

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Julio De Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Pós-graduação em Ciências Biológicas

Área de Concentração: Zoologia

Dissertação de Mestrado

**ESPERMATOZOIDE, EMBRIÃO OU ADULTO: QUAL
A FASE DO DESENVOLVIMENTO É MAIS SENSÍVEL
AOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DE HERBICIDAS
PRESENTES NA ÁGUA?**

NATHALIA RAISSA DE ALCÂNTARA ROCHA

Orientador: Prof. Dr. George Shigueki Yasui

Co-orientador: Prof. Dr. José Augusto Senhorini

BOTUCATU – SP

2019

**ESPERMATOZOIDE, EMBRIÃO OU ADULTO: QUAL
A FASE MAIS SENSÍVEL AOS EFEITOS DE
HERBICIDAS PRESENTES NA ÁGUA?**

NATHALIA RAISSA DE ALCÂNTARA ROCHA

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. George Shigueki Yasui

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Campus de Botucatu, UNESP, para
obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia).

BOTUCATU – SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Rocha, Nathalia Raissa de Alcântara.

Espermatozoide, embrião ou adulto : qual a fase do desenvolvimento é mais sensível aos efeitos toxicológicos de herbicidas presentes na água? / Nathalia Raissa de Alcântara Rocha. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: George Shigueki Yasui

Coorientador: José Augusto Senhorini

Capes: 20406002

1. Bioacumulação. 2. Peixes - Efeito da poluição da água. 3. Toxicidade. 4. Herbicidas.

Palavras-chave: bioacumulação; concentração letal média (CL50); peixes; toxicidade.

EPÍGRAFE

‘Somos pássaro novo longe do ninho’

Renato Russo

DEDICATÓRIA

À toda minha família em especial os meus pais, Rita de Cássia Gimenes de Alcântara Rocha e Jaime Vlaldir Pereira da Rocha, vocês são a razão e parte de todas as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Dr. George Shigueki Yasui e ao meu co-orientador Dr. José Augusto Senhorini, pela oportunidade e todos os ensinamentos.

Ao Dr. Paulo Sérgio Monzani por todo apoio, ensinamento, pelas correções e também pela companhia durante todos os experimentos. Serei sempre grata.

Agradeço aos amigos e companheiros do Laboratório de Biotecnologia de Peixes do CEPTA: Lucia Suarez, Bruna Machado, Rafaela Bertolini, Milena Chaguri, Hatus de Oliveira, Gustavo Shiguemoto, Nycolas Levy, Geovanna Coelho.

Agradeço especialmente aqueles que acompanharam de perto todo meu trabalho e ajudaram de todas as formas possíveis: Talita Lázaro, Gabriella Braga, Gabriel Marra e Nivaldo Ferreira e Dilberto Ribeiro.

Agradeço também a Empresa Metropolitana de Águas e Energia (EMAE) pelo apoio financeiro e aos membros da equipe José Teixeira e Admilson Barbosa.

Agradeço aos meus avós Dolores, Baldin, Jaime e Aparecida, por toda confiança e apoio.

Aos meus amigos da Turma da segunda por toda torcida e comemorações.

Agradeço a minha amiga e irmã Priscila, por sempre confiar e acreditar em mim, por estar presente em todos os momentos.

A minha madrinha e amiga Adriana Barros, por acreditar sempre no meu potencial e me incentivar a sempre buscar o melhor.

Agradeço as minhas companheiras de escrita, Nalah, Luna e Maia.

Mais uma vez agradeço aos meus pais, Rita e Jaime, pelo apoio incondicional em todas as decisões que eu tomei, por acreditarem e confiarem em mim.

Muito obrigada a todos!

Sumário

LISTA DE FIGURAS	9
Capítulo I	9
Capítulo II	10
LISTA DE TABELAS	11
Capítulo I	11
Capítulo II	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
RESUMO	14
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO GERAL	16
OBJETIVOS	21
Objetivo geral	21
Objetivos específicos	21
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO I:	29
CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL50) DE ADULTOS E DAS FASES INICIAS DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE <i>Astyanax altiparanae</i>	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	32
□ Concentração Letal Média (CL50) em indivíduos adultos de <i>Astyanax altiparanae</i>	33
□ Concentração Letal Média - CL50 nas fases iniciais de desenvolvimento embrionário de <i>Astyanax altiparanae</i>	35
RESULTADOS	39
□ Concentração Letal Média (CL50) em indivíduos adultos de <i>Astyanax altiparanae</i>	39
□ Concentração Letal Média - CL50 nas fases iniciais de desenvolvimento embrionário de <i>Astyanax altiparanae</i>	40
DISCUSSÃO	44
REFERÊNCIAS	47
CAPÍTULO II:	51
MOTILIDADE ESPERMÁTICA DE <i>Astyanax altiparanae</i> EM AMBIENTES CONTAMINADOS COM HERBICIDAS	51
INTRODUÇÃO	52

MATERIAL E MÉTODOS.....	54
RESULTADOS	56
DISCUSSÃO.....	59
CONCLUSÃO GERAL	60
REFERÊNCIAS	61

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1:** Exemplar de lambari do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*), espécie utilizada nos experimentos relatados neste trabalho. 32
- Figura 2:** Exemplares de fêmea (acima) e macho (abaixo) de indivíduos da espécie *Astyanax altiparanae*, que foram utilizados para realizar a reprodução e a coleta dos embriões..... 35
- Figura 3:** Administração da injeção de extrato de hipófise de carpa para produção de gametas, na cavidade abdominal de *Astyanax altiparanae*. 36
- Figura 4:** Exemplo de placa de noventa e seis poços, utilizada no experimento de concentração letal média -CL50, durante as fases de desenvolvimento embrionário. A cada trinta e dois poços era considerada como uma repetição..... 37
- Figura 5:** Gráfico de percentual de indivíduos adultos mortos em relação a concentração de RoundUp transorb utilizada..... 39
- Figura 6:** Gráfico de percentual de indivíduos adultos mortos em relação a concentração de para o herbicida ArsenalNa. 40
- Figura 7:** Gráfico do percentual de eclosão das larvas do tratamento com herbicida RoundUp Transorb, onde a concentração de 10 µg/L resultou em 90% de eclosão das larvas, enquanto a concentração de 22,5 µg/L foi a responsável por matar todos os embriões antes da eclosão. . 41
- Figura 8:** Gráfico do percentual de eclosão das larvas do tratamento com herbicida ArsenalNa, onde a concentração de 5 µg/L mg/L resultou em 90% de eclosão das larvas, enquanto a concentração de 12,5 µg/L mg/L foi a responsável por matar todos os embriões antes da eclosão..... 42

Figura 9: Gráfico do percentual de eclosão das larvas do tratamento com herbicida Reglone, onde a concentração de 0,5 µg/L resultou em 10% de eclosão das larvas, enquanto a concentração de 1,33 µg/L foi a responsável por matar todos os embriões antes da eclosão. .42

Capítulo II

Figura 10: Resultados do percentual de motilidade espermática de *Astyanax altiparanae* em contato com água contaminada com herbicida RoundUp Transorb, nas concentrações de 0, 96, 107, 120, 160 e 240 µg/L.....56

Figura 11: Resultados do percentual de motilidade espermática de *Astyanax altiparanae* em contato com água contaminada com herbicida ArsenalNa, nas concentrações de 0, 62, 83 e 125 µg/L.57

Figura 12: Resultados do percentual de motilidade espermática de *Astyanax altiparanae* em contato com água contaminada com herbicida Reglone, nas concentrações de 0, 1,3; 2; 4; 8 e 10 mg/L.58

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1: Concentrações (mg/L) de herbicida RoundUp Transorb (glifosato), ArsenalNa (imazapyr) e Reglone (diquat) utilizadas no experimento de concentração letal média (CL50) de indivíduos adultos de <i>Astyanax altiparanae</i>	33
Tabela 2: Concentrações (µg/L) de herbicida RoundUp Transorb, ArsenalNa e Reglone utilizadas no experimento de concentração letal média (CL50) de embriões de <i>Astyanax altiparanae</i>	38
Tabela 3: Resultados obtidos para concentração letal média (CL50) para indivíduos adultos e embriões de peixes da espécie <i>Astyanax altiparanae</i>	44

Capítulo II

Tabela 4: Concentrações de herbicidas utilizadas para os experimentos com sêmen de machos adultos de <i>Astyanax altiparanae</i>	54
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE – acetilcolinesterase

AHAS - síntese de acetohidróxido sintase

ALH - amplitude de deslocamento lateral da cabeça

BCF - frequência de batimento flagelar cruzado

CASA - computer assisted sperm analysis

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CEPTA - Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental

CL50 – concentração letal média

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DNA - ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)

EPM – erro padrão da média

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

LIN - linearidade

MOT - motilidade espermática

OECD - Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

pH - potencial Hidrogeniônico

STR - retilineariedade

TRAP - Toxicity Relationship Analysis Profram

VAP - velocidade média da trajetória

VCL - velocidade curvilinerar

VSL - velocidade em linha reta

WOB - oscilação

RESUMO

Nas últimas décadas o Brasil tornou-se um dos líderes mundiais no uso de agrotóxicos, devido à grande utilização destas substâncias na agricultura; o estado de São Paulo utiliza aproximadamente 25% do total de agrotóxicos comercializados no país sendo os herbicidas os agrotóxicos de maior consumo, devido as suas características de amplo espectro e eficiência em diferentes culturas terrestres, bem como a facilidade no controle de plantas daninhas, estes agentes químicos também são utilizados para o controle e manejo de macrófitas aquáticas. As macrófitas são plantas presentes nos ecossistemas aquáticos lóticos e lênticos, podendo ser flutuantes ou submersas, tendo basicamente como importância ecológica a criação de habitats para peixes. No entanto, o crescimento desordenado dessas plantas, devido à alta produção primária faz com que grandes extensões de área sejam tomadas pela colonização destas. Para solucionar este problema, torna-se necessário a aplicação de métodos de controle e manejo dessas plantas, através de métodos químicos, biológicos e mecânicos. Os testes de toxicidade aquática são de grande importância porque os ecossistemas aquáticos constituem os principais receptáculos de contaminantes, podendo estes serem oriundos de lançamentos direto aos corpos d'água, emitidos no ar ou solo. A concentração letal média (CL50) é aquela responsável pela morte de 50% da população, sendo utilizada em situações em que a substância é administrada em meio no qual o animal habita, no presente trabalhos utilizamos como espécie modelo o lambari do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*). Os resultados de CL50 para indivíduos adultos foi de 3,11 mg/L quando utilizamos o RoundUp Transorb e de 4,21 mg/L para o ArsenalNa, quanto ao Reglone, não foi possível determinar sua CL50. Os valores de CL50 para cada herbicida utilizado dos embriões foi de 15,57 µg/L para o herbicida RoundUp Transorb, de 8,48 µg/L como CL50 do herbicida ArsenalNa e de 0,88 µg/L para o herbicida Reglone. A concentração de 240 µg/L herbicida RoundUp transorb foi a responsável por inibir a motilidade espermática, para o herbicida ArsenalNa a concentração responsável por inibir a motilidade espermática foi a de 125 µg/L e o herbicida Reglone, a concentração que resultou na inibição da motilidade foi de 10 mg/L.

