

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ**  
**CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E**  
**ENGENHARIA DE PESCA**

**DENISE NASCIMENTO DE BASTOS**

Toxicidade do Herbicida Glifosato em *Daphnia magna* e pós-larvas de  
*Rhamdia quelen*

Toledo

2013

**DENISE NASCIMENTO DE BASTOS**

Toxicidade do Herbicida Glifosato em *Daphnia magna* e pós-larvas de  
*Rhamdia quelen*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Aquicultura.

Orientador: Prof. Dr. Nyamien Yahaut Sebastien

Toledo

2013

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária  
UNIOESTE/Campus de Toledo.

Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

B327t Bastos, Denise Nascimento de  
Toxicidade do herbicida Glifosato em *Daphnia magna* e pós-larvas de *Rhamdia quelen* / Denise Nascimento de Bastos. -- Toledo, PR : [s. n.], 2013.  
38 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Nyamien Yahaut Sebastien  
Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Campus de Toledo. Centro de Engenharias e Ciências Exatas.

1. Aquicultura 2. Ecossistema aquático - Toxicologia 3. Toxicologia aquática 4. Ecotoxicologia aquática 5. Peixes - Toxicidade por herbicida glifosato 6. Jundiá (*Rhamdia quelen*) 7. Microcrustáceos (*Daphnia magna*) - Testes de toxicidade 8. Água, Qualidade da - Manejo - Piscicultura I. Sebastien, Nyamien Yahaut, Orient. II. T

CDD 20. ed. 639.3752

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**DENISE NASCIMENTO DE BASTOS**

Toxicidade do Herbicida Glifosato em *Daphnia magna* e pós-larvas de  
*Rhamdia quelen*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

### COMISSÃO JULGADORA

---

Prof. Dr. Nyamien Yahaut Sebastien  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)

---

Prof. Dr. Gilmar Baumgartner  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

---

Prof. Dr. Eduardo Antônio Sanches  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Aprovada em: 26 de junho de 2013.

Local de defesa: Auditório do GERPEL/*Campus* de Toledo

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, tenho que agradecer a Deus pelo dom da vida e por todas as bênçãos que derramou sobre mim durante essa caminhada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Nyamien Yahaut Sebastien por todos os ensinamentos, carinho, atenção e compreensão durante a realização deste trabalho, que me acalmou sempre que eu estive preocupada com os experimentos que não funcionavam e os prazos que chegavam ao fim.

Ao Prof. Dr. Gilmar Baumgartner e Prof. Eduardo Antônio Sanches que aceitaram fazer parte dessa banca e contribuir para o desenvolvimento do trabalho.

Também devo agradecer a todos os professores da Unioeste, que foram importantes para minha formação e aprendizado, especialmente ao Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli, que foi quem me incentivou a escolher esse curso e me ofereceu emprego quando eu não tinha bolsa de estudos, obrigada por acreditar na minha capacidade.

A toda minha família especialmente meus pais Argemiro e Cecília e meus irmãos André, Jean e Priscila, pela educação, apoio em minhas decisões e por toda preocupação e carinho quando eu estava em desespero.

A toda equipe do InPAA que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho, especialmente ao meu colega de laboratório Marcos.

A toda equipe LATRAAC que dispuseram do seu tempo para me auxiliar, especialmente meus ex-estagiários do Aquário que me suportaram como chefe por alguns meses.

Como nem só de artigos e café vive um pesquisador, mas também de muita festa regada a cerveja, agradeço à minhas amigas de todas as horas, integrantes do “Las Sabonadas” Aline, Aninha, Carol, Fran, Jana, Léli, Luize, Manu e Sília.

E também não poderia me esquecer das Lulu’s Fest, por todos os nossos papos e muitos T.C.P.s (Truco, Cerveja e Pizza) Alis, Cristina, Danielle, Lucélia e Sília.

A todos os meus colegas de mestrado pelas trocas de conhecimentos nesses dois anos juntos e muitas jantadas da turma.

E por último, mas não menos importante, aos amigos que sempre me incentivaram nos estudos e no trabalho, parceria que vou levar para sempre, Edna e Eléxio.

Meus eternos agradecimentos!

## Toxicidade do Herbicida Glifosato em *Daphnia magna* e pós-larvas de *Rhamdia quelen*

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade de *Daphnia magna* cultivada em larga escala e pós-larvas do jundiá (*Rhamdia quelen*) ao herbicida Glifosato e a substâncias de referência. Foram utilizadas dáfrias com idade de 2 a 26 horas de vida, provenientes de matrizes cultivadas em larga escala. Foram realizados seis ensaios de sensibilidade que foram compostos por sete tratamentos e três réplicas, nas concentrações de 0; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 e 1,2 mg.L<sup>-1</sup> de dicromato de potássio, com duração de 24 horas. E os testes de toxicidade aguda, com sulfato de cobre nas concentrações de 0; 0,01; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,10 mg.L<sup>-1</sup>, e para o glifosato as concentrações de 0; 11; 21; 31; 41 e 51 µg.L<sup>-1</sup>, com três e duas réplicas respectivamente, e duração de 48 horas. Já as pós-larvas de jundiá foram expostas às concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de glifosato, por 96 horas. Cada réplica era composta de um frasco com 10 indivíduos. No teste de toxicidade crônica, as dáfrias foram expostas as concentrações de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 µg.L<sup>-1</sup> de glifosato, com 10 réplicas, sendo uma dáfria por réplica, avaliando a sobrevivência e fecundidade em 21 dias. Para os experimentos de toxicidade aguda foi calculada mortalidade através da Concentração Efetiva Mediana (CE<sub>50</sub>) em cada teste. A média da CE<sub>50</sub> para a *D. magna* com dicromato de potássio foi de 0,57 mg.L<sup>-1</sup>. O valor de toxicidade aguda para o sulfato de cobre foi alcançado na concentração de 0,034 mg.L<sup>-1</sup>. Já para o glifosato a CE<sub>50</sub> de 32 µg.L<sup>-1</sup> é tóxica para a espécie. No teste crônico, a alta taxa de mortalidade possivelmente é resultado das condições desfavoráveis no cultivo das matrizes em larga escala, o que prejudicou sua resistência. Para o *R. quelen* a CE<sub>50</sub> alcançada foi em 0,9 mg.L<sup>-1</sup>. Os resultados demonstraram que organismos da espécie *D. magna* cultivadas em larga escala podem ser utilizados em testes de toxicidade aguda, mas não em testes de toxicidade crônica, para a avaliação da qualidade da água.

**Palavras-chave:** Biomonitoramento. Ecotoxicologia. Ecotoxicidade. Qualidade da Água. Sensibilidade.

Toxicity of Glyphosate Herbicide on *Daphnia magna* and post larvae of  
*Rhamdia quelen*

**ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate the toxicity to *Daphnia magna* cultivated on a large scale and post-larvae of jundia (*Rhamdia quelen*) to Glyphosate herbicide and the reference substances. Were used daphnia with age between 2 and 26 hours of life, from large scale cultured arrays. There were performed six sensitivity assays that were composed of seven treatments and three replica, at concentrations of 0; 0.1; 0.3; 0.5; 0.7; 0.9 and 1.2 mg.L<sup>-1</sup> of potassium dichromate, with 24 hours duration. The acute toxicity assays, with copper sulfate at concentrations of 0; 0.01; 0.025; 0.05; 0.075 and 0.10 mg.L<sup>-1</sup>, and to the glyphosate concentrations of 0; 11; 21; 31; 41 and 51 µg.L<sup>-1</sup>, with three and two replica respectively, and 48 hours duration. However the post-larvae of jundia were exposed to concentrations of 0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 and 2.5 mg.L<sup>-1</sup> of glyphosate, per 96 hours. Each replica was composed of a bottle with 10 individuals. The chronic toxicity test, the daphnia were exposed to concentrations of 0, 2, 4, 6, 8 and 10 µg.L<sup>-1</sup> of glyphosate, with 10 replica, being a daphnia per replica, evaluating the survival and fecundity in 21 days. For acute toxicity assays, was calculated mortality using the Median Effective Concentration (EC<sub>50</sub>) in each test. The mean EC<sub>50</sub> for *D. magna* with potassium dichromate was 0.57 mg.L<sup>-1</sup>. The value of acute toxicity for copper sulphate was reached at a concentration of 0.034 mg.L<sup>-1</sup>. And for the glyphosate the EC<sub>50</sub> of 32 µg.L<sup>-1</sup> is toxic for the species. The chronic assay showed high rate of mortality, possibly the result of unfavourable conditions for the large scale cultivation of arrays, hurt his endurance. For the *R. quelen* the EC<sub>50</sub> was achieved at 0.9 mg. L<sup>-1</sup>. The results showed that organisms of the species *D. magna* cultivated on a large scale can be used in acute toxicity tests, but not in chronic toxicity testing, for the assessment of water quality.

Keywords: Biomonitoring. Ecotoxicology. Ecotoxicity. Water Quality. Sensitivity.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica *Brazilian Journal of Biology*. Disponível em: <<http://www.scielo.br/revistas/bjb/iinstruc.htm>>



## SUMÁRIO

Introdução .....	9
Objetivos .....	11
Objetivo Geral .....	11
Objetivos Específicos .....	11
Revisão Bibliográfica.....	12
Ecotoxicologia.....	12
Glifosato no Ambiente .....	14
<i>Daphnia magna</i> .....	15
<i>Rhamdia quelen</i> .....	16
Material e Métodos .....	18
Cultivo de <i>D. magna</i> .....	18
Ensaio de sensibilidade da <i>D. magna</i> .....	19
Ensaio de toxicidade aguda de <i>D. magna</i> ao Sulfato de Cobre.....	20
Ensaio de toxicidade aguda de <i>D. magna</i> ao Glifosato.....	20
Ensaio de toxicidade crônica com <i>D. magna</i> ao Glifosato.....	20
Ensaio de Toxicidade aguda com <i>R. quelen</i> ao Glifosato .....	21
Análise estatística.....	22
Resultados .....	23
Teste de sensibilidade com <i>D. magna</i> .....	23
Toxicidade aguda do sulfato de cobre em <i>D. magna</i> .....	24
Toxicidade aguda do Glifosato em <i>D. magna</i> .....	24
Toxicidade crônica do Glifosato em <i>D. magna</i> .....	25
Toxicidade aguda do Glifosato em <i>R. quelen</i> .....	26
Discussão.....	28
Conclusões .....	33
Referências Bibliográficas .....	34

## Introdução

As recentes alterações climáticas na Terra criaram um alerta para um problema que vem crescendo e se agravando há muitos anos, pois desde a revolução industrial com crescimento intensivo das cidades, a humanidade tem causado grandes mudanças no ambiente natural, gerando poluição e lançando resíduos indiscriminadamente, no ambiente e nos corpos d'água.

