

Análise dos efeitos do glifosato e sua formulação Roundup[®] nas células e gônadas dos peixes *Danio rerio* (Cyprinidae)

Analysis of the effects of glyphosate and its formulation Roundup[®] on the cells and gonads of fish *Danio rerio* (Cyprinidae)

Kamilla Bleil do Carmo¹, Tainan Filipe da Silva², Neide Armiliato³

Resumo

Os herbicidas estão entre os insumos químicos mais utilizados na agricultura e apresentam ação toxicológica para as plantas. Dentre os herbicidas existentes, o glifosato e a sua formulação comercial Roundup[®] são os mais utilizados devido à eficácia no controle de ervas daninhas. Entretanto, estudos sugerem que estes herbicidas podem provocar distúrbios a organismos aquáticos, principalmente o Roundup[®], que além do glifosato ativo, apresenta na composição componentes surfactantes que aumentariam o seu potencial toxicológico para os seres vivos. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo comparar o potencial mutagênico e desenvolvimento gonadal do princípio ativo glifosato e sua formulação Roundup[®] em peixes *Danio rerio*. Para isso, exemplares adultos de *D. rerio* permaneceram em aquários expostos à concentração de 65 µg/L de cada herbicida. Foram realizadas contagens de micronúcleos, calculado o índice gonadossomático (IGS) e verificado os estágios de maturação gonadal. Os resultados demonstraram que os peixes expostos aos herbicidas apresentaram aumentos significativos na frequência de micronúcleos, bem como no IGS, e maior ocorrência de ovários com estágios em maturação e maduros. Não foram verificadas diferenças significativas na comparação dos herbicidas, exceto um aumento na frequência de ovários maduros nas fêmeas expostas ao glifosato. Observou-se que, mesmo em pequenas concentrações, os herbicidas poderiam ter ocasionado efeitos nocivos para os peixes *D. rerio*, podendo induzir efeitos clastogênicos nos eritrócitos, assim como distúrbios reprodutivos, aumentando a preocupação sobre os impactos que estes herbicidas podem acarretar sobre o ciclo de vida destes organismos.

Palavras-chave: Agrotóxicos. Índice gonadossomático. Maturação gonadal. Micronúcleos. Peixe-zebra.

¹ Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Contestado (UnC), Concórdia, Santa Catarina, Brasil. E-mail: kamillableil@hotmail.com

² Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Contestado, Concórdia, Santa Catarina, Brasil.

³ Doutorado em Biologia Celular e do Desenvolvimento pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Professora na Universidade do Contestado, Concórdia, Santa Catarina, Brasil.

Abstract

The herbicides are among the most used chemical inputs in the agriculture and present a great toxicological action for the plants. Among the existing herbicides, glyphosate and its commercial formulation Roundup® are the most used due to their effectiveness in control of weeds. However, studies suggest that these herbicides can cause disturbances to aquatic organisms, mainly the Roundup®, that besides active glyphosate, it presents in the composition components surfactants that would increase its toxicological potential for the alive beings. Therefore, the aim of this study is to compare the mutagenic potential and gonadal development of the active principle glyphosate and its formulation Roundup® in fish *Danio rerio*. Thus, adult copies of *D. rerio* stayed in aquariums exposed to a concentration of 65 µg / L of each herbicide. Micronucleus counts were performed and the Gonadosomatic index (GSI) was calculated and the stages of gonadal maturation were verified. The results demonstrated that the fish exposed to the herbicides, presented significant increases in the micronucleus frequency, as well as in GSI and larger occurrence of ovaries with stages in maturation and mature. There were no significant differences in herbicide comparison, except an increase in the frequency of mature ovaries in the exposed females to glyphosate. It was observed that even in small concentrations, the herbicides could presented harmful effects for the fish *D. rerio*, could have caused clastogenic effects in the erythrocytes, as well as, reproductive disturbances, increasing the concern about the impacts that these herbicides can have on the life cycle of these organisms.

Keywords: Pesticides. Gonadosomatic index. Gonadal maturation. Micronuclei. Zebrafish.

Introdução

Os herbicidas são produtos químicos fitossanitários utilizados em grandes quantidades na agricultura com larga escala de produção alimentar. Tornaram-se um dos insumos mais utilizados no mundo que conseqüentemente apresentam alta toxicidade para plantas devido ao seu uso ser direcionado como método de controle e manejo de ervas daninhas na agricultura, mas, ao mesmo tempo, ocasionam efeitos nocivos a outros organismos não alvos, principalmente quando a molécula se apresenta em um meio hídrico.⁽¹⁾

Dentre os agrotóxicos utilizados na agricultura, o Roundup® é considerado um dos herbicidas com alta utilização no Brasil. Sua formulação química possui como princípio ativo o glifosato.⁽²⁾ O glifosato apresenta como fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ e é conhecido por ser um herbicida sistêmico, não seletivo e pós-emergente utilizado na agricultura na forma de pulverização em plantas daninhas, o que promove sua absorção através das folhas e caulículos, sendo transportado pelos vasos condutores e agindo nos sistemas enzimáticos por meio da inibição dos aminoácidos.⁽³⁾

Conforme Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama) nº 357/2005, a concentração máxima de glifosato permitida para águas doces em todo Brasil corresponde a 65 µg/L, servindo como um dos padrões para verificação da qualidade da água,⁽⁴⁾ pois devido sua toxicidade, principalmente em ambientes hídricos, os invertebrados aquáticos e os peixes são os organismos mais sensíveis a este herbicida.⁽³⁾

Ademais, vale ressaltar que o Roundup®, além de conter como princípio ativo o glifosato – composto pelo sal de isopropilamina (IPA), possui o surfactante POEA (amino polioxietileno) que ajuda na absorção do herbicida nas folhas da planta.⁽⁵⁻⁶⁾