Palavras chave: toxicologia, agrotóxicos, *Astyanax altiparanae*

ABSTRACT

In the recent decades, Brazil has become one of the world leaders in pesticides use, due its large use in agriculture; São Paulo State uses approximately 25% of the total pesticides traded in the country, being herbicides the most consumed pesticide, due to its broad spectrum and efficiency in different terrestrial crops, as well as the ease of weed control and in the management of aquatic macrophytes. Macrophytes are aquatic plants present in lotic and lentic aquatic ecosystems, where they can be floating or submerged, basically having ecological importance in the creation of habitats for many fish species. However, disordered plant growth, due to the high primary production, can lead to the colonization of large areas. To solve this problem, it's necessary to make use of chemical, biological and mechanical methods to control these plants proliferation. Aquatic toxicity tests are of great importance since the aquatic ecosystems are major contaminant receptacles, which may come from direct releases to water bodies, carried by air or soil. The median lethal concentration (LC50) is a concentration of a given agent that kills 50% of the population, and it is used in situations where the substance is administered in the habitats that are directly in contact with the animal. In the present work, we used the yellow-tail tetra (*Astyanax altiparanae*) as model for the aquatic toxicity tests. Results on CL50 for adults were 3.11 mg/L for RoundUp Transorb and 4.21 mg/L for ArsenalNa. For Reglone, it was not possible to determine the LC50 on adults. The LC50 values for each herbicide used in the embryos were 15.57 µg/L for RoundUp Transorb, 8.48 µg/L for ArsenalNa and 0.88 µg/L for Reglone herbicide. The concentration of 240 µg/L of RoundUp transorb, 125 µg/L of ArsenalNa and 10 mg/L of Reglone were the dosages of each herbicide responsible for inhibiting sperm motility.

Keywords: toxicology, pesticides, *Astyanax altiparanae*

INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas o Brasil tornou-se um dos líderes mundiais no uso de agrotóxicos, devido à grande utilização destas substâncias na agricultura (MAIA et al., 2018). Agrotóxicos são misturas químicas complexas e heterogêneas (TUREK et al., 2018), classificados de acordo com seus organismos alvo (BRIDI, 2017), podendo ser fungicidas para o controle de fungos e leveduras; herbicidas para o controle de plantas daninhas; inseticidas para o controle de insetos e fumigantes usados no combate a bactérias do solo (LOPES, 2018).

O estado de São Paulo utiliza aproximadamente 25% do total de agrotóxicos comercializados no país (DIAS et al., 2015), sendo os herbicidas os agrotóxicos de maior consumo, devido as suas características de amplo espectro de ação e eficiência em diferentes culturas terrestres (ROCHA et al., 2018), estes agentes químicos também são utilizados para o controle e manejo de macrófitas aquáticas.

As macrófitas são plantas presentes nos ecossistemas aquáticos lóticos e lênticos, podendo ser flutuantes ou submersas, tendo basicamente como importância ecológica a criação de habitats para peixes (VAZZOLER; AGOSTINHO e HAHN, 1997) e macroinvertebrados (ESTEVES e CAMARGO, 1986). Além disso, são capazes de absorver nutrientes e poluentes, servindo no tratamento de água (ENGELHARDT e RITCHIE, 2001). No entanto, o crescimento desordenado dessas plantas, devido à alta produção primária faz com que grandes extensões de área sejam tomadas pela colonização destas (THOMAZ, 2002).

Quando ocorre o crescimento desenfreado das macrófitas, estas acabam sendo consideradas plantas daninhas, responsáveis por afetar diretamente o uso múltiplo dos ecossistemas aquáticos. Dentre os danos causados por esse crescimento, destacam-se principalmente aqueles que afetam e causam prejuízos às usinas produtoras de energia elétrica (BINACIONAL, 1997), bem como a capacidade dos reservatórios para consumo humano de água.

No Brasil, existem relatos de proliferação indesejada dessas macrófitas em reservatórios de hidroelétricas, gerando prejuízo a essas empresas e comprometendo a produção de energia elétrica (TRINDADE et al., 2010), dentre as espécies de macrófitas

aquáticas que causam problemas em reservatórios localizados no estado de São Paulo, destacam-se: *Pistia stratiotes*, *Cyperus sp*, *Myriophyllum aquaticum*, *Ludwigia leptocarpa*, *Brachiaria sp*, *Eichhornia crassipes* (TAVARES et al., 2004).

Para solucionar este problema, torna-se necessário a aplicação de métodos de controle e manejo dessas plantas: métodos químicos, biológicos e mecânicos (PIETERSE, 1989).

No Brasil, a forma mais utilizada para o controle dessas plantas ainda é a retirada manual e mecanizada, uma vez que os controles químicos e biológicos foram recentemente autorizados (MARIA et al., 2018). O método mecânico é de alto custo e com resultados ainda insatisfatórios, permitindo a rebrota e recolonização das macrófitas, através dos fragmentos que ainda encontram-se presentes no ambiente (MARIA et al., 2018), tornado os resultados deste método de curta duração.

O método de controle biológico das macrófitas aquáticas é o mais bem-visto diante do ponto de vista ambiental, já que ele prevê que animais herbívoros, como peixes e mamíferos, incorporem a biomassa das macrófitas aquáticas. No Brasil, foram obtidos bons resultados com alguns peixes como a tilápia (*Tilapia rendalli*) e o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), capazes de consumir macrófitas do tipo elódeas (*Egeria densa*, *E. najas*) e também candelabro-aquático (*C. demersum*) (MOURA; FRANCO e MATALLO, 2009).

O método químico utiliza substâncias químicas como os herbicidas no controle de macrófitas aquáticas flutuantes, porém, é o menos aceito pela sociedade, devido ao grau de toxicidade de tais agentes para as espécies aquáticas presentes no ambiente e para o ser humano, sendo seus efeitos no homem ainda pouco conhecido (THOMAZ, 2002), podendo ainda gerar danos tanto ao meio ambiente como a organismos não-alvos (LOPES, 2014), como por exemplo peixes (NAKAGOME; NOLDIN e RESGALLA JR, 2007) e moluscos (SILVA, 2018).

Nos Estados Unidos, é permitido o uso de agrotóxicos específicos para ambientes aquáticos, porém, a utilização destes agentes químicos é motivo de controvérsias na Europa e no Brasil, apesar do controle químico ter sido autorizado através da Resolução CONAMA N° 467 em 2015 (LANGE et al., 2018) o país não possui nenhum herbicida registrado comercialmente para o controle de plantas aquáticas (NEVES; FOLONI e

PITELLI, 2002), fazendo com que muitas vezes herbicidas de amplo espectro sejam utilizados para combater macrófitas aquáticas flutuantes; no entanto, existem trabalhos que comprovam a eficiência deste método utilizando herbicidas como glifosato (VAN; VANDIVER JR e CONANT JR, 1987), diquat e imazapyr (MARTINS et al., 1999).

O herbicida glifosato [N-(fosfonometil) glicina] é de amplo espectro e largamente utilizado (MONSANTO, 2005), trata-se de um herbicida sistêmico que atua na inibição do crescimento de plantas, interferindo na produção de aminoácidos aromáticos e comprometendo a síntese proteica (FAUS et al., 2015); comercialmente é conhecido como RoundUp.

O diquat (1-1'-etileno-2-2'-dibrometo de biperidílio) trata-se de um herbicida que promove a formação de radicais livres que oxidam lipídeos, provocando a ruptura das membranas celulares, ocasionando a necrose de tecidos das macrófitas aquáticas (HESS, 2018).

O imazapyr é pertencente ao grupo químico das imidazolinonas (ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolina-2-ilo)nicotínico), de amplo espectro (RODRIGUES e DE ALMEIDA, 1998), seu mecanismo de ação é sobre a inibição da síntese de acetohidróxido sintase (AHAS), interrompendo a síntese de proteínas, consequentemente interferindo na síntese de DNA e no crescimento celular, acarretando na morte dos meristemas (ALMEIDA e RODRIGUES, 1985).

Existem relatos mundiais de contaminação de águas superficiais e subterrâneas, causadas por agrotóxicos que são utilizados na agricultura (MORAES e ROSSI, 2010), para os herbicidas a base de glifosato, as principais vias de dissipação no ambiente aquático são através da degradação microbiológica e a união a sedimentos, esse composto não se degrada rapidamente na água, porém, com a microflora aquática o glifosato é decomposto em AMPA (GIESY et al., 2000) , eventualmente também é decomposto em dióxido de carbono (RUEPPEL et al., 1977).

Curras et al. (1992) observaram que houve 100% de degradação do herbicida a base de imazapyr presente em solução aquosa, 48 horas após a exposição à luz ultravioleta.

Poucos são os estudos que são realizados para caracterizar os danos que os herbicidas causam ao ambiente aquático (NAKAGOME; NOLDIN e RESGALLA JR, 2006); porém, sabe-se que a grande maioria desses compostos são não seletivos e podem ser tóxicos para os organismos não alvos, incluindo o homem, além dos demais animais presentes no ambiente em que se encontram (HELFRICH et al., 2003), sobretudo os peixes que são particularmente sensíveis a contaminação do meio ambiente causada por esses agentes químicos (LINS et al., 2010).

Os resíduos de agrotóxicos, uma vez que são encontrados na água e dependendo de suas características físico químicas, são capazes de se ligarem ao material particulado que está em suspensão, bem como se depositar no sedimento do fundo ou mesmo serem absorvidos por organismos, conseqüentemente, sendo detoxicado ou acumulado; estes agrotóxicos, podem ser transportados através do sistema aquático por difusão nas correntes aquáticas ou nos corpos dos organismos aquáticos, que mantiveram contato com esses agentes (DOS SANTOS e DA SILVA, 2007), existe também a possibilidade de alguns agrotóxicos retornarem à atmosfera através da volatilização, o que evidencia a existência de uma interação contínua dos agrotóxicos entre sedimento e água, que é influenciada pelo movimento da água, turbulência e temperatura (RAND e PETROCELLI, 1985).

Os herbicidas que encontram-se presentes nos corpos d'água podem penetrar nos organismos aquáticos através de diferentes portas de entrada, e seu grau de acumulação depende do tipo de cadeia alimentar, da disponibilidade e da persistência do agente contaminante na água, além de suas propriedades físico-químicas (RAND e PETROCELLI, 1985).

Alguns estudos com peixes apontam que o RoundUp é capaz de induzir o estresse oxidativo comprometendo a atividade de enzimas antioxidantes, danos no DNA originados pela oxidação de bases nitrogenadas, inibição de enzimas do sistema de reparo e quebras cromossômicas (LUSHCHAK et al., 2009).

Estudos demonstram que os herbicidas são capazes de agir inibindo a enzima acetilcolinesterase (AChE) nos rins, brânquias e fígado de peixes (GIAQUINTO et al., 2017), segundo BRAZ-MOTA et al. (2015). Ao utilizarem herbicidas no ambiente

aquático, autores evidenciaram um aumento significativo no número de micronúcleos eritrocitários em peixes da espécie *Collossoma macropomum*, o que indica uma ação genotóxica do herbicida na espécie que foi avaliada. No geral, os efeitos tóxicos de herbicidas sobre organismos aquáticos podem incluir tanto efeitos sub-letais até a mortalidade, dentre os efeitos sub-letais destacam-se os que causam alteração no crescimento e desenvolvimento, reprodução, fisiologia e comportamentais (DOS SANTOS e DA SILVA, 2007).

Através dos estudos de LORENSI; JESSE e RUFF (2018) é possível constatar que os herbicidas a base de glifosato tem toxicidade generalizada em peixes que tem contato com este agente químico, resultando em alterações em marcadores bioquímicos, oxidativos e no comportamento alimentar dos peixes. A avaliação de organismos bioindicadores é reconhecida como uma técnica de monitoramento ambiental, visto que acrescenta informações a respeito da resposta biológica que aquele determinado ambiente irá apresentar na presença de um determinado agente poluente (TANABE, 1999).

O termo bioindicador refere-se a espécies sentinelas que são utilizadas como os indicadores iniciais dos efeitos de contaminação de seu habitat (ADAMS, 2002), no ambiente aquático, as plantas aquáticas, algas, crustáceos, moluscos, peixes, mamíferos e aves podem ser alvos de estudos, conseqüentemente sendo considerados como organismos bioindicadores (LINS et al., 2010).

