UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

FERNANDA BERNARDI

EXPOSIÇÃO DE GAMETAS, EMBRIÕES E LARVAS DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) AO 2,4-D E GLIFOSATO: EFEITOS SOBRE INDICADORES DO EQUILÍBRIO REDOX E SOBRE A VIABILIDADE DA PROLE

Marechal Cândido Rondon
2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

FERNANDA BERNARDI

EXPOSIÇÃO DE GAMETAS, EMBRIÕES E LARVAS DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) AO 2,4-D E GLIFOSATO: EFEITOS SOBRE INDICADORES DO EQUILÍBRIO REDOX E SOBRE A VIABILIDADE DA PROLE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Zootecnia.
Área de concentração: Produção e Nutrição Animal.

Orientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli

Marechal Cândido Rondon
2021

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Bernardi, Fernanda
Exposição de gametas, embriões e larvas de jundiá (Rhamdia quelen) ao 2,4-D e glifosato: efeitos sobre indicadores do equilíbrio redox e sobre a viabilidade da prole / Fernanda Bernardi; orientador(a), Robie Allan Bombardelli, 2021.
95 f.

Tese (doutorado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2021.

1. ácido 2,4-diclorofenoxiacético. 2. espermatozoide. 3. estresse oxidativo. 4. peixe. I. Bombardelli, Robie Allan . II. Título.

FERNANDA BERNARDI

Exposição de gametas, embriões e larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) ao 2,4-D e glifosato: efeitos sobre indicadores do equilíbrio redox e sobre a viabilidade da prole

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de "Doutora em Zootecnia", Área de Concentração "Produção e Nutrição Animal", Linha de Pesquisa "Aquicultura", APROVADA pela seguinte Banca Examinadora:

Orientador / Presidente – Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - *Campus* de Toledo

Membro – Prof.ª Dr.ª Thaís Souto Bignotto
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - *Campus* de Toledo

Membro – Prof. Dr. Affonso Celso Gonçalves Júnior
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - *Campus* de Mal. Cândido Rondon

Membro – Prof. Dr. Fábio Meurer
Universidade Federal do Paraná (UFPR) – *Campus* Avançado de Jandaia do Sul

Membro – Prof.ª Dr.ª Elenice Souza dos Reis Goes
Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)

Marechal Cândido Rondon, 08 de fevereiro de 2021.

unioeste
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - http://www.unioeste.br
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.

PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof. Dr. ROBIE ALLAN BOMBARDELLI**, declaro como **ORIENTADOR** que presidi os trabalhos de defesa **à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Tese da candidata **Fernanda Bernardi**, aluna de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, a apresentação e a arguição dos membros da banca examinadora, **formalizo como Orientador**, para fins de registro, por meio desta declaração, a decisão da banca examinadora de que a candidata foi considerada APROVADA na banca realizada em 08/02/2021, com o trabalho intitulado **"Exposição de gametas, embriões e larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) ao 2,4-D e glifosato: efeitos sobre indicadores do equilíbrio redox e sobre a viabilidade da prole"**.

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

Prof. Dr. ROBIE ALLAN BOMBARDELLI – ORIENTADOR/PRESIDENTE
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) / *Campus* de Toledo

Modelo 2 – Para orientador(a) da Banca Examinadora de Programa de Pós-graduação da UNIOESTE

unioeste
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - http://www.unioeste.br
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.

PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DOUTORADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof.ª Dr.ª Thaís Souto Bignotto,** declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Tese da candidata **Fernanda Bernardi**, aluna de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como Membro Externo**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que a candidata pode ser considerada APROVADA na banca realizada em 08/02/2021, com o trabalho intitulado **"Exposição de gametas, embriões e larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) ao 2,4-D e glifosato: efeitos sobre indicadores do equilíbrio redox e sobre a viabilidade da prole"**.

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

Thaís Souto Bignotto

Prof.ª Dr.ª Thaís Souto Bignotto
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) / *Campus* de Toledo

Modelo 1 – Para membros de Banca Examinadora de Programa de Pós-graduação da UNIOESTE

unioeste
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - http://www.unioeste.br
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.

PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DOUTORADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof. Dr. Affonso Celso Gonçalves Junior,** declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Tese da candidata **Fernanda Bernardi**, aluna de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como Membro Externo**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que a candidata pode ser considerada APROVADA na banca realizada em 08/02/2021, com o trabalho intitulado **"Exposição de gametas, embriões e larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) ao 2,4-D e glifosato: efeitos sobre indicadores do equilíbrio redox e sobre a viabilidade da prole"**.

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

Prof. Dr. Affonso Celso Gonçalves Junior
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) / *Campus* de Mal. Cândido Rondon

unioeste
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - http://www.unioeste.br
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.

PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DOUTORADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof. Dr. Fábio Meurer,** declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Tese da candidata **Fernanda Bernardi**, aluna de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como Membro Externo**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que a candidata pode ser considerada APROVADA na banca realizada em 08/02/2021, com o trabalho intitulado **"Exposição de gametas, embriões e larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) ao 2,4-D e glifosato: efeitos sobre indicadores do equilíbrio redox e sobre a viabilidade da prole"**.

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

Foi solicitado uma extensa revisão e correção do texto da tese.

Fabio Meurer

Prof. Dr. Fábio Meurer
Universidade Federal do Paraná (UFPR) / *Campus* Avançado de Jandaia do Sul

Modelo 1 – Para membros de Banca Examinadora de Programa de Pós-graduação da UNIOESTE

unioeste
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - http://www.unioeste.br
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.

PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DOUTORADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof.ª Dr.ª Elenice Souza dos Reis Goes,** declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Tese da candidata **Fernanda Bernardi**, aluna de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como Membro Externo**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que a candidata pode ser considerada APROVADA na banca realizada em 08/02/2021, com o trabalho intitulado **"Exposição de gametas, embriões e larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) ao 2,4-D e glifosato: efeitos sobre indicadores do equilíbrio redox e sobre a viabilidade da prole"**.

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

Elenice Souza dos Reis Goes

Prof.ª Dr.ª Elenice Souza dos Reis Goes
Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)

Modelo 1 – Para membros de Banca Examinadora de Programa de Pós-graduação da UNIOESTE

Dedico este trabalho, ao meu pai Nelson Bernardi, a minha mãe Lídia de Oliveira Bernardi e a minha irmã Andréia Bernardi, que um dia sonharam e hoje compartilham este importante momento comigo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, Lídia de Oliveira Bernardi e Nelson Bernardi, por todo o esforço investido na minha educação.

A minha irmã, Andréia Bernardi, que acima de tudo é uma grande amiga, sempre presente nos momentos difíceis com uma palavra de incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli, pelo suporte e incansável dedicação, pelas suas correções e paciência. Obrigada por ter acreditado na minha capacidade.

Aos membros da banca examinadora de qualificação, Dr. Marcio Douglas Goes e Dr.ª Jakeline Marcela Azambuja de Freitas, aos membros da banca examinadora de defesa, Prof.ª Dr.ª Elenice Souza dos Reis Goes e Prof. Dr. Affonso Celso Gonçalves Júnior, além do Prof. Dr. Fábio Meurer e da Prof.ª Dr.ª Thaís Souto Bignotto, por terem aceitado participar do exame de qualificação e, agora, da defesa. As suas valiosas sugestões fizeram toda a diferença.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia que sempre transmitiram seu saber com muito profissionalismo.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Paulo Henrique Morsch, por todas as dúvidas esclarecidas.

A todos do Laboratório de Tecnologia da Reprodução de Animais Aquáticos Cultiváveis (LATRAAC), pelas trocas de ideias e ajuda mútua.

A Prof.ª Dr.ª Marta Margarete Cestari e a Juliana Roratto Lirola, da Universidade Federal do Paraná, pelas análises do ensaio cometa.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Bacellar Barreiros, pelo auxílio no estágio de docência.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de cursar o doutorado.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

E, por fim, a todos que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho, o meu muito obrigada.

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém”

(DALAI LAMA)

EXPOSIÇÃO DE GAMETAS, EMBRIÕES E LARVAS DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) AO 2,4-D E GLIFOSATO: EFEITOS SOBRE INDICADORES DO EQUILÍBRIO REDOX E SOBRE A VIABILIDADE DA PROLE

RESUMO

Os agrotóxicos são produtos formulados, utilizados no ambiente agrícola visando o controle de pragas (insetos, animais, plantas ou fungos). Em viveiros escavados, o uso de herbicidas para eliminar todas as plantas aquáticas pode reduzir o habitat dos peixes, o suprimento de alimentos, o oxigênio dissolvido e a produtividade dos peixes. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos dos herbicidas 2,4-D, glifosato e a mistura de ambos sobre o estresse oxidativo, a genotoxicidade, as taxas de fertilização, eclosão, normalidade larval e sobre os parâmetros espermáticos em jundiás. Foram realizados dois experimentos, os quais foram distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado, compostos por dez tratamentos e três repetições. Os tratamentos foram constituídos pelo uso de água com diferentes concentrações de glifosato (3,0; 6,0; 9,0 e 12,0 mg e.a. L^{-1}), 2,4-D (5,0; 10,0; 20,0 e 30,0 mg e.a. L^{-1}) e a mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato) tanto para a incubação dos ovos quanto para a ativação do sêmen. Os ovos e o sêmen do grupo controle foram, respectivamente, incubados e ativados em água destilada. Os ovos incubados por 1 hora em incubadoras de fibra de vidro foram transferidos para placas de cultivo celular de 24 poços a uma densidade de 5 ovos por poço, contendo 2 mL de água contaminada em cada poço. Decorridas 12 horas após a fertilização artificial, foi mensurada a taxa de fertilização. A taxa de eclosão foi mensurada 38 horas após a fertilização artificial. A taxa de normalidade larval foi mensurada 62 horas após a fertilização artificial. Os ovos incubados por 1 hora em incubadoras de fibra de vidro foram transferidos para recipientes plásticos contendo 200 mL de água contaminada, a uma densidade de 3,0 mL de ovos (401 ± 33 ovos) por recipiente plástico. As larvas foram coletadas 45 horas após a fertilização artificial e, posteriormente, analisadas a atividade das enzimas catalase (CAT), glutationa-S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), lipoperoxidação (LPO) e carbonilação de proteínas (PCO). Os ovos incubados por 1 hora em incubadoras de fibra de vidro foram transferidos para recipientes plásticos contendo 100 mL de água contaminada, a uma densidade de 1,5 mL de ovos (173 ± 23 ovos) por recipiente plástico. As larvas foram coletadas 48 horas após a fertilização artificial e, posteriormente, foram quantificados os danos no DNA. Alíquotas de sêmen foram avaliadas pelo *plugin* CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) em *software* livre. O movimento dos espermatozoides foi avaliado aos 12 e 14 segundos após o início da ativação espermática. As variáveis analisadas foram: motilidade espermática, linearidade, velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade espermática (VE). A exposição ao glifosato e à mistura dos herbicidas diminuiu significativamente a fertilização dos ovócitos e a eclosão dos ovos. A água contaminada com o 2,4-D não afetou as taxas de fertilização e eclosão. As diferentes concentrações de 2,4-D e glifosato, além da mistura de ambos, não afetaram as taxas de normalidade larval. A atividade da CAT, da GST, da LPO e da PCO não foram alteradas em nenhuma das concentrações testadas de glifosato, 2,4-D e da mistura dos herbicidas. A atividade da SOD não foi evidenciada em nenhum dos tratamentos. A exposição ao 2,4-D e à mistura dos herbicidas provocou danos ao material genético das larvas de jundiá. A exposição ao glifosato não induziu a quebra na fita do DNA de larvas de jundiá. Os herbicidas 2,4-D, glifosato e a mistura de ambos foram prejudiciais para a motilidade dos espermatozoides. A linearidade, a VCL, a VAP, a VSL e a

VE não foram afetadas pelo uso do glifosato, do 2,4-D e da mistura dos herbicidas. Nossos resultados mostram que apesar de terem sido utilizadas altas concentrações dos herbicidas, foram detectadas alterações causadas pelos mesmos em apenas alguns dos biomarcadores testados.

Palavras-chave: ácido 2,4-diclorofenoxiacético, espermatozoide, estresse oxidativo, peixe, reprodução

EXPOSURE OF GAMETES, EMBRYOS AND LARVAE OF SILVER CATFISH (*Rhamdia quelen*) TO 2,4-D AND GLYPHOSATE: EFFECTS ON REDOX BALANCE INDICATORS AND ON THE VIABILITY OF OFFSPRING

ABSTRACT

Pesticides are products formulated used in the agricultural environment to control pests (insects, animals, plants, or fungi). In excavated ponds, the use of herbicides to eliminate all aquatic plants can reduce fish habitat, food supply, dissolved oxygen, and fish productivity. The objective of this work was to evaluate the effects of the herbicides 2,4-D, glyphosate, and the mixture of both on oxidative stress, genotoxicity, the rates of fertilization, hatching, larval normality, and on sperm parameters in silver catfish. Two experiments were carried out, which were distributed completely randomized experimental design, composed by ten treatments and three replications. The treatments consisted of using water with different concentrations of glyphosate (3.0; 6.0; 9.0 and 12.0 mg a.e. L^{-1}), 2.4-D (5.0; 10.0; 20.0 and 30.0 mg a.e. L^{-1}) and the mixture of both (5.0 mg a.e. L^{-1} of 2,4-D + 10.0 mg a.e. L^{-1} of glyphosate) both for the incubation of eggs and semen activation. The eggs and semen of the control group were incubated and activated in distilled water, respectively. Eggs incubated for 1 hour in fiberglass incubators were transferred to 24-well cell culture plates at a density of 5 eggs per well, containing 2 mL of contaminated water in each well. 12 hours after artificial fertilization, the fertilization rate was measured. The hatching rate was measured 38 hours after artificial fertilization. The rate of larval normality was measured 62 hours after artificial fertilization. Eggs incubated for 1 hour in fiberglass incubators were transferred to plastic containers containing 200 mL of contaminated water, at a density of 3.0 mL of eggs (401 ± 33 eggs) per plastic container. The larvae were collected 45 hours after artificial fertilization and, subsequently, analyzed the activity of the enzymes catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), lipoperoxidation (LPO), and protein carbonylation (PCO). Eggs incubated for 1 hour in fiberglass incubators were transferred to plastic containers containing 100 mL of contaminated water, at a density of 1.5 mL of eggs (173 ± 23 eggs) per plastic container. The larvae were collected 48 hours after artificial fertilization and, subsequently, DNA damage was quantified. Semen aliquots were evaluated by the CASA plugin (Computer Assisted Sperm Analysis) in free software. Sperm movement was assessed at 12 and 14 seconds after the start of sperm activation. The variables analyzed were: sperm motility, linearity, curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), straight-line velocity (VSL), and sperm velocity (VE). Exposure to glyphosate and the mixture of herbicides significantly decreased the fertilization of oocytes and the hatching of eggs. Water contaminated with 2,4-D did not affect fertilization and hatching rates. The different concentrations of 2,4-D and glyphosate, in addition to the mixture of both, did not affect the rates of larval normality. The activity of CAT, GST, LPO, and PCO were not altered in any of the tested concentrations of glyphosate, 2,4-D, and the mixture of herbicides. SOD activity was not evident in any of the treatments. Exposure to 2,4-D and the mixture of herbicides caused damage to the genetic material of larvae silver catfish. Exposure to glyphosate did not induce DNA strand break in larvae silver catfish. The herbicides 2,4-D, glyphosate, and the mixture of both were harmful to sperm motility. Linearity, VCL, VAP, VSL, and VE were not affected by the use of glyphosate, 2,4-D, and the mixture of herbicides. Our results show that although high concentrations of the herbicides were used, changes caused by them were detected in only some of the tested biomarkers.

Keywords: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, fish, oxidative stress, reproduction, spermatozoon

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Taxa de fertilização dos ovócitos de jundiá (*Rhamdia quelen*). (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos e o controle pelo teste de ANOVA seguida do teste de Dunnett 63

Figura 2. Taxa de eclosão dos ovos de jundiá (*Rhamdia quelen*). (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos e o controle pelo teste de ANOVA seguida do teste de Dunnett 64

Figura 3. Taxa de normalidade larval de jundiá (*Rhamdia quelen*). (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP 65

Figura 4. Atividade da catalase (CAT) em larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP..... 66

Figura 5. Atividade da glutationa-S-transferase (GST) em larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP 67

Figura 6. Níveis de lipoperoxidação (LPO) em larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP 68
Figura 7. Níveis de carbonilação de proteínas (PCO) em larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP 69
Figura 8. Escores do ensaio cometa de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos e o controle pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn 70
Figura 9. Motilidade espermática aos 12 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato. (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos e o controle pelo teste de ANOVA seguida do teste de Dunnett 71
Figura 10. Motilidade espermática aos 14 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos e o controle pelo teste de ANOVA seguida do teste de Dunnett 72

Figura 11. Linearidade aos 12 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP 73
Figura 12. Linearidade aos 14 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP 74
Figura 13. Velocidade curvilínea (VCL) aos 12 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP 75
Figura 14. Velocidade curvilínea (VCL) aos 14 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP 76
Figura 15. Velocidade média de deslocamento (VAP) aos 12 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP 77
Figura 16. Velocidade média de deslocamento (VAP) aos 14 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0

mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP 78
Figura 17. Velocidade em linha reta (VSL) aos 12 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP 79
Figura 18. Velocidade em linha reta (VSL) aos 14 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP 80
Figura 19. Velocidade espermática (VE) aos 12 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP 81
Figura 20. Velocidade espermática (VE) aos 14 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ocorrência de glifosato e 2,4-D em ambientes aquáticos..... 29
Tabela 2. Efeitos reprodutivos do 2,4-D e do glifosato em peixes..... 36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 24
2.1 AGROTÓXICOS 24
2.2 ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) 26
2.3 GLIFOSATO 26
2.4 CONTAMINAÇÃO DE AMBIENTES AQUÁTICOS POR 2,4-D E GLIFOSATO 28
2.5 PRODUÇÃO DE PEIXES NO BRASIL E A ESPÉCIE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) 31
2.6 BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) 33
2.7 REFERÊNCIAS 40
3 EFEITOS SOBRE PARÂMETROS REPRODUTIVOS, BIOQUÍMICOS E GENOTÓXICOS DOS HERBICIDAS 2,4-D E GLIFOSATO EM JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) 52
RESUMO 52
ABSTRACT 53
3.1 INTRODUÇÃO 54
3.2 MATERIAL E MÉTODOS 56
3.2.1 Experimento 1 56
3.2.1.1 Herbicidas 56
3.2.1.2 Preparo das soluções estoques 57
3.2.1.3 Seleção dos reprodutores, coleta de gametas e obtenção dos embriões 57
3.2.1.4 Determinação das taxas de fertilização, eclosão e normalidade larval 58
3.2.1.5 Análise de indicadores do estresse oxidativo 59
3.2.1.6 Análise dos danos no DNA 60
3.2.2 Experimento 2 61
3.2.2.1 Parâmetros espermáticos 61
3.2.3 Análise estatística 61
3.3 RESULTADOS 62
3.3.1 Taxas de fertilização, eclosão e normalidade larval 62
3.3.2 Indicadores do estresse oxidativo 65
3.3.3 Danos no DNA 69
3.3.4 Parâmetros espermáticos 70

3.4 DISCUSSÃO 82
3.5 CONCLUSÃO..... 87
3.6 REFERÊNCIAS 88
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 95

1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos são considerados os receptores finais dos poluentes lançados no meio ambiente, estando sujeitos a ação de contaminantes aéreos e terrestres, que chegam, respectivamente, aos corpos hídricos por deposição atmosférica e mediante escoamento superficial destes pelas chuvas (DOMINGOS, 2006).

Os resíduos de agrotóxicos chegam ao ambiente aquático através de escoamento direto, lixiviação, lavagem de equipamentos e descarte inadequado de embalagens vazias. A contaminação da água vai depender das características físicas e químicas do composto e da interação dos agrotóxicos com as águas superficiais e subterrâneas e com o solo (CALDAS et al., 2011).

Os agrotóxicos são produtos formulados, utilizados no ambiente agrícola visando o controle de pragas (insetos, animais, plantas ou fungos). Mesmo que a função letal dos agrotóxicos seja direcionada, estes também podem ocasionar danos fora do seu alvo (VEIGA et al., 2006). Em viveiros escavados, o uso de herbicidas para eliminar todas as plantas aquáticas pode reduzir o habitat dos peixes, o suprimento de alimentos, o oxigênio dissolvido e a produtividade dos peixes (HELFRICH et al., 2009).

Os herbicidas são largamente usados para o controle de plantas indesejáveis na agricultura (CERICATO et al., 2008), mas também são extensivamente usados em sistema aquáticos, para o manejo de plantas como o aguapé, alface d'água, salvínia e taboa. Com a intenção de reduzir o desenvolvimento destas plantas ou mesmo eliminá-las são utilizados os herbicidas ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que é um regulador de crescimento, e o glifosato, que inibe a síntese de aminoácidos (MARTINS et al., 1999).

O 2,4-D faz parte da família dos herbicidas clorofenoxiacéticos (RODRIGUES; SERRA, 1996). Suas formulações a base de amina e éster são utilizadas para controlar plantas daninhas de folhas largas em pastagens, plantações, gramados e sistemas aquáticos (NETHERLAND, 2014). O glifosato é um herbicida pós-emergente, pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas, não-seletivo e com amplo espectro de ação, o que propicia um ótimo manejo de plantas daninhas anuais ou perenes, tanto de folhas largas como estreitas (GALLI; MONTEZUMA, 2005). O glifosato também é utilizado diretamente nas folhas de plantas semiaquáticas, como juncos, taboas e salvínia, contaminando o meio aquático (GONÇALVES et al., 2018).

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie endêmica do sul da América do Sul, que pode ser produzida em qualquer região de clima temperado ou subtropical (CERICATO et al., 2008).

Testes ecotoxicológicos com algumas espécies de peixes (*Danio rerio*, *Pimephales promelas*, *Oncorhynchus mykiss* e *Salvelinus fontinalis*) já são padronizados, por apresentarem relativa sensibilidade, biologia e comportamento bem conhecidos. No entanto, é fundamental compreender os impactos das sustâncias tóxicas em espécies nativas brasileiras, para a identificação de fontes de contaminação ambiental e melhor entendimento das condições das bacias hidrográficas locais (BASTOS, 2013).

Tendo em vista que na maioria das propriedades rurais do Sul do Brasil, a produção aquícola ainda é considerada uma atividade complementar à produção agrícola, uma vez que os viveiros escavados estão próximos as lavouras, ou ainda, são abastecidos com água que circula pelo solo cultivado (CERICATO et al., 2008), tornam-se extremamente importantes estudos avaliando a toxicidade dos herbicidas sobre espécies de peixes de interesse comercial. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos herbicidas 2,4-D, glifosato e a mistura de ambos sobre o estresse oxidativo, a genotoxicidade, as taxas de fertilização, eclosão, normalidade larval e sobre os parâmetros espermáticos em jundiás.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AGROTÓXICOS

De acordo com a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, são considerados agrotóxicos e afins: os produtos ou agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; e as substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989).