O surfactante POEA, presente no herbicida Roundup®, foi classificado como mais tóxico que o glifosato puro, e com a combinação dos dois o efeito se tornaria mais tóxico. Pequenas doses do herbicida Roundup® causariam danos nocivos para os seres humanos, gerando desde irritações de pele a alterações cardíacas. Quando encontrado na água é considerado 20 a 70 vezes mais tóxico para peixes que o glifosato puro.⁽⁷⁾

Assim, produtos formulados que apresentam o glifosato ativo combinado a componentes surfactantes, como observado no herbicida

Roundup®, tendem a apresentar maior toxicidade a plantas e animais,⁽³⁾ sobretudo pela adição do surfactante POEA que aumenta o efeito do herbicida, gerando grande preocupação em relação à exposição de organismos não alvos a esses xenobióticos.⁽⁶⁾

Por isso, as consequências acumulativas de xenobióticos nos organismos dos peixes são alvo de estudos há décadas, principalmente por estarem entre os principais indivíduos não alvos afetados pelo uso abusivo de agrotóxicos.⁽⁸⁾ A acumulação de xenobióticos nesses animais pode ocasionar mortalidade em massa por envenenamento, bem como mudanças comportamentais e danos físicos, reprodutivos e endócrinos.⁽⁹⁾ Desse modo, os peixes são considerados excelentes organismos indicadores de condições ambientais, podendo apresentar diferentes tipos e graus de distúrbios de acordo com seu ciclo de vida.⁽¹⁰⁾

O peixe da espécie *Danio rerio* (*D. rerio*), é um exemplo de vertebrado muito utilizado em estudos científicos, principalmente em pesquisas toxicológicas,⁽¹¹⁾ por ser considerado um animal de pequeno porte, de econômica criação, com reprodução rápida, fácil manutenção e características fisiológicas e moleculares homólogas aos mamíferos, como os seres humanos,⁽¹¹⁻¹³⁾ o que,

portanto, o torna um bom animal modelo para pesquisas sobre as modificações ambientais.

Neste contexto, a presente pesquisa teve o objetivo de comparar o potencial mutagênico e de desenvolvimento gonadal do herbicida Roundup® e de seu princípio ativo, o glifosato, em peixes da espécie *D. rerio*.

Materiais e Métodos

Manutenção dos animais em laboratório

Para o estudo foram adquiridos peixes fêmeas e machos adultos da espécie *D. rerio* (Figura 1) em estabelecimento comercial especializado na criação de animais aquáticos e transportados em embalagens adequadas para o Laboratório de Análise Ambiental da Universidade do Contestado (UnC), *campus* Concórdia. Os peixes machos foram utilizados para o teste de micronúcleos e as fêmeas para a verificação dos estágios de desenvolvimento gonadal e índice gonadossomático. Os peixes em estágios de vida reprodutivos eram identificados com base em parâmetros de comprimento corporal, o qual corresponde a cerca de 20 mm (2 cm) em peixes da espécie *D. rerio* que se encontram em períodos de reprodução.⁽¹⁴⁾

Figura 1 - Peixes fêmea (1) e macho (2) da espécie *Danio rerio*.



Fonte: Dados da pesquisa (2018)

A aclimação dos peixes foi realizada em aquários com capacidade de 25 litros contendo água aerada e declorada. A água permaneceu em aeração

por um período de cinco dias, permitindo as trocas gasosas para a remoção total do cloro presente na água e evitando, assim, a morte dos peixes no

momento de alocação nos aquários testes. Os peixes permaneceram por um período de cinco dias de aclimatação em condições de aeração constante e fotoperíodo natural;⁽¹⁵⁾ as fêmeas e machos adultos de *D. rerio* foram divididos em quatro aquários contendo dez indivíduos cada (n=40). O glifosato ativo e o produto formulado Roundup® utilizados nos tratamentos foram adquiridos comercialmente.

Aquário 1: controle negativo, peixes livres mantidos em água de cultivo;

Aquário 2: controle positivo, peixes expostos a 2,5 mg/L de dicromato de potássio;

Aquário 3: peixes expostos a 65 µg/L do herbicida glifosato diluído em água;

Aquário 4: peixes expostos a 65 µg/L do herbicida Roundup® diluído em água.

O dicromato de potássio na concentração de 2,5 mg/L foi utilizado no estudo devido seus bons resultados na indução da formação de micronúcleos em eritrócitos de peixes, sendo visto como modelo de controle positivo para estudos toxicológicos,⁽¹⁶⁻¹⁷⁾ este agente induz a formação de micronúcleos citoplasmáticos devido seus efeitos clastogênicos que promovem a quebra cromossômica durante a divisão celular no organismo dos peixes.⁽¹⁷⁾

A concentração de 65 µg/L do herbicida glifosato utilizada foi baseada no parâmetro estabelecido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, que determina a concentração máxima permitida de glifosato para os rios brasileiros.⁽⁴⁾

Para garantir o bem-estar dos peixes na sua permanência em laboratório, foram utilizados métodos específicos para manutenção do *D. rerio*, no qual recomenda-se a temperatura entre 26 °C e 28 °C, que foi mantida através do termostato, aeração direta para trocas gasosas e parâmetros de pH entre 6,8 e 7,5, assim como fotoperíodo natural e alimentação com ração específica para peixes (Alcon Basic®) duas vezes ao dia.⁽¹⁸⁾ Para monitoramento dos parâmetros de qualidade da água, foram realizadas medidas para a verificação de pH, temperatura (°C) e oxigênio dissolvido a cada 24 horas de exposição,⁽¹⁵⁾ bem como a observação das condições de higiene dos aquários

e a saúde dos peixes. Em casos de ocorrência de doença ou morte os peixes eram retirados e descartados adequadamente.

Os procedimentos adotados com os peixes *Danio rerio* no presente estudo foram realizados conforme diretrizes do Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade do Contestado (aprovação do CEUA/UnC/07/15), seguindo as normas do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA).