No presente estudo a espécie utilizada é o peixe *Astyanax altiparanae*, conhecido popularmente como lambari do rabo amarelo; essa espécie é encontrada na bacia do alto Paraná (BUCKUP; MENEZES e GHAZZI, 2007), é considerada herbívora podendo também alimentar-se de insetos terrestres e fragmentos de peixes (DELARIVA, 2002).

Esta espécie é citada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) como uma espécie que vem sendo utilizada frequentemente como modelo experimental em várias áreas.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar qual fase do desenvolvimento (espermatozoide, adulto ou embrião) de *Astyanax altiparanae* é mais sensível aos efeitos toxicológicos de herbicidas comerciais.

Objetivos específicos

I- Determinar a concentração letal média (CL50) dos diferentes herbicidas: glifosato, diquat e imazapyr em peixes adultos e nos períodos iniciais do desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae*;

II- Avaliar a motilidade de espermatozoides de *Astyanax altiparanae* na presença dos diferentes herbicidas;

REFERÊNCIAS

ABNT, N. IEC 27001: 2006. **Tecnologia da informação-Técnicas de segurança-Sistemas de gestão de segurança da informação-Requisitos**, 2006.

ADAMS, S. M. **Biological indicators of aquatic ecosystem stress**. American Fisheries Society, 2002. ISBN 1888569433.

ALMEIDA, F. S. D. e RODRIGUES, B. N. Guia de herbicidas: contribuição para o uso adequado em plantio direto e convencional. In: (Ed.). **Guia de herbicidas: contribuição para o uso adequado em plantio direto e convencional**: Iapar, 1985.

BERTOLETTI, E.; GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; ZAGATTO, P. A.; DE SANEAMENTO AMBIENTAL, C. D. T. Ensaio biológicos com organismos aquáticos e sua utilização no controle da poluição: curso-1987. In: (Ed.). **Ensaio biológicos com organismos aquáticos e sua utilização no controle da poluição: curso-1987**: CETESB, 1987.

BINACIONAL, I. Ocorrência de plantas aquáticas em reservatórios de usinas hidrelétricas. **Foz do Iguaçu**, 1997.

BRAZ-MOTA, S.; SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; DUARTE, R. M.; VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. **Chemosphere**, v. 135, p. 53-60, 2015. ISSN 0045-6535.

BRIDI, D. Efeitos da exposição ao glifosato sobre parâmetros comportamentais em peixe-zebra (*Danio rerio*). 2017.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A. e GHAZZI, M. S. A. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Museu Nacional Rio de Janeiro, 2007.

CABRITA, E.; SARASQUETE, C.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; ROBLES, V.; BEIRAO, J.; PÉREZ-CEREZALES, S.; HERRÁEZ, M. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, n. 5, p. 623-635, 2010. ISSN 0175-8659.

CARNEIRO, F. F. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. EPSJV/Expressão Popular, 2015. ISBN 8598768804.

DAVICO, C. E. Toxicidade celular do herbicida à base de glifosato, Roundup® WG: impactos sobre a organização morfofuncional dos ovários do peixe-zebra *Danio rerio*, como modelo experimental. 2017.

DE VASCONCELLOS, M. G.; VERANI, N. F. e DE SÁ, O. R. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS CRÔNICOS DO HERBICIDA ROUNDUP (GLIFOSATO) SOBRE A DIFERENCIAÇÃO GONADAL DO BAGRE RHAMDIS HILARII (VALENCIENNES, 1840).

DELARIVA, R. L. **Ecologia trófica da ictiofauna do rio Iguaçu-PR sob efeito do represamento de Salto Caxias**. 2002. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá

DIAS, F. B.; SPADOTO-DIAS, D.; POLONI, P. F.; DELMANTO, L.; NAHAS-NETO, J.; NAHAS, E. A. Metabolic Syndrome: predictive factor for endometrial polyps in postmenopausal women. **Menopause-the Journal Of The North American Menopause Society**, p. 1398-1398, 2015. ISSN 1072-3714.

DOS SANTOS, J. R. e DA SILVA, J. M. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. **Oecologia brasiliensis**, v. 11, n. 4, p. 565-573, 2007. ISSN 1981-9366.

ENGELHARDT, K. A. e RITCHIE, M. E. Effects of macrophyte species richness on wetland ecosystem functioning and services. **Nature**, v. 411, n. 6838, p. 687, 2001. ISSN 1476-4687.

ESTEVEZ, F. e CAMARGO, A. Sobre o papel das macrófitas aquáticas na estocagem e ciclagem de nutrientes. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 1, n. 1, p. 273-298, 1986.

FAUS, I.; ZABALZA, A.; SANTIAGO, J.; NEBAUER, S. G.; ROYUELA, M.; SERRANO, R.; GADEA, J. Protein kinase GCN2 mediates responses to glyphosate in Arabidopsis. **BMC plant biology**, v. 15, n. 1, p. 14, 2015. ISSN 1471-2229.

FIORINO, E.; SEHONOVA, P.; PLHALOVA, L.; BLAHOVA, J.; SVOBODOVA, Z.; FAGGIO, C. Effects of glyphosate on early life stages: comparison between Cyprinus carpio and Danio rerio. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 9, p. 8542-8549, 2018. ISSN 0944-1344.

FOLMAR, L. C.; SANDERS, H. e JULIN, A. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 8, n. 3, p. 269-278, 1979. ISSN 0090-4341.

GEYER, H. J.; STEINBERG, C. E.; SCHEUNERT, I.; BRÜGGEMANN, R.; SCHÜTZ, W.; KETTRUP, A.; ROZMAN, K. A review of the relationship between acute toxicity (LC50) of γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH, Lindane) and total lipid content of different fish species. **Toxicology**, v. 83, n. 1-3, p. 169-179, 1993. ISSN 0300-483X.

GIAQUINTO, P. C.; DE SÁ, M. B.; SUGIHARA, V. S.; GONÇALVES, B. B.; DELÍCIO, H. C.; BARKI, A. Effects of glyphosate-based herbicide sub-lethal concentrations on fish feeding behavior. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 98, n. 4, p. 460-464, 2017. ISSN 0007-4861.

GONÇALVES, B.; NASCIMENTO, N.; SANTOS, M.; BERTOLINI, R.; YASUI, G.; GIAQUINTO, P. Low concentrations of glyphosate-based herbicide cause complete loss of sperm motility of yellowtail tetra fish *Astyanax lacustris*. **Journal of fish biology**, v. 92, n. 4, p. 1218-1224, 2018. ISSN 0022-1112.

GONÇALVES, B. B. Efeitos de herbicida à base de glifosato em aspectos reprodutivos de guppies (*Poecilia reticulata*). 2017.

GONÇALVES, L. U.; FERROLI, F. e VIEGAS, E. M. M. Effect of the inclusion of fish residue oils in diets on the fatty acid profile of muscles of males and females lambari (*Astyanax altiparanae*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 9, p. 1967-1974, 2012. ISSN 1516-3598.

HELFRICH, L.; WEIGMANN, D.; HIPKINS, P.; STINSON, E. Pesticides and aquatic animals: a guide to reducing impacts on aquatic systems. 1996. **Acesso em**, v. 10, p. 420-013, 2003.

HESS, F. D. Herbicide effects on plant structure, physiology, and biochemistry. In: (Ed.). **Pesticide interactions in crop production**: CRC Press, 2018. p.13-34.

JAMIESON, B. G. **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa: with a survey of lophophorate, echinoderm and protochordate sperm and an account of gamete cryopreservation**. Cambridge University Press, 1991. ISBN 0521413044.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E. S.; KRUAETRACHUE, M.; SAHAPHONG, S.; VICHASRI-GRAMS, S.; POKETHITIYOOK, P. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Science Asia**, v. 28, p. 121-127, 2002.

KENDALL, R. J.; ANDERSON, T. A.; BAKER, R. J.; BENS, C. M.; CARR, J. A.; CHIODO, L. A.; COBB III, G. P.; DICKERSON, R. L.; DIXON, K. R.; FRAME, L. T. Ecotoxicology. **USDA National Wildlife Research Center-Staff Publications**, p. 516, 2001.

KIME, D. e NASH, J. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. **Science of the Total Environment**, v. 233, n. 1-3, p. 123-129, 1999. ISSN 0048-9697.

LAMMER, E.; CARR, G.; WENDLER, K.; RAWLINGS, J.; BELANGER, S.; BRAUNBECK, T. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 2, p. 196-209, 2009. ISSN 1532-0456.

LANGE, L. C.; MEYER, S. T.; CASTRO, S. R.; SOARES, A. C.; MARIA, M. A. Avaliação da concentração de efeito do glifosato para controle de *Eichhornia crassipes* e *Salvinia* sp. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, 2018.

LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; DA SILVA QUEIROZ, V.; CIRIO, S. M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 8, n. 4, p. 469-484, 2010. ISSN 1981-4178.

LOMBARDI, J. Fundamentos de toxicologia aquática. **Sanidade de organismos acuáticos**. Livraria Varela Editora. São Paulo, p. 263-272, 2004.

LOPES, F. D. Avaliação da embriotoxidade de herbicida à base de glifosato, princípio ativo e surfactante sobre zebrafish (Danio Rerio). 2018.

LOPES, F. M. **Efeito da exposição ao herbicida glifosato sobre parâmetros bioquímicos, moleculares e espermáticos do peixe Danio rerio**. 2014.

LOPES, F. M.; JUNIOR, A. S. V.; CORCINI, C. D.; DA SILVA, A. C.; GUAZZELLI, V. G.; TAVARES, G.; DA ROSA, C. E. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish Danio rerio. **Aquatic toxicology**, v. 155, p. 322-326, 2014. ISSN 0166-445X.

LORENSI, C. A.; JESSE, C. R. e RUFF, J. R. GLIFOSATO: UMA REVISÃO DA TOXICIDADE EM PEIXES. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 9, n. 3, 2018. ISSN 2317-3203.

LUSHCHAK, V.; KUBRAK, O. I.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. **Chemosphere**, v. 76, n. 7, p. 932-937, 2009. ISSN 0045-6535.

MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. **Journal of Health Sciences**, v. 1, n. 1, 2015. ISSN 2447-8938.

MAIA, J. M. M.; LIMA, J. L.; ROCHA, T. J. M.; FONSECA, S. A.; MOSUINHO, K. C.; DOS SANTOS, A. F. Perfil de intoxicação dos agricultores por agrotóxicos em Alagoas. **Diversitas Journal**, v. 3, n. 2, p. 486-504, 2018. ISSN 2525-5215.

MARIA, M. A.; LANGE, L. C.; CASTRO, S. R.; SOARES, A. C.; MEYER, S. T. Evaluation of glyphosate effect concentration to control Eichhornia crassipes and Salvinia sp. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 23, n. 5, p. 881-889, 2018. ISSN 1413-4152.

MARTINS, D.; VELINI, E. D.; CAVENAGHI, A. L.; MENDONÇA, C. G. D.; MENDONÇA, C. G. D. Controle químico de plantas daninhas aquáticas em condições controladas-caixa d'água. **Planta Daninha**, p. 289-296, 1999. ISSN 0100-8358.

MORAES, P. e ROSSI, P. Comportamento ambiental do glifosato. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 9, n. 3, 2010. ISSN 1983-1471.

MOURA, E. E. S. D. **Determinação da toxicidade aguda e caracterização de risco ambiental do herbicida Roundup (glifosato) sobre três espécies de peixes**. 2009. Universidade Federal do Rio Grande do Norte

MOURA, M.; FRANCO, D. e MATALLO, M. Manejo integrado de macrófitas aquáticas. **Biológico**, v. 71, n. 1, p. 77-82, 2009.

NAKAGOME, F. K.; NOLDIN, J. A. e RESGALLA JR, C. Toxicidade aguda e análise de risco de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura do arroz irrigado sobre o cladóceros *Daphnia magna*. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 16, 2006. ISSN 0103-7277.