Ao longo do tempo essas substâncias lançadas e produzidas pelas atividades antrópicas, se mostraram perigosas para a saúde dos seres vivos (Truhaut, 1977), pois podem apresentar efeitos bioacumulativos, podendo interagir com os organismos e causar alterações (Arias *et al.*, 2007). Muitas vezes as reações dos indivíduos às substâncias nocivas, ocorrem desde o nível celular. Essas mudanças podem ocorrer quando a concentração desses compostos é baixa, e não detectável em análises químicas (Knie e Lopes, 2004), que ao longo do tempo vão se acumulando e prejudicando o metabolismo do indivíduo, até que ele apresente uma resposta corporal visível.

Os defensivos agrícolas, por exemplo, foram desenvolvidos para controlar ou eliminar alguma forma de vida indesejada e aumentar a produtividade, porém têm se mostrado prejudicial a espécies não-alvo, além de persistirem no ambiente por longos períodos de tempo (Fracacio, 2006). Alguns trabalhos têm mostrado que a exposição ao glifosato, um dos herbicidas mais utilizados no mundo, causa o efeito de um disruptor endócrino (Walsh *et al.*, 2000) inibindo a produção de hormônios, como os de crescimento, em peixes (El-Shebly e El-kady, 2008).

Outras substâncias também tem se mostrado prejudiciais aos organismos aquáticos. O sulfato de cobre, por exemplo, tem sido amplamente utilizado na aquicultura como algicida, e para controle de parasitas e enfermidades causadas por bactérias (Genovez *et al.*, 2008) porém, pode se tornar tóxico em elevadas concentrações.

Portanto, para determinar melhor o uso e aplicação de substâncias, prevenir perda da diversidade biológica e garantir a sanidade dos organismos aquáticos, existe a necessidade de desenvolver novas metodologias de controle, diagnóstico e manejo dos recursos hídricos (Buss, 2003). Para isso são feitas avaliações utilizando os parâmetros biológicos, juntamente com os métodos clássicos de análise dos compostos físicos e químicos. E pelo fato de os corpos d'água serem o principal destino da emissão de efluentes, seja ele através da descarga direta, emitidos pelo ar que chega pela chuva ou aqueles depositados no solo, os testes de ecotoxicidade de organismos aquáticos são de suma importância (Costa *et al.*, 2008).

Entre essas novas metodologias, podemos citar os testes de ecotoxicidade, que são fundamentais quando se busca a proteção dos organismos nos ecossistemas e tem por objetivo determinar o potencial de risco ambiental dos contaminantes (Costa *et al.*, 2008) permitindo avaliar os efeitos e a resistência dos organismos aquáticos à agentes químicos e físicos (Magalhães e Ferrão-Filho, 2008).

E para que estes testes alcancem seu objetivo, as metodologias conhecidas exigem alguns requisitos básicos no cultivo dos indivíduos. Para Knie e Lopes (2005), as condições da água não podem submeter os organismos a um estresse fisiológico, para que o resultado dos testes esteja exclusivamente ligado à substância a qual está sendo exposto.

Não foram encontrados trabalhos que elucidem os efeitos da exposição crônica do glifosato sobre a *Daphnia magna*, tanto que não está bem especificado no Brasil os procedimentos ideais para realização desse tipo de teste com a espécie. E também trabalhos com peixes em suas primeiras fases de desenvolvimento são escassos.

## **Objetivos**

### **Objetivo Geral**

Determinar a toxicidade do herbicida glifosato para a *Daphnia magna* e para pós-larvas de jundiá *Rhamdia quelen*.

### **Objetivos Específicos**

Determinar a toxicidade aguda do herbicida glifosato e do sulfato de cobre para o microcrustáceo *Daphnia magna*.

Determinar a toxicidade aguda do herbicida glifosato para pós-larvas do peixe *Rhamdia quelen*.

Avaliar a toxicidade crônica do glifosato sobre *D. magna*, verificando o efeito de concentrações sub-letais sob a fertilidade.

Testar a viabilidade do uso de *D. magna* cultivadas em sistema de larga escala, para realização de testes de toxicidade.

## Revisão Bibliográfica

### Ecotoxicologia

As atividades antrópicas nos últimos anos contribuíram gradativamente para a degradação dos ecossistemas aquáticos, principalmente com as atividades de mineração agricultura, construção de represas, eutrofização artificial, entre outros (Callisto *et al.*, 2001). Esse impacto têm gerado problemas, principalmente em ambientes lênticos, pois compromete não somente a biota aquática, como o abastecimento de água (Figueiredo *et al.*, 2007).

A partir do desenvolvimento de estudos de avaliação limnológica, foi possível estudar os efeitos dos poluentes químicos no ecossistema (Truhaut, 1977), para controlar esses problemas. Isso facilitou uma melhor compreensão do funcionamento e da forma de organização de cada ambiente aquático, sua dinâmica e as inter-relações com a biota, e permitiu estabelecer ações de manejo, tanto dos recursos hídricos, quanto dos pesqueiros (Calheiros e Ferreiro, 1997).

Dentre as formas mais comuns de avaliação da qualidade da água estão os testes físicos, químicos e bacteriológicos (Bieger *et al.*, 2010), que são úteis para a classificação do meio aquático. Porém, Terra *et al.* (2008a, 2008b) afirmam que essas técnicas muitas vezes não detectam algumas substâncias que podem ser prejudiciais para os organismos aquáticos, ou apenas quantificam esses poluentes, mas não seus efeitos na biota (Fracacio *et al.*, 2009). Ou ainda algumas das metodologias exigem mão-de-obra especializada e alto custo operacional, como de cromatografia e espectrometria (Alves e Oliveira-Filho, 2003).

Segundo Arias *et al.* (2007) essas metodologias bacteriológicas tradicionais, são deficientes na avaliação da qualidade estética, recreacional e ecológica do ambiente, e nem sempre são capazes de detectar perturbações sutis sobre o ecossistema.

Uma das ferramentas desenvolvidas como alternativa são os índices bióticos, que são uma expressão numérica que combina uma medida quantitativa da diversidade de espécies, com uma informação qualitativa da sensibilidade ecológica das comunidades aquáticas (Czerniawska-Kuzka, 2005). Dentre os índices mais conhecidos e utilizados estão o “Biological Monitoring Working Party” – BMWP (Armitage *et al.*, 1983) e o “Family Biotic Index” – FBI (Hilsenhoff, 1987), que se baseiam na composição de macroinvertebrados bentônicos.

No entanto, a aplicação desses índices não tem precisão, pois são baseados em pontuações bastante subjetivas, e quando aplicado em ambientes naturais ou alterados, que não seja aquele para que foram desenvolvidos, é necessário uma adaptação (Czerniawska-

Kuzka, 2005). Além do mais, não são conhecidos os limites de tolerância dos macroinvertebrados, ou seja, a faixa ótima para o organismo sobreviver, crescer e se reproduzir, além de que a sensibilidade dos organismos pode mudar de acordo com as condições ambientais a que estão expostos (Magalhães e Ferrão-Filho, 2008), dificultando a determinação com precisão da qualidade da água

Entretanto, outro método de biomonitoramento tem se mostrado mais eficiente, por expor comunidades aquáticas aos poluentes e avaliar os efeitos na sua saúde (Van Dyk, 2003). Esse método é aplicado através de testes ecotoxicológicos, para classificar a capacidade do meio ambiente para preservar a vida aquática e a saúde humana, e têm se mostrado essenciais para avaliar a qualidade do meio ambiente (Terra *et al.*, 2008b).

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos adversos que agentes físicos e químicos produzem em organismos vivos, sob condições específicas de exposição, e investiga fatores de risco das substâncias no ambiente (Williams *et al.*, 2000). O uso de parâmetros biológicos para medir a qualidade da água se baseia nas respostas dos organismos em relação ao meio onde vivem (Buss *et al.*, 2003), pois estes simulam o ambiente natural a fim de detectar alterações no desenvolvimento normal dos seres vivos (Terra e Feiden, 2008).

A resposta dos testes de toxicidade aguda é descrita na forma de concentração letal (CL), onde a medida da resposta é a mortalidade, e a partir da determinação de uma curva de dose-resposta é possível identificar doses que afetam uma percentagem específica da população exposta (Williams *et al.*, 2000).

No entanto, nem sempre as concentrações das substâncias são suficientes para causar mortalidade em curto prazo, pois, segundo Van Dyk (2003) antes que apareçam mudanças significativas externamente, elas já podem estar evidentes a nível celular e tecidual. Como demonstra Cavalcante *et al.* (2008), quando observaram danos às células branquiais e aos eritrócitos, em curimatá exposto ao Roundup®, e também Shiogiri *et al.* (2012) constataram severos danos ao fígado de pacu, expostos a mesma substância, causando redução de sua função.

Tendo em vista a necessidade de determinar os efeitos sutis, como anomalias morfológicas, redução do crescimento e reprodução, que uma determinada substância pode causar (USEPA, 2007), os testes da toxicidade crônica, que utilizam a exposição dos organismos a concentrações sub-letais para quantificar seu potencial tóxico, também são usados como ferramenta.