Os agrotóxicos são classificados de acordo com seu uso alvo. Os herbicidas são utilizados para eliminar ou impedir o crescimento de plantas daninhas, os inseticidas para controlar insetos, os fungicidas para combater doenças causadas por fungos, os nematicidas para controlar os nematoides (vermes redondos) do solo, das folhas e dos caules e os acaricidas para controlar ácaros e carrapatos (HELFRICH et al., 2009).

O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo desde o ano de 2008 (SESA, 2018). Os impactos positivos do uso de agrotóxicos na agricultura estão relacionados ao aumento da produtividade e a redução dos custos de produção, aliados ao significativo aumento do lucro dos agricultores (COUTINHO et al., 2005). Dentre os impactos negativos, podemos mencionar o uso ilegal de agrotóxicos contrabandeados, a maior quantidade de agrotóxico usado nas culturas agrícolas geneticamente modificadas, em função do próprio sistema de manejo, a aplicação em quantidades maiores do que as recomendadas, visando potencializar o efeito do agrotóxico, seja pelo aumento do número de aplicações e/ou pelo aumento da quantidade de produto por hectare e a emissão de receituário agronômico, sem antes visitar a propriedade rural ou examinar a amostra do material infectado (LONDRES, 2011). O uso maciço de agrotóxicos traz como consequências sérios problemas à saúde humana, além dos danos à natureza pela degradação dos recursos naturais não renováveis, desequilíbrio e destruição da fauna e flora e poluição do ar, do solo e das águas superficiais e subterrâneas (SESA, 2018).

Os danos dos agrotóxicos à saúde humana incidem em eventuais efeitos como carcinogênese, mutagênese, teratogênese, neurotoxicidade, alterações imunológicas, problemas

reprodutivos e desregulações endócrinas. Em organismos aquáticos e terrestres, os agrotóxicos podem levar à morte dos animais, podendo prejudicar algumas espécies, resultando na mudança da dinâmica bioquímica natural e na alteração do funcionamento de todo o ecossistema afetado (SPADOTTO, 2006).

Em 19 anos, o consumo de agrotóxicos no Brasil cresceu mais de 281%, ao subir de 162.461,96 toneladas em 2000 para 620.537,98 toneladas em 2019 (IBAMA, 2020a). O glifosato e o 2,4-D são os herbicidas mais vendidos no país. No ano de 2019, o glifosato representou cerca de 35% do consumo de agrotóxicos, quando foram comercializadas 217.592,24 toneladas da substância, e o 2,4-D representou cerca de 8% do consumo de agrotóxicos, quando foram comercializadas 52.426,92 toneladas da substância (IBAMA, 2020b).

O Estado do Paraná é o terceiro maior consumidor de agrotóxicos do país (SESA, 2018). O volume total de agrotóxicos vendidos foi de 92.904,3 toneladas em 2018 e 95.286,8 toneladas em 2019 (ADAPAR, 2020). Dos 10 municípios do Paraná que mais comercializaram agrotóxicos entre os anos de 2014 a 2019, 4 municípios pertencem a Região Oeste do Paraná. A média de comercialização de agrotóxicos durante os anos de 2014 a 2019 nestas 10 cidades foram: Cascavel (2.559,7 toneladas/ano), Tibagi (1.798,8 toneladas/ano), Guarapuava (1.565,5 toneladas/ano), Castro (1.548,2 toneladas/ano), Assis Chateaubriand (1.447,8 toneladas/ano), Toledo (1.408,4 toneladas/ano), Candói (1.354,1 toneladas/ano), Palmeira (1.229,9 toneladas/ano), Ponta Grossa (1.109,4 toneladas/ano) e Palotina (1.079,6 toneladas/ano) (ADAPAR, 2020).

No Paraná, as culturas agrícolas que mais consumiram agrotóxicos em 2019 foram: soja 53,21%, milho 17,37%, trigo 9,01%, soja geneticamente modificada 6,67%, feijão 2,65%, pastagens 2,32%, cana-de-açúcar 1,86%, batata 1,47%, citros 1,16%, milho geneticamente modificado 1,04%, fumo 0,62% e mandioca 0,38%. O consumo quanto à classificação de uso agrícola em 2019 foi: herbicidas 64,37%, fungicidas 15,52%, inseticidas 10,18%, acaricida/fungicida 3,99% e acaricida/inseticida 3,72%. Já os ingredientes ativos mais consumidos em 2019 foram: glifosato e seus equivalentes 28,99%, paraquate 6,89%, 2,4-D e seus equivalentes 5,03%, atrazina 4,69%, mancozebe 3,54%, cletodim 2,53%, acefato 2,25% e imidacloprido 2,22% (ADAPAR, 2020).

2.2 ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D)

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um herbicida hormonal do grupo dos fenoxiacéticos, desenvolvido há mais de 80 anos, largamente utilizado no Brasil e no mundo para controle de plantas daninhas de folhas largas (SPADOTTO et al., 2003). Esse composto possui um grupo carboxílico polar e um grupo fenil lipofílico (AYAR et al., 2008), com fórmula molecular de $C_8H_6Cl_2O_3$, massa molar de 221,04 g mol^{-1}, ponto de fusão de 162,8°C, ponto de ebulição de 345,6°C e solubilidade em água de 900 mg L^{-1} a 25°C (FREITAS, 2017).

Em condições ambientais, o 2,4-D é um composto hidrofílico, que tende a ficar associado à água do solo (COSTA et al., 2016), sendo susceptível à degradação microbiana como a principal rota de degradação (MACHADO, 2004). A meia-vida do 2,4-D no solo é menor que 7 dias e na água o tempo de meia-vida do 2,4-D é de 7,5 dias (PRIMEL et al., 2005). Sua rápida degradação, mesmo sendo altamente solúvel em água, minimiza a lixiviação desse herbicida (ARAÚJO et al., 2019).

O 2,4-D é um herbicida mimetizador de auxina, um dos hormônios reguladores de crescimento das plantas (ROMAN et al., 2005). As auxinas sintéticas (2,4-D) possuem ação similar à auxina natural, porém potencializada, induzindo alterações metabólicas e bioquímicas no metabolismo de ácidos nucleicos e na plasticidade da parede celular (CARVALHO, 2013a), provocando crescimento descontrolado e letal nas plantas-alvo (BRADBERRY et al., 2004).

Os produtos comerciais à base de 2,4-D são, em geral, classificados como perigosos ao meio ambiente (classe III). O 2,4-D é considerado um herbicida altamente transportável, muito persistente e altamente tóxico para organismos aquáticos. Já para organismos do solo, aves e abelhas é considerado pouco tóxico (REBELO et al., 2010). A concentração letal (CL_{50}) do 2,4-D para *Rhamdia quelen* é 745,0 mg L^{-1} (CATTANEO et al., 2008).

2.3 GLIFOSATO

O glifosato é um herbicida de amplo espectro, utilizado em pós-emergência, pertencente ao grupo químico das glicinas e inibidor da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) (CARVALHO, 2013b). Esse composto possui os grupos funcionais carboxilato, amino e fosfonato (COUTINHO; MAZO, 2005), com fórmula molecular de $C_3H_8NO_5P$, massa molar de 169,07 g mol^{-1}, ponto de fusão de 184,5°C e solubilidade em água de 11600 mg L^{-1} a 25°C (MENSINK; JANSSEN, 1994).

Segundo Roman et al. (2005), o glifosato é altamente solúvel em água, praticamente insolúvel em solventes orgânicos, pouco volátil e apresenta forte tendência de adsorção no sedimento. Possui característica de um ácido fraco, com quatro constantes de ionização, o que ocasiona a degradação da molécula em ambientes com pH variando de 2 a 10 (MARIA, 2017). As constantes de ionização do glifosato são: pK_1 = < 2,0; pK_2 = 2,6; pK_3 = 5,6; pK_4 = 10,6 (SPRANKLE et al., 1975).

A meia- vida do glifosato no solo pode variar de alguns dias até vários meses, enquanto na água a meia-vida do glifosato varia entre 12 horas a 7 semanas (CETESB, 2018), sendo que a principal rota de degradação microbiana é a transformação do glifosato em seu metabólito: o ácido aminometilfosfônico (AMPA) (ARAÚJO et al., 2019). Silva et al. (2003) relataram a presença de glifosato em águas superficiais até 60 dias após a aplicação do herbicida. Já Giesy et al. (2000) estimaram uma faixa de variação na meia-vida do glifosato em ambientes aquáticos entre 7 e 14 dias.

O glifosato inibe a ação da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), impedindo a síntese de três aminoácidos aromáticos: a fenilalanina, a tirosina e o triptofano (CARVALHO, 2013a). A inibição da EPSPs pelo glifosato ocorre por competição com o substrato PEP (fosfoenolpiruvato), impedindo a transformação do chiquimato em corismato (CARVALHO, 2013b). A inibição da enzima leva à desregulação do fluxo de carbono na planta e a um acúmulo de compostos intermediários tóxicos, o chiquimato ou chiquimato-3-fosfato (ROMAN et al., 2005). Assim, quando a planta é tratada com glifosato, sua morte ocorre de forma lenta, em questões de dias ou semanas (COUTINHO; MAZO, 2005). Essa enzima não é encontrada em animais (COUTINHO et al., 2005), mas isto não impede que o glifosato seja absorvido por organismos não-alvo, interferindo em outras vias metabólicas (CARDOSO, 2018).

Os produtos comerciais à base de glifosato, em geral, são classificados como perigosos ao meio ambiente (classe III). O glifosato é tóxico para organismos aquáticos, pouco tóxico para organismos do solo, aves e abelhas, além de ser pouco bioacumulável. É um composto considerado pouco a medianamente persistente no solo, pouco móvel e apresenta alta absorção no solo (REBELO et al., 2010). A concentração letal (CL_{50}) do glifosato para *Rhamdia quelen* é 7,3 mg L^{-1} (KREUTZ et al., 2008).

2.4 CONTAMINAÇÃO DE AMBIENTES AQUÁTICOS POR 2,4-D E GLIFOSATO

Na aquicultura, as análises de qualidade de água são voltadas principalmente aos poluentes tradicionais, como os compostos nitrogenados (amônia, nitrito e nitrato), os compostos fosfatados (ortofosfato), a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e a demanda química de oxigênio (DQO). Pouca atenção tem sido dada aos poluentes agrícolas.

A resolução 357/2005 do CONAMA (BRASIL, 2005a), 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. Nesta resolução a concentração máxima de glifosato permitida é de 65,0 $\mu g\ L^{-1}$ em águas destinadas a produção de organismos aquáticos (água doce - classe 2), enquanto a concentração máxima de 2,4-D permitida em águas destinadas a produção de organismos aquáticos (água doce - classe 2) é de 4,0 $\mu g\ L^{-1}$.

Nos Estados Unidos, o limite máximo permitido em água potável para o glifosato é de 700,0 $\mu g\ L^{-1}$, enquanto para o 2,4-D esse valor é de 70,0 $\mu g\ L^{-1}$ (USEPA, 2018). Já na União Europeia o limite máximo para qualquer agrotóxico em água destinada ao consumo humano é de 0,10 $\mu g\ L^{-1}$, e a soma de todos os agrotóxicos detectados e quantificados não pode ultrapassar 0,50 $\mu g\ L^{-1}$ (UNIÃO EUROPEIA, 1998). No Brasil, por sua vez o limite máximo de glifosato em água potável é de 500,0 $\mu g\ L^{-1}$ e de 2,4-D é de 30,0 $\mu g\ L^{-1}$ (BRASIL, 2005b).

A maioria dos viveiros escavados no Brasil foi construído muito próximos a áreas de plantações agrícolas, facilitando a entrada de agrotóxicos nos corpos d’água receptores (BASTOS, 2013). Diante deste cenário, são mostrados a seguir os resultados de alguns trabalhos que comprovam o potencial dos herbicidas glifosato e 2,4-D de contaminarem os ambientes aquáticos (Tabela 1).

Tabela 1. Ocorrência de glifosato e 2,4-D em ambientes aquáticos

Herbicidas	Amostras, País	Concentração máxima ($\mu g\ L^{-1}$)	Referências
Glifosato	Água superficial, Suíça	4,2	Hanke et al. (2010)
	Água superficial, Argentina	7,6	Aparicio et al. (2013)
	Água superficial, Argentina	1,80	Primost et al. (2017)
	Água superficial, Argentina	700,0	Peruzzo et al. (2008)
	Água superficial, EUA	427,0	Scribner et al. (2007)
	Água superficial, França	50,0	Horth e Blackmore (2009)
	Água superficial, Brasil	> 100,0	Silva et al. (2003)
	Água superficial, Inglaterra	8,99	Ramwell et al. (2014)
	Água superficial, Brasil	91,91	Mendonça (2018)
	Água superficial, EUA	59,9	Ramirez et al. (2014)
	Água de piscicultura, Brasil	< 150,0	Peiter (2017)
	Água de rio, México	36,71	Ruiz-Toledo et al. (2014)
	Água de rio, EUA	3,08	Battaglin et al. (2014)
	Água de rio, Brasil	2024,0	Freire et al. (2012)
	Água de rio, Argentina	1600,0	Avigliano et al. (2015)
	Água de rio, México	< 20,0	Rangel (2016)
	Água de lavoura, Brasil	144,0	Mattos et al. (2002)
	Água de lago, China	10000,0	Zhang et al. (2016)
	Água de lago, EUA	301,0	Battaglin et al. (2014)
	Água de córregos, EUA	73,0	Battaglin et al. (2014)
	Água de córregos, EUA	8,7	Battaglin et al. (2005)
	Água de córrego, Brasil	1550,0	Tzaskos et al. (2012)
	Água subterrânea, México	18,43	Ruiz-Toledo et al. (2014)
	Água subterrânea, EUA	4,7	Scribner et al. (2007)
	Água subterrânea, França	24,0	Horth e Blackmore (2009)
	Água subterrânea, México	1,41	Rendón-von Osten e Dzul-Caamal (2017)
	Água subterrânea, EUA	2,03	Battaglin et al. (2014)
	Água potável, México	0,65	Rendón-von Osten e Dzul-Caamal (2017)
	Água da chuva, EUA	2,5	Chang et al. (2011)

Tabela 1. Ocorrência de glifosato e 2,4-D em ambientes aquáticos (continuação)

Herbicidas	Amostras, País	Concentração máxima ($\mu g\ L^{-1}$)	Referências
	Água da chuva, Bélgica	6,2	Quaghebeur et al. (2004)
	Água de abastecimento público, Brasil	3,3	Delmonico et al. (2014)
	Água de esgoto pluvial, França	90,0	Botta et al. (2009)
	Água de piscina vernal, EUA	328,0	Battaglin et al. (2009)
	Água de escoamento superficial, EUA	430,0	Coupe et al. (2011)
2,4-D	Água de piscicultura, Irã	14,9	Yamini e Saleh (2013)
	Água potável, Irã	16,4	Yamini e Saleh (2013)
	Água da chuva, Bélgica	0,22	Quaghebeur et al. (2004)
	Água de rio, Irã	16,6	Yamini e Saleh (2013)
	Água de rio, Brasil	> 2,0	Primel et al. (2005)
	Água de rio, México	4,11	Rangel (2016)
	Água de rio, UE	1,22	Loos et al. (2009)
	Água de rio, Brasil	3,4	Marchesan et al. (2010)
	Água de rio, Brasil	5080,0	Chaim et al. (2010)
	Água de rio, Chile	9,7	Palma et al. (2004)
	Água de riacho, Canadá	5,25	Hall et al. (1993)
	Água de lavoura, Brasil	> 2,0	Primel et al. (2005)
	Água de lago, EUA	24,0	Borges et al. (2004)
	Água de lagoa, Canadá	0,29	Waite et al. (2002)
	Águas urbanas e agrícolas, Canadá	1,23	Woudneh et al. (2007)
	Água superficial, EUA	11,0	Mulder e Schmidt (2011)
	Água superficial, Brasil	74,5	Pinheiro et al. (2010)
	Água superficial, Bulgária	1,77	Balinova e Mondesky (1999)
	Água de esgoto pluvial, Canadá	2,75	Raina et al. (2011)
	Água subterrânea, Irlanda	0,007	McManus et al. (2014)
	Água subterrânea, Brasil	1,15	Pinheiro et al. (2010)
	Água subterrânea, Bulgária	1,6	Balinova e Mondesky (1999)
	Água de piscina vernal, EUA	< 0,038	Battaglin et al. (2009)
	Água de áreas úmidas, Canadá	2,04	Donald et al. (2001)

EUA: Estados Unidos da América; UE: União Europeia

Mattos et al. (2002) detectaram na lâmina de água de lavoura de arroz irrigado (RS) uma concentração de 144,0 μg L^{-1} de glifosato. No rio Santo Antônio, na fronteira do Brasil com a Argentina, a concentração de glifosato encontrada foi de 1600,0 μg L^{-1} (AVIGLIANO et al., 2015). Em águas superficiais da microbacia hidrográfica arroio Passo do Pilão (RS) foram detectadas concentrações de glifosato acima de 100,0 μg L^{-1}, principalmente em pontos próximos às áreas de intensa atividade agrícola (SILVA et al., 2003).

Na planície do Danúbio, na Bulgária o 2,4-D foi encontrado em águas superficiais e subterrâneas em concentrações máximas, respectivamente de 1,77 e 1,6 μg L^{-1} (BALINOVA; MONDESKY, 1999). Em um riacho urbano, na província de Ontário, Canadá a concentração máxima de 2,4-D detectada foi 5,25 μg L^{-1} durante o período de aplicação do produto (HALL et al., 1993). A concentração máxima de 2,4-D encontrada em amostras de água do rio Traiguén, Temuco, Chile foi de 9,7 μg L^{-1} (PALMA et al., 2004).

Poucos trabalhos detectaram a presença do 2,4-D e glifosato em águas de pisciculturas. Yamini e Saleh (2013) coletaram amostras de água de um tanque de piscicultura no norte do Irã, e encontraram o 2,4-D na concentração de 14,9 μg L^{-1}. Peiter (2017) analisando águas de viveiros escavados da Região Oeste do Paraná detectou a presença de glifosato + AMPA em valores abaixo de 150,0 μg L^{-1}. Em resumo, foi observada a contaminação de ambientes aquáticos pelos herbicidas 2,4-D e glifosato em todo o mundo, muitas vezes com valores acima dos limites aceitáveis, por isso sua toxicidade em peixes merece ser melhor investigada.

2.5. PRODUÇÃO DE PEIXES NO BRASIL E A ESPÉCIE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)

A produção aquícola é uma atividade que está em franco crescimento no Brasil. Em 2020, foram produzidas 802.930 toneladas de peixes no país, representando um crescimento de 5,93% sobre as 758.006 toneladas do ano anterior (PEIXE BR, 2021).

O Sul é a região com maior participação na produção aquícola brasileira. Em 2020, foram produzidas 249.802 toneladas, representando 31,1% da produção total. Este resultado é reflexo do excelente desempenho do Estado do Paraná que se consolida como líder nacional na produção de peixes, tendo produzido 172.000 toneladas em 2020 (PEIXE BR, 2021).

A produção de espécies nativas recuou em 2020, atingindo 278.671 toneladas, diminuição de 3,2% em relação ao ano anterior, representando 34,7% da produção total. O Paraná é o maior produtor de peixes nativos da região Sul do Brasil, tendo registrado em 2020 a produção de 3.800 toneladas (PEIXE BR, 2021).

Segundo o último levantamento realizado pela Secretaria da Agricultura e do Abastecimento, a produção de bagres nos municípios paranaenses no ano de 2018 foi de 395,8 toneladas (SEAB, 2018). Dados do Censo Agropecuário referentes a 2017 apontam que, em 36.017 estabelecimentos brasileiros havia criação de jundiá (*Rhamdia quelen*) e que deste total, 35.149 estabelecimentos pertenciam a região Sul (IBGE, 2018).

O jundiá se destaca entre as espécies nativas produzidas no Sul do Brasil, porque tolera as baixas temperaturas no inverno, cresce rápido no verão (BARCELLOS et al., 2004), apresenta bom desempenho produtivo e domínio dos métodos de reprodução em cativeiro (BOMBARDELLI et al., 2006). Além disso, é um peixe muito apreciado pelo mercado consumidor, devido a qualidade de sua carne e a ausência de espinhos intramusculares (ZANIBONI FILHO, 2004).

Esta espécie pertence à classe Actinopterygii, ordem Siluriformes e família Heptapteridae (FERRARO, 2009), sendo um bagre de ampla distribuição geográfica, tendo sua ocorrência registrada desde o sudeste do México até o centro da Argentina (ZANIBONI FILHO, 2004). O jundiá resiste a variações de pH entre 6,0 - 7,5 e a variações de temperatura entre 18ºC a 30ºC e quando adultos podem atingir o tamanho de 35 cm (FERRARO, 2009).

A coloração do jundiá varia de marrom avermelhado a cinza escuro e apresenta barbilhões sensitivos (ZANIBONI FILHO, 2004). Possuem hábitos noturnos, alimentam-se de invertebrados aquáticos e terrestres e vivem em profundidades de 0 a 3 metros (FERRARO, 2009). O período reprodutivo da espécie pode ser alterado de um ano para o outro e de uma região para a outra, mas normalmente estende-se entre os meses de setembro a fevereiro (NARAHARA et al., 1988).

Para todas as fases de vida do jundiá (ovo, larva, alevino e adulta) são necessários níveis ideais de determinados parâmetros de qualidade de água (BALDISSEROTTO; RADÜNZ NETO, 2004). No entanto, na aquicultura são monitorados com frequência apenas os parâmetros físicos e químicos da água de criação destes animais, não podendo prever assim quais serão os impactos dos poluentes agrícolas sobre o crescimento e reprodução desta espécie. Diante disto, os testes ecotoxicológicos são essenciais para compreender os efeitos dos contaminantes ambientais nesta espécie nativa.

2.6 BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)

Os biomarcadores são definidos como alterações celulares, bioquímicas, moleculares ou fisiológicas mensuradas em células, fluidos corporais, tecidos ou órgãos de um organismo e que são indícios da exposição e/ou efeito de um poluente (LAM; GRAY, 2003). Análises histológicas, histoquímicas e imuno-histoquímicas, testes como o micronúcleo písceo, ensaio cometa, identificação da atividade enzimática, observação de alterações morfológicas e no desenvolvimento embrionário e larval, são os principais biomarcadores utilizados em peixes (CARDOSO, 2018). A seguir, são mostrados os resultados de diferentes estudos envolvendo os herbicidas glifosato e 2,4-D e quais alterações estes herbicidas causaram em jundiás.

Jundiás expostos ao glifosato (0,2 e 0,4 mg L^{-1}) por 96 horas apresentaram aumento significativo dos níveis de glicogênio hepático e da glicose no músculo, redução dos níveis de glicogênio muscular e da glicose no fígado, aumento dos níveis de lactato no fígado e no músculo, aumento dos níveis de proteína no fígado e diminuição no músculo, diminuição da atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro, aumento da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no músculo, e redução de TBARS no cérebro (GLUSCZAK et al., 2007).