_____. Toxicidade aguda de alguns herbicidas e inseticidas utilizados em lavouras de arroz irrigado sobre o peixe *Danio rerio*. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 17, 2007. ISSN 0103-7277.

NEVES, T.; FOLONI, L. e PITELLI, R. Controle químico do aguapé (*Eichhornia crassipes*). **Planta Daninha**, p. 89-97, 2002. ISSN 0100-8358.

NWANI, C. D.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; KUMAR, P.; LAKRA, W. S. Lethal concentration and toxicity stress of Carbosulfan, Glyphosate and Atrazine to freshwater air breathing fish *Channa punctatus* (Bloch). 2010. ISSN 2008-4935.

PIETERSE, A. H. Aquatic weeds: the ecology and management of nuisance aquatic vegetation. Introduction. 1989.

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment**. CRC press, 1995. ISBN 1560320907.

RAND, G. M. e PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. FMC Corp., Princeton, NJ. 1985

c

RODRIGUES, B. N. e DE ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. Iapar Londrina, 1998.

RURANGWA, E.; KIME, D.; OLLEVIER, F.; NASH, J. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v. 234, n. 1-4, p. 1-28, 2004. ISSN 0044-8486.

SABBAG, O. J.; TAKAHASHI, L. S.; SILVEIRA, A. N.; ARANHA, A. S. Custos e viabilidade econômica da produção de lambari-do-rabo-amarelo em Monte Castelo/SP: um estudo de caso. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 3, p. 307-315, 2018. ISSN 1678-2305.

SALMITO-VANDERLEY, C.; PINHEIRO, J.; DE ALMEIDA, P.; LOPES, J.; LEITE, L. Methodologies for cryopreservation and mechanisms of sperm evaluation in characiformes fish. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, n. Suppl. 2, p. 343-350, 2014. ISSN 1981-5484.

SÁNCHEZ-BAIN, A.; FORGET, G.; FEOLA, G.; RONCO, A. **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones.** CIID, Ottawa, ON, CA, 2004. ISBN 9685536333.

SANCHEZ, J. A. A. **Efeitos comparativos de herbicidas à base de glifosato sobre parâmetros oxidativos e qualidade espermática no peixe estuarino *Jenynsia multidentata*.** 2015.

SILVA, A. F. D. Associação do penoxsulam e compostos algicidas no controle de algas e macrófitas aquáticas e o efeito sobre os organismos não alvos e na qualidade da água. 2018.

TANABE, S. Butyltin contamination in marine mammals—a review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 39, n. 1-12, p. 62-72, 1999. ISSN 0025-326X.

TAVARES, K.; ROCHA, O.; ESPINDOLA, E.; DORNFELD, C. Composição taxonômica da comunidade de macrófitas aquáticas do reservatório de Salto Grande (Americana, SP). **Reservatório de Salto Grande (Americana, SP): caracterização, impactos e propostas de manejo.** Editora Rima, São Carlos, p. 239-252, 2004.

TESOLIN, G. A. S.; MARSON, M. M.; JONSSON, C. M.; NOGUEIRA, A. J. A.; FRANCO, D. A. D. S.; DE ALMEIDA, S. D. B.; MATALLO, M. B.; DE MOURA, M. A. M. Avaliação da toxicidade de herbicidas usados em cana-de-açúcar para o Paulistinha (*Danio rerio*). **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2014.

THOMAZ, S. Fatores ecológicos associados à colonização e ao desenvolvimento de macrófitas aquáticas e desafios de manejo. **Planta daninha**, v. 20, n. 1, p. 21-33, 2002.

TRINDADE, C. R. T.; PEREIRA, S. A.; ALBERTONI, E. F.; SILVA, C. P. Caracterização e importância das macrófitas aquáticas com ênfase nos ambientes límnicos do Campus Carreiros-FURG, Rio Grande, RS. 2010. ISSN 1980-0223.

TULLY, D. B.; BAO, W.; GOETZ, A. K.; BLYSTONE, C. R.; REN, H.; SCHMID, J. E.; STRADER, L. F.; WOOD, C. R.; BEST, D. S.; NAROTSKY, M. G. Gene expression profiling in liver and testis of rats to characterize the toxicity of triazole fungicides. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 215, n. 3, p. 260-273, 2006. ISSN 0041-008X.

TUREK, J.; DE CASTILHOS GHISI, N.; MATOZO, F.; NOLETO, R. B. Efeitos citotóxicos de um herbicida a base de glifosato no peixe *Astyanax altiparanae*. **LUMINÁRIA**, v. 19, n. 02, 2018. ISSN 2359-4373.

VAN, T.; VANDIVER JR, V. e CONANT JR, R. Effects of herbicides rate and carrier volume on glyphosate phytotoxicity. **J. Aquatic Plant Manag**, v. 4, n. 1, p. 66-89, 1987.

VAZZOLER, A. D. M.; AGOSTINHO, A. e HAHN, N. S. **A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos.** Eduem Maringá, 1997. ISBN 8585545240.

WALKER, C. H. **Organic pollutants: an ecotoxicological perspective.** CRC press, 2008. ISBN 142006259X.

WILSON-LEEDY, J. G. e INGERMANN, R. L. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. **Theriogenology**, v. 67, n. 3, p. 661-672, 2007. ISSN 0093-691X.

YASUI, G. S.; SENHORINI, J. A.; SHIMODA, E.; PEREIRA-SANTOS, M.; NAKAGHI, L. S. O.; FUJIMOTO, T.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; SILVA, L. A. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. **animal**, v. 9, n. 3, p. 464-470, 2015. ISSN 1751-7311.

CAPÍTULO I:

CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL50) DE ADULTOS E DAS FASES INICIAS DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Astyanax altiparanae*

INTRODUÇÃO

A ecotoxicologia aquática tem como principal função avaliar os efeitos de agentes químicos tóxicos sobre os organismos do ecossistema aquático (RAND, 1995), estes efeitos podem se manifestar desde estruturas celulares até indivíduos, populações e comunidades (SÁNCHEZ-BAIN et al., 2004).

Os testes de toxicidade aquática são de grande importância porque os ecossistemas aquáticos constituem os principais receptáculos de contaminantes, podendo estes serem oriundos de lançamentos direto aos corpos d'água, emitidos no ar ou solo (KENDALL et al., 2001).

Testes de toxicidade aguda possibilitam que haja o estabelecimento de limites permissíveis para várias substâncias químicas, avaliando o impacto de misturas de poluentes sobre os organismos aquáticos (BERTOLETTI et al., 1987); LOMBARDI (2004) diz que estes testes de curta duração proporcionando rápidas respostas em estudos de efeitos tóxicos letais, onde o objetivo é determinar a Concentração Letal Média (CL50) de determinada substância, num intervalo de tempo de 24 a 96 horas de exposição.

A concentração letal média (CL50) é aquela responsável pela morte de 50% da população, sendo utilizada em situações em que a substância é administrada em meio no qual o animal habita (CETESB, 2010). Os testes de toxicidade realizados durante o ciclo de vida de uma espécie são fundamentais para a determinação das concentrações ambientais de elementos químicos tóxicos para as populações de ambientes aquáticos (MOURA, 2009). Estudos vem demonstrando que as fases de vida de peixes mais sensíveis são os estágios embrionários, larvais ou juvenis, permitindo que haja a estimativa da concentração tóxica máxima admissível (DE VASCONCELLOS; VERANI e DE SÁ).

A espécie utilizada no presente estudo foi o peixe conhecido popularmente como lambari de rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*). A espécie pertence à família Characidae, subfamília Tetragonopterinae, é uma espécie nativa da bacia do alto Paraná, tem porte pequeno, rápido crescimento e habito alimentar onívoro (GONÇALVES; FERROLI e VIEGAS, 2012).

O presente trabalho teve como objetivo determinar a concentração letal média (CL50) dos herbicidas comerciais RoundUp transorb, ArsenalNa e Reglone para adultos e também para os estágios iniciais de desenvolvimento do lambari do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*).

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos nas dependências do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (CEPTA/ICMBio), localizado na cidade de Pirassununga, São Paulo.

A espécie utilizada para os experimentos foi o lambari de rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*) com peso entre 5 e 7 gramas (Fig. 1).



Figura 1: Exemplar de lambari do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*), espécie utilizada nos experimentos relatados neste trabalho.

É uma espécie oportunista de fácil adaptação a diferentes ambientes, possui desova parcelada (mais de uma vez ao ano), sua reprodução pode ser induzida em laboratório apresentando grande fecundidade e alta taxa de crescimento (SABBAG et al., 2018).

➤ **Concentração Letal Média (CL50) em indivíduos adultos de *Astyanax altiparanae***

Os exemplares de machos e fêmeas de lambari foram coletados aleatoriamente nos tanques de alvenaria do CEPTA/ICMBio, aclimatados durante o período de 7 dias em aquários de 60 L contendo constantemente aeração forçada provida de pedras difusoras e aquecimento de 28°C através de termostatos, até reiniciarem a alimentação.

Após a aclimação, os peixes foram pesados e distribuídos em aquários de 40 L, onde a quantidade de água adicionada ao aquário foi proporcional a quantidade de massa de peixe, havendo uma relação de 1 litro de água para cada grama de peixe.

Cada experimento teve a duração de 96 horas de exposição aos herbicidas. As concentrações utilizadas de herbicida (Tabela 1) foram definidas após a realização de experimentos prévios onde as concentrações maiores do que as descritas no experimento foram descartadas por promoverem a morte precoce dos indivíduos.

Tabela 1: Concentrações (mg/L) de herbicida RoundUp Transorb (glifosato), ArsenalNa (imazapyr) e Reglone (diquat) utilizadas no experimento de concentração letal média (CL50) de indivíduos adultos de *Astyanax altiparanae*.

	RoundUp Transorb (glifosato)	ArsenalNa (imazapyr)	Reglone (diquat)
Concentrações Utilizadas (mg/L)	0 controle	0 controle	0 controle
	1,0	1,0	5
	1,9	3,8	10
	2,8	4,2	15
	3,7	4,6	20
	-	-	25

Os experimentos para cada herbicida foram realizados em triplicatas, desta forma, um total de 13 aquários experimentais de 40 L para cada herbicida, contendo três peixes em

cada aquário, sendo três aquários para cada concentração, mais um aquário controle que não possuía nenhuma concentração de herbicida.

Cada aquário possuía 3 peixes, desde que, a quantidade de massa dos indivíduos não ultrapassasse a capacidade máxima de 40 L dos aquários, contendo aeração forçada através de sopradores e pedras difusoras. Adotando as recomendações para realização de testes de toxicidade aguda, os peixes foram privados de alimentação durante o período experimental (ABNT, 2006), tendo início a privação alimentar 24 horas, antes do início dos experimentos, sendo que, após os peixes serem colocados nos aquários, a dose de herbicida foi administrada diretamente na água e misturada com auxílio de um bastão plástico. As dosagens foram calculadas de acordo com a quantidade do princípio ativo de cada herbicida fornecida pelo fabricante, em relação a quantidade de água contida em cada aquário, durante todo o experimento foi monitorado o pH que foi em média 7,3 e a quantidade de oxigênio dissolvido que foi em média 6,3 mg/L.

Os aquários foram monitorados durante as 96 horas, sendo que os peixes mortos eram retirados e congelados em freezer a -20°C. Os peixes eram considerados como mortos apenas se não apresentassem nenhuma reação quando estimulados no pedúnculo caudal.

O sistema utilizado para esse experimento foi do tipo estático, onde não havia troca de água dos aquários durante o tempo de 96 horas de experimentação.

Os valores da concentração letal média (CL50) foram calculados através da utilização do programa TRAP (Toxicity Relationship Analysis Profram), que resultou no valor final da CL50 de cada herbicida para os indivíduos adultos de *Astyanax altiparanae*.

➤ Análise estatística

Os dados foram apresentados com média \pm erro padrão da média (EPM).