O glifosato tem sido apontado como responsável pela redução da atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase, além de aumentar lipoperoxidação em uma espécie de crustáceo (Dutra *et al.*, 2011), afeta a estrutura e funcionamento do fígado (Edge *et al.*, 2011) e o transporte intracelular em sapos (Hedberg e Wallin, 2010)

Alguns trabalhos têm mostrado que o glifosato é apontado como disruptor endócrino (Walsh *et al.*, 2000), inibindo a produção de hormônios do crescimento em peixes (El-Shebly e El-kady, 2008), além de causar hemorragia, necrose hepática e congestão renal (Albinati *et al.*, 2009), podendo causar até efeitos genotóxicos (Cavalcante *et al.*, 2008; Guilherme *et al.*, 2012).

### ***Daphnia magna***

Diversos organismos podem ser utilizados como objeto de pesquisa em ecotoxicidade, o importante é que se tenha um grande conhecimento sobre o funcionamento do ecossistema, a biologia e fisiologia das espécies envolvidas, facilidade de coleta e manutenção em laboratório (Baptista, 2008).

Segundo Capoleti (2005) os organismos mais indicados para este fim devem apresentar as características favoráveis como distribuição cosmopolita, fácil amostragem, mobilidade limitada, baixa variabilidade genética e ecológica, diversidade taxonômica e fácil identificação e cultivo em laboratório, com custos relativamente baixos para sua manutenção e sensíveis a diferentes concentrações de poluentes no meio, fornecendo ampla faixa de respostas frente a diferentes níveis de contaminação ambiental. Nessa classificação se encaixam bactérias, algas, insetos aquáticos, macroinvertebrados bentônicos, microcrustáceos e algumas espécies de peixes.

Os cladóceros têm emergido como grupo padronizado para testes toxicológicos, segundo Mark e Soble (1998) e Scholten *et al.* (2005) as dáfrias são úteis nos testes por atenderem aos requisitos acima descritos e cumprem um papel fundamental nas cadeias alimentares de água doce; além disso, a reprodução é normalmente partenogenética, permitindo baixa variabilidade genética; têm um ciclo de vida curto e podem ser testadas em sistemas de ensaio de pequeno volume.

A biologia de *Daphnia magna* já foi amplamente estudada, segundo Ruppert e Barnes (1996), é um organismo planctônico, classificado taxonomicamente no filo Arthropoda, subfilo Crustacea, classe Branchiopoda, ordem Diplostraca, subordem Cladocera, família Daphnidae. Popularmente conhecida como pulga-d'água, apresenta tamanho médio de 5 a 6



mm, alcança a maturidade sexual de 6 a 8 dias e após o nascimento, tem um ciclo de vida de aproximadamente 60 dias, que pode variar de acordo com a temperatura (Dang *et al.*, 2012).

É um consumidor primário da cadeia trófica e alimenta-se da coleta de partículas em suspensão, pelas suas cerdas filtradoras presentes nos apêndices do tronco, que são também responsáveis pelas trocas gasosas (Ruppert e Barnes, 1996). De acordo estes, a natação é feita pela movimentação do segundo par de antenas, sendo que o movimento é predominantemente vertical e desajeitado, que propole o animal para cima; depois ele afunda lentamente, utilizando as antenas como um pára-quedas.

Devido a sua característica partenogenética, os ovos são diplóides, produzidos em sacos dentro da câmara incubatória dorsal e o desenvolvimento é direto. Porém, condições ambientais desfavoráveis podem causar a produção de machos haplóides e em seguida a produção de ovos fertilizados, que são envolvidos por uma cápsula protetora e são chamados efípios. Eles podem suportar diferentes condições e só eclodir quando for favorável ao seu desenvolvimento (Ruppert e Barnes, 1996).

Por apresentar essas características a *Daphnia magna* (Straus, 1820) têm sido amplamente utilizada, há muitos anos, como organismo padrão em aplicação de bioensaios de toxicidade aguda e crônica, para identificar contaminação do meio aquático (Martins *et al.*, 2007).

### ***Rhamdia quelen***

Testes com algumas espécies de peixes já são padronizados, como o *Danio rerio*, *Pimephales promelas*, *Oncorhynchus mykiss* e *Salvelinus fontinalis*, por apresentarem relativa sensibilidade, biologia e comportamento bem conhecida. Contudo, é necessário também conhecer os efeitos das substâncias tóxicas em espécies nativas brasileiras, para identificação de fontes de contaminação ambiental e melhor compreensão das condições das bacias hidrográficas locais.

O *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824), mais conhecido como jundiá, é um bagre de água doce, que está presente em bacias hidrográficas que se estendem desde o sudeste do México até o centro da Argentina (Zaniboni Filho, 2004). Esta espécie pertence à classe Osteichthyes, ordem Siluriformes e família Heptapteridae (Nakatani *et al.*, 2003).

A espécie pode medir até 50 cm e pesar 3 Kg (Gomes *et al.*, 2000), apresenta cabeça pequena em relação ao comprimento, sua coloração varia do cinza oliva ou negro com manchas escuras e irregulares e as nadadeiras são cinza (Baldisserotto e Randuz-Neto, 2010).

Apresentam comportamento preferencialmente bentônico e hábitos onívoros, a maturidade sexual é atingida por volta de um ano de idade em machos e fêmeas (Gomes et al., 2000).

A espécie foi escolhida como objeto de estudo por ser de grande interesse para a piscicultura da Região Sul do Brasil, por seu crescimento acelerado, inclusive nos meses mais frios (Maffezzolli e Nuñez, 2006). Esta espécie possui importância não só econômica, mas também ecológica (Miron *et al.*, 2008) em função de uma estratégia alimentar generalista (Kütter *et al.*, 2009).

Pós-larvas de peixes geralmente são mais sensíveis do que organismos adultos, representando melhor o risco de exposição a um poluente na sobrevivência e dispersão da espécie no ambiente. Tal condição que já foi relatado por Barrera (2013) ao expor larvas e adultos de jundiá à nano partículas de prata, as primeiras demonstraram maior mortalidade e deformidades, enquanto que os adultos apresentaram danos histopatológicos.

Grande parte dos tanques de cultivo de peixes no Brasil está localizado muito próximo a áreas de plantações agrícolas, facilitando a entrada dos defensivos agrícolas, utilizado nas culturas, nos corpos d'água. Assim os peixes estão diretamente sujeitos ao contato e ingestão de substâncias tóxicas, e como esses peixes são comercializados, podem estar vindo contaminados para a mesa do consumidor.

## Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Ecotoxicologia e Biomanipulação (LEB) situado no Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (InPAA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste).

### Cultivo de *D. magna*

O material e a metodologia utilizada para o cultivo e aplicação do teste de toxicidade aguda, seguiram as recomendações estabelecidas nas normas da ABNT NBR 12713 (2004, modificado).

As dáfrias foram provenientes do Laboratório de Planctologia localizado no InPAA, onde estavam mantidas em berçários de polietileno branco, de forma circular e côncavos de capacidade 20L, interligados a um filtro biológico e cultivadas em sistema fechado. Os indivíduos foram alimentados diariamente com a alga unicelular *Scenedesmus acuminatus*, cultivadas no Laboratório de Ficologia do InPAA.

Para caracterização da água foi utilizado um medidor multiparâmetro YSI Professional, para medição de temperatura (°C), oxigênio dissolvido ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) e pH, além de testes de dureza ( $\text{mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$ ) e alcalinidade ( $\text{mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$ ) realizado pelo laboratório de limnologia do Instituto Ambiental do Paraná (IAP).

Para realização dos testes, tanto agudo quanto crônico, no dia anterior cerca de 30 dáfrias adultas que apresentavam ovos na bolsa incubatória, provenientes do sistema de cultivo, foram transferidas para recipientes com capacidade de 2L de água de cultivo (Tabela 1). Essas matrizes foram mantidas em estufa incubadora tipo B.O.D (Biochemical Oxygen Demand) utilizando fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 de escuro e temperatura de  $20\pm 2^\circ\text{C}$ , para postura dos ovos, pois os neonatos a serem utilizados nos testes deveriam ter entre 2 a 26 horas de vida, e também para que estes não passassem por estresse e já nascessem nas condições ambientais à que iam ser submetidos durante os testes (ABNT NBR 12713, 2004).

As águas de cultivo e de diluição foram preparadas a partir da composição das soluções-estoque apresentadas na Tabela 1, utilizando os volumes necessários para cada uma.

Tabela 1 – Composição das soluções-estoque e volume para preparo de 1 litro de água de cultivo e água de diluição (ABNT, 2004).

Solução estoque	Reagente	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Água de Cultivo (mL)	Água de Diluição (mL)
1	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	73500	3,2	3,2
2	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	123300	0,8	0,8
3	KCl	5800	0,8	0,8
4	NaHCO <sub>3</sub>	64800	0,8	0,8
	MnCl.4H <sub>2</sub> O	7210		
	LiCl	6120		
5	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	335	0,1	-
	ZnCl	260		
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	200		
	NaNO <sub>3</sub>	548		
6	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5719	0,5	-
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	126		
	KI	6,5		
7	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	21475	0,2	-
8	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	500	5	-
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	199		
9	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	286	0,5	-
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	368		

No dia seguinte, os neonatos foram separados das matrizes, que foram retiradas com uma peneira de malha 1mm e em seguida com um de filtro de nylon de 500µm, foram capturados os neonatos. Estes então foram transferidos para uma bandeja, com o auxílio de um pissete contendo água de diluição (Tabela 1), onde foram mantidos por 2 horas para retirada dos indivíduos debilitados.

Para realização dos testes de sensibilidade e toxicidade a aguda foi utilizada água de diluição, que foi preparada 24 horas antes da realização dos testes, período em que foi mantida com aeração constante para saturação de oxigênio dissolvido e estabilização do pH, que foram medidos antes e após os testes para validade dos ensaios.

### **Ensaio de sensibilidade da *D. magna***

A ABNT recomenda que a princípio seja realizado um teste preliminar, garantindo que os neonatos estejam em condições aceitáveis de sensibilidade, e sejam considerados viáveis para uso em testes de toxicidade.