Teste de micronúcleo (MN)

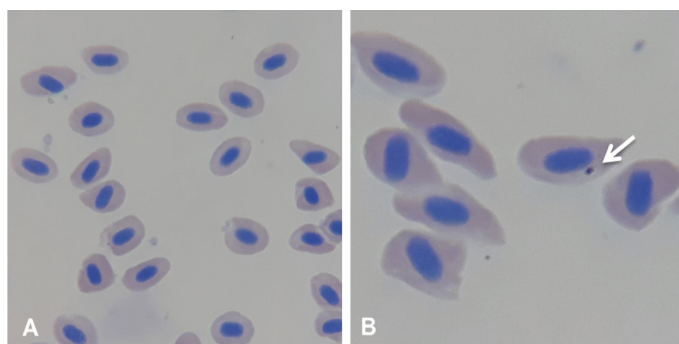
Para o teste de MN foram utilizados três indivíduos machos de cada aquário, após 72 horas de exposição aos diferentes tratamentos; esse tempo de exposição é considerado suficiente para que ocorra a mitose celular completa e o aparecimento de micronúcleos nos eritrócitos dos peixes, no qual a duração do ciclo celular corresponde entre dois a três dias na maioria das espécies aquáticas.⁽¹⁹⁾

Os peixes foram submetidos à eutanásia por submersão em água gelada a 4 °C por aproximadamente cinco minutos, e submetidos à dissecação⁽²⁰⁾ e coleta de sangue nas brânquias com o auxílio de seringa (2 ml) devidamente heparinizada. O sangue foi depositado em lâmina histológica submetido à técnica de esfregaço.

Após a realização dos esfregaços, as lâminas histológicas passaram pelo processo de secagem, fixação, coloração e visualização em microscópio, permanecendo em temperatura ambiente por 12 horas para a secagem. Em seguida, as lâminas secas foram fixadas em álcool metílico por 10 minutos e secadas em temperatura ambiente por 15 minutos. Na sequência, as lâminas passaram por processos de coloração com Giemsa 5% por 25 minutos, lavadas com água destilada e secas para posterior avaliação de MNs (micronúcleos).⁽²¹⁾

Para análise da presença de MNs nas hemácias foi utilizada a microscopia óptica, com aumento inicial de 400x. Em seguida, os MNs foram identificados em aumento de 1000x (Figura 2). Foram analisados 2.000 eritrócitos por peixe,⁽¹⁵⁾ totalizando três lâminas por aquário.

Figura 2 - Eritrócitos normais sem a presença de micronúcleos (A), e eritrócitos com presença de micronúcleo no citoplasma (B).



Fonte: Dados da pesquisa (2018)

Para melhor confiabilidade da avaliação dos micronúcleos (MNs) foram seguidos os critérios estipulados: (a) apresentar tamanho inferior a 1/3 do núcleo principal; (b) não refrativos; (c) presença de coloração e intensidade equivalente ao núcleo principal e (d) posição intracitoplasmática, mas sem tocar o núcleo principal.⁽²²⁾

Índice gonadossomático (IGS) e maturação gonadal

Para definir o IGS e a maturação gonadal foram utilizados sete peixes de cada aquário, expostos nos diferentes tratamentos em um período de 15 dias, como realizado em estudos com peixes *D. rerio*⁽²³⁾ e baseado nos valores de meia-vida do herbicida em meio hídrico (cerca de 7 a 14 dias),⁽²⁴⁾ visando, assim, simular o ambiente natural desses animais. A verificação da sexagem das fêmeas foi realizada através de exame macroscópico dos indivíduos e, quando necessário, foi utilizado um microscópio estereoscópico, para posterior retirada dos ovários.

Para obter os dados biométricos iniciais foram verificadas as medidas de massa corpórea (g) e comprimento total das fêmeas (cm), este obtido através da medição desde a extremidade da cabeça até a cauda do peixe.⁽²¹⁾ Após, os ovários foram dissecados e pesados (mg) para calcular o IGS (índice gonadossomático). O IGS foi obtido através do cálculo entre a massa corporal (mc) e a massa da gônada (mg) de cada fêmea, multiplicado por 100 ($IGS = (MG/MC) \times 100$).⁽²⁵⁻²⁶⁾

Para a verificação dos estágios de maturação gonadal, os parâmetros foram baseados de acordo com metodologias adaptadas e encontradas na literatura,⁽²⁷⁾ observando macroscopicamente os aspectos de vascularização, cor, consistência e transparência das gônadas. Em seguida, os ovários foram classificados conforme suas características morfológicas e qualitativas, e assim categorizados de acordo com os quatro estágios de maturidade gonadal definidos para peixes da família Cyprinidae: imaturo, em maturação, maduro e esvaziado (Quadro 1).

Quadro 1 - Escala macroscópica de maturação gonadal para peixes teleósteos, como a família Cyprinidae.

Estágios de maturidade	Características macroscópicas
	Fêmeas
I - Imaturo	Os ovários são filiformes, translúcidos, de tamanho muito reduzido, colocados bem junto da coluna vertebral; a olho nu não se observam os ovócitos.

Continua

Continuação

II - Em maturação	Os ovários apresentam-se ocupando cerca de 1/3 a 2/3 da cavidade abdominal, com intensa rede capilar. A olho nu observam-se grânulos opacos de tamanhos variados, os ovócitos.
III - Maduro	Os ovários apresentam-se túrgidos, ocupando quase que totalmente a cavidade abdominal. A olho nu observam-se ovócitos maduros, que se apresentam como grânulos esféricos opacos e/ou translúcidos e grandes, cuja frequência varia com o progresso da maturação.
IV - Esvaziado	Os ovários apresentam-se com aspecto hemorrágico, completamente flácidos, ocupando menos de 1/3 da cavidade abdominal. Observam-se poucos ovócitos, em estado de reabsorção.