➤ **Concentração Letal Média - CL50 nas fases iniciais de desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae***

Fêmeas e machos (Fig. 2) de lambari do rabo amarelo foram induzidos hormonalmente a produção de gametas através de injeção de extrato de hipófise de carpa na concentração de 5 mg/Kg.



Figura 2: Exemplos de fêmea (acima) e macho (abaixo) de indivíduos da espécie *Astyanax altiparanae*, que foram utilizados para realizar a reprodução e a coleta dos embriões.

As fêmeas receberam duas injeções, sendo a primeira diluída 10 vezes; após 8 horas a segunda dose concentrada foi administrada em ambos os sexos (Fig.3).



Figura 3: Administração da injeção de extrato de hipófise de carpa para produção de gametas, na cavidade abdominal de *Astyanax altiparanae*.

Após 8 horas da aplicação da segunda dose da injeção de extrato de hipófise de carpa, os machos foram coletados e anestesiados através de imersão em solução de eugenol a 1%, sendo o sêmen coletado com auxílio de pipetador. As fêmeas foram anestesiadas da mesma maneira que os machos e extrusadas manualmente.

Foram separadas alíquotas de ovócitos e realizada a fertilização *in vitro*, em seguida os zigotos foram colocados em placas de Petri contendo diferentes concentrações de herbicida RoundUp Transor, ArsenlNa e Reglone. Dessas alíquotas foram coletados trinta e dois zigotos e armazenados em placas de 96 poços, onde cada poço abrigava apenas 1 zigoto (Fig. 4). Cada trinta e dois poços ocupados por 1 zigoto, foi contado como uma repetição. Os experimentos foram realizados em triplicata.

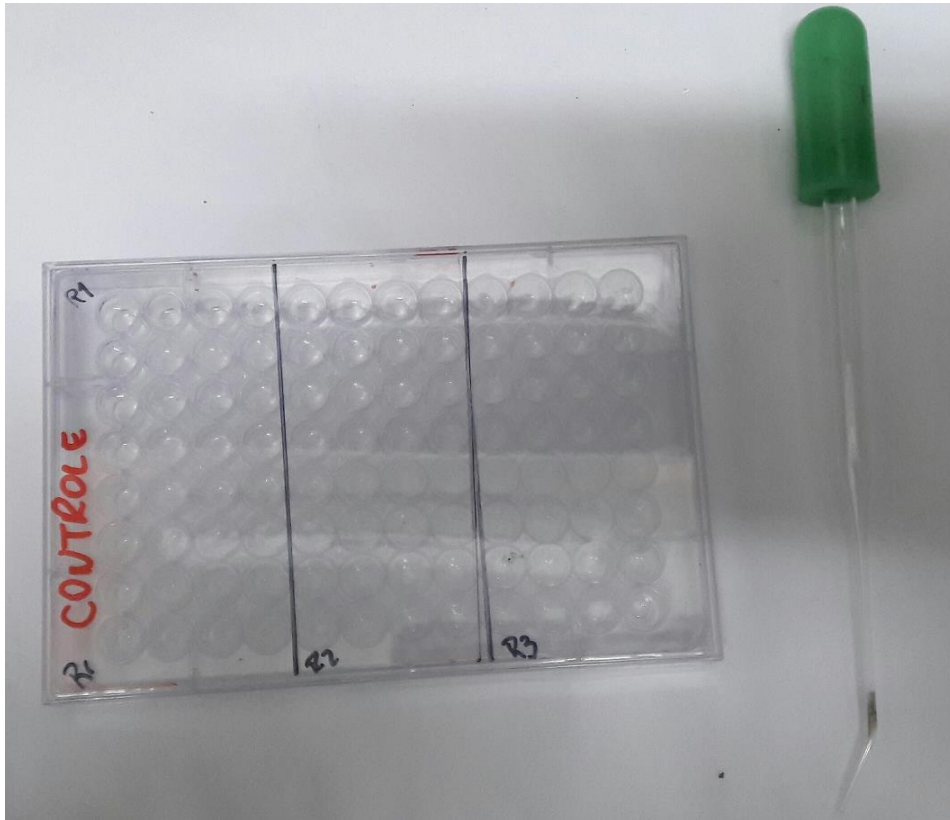


Figura 4: Exemplo de placa de noventa e seis poços, utilizada no experimento de concentração letal média -CL50, durante as fases de desenvolvimento embrionário. A cada trinta e dois poços era considerada como uma repetição.

As concentrações utilizadas para o experimento com RoundUp Transorb (glifosato) foram as de: 10; 12,5; 15; 17,5; 20 $\mu\text{g/L}$ mais um grupo controle que não possuía nenhuma concentração de herbicida.

As concentrações (Tabela 2) utilizadas estão descritas na tabela abaixo:

Tabela 2: Concentrações ($\mu\text{g/L}$) de herbicida RoundUp Transorb, ArsenalNa e Reglone utilizadas no experimento de concentração letal média (CL50) de embriões de *Astyanax altiparanae*.

	RoundUp Transorb (glifosato)	ArsenalNa (imzapyr)	Reglone (diquat)
Concentrações Utilizadas ($\mu\text{g/L}$)	0 controle	0 controle	0 controle
	10,0	5,0	1,0
	12,5	6,5	1,33
	15,0	8,5	1,5
	17,5	10,5	5,0
	20,0	-	-

Todas as concentrações utilizadas foram definidas após pré-testes com concentrações maiores que as descritas, a escolha das concentrações foi feita a partir da primeira concentração que resultava em eclosão dos ovos.

O desenvolvimento embrionário foi acompanhado durante 17 horas a 27°C até a eclosão, incluindo todas as fases do desenvolvimento embrionário – fertilização, ovos não fertilizados, clivagem, blástula, gástrula, segmentação e eclosão. Os ovos mortos, ou seja, aqueles que não foram fertilizados ou não clivaram e conseqüentemente morreram foram retirados e apenas os vivos foram contabilizados.

RESULTADOS

➤ Concentração Letal Média (CL50) em indivíduos adultos de *Astyanax altiparanae*

Os resultados de mortalidade em adultos obtidos para cada herbicida estão expostos nos gráficos abaixo, onde a concentração de RoundUp Transorb (Fig. 2) responsável por causar a morte de 100% dos indivíduos foi a de 3,7 mg/L, enquanto as concentrações de 1 e 1,9 mg/L não causaram a morte de nenhum dos indivíduos.

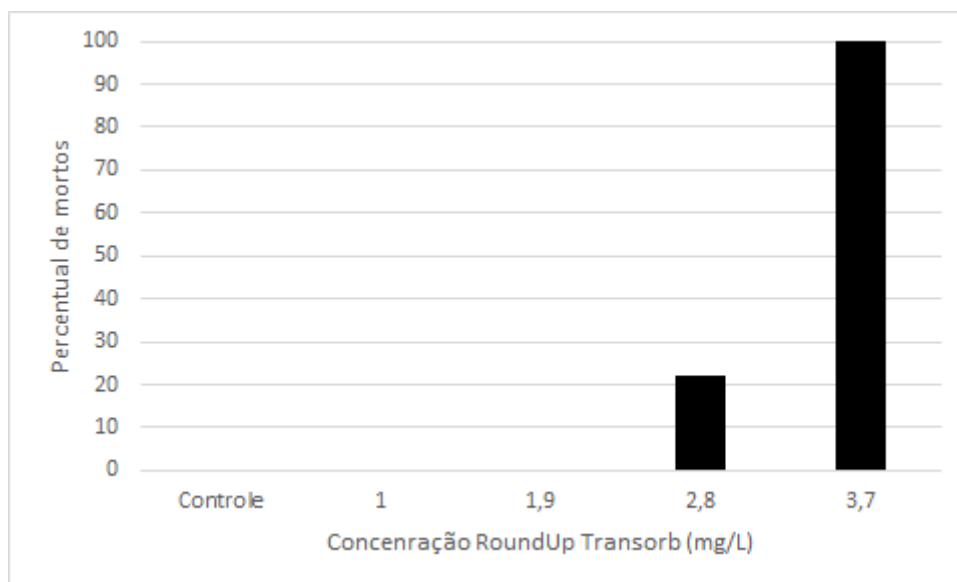


Figura 5: Gráfico de percentual de indivíduos adultos mortos em relação a concentração de RoundUp transorb utilizada.

Para o herbicida ArsenalNa (Fig. 3) a concentração letal encontrada foi a de 4,6 mg/L enquanto as concentrações de 1 e 3,8 mg/L não causaram a morte de nenhum indivíduo, os resultados obtidos estão descritos no gráfico abaixo:

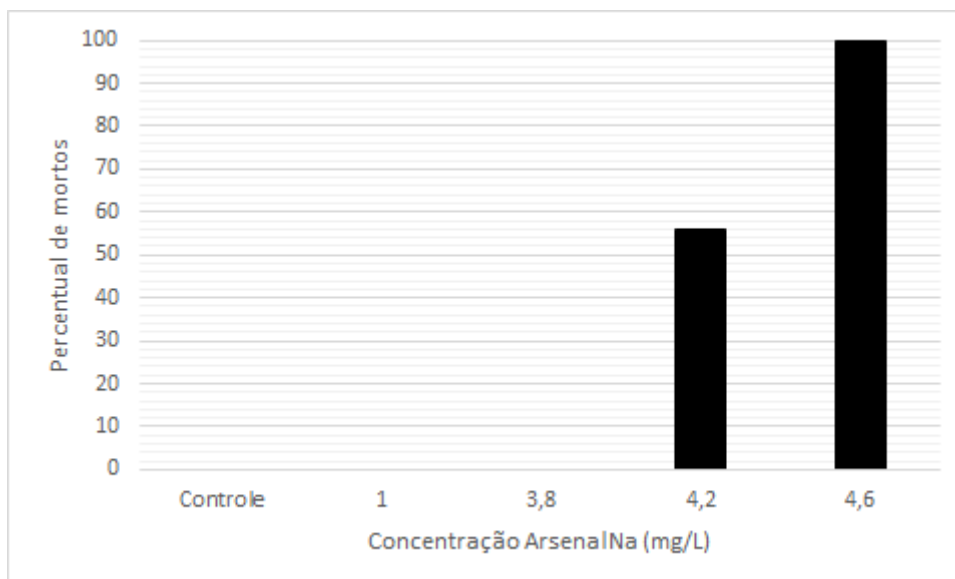


Figura 6: Gráfico de percentual de indivíduos adultos mortos em relação a concentração de para o herbicida ArsenalNa.

Para o herbicida Reglone foram feitos os experimentos utilizando as concentrações de 5 a 25 mg/L e mesmo em dosagens tão elevadas, não foi possível encontrar o valor da concentração letal para este herbicida. Experimentos utilizando concentrações mais elevadas ainda serão realizados.

Dos três herbicidas utilizados, o RoundUp Transorb aparenta ser o mais tóxico para o lambari adulto de rabo amarelo, com uma Concentração Letal Média (CL50) igual a 3,11 mg/L, enquanto o herbicida Arsenal apresentou uma CL50 um pouco mais alta, com o valor de 4,21 mg/L. O Reglone, apesar de não ter sido possível determinar a CL50, parece ser menos tóxico, precisando de altas dosagens para levar os indivíduos a óbito.

➤ **Concentração Letal Média - CL50 nas fases iniciais de desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae***

Os resultados dos percentuais de mortalidade de larvas obtidos nesse experimento estão descritos abaixo.

O herbicida RoundUp Transorb (Fig. 7) resultou em uma concentração letal quando utilizado na concentração de 22,5 $\mu\text{g/L}$, não apresentando eclosão de nenhuma larva, enquanto a concentração de 10 $\mu\text{g/L}$ foi a responsável pelo maior percentual de eclosão, 90% assim como o grupo controle.