Para realização desses testes foi preparada uma solução-estoque de dicromato de potássio (Synth®; L: 128709) com concentração de 100mg.L<sup>-1</sup>. A partir desta foram feitas as diluições em balão volumétrico. As concentrações utilizadas foram de 0; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 e 1,2 mg.L<sup>-1</sup> e o volume foi completado para 100mL com água de diluição. Foram utilizados

30 neonatos para cada diluição, distribuídos em três réplicas. Os frascos foram cobertos com filme de pvc, para evitar contaminação externa, entrada de poeira e evaporação da água, e então mantidas por 24h em estufa incubadora tipo B.O.D., com temperatura controlada de 20°C e sem iluminação. Após 24 horas, foi feita a contagem do número de indivíduos imóveis em cada solução-teste, com o auxílio de uma lupa de mesa com lâmpada acoplada.

Esse teste foi repetido mensalmente por 6 meses, pois a estabilidade da cultura é importante para a confiabilidade dos resultados. Para isso, após 5 resultados foi calculada a média e desvio padrão ( $\sigma$ ), e a partir desse valor, o teste seguinte deveria estar compreendido num intervalo de  $\pm 2 \sigma$  em relação à média anterior (ABNT, 2004).

Após obtenção desses resultados foram aplicados testes de toxicidade, que seguiram o mesmo procedimento de preparação do teste de sensibilidade, e foram realizadas duas leituras dos resultados, uma vez após 24 horas e outra após 48 horas de exposição.

### **Ensaio de toxicidade aguda de *D. magna* ao Sulfato de Cobre**

Devido ao fato de ser um metal pesado muito encontrado no ambiente, o sulfato de cobre (Vetec®; L: 0706632) é amplamente utilizado como substância de referência para padronização de testes de sensibilidade e toxicidade aguda da *D. magna*, segundo a ABNT. Por isso foi realizado um teste preliminar com essa substância, antes de utilizar o glifosato.

Assim, o mesmo procedimento foi seguido para elaboração do teste com o sulfato de cobre. Foi preparada uma solução-estoque de  $10\text{mg.L}^{-1}$ , a partir da qual foram preparados cinco tratamentos nas concentrações de 0,01; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,10  $\text{mg.L}^{-1}$  e três repetições cada, além de um grupo controle.

### **Ensaio de toxicidade aguda de *D. magna* ao Glifosato**

Para o teste com defensivo agrícola foi utilizado o produto Glifosato Biocarb® 48% (Sal isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina -  $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$ ), o delineamento foi inteiramente casualizado composto por cinco tratamentos nas concentrações de 11, 21, 31, 41, 51  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de glifosato, mais um grupo controle com duas repetições cada, pois no dia do procedimento as matrizes não produziram neonatos suficientes para fazer um número maior de repetições.

### **Ensaio de toxicidade crônica com *D. magna* ao Glifosato**

Como a ABNT não possui norma específica para testes de toxicidade crônica com a *D. magna*, para realização desse teste foi utilizada a metodologia descrita na OECD 211 (2012).

O princípio do teste se baseia na avaliação dos efeitos dos químicos na sobrevivência e fertilidade da dáfnia, por um período máximo de 21 dias.

A partir dos resultados da toxicidade aguda, é que foram estipuladas as concentrações a serem aplicadas no teste crônico. Essas foram preparadas em balão volumétrico nas concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ , mais um grupo controle, e utilizou-se a água de cultivo (Tabela 1) como diluente. Cada concentração constituiu de 10 réplicas, dispoendo 10 organismos individualmente em frascos com 100 ml de solução, considerando a unidade experimental como 1 dáfnia por frasco.

Os recipientes foram cobertos com filme de pvc, para evitar contaminação externa e evaporação da amostra e mantidos por 21 dias em estufa tipo B.O.D, com temperatura controlada de 21°C e fotoperíodo de 16 horas de luz. As dáfrias foram alimentadas diariamente com alga *Scenedesmus acuminatus* a um proporção de 10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup>.

Os organismos eram monitorados três vezes por semana, quando eram contados e removidos as neonatas produzidas e dáfrias mortas, posteriormente era realizada a troca da água, em que as dáfrias eram retiradas cuidadosamente com um coletor de microcrustáceos e transferidas para um novo recipiente com a mesma diluição e temperatura, caracterizando um sistema semi-estático.

A fecundidade foi avaliada pela contagem dos neonatos gerados pelas fêmeas no período de 21 dias. Como parâmetro foi utilizada a média de filhotes gerados por fêmea, considerando o número de posturas ao longo do teste. A sobrevivência foi calculada com base no numero de dáfrias sobreviventes após o período experimental.

### **Ensaio de Toxicidade aguda com *R. quelen* ao Glifosato**

O teste de toxicidade aguda com o *R. quelen* foi adaptado com base na norma USEPA (2002) e na OECD 203 (1992).

Os peixes com um dia de vida, foram adquiridos de uma estação de piscicultura comercial e transportados em saco plástico com oxigênio até o InPAA. Em seguida foram aclimatados e transferidos para um tanque de 100 L, a água foi proveniente de poço artesiano, com aeração artificial e alimentados *ad libitum* com ração comercial farelada, até a aplicação dos testes.

Quando os peixes atingiram 14 dias de idade, foi preparado o teste, que foi constituído de um delineamento experimental inteiramente casualizado composto de cinco tratamentos, através da adição de glifosato nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg.L<sup>-1</sup> além de um grupo controle, com três réplicas cada, em béqueres com 500ml de solução final, completados

com água de poço artesiano. Foi considerado como unidade experimental um béquer de 500ml de solução com 10 peixes cada.

Os frascos foram mantidos em câmara tipo B.O.D. por um período de 96h. O fotoperíodo foi de 12 horas de luz, temperatura de 23°C. O pH e o oxigênio dissolvido foram medidos ao início do teste e também após decorridas 48 e 96 horas, período em que foram contados também o número de indivíduos mortos. Os peixes não foram alimentados durante o período do teste.

### **Análise estatística**

Para análise dos resultados de toxicidade aguda com a *D. magna*, foram seguidas as recomendações da USEPA (2002). Após a contagem dos indivíduos imóveis, foram calculados os valores de Concentração Efetiva Mediana (CE<sub>50</sub>), ou seja, a concentração que causa efeito agudo (morte ou imobilidade) a 50% dos organismos durante o tempo de exposição (24 ou 48h), e com um intervalo de confiança de 95%, que foi determinada utilizando-se os métodos EPA Probit 1.5 e Trimmed Sperman Karber 1.5 (Hamilton *et al.*, 1977), considerado se os dados foram paramétricos ou não paramétricos, respectivamente. As mesmas recomendações foram utilizadas para o ensaio com o *R. quelen* (48 e 96h de exposição).

Para avaliar a toxicidade crônica, os resultados de fecundidade e sobrevivência, foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), seguido de um teste de comparação de médias Dunnett ambas pelo programa Statistica 7.0.

## Resultados

### Teste de sensibilidade com *D. magna*

Observa-se que a média e o desvio padrão dos parâmetros de qualidade da água dos ensaios (Tabela 2) permaneceram dentro dos limites aceitáveis para confiança nos resultados conforme ABNT (2004).

Tabela 2 – Média e desvio-padrão dos parâmetros ambientais medidos no início e ao final dos ensaios.

	Início	Final
Temperatura (°C)	21±1,5	20±0,6
pH	8,1±0,2	8,2±0,3
Oxigênio Dissolvido (mg.L <sup>-1</sup> )	4,2±0,4	3,2±0,3
Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )	41	-
Dureza (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )	227	-

Os valores da CE<sub>50-24 h</sub> dos testes de sensibilidade aguda com dicromato de potássio, estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Valores médios CE<sub>50-24 h</sub> e intervalo de confiança, calculados para teste de toxicidade aguda ao dicromato de potássio, juntamente com a média geral ( $\bar{x}$ ), desvio-padrão ( $\sigma$ ) e coeficiente de variação (C.V.).

	CE <sub>50-24h</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	Intervalo de Confiança (95%)
Teste 1	0,71	0,65 - 0,77
Teste 2	0,62	0,49 - 0,77
Teste 3	0,49	0,39 - 0,58
Teste 4	0,52	0,43 - 0,60
Teste 5	0,43	0,34 - 0,50
Teste 6	0,62	0,52 - 0,74
$\bar{x}$	0,57	-
$\sigma$	0,10	-
C.V. (%)	18,21	-

O pressuposto de confiabilidade dos resultados dos testes de sensibilidade foi alcançado, conforme exigências da ABNT (2004), pois a média obtida no teste 6 ficou compreendida no intervalo de confiança dos testes anteriores.



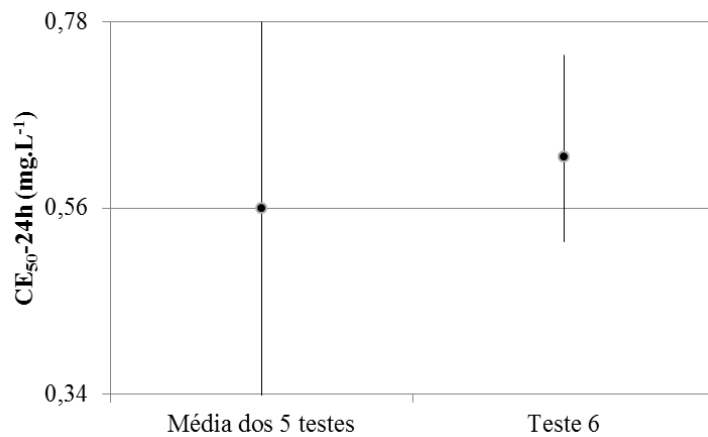


Figura 2 –  $CE_{50-24h}$  no 6º teste, compreendida no intervalo de confiança ( $média \pm 2\sigma$ ) da  $CE_{50-24h}$ , nos cinco primeiros testes de sensibilidade de *Daphnia magna* ao dicromato de potássio.

### Toxicidade aguda do sulfato de cobre em *D. magna*

Observou-se que a imobilidade foi diretamente proporcional à concentração de sulfato de cobre na água, e a  $CE_{50-48h}$  encontrada pelo método Probit foi de  $0,034 \text{ mg.L}^{-1}$ , ficou em um intervalo de confiança de 0,016 a 0,041 de sulfato de cobre (Figura 3).

