.; BURBANO, R. M. R. Studies of micronuclei and other nuclear abnormalities in red blood cells of *Colossoma macropomum* exposed to methylmercury. **Genetics and molecular biology**, v. 34, n. 4, p. 694-7, 2011. Disponível em: <  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3229127&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> >.

DAROS, W. F; RIEDER, A; RODRIGUES, F. A. C; MACEDO, P. C; LEITE, M. C; MELÃO, A. V; MORAES, V. A. Classes de agrotóxicos usados nas plantações de soja (*Glycine max* (L.) Merr. – Fabaceae) Cáceres, Mato Grosso. Universidade do Estado de Mato Grosso. **2º Jornada Científica da Unemal**. Barra do Bugres-MT. 2009.

EPA, 1999. LC50 Software Program, Version 1.50. Ecological Monitoring Research Division, Environmental Monitoring Systems Laboratory, EPA, Cincinnati, Ohio 45268.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research** 455 (2000) 81-95.

FERMENT, G.; ZANONI, M.; NODARI, R. O. **Estudo de caso: Sojas convencionais e transgênicas no planalto do Rio Grande do Sul**. Brasília : MDA, 2010.

FERRARO, M. V.M.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, C. O.; CESTARI, M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, 27, 1, 103-107 (2004).

\_\_\_\_\_. **Avaliação de três espécies de peixes – *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: Cometa e dos Micronúcleos.** 2009. 189 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas área de concentração Genética) - Curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2009.

FISPQ - Ficha de informações de segurança de produtos químicos- Imazetapir Plus Nortox. Disponível em: <<http://www.nortox.com.br/detprod.php?id=12>> . Acesso em: 22/08/2011.

FREITAS, R. S. 2006. O glifosato nosso de cada dia nos dai hoje... Revista Eco.21 – Editora Tricontinental. Edição 116. Disponível em: <http://www.eco21.com.br/textos/textos.asp?ID=1376>. Acesso: março, 2013.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research** 681 (2009) 80–92.

GALINDO, B. A. TROILO, G.; CÓLUS, I. M. S.; MARTINEZ, C. B. R.; SOFIA, S. H. 2010. Genotoxic Effects of Aluminum on the Neotropical Fish *Prochilodus lineatus*. Water, Air, & Soil Pollution, v. 212, n. 1-4, p. 419-428.  
GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. (2005). Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. Ed. ACADCOM. Disponível em: <<http://www.monsanto.com.br/roundup/glifosato/indice.asp>>. Acessado em: 30/05/2011.

GARCIA, O.; ROMERO, I.; GONZALEZ, J. E.; MANDINA, T. Measurements of DNA damage on silver stained comets using free Internet software. *Mutat Res*, v. 627, p. 186-90, 2007.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: **Mutagênese Ambiental**. RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, M. F.; MAQUES, E. K. (Org.). Canoas: Ed. ULBRA, p. 247 – 279. 2003.

GOULDING, M. e CARVALHO, M. L. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): na important amazonian food fish. **Revista brasileira de Zool.**, São Paulo 1 (2): 107-133.1982.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos** : mutações, câncer & reprodução. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2005. 392p.

GRISOLIA, C.K.; CORDEIRO, C.M.T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 235-239, 2000.

GRISOLIA, C. K. RIVERO, C. L.G.; STARLING, F. L. R. M.; SILVA, I. C. R.; BARBOSA, A. C.; DOREA, J. G. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. **Genetics and Molecular Biology**, 32, 1, 138-143, 2009.

GROFF, A. A.; SILVA, J.; NUNES, E. A.; IANISTCKI, M.; GUECHEVA, T. N.; OLIVEIRA, A. M.; OLIVEIRA, C. P. F.; VAL, A. L.; HENRIQUES, J. A.P. UVA/UVB-induced genotoxicity and lesion repair in *Collossoma macropomum* and *Arapaima gigas* Amazonian fish. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** Volume 99, Issue 2, 3 May 2010, Pages 93-99.

GLUSCZAK, L. 2008. Parâmetros toxicológicos em piavas (*Leporinus obtusidens*) e jundiás (*Rhamdia quelen*) após exposição a uma formulação comercial de glyphosate. 2008. 94 pag. Tese (Doutorado em Bioquímica Toxicológica), Universidade Federal de Santa Maria. RS.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y.F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y. Development of genotoxicity assays systems that use aquatic organisms. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 399 (2), p. 125-133, 1998.