Ferreira et al. (2010) estudaram os efeitos do glifosato (1,21 mg L^{-1}), metil paration (0,8 mg L^{-1}) e tebuconazol (0,88 mg L^{-1}) em jundiás após 96 horas de exposição. Os peixes expostos aos três agrotóxicos mostraram uma diminuição significativa da atividade da catalase (CAT) e aumento da atividade da glutationa-S-transferase (GST) e da glutationa reduzida (GSH) no tecido hepático.

Murussi et al. (2015) testaram três formulações comerciais à base de glifosato (2,5 e 5,0 mg L^{-1}) por 96 horas em jundiás. No fígado, os níveis de TBARS aumentaram e a CAT diminuiu. Em todos os tratamentos contendo glifosato foram observadas alterações histopatológicas no tecido hepático como vacuolização, infiltração de leucócitos, degeneração do citoplasma e melanomacrófago.

Alevinos de jundiá expostos ao glifosato (11,29 mg L^{-1}) por 30 dias tiveram redução de peso, aumento nos níveis de TBARS no fígado e no cérebro, aumento nos níveis de grupos sulfidrílicos (SH) no fígado, rim e cérebro, e diminuição no músculo e aumento da atividade da δ-aminolevulinato desidratase (δ-ALA-D) no fígado, músculo e cérebro (SILVA, 2016). Koakoski et al. (2014) também observaram redução no peso e na taxa de sobrevivência em jundiás expostos ao glifosato (1,21 mg L^{-1}) por 180 dias.

Jundiás expostos ao glifosato (0,2 e 0,4 mg L^{-1}) por 96 horas apresentaram níveis de glicose plasmática reduzidos, enquanto as atividades da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) aumentaram após a exposição ao herbicida. A exposição ao herbicida aumentou a proteína e níveis de glicose na camada de muco. Houve um aumento da atividade de trifosfato difosfoidrolase (NTPDase) e da ecto-5'-nucleotidase no cérebro e aumento na proteína carbonil no fígado (LORO et al., 2015).

Jundiás expostos ao glifosato (0,45 e 0,95 mg L^{-1}) por 8 dias tiveram aumento dos níveis de TBARS no fígado e no músculo na concentração mais alta e no cérebro nas duas concentrações. A proteína carbonil aumentou no fígado e os níveis de GST diminuíram em ambas as concentrações. Os níveis de tiol não proteicos diminuíram na concentração de 0,95 mg L^{-1} (MENEZES et al., 2011).

Ferraro (2009) avaliou o potencial bioindicador do jundiá em ensaios de biomonitoramento ambiental através do teste do micronúcleo písceo e do ensaio cometa. Os peixes foram expostos ao glifosato (1,58 e 3,16 mg L^{-1}), ao tebuconazol (0,4 e 0,8 mg L^{-1}) e a mistura de ambos (3,16 e 0,8 mg L^{-1}) por 5, 10 e 15 dias. O dano ao DNA foi confirmado pelas duas análises, sendo a mistura dos agrotóxicos mais genotóxica do que os produtos isolados.

Sobjak et al. (2017) avaliaram a taxa de sobrevivência de ovos/larvas de jundiás expostos a uma concentração subletal de glifosato (6,5 mg L^{-1}) após 12, 24, 48 e 72 horas. A partir das 48 horas de exposição ao herbicida foi observada diferença significativa na taxa de sobrevivência, sendo maior no grupo exposto ao glifosato (93%) em relação ao grupo controle (75%).

A exposição de jundiás a uma concentração subletal de glifosato (0,73 mg L^{-1}) por 96 horas diminuiu o número de eritrócitos, trombócitos, linfócitos e leucócitos totais. Em contrapartida, ocorreu um aumento no número de células circulantes imaturas (KREUTZ et al., 2011). Também foi observado a diminuição da fagocitose de células imunes e aumento da suscetibilidade ao patógeno *Aeromonas hydrophila*, ocasionando uma redução na taxa de sobrevivência (KREUTZ et al., 2010).

Soso et al. (2007) verificaram que o glifosato (3,6 mg L^{-1}) afeta a reprodução de jundiás, atuando como um desregulador endócrino, pois fêmeas expostas ao herbicida produziram um número menor de alevinos viáveis, além de terem os níveis 17β-estradiol diminuídos após 40 dias de exposição. Os autores também observaram que os níveis de ALT e de cortisol aumentaram após 20 dias de exposição ao glifosato.

Os níveis de cortisol em jundiás expostos a concentrações subletais (1,2; 2,43 e 3,65 mg L^{-1}) de glifosato por 96 horas foram superiores aos níveis do grupo controle, indicando que este

composto (ou o adjuvante adicionado à formulação comercial) provocou estresse em alevinos de *Rhamdia quelen* (CERICATO et al., 2008).

Cattaneo et al. (2008) estudou os efeitos do herbicida 2,4-D (400, 600 e 700 mg L^{-1}) por 96 horas em jundiás. A atividade da AChE aumentou no cérebro nas duas maiores concentrações testadas e diminuiu no tecido muscular em todas as concentrações testadas. O glicogênio diminuiu tanto no fígado quanto no músculo, enquanto os níveis de lactato foram reduzidos no tecido hepático e aumentados no tecido muscular. Na concentração mais alta testada, os níveis de glicose reduziram no fígado e no músculo, ao contrário da glicose plasmática que teve seus níveis aumentados. A análise histológica no fígado mostrou alterações nos cordões de arranjo e vacuolização de hepatócitos no grupo exposto ao 2,4-D na concentração de 700 mg L^{-1}.

Menezes et al. (2014) verificaram que o 2,4-D afeta o crescimento e os parâmetros bioquímicos de jundiás após 90 dias de exposição. Os peixes expostos a 0,5 ou 2,0 mg L^{-1} apresentaram parâmetros de crescimento diminuídos. Também apresentaram glicogênio hepático e renal reduzido nas duas concentrações testadas, enquanto no músculo o glicogênio foi reduzido apenas na concentração de 2,0 mg L^{-1}. A glicose aumentou no fígado e diminuiu no músculo e rins. O lactato aumentou em todos os tecidos e diminuiu no plasma. Os níveis de TBARS foram reduzidos no fígado e aumentados no músculo. O 2,4-D aumentou a atividade da catalase no fígado.

Os agrotóxicos podem prejudicar a função reprodutiva ou endócrina em animais de produção, animais selvagens e humanos (APODACA; MATTESSICH, 1997). No entanto, poucos estudos abordando os impactos dos herbicidas 2,4-D e glifosato sobre os parâmetros reprodutivos foram realizados em jundiás. Porém, em diferentes espécies de peixe os danos reprodutivos já foram comprovados (Tabela 2).

Tabela 2. Efeitos reprodutivos do 2,4-D e do glifosato em peixes

Herbicidas	Espécie	Concentração (mg L^{-1})	Tempo de exposição	Efeitos	Referências
2,4-D	*Oncorhynchus mikiss*	1,64	7 d	Níveis plasmáticos de vitelogenina 93 vezes maiores	Xie et al. (2005)
	Pimephales promelas	96,5	21 d	Diminuição da fecundidade	Coady et al. (2013)
	Danio rerio	0,1; 0,5 e 1,0	5 d	Inibição do crescimento de ovócitos, aumento no número de ovócitos atrésicos e diminuição da proporção de ovócitos em desenvolvimento	Koç e Akbulut (2012)
	Goodea atripinnis	143,35 e 230,96	96 h	Fêmeas apresentaram aumento da atresia ovocitária e hipertrofia das células foliculares, além de alterações nas membranas mitocondrial e nuclear dos ovócitos. Machos apresentaram vacuolização da espermatogônia e das células de Sertoli e alterações nas mitocôndrias das espermátides	Guerrero-Estévez e López-López (2016)
	Chapalichthys encaustus	94,06 e 133,72	96 h	Fêmeas apresentaram ovócitos com características precoces de atresia e hipertrofia das células foliculares, alterações nas membranas mitocondrial e nuclear dos ovócitos. Machos apresentaram alterações na crista mitocondrial nas espermátides	Guerrero-Estévez e López-López (2016)
	Clarias batrachus	75,0	96 h	Nos machos, os túbulos eram relativamente menores em tamanho e continham principalmente espermátides. Algumas células dos túbulos seminíferos apresentavam sinais de necrose caracterizada pela dissolução do núcleo e da membrana nuclear. As células de Leydig foram hipertrofiadas. Nas fêmeas foi observado ovócitos atrésicos e perda das cristas mitocondriais dos ovócitos	Ateeq et al. (2006)

Tabela 2. Efeitos reprodutivos do 2,4-D e do glifosato em peixes (continuação)

Herbicidas	Espécie	Concentração (mg L^{-1})	Tempo de exposição	Efeitos	Referências
	Pimephales promelas	0,05; 0,5 e 2,0	28 d	Aumento do índice gonadossomático (IGS) e da atresia ovocitária e retardo da maturação gonadal nas fêmeas	DeQuattro e Karasov (2016)
	Fundulus heteroclitus	0,01; 0,10 e 1,00	7, 14 e 21 d	Indução da proliferação peroxissomal	Ackers et al. (2000)
Glifosato	*Danio rerio*	0,065	15 d	Aumento no diâmetro dos ovócitos, no índice gonadossomático e maior expressão do fator esteroidogênico 1 (SF-1) nos ovócitos. Formações membranosas concêntricas tipo *myelin-like*, associadas aos grânulos de vitelo periféricos no citoplasma dos ovócitos	Armiliato et al. (2014)
	Danio rerio	0,065; 0,65 e 6,5	15 d	Diminuição no diâmetro dos ovócitos e um aumento da proteína vitelina nos ovários das fêmeas, além de zonas de vacuolização nas células foliculares e um aumento do espaço perivitelínico, com presença de macro e micro vesículas, bem como compartimentos mitocondriais comprometidos nos ovários. Redução do número de mitocôndrias e um aumento de mitocôndrias alteradas com uma severidade alta nos ovócitos, bem como uma diminuição no conteúdo de Drp1, Mfn1 e Mfn2 envolvidas na fissão e fusão mitocondrial	Davico (2017)
	Danio rerio	5,0 e 10,0	24 e 96 h	Redução da motilidade espermática, do tempo de motilidade, da funcionalidade mitocondrial, da integridade da membrana e da integridade do DNA dos espermatozoides	Lopes et al. (2014)
	Danio rerio	0,065	360 h	Machos apresentaram alterações nas células de Sertoli, alterações das interações entre células de Sertoli e células germinativas e perda das pontes citoplasmáticas entre as células germinativas	Nezzi (2015)

Tabela 2. Efeitos reprodutivos do 2,4-D e do glifosato em peixes (continuação)

Herbicidas	Espécie	Concentração (mg L^{-1})	Tempo de exposição	Efeitos	Referências
	Danio rerio	10,0	21 d	Fêmeas e machos apresentaram, respectivamente, alterações na expressão dos genes *cyp19a1* e *esr1* no ovário e *hsd3b2*, *cat* e *sod1* no testículo	Uren Webster et al. (2014)
	Oryzias latipes	0,5 e 5,0	15 d	Diminuição na taxa de eclosão e anormalidades morfológicas em embriões. Regulação negativa de *Dnmt1* e regulação positiva de *Tet1*, *Tet2* e *Tet3* em embriões. A expressão de *Gpr54-1* e *Gpr54-2* foi reduzida no cérebro das fêmeas. Nos testículos, os genes reprodutivos *Fshr*, *Arα*, *Dmrt1* e *Dnmt1* foram reduzidos	Smith et al. (2019)
	Jenynsia multidentata	0,5	7 e 28 d	Diminuição no número de cópulas e sucesso de acasalamento em peixes machos	Hued et al. (2012)
	Poecilia reticulata	0,05 e 0,1	48 h	Machos não expostos ao glifosato diminuem a exibição para fêmeas expostas ao glifosato e evitam copular com fêmeas expostas à concentração de 0,1 mg L^{-1}. Fêmeas expostas ao glifosato são menos receptivas à cópula. O glifosato afetou a morfologia dos espermatozoides, onde machos expostos a 0,05 mg L^{-1} apresentaram maior quantidade de células com danos primários	Gonçalves (2017)
	Astyanax lacustris	0,05; 0,3 e 1,8	-	A motilidade espermática após a ativação com glifosato foi zero em todas as concentrações. A viabilidade das células espermáticas foi prejudicada em 0,3 e 1,8 mg L^{-1}	Gonçalves et al. (2018)
	Poecilia reticulata	17,13; 34,26 e 51,39	96 h	Machos apresentaram regressão testicular pela redução das medidas morfométricas, redução do número de compartimentos espermáticos, redução do índice gonadossomático e alterações histológicas nos testículos	Pires (2013)

Tabela 2. Efeitos reprodutivos do 2,4-D e do glifosato em peixes (continuação)

Herbicidas	Espécie	Concentração (mg L^{-1})	Tempo de exposição	Efeitos	Referências
	Jenynsia multidentata	0,5	24 e 96 h	Redução da motilidade e da concentração espermática	Sánchez et al. (2017)
	Austrolebias nigrofasciatus	0,36	96 h	Casais expostos ao glifosato produziram menos embriões, porém com maior diâmetro embrionário	Zebral et al. (2018)
	Hyphessobrycon eques	0,25; 0,50 e 1,00	96 h	Machos apresentaram redução dos cistos de espermátides e diâmetro tubular, redução do número de células da linhagem espermatogênica (espermatogônia A e B e espermatócito I), cisto de espermatócitos I, aumento de cistos rompidos, alterações ligadas ao processo de necrose como picnose nuclear e vacuolização citoplasmática	Nunes (2011)
	Poecilia vivipara	0,13 e 0,70	96 h	Machos apresentaram uma baixa qualidade espermática, mensurada pela redução da integridade da membrana plasmática, funcionalidade mitocondrial, integridade do DNA e motilidade espermática	Harayashiki et al. (2013)
	Danio rerio	0,065	15 d	Aumento na massa dos ovários, bem como aumento no índice gonadossomático em ovários	Silva et al. (2017)
	Odontesthes humensis	7,8	24 h	Diminuição significativa dos parâmetros de cinética espermática. Aumento na fluidez da membrana, na produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS), na peroxidação lipídica e diminuição na funcionalidade mitocondrial em espermatozoides	Silveira et al. (2019)

2.7 REFERÊNCIAS

ACKERS, J.T.; JOHNSTON, M.F.; HAASCH, M.L. Immunodetection of hepatic peroxisomal PMP70 as an indicator of peroxisomal proliferation in the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. **Marine Environmental Research**, v. 50, n. 1-5, p. 361-365, 2000.

AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ - ADAPAR. **Dados do SIAGRO**. 2020. Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=389>. Acesso em: 21/05/2020.

APARICIO, V.C.; DE GERÓNIMO, E.; MARINO, D.; PRIMOST, J.; CARRIQUIRIBORDE, P.; COSTA, J.L. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. **Chemosphere**, v. 93, n. 9, p. 1866-1873, 2013.

APODACA, J.; MATTESSICH, J. **The effects of endocrine-disrupting chemicals on survivorship and fecundity. A potential cause for extinction?** 1997.

ARAÚJO, V.C.R.; FERREIRA, T.C.; SANTOS, M.L.M.; RAMOS, G.S.; GOMES, G.R. Impactos Ambientais de Pesticidas sobre o Solo. In: ZABOTTO, A.R. (Ed.). **Estudos Sobre Impactos Ambientais**: Uma Abordagem Contemporânea. FEPAF: Botucatu, 2019. p. 128-143.

ARMILIATO, N.; AMMAR, D.; NEZZI, L., STRALIOTTO, M.; MULLER, Y.M.R.; NAZARI, E.M. Changes in Ultrastructure and Expression of Steroidogenic Factor-1 in Ovaries of Zebrafish Danio rerio Exposed to Glyphosate. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues**, v. 77, n. 7, p. 405-414, 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA - PEIXE BR. **Anuário Peixe BR da Piscicultura 2021**, 2021.

ATEEQ, B.; FARAH, M.A.; AHMAD, W. Evidence of apoptotic effects of 2,4-D and butachlor on walking catfish, *Clarias batrachus*, by transmission electron microscopy and DNA degradation studies. **Life Sciences**, v. 78, n. 9, p. 977-986, 2006.

AVIGLIANO, E.; SCHENONE, N.F. Human Health Risk Assessment and Environmental Distribution of Trace Elements, Glyphosate, Fecal Coliform and Total Coliform in Atlantic Rainforest Mountain Rivers (South America). **Microchemical Journal**, v. 122, p. 149-158, 2015.

AYAR, N.; BILGIN, B.; ATUN, G. Kinetics and equilibrium studies of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid adsorption on bituminous shale. **Chemical Engineering Journal**, v. 138, n. 1-3, p. 239-248, 2008.

BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. **Criação de Jundiá**. Santa Maria: Editora UFSM, 2004. 232p.

BALINOVA, A.M.; MONDESKY, M. Pesticide contamination of ground and surface water in Bulgarian Danube plain. **Journal of Environmental Science & Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 34, n. 1, p. 33-46, 1999.

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; FIOREZE, I.; CERICATO, L.; SOSO, A.B.; FAGUNDES, M.; CONRAD, J.; BALDISSERA, R.K.; BRUSCHI, A.; RITTER, F. Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. **Aquaculture**, v. 232, n. 1-4, p. 383-394, 2004.

BASTOS, D.N. **Toxicidade do herbicida Glifosato em *Daphnia magna* e pós-larvas de *Rhamdia quelen***. 2013. 38f. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo.

BATTAGLIN, W.A.; KOLPIN, D.W.; SCRIBNER, E.A.; KUIVILA, K.M.; SANDSTROM, M.W. Glyphosate, other herbicides, and transformation products in midwestern streams, 2002[1]. **JAWRA Journal of the American Water Resources Association**, v. 41, n. 2, p. 323-332, 2005.

BATTAGLIN, W.A.; RICE, K.C.; FOCAZIO, M.J.; SALMONS, S.; BARRY, R.X. The occurrence of glyphosate, atrazine, and other pesticides in vernal pools and adjacent streams in Washington, DC, Maryland, Iowa, and Wyoming, 2005–2006. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 155, n. 1-4, p. 281-307, 2009.

BATTAGLIN, W.A.; MEYER, M.T.; KUIVILA, K.M.; DIETZE, J.E. Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in US soils, surface water, groundwater, and precipitation. **JAWRA Journal of the American Water Resources Association**, v. 50, n. 2, p. 275-290, 2014.

BOMBARDELLI, R.A.; MÖRSCHBÄCHER, E.F.; CAMPAGNOLO, R.; SANCHES, E.A.; SYPERRECK, M.A. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1251-1257, 2006.

BORGES, S.; DZUBOW, C.; ORRICK, G.; STAVOLA, A. 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Analysis of Risks to Endangered and Threatened Salmon and Steelhead. **Environmental Field Branch Office of Pesticide Programs**, 2004.

BOTTA, F.; LAVISON, G.; COUTURIER, G.; ALLIOT, F.; MOREAU-GUIGON, E.; FAUCHON, N.; GUERY, B.; CHEVREUIL, M.; BLANCHOUD, H. Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surface waters through urban sewerage systems. **Chemosphere**, v. 77, n.1, p. 133-139, 2009.

BRADBERRY, S.M.; PROUDFOOT, A.T.; VALE, J.A. Poisoning Due to Chlorophenoxy Herbicides. **Toxicological Reviews**, v. 23, n. 2, p. 65-73, 2004.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de

agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 1989.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA. Resolução 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**, n. 53, p. 58-63, 2005a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. **Portaria MS n.º 518/2004** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005b. 28p. – (Série E. Legislação em Saúde).

CALDAS, S.S.; ZANELLA, R.; PRIMEL, E.G. Risk Estimate of Water Contamination and Occurrence of Pesticide in the South of Brazil. In: KORTEKAMP, A. (Ed.). **Herbicides and Environment**. Rijeka, Croatia: InTech, 2011. p. 471-492.

CARDOSO, C.M.N.S. **Toxicidade do glifosato em peixes teleósteos: uma revisão bibliográfica**. 2018. 61f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CARVALHO, L.B. **Plantas Daninhas**. 1.ed. Lages: Editado pelo autor, 2013a. 82p.

CARVALHO, L.B. **Herbicidas**. 1.ed. Lages: Editado pelo autor, 2013b. 62p.

CATTANEO, R.; LORO, V.L.; SPANEVELLO, R.; SILVEIRA, F.A.; LUZ, L.; MIRON, D.S.; FONSECA, M.B.; MORAES, B.S.; CLASEN, B. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxiacetic acid (2,4-D) herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 92, n. 3, p. 133-137, 2008.

CERICATO, L.; NETO, J.G.M.; FAGUNDES, M.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; FINCO, J.; ROSA, J.G.S.; KOAKOSKI, G.; CENTENARO, L.; POTTKER, E.; ANZILIERO, D.; BARCELLOS, L.J.G. Cortisol response to acute stress in jundiá *Rhamdia quelen* acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 148, n. 3, p. 281-286, 2008.

CHAIM, C.F.; PLESE, L.P.M.; CONSOLIN-FILHO, N. **Monitoramento do Rio Iquiri no Município de Capixaba/AC do herbicida 2,4-D Utilizado na Cultura da Cana-de-Açúcar**. V Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica - CONNEPI, 2010.

CHANG, F.C.; SIMCIK, M.F.; CAPEL, P.D. Occurrence and fate of the herbicide glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 3, p. 548-555, 2011.

COADY, K.; MARINO, T.; THOMAS, J.; SOSINSKI, L.; NEAL, B.; HAMMOND, L. An evaluation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in the Amphibian Metamorphosis Assay and

the Fish Short-Term Reproduction Assay. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 90, p. 143-150, 2013.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. **Glifosato**. 2018. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2018/07/Glifosato.pdf>. Acesso em: 31/03/2019.

COSTA, D.G.; CAMPOS, T.M.P.; LANGENBACH, T.; NUDI, A.H. **Volatilização do 2,4-D Aplicado na Superfície de Solos em Diferentes Horários**. XVIII Congresso Brasileiro de Mecânica dos Solos e Engenharia Geotécnica - COBRAMSEG, 2016.

COUPE, R.H.; KALKHOFF, S.J.; CAPEL, P.D.; GREGOIRE, C. Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. **Pest Management Science**, v. 68, n. 1, p. 16-30, 2011.

COUTINHO, C.F.B.; MAZO, L.H. Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1038-1045, 2005.

COUTINHO, C.F.B.; TANIMOTO, S.T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G.S.; TAKAYAMA, M.; DO AMARAL, R.B.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A.; MACHADO, S.A.S. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.

DAVICO, C.E. **Toxicidade celular do herbicida à base de glifosato, Roundup® WG: impactos sobre a organização morfofuncional dos ovários do peixe-zebra *Danio rerio*, como modelo experimental**. 2017. 81f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DELMONICO, E.L.; BERTOZZI, J.; DE SOUZA, N.E.; OLIVEIRA, C.C. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid for assessing the quality tap water using SPE and HPLC. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 36, n. 3, p. 513-519, 2014.