Fonte: Modificado por Vazzoler⁽²⁷⁾

Análise estatística

Para efetuar a comparação e análise de diferenças significativas nos dados obtidos pelo teste de MNs e de IGS nos grupos, foi realizada a Análise de Variância One-Way ANOVA ($p < 0,05$), seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas através do *software* PAST.

Resultados

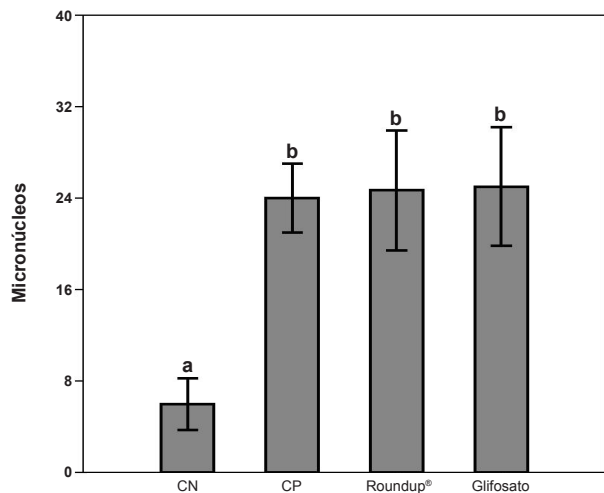
Micronúcleos (MNs)

Para confirmação da presença de MNs foram analisados 24.000 eritrócitos de peixes através da microscopia óptica. Destes, foram encontrados um total de 239 MNs, o que correspondeu por grupo a média + desvio padrão de 6 ($\pm 1,6$) no controle negativo (CN), 24 ($\pm 2,2$) no controle positivo (CP), 24,7 ($\pm 3,8$) em eritrócitos de peixes expostos ao herbicida Roundup[®] e 25 ($\pm 3,7$) em eritrócitos de peixes expostos ao herbicida glifosato. Por meio dos dados obtidos nas análises estatísticas foi possível observar que os eritrócitos dos peixes do grupo CP apresentaram diferença significativamente maior na frequência de MNs em relação aos peixes do CN ($p = 0,001$).

Os resultados deste estudo demonstraram diferenças significativas na frequência de MNs nos eritrócitos dos peixes expostos a 65 $\mu\text{g/L}$ do

princípio ativo glifosato e do herbicida Roundup[®] em relação aos peixes do grupo CN ($p = 0,0025$). Porém, não foi observado diferenças significativas na presença de MNs nos eritrócitos dos peixes do grupo exposto ao glifosato em comparação aos do grupo Roundup[®] ($p = 0,93$), verificando, assim, uma similaridade de ambos os compostos na indução de MNs (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Frequência de MNs observados em eritrócitos de peixes *D. rerio* expostos aos tratamentos contendo Roundup[®] e glifosato em comparação aos peixes expostos ao CN e CP (\pm desvio padrão). Letras diferentes entre os tratamentos indicam diferenças estatísticas, One-Way ANOVA ($p < 0,05$).



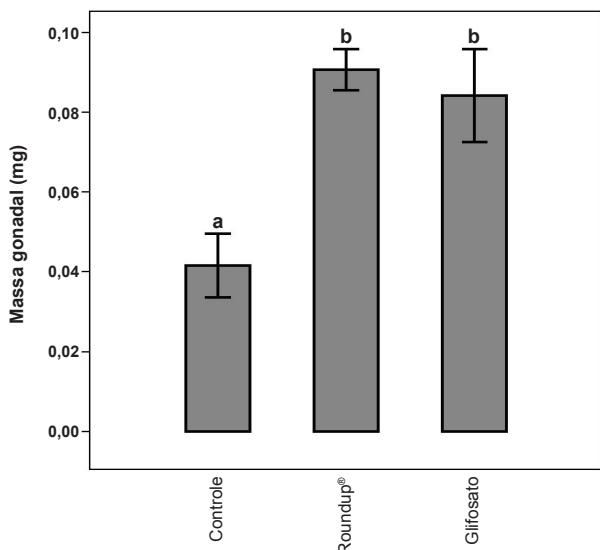
Fonte: Dados da pesquisa (2018)

Massa gonadal

Quanto à avaliação da massa gonadal das fêmeas, foram obtidas médias + desvio padrão de 0,0416g (\pm 0,02) para as fêmeas do grupo CN (controle negativo), 0,0906g (\pm 0,01) para as fêmeas expostas ao Roundup® e 0,0841g (\pm 0,03) para as fêmeas expostas ao glifosato.

Na comparação das médias de massa das gônadas obtidas entre os tratamentos foi possível verificar diferenças estatisticamente maiores entre a massa gonadal das fêmeas expostas aos tratamentos com herbicidas em comparação à massa gonadal das fêmeas do grupo CN ($p=0,0045$), demonstrando que fêmeas expostas ao Roundup® e seu ingrediente ativo glifosato apresentaram aumento da massa dos ovários em relação às fêmeas não expostas. Contudo, quando na comparação entre os herbicidas, verificou-se que ambos não apresentaram diferenças significativas ($p=0,63$). (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Massa gonadal de fêmeas de *D. rerio* expostas aos tratamentos contendo herbicidas em comparação à massa gonadal das fêmeas *D. rerio* do grupo controle negativo (\pm desvio padrão). Letras diferentes entre os tratamentos indicam diferenças estatísticas, One-Way ANOVA ($p<0,05$).



