

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**EFEITOS DE HERBICIDA À BASE DE
GLIFOSATO EM ASPECTOS
REPRODUTIVOS DE GUPPIES
(*Poecilia reticulata*)**

Bruno Bastos Gonçalves

Jaboticabal, São Paulo

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**EFEITOS DE HERBICIDA À BASE DE
GLIFOSATO EM ASPECTOS
REPRODUTIVOS DE GUPPIES**

Bruno Bastos Gonçalves

Orientadora: Dra. Percilia Cardoso Giaquinto

Tese apresentada ao Programa
de Pós-graduação em
Aqüicultura do Centro de
aqüicultura da UNESP -
CAUNESP, como parte dos
requisitos para obtenção do
título de Doutor

Jaboticabal, São Paulo

2017

T
E
S
E

I

G
O
N
C
A
L
V
E
S

B.
B.

2
0
1
7

Gonçalves, Bruno Bastos

G635e Efeitos de Herbicida à base de glifosato em aspectos reprodutivos de Guppies (*Poecilia reticulata*) / Bruno Bastos Gonçalves. -- Jaboticabal, 2017

iv, 40 f. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) , 2017

Orientador: Percilia Cardoso Giaquinto

Banca examinadora: Ana Carolina Kiss, Marisa Fernandes de Castilho, Ricardo de Oliveira Orsi, Thiago Lopes Rocha

Bibliografia

1. Escolha sexual. 2. *Poecilia reticulata*. 3. Toxicologia. 4. Roundup®. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura da UNESP.

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal. E-mail: goncalves.b.b@gmail.com

Sumário

Sumário	iii
Agradecimentos	4
Apoio financeiro	5
Resumo.....	6
Abstract	7
Resumo gráfico.....	8
1 Introdução.....	9
2 Objetivos	11
3 Metodologia	12
3.1 Animais.....	12
3.2 Produtos químicos e concentração média letal.....	12
3.3 Procedimento experimental	14
3.3.1 A exposição a herbicidas à base de glifosato afeta a escolha sexual da fêmea? 14	
3.3.2 Herbicidas à base de glifosato afetam o sucesso reprodutivo de machos?	17
3.4 Análises estatísticas.....	20
4 Resultados	21
4.1 A exposição a herbicidas à base de glifosato afeta a escolha sexual da fêmea?.....	21
4.1.1 Fêmeas evitam machos expostos ao HBG?.....	21
4.1.2 A exposição de fêmeas ao HBG afeta a escolha de fêmeas pelo macho mais atraente?21	
4.1.3 A exposição ao HBG afeta a receptividade sexual das fêmeas?	22
4.2 Herbicidas à base de glifosato afetam o sucesso reprodutivo de machos?	23
4.2.1 A exposição ao HBG afeta o comportamento de cômputo do macho?.....	23
4.2.2 A exposição ao HBG afeta a qualidade espermática?.....	24
4.2.3 Machos evitam fêmeas expostas ao HBG e despendem menor esforço reprodutivo com elas?	27
5 Discussão.....	29
6 Referências bibliográficas	35
7 Anexo I.....	43
8 Anexo II.....	44

Agradecimentos

Sou grato aos meus pais, que me proporcionaram uma ótima educação, tanto moral quanto científica e, principalmente de humildade, característica que julgo essencial para atuar no meio acadêmico e que tanto admiro em grandes cientistas como Carl Sagan. Também sou grato à Profa. Dra. Eliane Gonçalves que me indicou a orientação da Profa. Dra. Percília Cardoso Gianquinto sendo que fui bastante feliz sob sua orientação. Agradeço também a paciência, atenção e ensinamentos que a Profa. Percília tem me proporcionado, contribuindo para a minha formação como cientista e direcionando meus pensamentos que frequentemente se dispersam perante várias emoções e ideias que envolvem a criatividade científica. Sou grato também ao Dr. Gilson Volpato pelo ensinamento de metodologia científica, que, apesar do pouco convívio, me transmitiu seu conhecimento por meios digitais como o SOS ciência, livros e por transmissão de memes (termo cunhado por Richard Dawkins no livro “O gene egoísta”) por meio do contato que tive com seus estudantes (incluindo minha orientadora). Agradeço CAUNESP pelo importante suporte acadêmico, ao Dr. George Yasui e Prof. Dr. Rafael Nóbrega e a todos seus estudantes pelo apoio nas análises de espermatozoide. Agradeço ao Prof. Dr. Joel Mesa que, com grande paciência sempre se dispôs a me ajudar com aspectos técnicos dos experimentos. Sou imensamente grato à Profa. Dra. Sílvia Nishida, ao Prof. Dr. Felipe Amorim, Prof. Dr. Rodrigo Egydio e Prof. Dr. Helton Delício pelas ótimas conversas e aprendizado! Sou igualmente grato a todos os colegas de laboratório pelo ótimo convívio e imensa troca de experiências. Entre eles, cito Patrícia Tatemoto, Graziela Valença, Mônica Serra, Fernanda Pereira, Cândido Neto, Clarissa Lerois, Vanessa Stramantinoli, Juliane Campos, Adriana Barretto, Rafaela Torres, Fábio Zanuzzo, Marciano Venâncio e Renata Falaguera, os quais tive mais convívio e que me aturaram durante todo esse tempo! Agradecimento especial ao estudante Bruno Camargo, por ser tão louco quanto eu, adotando minhas ideias de experimento e se tornando meu primeiro orientando, me proporcionando grande aprendizado. Afinal, ensinar também é aprender! Agradecimento especial ao antigo colega veterano Dr. Thiago Lopes Rocha por todo o apoio quanto aos experimentos e criação de Guppies, assim como pela inspiração para esse trabalho, advindos dos

trabalhos advindos de seu grupo de pesquisa. Agradeço a todos da república Vão di Cerka, que me acolheram com tanto carinho, tornando toda a vivência em Botucatu mais prazerosa. Agradeço com bastante estima todo o pessoal da Universidade McGill (Canadá), em especial o Dr. Rüdiger Krahe que me deu todo suporte acadêmico e até afetoso em minha estadia lá, e o Dr. Andrew Hendry por todo ensinamento e disponibilidade para que eu tivesse a incrível experiência do doutorado sanduíche. Por fim, agradeço a todos os peixes que contribuíram com sua vida para esse trabalho.

Apoio financeiro

CNPq, bolsa de doutorado, processo nº 147399/2013-0.

CAPES, bolsa de doutorado sanduíche, processo nº 99999.007351/2015-01

Resumo

A população humana cresce em proporções maiores que a produção de alimentos. Nesse cenário, a agricultura potencializa este cultivo por meio do uso de defensivos agrícolas, como por exemplo, herbicidas à base de glifosato (HBG). Entretanto, tais produtos possuem vários efeitos adversos em organismos não-alvos, como peixes. Estudos apontam danos em tecidos e em material genético de peixes, porém, não há estudos sobre o comportamento reprodutivo dessa espécie quando expostas a concentrações permitidas por lei. Assim, testamos os efeitos de HBG na seleção sexual de parceiros e na qualidade espermática de machos de *Poecilia reticulata*. Para isso, avaliamos o comportamento sexual, o interesse sexual, a qualidade espermática e a receptividade das fêmeas a machos expostos a 2 concentrações de HBG (50 e 100 µg/L) por 48 horas. Para avaliar a escolha de parceiros, utilizamos o método de escolhas dicotômicas e análise de múltiplas escolhas. Já para análise da qualidade espermática, avaliamos a morfologia, a viabilidade, a concentração e a motilidade dos espermatozoides. Nossos resultados indicam que machos não expostos ao HBG diminuem a exibição para fêmeas expostas ao HBG e evitam copular com fêmeas expostas à concentração de 100µg/L. Além disso, fêmeas expostas ao HBG são menos receptivas à cópula. O HBG afetou a morfologia dos espermatozoides, onde machos expostos a 50µg/L apresentaram maior quantidade de células com danos primários. Porém, não afetou a viabilidade, concentração e motilidade dos espermatozoides. Nossos dados indicam que concentrações ambientalmente relevantes de HBG podem afetar o comportamento reprodutivo e a qualidade espermática de peixes.

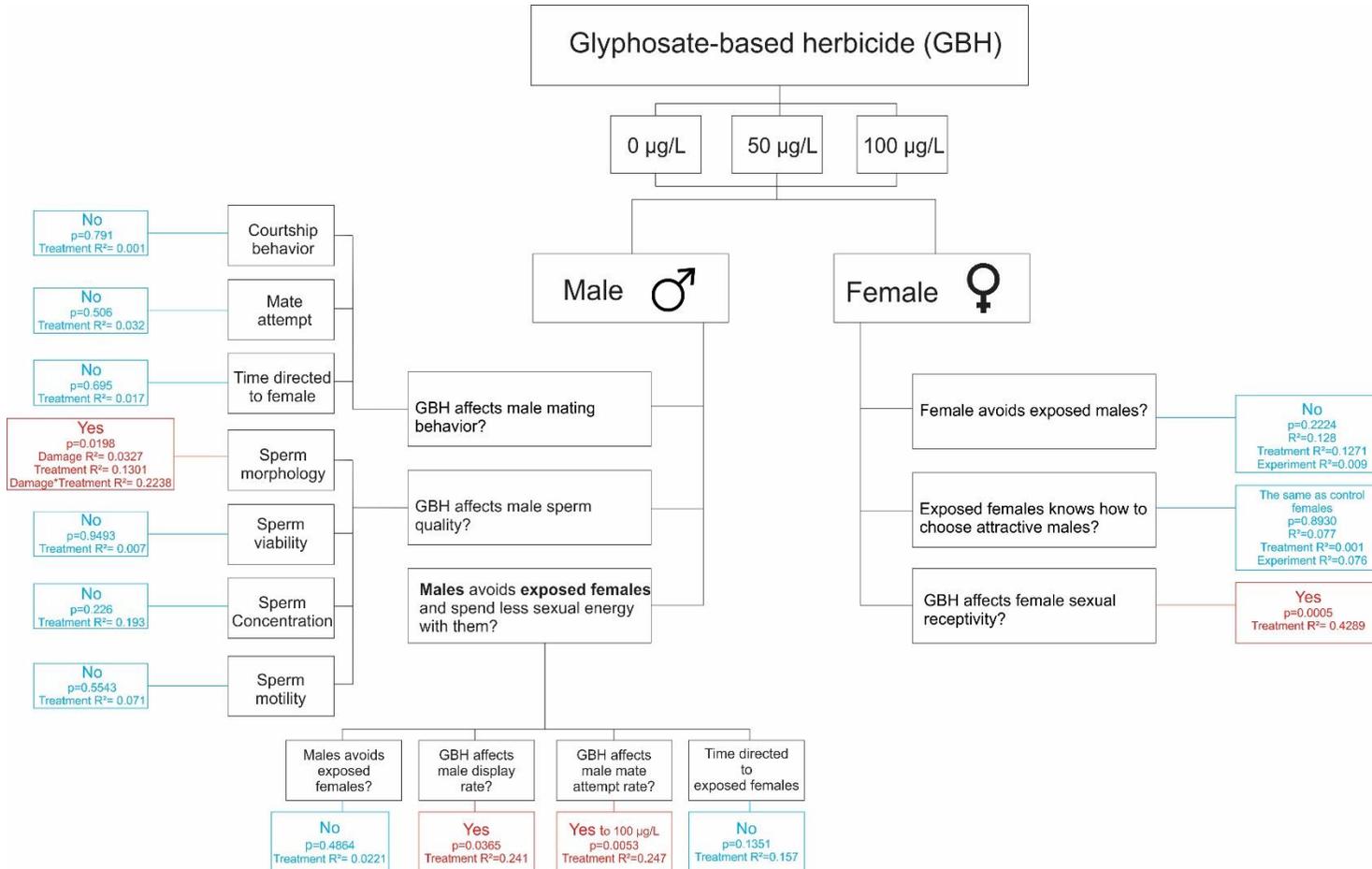
Palavras-chave: Escolha sexual, *Poecilia reticulata*, toxicologia, Roundup®

Abstract

Human population grows in bigger proportions than food production worldwide. To solve this problem, increase food production is required. Agriculture has potentialized food production through pesticides usage. Besides that, GMO's increase production and usage of glyphosate based herbicide (HBG), since this product does not affect GMO's. HBG's have many side effects on non-target animals, such as fishes. Many studies demonstrated damage in a lot of tissues and DNA. However, effects on behavior and even in concentrations allowed by law have not been studied. We aim to assess the effects of a GHB on physiological and behavioral reproductive features of *Poecilia reticulata* as male sexual behavior, sexual interest, sperm quality and female receptivity. We used dichotomous and multiple-choice arenas for mate choice and viability, concentration, motility and morphology to assess sperm quality. HBG decrease female receptivity, affects male interest on perform displays and mate attempt with females exposed to 100µg/L. HBG also affected sperm quality of males exposed to 50µg/L concentration. Despite this, we did not find any effect on viability, concentration and motility of sperm cells of exposed males to any concentration. We conclude that HBG affects female receptivity, and, in turn, it affects sexual male effort, reducing display and mate attempt rate. Our data shows that HBG, even in environment relevant concentrations, can affect reproductive behavior and sperm quality. We show here the necessity to assess with more caution the toxicology of pollutants and its effects, as the law that regulates it.