DEQUATTRO, Z.A.; KARASOV, W.H. Impacts of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid aquatic herbicide formulations on reproduction and development of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 6, p. 1478-1488, 2016.

DOMINGOS. F.X.V. **Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis do petróleo em peixes**. 2006. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

DONALD, D.B.; GURPRASAD, N.P.; QUINNETT-ABBOTT, L.; CASH, K. Diffuse geographic distribution of herbicides in northern prairie wetlands. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 273-279, 2001.

FERRARO, M.V.M. **Avaliação de três espécies de peixes - *Rhamdia quelen, Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios**: cometa e dos micronúcleos. 2009. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

FERREIRA, D.; DA MOTTA, A.C.; KREUTZ, L.C.; TONI, C.; LORO, V.L.; BARCELLOS, L.J.G. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. **Chemosphere**, v. 79, n. 9, p. 914-921, 2010.

FREIRE, R.; SCHNEIDER, R.M.; DE FREITAS, F.H.; BONIFÁCIO, C.M.; TAVARES, C.R.G. Monitoring of toxic chemical in the basin of Maringá stream. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 34, n. 3, p. 295-302, 2012.

FREITAS, L.L. **Síntese de hidróxidos duplos lamelares (HDL) para adsorção de herbicida e obtenção de HDL a partir do material catódico de baterias exauridas para aplicação como eletrodo**. 2017. 123f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

GALLI, A.J.B.; MONTEZUMA, M.C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. Santo André: ACADCOM Gráfica e Editora, 2005. 67p.

GIESY, J.P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K.R. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. In: WARE, G.W. (Ed.). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. New York: Springer, 2000. p. 35-120.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D.S; MORAES, B.S.; SIMÕES, R.R.; SCHETINGER, M.R.C.; MORSCH, V.M.; LORO, V.L. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 4, p. 519-524, 2007.

GONÇALVES, B.B. **Efeitos de herbicida à base de glifosato em aspectos reprodutivos de guppies (*Poecilia reticulata*)**. 2017. 40f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

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

GUERRERO-ESTÉVEZ, S.M.; LÓPEZ-LÓPEZ, E. Effects of endocrine disruptors on reproduction in viviparous teleosts with intraluminal gestation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 26, n. 3, p. 563-587, 2016.

HALL, J.C.; VAN DEYNZE, T.D.; STRUGER, J.; CHAN, C.H. Enzyme immunoassay based survey of precipitation and surface water for the presence of atrazine, metolachlor and 2,4-D. **Journal of Environmental Science & Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 28, n. 5, p. 577-598, 1993.

HANKE, I.; WITTMER, I.; BISCHOFBERGER, S.; STAMM, C.; SINGER, H. Relevance of urban glyphosate use for surface water quality. **Chemosphere**, v. 81, n. 3, p. 422-429, 2010.

HARAYASHIKI, C.A.Y.; JUNIOR, A.S.V.; MACHADO, A.A.S.; CABRERA, L.C.; PRIMEL, E.G.; BIANCHINI, A.; CORCINI, C.D. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. **Aquatic Toxicology**, v. 142, p. 176-184, 2013.

HELFRICH, L.A.; WEIGMANN, D.L.; HIPKINS, P.A.; STINSON, E.R. **Pesticides and Aquatic Animals**: A Guide to Reducing Impacts on Aquatic Systems. 2009. Disponível em: <https://vtechworks.lib.vt.edu/bitstream/handle/10919/48060/420-013_pdf.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 18/03/2019.

HORTH, H.; BLACKMORE, K. Survey of glyphosate and AMPA in groundwaters and surface waters in Europe. **WRc Report No. UC8073.02**, 2009.

HUED, A.C.; OBERHOFER, S.; DE LOS ÁNGELES BISTONI, M. Exposure to a Commercial Glyphosate Formulation (Roundup®) Alters Normal Gill and Liver Histology and Affects Male Sexual Activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 62, n. 1, p. 107-117, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Censo Agropecuário 2017**. 2018. Disponível em: <http://sidra.ibge.gov.br/tabela/6661#notas-tabela>. Acesso em: 18/08/2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Histórico de comercialização 2000 - 2019**. 2020a. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>. Acesso em: 08/10/2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Os 10 ingredientes ativos mais vendidos - 2019**. 2020b. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>. Acesso em: 08/10/2020.

KOAKOSKI, G.; QUEVEDO, R.M.; FERREIRA, D.; OLIVEIRA, T.A.; DA ROSA, J.G.S.; DE ABREU, M.S.; GUSSO, D.; MARQUEZE, A.; KREUTZ, L.C.; GIACOMINI, A.C.V.; FAGUNDES, M.; BARCELLOS, L.J.G. Agrichemicals chronically inhibit the cortisol response to stress in fish. **Chemosphere**, v. 112, p. 85-91, 2014.

KOÇ, N.D.; AKBULUT, C. Histological analysis of acute toxicity of 2,4-diclorophenoxy acetic acid in ovary of zebrafish. **Animal Cells and Systems**, v. 16, n. 5, p. 400-407, 2012.

KREUTZ, L.C.; BARCELLOS, L.J.G.; SILVA, T.O.; ANZILIERO, D.; MARTINS, D.; LORENSON, M.; MARTENINGHE, A.; SILVA, L.B. Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 1050-1055, 2008.

KREUTZ, L.C.; BARCELLOS, L.J.G.; MARTENINGHE, A.; DOS SANTOS, E.D.; ZANATTA, R. Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, n.4, p. 694-697, 2010.

KREUTZ, L.C.; BARCELLOS, L.J.G.; VALLE, S.F.; SILVA, T.O.; ANZILIERO, D.; DOS SANTOS, E.D.; PIVATO, M.; ZANATTA, R. Altered hematological and immunological

parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, n. 1, p. 51-57, 2011.

LAM, P.K.S.; GRAY, J.S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 2, p. 182-186, 2003.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil**: um guia para ação em defesa da vida. 1.ed. Rio de Janeiro: Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011. 190p.

LOOS, R.; GAWLIK, B.M.; LOCORO, G.; RIMAVICIUTE, E.; CONTINI, S.; BIDOGLIO, G. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. **Environmental pollution**, v. 157, n. 2, p. 561-568, 2009.

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

LORO, V.L.; GLUSCZAK, L.; MORAES, B.S.; LEAL, C.A.M.; MENEZES, C.; MURUSSI, C.R.; LEITEMPERGER, J.; SCHETINGER, M.R.C.; MORSCH, V.M. Glyphosate-based herbicide affects biochemical parameters in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824 and) *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837). **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 1, p. 229-236, 2015.

MACHADO, A.F. **Degradação do herbicida 2,4-D por processos oxidativos avançados**. 2004. 97f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MARCHESAN, E.; SARTORI, G.M.S.; AVILA, L.A.; MACHADO, S.L.O.; ZANELLA, R.; PRIMEL, E.G.; MACEDO, V.R.M.; MARCHEZAN, M.G. Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1053-1059, 2010.

MARIA, M.A. **Avaliação da utilização do glifosato para manejo de macrófitas aquáticas**. 2017. 144f. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MARTINS, D.; VELINI, E.D.; CAVENAGHI, A.L.; MENDONÇA, C.G.; MENDONÇA, C.G. Controle químico de plantas daninhas aquáticas em condições controladas - caixa d'água. **Planta Daninha**, v. 17, n. 2, p. 289-296, 1999.

MATTOS, M.L.T.; PERALBA, M.C.R.; DIAS, S.L.P.; PRATA, F.; CAMARGO, L. Monitoramento ambiental do glifosato e do seu metabólito (ácido aminometilfosfônico) na água de lavoura de arroz irrigado. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, p. 145-154, 2002.

MCMANUS, S.L.; MOLONEY, M.; RICHARDS, K.G.; COXON, C.E.; DANAHER, M. Determination and Occurrence of Phenoxyacetic Acid Herbicides and Their Transformation Products in Groundwater Using Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20627-20649, 2014.

MENDONÇA, C.F.R. **Determinação de glifosato e AMPA nas águas superficiais da Bacia do Paraná 3**. 2018. 129f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara.

MENEZES, C.C.; DA FONSECA, M.B.; LORO, V.L.; SANTI, A.; CATTANEO, R.; CLASEN, B.; PRETTO, A.; MORSCH, V.M. Roundup Effects on Oxidative Stress Parameters and Recovery Pattern of *Rhamdia quelen*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 4, p. 665-671, 2011.

MENEZES, C.; FONSECA, M.B.; LEITEMPERGER, J.; PRETTO, A.; MORAES, B.S.; MURUSSI, C.R.; BALDISSEROTTO, B.; LORO, V.L. Commercial formulation containing 2,4-D affects biochemical parameters and morphological indices of silver catfish exposed for 90 days. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 323-330, 2014.

MENSINK, H.; JANSSEN, P. **Environmental health criteria 159**: Glyphosate. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1994. 177p.

MULDER, R.; SCHMIDT, C.H. Groundwater, Surface Water, and Sediment Monitoring for Pesticides and Nitrate in Billings, Montana. **Montana Department of Agriculture, Helena, USA**, 2011.

MURUSSI, C.R.; COSTA, M.D.; LEITEMPERGER, J.W.; GUERRA, L.; RODRIGUES, C.C.R.; MENEZES, C.C.; SEVERO, E.S.; FLORES-LOPES, F.; SALBEGO, J.; LORO, V.L. Exposure to different glyphosate formulations on the oxidative and histological status of *Rhamdia quelen*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 445-455, 2015.

NARAHARA, M.Y.; BASILE-MARTINS, M.A.; GODINHO, H.M.; CIPÓLLI, M.N. Escala de maturidade, época de reprodução e influência de fatores abióticos sobre o desenvolvimento gonadal de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 15, n. 2, p. 201-211, 1988.

NETHERLAND, M.D. Chemical Control of Aquatic Weeds. In: GETTYS, L.A.; HALLER, W.T.; PETTY, D.G. (Ed.). **Biology and Control of Aquatic Plants**: A Best Management Practices Handbook. 3.ed. Marietta, Georgia: Aquatic Ecosystem Restoration Foundation, 2014. p. 71-88.

NEZZI, L. **Efeito do herbicida glifosato sobre as células somáticas e germinativas de testículo de peixe *Danio rerio* (Hamilton, 1822)**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

NUNES, L.R. **Toxicidade aguda e efeito subletal do Roundup Transorb® nos testículos de mato grosso *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882) (Teleostei: Characide)**. 2011. 39f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PALMA, G.; SÁNCHEZ, A.; OLAVE, Y.; ENCINA, F.; PALMA, R.; BARRA, R. Pesticide levels in surface waters in an agricultural–forestry basin in Southern Chile. **Chemosphere**, v. 57, n. 8, p. 763-770, 2004.

PEITER. G.C. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de glifosato e AMPA em águas**. 2017. 75f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias de Bioprodutos Agroindustriais) - Universidade Federal do Paraná, Palotina.

PERUZZO, P.J.; PORTA, A.A.; RONCO, A.E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 1, p. 61-66, 2008.

PINHEIRO, A.; SILVA, M.R.; KRAISCH, R. Presença de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas na bacia do Itajaí, SC. **Revista de Gestão de Água da América Latina**, v. 7, n. 2, p. 17-26, 2010.

PIRES, F.S. **Disrupção endócrina em testículos de *Poecilia reticulata* causada pelo herbicida glifosato**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

PRIMEL, E.G.; ZANELLA, R.; KURZ, M.H.S.; GONÇALVES, F.F.; MACHADO, S.O.; MARCHESAN, E. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 605-609, 2005.

PRIMOST, J.E.; MARINO, D.J.G.; APARICIO, V.C.; COSTA, J.L.; CARRIQUIRIBORDE, P. Glyphosate and AMPA, “pseudo-persistent” pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. **Environmental Pollution**, v. 229, p. 771-779, 2017.

QUAGHEBEUR, D.; DE SMET, B.; DE WULF, E.; STEURBAUT, W. Pesticides in rainwater in Flanders, Belgium: results from the monitoring program 1997–2001. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 6, n. 3, p. 182-190, 2004.

RAINA, R.; ETTER, M.L.; BUEHLER, K.; STARKS, K.; YOWIN, Y. Phenoxyacid Herbicides in Stormwater Retention Ponds: Urban Inputs. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 2, p. 962-970, 2011.

RAMIREZ, C.E.; BELLMUND, S.; GARDINALI, P.R. A simple method for routine monitoring of glyphosate and its main metabolite in surface waters using lyophilization and LC-FLD + MS/MS. Case study: canals with influence on Biscayne National Park. **Science of the Total Environment**, v. 496, p. 389-401, 2014.

RAMWELL, C.T.; KAH, M.; JOHNSON, P.D. Contribution of household herbicide usage to glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in surface water drains. **Pest Management Science**, v. 70, n. 12, p. 1823-1830, 2014.

RANGEL, A.I.M. **Análisis del comportamento ambiental de los herbicidas de mayor uso em la Subcuenca Río Tecolutla, Veracruz. Caso de estudio: Municipios de Tecolutla y Gutiérrez Zamora**. 2016. Tesis (Maestría em Ciencias em Estudios Ambientales y de la Sustentabilidad) - Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México.

REBELO, R.M.; VASCONCELOS, R.A.; BUYS, B.D.M.C.; REZENDE, J.A.; MORAES, K.O.C.; OLIVEIRA, R.P. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil**: uma abordagem ambiental. Brasília: Ibama, 2010.

RENDÓN-VON OSTEN, J.; DZUL-CAAMAL, R. Glyphosate Residues in Groundwater, Drinking Water and Urine of Subsistence Farmers from Intensive Agriculture Localities: A Survey in Hopelchén, Campeche, Mexico. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 6, p. 595, 2017.

RODRIGUES, M.V.N.; SERRA, G.E. Determinação de resíduos de 2,4D em amostras vegetais. **Pesticidas**: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, v. 6, 1996.

ROMAN, E.S.; VARGAS, L.; RIZZARDI, M.A.; HALL, L.; BECKIE, H.; WOLF, T.M. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. Passo Fundo: Berthier, 2005. 152p.

RUIZ-TOLEDO, J.; CASTRO, R.; RIVERO-PÉREZ, N.; BELLO-MENDOZA, R.; SÁNCHEZ, D. Occurrence of Glyphosate in Water Bodies Derived from Intensive Agriculture in a Tropical Region of Southern Mexico. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, n. 3, p. 289-293, 2014.

SÁNCHEZ, J.A.A.; JUNIOR, A.S.V.; CORCINI, C.D.; DA SILVA, J.C.; PRIMEL, E.G.; CALDAS, S.; KLEIN, R.D.; MARTINS, C.M.G. Effects of Roundup formulations on biochemical biomarkers and male sperm quality of the livebearing *Jenynsia multidentata*. **Chemosphere**, v. 177, p. 200-210, 2017.

SCRIBNER, E.A.; BATTAGLIN, W.A.; GILLIOM, R.J.; MEYER, M.T. **Concentrations of Glyphosate, Its Degradation Product, Aminomethylphosphonic Acid, and Glufosinate in Ground- and Surface-Water, Rainfall, and Soil Samples Collected in the United States, 2001-06**: U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2007-5122, 2007. 111p.

SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO - SEAB. **Piscicultura por Município**. 2018. Disponível em: < http://www.agricultura.pr.gov.br/deral/ProducaoAnual>. Acesso em: 12/02/2021.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ - SESA. **Plano de Vigilância e Atenção à Saúde de Populações Expostas aos Agrotóxicos do Estado do Paraná 2017 a 2019**. 2018. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/PlanoAgrotoxic30_05_18.pdf>. Acesso em: 20/03/2019.

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

SILVA, M.P. **Efeitos da exposição ao glifosato sobre biomarcadores de estresse oxidativo em jundiás (*Rhamdia quelen*)**. 2016. 41f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia em Aquicultura) - Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana.

SILVA, T.F.; BARP, E.A.; ARMILIATO, N. Avaliação da toxicidade celular do glifosato sobre as gônadas de *Danio rerio* (Cyprinidae). **Saúde e Meio Ambiente: Revista Interdisciplinar**, v. 6, n. 1, p. 85-95, 2017.

SILVEIRA, T.; JUNIOR, A.S.V.; CORCINI, C.D.; DOMINGUES, W.B.; REMIÃO, M.; SANTOS, L.; BARRETO, B.; LESSA, I.; MARTINS, D.; BOYLE, R.T.; COSTA, P.G.; BIANCHINI, A.; ROBALDO, R.B.; CAMPOS, V.F. Roundup® Herbicide Decreases Quality Parameters of Spermatozoa of Silversides *Odontesthes Humensis*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 102, n. 1, p. 1-6, 2019.

SMITH, C.M.; VERA, M.K.M.; BHANDARI, R.K. Developmental and epigenetic effects of Roundup and glyphosate exposure on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Aquatic Toxicology**, v. 210, p. 215-226, 2019.

SOBJAK, T.M.; ROMÃO, S.; NASCIMENTO, C.Z.; SANTOS, A.F.P.; VOGEL, L.; GUIMARÃES, A.T.B. Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of *Rhamdia quelen* fish. **Chemosphere**, v. 182, p. 267-275, 2017.

SOSO, A.B.; BARCELLOS, L.J.G.; RANZANI-PAIVA, M.J.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R. M.; ANZILIERO, D.; LIMA, M.; DA SILVA, L.B.; RITTER, F.; BEDIN, A.C.; FINCO, J.A. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, n. 3, p. 308-313, 2007.

SPADOTTO, C.A.; MATALLO, M.B.; GOMES, M.A.F. Sorção do herbicida 2,4-D em solos brasileiros. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 103-110, 2003.

SPADOTTO, C.A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. **Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar**, p. 1-9, 2006.

SPRANKLE, P.; MEGGITT, W.F.; PENNER, D. Adsorption, Mobility, and Microbial Degradation of Glyphosate in the Soil. **Weed Science**, v. 23, n. 3, p. 229-234, 1975.

TZASKOS, D.F.; MARCOVICZ, C.; DIAS, N.M.P.; ROSSO, N.D. Development of sampling for quantification of glyphosate in natural waters. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 4, p. 399-405, 2012.

UNIÃO EUROPEIA. Directiva 98/83/CE do Conselho de 3 de novembro de 1998 relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, 1998.

UREN WEBSTER, T.M.; LAING, L.V.; FLORANCE, H.; SANTOS, E.M. Effects of Glyphosate and its Formulation, Roundup, on Reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 2, p. 1271-1279, 2014.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. **2018 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories**. EPA 822-F-18-001. 2018.

VEIGA, M.M.; SILVA, D.M.; VEIGA, L.B.E.; FARIA, M.V.C. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Caderno Saúde Pública,** v. 22, n. 11, p. 2391-2399, 2006.

WAITE, D.T.; CESSNA, A.J.; GROVER, R.; KERR, L.A.; SNIHURA, A.D. Environmental Concentrations of Agricultural Herbicides: 2,4-D and Triallate. **Journal of Environmental Quality**, v. 31, n. 1, p. 129-144, 2002.

WOUDNEH, M.B.; SEKELA, M.; TUOMINEN, T.; GLEDHILL, M. Acidic herbicides in surface waters of lower Fraser valley, British Columbia, Canada. **Journal of Chromatography A**, v. 1139, n. 1, p. 121-129, 2007.

XIE, L.; THRIPPLETON, K.; IRWIN, M.A.; SIEMERING, G.S.; MEKEBRI, A.; CRANE, D.; BERRY, K.; SCHLENK, D. Evaluation of Estrogenic Activities of Aquatic Herbicides and Surfactants Using an Rainbow Trout Vitellogenin Assay. **Toxicological Sciences**, v. 87, n. 2, p. 391-398, 2005.

YAMINI, Y.; SALEH, A. Ultrasound-assisted emulsification microextraction combined with injection-port derivatization for the determination of some chlorophenoxyacetic acids in water samples. **Journal of separation science**, v. 36, n. 14, p. 2330-2338, 2013.

ZANIBONI FILHO, E. Piscicultura das espécies nativas de água doce. In: POLI, C.L.; POLI, A.T.B.; ANDREATTA, E.R.; BELTRAME, E. (Org.). **Aquicultura**: experiências brasileiras. Florianópolis: Multitarefa, 2004. p. 337-368.

ZEBRAL, Y.D.; LANSINI, L.R.; COSTA, P.G.; ROZA, M.; BIANCHINI, A.; ROBALDO, R.B. A glyphosate-based herbicide reduces fertility, embryonic upper thermal tolerance and alters embryonic diapause of the threatened annual fish *Austrolebias nigrofasciatus*. **Chemosphere**, v. 196, p. 260-269, 2018.

ZHANG, Q.; ZHOU, H.; LI, Z.; ZHU, J.; ZHOU, C.; ZHAO, M. Effects of glyphosate at environmentally relevant concentrations on the growth of and microcystin production by *Microcystis aeruginosa*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 11, p. 632, 2016.

3 EFEITOS SOBRE PARÂMETROS REPRODUTIVOS, BIOQUÍMICOS E GENOTÓXICOS DOS HERBICIDAS 2,4-D E GLIFOSATO EM JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos dos herbicidas 2,4-D, glifosato e a mistura de ambos sobre o estresse oxidativo, a genotoxicidade, as taxas de fertilização, eclosão, normalidade larval e sobre os parâmetros espermáticos em jundiás. Foram realizados dois experimentos, os quais foram distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado compostos por dez tratamentos e três repetições. Os tratamentos foram constituídos pelo uso de água com diferentes concentrações de glifosato (3,0; 6,0; 9,0 e 12,0 mg e.a. L^{-1}), 2,4-D (5,0; 10,0; 20,0 e 30,0 mg e.a. L^{-1}) e a mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato) tanto para a incubação dos ovos quanto para a ativação do sêmen. Os ovos e o sêmen do grupo controle foram, respectivamente, incubados e ativados em água destilada. Em embriões e larvas, foram avaliadas as taxas de fertilização, eclosão, normalidade larval, atividade das enzimas catalase (CAT), glutationa-S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), lipoperoxidação (LPO), carbonilação de proteínas (PCO) e os danos ao DNA. No sêmen, as variáveis analisadas foram: motilidade espermática, linearidade, velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade espermática (VE). A exposição ao glifosato e à mistura dos herbicidas diminuiu significativamente a fertilização dos ovócitos e a eclosão dos ovos. A exposição ao 2,4-D e à mistura dos herbicidas provocou danos ao material genético das larvas de jundiá. Os herbicidas 2,4-D, glifosato e a mistura de ambos foram prejudiciais para a motilidade dos espermatozoides. Nossos resultados mostram que apesar de terem sido utilizadas altas concentrações dos herbicidas, foram detectadas alterações causadas pelos mesmos em apenas alguns dos biomarcadores testados.