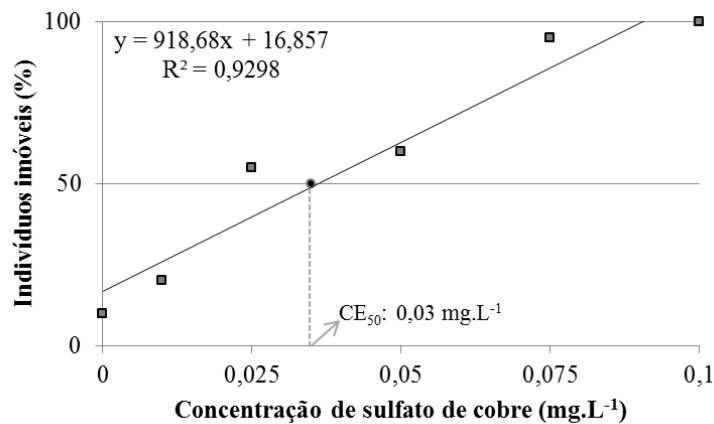


Figura 3 – Imobilidade de *Daphnia magna*, exposta a diferentes concentrações de sulfato de cobre e valor da  $CE_{50}$ .

### Toxicidade aguda do Glifosato em *D. magna*

Observou-se que a imobilidade foi crescendo a medida que aumentou-se a concentração do glifosato. E a  $CE_{50}$ , calculada pelo método Trimmed Sperman Karber, de *D. magna* para o glifosato foi de  $32 \mu\text{g.L}^{-1}$ , com um intervalo de confiança entre 21 e  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

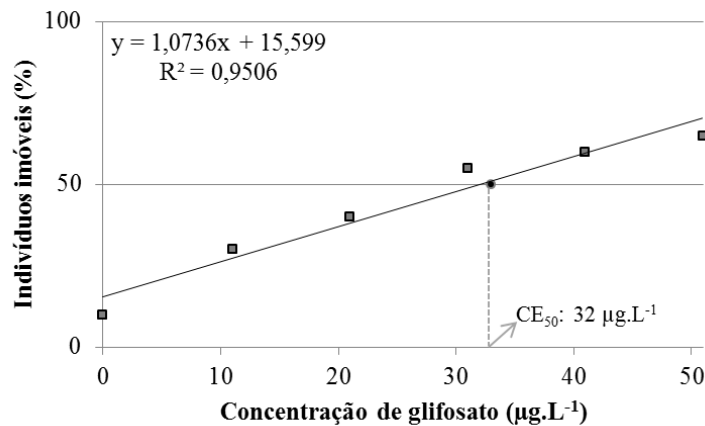


Figura 4 – Imobilidade de *Daphnia magna* quando exposta a diferentes concentrações de Glifosato e valor da  $CE_{50}$ .

### Toxicidade crônica do Glifosato em *D. magna*

Observou-se efeito ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos, em que a concentração de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  apresentou maior fecundidade (Figura 5).

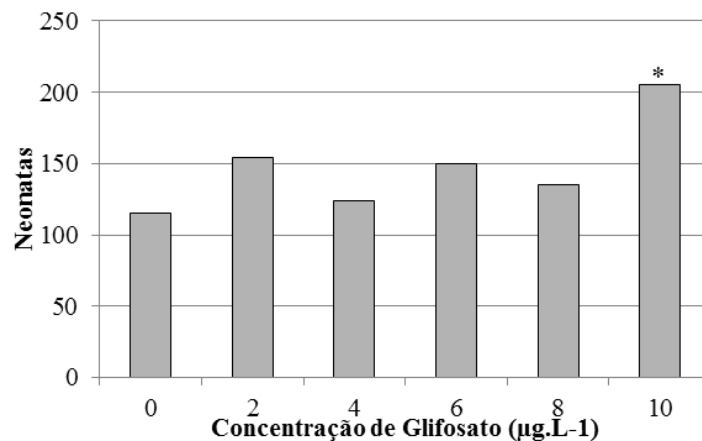


Figura 5 – Número total de neonatas produzidas por tratamento, em 21 dias. \*  $P < 0,05$  pelo teste de Dunnett.

É necessário ressaltar que a fecundidade não seguiu um padrão, em relação a concentração de glifosato, sendo que apenas o tratamento com maior concentração  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ , apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle pelo teste de Dunnett. Porém a média de indivíduos produzidos por fêmea em cada postura, não diferenciou significativamente ( $p=0,13$ ), como mostra a Tabela 4.

Tabela 4 – Média de neonatas produzidas por postura, em cada réplica nos diferentes tratamentos, juntamente com a média geral ( $\bar{x}$ ), desvio padrão ( $\sigma$ ) e coeficiente de variação (C.V.).

Réplicas	Concentração de Glifosato ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )					
	0	2	4	6	8	10
1	7,0	6,0	6,5	6,0	4,0	6,5
2	6,0	6,5	7,5	7,0	6,3	5,5
3	4,0	4,7	4,0	7,0	5,3	5,6
4	5,0	8,0	4,0	7,5	6,3	7,3
5	5,3	6,0	6,0	-	-	9,5
6	11,0	8,5	15,0	5,5	3,3	9,0
7	11,0	7,0	3,0	8,5	-	-
8	7,0	7,0	4,3	3,7	6,6	10,0
9	6,3	5,8	7,5	3,7	-	8,0
10	3,0	7,3	3,7	3,5	4,8	-
$\bar{x}$	6,6	6,7	6,2	5,8	5,2	7,7
$\sigma$	2,7	1,1	3,5	1,9	1,3	1,7
C.V.	40,4	16,9	57,0	31,9	24,0	22,6

O tempo de sobrevivência das dáfias não diferiu significativamente ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos apresentando tempo médio de vida de  $13,7 \pm 0,6$  dias.

### Toxicidade aguda do Glifosato em *R. quelen*

Observa-se que a média e o desvio padrão dos parâmetros de qualidade da água dos ensaios (Tabela 5) permaneceram dentro dos limites aceitáveis para confiança nos resultados conforme a USEPA (2002).

Tabela 5 – Média e desvio-padrão dos parâmetros ambientais medidos no início e ao final dos ensaios.

	Início	Final
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	22	$21 \pm 0,5$
pH	$8,1 \pm 0,2$	$8,2 \pm 0,3$
Oxigênio Dissolvido ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	$4,6 \pm 0,2$	$4,4 \pm 0,2$
Alcalinidade ( $\text{mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$ )	77	-
Dureza ( $\text{mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$ )	181	-

Foi verificado que o valor da  $\text{CE}_{50}$  foi menor após as 96h, mostrando que a toxicidade ao glifosato aumenta ao longo do tempo (Figura 7).

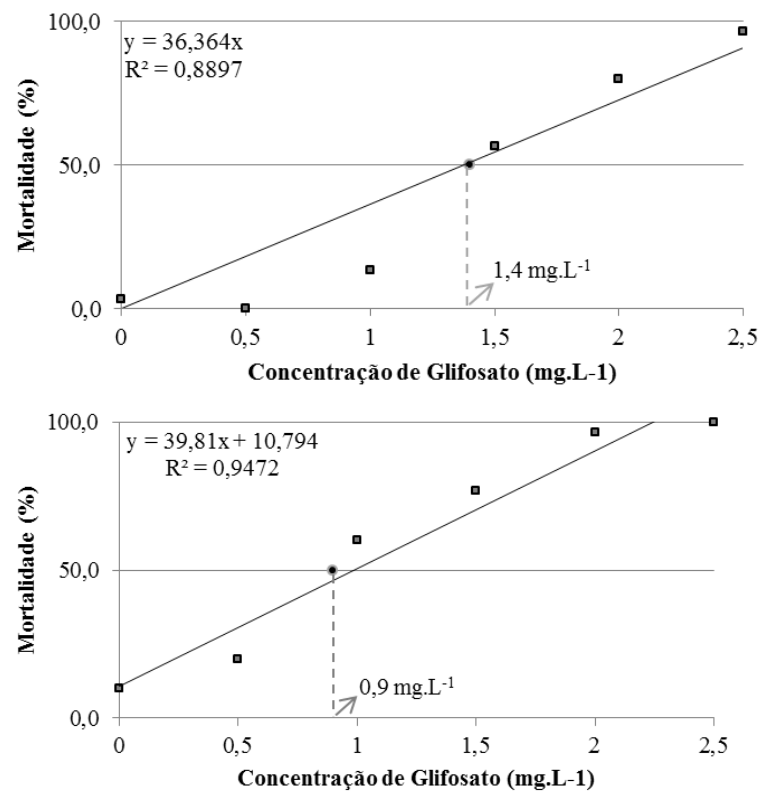


Figura 7 – Porcentagem de mortalidade de *R. quelen* quando exposto a diferentes concentrações de Glifosato e valor da CE<sub>50</sub> após 48 (A) e 96 horas (B).

## Discussão

De acordo com a USEPA (2000), para garantia de precisão dos resultados da  $CE_{50}$  o coeficiente de variação deve ser menor que 40%. Assim, o resultado obtido permaneceu dentro desse limite estabelecido.

Os valores obtidos de sensibilidade para o dicromato de potássio estão acima dos encontrados por Sorvari e Sillanpaa (1996), cujas dáfnias apresentaram a sensibilidade em  $0,37 \text{ mg.L}^{-1}$  e Arauco (2002) que encontrou sensibilidade em média de  $0,09 \text{ mg.L}^{-1}$ . Porém as dáfnias foram mais sensíveis se comparadas a sensibilidade obtido por Beatrici *et al.* (2006) que foi de  $0,86 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Essas diferenças nos valores de sensibilidade podem estar relacionadas à composição do meio de cultivo a que as dáfnias foram submetidas, pois a ausência de alguns elementos-traço podem provocar sintomas de carência a longo prazo (Knie e Lopes, 2004), o que pode causar uma variabilidade nos resultados.

Além disso, temperatura e a dureza da água podem influenciar diretamente na fertilidade, e conseqüentemente, nos resultados de toxicidade dos organismos (Lewis e Maki 1981; Persoone *et al.*, 1989). Isso é corroborado ao comparar os resultados de Beatrici *et al.* (2006) e Arauco (2002) que realizaram um cultivo em água dura ( $250 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ ) e água mole ( $40 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ ), respectivamente. Por se tratar de um microcrustáceo esse elemento é essencial para a dáfnia, para a formação da sua carapaça.