Keywords: Mate choice, *Poecilia reticulata*, toxicology, aromatase, Roundup®

Resumo gráfico



1 Introdução

Thomas Robert Malthus em sua obra “*An Essay on the Principle of Population*” (1798), já previa que a população humana cresceria em proporções bem maiores que a produção de alimentos no mundo. Para aumentar a produtividade de alimentos, a humanidade tem se servido de maior exploração de recursos naturais, sendo o desmatamento e uso do solo para produção agropecuária um dos fatores responsáveis por grande parte da perda de biodiversidade (MATSON et al. 1997; TILMAN et al. 2001). Uma maneira de aumentar a produtividade do setor agropecuário é utilizar pesticidas, evitando perdas por pragas (WILSON e TISDELL, 2001). Porém, o uso de pesticidas tem levado a diversos danos ao meio ambiente e à sobrevivência das espécies.

Um dos principais pesticidas utilizados no combate de plantas daninhas é composto de formulação à base de glifosato (HBG). De acordo com a agência de proteção ambiental (2015; EPA), esses produtos lideram o mercado mundial de pesticidas desde 2001 (análise feita até 2007), de 40 a 45 milhões de quilogramas em 2001 para 90 a 92,5 milhões de quilogramas em 2007. São produtos largamente utilizados para aumentarem a produtividade (TIMMERMANN et al. 2003). Além disso, a utilização de organismos geneticamente modificados (GMO's) que são resistentes ao glifosato, favorece ainda mais o uso desse tipo de pesticida.

Herbicidas à base de glifosato são utilizados principalmente em ambientes terrestres. No entanto, podem ser encontrados em quantidades substanciais em ambientes aquáticos. Pesticidas atingem corpos d'água principalmente por meio de ação dos ventos no momento da aplicação, por meio da lixiviação do solo e aplicação direta e ilegal em leitos de corpos d'água, no intuito de controlar o crescimento de algas (ANNETT, et al. 2014). Segundo esses autores, concentrações de 0,03µg/L à 1950µg/L podem ser encontradas em ambientes naturais, apesar de legislação específica determinar nível máximo de glifosato em corpos d'água. No Brasil, segundo resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente CONAMA 357 para corpos d'água próprios para banhos e cultura, o limite máximo é de 65µg/L. Já a *United States Environmental Protection Agency* (US EPA) estabelece 700µg/L, enquanto a agência ambiental Canadense estabelece 280µg/L, ambas em água destinadas ao consumo humano.

É de se esperar que os prejuízos ambientais decorrentes da poluição de cursos d'água por HBG ocorressem apenas em organismos fotossintetizantes, pois o glifosato age inibindo a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP). Essa enzima é responsável pela produção de aminoácidos essenciais em plantas como o triptofano, fenilalanina e tirosina (AMRHEIN e STEINRÜCJEN, 1980; ANNETT et al. 2014). Sendo essa enzima inibida, a produção desses aminoácidos fica comprometida, levando a planta à morte. Como animais não são capazes de produzir aminoácidos essenciais, obtendo-os por meio da alimentação, não possuem esse ciclo bioquímico e essa enzima. Portanto, não deveriam ser afetados por esse composto químico. No entanto, existem estudos apontando efeitos de herbicidas à base de glifosato na saúde dos animais. Alguns desses efeitos em diversos grupos taxonômicos são: má-formação ontogenética (LAJMANOVICH et al. 2003; COSTA e NOMURA, 2016), aborto (ARBUCKLE et al., 2001), inibição da atividade da acetilcolinesterase, comprometendo impulsos nervosos (CATTANEO et al., 2011; GLUSCZAK et al. 2006; LAJMANOVICH et al. 2011; MENÉNDEZ-HELMAN et al. 2012; MODESTO e MARTINEZ, 2010; SALBEGO et al. 2010; SANDRINI et al. 2013) e aromatase, afetando níveis hormonais sexuais (BENACHOUR et al 2007; RICHARD et al. 2005; SOSO et al. 2007).

Em peixes, existem estudos apontando danos causados por HBG em fígado, rins, brânquias e cérebro (ARELLANO et al. 1999; AYOOLA, 2008; JIRAUNGKOORSKUL et al. 2003; LANGIANO e MARTINEZ, 2008; NESKOVIC et al. 1996; SOUZA-FILHO et al. 2013a), DNA, qualidade espermática e alterações em perfis hormonais (HARAYASHIKI et al. 2013; SOSO et al. 2007). Apesar da vasta literatura a respeito dos efeitos de herbicidas à base de glifosato na saúde dos peixes, são poucos os estudos que verificam os efeitos de concentrações subletais de glifosato em seu comportamento. O comportamento animal pode ser um dos primeiros *outputs* apresentados, indicando má funcionalidade fisiológica, sendo considerado bioindicador de qualidade ambiental (ADAMS, 2002; HOLT et al. 2010).

Assim, objetivamos verificar a ação do HBG na qualidade espermática, no comportamento e escolha sexual de machos e na escolha de parceiros e receptividade de fêmeas de *Poecilia reticulata*, Peters 1859 (Guppy).

Escolhemos essa espécie como modelo de trabalho considerando sua facilidade de reprodução em cativeiro, por possuir comportamento reprodutivo evidente, entre eles o de corte e de interceptação da fêmea (*sneaky behavior*; LILEY, 1966; KOHNEN, 1991; HOUDE, 1997), pela facilidade no manejo em laboratório e pela indicação para estudos toxicológicos pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 1992).

Acreditamos que a exposição de peixes ao herbicida pode afetar o comportamento sexual e a escolha de parceiros, considerando os efeitos na atividade da acetilcolinesterase (SANDRINI et al. 2013) e na aromatase (BENACHOUR et al 2007; RICHARD et al. 2005; SOSO et al. 2007). Prevemos também que a qualidade espermática de machos de *P. reticulata* seja afetada, considerando que o glifosato afeta integridade de microtúbulos (HEDBERG e WALLIN, 2010) e atividade enzimática da caspase 3, podendo levar à apoptose e ruptura da membrana celular (KIM et al. 2013; LAKHANI et al., 2006).

2 Objetivos

Nosso objetivo foi estudar os efeitos de três concentrações de uma formulação comercial de glifosato na seleção sexual de Guppies. Como objetivos específicos, temos:

1. A exposição a herbicidas à base de glifosato afeta a escolha sexual da fêmea?
 - 1.1 Fêmeas evitam machos expostos ao HBG?
 - 1.2 A exposição de fêmeas ao HBG afeta sua escolha pelo macho mais atraente?
 - 1.3 A exposição ao HBG afeta a receptividade sexual das fêmeas?
2. Herbicidas à base de glifosato afetam o sucesso reprodutivo de machos?
 - 2.1 A exposição ao HBG afeta o comportamento de corte do macho?
 - 2.2 A exposição ao HBG afeta a qualidade espermática?
 - 2.3 Machos evitam fêmeas expostas ao HBG e despendem menor esforço reprodutivo com elas?

3 Metodologia

3.1 Animais

Nós usamos machos ($1,62 \pm 0,07$ cm, comprimento padrão) e fêmeas ($3,14 \pm 0,42$ cm, comprimento padrão) de *P. reticulata* coletados em uma lagoa localizada na Fazenda Lageado, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, *Campus* Botucatu ($22^{\circ}50'26.11''S$ $48^{\circ}25'39.56''O$). Vale ressaltar que não há nenhuma atividade agropecuária próximo à lagoa. Analisamos a qualidade da água da mesma para a identificação de possíveis poluentes e não foi encontrado nenhum tipo poluição, dentro dos parâmetros analisados (Anexo I). Apesar de não termos analisado a presença de glifosato ou seus derivados na água, por motivos técnicos, a ausência dos demais poluentes indicam baixa probabilidade de poluição.

Os peixes coletados na lagoa da fazenda lajeado da UNESP foram mantidos em um tanque estoque, com densidade de 0,2 peixes por litro por pelo menos 1 mês antes do início dos experimentos. Esses peixes foram utilizados para os experimentos de comportamento dos machos e qualidade espermática. Já para os demais objetivos, utilizamos peixes descendentes de indivíduos de Trinidad e Tobago, que foram mantidos em aquários também com densidade de 0,2 peixes por litro (aquário de 60 litros) da universidade McGill (Montreal, QC, Canadá). Todos os animais demonstraram completa aclimação às condições laboratoriais e presença dos pesquisadores. A temperatura durante a aclimação e experimentos foi mantida em 24-26°C, amônia < 0,04 ppm, aeração constante (inclusive durante os experimentos), pH em torno de 7,2 e 12 horas de ciclo claro/escuro. Peixes foram alimentados uma vez por dia com ração para peixes neotropicais até a saciedade, incluindo os dias experimentais (experimentos se iniciaram pelo menos uma hora após a alimentação). Todo procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNESP, Botucatu (protocolo número 710).

3.2 Produtos químicos e concentração média letal

Executamos todos os experimentos utilizando uma formulação comercial de glifosato contendo 143g/L de sal de amônio de glifosato e 3-iodo-2propinilo butilcarbamato à 0,0017% (número de registro: 22627). No teste de concentração média letal, utilizamos cinco tratamentos nominais de HBG (100, 1000, 10000,

100000µg/L e 300000 µg/L de equivalente de glifosato) e um controle (0µg/L de equivalente de glifosato). Temperatura, pH e oxigênio dissolvido se mantiveram constantes durante o experimento ($27,8\pm 0,7^{\circ}\text{C}$, $6,933\pm 0,1154$ e $3,2166\pm 0,2433\text{mg/L}$, respectivamente).

O teste de concentração média letal (CL50, 48h) foi realizado conforme a norma ABNT NBR 15088 e o método estatístico *trimmed spearman-karber* (HAMILTON et al. 1977) para 48 horas de exposição. As exposições utilizadas nesse trabalho foram todas de 48 horas, segundo norma da ABNT para produtos químicos não-voláteis, iniciando os experimentos às 10 da manhã e finalizando-os às 10 horas da manhã dois dias após o início do experimento. Nesse período, os aquários foram verificados uma vez a cada 24 horas, onde peixes mortos foram retirados dos aquários.

O valor da concentração nominal média letal para os Guppies foi de 316µg/L. Dados de mortes ao longo do tempo estão apresentados no anexo II. Nós determinamos as concentrações dos experimentos baseado no CL50, 48h, nas concentrações permitidas por leis brasileiras e dos estados unidos e concentrações que são encontradas em ambientes naturais. Portanto, as concentrações nominais foram: 0 (grupo controle), 50 (~15% do CL50, 48h) e 100µg/L (~30% do CL50, 48h). As concentrações nominais no valor de 150µg/L ou maiores resultaram em morte de alguns indivíduos, assim como o comportamento de “boquejar”, nas 48 horas de exposição. Sendo assim, tais concentrações foram excluídas dos nossos experimentos. A concentração de 50µg/L é permitida em corpos d’água pela legislação brasileira (CONAMA 357). Já a 100µg/L é permitida em corpos d’água pela Agência de Proteção Ambiental Americana – EPA, que considera como limite máximo 700µg/L.

Cabe observar que a exposição aguda pode ocorrer em ambientes naturais como em ambientes lóticos que receberam recente aporte do herbicida, seja por aplicação direta na água (feito ilegalmente para controle de algas) ou por aplicações em porções de terras adjacentes aos corpos d’água. Segundo ANNETT et al. (2014), é possível encontrar glifosato em corpos d’água desde 0,075µg/L à 1950µg/L.

3.3 Procedimento experimental

3.3.1 A exposição a herbicidas à base de glifosato afeta a escolha sexual da fêmea?

3.3.1.1 Fêmeas evitam machos expostos ao HBG?

Nós utilizamos 40 machos, formando 20 duplas, sendo cada uma similar em comprimento e padrão de coloração. Os machos de cada dupla foram divididos e submetidos aos tratamentos do herbicida, sendo que, da dupla, um era controle (N=20) e o outro do grupo 50µg/L (N=10) ou 100µg/L (N=10). A exposição aos tratamentos teve duração de 48 horas. Após esse período, colocamos cada dupla na arena de escolha dicotômica, juntamente com uma fêmea não-gravídica que não teve nenhum contato prévio com os machos da dupla, como ilustrado na Fig 1. Mantivemos a fêmea no compartimento central por 10 minutos antes do início das gravações. Dessa forma, ela recebeu estímulos químicos e visuais dos machos de forma equitativa. Após esse período, libertamos a fêmea e iniciamos as gravações por 15 minutos. Das filmagens, descartamos os primeiros 5 minutos (tempo para aclimatação e exploração da fêmea) e consideramos apenas os últimos 10 minutos de registro, medindo o tempo que a fêmea passou inserida totalmente nas zonas de escolha de cada macho. Os vídeos foram analisados às cegas, de forma que o pesquisador não sabia a qual grupo experimental o peixe em análise pertencia.