Palavras-chave: agrotóxicos, biomarcadores, gametas, qualidade espermática, toxicologia reprodutiva

EFFECTS ON REPRODUCTIVE, BIOCHEMICAL AND GENOTOXIC PARAMETERS OF HERBICIDES 2,4-D AND GLYPHOSATE IN SILVER CATFISH (*Rhamdia quelen*)

ABSTRACT: The objective of this work was to evaluate the effects of the herbicides 2,4-D, glyphosate, and the mixture of both on oxidative stress, genotoxicity, the rates of fertilization, hatching, larval normality, and on sperm parameters in silver catfish. Two experiments were carried out, which were distributed completely randomized experimental design, composed by ten treatments and three replications. The treatments consisted of using water with different concentrations of glyphosate (3.0; 6.0; 9.0 and 12.0 mg a.e. L^{-1}), 2.4-D (5.0; 10.0; 20.0 and 30.0 mg a.e. L^{-1}) and the mixture of both (5.0 mg a.e. L^{-1} of 2,4-D + 10.0 mg a.e. L^{-1} of glyphosate) both for the incubation of eggs and semen activation. The eggs and semen of the control group were incubated and activated in distilled water, respectively. In embryos and larvae, were evaluated the rates of fertilization, hatching, larval normality, activity of the enzymes catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), lipoperoxidation (LPO), protein carbonylation (PCO) and DNA damage. In semen, the variables analyzed were: sperm motility, linearity, curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), straight-line velocity (VSL), and sperm velocity (VE). Exposure to glyphosate and the mixture of herbicides significantly decreased the fertilization of oocytes and the hatching of eggs. Exposure to 2,4-D and the mixture of herbicides caused damage to the genetic material of larvae silver catfish. The herbicides 2,4-D, glyphosate, and the mixture of both were harmful to sperm motility. Our results show that although high concentrations of the herbicides were used, changes caused by them were detected in only some of the tested biomarkers.

Keywords: biomarkers, gametes, pesticides, reproductive toxicology, sperm quality

3.1 INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos podem entrar no ambiente aquático por meio de fontes acidentais ou controladas (descargas urbanas e industriais), e também por meio de fontes difusas originárias de atividades domésticas e agrícolas. A contaminação das águas continentais e marinhas por agrotóxicos é devido principalmente a atividade agrícola, e a maioria das moléculas envolvidas é de herbicidas (AKCHA et al., 2012).

Segundo dados do IBAMA (2020), o glifosato e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) são os dois herbicidas mais comercializados no Brasil. O glifosato é um composto organofosforado, indicado para aplicação em pós-emergência, não-seletivo e de amplo espectro de ação, largamente utilizado para controlar plantas daninhas de folhas largas e gramíneas que rivalizam com as culturas agrícolas (ÇAĞLAR; KOLANKAYA, 2008). Os ácidos fenoxiacéticos, como o 2,4-D, agem como reguladores de crescimento das plantas, sendo absorvidos principalmente pelos folículos vegetais e por isso são usados para combater o crescimento de plantas daninhas de folhas largas nas plantações (BRAND et al., 2002).

Resíduos de glifosato e 2,4-D foram encontrados em ambientes aquáticos no Brasil em concentrações que variaram, respectivamente, entre cerca de 0,0033 e 2,024 mg L^{-1} (DELMONICO et al., 2014; FREIRE et al., 2012) e 0,00115 e 5,08 mg L^{-1} (PINHEIRO et al., 2010; CHAIM et al., 2010). Todavia, animais expostos repetidamente a certos herbicidas podem apresentar alterações na produção e liberação de hormônios, interferindo diretamente na capacidade reprodutiva (ROMANO et al., 2009). Além disso, os herbicidas podem induzir o estresse oxidativo, produzindo radicais livres e causando peroxidação lipídica. O incremento da peroxidação lipídica e do estresse oxidativo podem danificar as atividades dos antioxidantes enzimáticos protetores que mostram ser indicadores sensíveis do aumento das reações de oxidação (BUKOWSKA, 2006). Os efeitos negativos no comportamento reprodutivo e no estresse oxidativo não se restringem apenas as populações naturais, já que o abastecimento de tanques de produção aquícola com águas superficiais e/ou subterrâneas com a presença de resíduos de herbicidas pode prejudicar o desenvolvimento da aquicultura, tanto em nível produtivo quanto em nível econômico (SILVA et al., 2015).

O mecanismo de ação tóxica em animais e humanos do 2,4-D, compreende os danos às membranas celulares dose-dependentes, que podem induzir a toxicidade ao sistema nervoso central (SNC), danificando a barreira hematoencefálica e interrompendo os mecanismos de transporte da membrana neuronal, a interrupção do metabolismo da acetilcoenzima A (acetil-CoA) e o desacoplamento da fosforilação oxidativa (como consequência da interferência nas

vias metabólicas celulares envolvendo a acetil-CoA ou devido a ruptura das membranas intracelulares pelo herbicida) (BRADBERRY et al., 2004a). Enquanto o mecanismo de ação tóxica do glifosato está relacionado ao desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial (MOSSINI; NISHIYAMA, 2017). Embora o glifosato seja um composto que contém fósforo, não há evidências de inibição significativa da acetilcolinesterase (AChE) em mamíferos *in vivo* (BRADBERRY et al., 2004b), porém em peixes (*Prochilodus lineatus*) foi observada inibição da atividade da AChE cerebral e muscular e ocorrência de alterações importantes nas defesas antioxidantes, como diminuição dos níveis de glutationa S-transferase (GST) (MODESTO; MARTINEZ, 2010).

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie nativa da região Sul do Brasil, que apresenta alta velocidade de crescimento, grande rusticidade, ótima qualidade da carne e imenso potencial para produção intensiva (CARDOSO et al., 2004). A espécie é facilmente produzida em cativeiro, adapta-se facilmente aos ensaios laboratoriais e conhece-se a sua biologia reprodutiva (BRITO, 2015), além de possuir grande importância econômica e ecológica. Diversos estudos já foram realizados utilizando jundiás como bioindicadores em ambientes aquáticos contaminados por glifosato (SOSO et al., 2007; MENEZES et al., 2011) e 2,4-D (CATTANEO et al., 2008; MENEZES et al., 2014), porém estudos visando avaliar eventuais efeitos desses herbicidas em gametas, embriões e larvas de jundiás são escassos.

A avaliação da qualidade espermática é extremamente importante para peixes teleósteos, que possuem fertilização externa, já que seus gametas entram em contato direto com os poluentes aquáticos (GONÇALVES et al., 2018), o que torna o jundiá um excelente modelo para avaliar os efeitos dos herbicidas 2,4-D e glifosato sobre as células espermáticas. Estudos focados na reprodução de peixes mostraram que concentrações de glifosato de 0,5 e 7,8 mg e.a. L^{-1} causaram efeitos negativos na qualidade das células espermáticas das espécies *Jenynsia multidentata* e *Odontesthes humensis*, respectivamente (SÁNCHEZ et al., 2017; SILVEIRA et al., 2019).

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos herbicidas 2,4-D, glifosato e a mistura de ambos sobre o estresse oxidativo, a genotoxicidade, as taxas de fertilização, eclosão, normalidade larval e sobre os parâmetros espermáticos em jundiás.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi dividido em dois experimentos: o primeiro consistiu em avaliar os efeitos da contaminação da água de incubação com diferentes concentrações de glifosato, 2,4-D e da mistura de ambos sobre embriões e larvas de jundiás e o segundo constou na avaliação dos efeitos da contaminação da água de ativação com diferentes concentrações de glifosato, 2,4-D e da mistura de ambos sobre as células espermáticas de jundiás.

No primeiro, foram utilizados 18 machos (114,85 ± 28,87 g) e 31 fêmeas (168,17 ± 47,32 g) de jundiá. No segundo, foram utilizados 15 machos (171,14 ± 42,33 g) de jundiá. Todos os peixes foram provenientes do Laboratório de Tecnologia da Reprodução de Animais Aquáticos Cultiváveis (LATRAAC), instalado no Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (InPAA), da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - Campus de Toledo. Esses peixes pertenciam a um estoque de reprodutores que estavam alojados em um tanque escavado revestido de concreto, com fundo de terra e área de 200 m^2, sem renovação de água e com abastecimento somente para compensar a perda de água por evaporação e infiltração. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial contendo 32% de proteína bruta. A realização deste estudo foi autorizada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, certificado sob o número 16-20.

3.2.1 Experimento 1

3.2.1.1 Herbicidas

Os produtos comerciais utilizados neste experimento foram os herbicidas GLI OVER® contendo 480 g L^{-1} de sal de isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina, 360 g L^{-1} de equivalente ácido (e.a.) de N-(fosfonometil) glicina e 696,3 g L^{-1} de outros ingredientes e U46 PRIME® contendo 806 g L^{-1} de sal de dimetilamina do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 670 g L^{-1} de equivalente ácido de 2,4-D, sal de dimetilamina e 429 g L^{-1} de outros ingredientes. As concentrações de glifosato e 2,4-D foram calculadas com base na concentração de equivalente ácido existente nos produtos comerciais.

3.2.1.2 Preparo das soluções estoques

Foram preparadas soluções estoques de 2,4-D e glifosato de 1000 mg e.a. L^{-1}. As concentrações de 2,4-D utilizadas foram: 5,0; 10,0; 20,0 e 30,0 mg e.a. L^{-1}, enquanto as concentrações de glifosato utilizadas foram: 3,0; 6,0; 9,0 e 12,0 mg e.a. L^{-1}. Essas concentrações foram obtidas a partir da diluição das soluções estoques em água destilada.

A mistura dos herbicidas 2,4-D e glifosato foi preparada a partir da diluição das soluções estoques em água destilada na seguinte concentração final: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato. As concentrações de glifosato e 2,4-D utilizadas na mistura dos herbicidas foram baseadas nas maiores concentrações encontradas no ambiente aquático, respectivamente por Zhang et al. (2016) e Chaim et al. (2010).

3.2.1.3 Seleção dos reprodutores, coleta de gametas e obtenção dos embriões

Os reprodutores foram selecionados no próprio tanque, no mês de fevereiro de 2019, empregando-se como parâmetros, nas fêmeas, abdômen arredondado, papila urogenital avermelhada, coloração e tamanho dos ovócitos uniformes e nos machos, presença de sêmen (WITECK et al., 2011).

Após a seleção, os reprodutores foram levados ao laboratório, pesados, marcados e separados por sexo em tanques individuais. Posteriormente, os peixes foram submetidos aos procedimentos para hipofisação e extrusão dos gametas.

Os reprodutores foram induzidos com aplicação de extrato de hipófise de carpa (EHC). As fêmeas receberam uma dose preparatória de 0,5 mg de EHC kg^{-1} e, após 12 horas, receberam uma segunda dose de 5,0 mg de EHC kg^{-1} (BOMBARDELLI et al., 2006). Os machos receberam uma dose única de 3,0 mg de EHC kg^{-1} no mesmo horário da aplicação da segunda dose nas fêmeas (BOMBARDELLI et al., 2016). As aplicações de extrato de hipófise de carpa foram realizadas via intramuscular, próximo da nadadeira dorsal.

Após 240 horas-grau ou unidades térmicas acumuladas, foram realizadas as coletas dos gametas. Neste momento, os peixes foram contidos e secos com papel-toalha. Posteriormente, foi efetuada massagem na região ventral dos animais em sentido céfalo-caudal. O sêmen foi coletado em tubo de ensaio e os ovócitos foram coletados em bacia de plástico limpa e seca (BOMBARDELLI et al., 2006). As primeiras parcelas de sêmen liberadas foram descartadas

para evitar possíveis contaminações com urina, fezes ou sangue (SANCHES et al., 2015), assim como as porções de ovócitos liberadas com esses fluidos (SANCHES et al., 2009).

Para a fertilização artificial foram utilizados 3 *pools* de ovócitos, sendo 2 *pools* compostos pelos gametas de 10 fêmeas e 1 *pool* composto pelos gametas de 11 fêmeas e 3 *pools* de sêmen compostos cada um pelos gametas de 6 machos. A mistura de ovócitos com sêmen foi fertilizada com água do sistema de incubação de ovos. Os gametas fertilizados foram mantidos em movimento suave por 1 minuto. Após, os ovos foram lavados para a remoção do excesso de sêmen e incubados por 1 hora em incubadoras de fibra de vidro com capacidade de 60 litros.

3.2.1.4 Determinação das taxas de fertilização, eclosão e normalidade larval

Os ovos incubados por 1 hora em incubadoras de fibra de vidro foram transferidos para placas de cultivo celular de 24 poços da marca KASVI, modelo K12-024 a uma densidade de 5 ovos por poço, contendo 2 mL de água contaminada em cada poço. As placas foram mantidas sem agitação, em temperatura ambiente e em fotoperíodo natural durante todo o experimento. Neste ensaio, foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por dez tratamentos e três repetições. Os tratamentos foram constituídos pelo uso de água com diferentes concentrações de glifosato (3,0; 6,0; 9,0 e 12,0 mg e.a. L^{-1}), 2,4-D (5,0; 10,0; 20,0 e 30,0 mg e.a. L^{-1}) e a mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). O grupo controle foi incubado em água destilada. Foi considerado como uma unidade experimental 12 poços contendo 60 ovos de jundiá.

Decorridas 12 horas após a fertilização artificial, foi mensurada a taxa de fertilização (TF), utilizando-se a fórmula: TF = número de ovos viáveis x 100/número total de ovos.

A taxa de eclosão foi mensurada 38 horas após a fertilização artificial. Para o cálculo da taxa de eclosão (TE) aplicou-se a seguinte equação: TE = número de larvas eclodidas x 100/número total de ovos.

As possíveis anormalidades morfológicas foram avaliadas 62 horas após a fertilização artificial. Ao final deste período, todas as larvas foram fixadas em formol 4% tamponado. As larvas foram analisadas com auxílio de um estereomicroscópio em um aumento de 10x. Foram consideradas anormais as larvas que apresentaram alterações na coluna vertebral, olhos deformados, cabeça deformada, edema do saco vitelínico, edema cardíaco e tamanho reduzido

(JEZIERSKA et al., 2000). A taxa de normalidade larval (TNL) foi calculada utilizando-se a fórmula: TNL = número de larvas normais x 100/número total de larvas.

3.2.1.5 Análise de indicadores do estresse oxidativo

Os ovos incubados por 1 hora em incubadoras de fibra de vidro foram transferidos para recipientes plásticos contendo 200 mL de água contaminada, a uma densidade de 3,0 mL de ovos (401 ± 33 ovos) por recipiente plástico. A incubação dos ovos em recipientes plásticos foi realizada em água parada, em temperatura ambiente e em fotoperíodo natural. O delineamento experimental utilizado foi idêntico ao do ensaio anterior. Foi considerado como uma unidade experimental um recipiente plástico contendo 3,0 mL de ovos (401 ± 33 ovos) de jundiá. As larvas foram coletadas 45 horas após a fertilização artificial, eutanasiadas a -20ºC, colocadas em microtubos tipo *eppendorf* e armazenadas a -80ºC.

O *pool* contendo 100 larvas foi preparado, sendo adicionado tampão fosfato salina e posteriormente homogeneizado, centrifugado a 11000 rpm a 4ºC por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, fracionado em microtubos tipo *eppendorf*, congelado e armazenado a -80ºC para posteriores análises.

A concentração proteica foi determinada espectrofotometricamente a 595 nm utilizando o método de Bradford (1976) com albumina de soro bovino como padrão. Após a leitura da proteína, as amostras foram normalizadas para a concentração de 1 mg mL^{-1} para a realização dos ensaios bioquímicos.

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 240 nm conforme Aebi (1984). A atividade da glutationa-S-transferase (GST) foi determinada em espectrofotômetro a 340 nm de acordo com Habig et al. (1974). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi medida em espectrofotômetro a 560 nm segundo Crouch et al. (1981). Os níveis de lipoperoxidação (LPO) foram estimados espectrofotometricamente a 570 nm de acordo com o método descrito por Jiang et al. (1992). A carbonilação de proteínas (PCO) foi mensurada em espectrofotômetro a 360 nm de acordo com Levine et al. (1990).

3.2.1.6 Análise dos danos no DNA

Os ovos incubados por 1 hora em incubadoras de fibra de vidro foram transferidos para recipientes plásticos contendo 100 mL de água contaminada, a uma densidade de 1,5 mL de ovos (173 ± 23 ovos) por recipiente plástico. A incubação dos ovos em recipientes plásticos foi realizada em água parada, em temperatura ambiente e em fotoperíodo natural. O delineamento experimental utilizado foi idêntico aos dos ensaios anteriores. Foi considerado como uma unidade experimental um recipiente plástico contendo 1,5 mL de ovos (173 ± 23 ovos) de jundiá.

As larvas foram coletadas 48 horas após a fertilização artificial, eutanasiadas a -20ºC e colocadas em microtubos tipo *eppendorf* contendo 500 µL de soro bovino fetal, armazenadas sob refrigeração e na ausência de luz.

Os danos no DNA foram quantificados por meio do ensaio cometa alcalino, segundo Singh et al. (1988) com modificações de Ramsdorf et al. (2009). O *pool* contendo 30 larvas foi desagregado em micro-homogeneizador (tipo Potter) e centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. Posteriormente, descartou-se 200 µL do sobrenadante. Após, foi adicionado 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP), homogeneizou-se e então o conteúdo foi dispensado em três lâminas. As lâminas foram colocadas em solução de lise por três horas. Em seguida, foram cobertas por tampão alcalino por 25 minutos e então submetidas à eletroforese (25 V e 300 mA) durante 25 minutos.

As lâminas foram preparadas em triplicata. Antes da análise as lâminas foram coradas com 20 µL de brometo de etídio (10 µL mL^{-1}). A análise foi realizada em teste cego de 100 nucleoides por lâmina, com microscópio de epifluorescência em aumento de 400x. Os nucleoides foram classificados por análise visual com atribuição de escores para cada classe de danos do DNA, sendo 0 = sem danos aparente, 1 = dano pequeno, 2 = dano médio, 3 = dano extenso e 4 = dano máximo (COLLINS et al., 1997; KOPPEN et al., 2017).

3.2.2 Experimento 2

3.2.2.1 Parâmetros espermáticos

Na execução deste experimento, foram utilizados os mesmos produtos comerciais e as mesmas concentrações de glifosato, 2,4-D e da mistura de ambos do experimento 1.

A seleção dos reprodutores, a indução hormonal e a coleta do sêmen foram realizadas de forma idêntica ao primeiro experimento. Para as análises espermáticas foram utilizados 3 *pools* de sêmen compostos cada um pelos gametas de 5 machos. O sêmen coletado foi mantido sob refrigeração (12,0 ± 1,0ºC) durante o tempo necessário para a realização das análises espermáticas (ADAMES et al., 2015).

Alíquotas de sêmen foram avaliadas pelo *plugin* CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) em *software* livre (WILSON-LEEDY; INGERMANN, 2007). A ativação espermática foi realizada em microtubos tipo *eppendorf*, utilizando-se 1 µL de sêmen e 1000 µL da solução ativadora. O sêmen ativado (10 µL) foi pipetado em câmara de Neubauer, coberto com lamínula e visualizado em microscópio óptico em um aumento de 10x. O movimento dos espermatozoides foi avaliado aos 12 e 14 segundos após o início da ativação espermática. As variáveis analisadas foram: motilidade espermática, linearidade, velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP) e velocidade em linha reta (VSL). O delineamento experimental utilizado foi idêntico aos dos ensaios anteriores. Os tratamentos aplicados foram constituídos pela ativação do sêmen com água contaminada com glifosato (3,0; 6,0; 9,0 e 12,0 mg e.a. L^{-1}), 2,4-D (5,0; 10,0; 20,0 e 30,0 mg e.a. L^{-1}) e a mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). O sêmen do grupo controle foi ativado com água destilada. Foi considerado como uma unidade experimental o sêmen proveniente de um *pool*. Os dados de velocidade (VCL, VAP e VSL) foram agrupados pela análise de componentes principais (PCA), gerando uma nova variável chamada velocidade espermática (VE) (TESSARO et al., 2012).

3.2.3 Análise estatística

Os resultados obtidos nas taxas de fertilização, eclosão, normalidade larval, atividades enzimáticas, ensaio cometa e parâmetros espermáticos tiveram a normalidade e a

homogeneidade testadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. No caso de dados paramétricos, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Dunnett, a um nível de significância de 0,05. No caso de dados não paramétricos foi aplicado o teste de Kruskall-Wallis, seguido pelo teste de Dunn, com nível de significância de 0,05. Tanto os dados da atividade enzimática da lipoperoxidação quanto os dados da motilidade espermática passaram por transformação logarítmica para atender aos pressupostos de homogeneidade das variâncias e normalidade dos resíduos. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Taxas de fertilização, eclosão e normalidade larval

As taxas de fertilização dos ovócitos diminuíram significativamente à medida que a concentração de glifosato na água aumentou. As concentrações de 2,4-D presentes na água não interferiram sobre as taxas de fertilização dos ovócitos. Os herbicidas testados de forma combinada apresentaram resultado semelhante ao glifosato testado de forma isolada nas maiores concentrações (Figura 1).

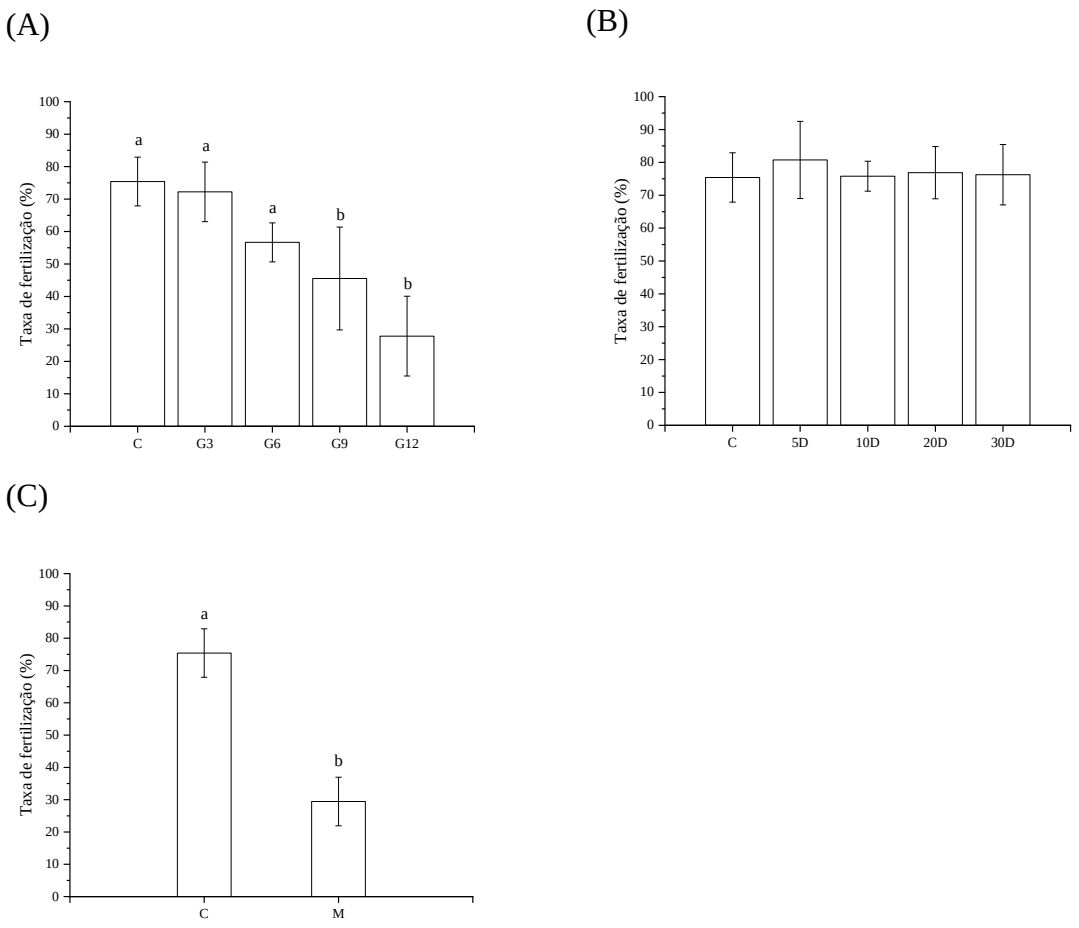

Figura 1. Taxa de fertilização dos ovócitos de jundiá (*Rhamdia quelen*). (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos e o controle pelo teste de ANOVA seguida do teste de Dunnett

As taxas de eclosão tiveram comportamento semelhante aos das taxas de fertilização. A porcentagem de ovos eclodidos diminuiu com o aumento da concentração de glifosato na água. A água contaminada com o 2,4-D não afetou as taxas de eclosão dos ovos, as quais permaneceram constantemente altas em todos os tratamentos. O efeito deletério causado pela mistura dos herbicidas foi similar ao causado pelo glifosato (Figura 2).