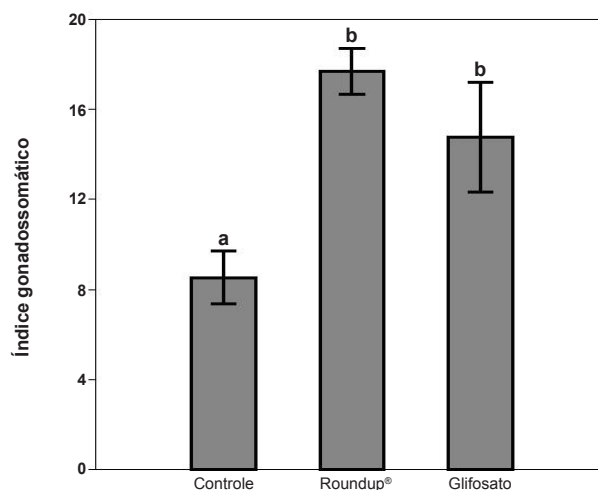
Fonte: Dados da pesquisa (2018)

Índice gonadossomático (IGS)

Nos resultados obtidos através do IGS, as médias \pm desvio padrão verificadas nos tratamentos correspondem a 8,53 (\pm 3) das fêmeas do CN (não expostas aos herbicidas), de 17,67 (\pm 2) das fêmeas expostas ao Roundup® e 14,75 (\pm 5) das fêmeas expostas ao princípio ativo glifosato.

Quando comparados estatisticamente, foi possível verificar diferenças significativas entre o IGS dos grupos tratados com herbicidas em comparação aos do grupo CN ($p=0,0021$). Mas não verificou-se diferenças significativas no IGS das fêmeas pertencentes ao grupo Roundup® em relação às do glifosato ($p=0,32$). (Gráfico 3).

Gráfico 3 - IGS de fêmeas de *Danio rerio* expostas aos tratamentos contendo herbicidas em comparação ao IGS das fêmeas de *Danio rerio* do grupo controle negativo (\pm erro padrão). Letras diferentes entre os tratamentos indicam diferenças estatísticas, One-Way ANOVA ($p<0,05$).



Fonte: Dados da pesquisa (2018)

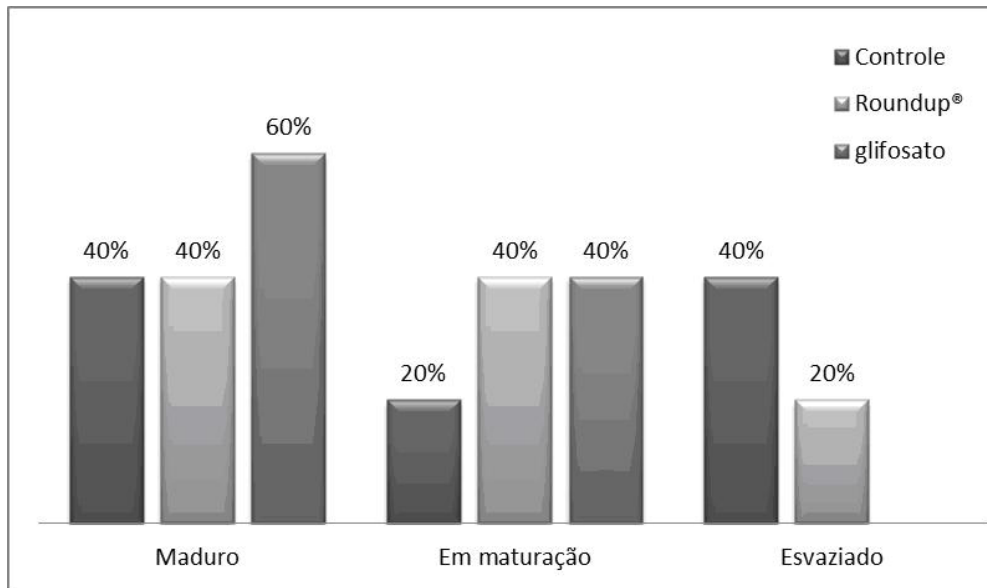
Maturação gonadal

Com base nas escalas de estágio de maturidade gonadal para peixes da família Cyprinidae,⁽²⁷⁾ foi possível observar no presente estudo a presença de três tipos de estágios de maturação gonadal: em maturação, maduro e esvaziado.

Após as análises macroscópicas das gônadas, pode-se verificar que os ovários das fêmeas expostas ao herbicida Roundup® apresentaram 40% das gônadas em maturação, 40% maduras e 20% esvaziadas. As fêmeas expostas ao glifosato

apresentaram 40% das gônadas em maturação e 60% maduras, mas não apresentaram gônadas em estágio esvaziado. As fêmeas do aquário controle tiveram 20% das gônadas em maturação, 40% maduras e 40% esvaziadas (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Estágios de maturação gonadal observados em fêmeas de *Danio rerio* expostas aos diferentes tratamentos.



Fonte: Dados da pesquisa (2018)

Discussões

Micronúcleos (MNs)

Com base nas análises estatísticas da frequência de micronúcleos, constatou-se que tanto o herbicida Roundup® como o glifosato demonstram potencial genotóxico, podendo ocasionar efeitos clastogênicos ou aneugênicos em eritrócitos de peixes da espécie *D. rerio*. Por mais que o glifosato seja considerado um agente com baixa toxicidade, autores sugerem que os peixes estão entre os animais mais sensíveis à exposição deste herbicida e de componentes adicionados comercialmente,⁽³⁾ corroborando os resultados avaliados neste estudo.