3.3.1.2 A exposição de fêmeas ao HBG afeta sua escolha pelo macho mais atraente?

Primeiramente, determinamos qual o macho mais e menos atraente para fêmeas. Para isso, escolhemos 4 machos com grande diferença em tamanho e padrões de coloração e 15 fêmeas do tanque estoque. Colocamos os quatro machos (desconhecidos pela fêmea) e uma fêmea por vez em uma arena de múltipla escolha (Fig 2). Em cada teste, nós sorteamos a posição de cada macho nas laterais da arena e colocamos uma fêmea no centro do aquário por 10 minutos antes do início dos testes, a fim de que a fêmea recebesse estímulos visuais e químicos dos machos de forma equitativa. Após esse tempo, libertamos a fêmea e filmamos sua resposta por 15 minutos. Da mesma forma que no item 1.1, nós descartamos os 5 primeiros minutos na análise dos vídeos, tempo considerado para aclimatação e exploração do aquário. Nos últimos 10 minutos, registramos o tempo

em que a fêmea passou inserida totalmente nas zonas de escolha de cada macho. Os vídeos foram analisados às cegas.

Posteriormente, submetemos 10 fêmeas a cada tratamento (00, 50 e 100 μ g/L de HBG) por 48 horas. Após esse período, colocamos os machos mais e menos atraentes, obtidos no experimento anterior, na arena de escolha dicotômica (em posição aleatória em cada teste). Além disso, colocamos as 10 fêmeas de cada tratamento (uma por vez) no centro da arena e realizamos o teste de escolha exatamente como descrito no item 3.31.1. As fêmeas nunca tiveram contato algum com os machos utilizados no experimento. Registramos nos 10 minutos de filmagem, a quantidade de tempo em que a fêmea estava inserida completamente em cada zona da arena de escolha dicotômica. Os vídeos foram também analisados às cegas.

3.3.1.3 A exposição ao HBG afeta a receptividade sexual das fêmeas?

Utilizamos 10 fêmeas não-gravídicas de cada tratamento (0, 50 e 100 μ g/L) expostas ao HBG por 48 horas e as colocamos individualmente com quatro diferentes machos (um por vez) em um aquário de 10 litros e filmamos o casal por 15 minutos (descartando os primeiros 5 minutos). Por meio das filmagens, estabelecemos uma pontuação para o quanto a fêmea está receptiva à cópula segundo o etograma de HOUDE (1987; Tabela 1). Nesse etograma, cada vez que o animal apresentava o comportamento descrito, a pontuação era atribuída. No final, a pontuação foi somada para cada indivíduo. Os vídeos foram analisados às cegas.

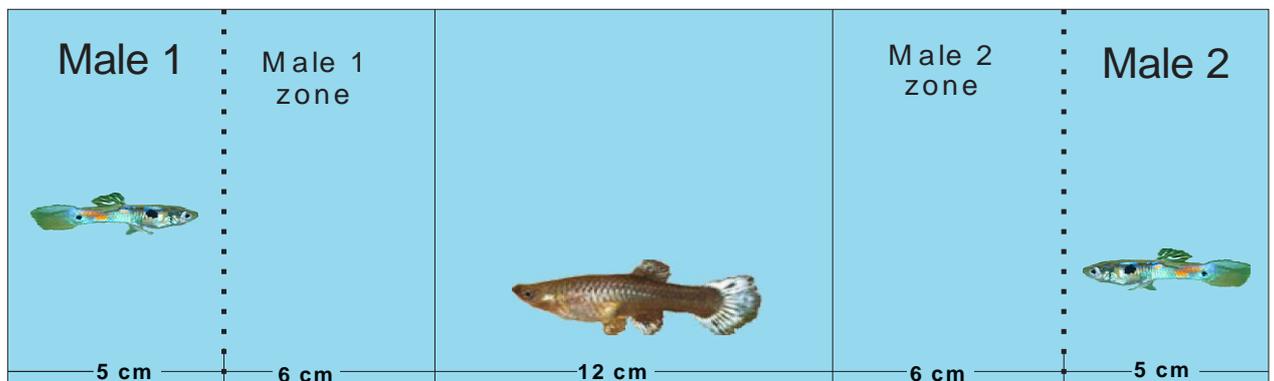


Fig 1. Arena de escolha dicotômica para a escolha de parceiros em *Poecilia reticulata*. A arena permite a escolha baseada em sinais visuais e químicos, usando uma tela como divisor (linha tracejada). A zona neutra corresponde aos 12

cm no centro do aquário, Male 1 zone e Male 2 zone indicam as zonas do compartimento central próximo aos respectivos machos, onde o tempo de permanência da fêmea foi contabilizado.

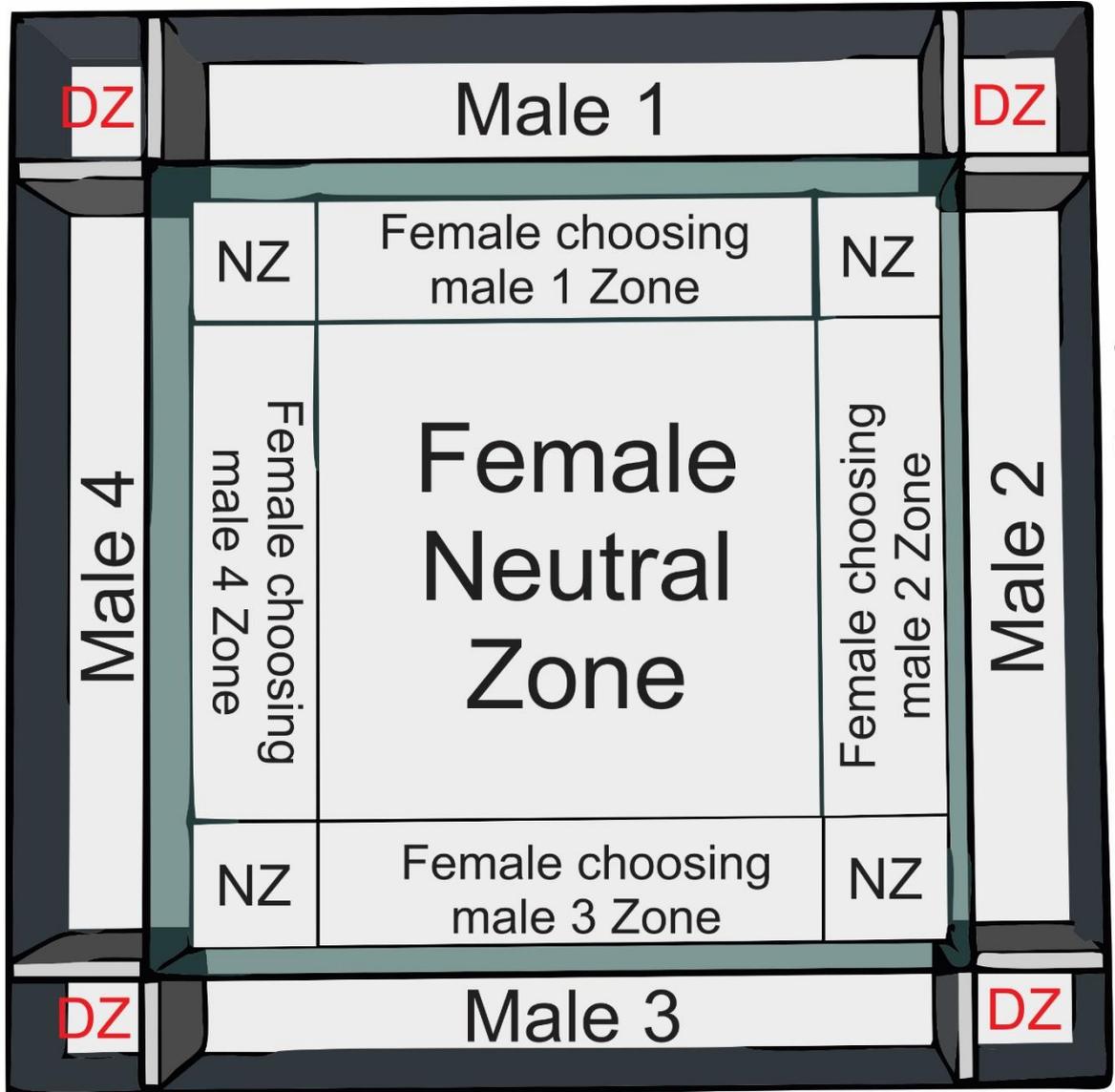


Fig 2. Arena de múltipla escolha vista de cima. A fêmea foi colocada no centro da arena (*Female Neutral Zone*) e os machos colocados cada um em um canto da arena, separada por uma tela que permite comunicação visual e química entre os indivíduos. As linhas próximas aos compartimentos laterais são áreas de escolha dos respectivos machos (*female choosing male zone*). Os quadriláteros laterais (NZ- *Neutral zone*) são zonas neutras, pois não se pode definir qual macho atraiu a fêmea para aquela área. DZ indica *dead zone*, onde machos e fêmeas são impedidos de visitar por barreira física.

Tabela 1. Sistema de pontuação para a receptividade das fêmeas, baseado no etograma proposto por HOUDE (1987).

Pontuação	Comportamento de machos e fêmeas
0	Sem resposta; fêmeas ignoram os machos
1	Fêmeas se direcionam para os machos mas não se aproximam deles
2	Fêmeas se movimentam em direção aos machos
3	Machos e fêmeas circulam entre si
4	Tentativa de cópula; machos fazem contato do gonopódio na abertura urogenital da fêmea
5	Cópula; Contato do gonopódio com a abertura urogenital da fêmea, seguido de contração característica de ejaculação do macho

3.3.2 Herbicidas à base de glifosato afetam o sucesso reprodutivo de machos?

3.3.2.1 A exposição ao HBG afeta o comportamento de cômte do macho?

Submetemos 10 machos em cada tratamento (0, 50 e 100µg/L) por 48 horas ao HBG. Após esse período, colocamos cada macho individualmente com uma fêmea não-gravídica em um aquário de 10 litros e os filmamos por 15 minutos. Descartamos os primeiros cinco minutos e nos 10 minutos restantes registramos o tempo em que o macho fica direcionado para fêmea, a frequência de comportamentos de cômte e tentativas de cópula dos machos. Os vídeos foram analisados às cegas.

3.3.2.2 A exposição ao HBG afeta a qualidade espermática?

Utilizamos 15 indivíduos (5 em cada tratamento; 0, 50 e 100µg/L) utilizados no experimento do objetivo 2.1, após os experimentos comportamentais, para fazer a análise de qualidade espermática. Os indivíduos utilizados possuíam

espermatozoides em estoque e não realizaram nenhuma cópula nas 48 horas anteriores ao experimento. Os procedimentos adotados estão descritos a seguir.

3.3.2.2.1 Extração do sêmen

Para a extração do sêmen, anestesiámos os machos de *P. reticulata* com benzocaína (80 mg/L) via absorção branquial e aplicamos uma leve pressurização na cavidade abdominal no sentido antero-posterior, até que o sêmen fosse extraído em no máximo de 5 tentativas. Nós diluímos o sêmen extraído em 30µl de uma solução fisiológica (GARDINER, 1978), contendo 207mM de NaCl, 5,4mM de KCl, 1,3mM de CaCl₂, 0,49mM de MgCl₂, 0,41mM de MgSO₄ e 10mM de Tris, ajustando o pH para 7,5 com HCL. Posteriormente, pipetamos cada amostra por cerca de 100 vezes para quebrar as espermatózeugmatas (estruturas em forma arredondada que contém os espermatozoides, que ganham mobilidade apenas após sua soltura) e liberar os espermatozoides.

3.3.2.2.2 Morfologia de espermatozoides

Utilizamos 15 µl da solução fisiológica contendo esperma fixado em uma solução de formol-salina e 5µl dessa solução foi depositada em lâmina, corado com corante rosa bengala (3g de rosa bengala, 99ml de água destilada e 1ml de formaldeído a 40%), segundo STREIT JR. et al. (2004). A morfologia de 200 células espermáticas de cada amostra foi analisada por meio de microscopia ótica (aumentada 1000 vezes) e classificados como normais, patologia primária e patologia secundária, segundo HERMAN et al. 1994 (Tabela 2). As análises foram feitas às cegas.