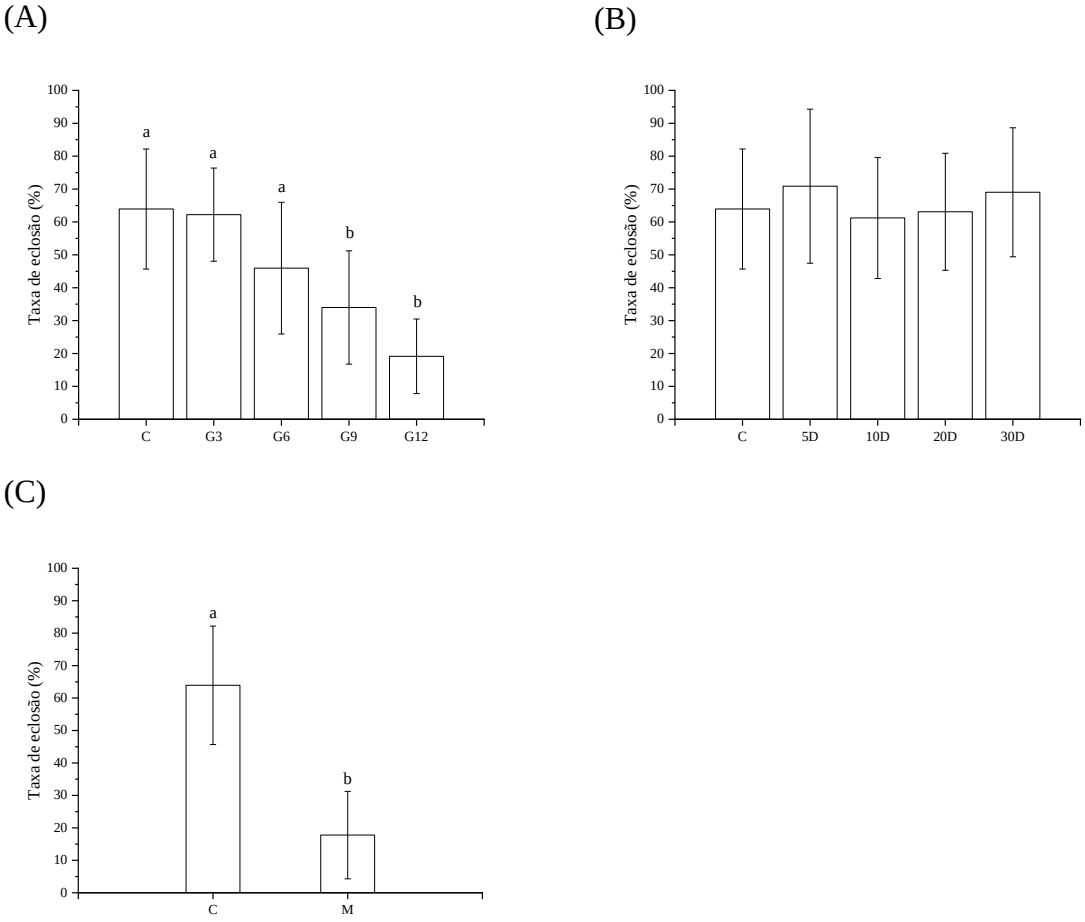

Figura 2. Taxa de eclosão dos ovos de jundiá (*Rhamdia quelen*). (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos e o controle pelo teste de ANOVA seguida do teste de Dunnett

As diferentes concentrações dos herbicidas 2,4-D e glifosato, além da mistura de ambos, não afetaram as taxas de normalidade larval (Figura 3).

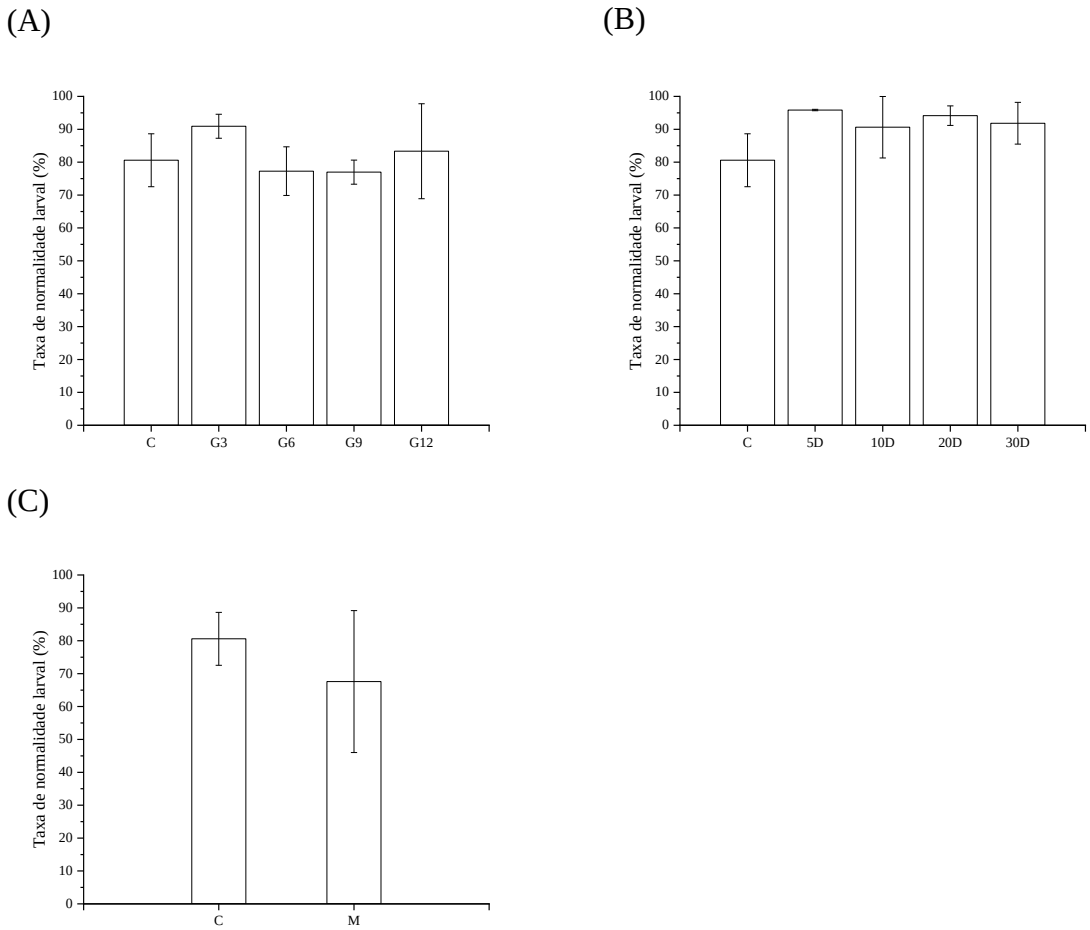

Figura 3. Taxa de normalidade larval de jundiá (*Rhamdia quelen*). (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP

3.3.2 Indicadores do estresse oxidativo

A atividade da CAT (Figura 4), da GST (Figura 5), da LPO (Figura 6) e da PCO (Figura 7) não foram alteradas em nenhuma das concentrações testadas de glifosato, 2,4-D e da mistura dos herbicidas. A atividade da SOD não foi evidenciada em nenhum dos tratamentos.

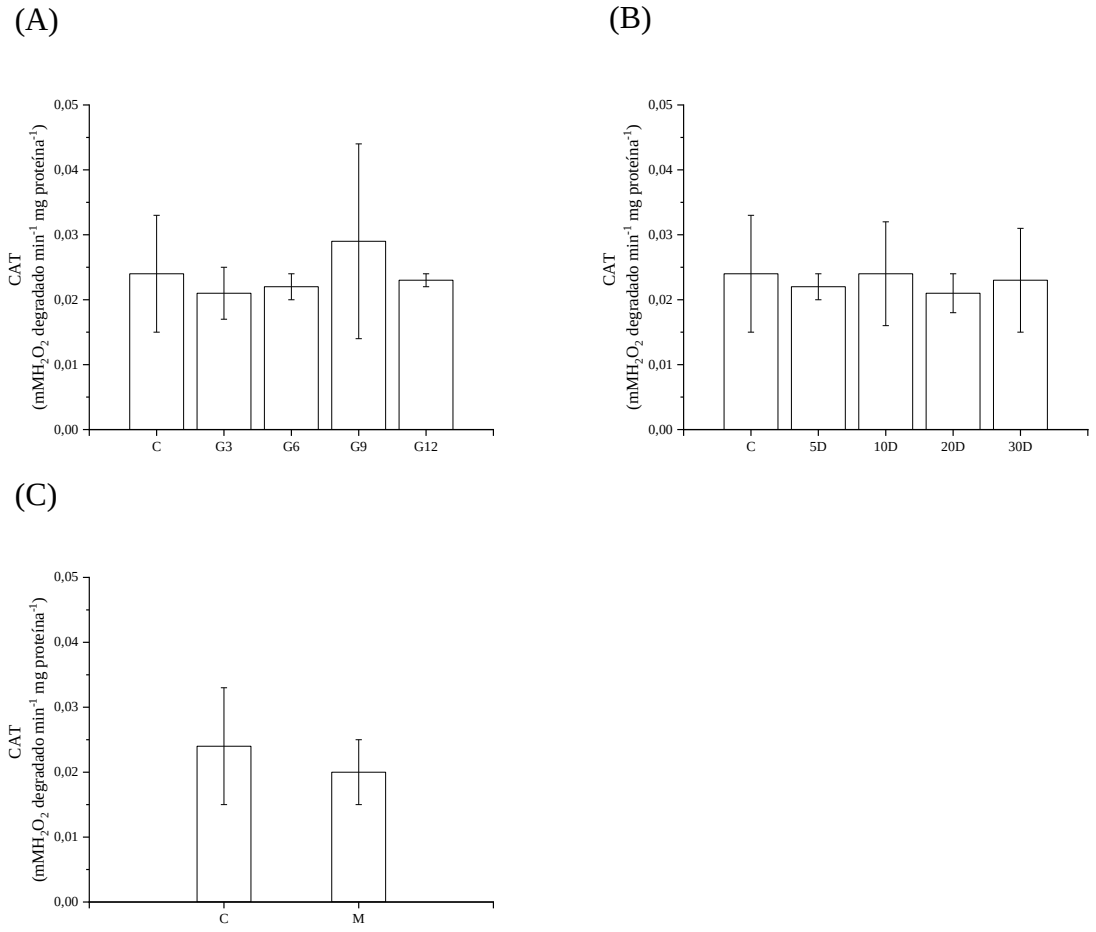

Figura 4. Atividade da catalase (CAT) em larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP

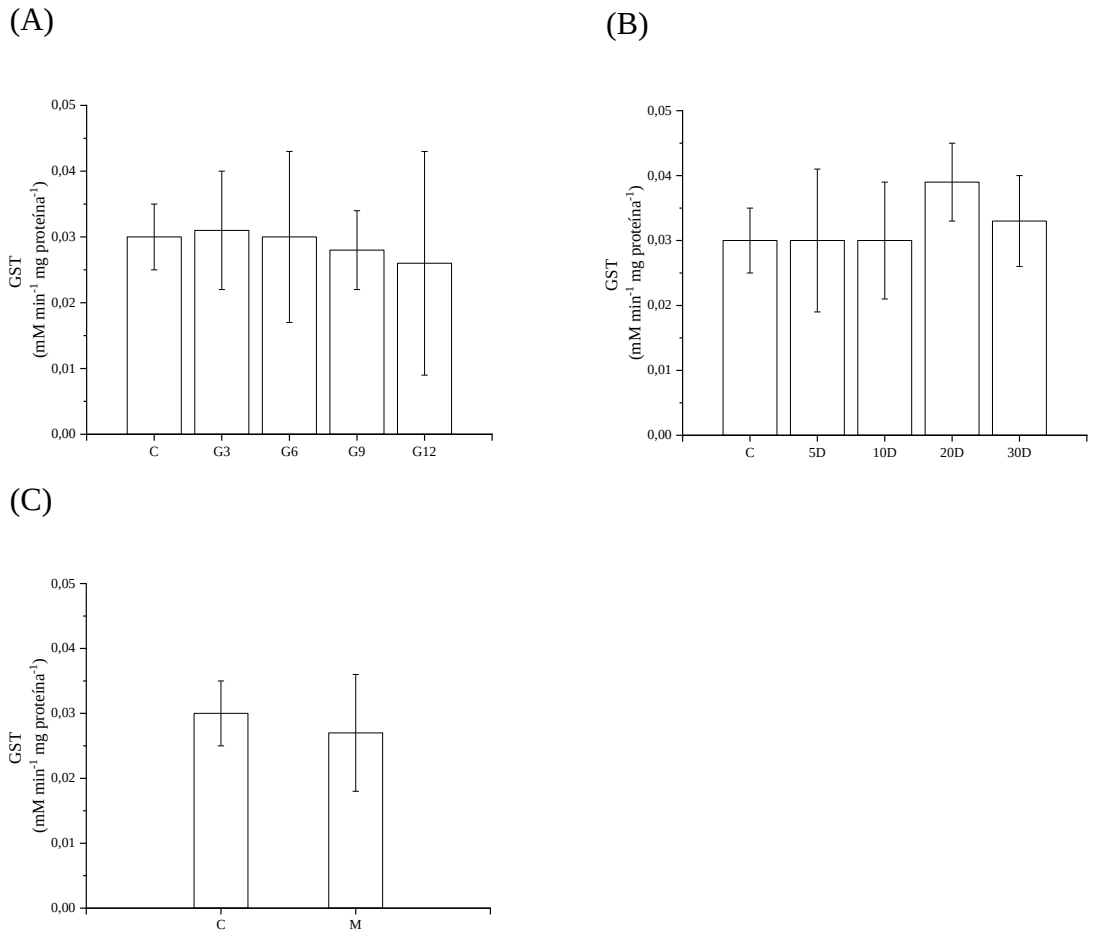

Figura 5. Atividade da glutationa-S-transferase (GST) em larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP

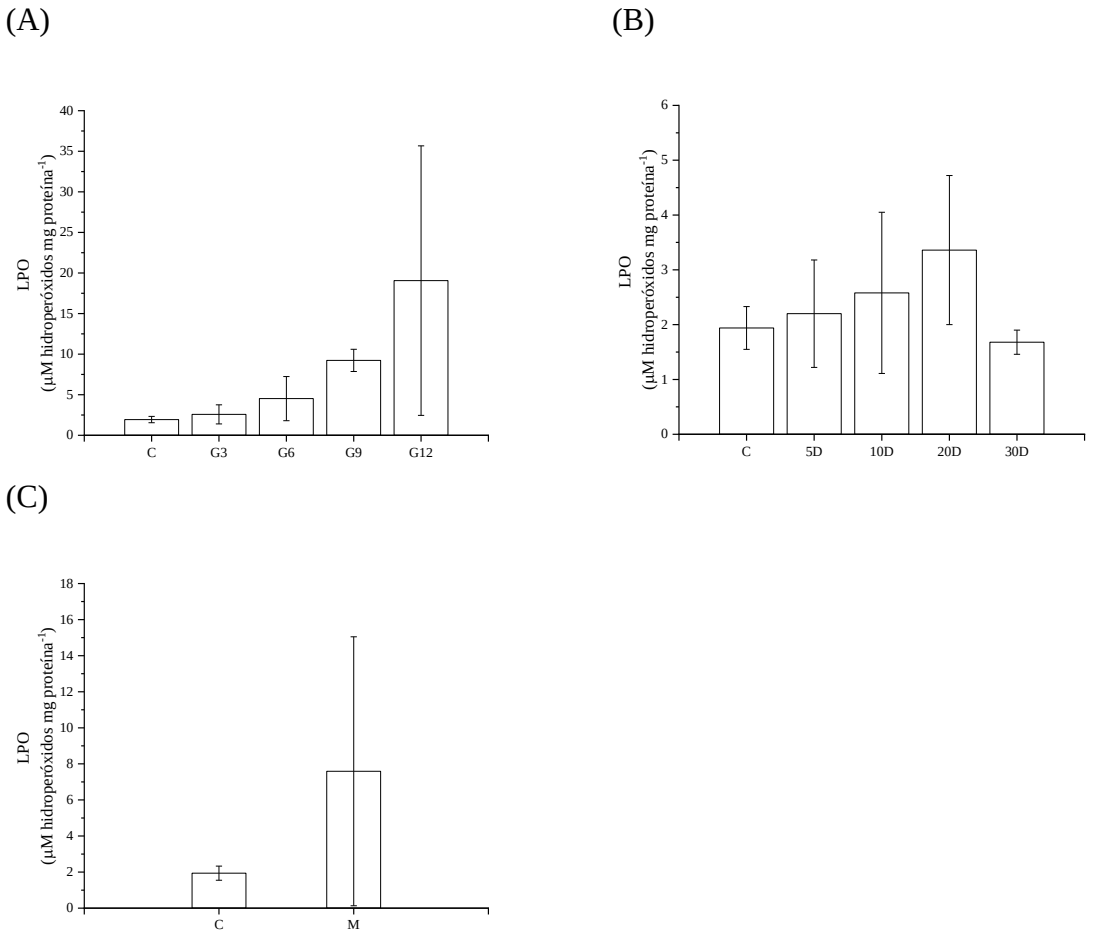

Figura 6. Níveis de lipoperoxidação (LPO) em larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP

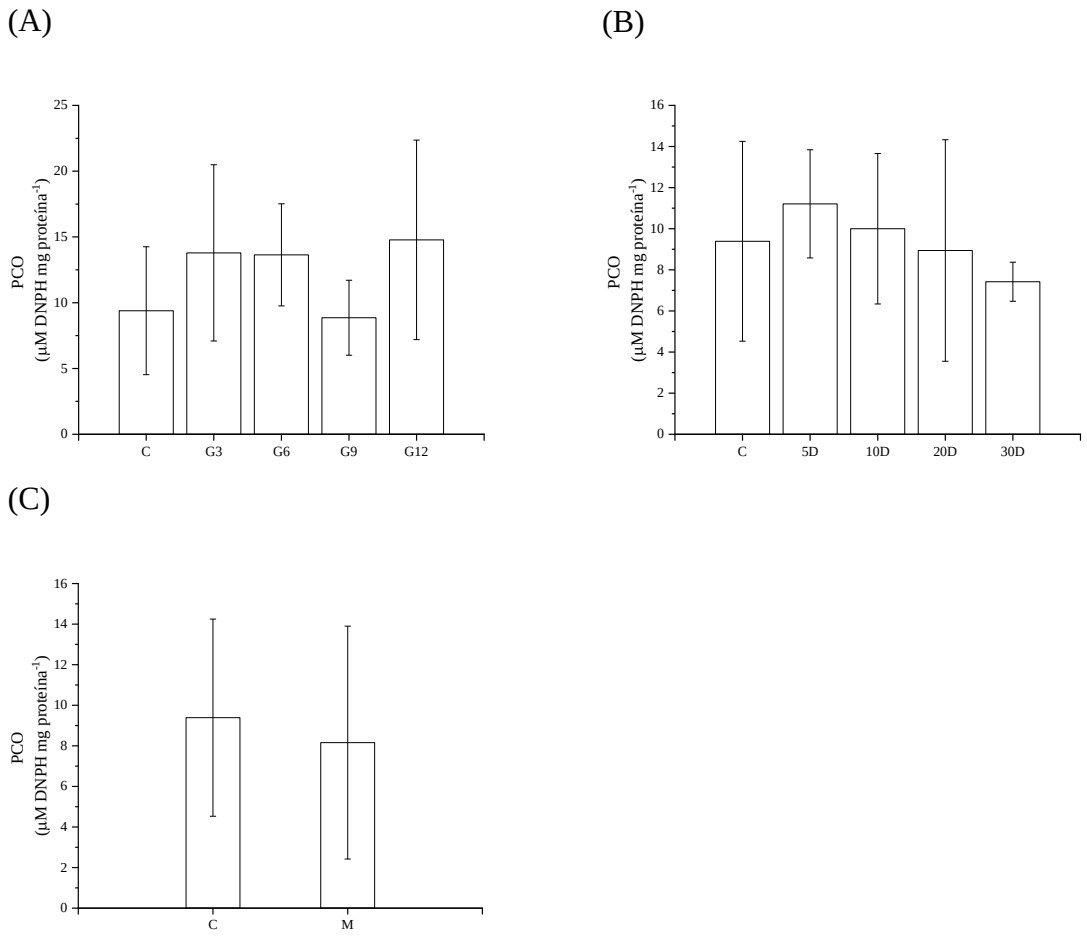

Figura 7. Níveis de carbonilação de proteínas (PCO) em larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP

3.3.3 Danos no DNA

Em larvas de jundiá, o glifosato mostrou-se não genotóxico. O 2,4-D mostrou-se genotóxico às larvas de jundiá nas concentrações de 5,0; 20,0 e 30,0 mg e.a. L^{-1}. A mistura dos herbicidas causou danos ao DNA de larvas de jundiá (Figura 8).