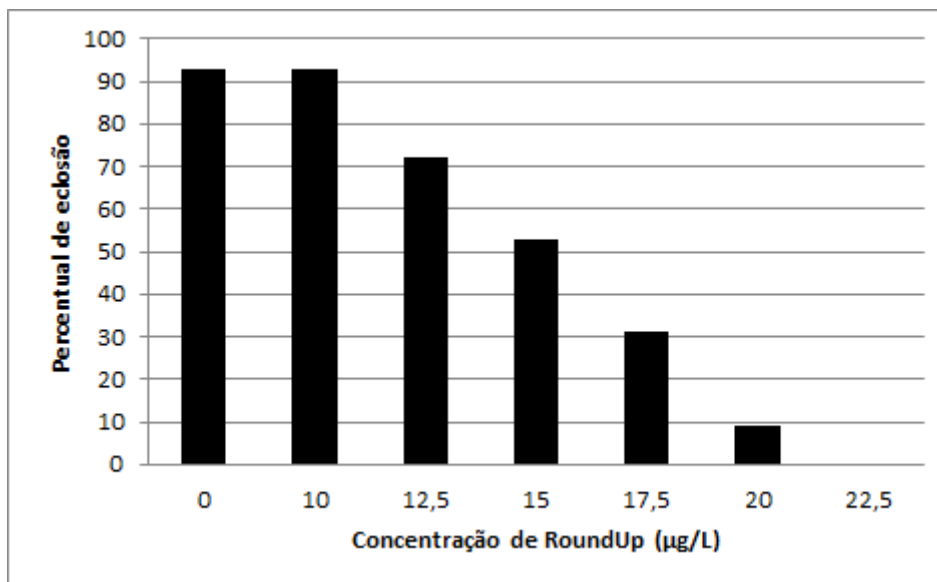


Figura 7: Gráfico do percentual de eclosão das larvas do tratamento com herbicida RoundUp Transorb, onde a concentração de 10 $\mu\text{g/L}$ resultou em 90% de eclosão das larvas, enquanto a concentração de 22,5 $\mu\text{g/L}$ foi a responsável por matar todos os embriões antes da eclosão.

Para o experimento com o herbicida ArsenalNa (Fig. 8), a concentração de 12,5 $\mu\text{g/L}$ foi a responsável por matar todos os ovos antes da eclosão, enquanto a concentração de 5 $\mu\text{g/L}$ assim como o controle resultaram em um percentual de eclosão igual a 90%.

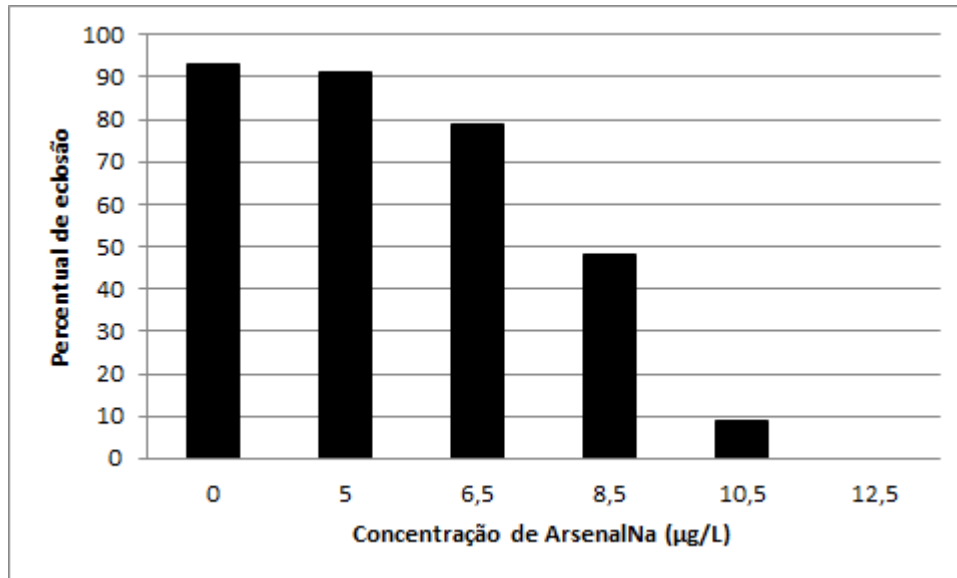


Figura 8: Gráfico do percentual de eclosão das larvas do tratamento com herbicida ArsenalNa, onde a concentração de 5 µg/L mg/L resultou em 90% de eclosão das larvas, enquanto a concentração de 12,5 µg/L mg/L foi a responsável por matar todos os embriões antes da eclosão.

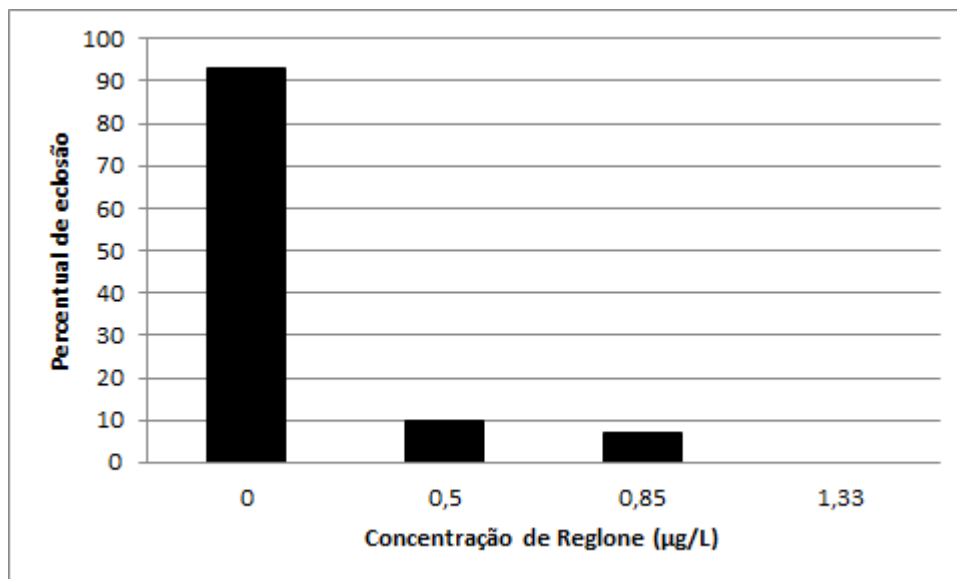


Figura 9: Gráfico do percentual de eclosão das larvas do tratamento com herbicida Reglone, onde a concentração de 0,5 µg/L resultou em 10% de eclosão das larvas, enquanto a concentração de 1,33 µg/L foi a responsável por matar todos os embriões antes da eclosão.

Os valores de CL50 dos embriões obtidos para cada herbicida utilizado, foram iguais a 15,57 $\mu\text{g/L}$ para o herbicida RoundUp Transorb, a concentração de 8,48 $\mu\text{g/L}$ como CL50 do herbicida ArsenalNa e a concentração de 0,88 $\mu\text{g/L}$ como CL50 do herbicida Reglone.

Com os resultados obtidos podemos observar que o herbicida Reglone (Fig. 9) foi o mais tóxico para os embriões, onde a concentração de 1,35 $\mu\text{g/L}$ foi a responsável por matar todos os embriões antes da eclosão das larvas, uma concentração nove vezes mais baixa que a concentração letal de ArsenalNa e dezesseis vezes menor que a concentração letal de RoundUp Transorb.

A concentração de 0,5 $\mu\text{g/L}$ foi a que apresentou maior percentual de eclosão de 10%, resultado bem mais baixo do que o percentual de eclosão dos outros herbicidas.

DISCUSSÃO

Em estudos a CL50 é definida como a concentração de um composto químico que causa a mortalidade de 50% dos organismos aquáticos expostos durante um determinado tempo, podendo ser entre 24, 48 ou 96 horas (GEYER et al., 1993), é utilizada como um índice de toxicidade aguda de substâncias químicas em organismos aquáticos (DAVICO, 2017).

No experimento de CL50 de adultos e embriões de lambari do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*) foi possível observar uma grande diferença nos resultados de concentrações letais méspadoto, que estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Resultados obtidos para concentração letal média (CL50) para indivíduos adultos e embriões de peixes da espécie *Astyanax altiparanae*.

	CL50 ADULTO (mg/L)	CL50 EMBRIÃO (µg/L)
RoundUp Transorb	3,11	15,57
ArsenalNa	4,21	8,48
Reglone	-	0,88

Diante de tais números podemos afirmar que para adultos de *Astyanax altiparanae* o herbicida RoundUp transorb apresentou maior toxicidade, enquanto para os embriões o herbicida que teve maior toxicidade foi o Reglone, que apresentou uma CL50 na concentração de dezessete vezes menor que a CL50 do RoundUp transorb.

É possível afirmar também que os embriões são mais sensíveis aos herbicidas do que os adultos, visto que, as concentrações utilizadas são muito menores do que aquelas utilizadas para os testes com adultos, isso pode ser explicado pelo fato de que a concentração média letal (CL50) de peixes apresenta algumas variações que são esclarecidas devido à idade do indivíduo, sendo os peixes mais velhos mais resistentes aos herbicidas do que peixes mais jovens (FOLMAR; SANDERS e JULIN, 1979), este fato deve-se ao fato de que os embriões, não possuem uma toxicocinética desenvolvida, ou seja, seus mecanismos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (WALKER,

2008) dos agentes químicos aos quais o organismo entrou em contato, não estão totalmente desenvolvidos, fazendo com que essa fase do desenvolvimento seja extremamente sensível aos efeitos dos herbicidas presentes na água.

MACHADO (2015) diz que a concentração letal média (CL50), trata-se de um dado preliminar que apenas oferece uma ideia a respeito da real toxicidade de um agrotóxico aos peixes e a outros organismos que tenham contato com tal agente.

No presente estudo, observou-se que estes agentes químicos são responsáveis pela baixa taxa de eclosão, quando usados em concentrações elevadas, que muitas vezes, estão acima do padrão de potabilidade determinado pela legislação brasileira e que podem ser encontrado em águas superficiais (TESOLIN et al., 2014), que segundo estabelecido pela portaria 518/2004 do Ministério da Saúde para o herbicida glifosato é de 500 µg/L.

É comprovado que a exposição à agrotóxicos afeta a saúde dos seres humanos, o desenvolvimento embrionário, o sistema reprodutor, endócrino e ocasiona o desenvolvimento de neoplasias (CARNEIRO, 2015).

Os experimentos de exposição de embriões de peixes de acordo com a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico – OECD (1992), tem como finalidade definir os efeitos letais e sub-letais de produtos químicos.

Existem vários autores que vem demonstrando a alta mortalidade nos estágios iniciais de vida dos peixes quando estes são expostos à herbicidas a base de glifosato (FIORINO et al., 2018).

As pesquisas utilizando embriões para testes de letalidade e sub-letalidade de compostos químicos é uma área promissora no campo da ciência, mas, ainda se fazem necessárias mais pesquisas para testes toxicológicos averiguando alternativas de substituição de peixes adultos por embriões (LAMMER et al., 2009).

Estudos descrevem que a CL50 varia para diferentes peixes, dependendo da espécie, do estágio de vida e das condições experimentais (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2002).

A toxicidade de produtos químicos em organismos aquáticos pode ser afetada pela temperatura, pH, oxigênio dissolvido, tamanho e idade dos indivíduos e qualidade da água (NWANI et al., 2010); no presente estudo a idade dos indivíduos (adultos e embriões) pode explicar a grande diferença nas concentrações letais média obtidas para estas fases de vida utilizando o mesmo herbicida, porém, ao compararmos todos os

resultados é possível afirmar que os embriões são mais sensíveis a todos os herbicidas do que os indivíduos adultos.