3.3.2.2.3 Viabilidade espermática

Analisamos a viabilidade de células espermáticas por meio de microscopia de fluorescência. Para isso, 7 µl da solução fisiológica contendo sêmen foram mantidas em temperatura de 0°C até as análises. Coramos cada amostra com 0,1µl de SYBR Green e iodeto dipropídico, que foram colocadas em lâminas e analisadas sob microscopia de fluorescência com aumento de 200 vezes. Tiramos seis fotos de cada campo de visualização, três destacando células vivas com o corante SYBR Green e três destacando células mortas marcadas com Iodeto dipropídico. Os campos visuais foram escolhidos aleatoriamente. Por meio das

fotografias, registramos a proporção de células vivas. As análises foram feitas às cegas.

3.3.2.2.4 Concentração espermática

Utilizamos 10 µl da solução fisiológica contendo sêmen e colocamos em um hemocítmetro, segundo HILBIG et al. 2008 e VARELA-JUNIOR et al. (2012). Usamos a microscopia ótica (aumento de 200 vezes) para a contagem de células espermáticas.

Tabela 2. Classificação das principais patologias (segundo HERMAN et al. 1994) encontradas em células espermáticas de *Poecilia reticulata* expostos ao HBG.

Tipo de dano	Patologia
Normal	Normal
Primário (Leve)	Cauda dobrada
Primário (Leve)	Cauda dobrada parte final
Primário (Leve)	Cabeça solta
Primário (Leve)	Cauda solta
Primário (Leve)	Edema de colo
Primário (Leve)	Gota proximal (L até 3%)
Primário (Leve)	Gota distal (L até 5%)
Primário (Leve)	Cauda dupla
Secundário (Grave)	Cauda quebrada parte inicial
Secundário (Grave)	Cauda quebrada parte intermediária
Secundário (Grave)	Cauda quebrada parte final
Secundário (Grave)	Cauda quebrada junto à cabeça
Secundário (Grave)	Cauda enrolada
Secundário (Grave)	Cauda enrolada parte final
Secundário (Grave)	Cauda degenerada
Secundário (Grave)	Cauda curta
Secundário (Grave)	Cauda abaxial
Secundário (Grave)	Cauda corrugada
Secundário (Grave)	Microcefalia
Secundário (Grave)	Macrocefalia

3.3.2.2.5 Motilidade espermática

Utilizamos outros 8 µl da solução fisiológica contendo sêmen de cada amostra e colocamos em uma lâmina banhada com álcool polivinílico (1%). Analisamos a motilidade por meio da microscopia ótica com aumento de 200 vezes e gravamos 1,5 minutos da motilidade de cada amostra. Os parâmetros da motilidade espermática analisados foram: Porcentagem de células estáticas (totalmente

estacionadas no campo de visão), progressivas (com motilidade que de fato leva ao deslocamento da célula) e não progressivas (com motilidade, mas sem deslocamento efetivo, sendo comum um movimento circular). Os vídeos foram analisados às cegas.

3.3.2.3 Machos evitam fêmeas expostas ao HBG e despendem menor esforço reprodutivo com elas?

Formamos 20 duplas de fêmeas não gravídicas com tamanhos similares. As fêmeas de cada dupla foram divididas entre os tratamentos, sendo que uma foi destinada ao grupo controle (00 μ g/L) e a outra destinada a um dos tratamentos (100 ou 50 μ g/L). Dessa forma, o grupo 00 μ g/L continha 20 fêmeas e os grupos 50 e 100 μ g/L continham 10 fêmeas cada um. As fêmeas foram expostas aos tratamentos por 48 horas. Após esse período, realizamos o teste de escolha dicotômica, dessa vez com as fêmeas dos tratamentos nas extremidades sendo uma fêmea controle em um dos lados e fêmea tratada com herbicida no lado oposto e um macho na região central. Registramos a localização do macho por 15 minutos, descartando os primeiros 5, considerados tempo de exploração do aquário e aclimatação. Após a filmagem, retiramos as fêmeas do aquário de escolha dicotômica e as inserimos individualmente, no centro do aquário, junto ao macho, e filmamos por mais 10 minutos, afim de registrar o esforço reprodutivo do macho medido pelo número de exhibições sigmoides, tentativas de cópula e tempo direcionado para cada uma das fêmeas.

3.4 Análises estatísticas

Nós realizamos modelos lineares hierárquicos (*Linear mixed-effects models*) para os objetivos 1.1, 1.2 e 2.3 (experimentos de escolha dicotômica e arena de múltipla escolha), utilizando a dupla da escolha dicotômica com efeito aleatório e os tratamentos de herbicida com efeito fixo. Utilizamos o método loglikelihood e critério de Akaike (AKAIKE, 1974; FIELD et al. 2012), para determinar se o modelo contendo variáveis aleatórias tem mais poder explicativo que modelos apenas de efeitos fixos. Nos casos em que o efeito aleatório não seja significativo, utilizamos apenas os efeitos fixos, ou seja, modelos lineares simples. Já os objetivos 1.2 (macho com maior atratividade), 1.3, 2.1, 2.2 e 2.3 (esforço reprodutivo do macho), analisamos por meio da ANOVA one-way. Na análise de morfologia espermática do item 2.2 fizemos uma ANOVA two-way. Comparações a posteriori foram feitas

por meio do teste de Tukey. Os dados foram logaritimizados quando necessário para atingir normalidade e homocedasticidades dos dados. Esses pressupostos foram analisados por meio dos testes de Kolmogorov-smirnov e Levene, respectivamente. Para verificar se tamanhos de machos e fêmeas diferiram entre tratamentos, executamos anova one-way quando dados apresentavam homocedasticidade e normalidade ou Kruskal-Wallis em caso negativo, mesmo após as transformações.

4 Resultados

4.1 A exposição a herbicidas à base de glifosato afeta a escolha sexual da fêmea?

4.1.1 Fêmeas evitam machos expostos ao HBG?

Nesse experimento, machos não diferiram em tamanho entre os tratamentos ($F=0,283$, $df=35$, $p=0,755$). O melhor modelo encontrado foi o modelo aleatório (AIC modelo fixo= 479,6985, AIC modelo aleatório= 476,6584, *loglikelihood ratio*= 15,0401, $p=0,0102$). Nesse modelo, o HBG não afetou o tempo em que a fêmea despendeu próximo aos machos de cada tratamento ($t=-1,2665$, $df=17$, $p=0,2224$).

4.1.2 A exposição de fêmeas ao HBG afeta a escolha de fêmeas pelo macho mais atraente?

No experimento para verificar qual é o macho mais atraente para fêmeas, o modelo considerando cada experimento como variável aleatória e os machos como fixo foi o melhor (AIC modelo fixo= 517,6264, AIC modelo aleatório= 508,6815, *loglikelihood ratio*= 28,9448, $p=0,0013$). Nesse modelo, o macho 2 foi o que recebeu a menor quantidade de tempo das fêmeas, enquanto os demais não diferiram entre si ($t=-3,6485$, $df=33$, $p=0,0009$; Fig 3). Sendo assim, utilizamos no experimento seguinte o macho 2 (com menor atração de fêmeas) e o macho 4 (escolhido de forma aleatória dentre os três machos considerados iguais em termos de atração).

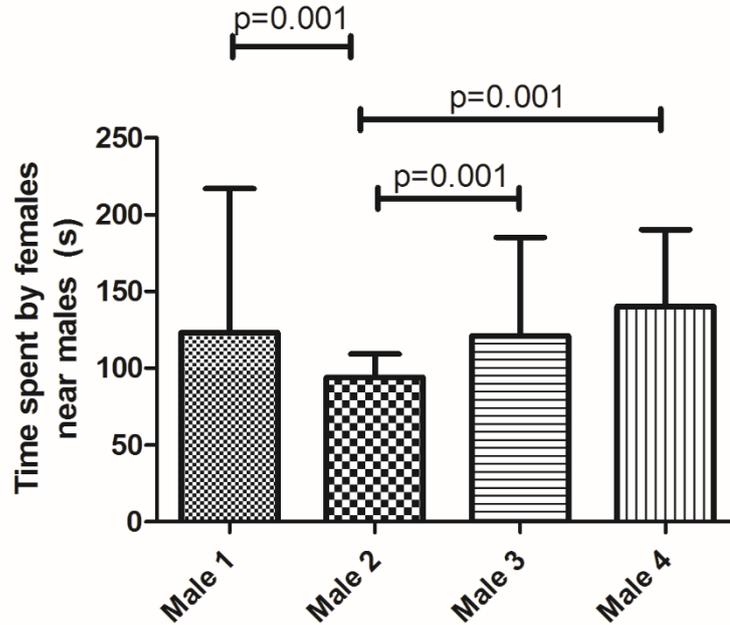


Fig 3. Tempo gasto pelas fêmeas próximas aos machos (s). Colunas indicam a média e barras indicam o desvio padrão. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) são indicadas por barras horizontais (teste de Tukey). $N=15$.

No experimento que verifica se o glifosato afeta a capacidade de escolha de fêmeas submetidas aos tratamentos de HBG pelo macho mais atraente, as fêmeas submetidas aos tratamentos do HBG não diferiram em tamanho ($F=0,851$, $df=29$, $p=0,438$). O melhor modelo foi o que considera o experimento dicotômico como variável aleatória e machos e o tratamento como variáveis de efeito fixo (AIC modelo fixo= 788,1487, AIC modelo aleatório=772,9402, *loglikelihood ratio*= 21,2084, $p=0,0001$). Nesse modelo, o HBG não afetou a escolha de fêmeas pelo macho mais atraente, de modo que fêmeas de todos os tratamentos despenderam tempo semelhantes aos dois machos escolhidos, sendo a diferença entre machos: $t=1,3548$, $df=29$, $p=0,1859$; a diferença entre tratamentos: $t=0,3115$, $df=28$, $p=0,7577$; e a interação entre machos e tratamento: $t=-0,1356$, $df=28$, $p=0,8930$).

4.1.3 A exposição ao HBG afeta a receptividade sexual das fêmeas?

As fêmeas submetidas aos diferentes tratamentos de HBG não diferiram em tamanho ($F= 1,1932$, $df= 29$, $p=0,3187$). O HBG afeta a receptividade das fêmeas, de modo que fêmeas não expostas são 1,91 vezes mais receptivas que fêmeas

expostas a 50 µg/L e 2,13 vezes mais receptivas que fêmeas expostas a 100 µg/L ($F=10,14$, $df=29$, $p=0,0005$; Fig 4).

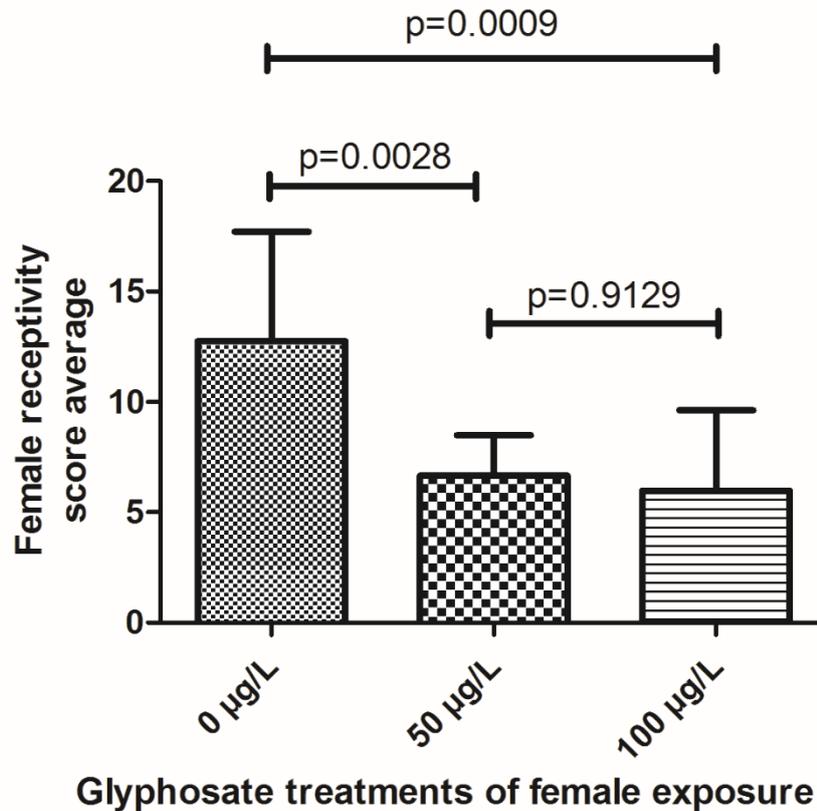


Fig 4. Receptividade de fêmeas expostas ao HBG. As colunas indicam as médias e as barras indicam desvio padrão. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) são indicadas por barras horizontais (teste de Tukey). $N=10$.