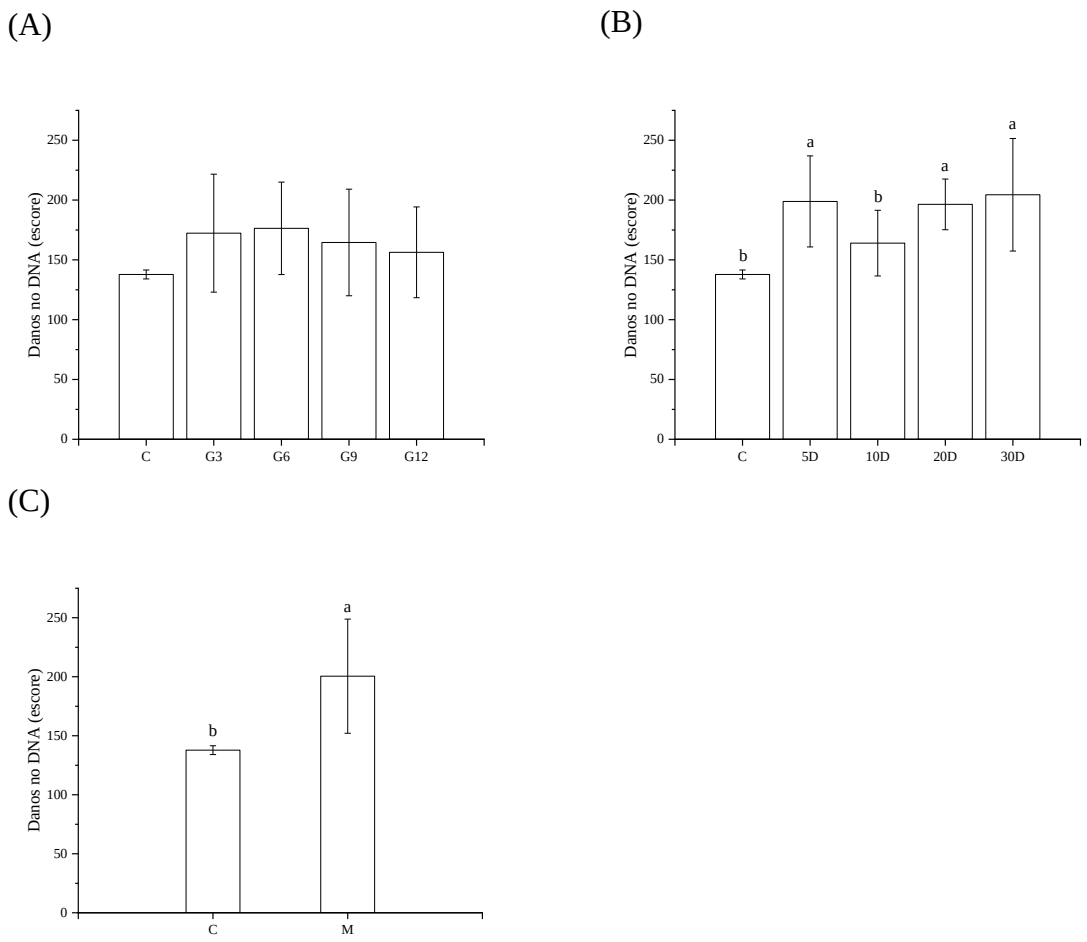

Figura 8. Escores do ensaio cometa de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos e o controle pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn

3.3.4 Parâmetros espermáticos

As taxas de motilidade espermática não sofreram interferência das diferentes concentrações de glifosato, porém diminuíram significativamente em todas as concentrações de 2,4-D testadas e na mistura dos herbicidas, no tempo 12 segundos após a ativação espermática (Figura 9).

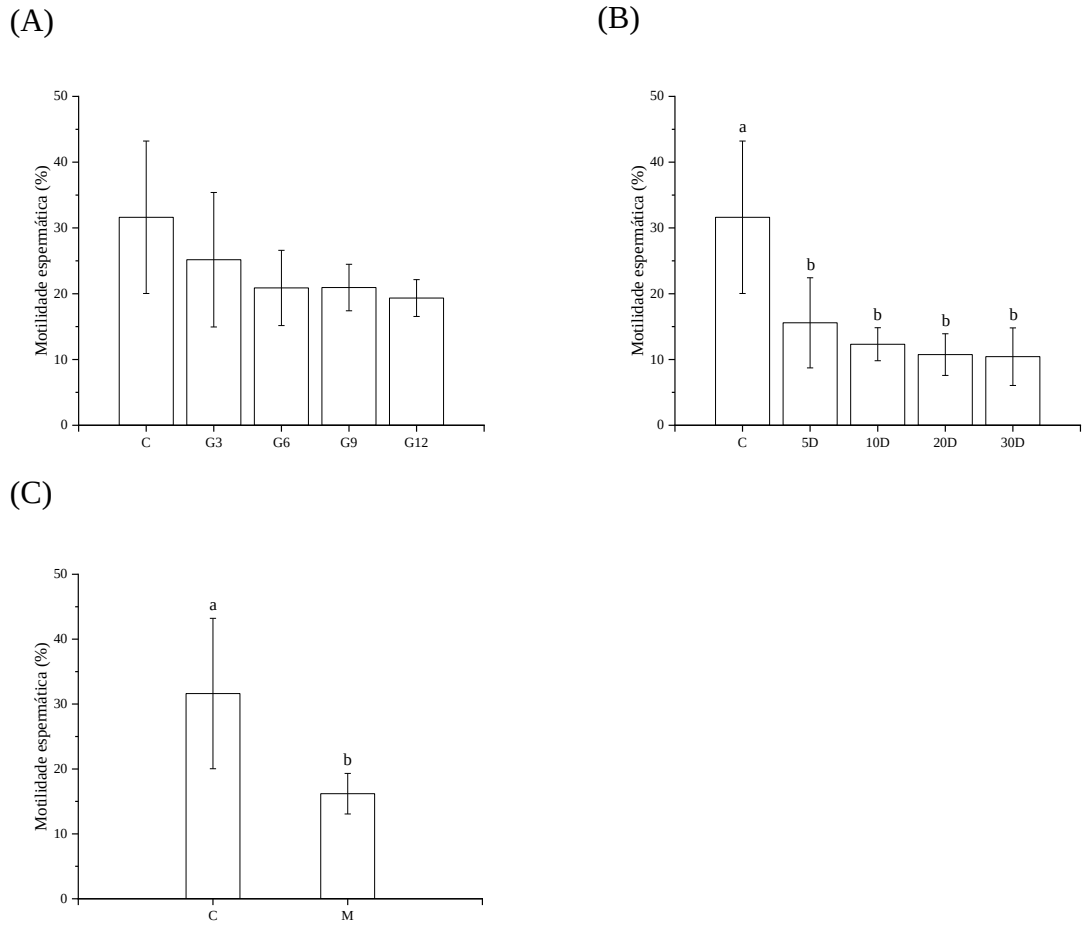

Figura 9. Motilidade espermática aos 12 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato. (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos e o controle pelo teste de ANOVA seguida do teste de Dunnett

No tempo 14 segundos, a porcentagem de espermatozoides móveis diminuiu significativamente com o aumento da concentração de glifosato, além de ter diminuído em todas as concentrações testadas de 2,4-D e na mistura dos herbicidas (Figura 10).

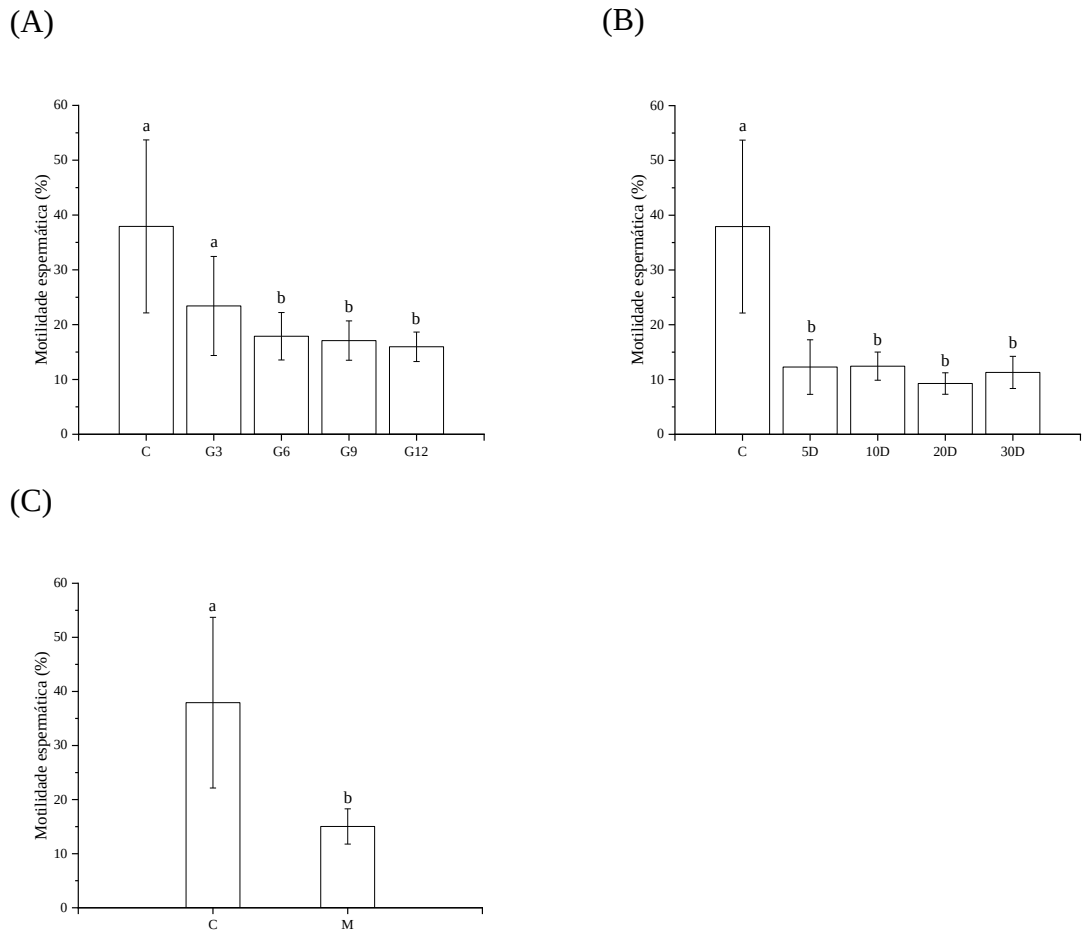

Figura 10. Motilidade espermática aos 14 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos e o controle pelo teste de ANOVA seguida do teste de Dunnett

Nenhuma diferença foi observada na linearidade dos espermatozoides entre os grupos, em nenhum dos tempos de ativação espermática avaliados (Figuras 11 e 12).

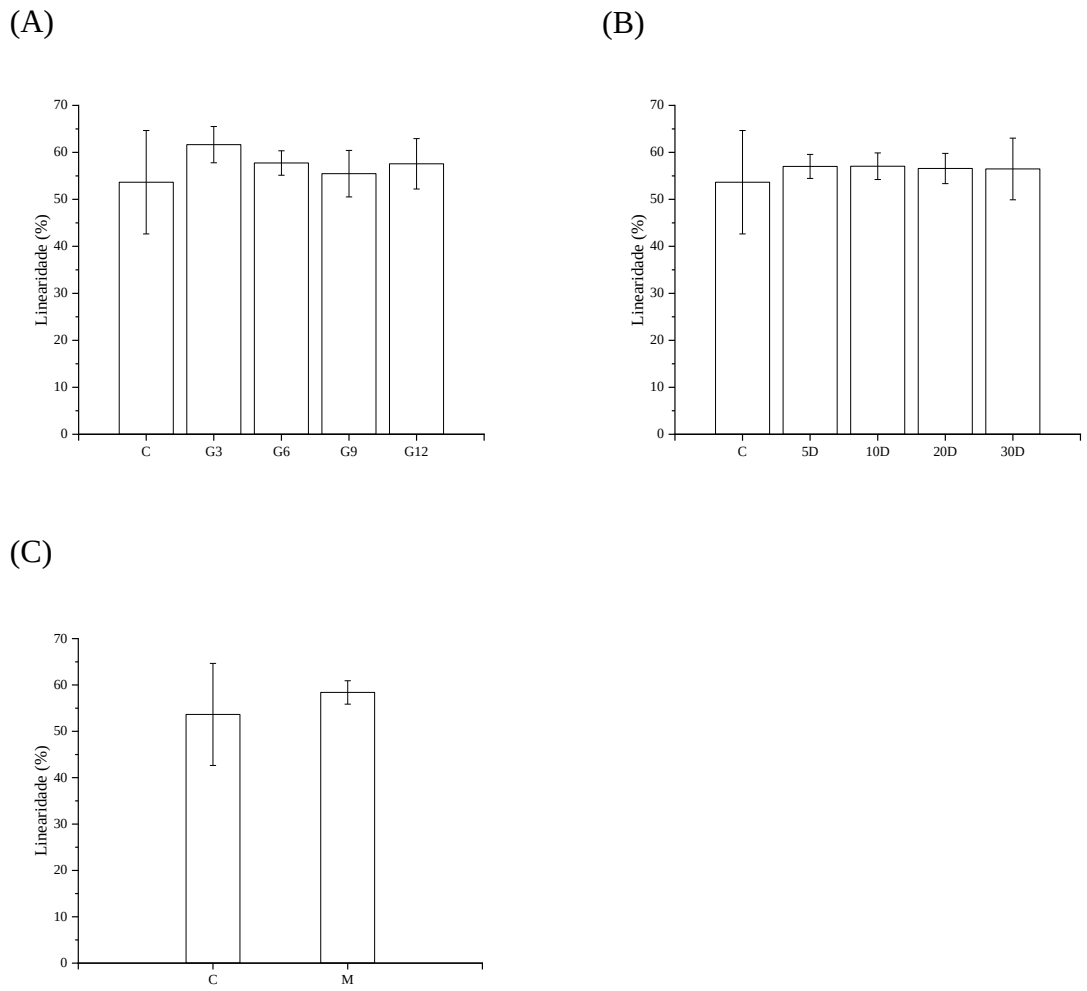

Figura 11. Linearidade aos 12 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP

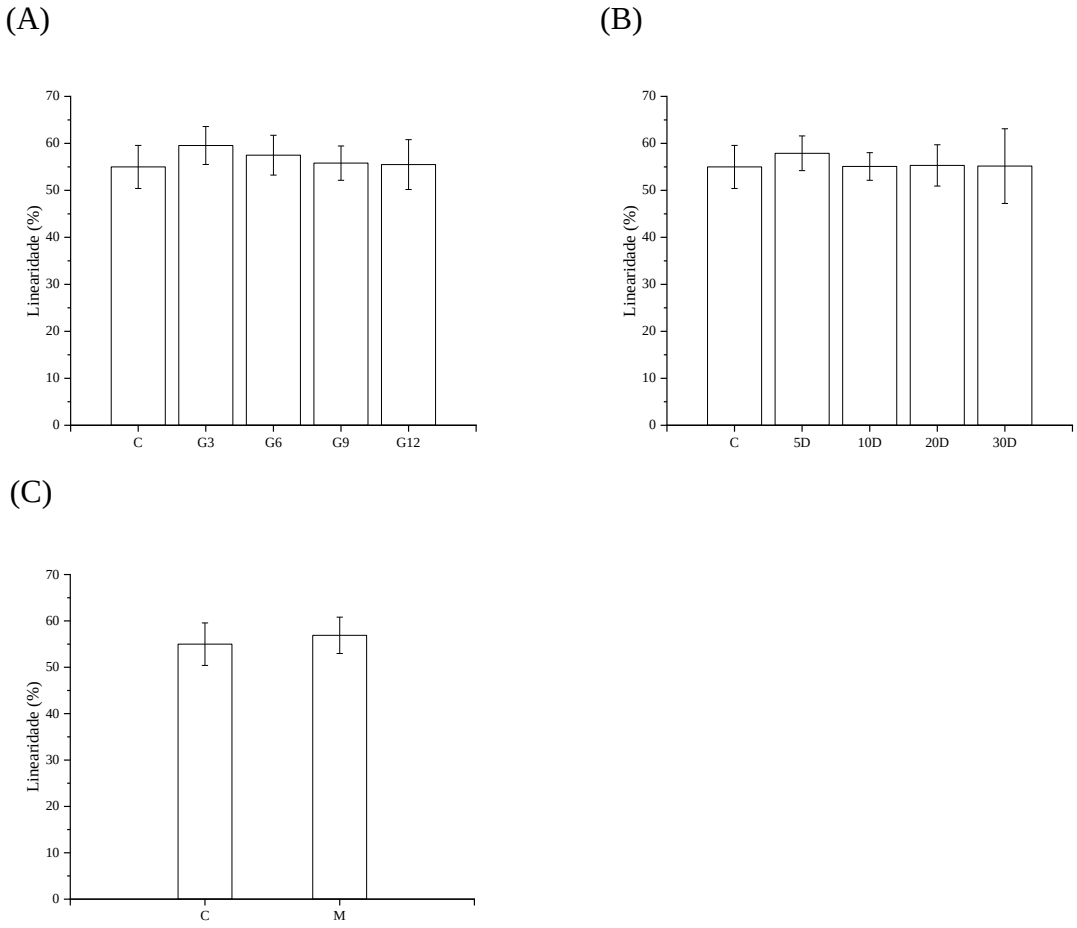

Figura 12. Linearidade aos 14 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP

A velocidade curvilínea (VCL) não foi afetada pelas diferentes concentrações de glifosato, 2,4-D e pela mistura de ambos, nos tempos 12 e 14 segundos após a ativação espermática (Figuras 13 e 14).

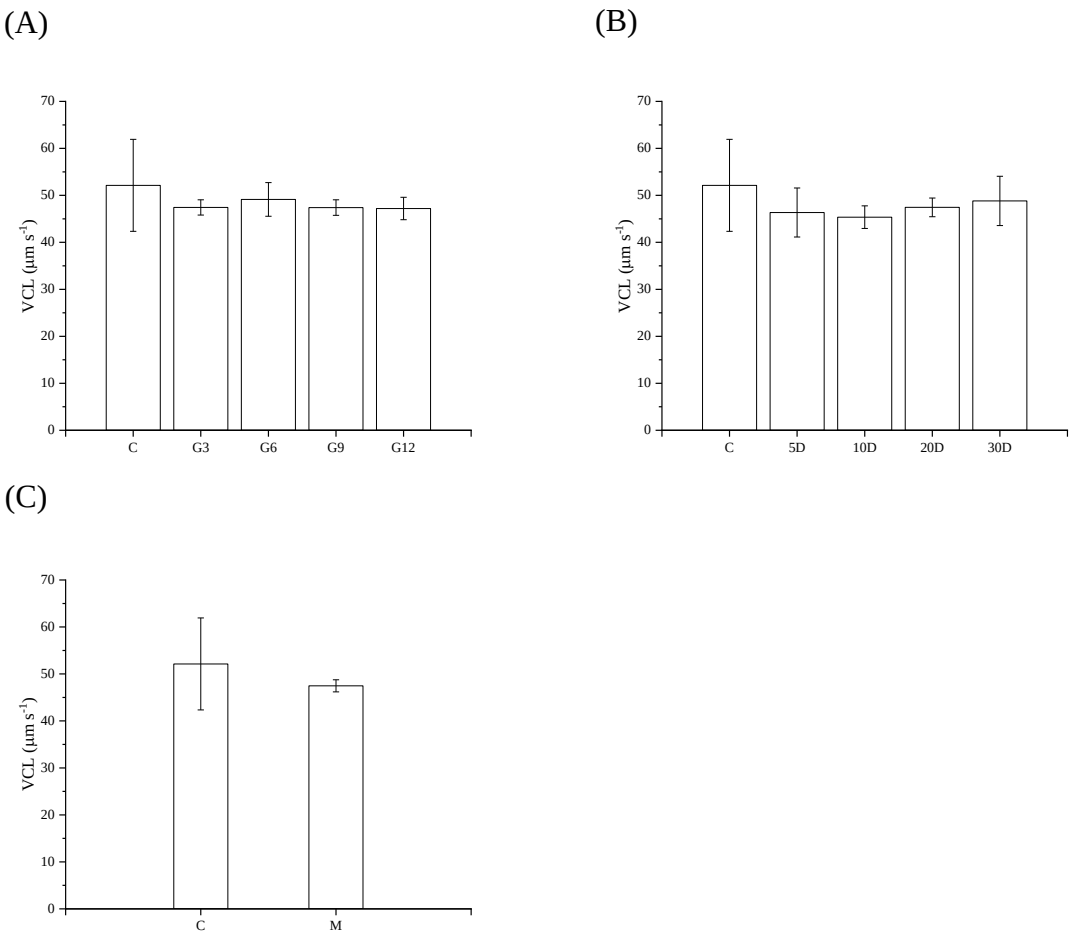

Figura 13. Velocidade curvilínea (VCL) aos 12 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP

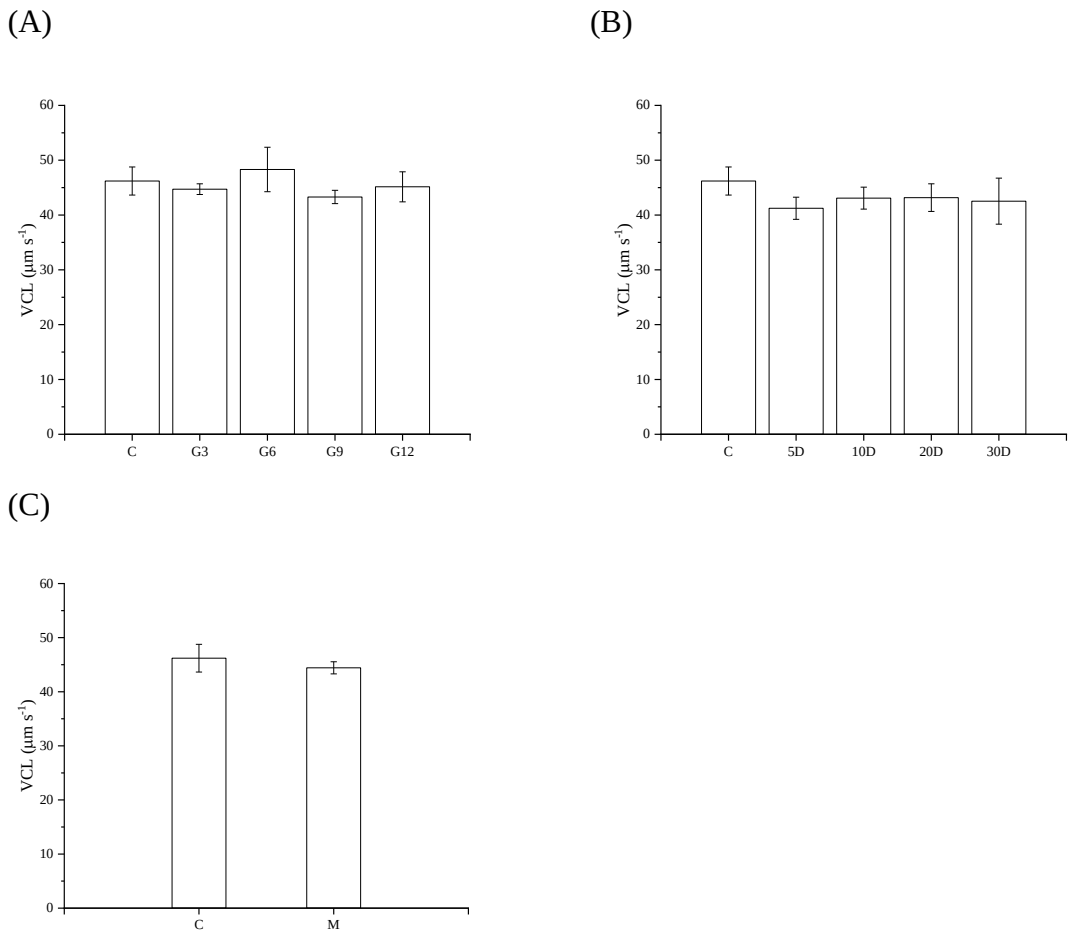

Figura 14. Velocidade curvilínea (VCL) aos 14 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP

A velocidade média de deslocamento (VAP) não foi influenciada pelas diferentes concentrações testadas de glifosato, 2,4-D e a mistura de ambos, aos 12 e aos 14 segundos após a ativação espermática (Figuras 15 e 16).