No Brasil estudos revelam que os limites permissíveis de glifosato chegam a ser cinco mil vezes mais altos do que os europeus, onde é permitido apenas 0,1 µg/L na água, enquanto no Brasil a legislação permite que essas concentrações cheguem até 500 µg/L (REPORTER BRASIL, 2017), o que segundo mostram os resultados de nossos estudos, afetaria diretamente tanto os indivíduos adultos, assim como, os embriões de *Astyanax altiparanae*.

REFERÊNCIAS

ABNT, N. IEC 27001: 2006. **Tecnologia da informação-Técnicas de segurança-Sistemas de gestão de segurança da informação-Requisitos**, 2006.

BERTOLETTI, E.; GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; ZAGATTO, P. A.; DE SANEAMENTO AMBIENTAL, C. D. T. Ensaio biológico com organismos aquáticos e sua utilização no controle da poluição: curso-1987. In: (Ed.). **Ensaio biológico com organismos aquáticos e sua utilização no controle da poluição: curso-1987**: CETESB, 1987.

BRASIL - Ministério da Saúde, portaria n.518, 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências. 15p

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/produtos/ECO_HELP.htm-
Informacoes_Ecotoxicologicas Acesso em junho de 2019.

DAVICO, C. E. Toxicidade celular do herbicida à base de glifosato, Roundup® WG: impactos sobre a organização morfofuncional dos ovários do peixe-zebra Danio rerio, como modelo experimental. 2017.

DE VASCONCELLOS, M. G.; VERANI, N. F. e DE SÁ, O. R. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS CRÔNICOS DO HERBICIDA ROUNDUP (GLIFOSATO) SOBRE A DIFERENCIAÇÃO GONADAL DO BAGRE RHAMDIS HILARII (VALENCIENNES, 1840).

FIORINO, E.; SEHONOVA, P.; PLHALOVA, L.; BLAHOVA, J.; SVOBODOVA, Z.; FAGGIO, C. Effects of glyphosate on early life stages: comparison between *Cyprinus carpio* and *Danio rerio*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 9, p. 8542-8549, 2018. ISSN 0944-1344.

FOLMAR, L. C.; SANDERS, H. e JULIN, A. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 8, n. 3, p. 269-278, 1979. ISSN 0090-4341.

GEYER, H. J.; STEINBERG, C. E.; SCHEUNERT, I.; BRÜGGEMANN, R.; SCHÜTZ, W.; KETTRUP, A.; ROZMAN, K. A review of the relationship between acute toxicity (LC50) of γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH, Lindane) and total lipid content of different fish species. **Toxicology**, v. 83, n. 1-3, p. 169-179, 1993. ISSN 0300-483X.

GONÇALVES, L. U.; FERROLI, F. e VIEGAS, E. M. M. Effect of the inclusion of fish residue oils in diets on the fatty acid profile of muscles of males and females lambari (*Astyanax altiparanae*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 9, p. 1967-1974, 2012. ISSN 1516-3598.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E. S.; KRUATRACHUE, M.; SAHAPHONG, S.; VICHASRI-GRAMS, S.; POKETHITIYOOK, P. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Science Asia**, v. 28, p. 121-127, 2002.

KENDALL, R. J.; ANDERSON, T. A.; BAKER, R. J.; BENS, C. M.; CARR, J. A.; CHIODO, L. A.; COBB III, G. P.; DICKERSON, R. L.; DIXON, K. R.; FRAME, L. T. Ecotoxicology. **USDA National Wildlife Research Center-Staff Publications**, p. 516, 2001.

LAMMER, E.; CARR, G.; WENDLER, K.; RAWLINGS, J.; BELANGER, S.; BRAUNBECK, T. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 2, p. 196-209, 2009. ISSN 1532-0456.

LOMBARDI, J. Fundamentos de toxicologia aquática. **Sanidade de organismos acuáticos. Livraria Varela Editora. São Paulo**, p. 263-272, 2004.

MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. **Journal of Health Sciences**, v. 1, n. 1, 2015. ISSN 2447-8938.

MOURA, M.; FRANCO, D. e MATALLO, M. Manejo integrado de macrófitas aquáticas. **Biológico**, v. 71, n. 1, p. 77-82, 2009.

NWANI, C. D.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; KUMAR, P.; LAKRA, W. S. Lethal concentration and toxicity stress of Carbosulfan, Glyphosate and Atrazine to freshwater air breathing fish *Channa punctatus* (Bloch). 2010. ISSN 2008-4935.

OECD (1992) Test Guideline No. 301. OECD Guideline for Testing of Chemicals.

Ready Biodegradability. Disponível em:

<http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html>. Acessado em: 27 de Junho de 2019.

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment**. CRC press, 1995. ISBN 1560320907.

REPORTER BRASIL. Agrotóxicos: Brasil libera quantidade até 5 mil vezes maior do que Europa. Disponível em: <http://reporterbrasil.org.br/2017/11/agrotoxicosalimentos-brasil-estudo/> Acesso em: 05 de ago de 2019.

SÁNCHEZ-BAIN, A.; FORGET, G.; FEOLA, G.; RONCO, A. **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. CIID, Ottawa, ON, CA, 2004. ISBN 9685536333.

SABBAG, O. J.; TAKAHASHI, L. S.; SILVEIRA, A. N.; ARANHA, A. S. Custos e viabilidade econômica da produção de lambari-do-rabo-amarelo em Monte Castelo/SP:

um estudo de caso. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 3, p. 307-315, 2018. ISSN 1678-2305.

TESOLIN, G. A. S.; MARSON, M. M.; JONSSON, C. M.; NOGUEIRA, A. J. A.; FRANCO, D. A. D. S.; DE ALMEIDA, S. D. B.; MATALLO, M. B.; DE MOURA, M. A. M. Avaliação da toxicidade de herbicidas usados em cana-de-açúcar para o Paulistinha (*Danio rerio*). **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2014.

WALKER, C. H. **Organic pollutants: an ecotoxicological perspective**. CRC press, 2008.

CAPÍTULO II:

MOTILIDADE ESPERMÁTICA DE *Astyanax* *altiparanae* EM AMBIENTES CONTAMINADOS COM HERBICIDAS

INTRODUÇÃO

A motilidade espermática trata-se da quantidade de espermatozoides que se encontram móveis, é o parâmetro mais utilizado para determinar a qualidade seminal (CABRITA et al., 2010), o tempo de duração dessa motilidade também é importante para a ocorrência da fertilização, em peixes teleósteos a motilidade tem duração de cerca de um minuto (JAMIESON, 1991).

O parâmetro de motilidade espermática pode ser mensurado através de programas computacionais, como por exemplo o software Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), um sistema automático, utilizado para visualização, digitalização e análise de imagens sucessivas da trajetória dos espermatozoides, resultando em informações sobre a motilidade espermática (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média da trajetória (VAP), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), retilineariedade (STR), oscilação (WOB) e linearidade (LIN) (SALMITO-VANDERLEY et al., 2014).

A mensuração da motilidade espermática é um parâmetro extremamente importante para o sucesso da fertilização de oócitos (RURANGWA et al., 2004), conseqüentemente de grande necessidade durante a reprodução dos peixes, também é utilizada como ferramenta para avaliar os efeitos da presença de agentes contaminantes no meio ambiente (SANCHEZ, 2015).

Nos peixes teleósteos, que possuem fertilização externa, no momento em que a desova ocorre, os gametas são lançados no ambiente para que possa ocorrer a fertilização, é neste instante que os gametas ficam expostos aos vários contaminantes presentes na água (KIME e NASH, 1999).

A motilidade espermática (MOT) está entre os parâmetros mais sensíveis à presença de herbicida na água, fazendo com que essa motilidade seja reduzida (LOPES, 2014) ou até mesmo inibida (GONÇALVES, 2017), afetando de forma negativa a qualidade espermática desses animais.

O objetivo do presente estudo, foi determinar qual concentração dos herbicidas comerciais RoundUp transorb, Reglone e ArsenalNa são responsáveis por inibir a

motilidade espermática, de machos adultos de lambari do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*).

MATERIAL E MÉTODOS

Para a análise de motilidade espermática dos machos de *Astyanax altiparanae*, foram coletados 5 machos que receberam uma única injeção de hipófise de carpa na concentração de 5 mg/Kg, para indução da produção de gametas.

Após 8 horas da administração da injeção, os machos foram coletados e anestesiados um a um, através da imersão em água contendo eugenol a 1%.

O sêmen foi coletado com auxílio de uma pipeta de 1000 μ L (Eppendorf, Alemanha) e mantido em solução de ringer modifica (128,3 mM NaCl, 23,6 mM KCl, 3,6 mM CaCl₂, 2,1 mM MgCl₂), segundo protocolo de YASUI et al. (2015); a solução de ringer modificada trata-se de uma solução imobilizadora para os espermatozoides.

Para as análises de motilidade computadorizada foi utilizado o protocolo de Wilson-Leedy e Ingermann (WILSON-LEEDY e INGERMANN, 2007) e foram analisados os dados de motilidade espermática em termos de porcentagem, velocidade curvilínea (VCL) e velocidade em trajetória linear (VLP). As concentrações de herbicidas utilizadas estão descritas na tabela abaixo.

Tabela 4: Concentrações de herbicidas utilizadas para os experimentos com sêmen de machos adultos de *Astyanax altiparanae*.

RoundUp Transorb (μ g/L)	ArsenalNa (μ g/L)	Reglone (mg/L)
0 controle	0 controle	0 controle
96,0	30,0	1,3
107,0	62,0	2,0
120,0	83,0	4,0
160,0	125,0	58,0
240,0	-	10,0

A viabilidade celular foi analisada através de citometria de fluxo, utilizando o citometro Accuri C6, - BD Biosciences – USA, utilizando o kit LIVE/DEAD®SpermViability Kit, ThermoScientific Waltham, MA, USA.

RESULTADOS

Para os experimentos dos efeitos dos herbicidas na motilidade espermática de lambari do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*) os resultados mostraram quais as doses responsáveis por acarretar a não ocorrência da motilidade dos espermatozoides.

A concentração de 240 $\mu\text{g/L}$ herbicida RoundUp transorb (Fig. 11) foi a responsável por zerar a motilidade espermática. O maior percentual de motilidade foi do grupo controle com 61% de motilidade, ou seja foi o grupo que apresentou maior percentual de espermatozoides móveis durante as análises, consecutivamente os maiores percentuais de motilidades foram de 43%, 33%, 13% e 3% nas concentrações de 96, 107, 120 e 160 $\mu\text{g/L}$ respectivamente.

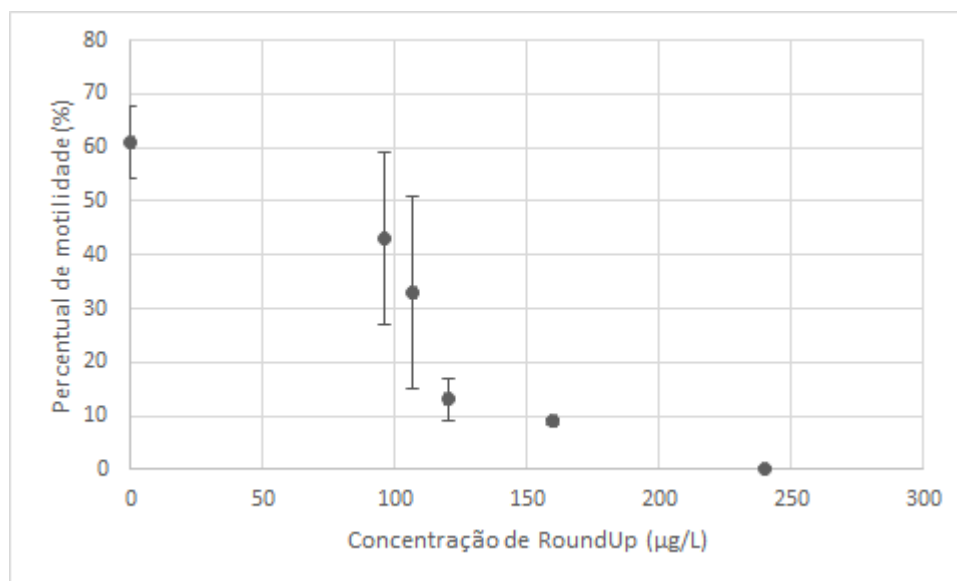


Figura 10: Resultados do percentual de motilidade espermática de *Astyanax altiparanae* em contato com água contaminada com herbicida RoundUp Transorb, nas concentrações de 0, 96, 107, 120, 160 e 240 $\mu\text{g/L}$.