4.2 Herbicidas à base de glifosato afetam o sucesso reprodutivo de machos?

4.2.1 A exposição ao HBG afeta o comportamento de cômte do macho?

Machos expostos aos diferentes tratamentos não diferiram em tamanho ($p=0,701$). Peixes do grupo controle (00µg/L) apresentaram, em média, 1,6 ($\pm 3,75$) vezes o comportamento de cômte em 10 minutos, 1 ($\pm 2,22$) tentativa de cópulas e ficaram direcionados para as fêmeas cerca de 84,73 ($\pm 104,93$) segundos. Já no grupo 50µg/L, os peixes apresentaram 1,53 ($\pm 4,73$) vezes o comportamento de cômte, 0,86 ($\pm 1,4$) tentativas de cópula e 106 ($\pm 97,46$) segundos direcionados para a fêmea. Peixes do grupo 100µg/L exibiram o comportamento de cômte 0,73 ($\pm 2,23$)

vezes, 2,23 ($\pm 0,33$) tentativas de cópula e ficaram 75,54 ($\pm 91,15$) segundos direcionados para a fêmea. A exposição ao glifosato não afetou o comportamento de corte ($p=0,791$), a tentativa de cópula ($p=0,506$) e o tempo direcionado à fêmea ($p=0,695$).

4.2.2 A exposição ao HBG afeta a qualidade espermática?

4.2.2.1 Morfologia de células espermáticas

Células do grupo controle apresentaram $80 \pm 38,77$ células normais, $64,2 \pm 24,69$ células com danos primários e $57,4 \pm 35,14$ com danos secundários, enquanto que células do grupo $50 \mu\text{g/L}$ apresentaram $51,6 \pm 28,72$ células normais, $94 \pm 25,64$ células com danos primários e $55,2 \pm 26,7$ células com danos secundários. Já o grupo $100 \mu\text{g/L}$ apresentou $97,4 \pm 5,17$ células normais, $70,4 \pm 17,72$ células com danos primários e $36 \pm 17,21$ células com danos secundários. Não há diferença em número de células em cada tipo e patologia (normal, primária e secundária) entre os grupos ($p=0,994$), com exceção a quantidade de células normais do grupo $50 \mu\text{g/L}$, que teve menos células que o grupo $100 \mu\text{g/L}$ ($p=0,008$). Apesar disso, existem diferenças entre o número de células dentro de cada tratamento (Fig 5), onde $50 \mu\text{g/L}$ possui uma maior quantidade de células com danos primários que normais ($p=0,014$) e células secundárias ($p=0,024$). Já o grupo $100 \mu\text{g/L}$ possui menos danos secundários que danos primários ($p=0,045$) e células normais ($p=0,0007$). As principais patologias encontradas estão ilustradas na Fig 6.

4.2.2.2 Viabilidade espermática

HBG não leva à morte as células espermáticas de *P. reticulata* quando os peixes são submetidos aos tratamentos por 48 horas ($p=0,9493$). Grupo controle apresentou 81% ($\pm 1,5$) de células espermáticas vivas, $50 \mu\text{g/L}$ apresentou 84% ($\pm 1,8$) e $100 \mu\text{g/L}$ 80% ($\pm 1,62$).

4.2.2.3 Concentração espermática

A exposição dos peixes ao HBG por 48 horas não mudou a concentração espermática em Guppies ($p=0,2226$). O grupo controle apresentou $3,12 \pm 2,05 \times 10^8$ células, $50 \mu\text{g/L}$ apresentou $1,36 \pm 1,12 \times 10^8$ e $100 \mu\text{g/L}$ apresentou $1,56 \pm 1,5 \times 10^8$ células por mililitro de solução fisiológica contendo o sêmen.

4.2.2.4 Motilidade espermática

O HBG não afetou a motilidade de espermatozoides, de forma que a quantidade de células com motilidade progressiva não diferiu entre os tratamentos ($p=0,5543$). O grupo controle apresentou $34,5\% \pm 25,25$ de células com motilidade progressiva, $50\mu\text{g/L}$ apresentou $21,1\% \pm 18,16$ e $100\mu\text{g/L}$ apresentou $26\% \pm 13,13$ 8%. Quanto às células com motilidade não-progressiva, também não houve diferença entre tratamentos ($p=0,4843$), sendo que o grupo controle possuiu $8\% \pm 8,62$, $50\mu\text{g/L}$, $12,9\% \pm 11,25$ e $100\mu\text{g/L}$, $8,08\% \pm 5,24$. Da mesma maneira, a porcentagem de células estáticas não foi afetada ($p=0,7462$), com o grupo controle apresentando $57,5\% \pm 26,33$, $50\mu\text{g/L}$ $66\% \pm 19,59$ e $100\mu\text{g/L}$ $65,8\% \pm 14,83$.

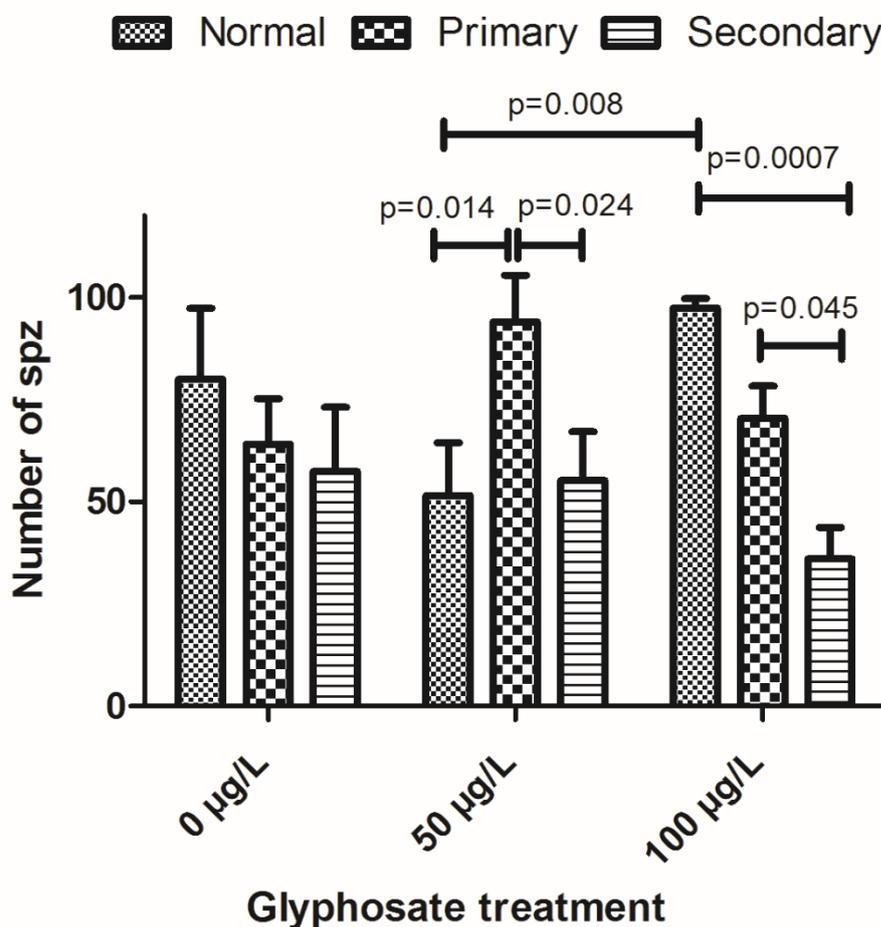


Fig 5. Número de células espermáticas de *Poecilia reticulata* em cada tipo de classificação morfológica de dano (normal, danos primários e secundários) nos tratamentos de HBG (0, 50 e $100\mu\text{g/L}$; ANOVA two-way). Colunas indicam a média e barras indicam o desvio padrão. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) são indicadas com barras horizontais (teste de Tukey). $N=5$.

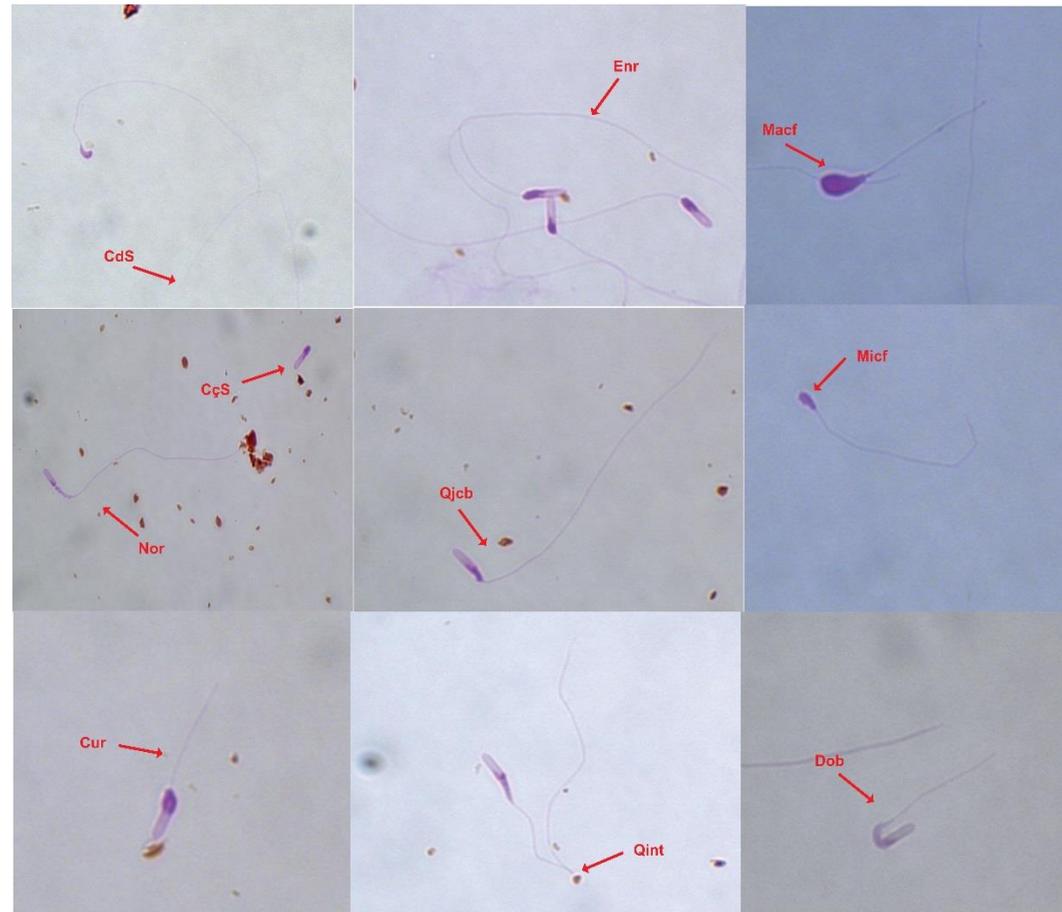


Fig 6: Principais anormalidades encontradas em células espermáticas de *Poecilia reticulata*. Os acrônimos significam: Norm: Normal; Cds: cauda solta; Enr: cauda enrolada; CçS: cabeça solta; Qjcb: cauda quebrada próxima à cabeça; Cur: cauda curta; Qint: cauda quebrada parte intermediária; Macf: Macrocefalia; Micf: Microcefalia; Dob: cauda dobrada.

4.2.3 Machos evitam fêmeas expostas ao HBG e despendem menor esforço reprodutivo com elas?

As fêmeas não diferiram em tamanho tanto no experimento escolha dicotômica (Kruskall-Wallis $\chi^2= 17.261$, $df=15$, $p=0,3035$), nem no experimento de esforço reprodutivo do macho (Kruskall-Wallis $\chi^2= 13.279$, $df=14$, $p=0,5047$). Quanto ao teste de escolha dicotômica, para verificar se machos evitam fêmeas expostas, o efeito aleatório do modelo que considera a dupla de machos não foi significativo (AIC modelo fixo= 482,7879; AIC modelo aleatório= 487,6659, $df=3$, *Loglikelihood ratio*= 1,1220, $p=0,7718$). Nesse caso, consideramos apenas o modelo fixo ou ANOVA one-way. Nesse modelo, machos não tendem a passar mais tempo próximo à fêmeas não expostas do que com fêmeas expostas, tanto em concentrações de 50 $\mu\text{g/L}$ como de 100 $\mu\text{g/L}$ ($F=0,4946$, $df= 36$, $p=0,4864$). Sendo assim, concluímos que o glifosato não afeta a proximidade de machos com fêmeas.