Outro fator que pode afetar a sensibilidade foi descrito por Enserink *et al.* (1990), onde evidenciam que a nutrição das matrizes também pode interferir na taxa de reprodução, quantidade de neonatos por ninhada e tamanho de cada neonato. Esses fatores vão acarretar em uma má qualidade na prole, com neonatas de saúde debilitada com baixa resistência a ambiente tóxico.

Ao longo dos meses de experimento observou-se, inclusive, uma variação da  $CE_{50}$ , e esta diferença pode estar ligada às condições ambientais a que os organismos, do cultivo em larga escala, ficaram exposta durante esse período, o qual se pode frisar a influência das mudanças bruscas de temperatura nos meses de inverno e a alta densidade populacional.

Em relação ao teste com sulfato de cobre, Mark e Solbé (1998) mostraram a base de dados da European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC), onde a toxicidade aguda dessa substância para *D. magna* foi de  $0,011 \text{ mg.L}^{-1}$ . Resultado semelhante foi encontrado por Mastin e Rodgers (2000) que determinaram a toxicidade aguda em  $0,018$

mg.L<sup>-1</sup> de sulfato de cobre, valor menor comparado ao resultado deste trabalho (0,034 mg.L<sup>-1</sup>).

Outros trabalhos mostraram valores de CE<sub>50</sub> mais altos. Arauco (2002) e Khangarot e Ray (1989), por exemplo, encontraram a toxicidade do cobre para *D. magna* em 0,045 e 0,09 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Já Sorvari e Sillanpaa (1996) encontraram uma CE<sub>50</sub> de 0,022 mg.L<sup>-1</sup>, porém utilizando como fonte de exposição o cloreto de cobre por 24h.

Alguns autores destacam que devido à formação do íon metálico Cu<sup>2+</sup>, a toxicidade deste elemento pode variar conforme a qualidade da água, desde pH, dureza, temperatura e até procedimento dos testes (Khangarot e Ray 1989). Shi *et al.* (1998) também afirmam que o valor do pH influencia diretamente na disponibilização desses íons Cu<sup>2+</sup> na coluna d'água e, conseqüentemente, na sua toxicidade. Quanto menor o pH maior será sua disponibilidade e, dessa forma, os organismos absorvem esse elemento através da respiração. Já em ambiente com pH mais alto os íons tendem a se complexar e formar hidróxidos e complexos orgânicos.

Esse fator é importante na extrapolação dos resultados feitos em laboratório para o ambiente natural, em que a presença de matéria orgânica pode influenciar nos efeitos desse composto para as comunidades aquáticas.

A Resolução CONAMA n° 357 (2005) permite uma concentração de cobre total de 0,009mg.L<sup>-1</sup> em águas classe I e II e de 0,013mg.L<sup>-1</sup> em águas classe III. Concentração que se pode considerar não tóxica, portanto segura, comparada aos resultados obtidos nesse trabalho.

Porém, a Resolução CONAMA n° 430 (2011) permite o lançamento de efluentes com uma concentração máxima de cobre de 1 mg.L<sup>-1</sup>. Pelo fato de essa quantidade estar acima dos valores de toxicidade encontrados neste e nos demais trabalhos, ela pode afetar significativamente as comunidades aquáticas nos pontos de liberação desses efluentes e à jusante.

Estudos já demonstram que a exposição de dáfnias à concentrações acima de 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de cobre por 24h, afeta diretamente as taxas de filtração e ingestão de alimento (Ferrando e Andreu, 1993), o que pode prejudicar as comunidades aquáticas a médio e longo prazo.

Para as espécies *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia ambigua* a CL<sub>50</sub> (concentração letal mediana) calculada por Harmon *et al.* (2003) foi de 0,004 e 0,006 mg.L<sup>-1</sup> de sulfato de cobre, muito abaixo dos valores encontrados para *D. magna*. Isto evidencia também a diferença de toxicidade do sulfato de cobre entre organismos da mesma família, podendo prejudicar a diversidade de populações nos corpos d'água.

A toxicidade aguda da dáfnia para o glifosato já foi demonstrada por, Sarigul e Bekcan (2009) utilizando o Roundup® encontraram a  $CL_{50-48h}$  a  $12 \mu\text{g.L}^{-1}$  para a espécie, sendo que a menor concentração utilizada no teste foi de  $11 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

No entanto, Rojas e Riveros (2008) expuseram dáfnias ao Roundup® 747, que é em forma de grânulos, e a  $CL_{50}$  foi atingida na concentração de  $42,90 \text{ mg.L}^{-1}$ , muito acima do encontrado neste trabalho. O que pode indicar que essa formulação é menos tóxica do que a utilizada.

A concentração de glifosato utilizada nas culturas de arroz e soja no Brasil está entre  $0,36$  a  $2,16 \text{ mg.L}^{-1}$  (Gluszczak *et al.*, 2007). A partir disso para estimar a toxicidade desse composto para os organismos aquáticos, ainda é necessário avaliar a capacidade de degradação do glifosato pelos microrganismos no solo e a forma como ele é carregado para os corpos d'água.

A Resolução CONAMA nº 357 (2005) permite a quantia de  $65 \mu\text{g}$  de glifosato por litro água doce de classe I e II, e concentração de  $280 \mu\text{g}$  em água classe III. Concentração que já pode ser considerada tóxica para a espécie estudada.

Alguns estudos inclusive já demonstraram que concentrações acima de  $3,6 \text{ mg.L}^{-1}$  resultaram em perdas significativas na riqueza e abundância de espécies de copépodos, tanto na fase de náuplio quanto adulto (Vera *et al.*, 2012), e também de girinos e caracóis (Relyea, 2005). Para o camarão de água doce *Cardina nilotica* a  $CL_{50}$  do glifosato, para indivíduos com menos de 7 dias, se obteve na concentração de  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$  (Mensah *et al.*, 2011).

De acordo com os critérios de validade pré-estabelecidos pela OECD 211 (2012), o teste de toxicidade crônica não é válido, uma vez que a mortalidade nos tratamentos, inclusive no controle alcançou os 100% após 21 dias. Contudo, como o objetivo desta bateria foi testar também a hipótese de uso de *D. magna* produzida em larga escala para utilização em testes de toxicidade, os resultados foram apresentados.

O fato de os organismos alcançarem 100% de mortalidade inclusive no grupo controle, pode ser sinal de que o sistema de cultivo em larga escala afete na sua sensibilidade. Condições desfavoráveis como variações contínuas de temperatura, alta densidade populacional e produção de efípios, podem prejudicar a cultura (ABNT NBR 12713, 2004), esta pode ser a causa das dáfnias não resistirem até o final do ensaio.

Em relação à reprodução, a média de neonatas produzidas em cada evento reprodutivo, não diferenciou significativamente entre os tratamentos. No entanto, foi observado que o tratamento com maior concentração de glifosato, produziu um número maior de neonatos, resultado de um maior número de eventos reprodutivos. Nesse caso, os organismos podem ter

se adaptado à condição tóxica, ou a presença do glifosato pode ter estimulado uma maior reprodução, para que pelo menos uma pequena porcentagem dos organismos conseguisse sobreviver às condições de estresse.

Existem muitos trabalhos que evidenciam não apenas a ação letal do glifosato em outras comunidades aquáticas, mas inclusive os efeitos sub-letais/fisiológicos. Por exemplo, o crustáceo *Hyalella castroi*, apresentou redução muito significativas nos teores de glicogênio, proteínas, lipídeos, triglicerídeos e colesterol quando expostos a concentrações acima de 0,36 mg.L<sup>-1</sup> de Roundup® (Dutra *et al.*, 2011).

Experimentos de toxicidade são feitos geralmente juvenis de peixes ou com adultos, sendo que trabalhos com peixes nos primeiros estágios de desenvolvimento são reduzidos.

Estudos já demonstraram a toxicidade aguda do glifosato para juvenis de jundiá na concentração de 7,3 mg.L<sup>-1</sup> de glifosato (Kreutz *et al.*, 2008). Observa-se que toxicidade está bem acima se comparada a do presente trabalho, provavelmente devido ao estágio de desenvolvimento dos peixes.

Para juvenis de piaçu (*Leporinus macrocephalus*) a letalidade para o glifosato foi na concentração de 15,8 mg.L<sup>-1</sup>. Enquanto que juvenis de Pacu alcançaram CL<sub>50-48</sub> em concentração muito inferior, em 3,7 mg.L<sup>-1</sup> (Shiogiri *et al.*, 2012).

No entanto, os efeitos sub-letais do glifosato para o jundiá foram relatados por Ferreira *et al.* (2010), em que ao nível de 1,21 mg.L<sup>-1</sup> de glifosato, houve redução da atividade da enzima catalase e aumento da glutathione S-transferase. Sendo ambas responsáveis pela eliminação de compostos xenobióticos e tóxicos das células, nesse caso havendo um efeito compensatório no metabolismo. Efeitos semelhantes foram observados em curimatá (*Prochilodus lineatus*) quando expostos a 10mg.L<sup>-1</sup> de Roundup® (Modesto *et al.*, 2010).

A presença do glifosato na concentração de 0,73 mg.L<sup>-1</sup>, também foi responsável pela redução no número de eritrócitos, leucócitos, trombócitos e linfócitos no sangue, além do aumento de células imaturas, prejudicando também as funções imunológicas, também para jundiá (Kreutz *et al.*, 2011), concentração esta, muito próxima à letal encontrada para as pós-larvas neste trabalho.

Também trabalhando com jundiá, Gluszczak *et al.* (2007) observaram que em concentrações maiores que 0,2 mg.L<sup>-1</sup> de glifosato, houve redução da atividade da acetilcolinesterase no cérebro, prejudicando o processo de neurotransmissão, além de causar alterações na concentração de glicogênio e amônia no fígado e músculos, que caracterizam uma reação de estresse causada pelo componente tóxico.