Aumentos significativos na frequência de micronúcleos em eritrócitos de peixes foram verificados em pesquisa realizada com Lambaris.⁽²⁾ Peixes do gênero *Astyanax* spp. permaneceram

em exposição por 72 horas a uma concentração igual a do presente estudo (65 µg/L de glifosato), demonstrando os efeitos nocivos do herbicida ao DNA dos eritrócitos destes organismos. Aumentos na frequência de micronúcleos também foram verificados em estudos realizados nos peixes *D. rerio* expostos a 65 µg/L e 120 µg/L do herbicida glifosato, elucidando os efeitos genotóxicos deste agente para as células dos peixes, mesmo na concentração máxima permitida para rios brasileiros,⁽²¹⁾ uma vez que o peixe *D. rerio* é considerado um comprovado modelo na monitoria do potencial citotóxico e genotóxico de diversos compostos químicos por meio da verificação na formação de micronúcleos.⁽²⁸⁾

Estudos para verificar o potencial genotóxico do herbicida Roundup® também foram efetuados na literatura. Pesquisadores realizaram um estudo *in vivo* sobre os efeitos genotóxicos do

produto formulado Roundup® em peixes dourados *Carassius auratus*, pertencentes à família dos Ciprinídeos, a mesma à qual pertence o *D. rerio*. Os peixes foram expostos a três doses do herbicida (5, 10 e 15 ppm) em intervalos de 48, 96 e 144 horas, constatando que a exposição dos peixes ao herbicida induziu aumentos significativos nas frequências de micronúcleos.⁽²⁹⁾

Portanto, os resultados obtidos no presente estudo corroboram os relatados na literatura, demonstrando que tanto o herbicida Roundup®, como seu princípio ativo glifosato, demonstram potencial citotóxico e genotóxico em peixes, que supostamente ocasionam a presença de micronúcleos nos eritrócitos do *D. rerio*. Sabe-se que essa formação é proveniente de quebras ou perdas de cromossomos pelo fuso mitótico no momento da divisão celular, o que provocaria alterações na estrutura dos cromossomos, estas decorrentes da exposição a agentes químicos exógenos, como os herbicidas.^(22,30-31)

No entanto, quando comparamos os MNs dos eritrócitos de peixes expostos ao herbicida Roundup® em relação aos do herbicida glifosato, pôde-se verificar que ambos apresentaram potencial genotóxico similar. Contudo, estudos apontam que tanto o glifosato como os seus derivados possuem potencial toxicológico para os peixes, porém somente o glifosato apresenta menos efeitos tóxicos que a sua formulação comercial, Roundup®, que possui adição de surfactantes em sua composição.⁽⁷⁾

Pesquisas indicaram que concentrações do herbicida Roundup® e seu componente surfactante (amino polioxietileno) foram mais tóxicas para peixes e invertebrados aquáticos em comparação ao princípio ativo glifosato,⁽³²⁾ pois os eventos genotóxicos dos agrotóxicos são decorrentes do aumento toxicológico das formulações, ocasionado pela adição de compostos inertes ou surfactantes presentes em sua composição.⁽³³⁾

Desta forma, os resultados da presente pesquisa apresentaram diferenças com os observados na literatura, pois tanto o glifosato como a formulação comercial Roundup® que apresenta,

além do glifosato, a adição de surfactantes, não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados. Mas é necessário levar em consideração o tempo de exposição, pois a duração do ciclo celular, o tempo de maturação e a vida útil dos eritrócitos podem variar entre as espécies de peixes.⁽¹⁹⁾ Autores indicam que os micronúcleos são observados após o primeiro ciclo celular, sendo totalmente dependentes da ocorrência de proliferação celular no organismo, algo que pode variar entre as espécies de teleósteos.⁽³⁴⁾

Índice gonadossomático (IGS)

Pesquisas demonstram que na maturação gonadal dos peixes são notados simultaneamente aumentos graduais nos valores do IGS relacionados aos estágios de maturação das fêmeas, como também variações no IGS condizem com alterações nas estruturas ovarianas nos estágios de maturação.⁽²⁵⁾ Desta forma, verificou-se que o glifosato e o Roundup® são herbicidas que provavelmente provocam a indução da maturação gonadal das fêmeas de *Danio rerio*, alterando o processo reprodutivo natural, o que resultou num aumento nos valores de IGS de forma significativa quando comparado às fêmeas que não foram expostas aos herbicidas. Portanto, sugere-se que os herbicidas podem ter induzido a picos precoces de maturação nos ovários, assim como alterações nos estágios de desenvolvimento das gônadas.

Aumentos em valores de IGS nos ovários de peixes *D. rerio* expostos a diferentes concentrações de glifosato também foram identificados após 15 dias de exposição.⁽²¹⁾ Contudo, as comparações de IGS das fêmeas dos tratamentos contendo herbicidas demonstraram que tanto o glifosato como o Roundup® possuem efeitos de toxicidade similar nas gônadas de *D. rerio* e induziram a maturação precoce dos ovários nestes peixes de forma semelhante.

Pesquisas indicam que exposições de curto prazo de peixes truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) ao Roundup® e seu princípio ativo glifosato não ocasionaram alterações no IGS e maturação

gonadal, mas induziram na diminuição da eclosão de ovos e na sobrevivência dos alevinos, o que prejudicaria as fases iniciais da vida do peixe.⁽³²⁾

Outros estudos propuseram que o aumento do IGS pode estar relacionado com a elevação na expressão da biossíntese de hormônios esteróides nas fêmeas de *Danio rerio* expostas ao herbicida glifosato, o que poderia ter ocasionado alterações no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, induzindo, assim, a maturação ovariana.⁽¹⁵⁾ Pesquisas sobre a influência do glifosato nos ovários de *Danio rerio* demonstraram que a elevação nos valores de índice gonadossomático foi resultante do avanço da maturação ovariana, associado à maior expressão do fator esteroideogênico 1 (SF-1), considerado o principal regulador da formação de hormônios esteróides.⁽²³⁾

Destarte, sugere-se que o aumento de índice gonadossomático nas fêmeas de *Danio rerio* pode estar relacionado a alterações hormonais ocorridas nas gônadas dos peixes, decorrente da exposição a estes xenobióticos, uma vez que agrotóxicos foram considerados capazes de gerar distúrbios endócrinos nas fases iniciais de desenvolvimento dos peixes, bloqueando hormônios sexuais e interferindo no desenvolvimento sexual normal desses animais.⁽⁹⁾