Quanto ao número de *displays* dos machos para fêmeas, o modelo aleatório foi o melhor modelo (AIC modelo fixo= 230.9397, AIC modelo aleatório= 210.5384, *Loglikelihood ratio* = 26.4013, $p=0,0001$). Nesse caso, a exposição de fêmeas ao HBG afetou o quanto os machos exibem o comportamento sexual sigmóide para as fêmeas, de forma que machos exibiram, em 10 minutos, cerca de 2 vezes mais para fêmeas do grupo controle que para fêmeas do grupo 50 $\mu\text{g/L}$ ($t=-2,6548$, $df= 39$, $p=0,0114$), e cerca de três vezes mais que para fêmeas do grupo 100 $\mu\text{g/L}$ ($t=-4.2115$, $df= 39$, $p= 0,0004$). Machos também se exibem mais para fêmeas do grupo 50 $\mu\text{g/L}$ do que para fêmeas do grupo 100 $\mu\text{g/L}$ ($t=2,311$ $df= 38$, $p=0,02633$). (Fig 7).

O modelo aleatório também foi mais explicativo quanto ao número de tentativa de cópula dos machos (AIC modelo fixo= 210,6356, AIC modelo aleatório=207,8210, *Loglikelihood ratio*= 8,8146, $p=0,0319$). Machos tentaram copular 3.55 vezes com fêmeas do grupo controle em 10 minutos, enquanto com fêmeas do grupo 50 $\mu\text{g/L}$, tentaram copular 1,2 vezes e 0,1 vezes com fêmeas do grupo 100 $\mu\text{g/L}$. Os mesmos tentam copular mais com fêmeas do grupo controle e 50 $\mu\text{g/L}$ ($t=-1.9090$, $df=39$, $p= 0,0636$) do que com fêmeas do grupo 100 $\mu\text{g/L}$ ($t=-5,4852$, $df=39$, $p=0$ ao comparar com o grupo controle e $t=2,383$, $df=38$, $p=0,0223$ ao comparar com o grupo 50 $\mu\text{g/L}$; Fig 8).

Já no tempo que o macho se direciona para a fêmea, o modelo misto com o intercepto aleatório e o tratamento como efeito fixo, foi o melhor modelo encontrado (AIC intercepto aleatório= 533,9503, AIC coeficiente angular aleatório= 539.2420, AIC modelo fixo= 544,5243. *loglikelihood ratio*= 17,2823 , $p=0,0083$). Nesse modelo, o HBG não afetou o tempo que machos ficaram direcionados para fêmeas expostas em concentração de 50 $\mu\text{g/L}$ ($t=-0,4980$, $df=39$, $p=0,6213$) nem para fêmeas do grupo 100 $\mu\text{g/L}$ ($t=-1,5259$, $df=39$, $p=0,1351$).

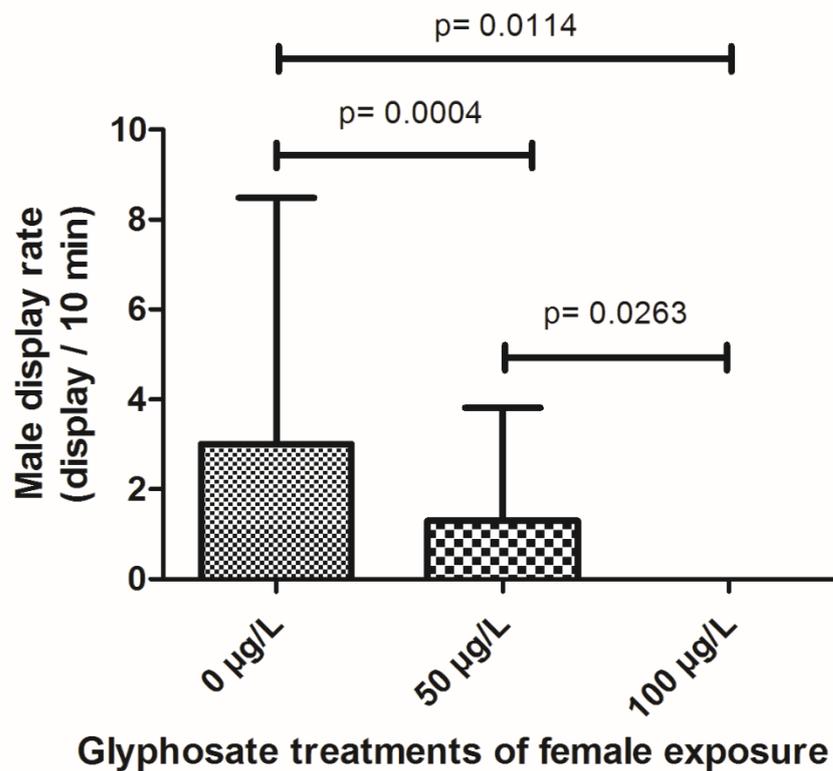


Fig 7. Número de exibições sigmóides de machos para fêmeas expostas aos tratamentos de HBG. Colunas representam a média e barras o desvio padrão. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) são indicadas por barras horizontais (teste de Tukey). $N= 20$ no controle e $N=10$ nos tratamentos de HBG.

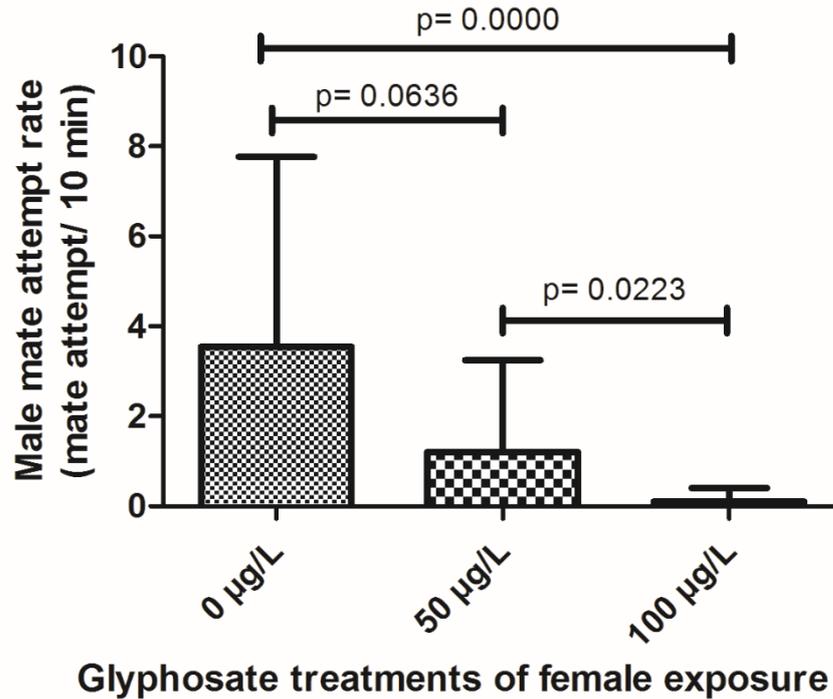


Fig 8. Número de tentativa de cópula de machos com fêmeas expostas aos tratamentos de HBG. Colunas representam a média e barras o desvio padrão. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) são indicadas por barras horizontais (teste de Tukey). $N = 20$ no controle e $N = 10$ nos tratamentos de HBG.

5 Discussão

O HBG não fez com que fêmeas evitassem machos expostos ao glifosato como também não afetou a escolha da fêmea pelo macho mais atraente. Apesar disso, o HBG afetou a receptividade da fêmea. O comportamento sexual de fêmeas de *P. reticulata* e, sua receptividade para cópula, é influenciada por hormônios sexuais, como hormônios hipofisários (FSH e LH; LILEY, 1968) e esteroides (LILEY, 1972; LILEY e DONALDSON, 1969), de modo que a receptividade da fêmea aumenta com o aumento na concentração de estrogênio e da produção de FSH e LH. Uma enzima importante na produção de parte de esteroides é a citocromo P450-aromatase, responsável pela conversão de andrógenos como a testosterona em esteroides, como o 17β -estradiol. A produção desse hormônio ocorre nos ovários através do estímulo de hormônios hipofisários (FSH e LH) nas células da camada teca que produzem testosterona. A testosterona, por sua vez, é convertida em 17β -estradiol através da aromatase nas células da camada

granulosa (NAGAHAMA, 1987). Essa enzima está presente em gônadas e abundantes em cérebros de teleósteos, sendo de 100 a 1000 vezes mais ativos do que em cérebros de mamíferos (GELINAS e CALLARD, 1997). A Fig 9 ilustra o processo de conversão de andrógenos em esteroides.

BENACHOUR et al (2007) observaram redução da atividade da aromatase em células embrionárias humanas tratadas com baixas concentrações de HBG (12 ng/L), prejudicando a conversão de andrógenos em esteroides. Até onde sabemos, a ação do HBG na aromatase em peixes ainda não foi estudada, porém, espera-se que o HBG tenha efeitos bastante semelhantes em peixes, tendo em vista que perfis hormonais de esteroides são afetados pelo pesticida (SOSO et al. 2007). Portanto, fêmeas tratadas com HBG provavelmente têm uma menor conversão de andrógenos em esteroides, afetando o comportamento reprodutivo e, mais especificamente, a receptividade para a cópula.

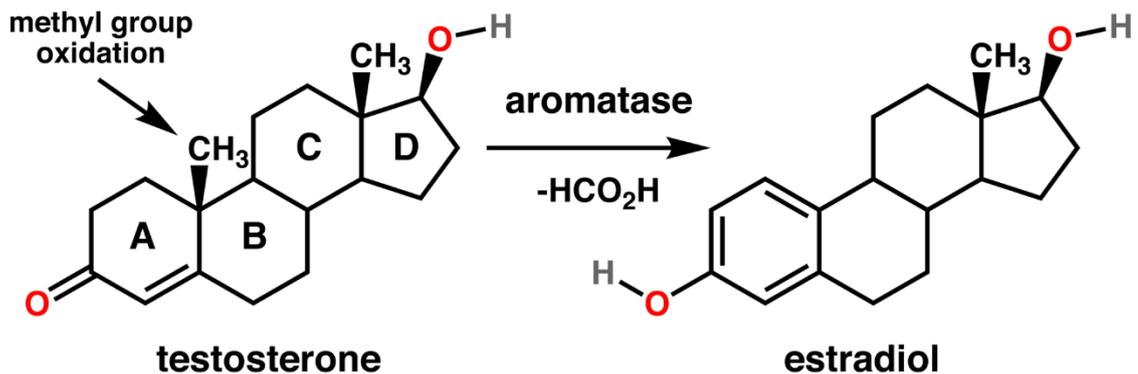


Fig 9. Conversão de testosterona em estradiol através da enzima aromatase, onde o grupo metil é removido do anel “A”, convertendo-o em um anel aromático. Fonte: FISHER et al. 2003.

Quanto ao fato de fêmeas expostas ao HBG despenderem tanto tempo próximas ao macho mais atraente quanto fêmeas do grupo controle pode ser explicado por dois fatores. (1) Provavelmente a enzima acetilcolinesterase não foi afetada nas concentrações utilizadas, tendo em vista que comportamento de corte de machos também não foi. Estudos que relatam o comprometimento da atividade da acetilcolinesterase utilizaram concentrações de 0 a 16M (ou 0 a 2,7 g/L) em moluscos (SANDRINI et al. 2013), 0 a 20 mg/L em *Leporinus obtusidens* (GLUSCZAK et al. 2006) e 10mg/L e 15 mg/L em *Colossoma macropomum* (BRAZ-MOTA, et al. 2015), sendo essas bem maiores do que as utilizadas nesse estudo.

Portanto, a capacidade de análise de parceiro das fêmeas não foi afetada. (2) Apesar de a não-preferência pelo macho 2 (menos atraente) ser estatisticamente significativa, é esperado que haja uma grande variação na preferência sexual, culminando em alta variabilidade nos dados de tempo próximo à cada macho, dificultando a determinação de padrões.

Esperávamos que fêmeas evitassem machos expostos ao glifosato por dois principais motivos: (1) a provável incapacidade de exibição de cômte devido à ação do HBG na acetilcolinesterase e (2) pelo fato de peixes evitarem locais com glifosato (FOLMAR 1976; HILDEBRAND et al, 1982) identificados, provavelmente, pelo odor. Sendo assim, o odor de HBG remanescente no corpo de machos poderia causar repulsa em fêmeas. Constatamos, no entanto, que fêmeas não evitam os machos expostos ao HBG por três motivos: (1) o comportamento reprodutivo de machos não ter sido afetado pelo HBG, (2) a concentração de HBG no corpo dos machos provavelmente ser muito baixa, insuficiente para a detecção do mesmo pelas fêmeas ou (3) devido ao fato de baixas concentrações de HBG não causar repulsa em peixes (MORGAN et al. 1991).