Esses variados tipos de alterações citados acima, são sinais que indicam estresse oxidativo causado pela presença do glifosato (Menezes *et al.*, 2011)

Com esses resultados pode-se observar que concentrações que são consideradas sub-letais para juvenis e adultos podem ser muito prejudiciais para peixes nos estágios iniciais, pois estes ainda não conseguem se adaptar facilmente a presença de xenobióticos na água.

Souza *et al.* (2006) afirmam que o glifosato em si não é muito tóxico, porém as formas comercializadas no país contêm surfactantes, que podem maximizar sua toxicidade, associado ao seu uso prolongado. Esse herbicida também apresenta alta polaridade e solubilidade em água, o que permite que se associe a outros compostos iônicos inorgânicos e metálicos, o que dificulta sua extração e também na sua detecção e quantificação no solo (Amarante Junior *et al.*, 2002).

Baseado nisso, os testes de toxicidade são de fato, uma ótima ferramenta para avaliar as possíveis consequências, em curto prazo, do lançamento de diferentes compostos químicos nos corpos d'água, e atualmente necessários para o desenvolvimento de novas metodologias de proteção das comunidades aquáticas e garantia da boa qualidade da água.

Consideram-se também necessárias, pesquisas com peixes de diferentes tamanhos e estágio de desenvolvimento, para uma melhor padronização de metodologias e melhores informações sobre sua resistência, e conseqüentemente estabelecer as concentrações seguras para manutenção da espécie.

## **Conclusões**

A sensibilidade da *Daphnia magna*, cultivada em larga escala, ao dicromato de potássio foi encontrada na concentração média de  $0,57 \pm 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ , confirmando que seu uso na aplicação de teste de toxicidade é viável.

Na avaliação da toxicidade aguda da espécie ao sulfato de cobre, a  $CE_{50}$  encontrada foi de  $0,034 \text{ mg.L}^{-1}$  e para o Glifosato foi de  $32 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ . E a toxicidade aguda do glifosato para o *Rhamdia quelen*, foi ao nível de  $0,9 \text{ mg.L}^{-1}$ .

O cultivo em larga escala não se mostrou favorável à aplicação dos testes de toxicidade crônica, sugere-se então, rever os protocolos desse tipo de cultivo para que não afete a resistência dos organismos.

## Referências Bibliográficas

- ABNT - Associação Brasileira De Normas Técnicas. 2004. ABNT NBR - 12713: Ecotoxicologia aquática -Toxicidade aguda-Método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustacea). 2 ed. Rio de Janeiro. Brasil.
- Albinati, A. C. L.; Moreira, E. L. T.; Albinati, R. C. B.; Carvalho, J. V.; De Lira, A. D.; Santos, G. B.; Vidal, L. V. O. 2009. Biomarcadores histológicos - toxicidade crônica pelo Roundup em piaçu (*Leporinus macrocephalus*). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61, 621-627.
- Alves, S. R.; Oliveira-Filho, J. J. O. 2003. Avaliação de ambientes contaminados por agrotóxicos. In. Peres, F.; Moreira, J. C. (Org.) É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente. 20 ed. Fiocruz, Rio de Janeiro. p. 137 – 156.
- Amarante Junior, O. P.; Santos, T. C. R.; Brito, N. M. Ribeiro, M. L. 2002. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. Quim. Nova. 25, 589-593.
- Arauco, L. R. R. 2002. Toxicidade aguda do sulfato de cobre e do triclorfon para três espécies de daphnias em presença e ausência de sedimento. Mestrado (Dissertação), Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, SP.
- Arias, A. R. L.; Buss, D. F.; Albuquerque, C.; Inácio, A. F.; Freire, M. M.; Egler, M.; Mugnai, R.; Baptista, D. F. 2007. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. Ciênc. Saúde Colet. 12, 61-72.
- Armitage, P. D., Moss, D., Wright, J. T., Furse, M. T. 1983. The performance of the new biological water quality score system based on macroinvertebrates over a wide range of unpolluted running water sites. Water Res. 17, 333–347.
- Baldisserotto, B., Radünz Neto, J. 2010. Jundiá (*Rhamdia* sp.), In: Baldisserotto, B.; Gomes, L.C. (Eds.). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 2 ed. UFSM, Santa Maria. 303-325.
- Baptista, D. F. 2008. Uso de macroinvertebrados em procedimentos de biomonitoramento em ecossistemas aquáticos. Oecol. Bras. 12, 425-44.
- Barrera, E. A. L. 2013. Avaliação dos efeitos da exposição de nanopartículas de prata em larvas de *Rhamdia quelen* e da coexposição com Benzo(a)pireno em indivíduos adultos. Doutorado (Tese) Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
- Beatrici, A. C.; Arenzon, A.; Coimbra N. J.; Raya-Rodriguez M. T., 2006. Fertilidade e Sensibilidade de *Daphnia similis* e *Daphnia magna* Submetidas a Diferentes Cultivos. J.Braz. Soc. of Ecotoxicol.1, 123-126.
- Bieger, L.; Carvalho, A. B. P.; Strieder, M. N.; Maltchik, L.; Stenert, C. 2010. Are the streams of the Sinos River basin of good water quality? Aquatic macroinvertebrates may answer the question. Braz. J. Biol. 70, 1207-1215.
- Britt, C.; Mole, A.; Kirkham, F.; Terry, A. 2003. The Herbicide Handbook: Guidance on the use of herbicides on nature conservation sites. Engl. Nature. Wetherby, 145 p.
- Buss, D. F.; Baptista, D. F.; Nessimian, J. L. , 2003. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. Cad. Saúde Pública. 19, 465-473.
- Calheiros, D. F.; Ferreira, C. J. A. 1997. Alterações limnológicas no rio paraguai (“dequada”) e o fenômeno natural de mortandade de peixes no pantanal mato-grossense – MS. EMBRAPA-CPAP, Corumbá-MS. 51p.
- Callisto, M.; Moretti, M.; Goulart, M., 2001. Macroinvertebrados bentônicos como ferramenta para avaliar a saúde de riachos. Rev. Bras. de Recur. Hídr. 6, 71-82.

- Capoleti, C. 2005. Biomonitoramento da qualidade da água na Estação de tratamento de água Rio Grande, São Bernardo do Campo, SP. Mestrado (Dissertação). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- Cavalcante, D. G. S. M.; Martinez, C. B.R.; Sofia, S. H. 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat. Res.* 655, 41–46.
- Costa, C. R.; Olivi, P.; Botta, C. M. R.; Espindola, E. L. G. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quim. Nova.* 31, 1820-1830.
- CONAMA. Conselho Nacional de Meio Ambiente. 2005. Resolução Conama 357 de 17 de março.
- CONAMA. Conselho Nacional de Meio Ambiente. 2011. Resolução Conama 430 de 13 de maio.
- Czerniawska-Kuzka, I. 2005. Comparing modified biological monitoring working party score system and several biological indices based on macroinvertebrates for water-quality assessment. *Limnologica.* 35, 169–176.
- Dang, Z.; Cheng, Y.; Chen, H.; Cui, Y.; Yin, H.; Traas, T.; Montforts, M.; Vermeire, T. 2012. Evaluation of the *Daphnia magna* reproduction test for detecting endocrine disruptors. *Chemosphere* .88, 514–523.
- Dutra, B. K., Fernandes, F. A., Failace, D. M., Oliveira, G. T., 2011. Effect of roundup® (glyphosate formulation) in the energy metabolism and reproductive traits of *Hyaella castroi* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae). *Ecotoxicology.* 20, 255-263.
- Edge, C. B.; Gahl, M. K.; Pauli, B. D.; Thompson, D. G.; Houlahan, J. E. 2011. Exposure of juvenile green frogs (*Lithobates clamitans*) in littoral enclosures to a glyphosate-based herbicide. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1363–1369.
- El-Shebly, A. A., El-Kady, M. A. H., 2008. Effects of Glyphosate Herbicide on Serum Growth Hormone (GH) Levels and Muscle Protein Content in Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus* L.). *Res. J. Fish. and Hydrobiol.* 3, 84-88.
- Enserink, L., Luttmer, W., Maasdiepeveen, H., 1990. Reproductive strategy of *daphnia-magna* affects the sensitivity of its progeny in acute toxicity tests. *Aquat. Toxicol.* 17. 15 - 26.
- Faria, N. M. X.; Fassa, A. C. G.; Facchini, L. A. 2007. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. *Ciênc. Saúde Colet.* 12, 25-38.
- Ferrando, M. D., Andreu, E., 1993. Feeding-behavior as an index of copper stress in *Daphnia magna* and *brachionus-calyciflorus*. *Comp. Biochem. Physiol. C-Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 106, 327-331.
- Ferreira, D., da Motta, A. C., Kreutz, L. C., Toni, C., Lore, V. L., Barcellos, L. J. G., 2010. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chemosphere.* 79, 914-921.
- Figueiredo, M. C. B.; Teixeira, A. S.; Araújo, L. F. P.; Rosa, M. F.; Paulino, W. D.; Mota, S.; Araújo, J. C. 2007 . Avaliação da vulnerabilidade ambiental de reservatórios à eutrofização. *Eng. Sanit. Ambient.* 4, 399-409.
- Fracacio, R. 2006. Estudos limnológicos e ecotoxicológicos (laboratoriais e *in situ*), com ênfase na avaliação da toxicidade de metais e pesticidas organoclorados em peixes (*Danio rerio* e *Poecilia reticulata*) – Sub-bacia do rio Monjolinho. Doutorado (Tese). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos –SP.
- Fracacio, R.; Rodriguês, B. K.; Campagna, A. F.; Verani, N. F.; Dornfeld, C. B.; Espíndola, E. L. G. 2009. In situ and laboratory evaluation of toxicity with *Danio rerio* Buchanan (1822) and *Poecilia reticulata* Peters (1859). *Acta Limnol. Bras.*, 2009, vol. 21, no. 1, p. 111-122