HELFIGH, L. A., 1996. Pesticides and aquatic animals: a guide to reducing impacts on aquatic systems. Disponível em: < [www.ext.vt.edu/pubs/waterquality/420-013/420-013.pdf](http://www.ext.vt.edu/pubs/waterquality/420-013/420-013.pdf)> Acesso em Março, 2013.

HEATH, A.G. Water Pollution and Fish Physiology. 2.ed. **CRC/Lewis Publishers**, Boca Raton , Florida. 342pp.1995.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRIJM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research** 363 (1996) 89-96

KRÜGER, R. A. **Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa***.2009. 58 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) - Centro Universitário Feevale, Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental, Novo Hamburgo-RS, 2009

KOCHHANN, D.; AZEVEDO, S. M. B.; DOMINGOS, F. X. V.; VAL, A. L. Linking Hematological, Biochemical, Genotoxic, and Behavioral Responses to Crude Oil in the Amazon Fish *Collossoma macropomum* (Cuvier, 1816). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 65, n. 2, p. 266-275, 2013.

KUMAR, R.; KUMARAVEL, T. S.; JHA, AWADHESH N. Investigation of the genotoxicity of malathion to freshwater teleost fish *Channa punctatus* (Bloch) using the micronucleus test and comet assay. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 58, n. 1, p. 123-30, 2010.

INSTITUTO DE PESQUISA AMBIENTAL DA AMAZÔNIA (IPAM). Apresentação: Elaboração do plano territorial de desenvolvimento rural sustentável (PTDRS) do baixo Amazonas/PA. Fevereiro, 2011.

IUPAC – The international Union of Pure and Applied Chemistry - <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/610.htm>. Acesso em: 20/09/2011

IZQUIERDO, J.L., MACHADO, G.; AYLLON, F.; AMICO, V.; BALA, L.O.; VALLARINO, E.; ELIAS, R.; VAZQUEZ, E.G. Assessing pollution in coastal ecosystems: a preliminary survey using the micronucleus test in the mussel *Mytilus edulis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 55 (2003) 24–29.

JURADO, A., FERNANDES, M., VIDEIRA, R., PEIXOTO, F., VICENTE, J. Herbicides: the Face and the Reverse of the Coin. An in Vitro Approach to the Toxicity of Herbicides in Non-Target Organisms. In: KORTEKAMP, A. (Ed.) **Herbicides and Environment**. 2011. p.3 -44. ISBN: 978-953-307-476-4, InTech, Acesso em: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-and-environment/herbicides-the-face-and-the-reverse-of-the-coin-an-in-vitro-approach-to-the-toxicity-of-herbicides-i>

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research** 544 (2003) 43–64

LOPES, R. B. **Análise ecotoxicológica dos xenobióticos Triclofon e Diflubenzuron empregados na aqüicultura continental**. 2005. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração Energia Nuclear na Agricultura) - Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba-SP, 2005.

LOPES-POLEZA, S.C.G. **Avaliação do efeito do metilmercúrio (CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>) em *Hoplias malabaricus*, através da frequência de aberrações cromossômicas e dos ensaios cometa e micronúcleo**. 2004. 70 f.. Dissertação Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

MENEZES, A. C. L. **Toxicidade de cobre sobre tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) em pH 4 e pH 8**. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de água doce e pesca interior). INPA/UFAM. 2005.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation research**, v. 399, n. 2, p. 135-47, 1998. ISSN 4412141454. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9672656> >.

MIYAMAE, Y.; YAMAMOTO, M.; SASAKI, Y. F.; KOBAYASHI, H.; IGARASHI-SOGA, M.; SHIMOI, K.; HAYASHI, M. Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. **Mutation research**, v. 418, n. 2-3, p. 131-40.1998.

MIYAZAKI, D. M. Y.; MACHADO NETO, J. G.; CASTAGNOLLI, N. Toxicidade aguda de triclorfon, parition metílico e glifosato para alevinos de tambaqui (*Colossoma macroporum*) e tambacu ( *C. macroporum* X *Piaractus mesopotamicus*).In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS (ENBRAPOA), 8., 2004, Laguna Anais...Maringá. p.203. 2004.