Machos também não evitam fêmeas expostas ao glifosato e nem dedicam menor tempo direcionados a elas, mas afeta a motivação dos machos a se exibirem e a tentarem a cópula. Esse resultado indica que machos continuam tendo atração por fêmeas expostas ao HBG, de modo que despense a mesma quantidade de tempo para fêmeas controle e fêmeas expostas ao HBG e passa a mesma quantidade de tempo direcionados a elas. No entanto, o fato de exibirem o comportamento de cômte e tentativa de cópula em menor frequência evidencia certa rejeição dos machos à essas fêmeas. Provavelmente, isso ocorre devido às fêmeas estarem menos receptivas, como observamos no experimento 3.3.1.3. Machos devem perceber a menor receptividade das fêmeas por meio da ausência dos comportamentos típicos de aceite de cópula da fêmea, assim como pelo odor. Como exposto anteriormente, o HBG afeta a atividade da enzima aromatase, prejudicando a conversão de testosterona em estradiol. Esse excesso de testosterona, que diminui a receptividade das fêmeas, também pode sinalizar quimicamente para o macho a alta concentração de testosterona em fêmeas (STACEY e SORENSEN, 1991), e, portanto, a baixa receptividade e baixa

fecundidade (LILEY e DONALDSON, 1969; LILEY, 1972; PARTRIDGE et al. 1976; COLOMBO et al. 1982; LILEY, 1982; MEYER e LILEY, 1982).

O HBG não alterou o comportamento reprodutivo de machos de *P. reticulata* após a exposição por 48 horas. HUED et al. (2012) relatam redução do número de cópula e sucesso reprodutivo de *Jenysia multidentata* expostos por 7 e 28 dias à 500µg/L, apesar de não ocorrer mudanças no número de perseguições à fêmeas e número de tentativas de cópula. Portanto, pode-se concluir do estudo de HUED et al. (2012) que o comportamento reprodutivo de *J. multidentata* não foi alterado, e sim, sua habilidade em conseguir concretizar as cópulas. De fato, a habilidade motora de peixes pode ficar comprometida quando submetidos à herbicidas à base de glifosato (SOUZA-FILHO et al. 2013b) devido à inibição da enzima acetilcolinesterase (BRAZ-MOTA et al. 2015; GLUSCZAK et al. 2006; SANDRINI et al. 2013), prejudicando a transmissão do impulso no sistema nervoso central e em cadeias musculares. Porém, como dito anteriormente, acreditamos que as concentrações que utilizamos foram muito baixas para afetar atividade da acetilcolinesterase, em comparação aos estudos de GLUSCZAK et al. (2006), HUED et al. (2012), SANDRINI et al. (2013), e BRAZ-MOTA et al. (2015).

Em relação às análises de qualidade espermática, apenas o grupo de 50µg/L possuiu alterações na morfologia de espermatozoides, apresentando maior quantidade de células com patologias primárias (menos graves) que os demais grupos. É bastante comum doses intermediárias, tanto de produtos tóxicos, como de fármacos, possuírem maior efeito que doses mais altas. Isso ocorre, na maioria das vezes, pelo fato de doses altas ativarem mecanismos fisiológicos que doses intermediárias não ativam ou ativam com menor intensidade. Em peixes, sabe-se que HBG's promovem aneurisma lamelar, hiperplasia, elevação do epitélio das brânquias, hipertrofia e fusão de lamelas (ANNETT et al. 2014; CHANDRASEKERA e WEERATUNGA, 2011; HUED et al. 2012; JIRAUNGKOORSKUL et al. 2003). Essas alterações reduzem a superfície de contato das brânquias com o meio aquático, reduzindo a absorção de elementos químicos na água (ARELLANO et al. 1999), incluindo oxigênio, comprometendo, também, a respiração celular. HUED et al. (2012) indica que quanto maior a concentração de glifosato, maior são os efeitos nas brânquias. Portanto, doses maiores acarretam em maior isolamento dos peixes

quanto a seu meio, reduzindo a absorção do HBG e diminuindo seus efeitos no metabolismo dos peixes.

Além disso, Alterações na morfologia de espermatozoides ocorrem, normalmente, durante a espermatogênese. No caso de Guppies, a espermatogênese dura pelo menos 36 dias (BILLARD, 1969). Portanto, os danos causados pelo herbicida na morfologia dos espermatozoides ocorreram nos estágios finais da espermatogênese ou em espermatozoides já formados. Isso explica a concentração espermática não ser afetada. Sabe-se que HBG's alteram níveis hormonais sexuais como FSH, LH e testosterona (CAVALLI et al. 2013), que são importantes para a espermatogênese (SCHULZ e MIURA, 2002). Além disso, o herbicida pode levar à apoptose celular por meio da ativação da caspase 3, causando ruptura da membrana celular (KIM et al. 2013; LAKHANI et al., 2006). HEDBERG e WALLIN (2010) encontraram alterações morfológicas e integridade de microtúbulos e citoesqueleto em melanóforos. Todos esses fatores podem ter prejudicado a composição das caudas de espermatozoides (principal patologia primária), comprometendo sua morfologia.

Quanto aos outros parâmetros espermáticos, não encontramos nenhuma alteração nas concentrações utilizadas. Porém, HARAYASHIKI et al. (2013) encontraram efeitos na integridade da membrana de espermatozoides de *Poecilia vivipara* quando expostos ao Roundup® por 96 horas em concentrações a partir de 130µg/L. Além da integridade da membrana, também encontraram reduzida motilidade quando expostos à 700µg/L do herbicida. A atividade mitocondrial também estava reduzida, o que deve ter contribuído para a redução da motilidade. Como não utilizamos concentrações altas devido às mortes a partir de 150µg/L, esses efeitos não foram observados. É possível que, com o aumento da concentração, ocorra prejuízos à viabilidade e motilidade em *P. reticulata*, caso o indivíduo sobreviva à essa concentração. Apesar disso, um estudo prévio de nosso grupo de pesquisa (dados ainda não publicados) identificou que concentrações tão baixas quanto as utilizadas nesse estudo foram suficientes para causar a morte de 100% de células espermáticas de *Astyanax altiparanae* ao entrarem em contato direto com HBG, já que essa espécie possui fecundação externa.

O valor do CL50, 48H de herbicidas à base de glifosato varia bastante de espécie para espécie de teleósteos, indo desde 1000µg/L a 9750µg/L (NWANI et al. 2013; ANNETT et al. 2014). O CL50, 48H calculado para *P. reticulata* foi de 316µg/L de equivalente de glifosato, com mortalidade de peixes ainda com 150µg/L. Comparativamente, esse valor é baixo, inclusive em se tratando de *P. reticulata*. CHANDRASEKERA e WEERATUNGA (2011) encontraram um CL50, 48H(96h) de 976µg/L, trabalhando com filhotes de *P. reticulata*, utilizando um produto com maior concentração de glifosato (360g/L⁻¹ contra 143g/L usado nesse trabalho). Já para indivíduos adultos, SADEGHI e HEDAYATI (2014) encontraram o valor de 12640µg/L para uma formulação comercial contendo 41% de glifosato. SOUZA-FILHO et al. (2013b) encontraram um CL50, 48H (48hs) para *P. reticulata* de 6,5 µL/L de Roundup® Transorb, que é equivalente à 4212µg/L. Essa grande diferença de valores de CL50, 48H se deve, provavelmente, à proporção de surfactante ser menor em uma formulação com maior proporção de glifosato, pois o surfactante polioxietileno amina (POEA) é considerado mais tóxico para animais que o próprio glifosato (BRINGOLF et al. 2007; FOLMAR et al. 1979; PEREIRA et al. 2009). Além disso, o CL50, 48H pode variar conforme o lote de indivíduos a ser utilizados, segundo a norma da ABNT NBR 15088.

Apesar da legislação tanto brasileira, quanto de demais países estabelecerem um limite de concentração de glifosato em corpos d'água, concentrações bem mais altas do limite podem ser encontrados, como revisto por ANNETT et al. (2014). Mesmo que as concentrações se limitassem ao que é estabelecido pela lei, mostramos que a assembleia de peixes não está livre de efeitos deletérios de HBG's, comprometendo a receptividade das fêmeas, o comportamento de machos com essas fêmeas e a qualidade espermática. Faz-se necessário, portanto, a revisão da legislação ambiental baseada em estudos científicos que considerem não apenas a mortalidade, mas também o bem-estar dos organismos aquáticos e sua capacidade reprodutiva, envolvendo tanto aspectos fisiológicos como comportamentais.

Estudos toxicológicos também devem ser repensados. A toxicologia ainda se limita muito ao tratar apenas aspectos como mortalidade ou alterações histológicas com danos claros à tecidos orgânicos como ferramenta de análise.

Estudos de efeitos comportamentais de contaminantes, considerando toda a fisiologia envolvida pode ser bastante útil como ferramenta de análise dos impactos desses químicos em comunidades. Além disso, o desenvolvimento de bioindicadores comportamentais provenientes desses estudos podem ser de mais fácil diagnóstico que análises laboratoriais de tecidos ou análise química da água.

Em nosso estudo, mostramos pela primeira vez que HBG's promovem alterações reprodutivas comportamentais de *P. reticulata*, em concentrações baixas permitidas por legislação ambiental das américas (Brasil, EUA e Canadá). Tais alterações são capazes de comprometer a reprodução dos indivíduos, alterando a receptividade de fêmeas, o interesse de machos por fêmeas expostas à essas concentrações de HBG e a qualidade espermática. No caso de Guppies, que se reproduzem constantemente, o efeito de HBG é amenizado. Porém, em diversas espécies de peixes, como os Salmonídeos, HBG's podem ter efeitos devastadores já que esses peixes possuem apenas uma chance reprodutiva durante a vida e podem não conseguir se reproduzir.

6 Referências bibliográficas

Adams SM. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. Bethesda: American Fisheries Society; 2002.

Akaike H. A new look at the statistical model identification. IEEE Trans Autom Control. 1974; 19(6): 716-723.

Amrhein N, Steinrücken HC. The herbicide Glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshimic acid-3-phosphate synthase. Biochem Biophys Res commun. 1980; 94(4): 1207-1212.

Annett R, Habibi HR, Hontela A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. J. Appl. Toxicol. 2014; 34: 458-479.

Arbuckle TE, Lin Z, Mery LS. An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population. Environ Health Perspect. 2001; 109(8): 851-857.

Arellano JM, Storch V, Sarasquete C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of Senegales sole, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicol and Environ Saf.* 1999; 44: 62-72.

Associação Brasileira De Normas Técnicas (ABNT). *Norma brasileira 15088 – Ecotoxicologia aquática, toxicidade aguda, método de ensaio com peixes.* 22 p. 2011.

Ayoola SO. Histopathological Effects of Glyphosate on Juvenile African Catfish (*Clarias gariepinus*). *American-Eurasian J Agric Environ Sci.* 2008; 4(3): 362-367.

Benachour N, Sipahutar H, Moslemi S, Gasnier C, Travert C, Seralini GE. Time and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. *Arch Environ Con Tox.* 2007; 53:126-133.

Billard, R. La spermatogenèse de *Poecilia reticulata*. I.- Estimation du nombre de générations goniales et rendement de la spermatogenèse. *Ann Biol Anim Bioch Biophys.* 1969; 9(2):251-271.

Brasil, Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional de Meio Ambiente, CONAMA. Resolução CONAMA nº 357, de 18 de março de 2005 – In Resoluções, 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>, accessed in 02/10/2015 at 17:03.

Braz-mota S, Sadauskas-Henrique H, Duarte RM, Val AL, Almeida-Val VMF. Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. *Chemosphere.* 2015; 135: 53-60.

Bringolf RB, Cope WG, Mosher S, Barnhart MC, Shea D. Acute and chronic toxicity of glyphosate compounds to glochidia and juveniles of *Lampsilis siliquoides* (Unionidae). *Environ Toxicol Chem.* 2007; 26(10): 2094–2100.

Cattaneo R, Clasen B, Loro VL, De Menezes CC, Pretto A, Baldisserotto B, Santi A, De Avila LA. Toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposed to a commercial formulation containing glyphosate. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2011; 87(6): 597–602.

Cavalli VLLO, Cattani D, Rieg CEH, Pieroan P, Zanatta L, Parisotto EB, Filho DW, Silva FRMB, Pessoa-Pureur R, Zamoner A. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. *Free rad Biol Med.* 2013; 65:335-346.

Chandrasekera WU, Weeratunga NP. The lethal impacts of Roundup® (Glyphosate) on the fingerlings of Guppy, *Poecilia reticulata* Peters, 1859. *Asian Fish Sci.* 2011; 24: 367-378.

Colombo L, Belvedere PC, Marconato A, Bentivegna F. Pheromones in teleost fishes in Richter CJJ, Goos HJTh, editors. *Proc. Int. Symposium on Reproductive Physiology of Fish.* Wageningen: Centre for Agricultural Publishing and Documentation; 1982. pp. 84-94.

Costa RN, Nomura F. Measuring the impacts of Roundup Original® on fluctuating asymmetry and mortality in a neotropical tadpole. *Hydrobiologia.* 2016; 765(1): 85-96.

Environmental Protection Agency (EPA). Pesticie market estimates: Usage. Disponível em: http://www.epa.gov/pesticides/pestsales/07pestsales/usage2007_2.htm#3_6, acessado em 05/10/2015 às 11:56.