- Genovez, L. W.; Pilarski, F.; Sakabe, R.; Marques, M. P. A.; Moraes, F. R. 2008. Controle biológico de dolops carvalhoi (Brustacea: Branchiura) em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Bol. Inst. Pesca. 34, 99 – 105.
- Gluszczak, L., Miron, D. D., Moraes, B. S., Simoes, R. R., Schetinger, M. R. C., Morsch, V. M., Loro, V. L., 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol. 146, 519-524.
- Gomes, L.C.; Golombieski, J.I.; Chippari Gomes, A.R. Baldisserotto. B. 2000. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae): Uma revisão. Cienc. Rural. 30, 179-185.
- Guilherme, S.; Gaivão, I.; Santosa, M.A.; Pacheco, M. 2012. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide – Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. Mutat. Res. 743, 1–9.
- Hamilton, M. A., Russo, R. C., Thurston, R. V., 1977. Trimmed Spearman-Kärber Method For Estimating Median Lethal Concentrations In Toxicity Bioassays. Environ. Sci. Technol. 11, 714 - 719.
- Harmon, S. M., Specht, W. L., Chandler, G. T., 2003. A comparison of the daphnids *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia ambigua* for their utilization in routine toxicity testing in the Southeastern United States. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 45, 79-85.
- Hedberg, D.; Wallin, M. 2010. Effects of Roundup and glyphosate formulations on intracellular transport, microtubules and actin filaments in *Xenopus laevis* melanophores. Toxicol. in Vitro. 24, 795–802.
- Hilsenhoff, W. L. 1987. An improved biotic index of organic stream pollution. Great Lakes Entomol. 20, 31-39.
- Khangarot, B. S., Ray, P. K., 1989. Investigation Of Correlation Between Physicochemical Properties Of Metals And Their Toxicity To The Water Flea *Daphnia magna* Straus. Ecotoxicol. Environ. Saf. 18, 109-120.
- Knie, J. L. W.; Lopes, E. W. B, 2004. Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. FATMA. p. 289.
- Kreutz, L. C., Barcellos, L. J. G., Silva, T. O., Anziliero, D., Martins, D.; Lorenson, M.; Marteninghe, A.; Silva, L. B. 2008. Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. Ciênc. Rural. 38,1050-1055.
- Kreutz, L. C., Barcellos, L. J. G., Valle, S. D., Silva, T. O., Anziliero, D., Dos Santos, E. D., Pivato, M., Zanatta, R., 2011. Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. Fish Shellfish Immunol. 30, 51-57.
- Kütter, M. T.; Bemvenuti M. A.; Moresco A. 2009. Feeding strategy of the jundiá *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) in costal lagoons of southern Brazil. Acta Sci. Bio. Sci. 31, 41-47.
- Lewis, M. A., Maki, A. W., 1981. Effects of water hardness and diet on productivity of daphnia-magna straus in laboratory culture. Hydrobiologia. 85, 175 - 179.
- Maffezzolli, G.; Nuñez, A. P. O. 2006. Crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae), em diferentes concentrações de oxigênio dissolvido. Acta Sci. Bio. Sci. 28, 41-45.
- Magalhães, D. P., Ferrão Filho, A. S., 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. Oecol. Bras. 12, 355-381.
- Mamy, L.; Barriuso, E.; Gabrielle, B. 2005. Environmental fate of herbicides trifluralin, metazachlor, metamitron and sulcotrione compared with that of glyphosate, a substitute broad spectrum herbicide for different glyphosate-resistant crops. Pest Manage. Sci. 61, 905–916.

- Mark, U., Solbe, J., 1998. Analysis of the ECETOC aquatic toxicity (EAT) database - V - The relevance of *Daphnia magna* as a representative test species. *Chemosphere*. 36. 155 - 166.
- Martins, J.; Teles, L. O.; Vasconcelos, V. 2007. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environ. Int.* 33, 414–425.
- Mastin, B. J., Rodgers, J. H., 2000. Toxicity and bioavailability of copper herbicides (clearigate, cutrine-plus, and copper sulfate) to freshwater animals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 445-451.
- Menezes, C. C., Da Fonseca, M. B., Loro, V. L., Santi, A., Cattaneo, R., Clasen, B., Pretto, A., Morsch, V. M., 2011. Roundup Effects on Oxidative Stress Parameters and Recovery Pattern of *Rhamdia quelen*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 665-671.
- Mensah, P. K., Muller, W. J., Palmer, C. G., 2011. Acute toxicity of Roundup (R) herbicide to three life stages of the freshwater shrimp *Caridina nilotica* (Decapoda: Atyidae). *Phys. Chem. Earth.* 36, 905-909.
- Miron, D. S.; Moraes, B.; Becker, A. G.; Crestani, M.; Spanevello, R, Loro, V. L.; Baldisserotto, B. 2008. Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). *Aquaculture*. 277, 192–196.
- Modesto, K. A.; Martinez, C. B. R. 2010. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*. 78, 294–299.
- Nakatani, K.; Agostinho, A.A.; Baumgartner, G.; Bialezki, A.; Sanches, P.V.; Makrakis, M.C.; Pavanelli, C.S. 2001. Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: Eduem, 378 p.
- OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. 1992. Test no. 203: Fish, Acute Toxicity Test. OECD Guideline For The Testing Of Chemicals. OECD Publishing. 10 p.
- OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. 2012. Test no. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test. OECD Guideline For The Testing Of Chemicals. OECD Publishing. 25 p.
- Persoone, G., Vandevael, A., Vansteertegem, M., Denayer, B., 1989. Predictive value of laboratory tests with aquatic invertebrates - influence of experimental conditions. *Aquat. Toxicol.* 14, 149-167.
- Relyela, R. A. 2005. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecol. Appl.* 15, 618–627.
- Rojas, C. M.G.; Riveros, E. J. R. 2008. Determinación de la concentración letal media (CL50-48) del herbicida roundup 747 sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con *Daphnia magna*. *Graduação (Dissertação) Facultad De Ingeniería Ambiental Y Sanitaria. Universidad De La Salle. Bogotá, D.C.*
- Ruppert, E. E.; Barnes, R. D. *Zoologia dos Invertebrados*. 6ª ed. São Paulo: Roca, 1996. 1029p.
- Sarigul, Z., Bekcan, S., 2009. Acute Toxicity of The Herbicide Glyphosate on *Daphnia magna*. *J. Agric. Sci.* 15. 204 - 208.
- Scholten, M. C. T.; Foekema, E. M.; Van Dokkum, H. P.; Kaag, N. H. B. M.; Jak, R. G. 2005. *Eutrophication Management and Ecotoxicology*. Springer. Berlin. 122 p.
- Shi, B., Allen, H. E., Grassi, M. T., Ma, H. Z., 1998. Modeling copper partitioning in surface waters. *Water Res.* 32, 3756-3764.
- Shiogiri, N. S.; Paulino, M. G.; Carraschi, S. P.; Baraldi, F. G.; Cruz, C.; Fernandes, M. N. 2012. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the

- Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. Environ. Ecol. Pharmacol. 34, 388–396.
- Sorvari, J., Sillanpaa, M., 1996. Influence of metal complex formation on heavy metal and free EDTA and DTPA acute toxicity determined by *Daphnia magna*. Chemosphere. 33, 1119-1127.
- Souza, T. A.; Matta, M. H. R.; Montagner, E.; Abreu, A. B. G. 2006. Estudo de recuperação de glifosato e ampa derivados em solo utilizando-se resinas nacionais. Quim. Nova. 29, 1372-1376.
- Terra, N. R.; Feiden, I. R. 2008. Avaliação de amostras de água do rio Caí entre os anos de 1996 e 1997 através de ensaios crônicos com *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera). Fepam. 2, 18-25.
- Terra, N. R.; Feiden, I. R.; Fachel, J. M. G.; Lemos, T.; Nunes, E. A. 2008a. Ecotoxicological evaluation of sediment and water samples from Sinos River, Rio Grande do Sul, Brazil, using *Daphnia magna* and V79 cells. Acta Limnol. Bras. 20, 63-72.
- Terra, N. R.; Feiden, I. R.; Fachel, J. M. G. 2008b. Taquari River (Rio Grande do Sul, Brazil) sediment ecotoxicology, using *Daphnia magna*, 1820: straus as test organism. Acta Limnol. Bras. 20, 153-159.
- Truhaut, R. 1977. Ecotoxicology: Objectives, Principles and Perspectives. Ecotoxicol. Environ. Saf. 1, 151-173.
- Tsui, M. T. K.; Chu, L. M. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. Chemosphere. 52, 1189–1197
- USEPA - United States Environmental Protection Agency, 2000. Understanding and accounting for Method Variability in Whole Effluent Toxicity Applications Under the National Pollutant Discharge Elimination System. EPA 833-R-00-003, Office of Wastewater.
- USEPA - United States Environmental Protection Agency, 2002. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. EPA-821-R-02-012, Office of Water. 50.
- USEPA - United States Environmental Protection Agency, 2007. Freshwater Chronic Toxicity Test Procedure And Protocol. USEPA Region 1. Boston. 7 p.
- Van Dyk, J. C. 2003. Fish histopathology as a monitoring tool for aquatic health: a preliminary investigation. Mestrado (Dissertação), Environmental Management. Faculty of Science at the Rand Afrikaans university. Johannesburg, South Africa.
- Van Leeuwen, F. X. R. 2000. Safe Drinking Water: the Toxicologist's Approach. Food and Chemical Toxicology. 38, 51-58
- Vera, M. S.; Di Fiori, E.; Lagomarsino, L.; Sinistro, R.; Escaray, R.; Iummato, M. M.; Juarez, A.; Molina, M. D. C. R.; Tell, G.; Pizarro, H. 2012. Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanoron freshwater microbial communities. Ecotoxicology. 21, 1805–1816.
- Walsh, L. P., McCormick, C., Martin, C., Stocco, D. M., 2000. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. Environ. Health Perspect. 108, 769-776.
- Williams, P. L.; James, R. C.; Roberts, S. M. 2000. Principles of toxicology: environmental and industrial applications. 2 ed. Wiley. 602 p.
- Zaniboni Filho, E. 2004. Piscicultura das espécies nativas de água doce. In: Poli, C.R.; Poli, A.T.B.; Andreatta, E.R.; Beltrame, E. (Eds). Aquicultura: experiências brasileiras. Multitarefa, Florianópolis. p. 337-368.