Para o herbicida ArsenalNa (Fig. 12) a concentração responsável por inibir a motilidade espermática foi a de 125 $\mu\text{g/L}$, o maior percentual de motilidade espermática

foi também no grupo controle com 61% de motilidade, seguido pelas concentrações de 62 e 83 $\mu\text{g/L}$ com percentual de motilidade igual à 30% e 13% respectivamente.

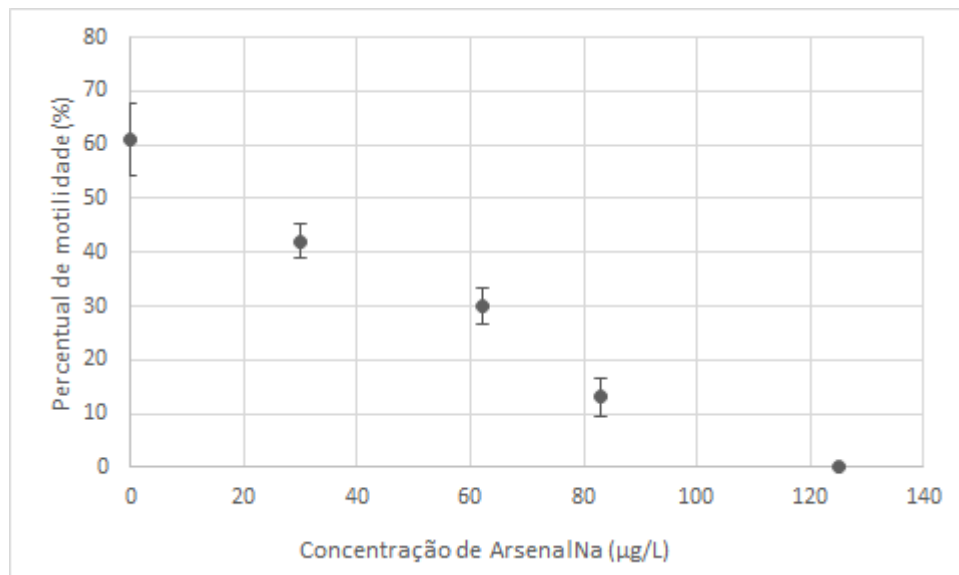


Figura 11: Resultados do percentual de motilidade espermática de *Astyanax altiparanae* em contato com água contaminada com herbicida ArsenalNa, nas concentrações de 0, 62, 83 e 125 $\mu\text{g/L}$.

O resultado do experimento utilizando o herbicida Reglone (Fig. 13), resultou em motilidade inibida quando utilizado a concentração de 10 mg/L .

O maior percentual de motilidade, assim como nos outros herbicidas, foi no grupo controle, resultando em uma motilidade igual à 61%, seguida por motilidades iguais à 31%, 15%, 12% e 10%, nas concentrações de 1,3; 2; 4 e 8 mg/L respectivamente.

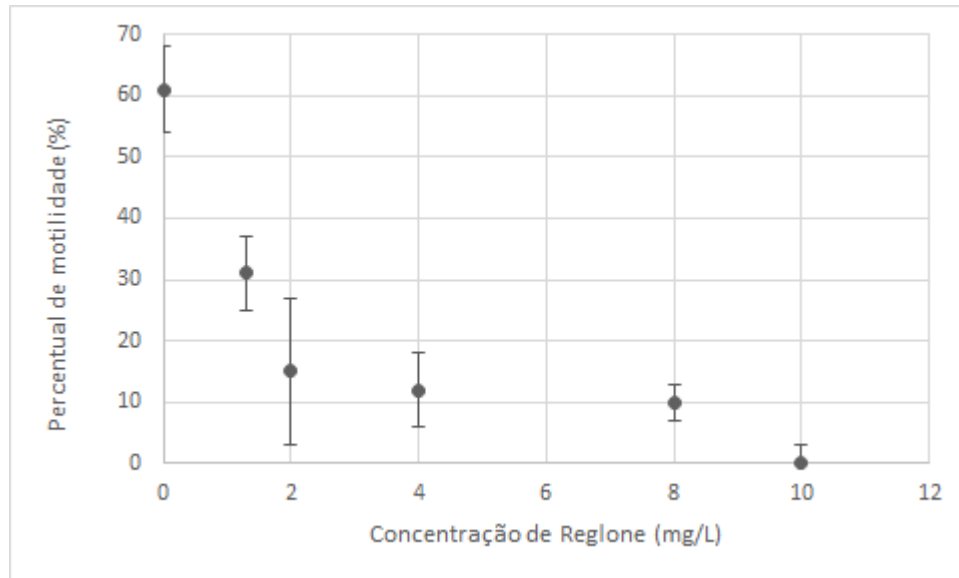


Figura 12: Resultados do percentual de motilidade espermática de *Astyanax altiparanae* em contato com água contaminada com herbicida Reglone, nas concentrações de 0, 1,3; 2; 4; 8 e 10 mg/L.

DISCUSSÃO

Neste experimento foi possível observar que o herbicida mais tóxico aos espermatozoides foi o ArsenalNa, com à concentração de 125 µg/L responsável por zerar a motilidade espermática, uma concentração 80 vezes mais baixa que o Reglone e quase metade da concentração encontrada para o RoundUp transorb.

A ausência de motilidade espermática resultante do contato com concentrações altas de herbicida corrobora com estudos feitos por LOPES et al. (2014) utilizando *Danio rerio*, e glifosato, documentando a redução na funcionalidade e diminuição na duração da motilidade espermática, convergindo conseqüentemente para uma diminuição na fertilidade dos machos adultos.

Diante dos dados apresentados neste estudo é possível constatar que a motilidade espermática resultante dos tratamentos com diferentes concentrações de herbicida foi significativamente reduzida em relação ao controle, afetando diretamente a qualidade espermática, esse resultado observado corrobora com o estudo de TULLY et al. (2006) que descreveu um declínio significativo da motilidade espermática geral em animais que foram expostos a um herbicida. A análise das conseqüências causadas pelos herbicidas na motilidade é de grande valia visto que a maioria dos peixes apresenta fertilização externa, dessa maneira, estes gametas tem contato direto com os herbicidas presentes no ambiente aquático (GONÇALVES et al., 2018). Nossos resultados corroboram com estudos feitos por GONÇALVES et al (2018) que realizou testes com *Astyanax lacustres* mostrando que herbicidas a base de glifosato, mesmo quando usados nas concentrações abaixo da permitida pela legislação brasileira (BRASIL, 2005) para corpos d'água de classe III, causam a diminuição da motilidade espermática bem como a sobrevivência dos espermatozoides, visto que de acordo com a legislação brasileira a concentração permitida de glifosato nos corpos d'água de classe III, que são adequados para o consumo humano (após tratamento básico), proteção de comunidades aquáticas, recreação e cultivo e irrigação bem como para a pesca e aquicultura é de 280 µg/L, e em nosso experimento a concentração de 240 µg/L foi capaz de impossibilitar que houvesse motilidade espermática.

CONCLUSÃO GERAL

Com o presente estudo pôde-se concluir que para o herbicida RoundUp transorb (glifosato) os indivíduos adultos mostraram-se mais sensíveis, resultando em uma CL50 igual a 3,11 mg/L; já para o herbicida Reglone (diquat) a fase mais sensível foram os embriões, com uma CL50 igual a 0,88 µg/L enquanto os espermatozoides mostraram-se mais sensíveis ao herbicida ArsenalNa (imazapyr), resultando em uma ausência de motilidade espermática quando utilizado na concentração de 125 mg/L.

A utilização de agentes químicos deve sempre levar em consideração a menor dose que atenda aos objetivos propostos, uma vez que a utilização destes agentes pode desencadear uma sucessão de efeitos e impactos aos organismos não-alvos e ao ecossistema; dessa forma, para que sejam utilizados deve-se levar em conta que cada herbicida reage de diferentes formas nas fases de vida do *Astyanax altiparanae*, porém a fase de vida que mostrou-se mais sensível aos efeitos dos herbicidas foram os embriões, indicando que as concentrações tóxicas para eles deveriam ser utilizadas como padrões.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. (2005). Resolução n. 357. de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

CABRITA, E.; SARASQUETE, C.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; ROBLES, V.; BEIRAO, J.; PÉREZ-CEREZALES, S.; HERRÁEZ, M. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, n. 5, p. 623-635, 2010. ISSN 0175-8659.

GONÇALVES, B. B. **Efeitos de herbicida à base de glifosato em aspectos reprodutivos de guppies** (*Poecilia reticulata*). 2017.

GONÇALVES, B.; NASCIMENTO, N.; SANTOS, M.; BERTOLINI, R.; YASUI, G.; GIAQUINTO, P. Low concentrations of glyphosate-based herbicide cause complete loss of sperm motility of yellowtail tetra fish *Astyanax lacustris*. **Journal of fish biology**, v. 92, n. 4, p. 1218-1224, 2018. ISSN 0022-1112.

JAMIESON, B. G. **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa: with a survey of lophophorate, echinoderm and protochordate sperm and an account of gamete cryopreservation**. Cambridge University Press, 1991. ISBN 0521413044.

KIME, D. e NASH, J. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. **Science of the Total Environment**, v. 233, n. 1-3, p. 123-129, 1999. ISSN 0048-9697.

LOPES, F. M. **Efeito da exposição ao herbicida glifosato sobre parâmetros bioquímicos, moleculares e espermáticos do peixe Danio rerio**. 2014.

LOPES, F. M.; JUNIOR, A. S. V.; CORCINI, C. D.; DA SILVA, A. C.; GUAZZELLI, V. G.; TAVARES, G.; DA ROSA, C. E. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. **Aquatic toxicology**, v. 155, p. 322-326, 2014. ISSN 0166-445X.

RURANGWA, E.; KIME, D.; OLLEVIER, F.; NASH, J. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v. 234, n. 1-4, p. 1-28, 2004. ISSN 0044-8486.

TULLY, D. B.; BAO, W.; GOETZ, A. K.; BLYSTONE, C. R.; REN, H.; SCHMID, J. E.; STRADER, L. F.; WOOD, C. R.; BEST, D. S.; NAROTSKY, M. G. Gene expression profiling in liver and testis of rats to characterize the toxicity of triazole fungicides. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 215, n. 3, p. 260-273, 2006. ISSN 0041-008X.

SALMITO-VANDERLEY, C.; PINHEIRO, J.; DE ALMEIDA, P.; LOPES, J.; LEITE, L. Methodologies for cryopreservation and mechanisms of sperm evaluation in characiformes fish. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, n. Suppl. 2, p. 343-350, 2014. ISSN 1981-5484.

SANCHEZ, J. A. A. **Efeitos comparativos de herbicidas à base de glifosato sobre parâmetros oxidativos e qualidade espermática no peixe estuarino *Jenynsia multidentata***. 2015.

WILSON-LEEDY, J. G. e INGERMANN, R. L. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. **Theriogenology**, v. 67, n. 3, p. 661-672, 2007. ISSN 0093-691X.

YASUI, G. S.; SENHORINI, J. A.; SHIMODA, E.; PEREIRA-SANTOS, M.; NAKAGHI, L. S. O.; FUJIMOTO, T.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; SILVA, L. A. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. **animal**, v. 9, n. 3, p. 464-470, 2015. ISSN 1751-7311.