Field A, Miles J, Field Z. *Discovering Statistics Using R.* London: SAGE publications LTD; 2012.

Fisher MB, Obach RS, Lee JS. *Drug metabolizing enzymes: cytochrome P450 and other enzymes in drug discovery and development.* Lausanne: CRC Press: 2003.

Folmar, L. C. Overt avoidance reaction of rainbow trout fry to nine herbicides. *B Environ Contam Tox.* 1976; 15:509-514.

Folmar LC, Sanders HO, Julin AM. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Arch Environ Con Tox.* 1979; 8(3): 269–278.

Gardiner DM. Utilization of extracellular glucose by spermatozoa of two viviparous fishes. *Comp Biochem Physiol.* 1978; 59: 165–168.

Gelinas D, Callard GV. Immunolocalization of aromatase and androgen receptor-positive neurons in the goldfish brain. *Gen Comp Endocrinol*. 1997; 106: 155-168.

Gluszczak L, Miron DDS, Crestani M, Da Fonseca MB, Pedron FDA, Duarte MF, Vieira VUP. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol Environ Saf*. 2006; 65: 237–241.

Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ Sci Technol*. 1977; 11(1):714-719.

Harayashiki CAY, Varela-Junior AS, Machado AA de S, Cabrera L da C, Primel E G, Bianchini A, Corcini CD. Toxic effects of the herbicide Roundup in the Guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. *Aquat Toxicol*. 2013; 142: 176-184.

Hedberg D, Wallin M. Effects of Roundup and glyphosate formulations on intracellular transport, microtubules and actin filaments in *Xenopus laevis* melanophores. *Toxicol in vitro*. 2010; 24:795-802.

Herman HA, Mitchell JR, Doak GA. The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle. Illinois: Interstate Publishers; 1994.

Hilbig CC, Bombardelli RA, Sanches EA, Oliveira JD, Baggio DM, Souza BE. Efeito do chumbo sobre a fertilização artificial e incubação de ovos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*). *Acta Sci Anim Sci*. 2008; 30, 217-224.

Hildebrand LD, Sullivan DS, Sullivan TP. Experimental studies of rainbow trout populations exposed to field applications of Roundup herbicide. *Arch Environ Con Tox*. 1982; 11:93-98.

Holt EA, Miller SW. Bioindicators: Using organisms to measure environmental impacts. *Nature Education Knowledge*. 2010; 3(10): 8.

Hued A, Oberhofer S, Bistoni MLA. Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup®) alters normal gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Arch Environ Contam Toxicol*. 2012; 62:107-117.

Houde AE. Mate choice based upon naturally occurring color pattern variation in a guppy population. *Evolution*. 1987; 41:1–10.

Houde AE. Sex, color, and mate choice in guppies. New Jersey: Princeton University Press; 1997.

Jiraungkoorskul W, Upatham ES, Kruatrachue M, Sahaphong S, Vichasri-Grams S, Pokethitiyook P. Biochemical and Histopathological Effects of Glyphosate Herbicide on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ Toxicol*. 2003; 18(4): 260-267.

Kim Y, Hong J, Gil H, Song H, Hong S. Mixtures of glyphosate and surfactant TN20 accelerate cell death via mitochondrial damage-induced apoptosis and necrosis. *Toxicol in vitro*. 2013; 27: 191-197.

Kohnen WP. O Guppy: Criação e desenvolvimento 2nd ed. São Paulo: Nobel; 1991.

Lajmanovich RC, Sandoval MT, Peltzer PM. Induction of mortality and malformation in *Scinax nascius* tadpoles exposed to glyphosate formulations. *Bull Environm Contam Toxicol*. 2003; 70: 612-618.

Lajmanovich RC, Attademo AM, Peltzer PM, Junges CM, Cabagna MC. Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-esterases and glutathione s-transferase inhibitors. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2011; 60: 681–689.

Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter-JR GA, Booth CJ, Mehal WZ, Inayat I, Flavell RA. Caspases 3 and 7: Key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*. 2006; 311: 847-851.

Langiano VC, Martinez CBR. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp Biochem Phys*. 2008; 147: 222-231.

Liley NR. Ethological isolating mechanisms in four sympatric species of poeciliid fishes. *Behaviour (Suppl.)*. 1966 13: 1-197.

Liley NR. The endocrine control of reproductive behavior in the female Guppy, *Poecilia reticulata* Peters. *Anim behav*. 1968; 16:318-331.

Liley NR, Donaldson EM. The effects of salmon pituitary gonadotropin on the ovary and sexual behavior of the female Guppy, *Poecilia reticulata*. Can J Zool. 1969; 47:569-573.

Liley NR. The effects of estrogens and other steroids on the sexual behavior of the female guppy, *Poecilia reticulata*. Gen Comp Endocr. 1972; 3: 542-552.

Liley NR. Chemical communication in fish. Can J Fish Aquat Sci. 1982; 39: 22-35.

Malthus T. An essay on the principle of population. London: Electronic Scholarly Publishing Project. 1998.

Matson PA, Parton WJ, Power AG, Swift MJ. Agricultural intensification and ecosystem properties. Science. 1997; 277: 504-509.

Menéndez-Helman RJ, Ferreyroa GV, Afonso MSA. Glyphosate as an Acetylcholinesterase Inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. B Environ Contam Tox. 2012; 88:6-9.

Meyer JH, Liley NR. Hormonal control of pheromone production in the guppy (*Poecilia reticulata* Peters). Can J Zool. 1982; 60: 1505-1510.

Modesto KA, Martinez CBR. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. Chemosphere. 2010; 81: 781–787.

Morgan JD, Vigers GA, Farrel AP, Jans DM. Acute avoidance reactions and behavioral responses of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to Garlon 4®, Garlon 3A® and Vision® Herbicides. Environ Toxicol Chem. 1991; 10:73-79.

Nagahama Y. Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads. Zool Sci. 1987; 4:209-222.

Neskovic NK, Poleksic V, Elezovic I, Karan V, Budimir M. Biochemical and Histopathological Effects of Glyphosate on Carp, *Cyprinus carpio* L. B Environ Contam Toxicol. 1996; 56: 295-302.

Nwani CD, Ibiam UA, Nworie O, Onyishi G, Atama C. Investigation on acute toxicity and behavioral changes in *Tilapia zillii* due to glyphosate-based herbicide, Forceup. The J anim plant sci. 2013; 23(3):888-869.

OECD 1992. Test 203: fish acute toxicity test. Disponível em <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-Assessment/1948241.pdf>> accessed in 04/11/2017 at 13:15.

Partridge BL, Liley NR, Stacey NE. The role of pheromones in the sexual behavior of the goldfish. *Anim Behav.* 1976; 24: 291-299.

Pereira JL, Antunes SC, Castro BB, Marques CR, Goncalves AMM, Goncalves F, Pereira R. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: Commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicol.* 2009; 18(4): 455–463.

Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, Benachour N, Seralini G. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells. *Environ Health Perspect.* 2005; 113:716-720.

Sadeghi A, Hedayati A. Investigatin of CL50, 48H, NOEC and LOEC of glyphosate, deltamethrin and Pretilachlor in Guppies (*Poecilia reticulata*). *Iranian J Toxicol.* 2014; 28(6): 1124-1129.

Salbego J, Pretto A, Gioda CR, De Menezes CC, Lazzari R, Neto JR, Baldisserotto B, Loro VL. Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). *Arch Environ Contam Toxicol.* 2010; 58(3): 740–745.

Sandrini JZ, Rola RC, Lopes FM, Buffon HF, Freitas MM, Martins CMG, Rosa CE. Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: In vitro studies. *Aquat Toxicol.* 2013; 130-131: 171–173.

Schulz RW, Miura T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiol Biochem.* 2002; 26:43-56.

Soso AB, Barcellos LJG, Ranzani-Paiva MJ, Kreutz LC, Quevedo RM, Anziliero D, Lima M, Silva LB, Ritter F, Bedin AC, Finco JA. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environ Toxicol Pharmacol.* 2007; 23:308-313.

Souza-Filho J, Souza CCN, Da Silva CC, Sabóia-Morais SMT, Grisolia CK. Mutagenicity and Genotoxicity in Gill Erythrocyte Cells of *Poecilia reticulata* exposed to a Glyphosate Formulation. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2013a; 91:583-587.

Souza-Filho CCN, Pires FS, Grisolia CK, Sabóia-Morais SMT. Toxicological effects of a glyphosate-based formulation on the liver of *Poecilia reticulata*. *Curr Top Toxicol*. 2013b; 9: 81-91.

Stacey NE, Sorensen PW. Function and evolution of fish hormonal pheromones in Hochacka PW, Mommsen TP. editors. *The biochemistry and molecular biology of fishes*. Amsterdam: Elsevier 1991. pp. 109-135.

Streit-Jr DP, Moraes GV, Ribeiro RP, Povh JÁ, Souza ED, Oliveira CAL. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arquivos de Ciência Veterinárias e Zoologia da UNIPAR, Umuarama*. 2004; 7(2): 157-162.

Tilman D, Fargione J, Wolff B, D'antonio C, Dobson A, Howarth R, Schindler D, Schlesinger WH, Simberloff D, Swackhamer D. Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Sciences*. 2001; 292(5515): 281-284.

Timmermann, C., Gerhards, R., Kubauch, W. The economic impact of site-specific weed control. *Precis Agric*. 2003; 4:249-260.

Varela-Junior AS, Corcini CD, Gheller SMM, Jardim RD, Lucia-Jr T, Streit-Jr DP, Figueiredo MRC. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Theriogenology*. 2012; 78, 244–251.

Wilson C, Tisdell, C. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. *Ecol Econom*. 2001. 39, 449-462.

7 Anexo I

RESULTADO DE ANÁLISE TOXICOLÓGICA Nº 176/2014

ANÁLISES: Determinação de Metais (Pb,As,Mn,Hg,Cr,Cu, Cd) e Inseticidas (Organofosforados, Organoclorados e Piretróides).

DADOS DO SOLICITANTE: Profa. Dra. Percilia Giaquinto.

AMOSTRA(S) ANALISADA(S): Água lagoa/lageado

TÉCNICA DE IDENTIFICAÇÃO: Espectrofotometria por absorção atômica para metais e Cromatografia em fase gasosa (CG) e líquida (HPLC) para inseticidas.

RESULTADOS:

Material \ Metais	Chumbo	Arsênio	Mercúrio	Crômio	Cádmio	Manganês	Cobre
Água Lageado	< 0,05 ppm	< 0,6 ppm	< 0,001 ppm	< 0,05 ppm	< 0,01 ppm	< 0,02 ppm	< 0,02 ppm
Material \ Inseticidas	Organoclorados	Organofosforados	Piretroides	_____	_____	_____	_____
Água Lageado	Aldrin < 1,0 ppb	Coumafos < 10,0 ppb	Cipermetrina < 10,0 ppb	_____	_____	_____	_____
Água Lageado	DDD < 1,0 ppb	Diazinon < 10,0 ppb	Aletrina < 10,0 ppb	_____	_____	_____	_____
Água Lageado	DDT < 1,0 ppb	DDVP < 10,0 ppb	Deltametrina < 10,0 ppb	_____	_____	_____	_____
Água Lageado	DDE < 1,0 ppb	Dimetoato < 10,0 ppb	Cialotrina < 10,0 ppb	_____	_____	_____	_____
Água Lageado	Dieldrin < 1,0 ppb	Etion < 10,0 ppb	Ciflutrina < 10,0 ppb	_____	_____	_____	_____
Água Lageado	Endossulfam I < 1,0 ppb	Fention < 10,0 ppb	Fenvarelato < 10,0 ppb	_____	_____	_____	_____
Água Lageado	Endrin < 1,0 ppb	Fosdrim < 10,0 ppb	Permetrina < 10,0 ppb	_____	_____	_____	_____
Água Lageado	Heptacoloro < 1,0 ppb	Malation < 10,0 ppb	Tetrametrina < 10,0 ppb	_____	_____	_____	_____
Água Lageado	Heptacoloro epoxido < 1,0 ppb	Metil Paration < 10,0 ppb	L-Cialotrina < 10,0 ppb	_____	_____	_____	_____
Água Lageado	Endossulfam II < 1,0 ppb	_____	Flumetrina < 10,0 ppb	_____	_____	_____	_____

OBS: "<" não detectado = Limite de detecção da técnica: em parte por milhão = ppm e parte por bilhão = ppb
Botucatu 21 de setembro de 2015.

8 Anexo II

Tabela de resultados do experimento de concentração média letal evidenciando o número de mortes em cada tratamento de equivalente de glifosato ao longo das 48 horas de exposição.

Tempo (h)	Controle	100 µg/L	1000 µg/L	10000 µg/L	100000 µg/L	300000 µg/L
0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	10	10	10	10
48	0	0	10	10	10	10