Massa e maturação gonadal

Peixes da espécie *Danio rerio* expostos por 15 dias a uma concentração do herbicida glifosato apresentaram aumentos na massa dos ovários de forma significativa em relação a peixes não expostos, demonstrando certa capacidade deste composto em interferir na reprodução destes organismos.⁽¹⁵⁾ Ademais, fêmeas de *Danio rerio* submetidas ao glifosato demonstraram aumentos significativos nos diâmetros dos ovócitos, assim como danos ultraestruturais através da formação de membranas concêntricas, podendo acometer as funções dos ovócitos logo após a fertilização.⁽²³⁾

Peixes da espécie *Austrolebias nigrofasciatus* expostos a concentrações de um herbicida comercial à base de glifosato, também apresentaram redução

no número de embriões fertilizados, porém exibiram elevados aumentos em seus diâmetros, bem como diminuição na tolerância térmica embrionária.⁽³⁵⁾

Neste contexto, os resultados apresentados no presente estudo e os observados na literatura demonstraram que herbicidas que contêm como princípio ativo o glifosato estão ocasionando mudanças no desenvolvimento das células germinativas, bem como afetando suas funções, podendo induzir ao ciclo reprodutivo precoce de *Danio rerio* devido ao aumento desproporcional da massa gonadal, e promovendo, assim, o desequilíbrio no ciclo de vida destes organismos.

Além disso, os resultados qualitativos dos ovários observados nesta pesquisa demonstram que as gônadas das fêmeas expostas no herbicida Roundup®, assim como no glifosato, tiveram maior ocorrência de ovários em maturação do que as gônadas das fêmeas do aquário controle. A prevalência deste estágio coincide com os resultados destacados anteriormente a respeito do aumento de massa gonadal e valores elevados de índice gonadossomático.

Pesquisas indicam que tanto o herbicida Roundup® como o glifosato foram capazes de aumentar a incidência de anormalidades ovarianas e mortalidade precoce dos embriões, assim como estimularam a eclosão precoce nos ovos dos peixes *Danio rerio*.⁽³⁶⁾ O glifosato também gerou efeitos deletérios na reprodução dos machos de *D. rerio* através de danos espermáticos, acarretando na redução das taxas de fertilidade da espécie.⁽³⁷⁾ Deste modo, nossos resultados demonstram que estes herbicidas podem estar ocasionando mudanças nos estágios reprodutivos dos peixes, principalmente no desenvolvimento ovariano.

Outra característica observada é a ocorrência de ovários maduros nas fêmeas que permaneceram em exposição ao glifosato, excedendo a frequência visualizada no grupo controle e nas fêmeas expostas ao Roundup®. A princípio, este resultado pode ser indicativo que o herbicida glifosato ocasionou maior indução de maturação dos ovários após o período de 15 dias de exposição dos peixes do que

os visualizados nos outros tratamentos, podendo ser um indicativo que o glifosato ocasionou maior interferência sobre a maturação gonadal nos peixes do que o herbicida Roundup®.

Conclusão

Conclui-se que os herbicidas Roundup® e glifosato apresentaram potencial genotóxico similar, que possivelmente ocasionou efeitos clastogênicos e aneugênicos em eritrócitos de peixes da espécie *D. rerio*, bem como provocou o aumento do índice gonadossomático, da massa gonadal e do número de ovários nos estágios em maturação. Porém, verificou-se que a frequência de ovários maduros foi relativamente maior para o grupo tratado com glifosato em comparação ao grupo tratado com Roundup®.

Diante disso, através das análises genotóxicas e reprodutivas realizadas na pesquisa, conclui-se que o herbicida Roundup®, bem como o glifosato foram tóxicos para os peixes *Danio rerio*, mesmo nas concentrações máximas permitidas para rios brasileiros.

Agradecimento

Ao Grupo de Pesquisa GEMA, Universidade do Contestado (UnC), *campus* Concórdia.

Referências

- 1 Santos EAD, Correia NM, Botelho RG. Resíduos de herbicidas em corpos hídricos: uma revisão. *Rev. Bras. Herbicidas*. 2013 ago; 12(2):188-201. doi: 10.7824/rbh.v12i2.245.
- 2 Silva MRLR. Avaliação da toxicidade celular do herbicida glifosato em *Astyanax* spp. *Saúde e Meio Ambient. Rev. Interdisciplin.* 2015;3(2):62-9. doi: 10.24302/sma.v3i2.629.
- 3 Amarente OP Jr, Santos TCR, Brito NM, Ribeiro ML. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quím. Nova*. 2002;25(4):589-93. doi: 10.1590/S0100-40422002000400014.
- 4 Brasil. Resolução Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, nº 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 União*, v. 18, n. 3, p. 1-9, 2005.
- 5 Cavalcante DGSM, Martinez CBR, Sofia, SH. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat Res.* 2008;655(1-2):41-6. doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.06.010.
- 6 Tsui MTK, Chu LM. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*. 2003 ago;52(7):1189-97. doi: 10.1016/s0045-6535(03)00306-0.
- 7 Cox C. Glyphosate (ROUNDUP). *J Pesticide Reform*. 1998;18(3):3-17.
- 8 Santana LMBM, Cavalcante RM. Transformações metabólicas de agrotóxicos em peixes: uma revisão. *Orbital: Electron. J. Chem.* 2016 jul;8(4):257-68. doi:10.17807/orbital.v8i4.856.
- 9 Sabra FS, Mehana ESED. Pesticides toxicity in fish with particular reference to Insecticides. *Asian J Agric Food Sci*. 2015 Fev;3(1):40-60. doi:10.24203/ajafs.v3i1.2156.
- 10 Freitas CEC, Souza FKS. O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia amazônica. *Rev AgrogeoAmbiental*. 2009 ago;1(2):39-45. doi: 10.18406/2316-1817v1n2200975.
- 11 Silveira TR, Schneider AC, Hammes TO. *Zebrafish*: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. *Ciênc. Cult.*, 2012 abr./jun; 64(2):4-5. doi: 10.21800/S0009-67252012000200002.
- 12 Chakravarthy S, Sadagopan S, Nair A, Sukumaran SK. Zebrafish as an in vivo high-throughput model for genotoxicity. *Zebrafish*. 2014 Apr;11(2):154-66. doi: 10.1089/zeb.2013.0924.