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

MORAES, B. S. **Parâmetros toxicológicos em carpas (*Cyprinus carpio*) expostos a formulações comerciais de diferentes herbicidas em condições de lavoura de arroz e em laboratório**. 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS. 2008.

MORAIS, L.S.R. **Desenvolvimento e validação de métodos para determinação de agrotóxicos em água e solo das áreas de recarga do aquífero Guarani, na região das nascentes do Rio Araguaia, MT/GO**. 2009. 157 f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química, Campinas, SP. 2009.

MOURA, E. E. S. **Determinação da toxicidade aguada e caracterização de risco ambiental do herbicida Roundup (glifosato) sobre três espécies de peixes**. 2009. 58 f. Dissertação (Mestrado em Bioecologia Aquática – Área de concentração: Ecotoxicologia). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2009.

MÜLLER, W.; NÜSSE, M. MILLER, B. M.; SLAVOTINEK, A. VIAGGI, S. STREFFER, C. Micronuclei: a biological indicator of radiation damage. **Mutation Research** 366 (1996) 163-169.

NADIN, S. B.; VARGAS-ROING, L. M.; CIOCCA, D. R.; A silver staining method for single-cell gel assay. **J Histochem Cytochem**, v. 9, p. 1183-6, 2001.

NWANI, C. D. et al. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 314-22, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21787700> >.

PAN – Pesticide database. Disponível em <http://www.pesticideinfo.org/Index.html>. Acesso em 12/09/2011

PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline single cell (comet): assay and genotoxicity monitoring using bullhead and carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 26, p. 345-356, 1995.

PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **CHEMOSPHERE**, V. 61, p. 1115–1122. 2005.

PÉREZ, G. L.; VERA, M. S.; MIRANDA, L. Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations on Aquatic Ecosystems. In: KORTEKAMP, A. (Ed.). **Herbicides and Environment**. 2011. p. 343 – 368. ISBN: 978-953-307-476-4, InTech, Acesso em: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-andenvironment/effects-of-herbicide-glyphosate-and-glyphosate-based-formulations-on-aquatic-ecosystems>

PIOLA, L.; FUCHS, J.; ONETO, M.; BASACK, S.; KESTEN, E.; CASABE, N. Comparative toxicity of two glyphosate-based formulations to *Eisenia andrei* under laboratory conditions. **Chemosphere** 91, 545–551. 2013.

QASEM, J. R. Herbicides Applications: Problems and Considerations. In: KORTEKAMP, A. (Ed.). **Herbicides and Environment**. 2011. p.643- 664. ISBN: 978-953-307-476-4, InTech, Acesso em: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-and-environment/herbicides-applications-problems-andconsiderations>

QUEIROZ, G. M. P.; SILVA, M. R.; BIANCO, R. J. F.; PINHEIRO, A.; KAUFMANN, V. Transporte de glifosato pelo escoamento superficial e por lixiviação em um solo agrícola. **Quim. Nova**, Vol. 34, No. 2, 190-195, 2011

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. (Eds.). Mutagênese Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: **Revista Brasileira de Genética**, 1991.

RIBEIRO, C. A. O. **Dinâmica do mercúrio inorgânico (Hg<sup>++</sup>) e o orgânico (CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>) e seus efeitos tóxicos em *Trichomycterus zonatus* e *Salvelinus alpinus***. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área de concentração Biofísica Ambiental)-Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, 1997.

RIBEIRO, D.H.B.; VIEIRA, E. **Avaliação do potencial de impacto dos agrotóxicos no meio ambiente**. 2010. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2010\\_2/agrotoxicos/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2010_2/agrotoxicos/index.htm)>. Acesso em: 8/9/2011

ROJAS, E.; LOPEZ, M.C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, 722, p.225-254, 1999.

RUFFINO, M. L. (coord). **A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira**. Manaus: IBAMA/PROVÁRZEA, 265p, 2004.

RUNDELL, M. S.; WAGNER, E. D.; PLEWA, M. J. The Comet Assay: Genotoxic Damage or Nuclear Fragmentation? **Environmental and Molecular Mutagenesis** 42:61-67 (2003).

RUSSO, C.; ROCCO, L.; MORESCALCHI, M. A.; STINGO, V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 57 (2004) 168–174.

SANCHEZ-GALAN, S; LINDE, A L; GARCIA-VAZQUEZ, E. Brown Trout and European Minnow as Target Species for Genotoxicity Tests: Differential Sensitivity to Heavy Metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.43, p.301- 304, 1999.