- 13 Siebel AM, Bonan CD, Silva RS. *Zebrafish* como modelo para estudos comportamentais. In: Resende RR, organizador. *Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações*. São Paulo: Blucher; 2015. p. 15-56.
- 14 Dammski AP, Müller BR, Gaya C, Regonato D. *Zebrafish: manual de criação em biotério*. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2011.
- 15 Silva TF, Barp EA, Armiliato N. Avaliação da toxicidade celular do glifosato sobre as gônadas de *Danio rerio* (Cyprinidae). *Saúde e Meio Ambient. Rev. Interdisciplin.* 2017;6(1):85-95. doi: 10.24302/sma.v6i1.1041.
- 16 Fuzinato CF, Flohr L, Melegari SP, Matias WG. Induction of micronucleus of *Oreochromis niloticus* exposed to waters from the Cubatão do Sul River, southern Brazil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2013 dez;98:103-9. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.09.016.
- 17 Normann CABM, Moreira JCF, Cardoso VV. Micronuclei in red blood cells of armored catfish *Hypostomus plecostomus* exposed to potassium dichromate. *Afr. J. Biotechnol.* 2008 Apr;7(7):893-6. doi: 10.5897/AJB07.669.
- 18 Schneider ACR, Santos JL, Porawski M, Schaefer PG, Maurer RL, Matte U, et al. Implementação de um novo modelo de experimentação animal - *zebrafish*. *Rev. Hosp. Clín. Porto Alegre.* 2009;29(2):100-3.
- 19 Udroui I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicol.* 2006 Aug;79(2): 201-4. doi: 10.1016/j.aquatox.2006.06.013.
- 20 Wilson JM, Bunte RM, Carty AJ. Evaluation of rapid cooling and tricainemethanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2009 Nov;48(6):785-9.
- 21 Silva TF, Carmo KB, Armiliato N. Toxicidade celular do herbicida glifosato sobre os ovários do peixe *Danio rerio*. *Saúde e Meio Ambient. Rev. Interdisciplin.* 2019 Fev;8:1-12. doi:10.24302/sma.v8i0.1859.
- 22 Grisolia CK. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutat Res.* 2002 Jul;518(2):145-50. doi:10.1016/s1383-5718(02)00086-4.
- 23 Armiliato N, Ammar D, Nezzi L, Stralio M, Muller YMR, Nazari EM. Changes in ultrastructure and expression of steroidogenic factor-1 in ovaries of Zebrafish *Danio rerio* Exposed to Glyphosate. *J Toxicol Environ Health A.* 2014 Mar;77(7):405-14. doi: 10.1080/15287394.2014.880393.
- 24 Giesy J, Dobson S, Solomon K. *Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide*. *Rev Environ Contam Toxicol*: Springer; 2000;167(2):35-120.
- 25 Navarro RD, Ribeiro OF Filho, Ferreira WM, Pereira FKS. A importância das vitaminas E, C e A na reprodução de peixes: revisão de literatura. *Rev Bras Reprod Anim.* 2009 Jan;33(1):20-5.
- 26 Soso AB, Barcellos LJ, Ranzani-Paiva MJ, Kreutz LC, Quevedo RM, Anziliero D, et al. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environ Toxicol Pharmacol.* 2007 May;23(3):308-13. doi: 10.1016/j.etap.2006.11.008.
- 27 Vazzoler AEAM. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: Editora Universidade Estadual de Maringá; 1996.
- 28 Bihanic FL, Bucchianico S, Karlsson HL, Dreij K. In vivo micronucleus screening in zebrafish by flow cytometry. *Mutagenesis.* 2016 Jul;31(6):643-53. doi: 10.1093/mutage/gew032.
- 29 Cavas T, Konen S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis.* 2007 Apr;22(4):263-8. doi: 10.1093/mutage/gem012.

- 30 Flores M, Yamaguchi MU. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. *Saúde Pesq.* 2008 set;1(3):337-40.
- 31 Carrard VC, Costa CH, Ferreira LA, Lauxen IS, Rados PV. Teste de micronúcleos: um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. *Rev. Fac. Odontol.* 2007 jan;48(1-3):77-81. doi: <https://doi.org/10.22456/2177-0018.7512>
- 32 Folmar LC, Sanders HO, Julin AM. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1979;8(3):269-78. doi: 10.1007/BF01056243.
- 33 Grisolia, CK. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutat Res.* 2002 Jul;518(2):145-50. doi: 10.1016/s1383-5718(02)00086-4.
- 34 Al-sabti K, Metcalfe CD. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res.* 1995 Jun;343 (2-3):121-35. doi: 10.1016/0165-1218(95)90078-0.
- 35 Zebal YD, Lansini LR, Costa PG, Roza M, Bianchini A, Robaldo RB. A glyphosate-based herbicide reduces fertility, embryonic upper thermal tolerance and alters embryonic diapause of the threatened annual fish *Austrolebias nigrofasciatus*. *Chemosphere.* 2018;196:260-9. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.12.196.
- 36 Webster TMU, Laing LV, Florance H, Santos EM. Effects of Glyphosate and its Formulation, Roundup, on Reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol.* 2014 Jan;48(2):1271-79. doi: <https://doi.org/10.1021/es404258h>
- 37 Lopes FM, Junior ASV; Corcini CD; Silva AC; Guazzelli VG; Tavares G *et al.* Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. *Aquat Toxicol.* 2014 Oct;155:322-6. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.07.006.

Recebido em: 7 abr. 2020

Aceito em: 8 jun. 2020