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E.J.G.; ZUANON, J.A.S. **Peixes comerciais de Manaus**. Manaus: IBAMA/PROVÁRZEA, 144p. 2006.

SILVA, M. D.; PERALBA, M. C. R.; MATTOS, M. L. T.; Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do arroio Passo do Pilão. In: **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 19-28, jan./dez. 2003.

SILVA, J. O uso do Ensaio Cometa para ensino de genética toxicológica. **Genética na Escola**. 02.02, 30-33 (2007).

SILVA, R. B.; ROCHA, C. A. M.; SALIBA, I. L. S.; PENA, S. A.; PINHEIRO, R. H. S.; TOCANTINS, T. A. Avaliação citogenética de eritrócitos de tabaco (*Colossoma macropomum*) sob exposição ao Metilmercúrio. **62ª Reunião Anual da SBPC**. Disponível em < <http://www.sbpcnet.org.br/livro/62ra/resumos/resumos/5017.htm>>. Acesso em: 28 out. 2011.

SILVA, D. R. O.; AVILA, L. A.; AGOSTINETTO, D.; BUNDT, A. ; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S.S. Ocorrência de agrotóxicos em águas subterrâneas de áreas adjacentes a lavouras de arroz irrigado. **Química Nova**, Vol. 34, No. 5, 748-752, 2011.

SIU, W.H.L.; CAO, J.; JACK, R.W.; WU, R. S. S.; RICHARDSON, B. J.; XU, L.; LAM, P. K. S. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). **Aquatic Toxicology** 66 (2004) 381 –392.

TERRADAS, M. MARTIN, M.; TUSSEL, L. GENESCA, A. Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? **Mutation Research** 705 (2010) 60–67.

TOWNSEND, C. & BEGON, M. **Fundamentos em ecologia**. Parte IV; Cap. 12.4 – A agricultura de monoculturas. ARTIMED. 2008.

TSUI, M. T. K.; CHU, L. M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulation: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere** 52 - 1189 -1197. 2003.

TORRES, M. (Org.) **Amazonia revelada: os descaminhos ao longo da BR-163**. Brasília: CNPQ. 496 p. 2005.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology** 79 (2006) 201-204.

VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. 1999. Effects of crude oil on respiratory aspects of some fish species of the Amazon. In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F.; Maia, N.B. (Eds.) **Biology of Tropical Fishes**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. p. 277-291.

VALDES, S.A.C. **Estudo da contaminação por agrotóxicos em aves da Família Camprimulgidae no Parque Nacional das Emas (GO)**. 2007. 109 f. Tese (Doutorado em ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Universidade de São Paulo. Piracicaba-SP. 2007.

VARGAS, L. Circular Técnica 44 – Sintomas e Diagnose de Toxicidade Herbicida em Cultura de Maçã. **EMBRAPA**. Bento Gonçalves, RS. Setembro, 2003.

VEIGA, M. M.; SILVA, D. M.; VEIGA, L. B. E.; CASTRO, M. V. **Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade**

rural do Sudeste do Brasil. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 22(11):2391-2399, Nov, 2006.

VICARI, T. **Avaliação do efeito mutagênico de duas concentrações (0,075µg/g E 0,75 µg/g) do metilmercúrio em *Hoplias malabaricus* (PISCES) através dos ensaios cometa e micronúcleo.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Curitiba, 2009.

VILLELA, I. V.; DE OLIVEIRA, I. M.; DA SILVA, J.; HENRIQUES, J. A. P.. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutation research**, v. 605, n. 1-2, p. 78-86. 2006.

World Health Organization (WHO). 1994. Glyphosate. Environmental Health Criteria. Publication N° 159, Geneva, Switzerland.

ZAGATO, P.A.; Ecotoxicologia. In ZAGATO, P. A. & BERTOLETTI, E.; **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações.** São Carlos: RiMa, p.13-25. 2006.

YASSUMOTO, L.; OSAJIMA, J.A.; TAKASHIMA, K. Efeitos de oxidantes e sais inorgânicos na degradação fotocatalítica do herbicida imazetapir mediada por dióxido de titânio. **Eclética Química**, São Paulo, 32 (1): 27-32, 2007.

**ANEXO 1** – Regras para publicação na revista Chemosphere.