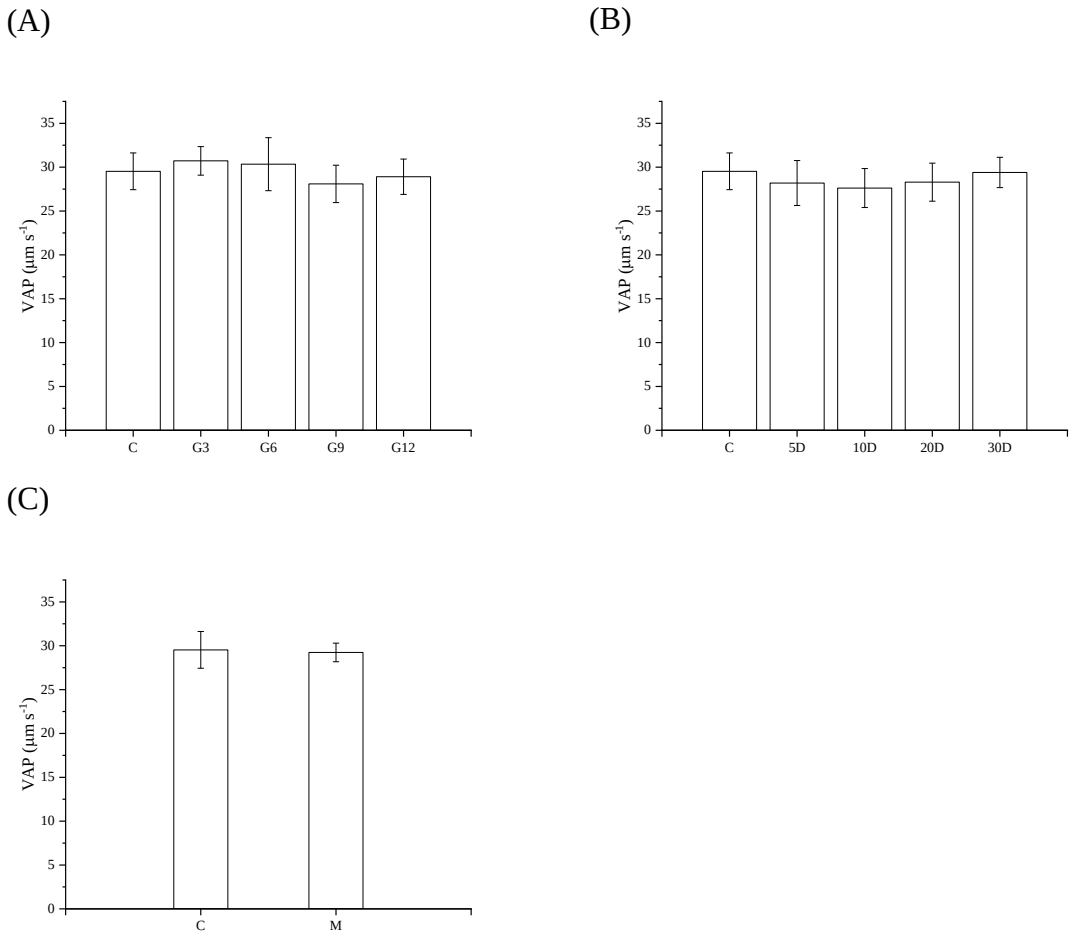

Figura 15. Velocidade média de deslocamento (VAP) aos 12 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP

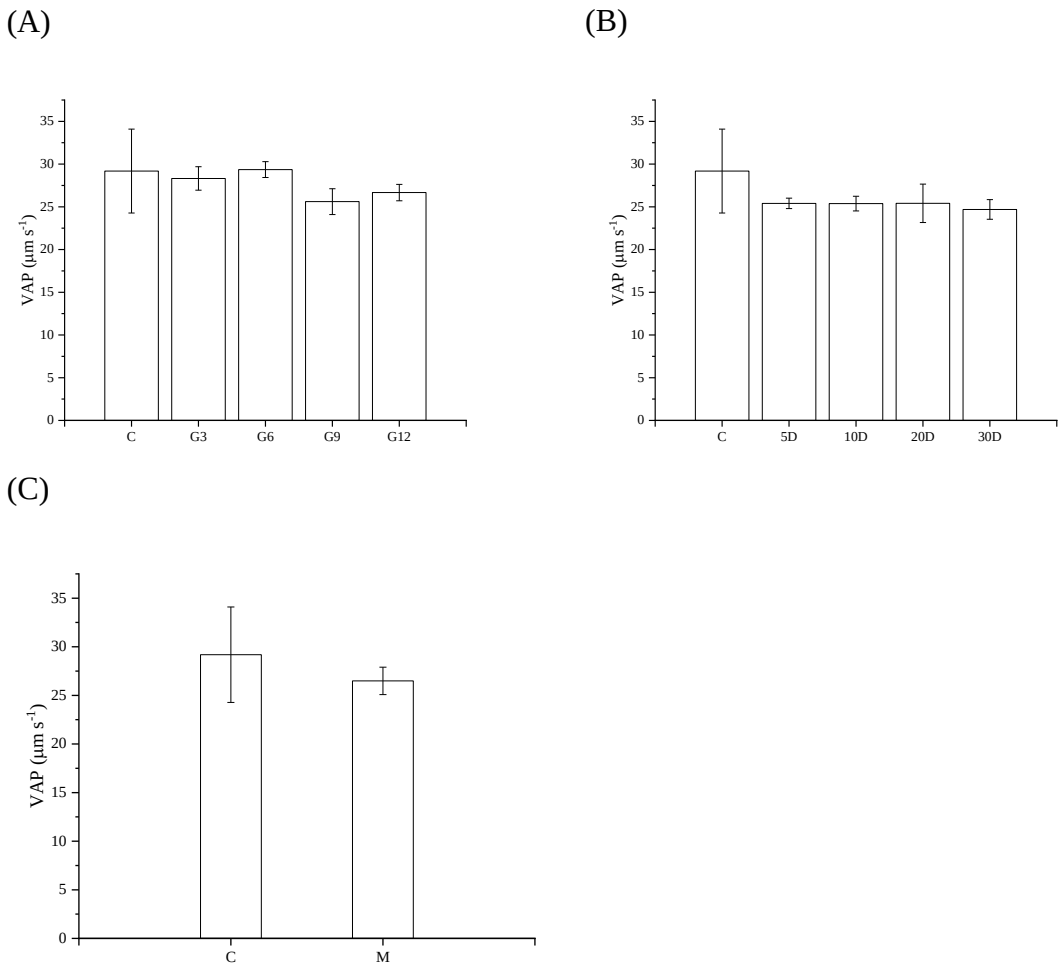

Figura 16. Velocidade média de deslocamento (VAP) aos 14 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP

A velocidade em linha reta (VSL) não sofreu efeito dos tratamentos, aos 12 e aos 14 segundos após a ativação espermática (Figuras 17 e 18).

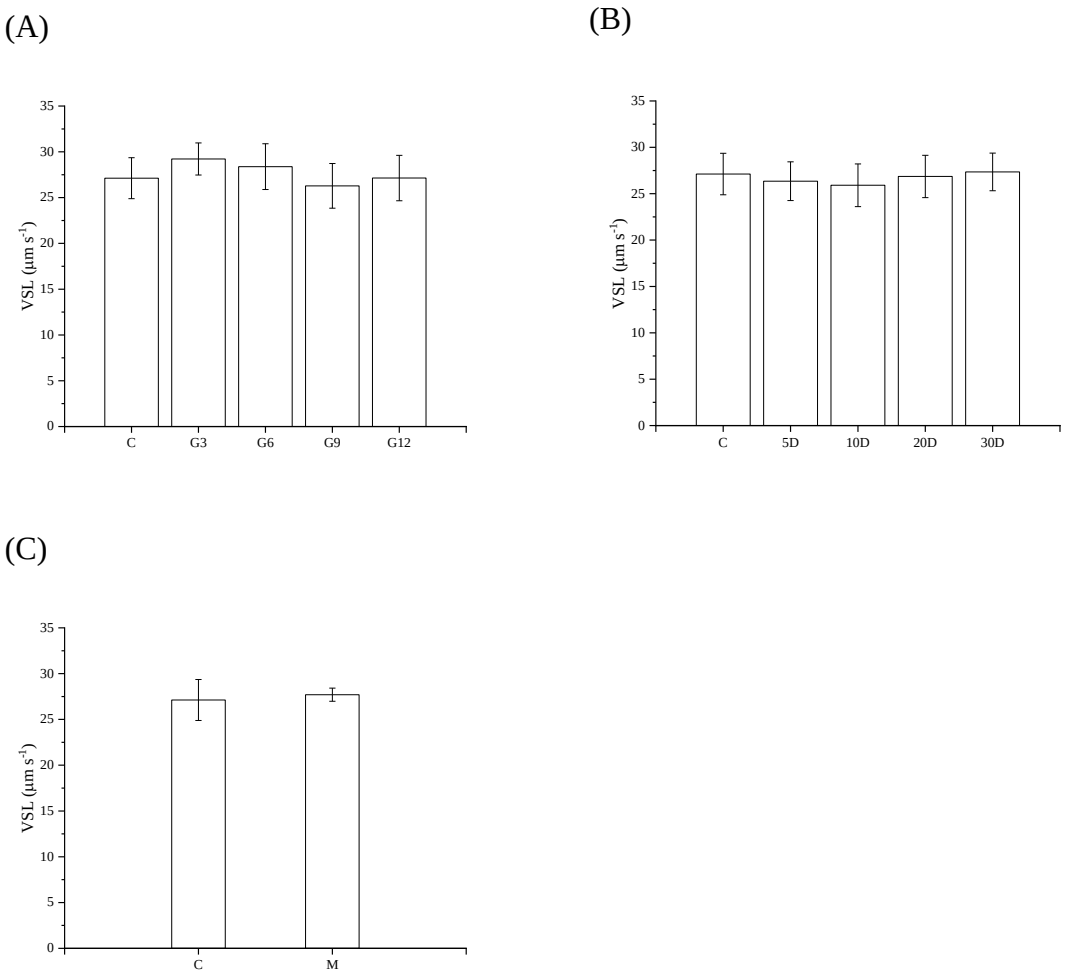

Figura 17. Velocidade em linha reta (VSL) aos 12 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP

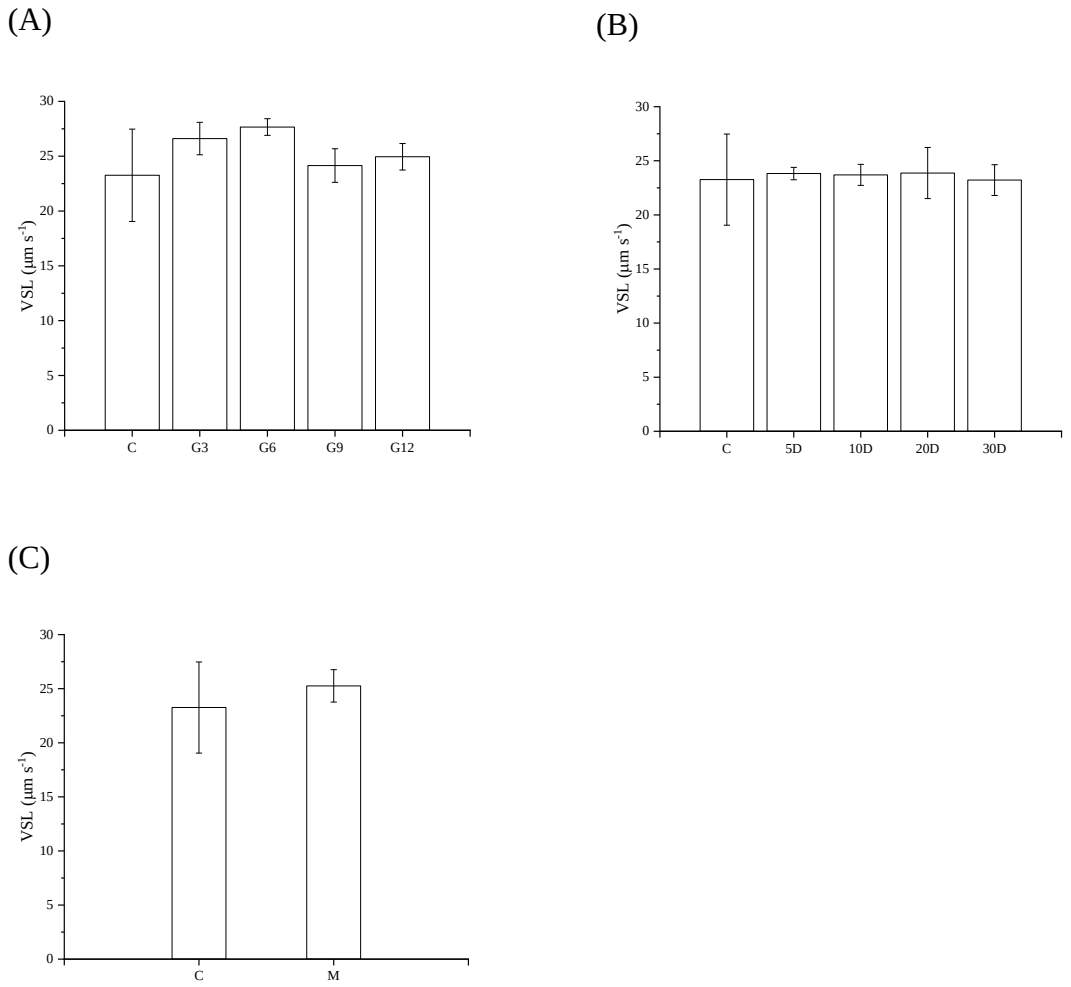

Figura 18. Velocidade em linha reta (VSL) aos 14 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP

As diferentes concentrações de glifosato, 2,4-D e a mistura de ambos não afetaram a velocidade espermática (VE), em nenhum dos tempos de ativação analisados (Figuras 19 e 20).

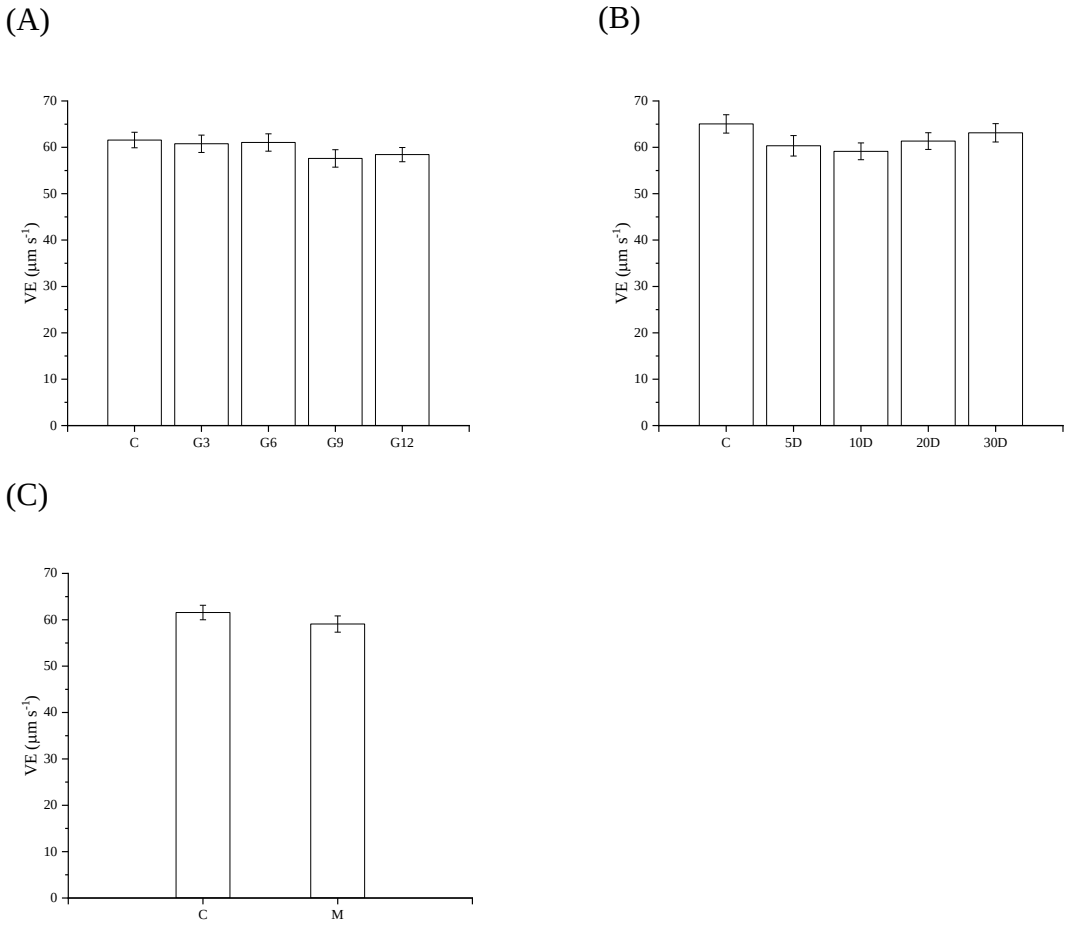

Figura 19. Velocidade espermática (VE) aos 12 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP

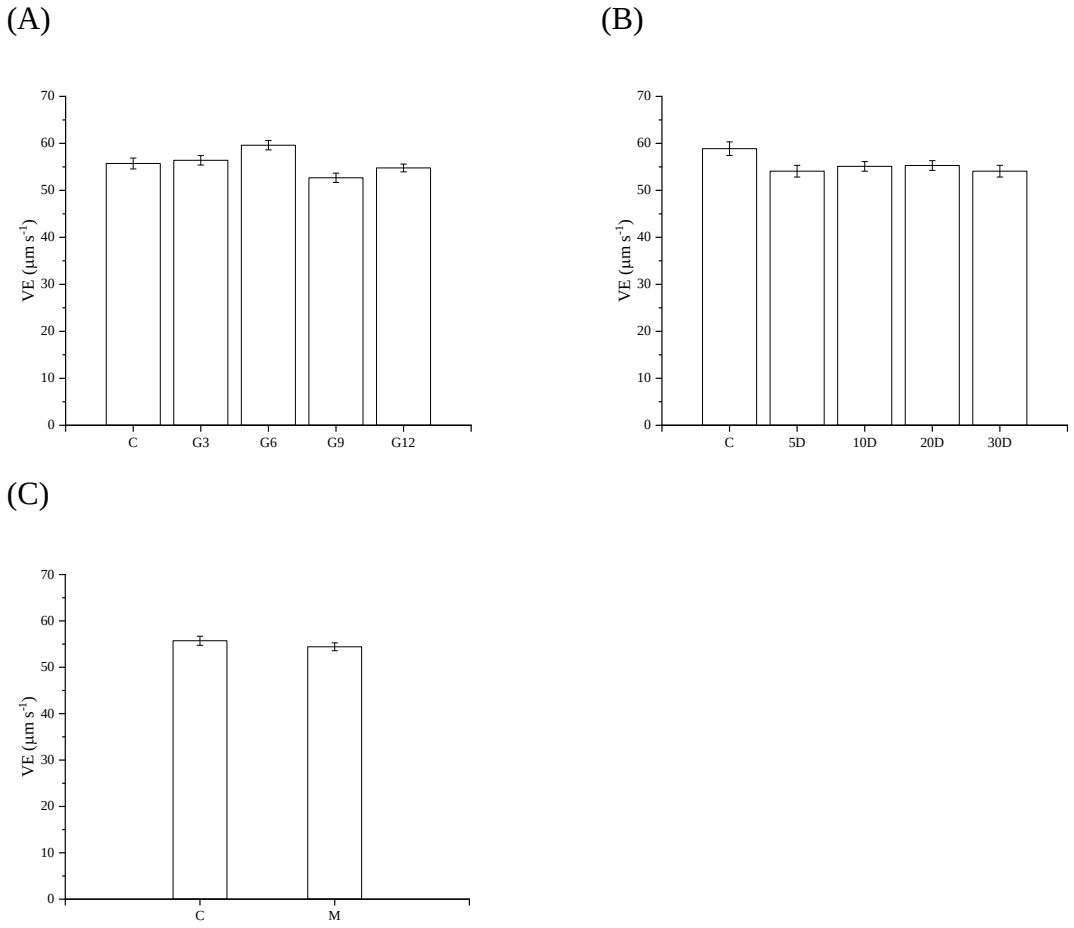

Figura 20. Velocidade espermática (VE) aos 14 segundos após a ativação espermática. (A) C: Controle; G3: 3,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G6: 6,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G9: 9,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; G12: 12,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato; (B) C: Controle; 5D: 5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 10D: 10,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 20D: 20,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; 30D: 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D; (C) C: Controle; M: mistura de ambos (5,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D + 10,0 mg e.a. L^{-1} de glifosato). Valores expressos em média ± DP

3.4 DISCUSSÃO

As concentrações de 2,4-D utilizadas neste estudo, foram insuficientes para causar efeitos deletérios à fertilização e à eclosão. Estes resultados, possivelmente, ocorreram pelo fato de que as concentrações de 2,4-D presentes na água de incubação foram muito menores que a concentração letal (CL_{50}) do 2,4-D para *Rhamdia quelen* (745,0 mg L^{-1}) (CATTANEO et al., 2008). Bringolf et al. (2004) também não observaram diferenças significativas nas taxas de fertilização e eclosão em *Pimephales promelas* expostos a atrazina nas concentrações de 5,0 e 50,0 µg L^{-1}. Gomes (2017) relatou que concentrações crescentes de 2,4-D (0,0; 0,5; 1,0; 2,0;

3,0; 4,0 e 5,0 mg L^{-1}) não interferiram significativamente na capacidade de eclosão de embriões de zebrafish (*Danio rerio*).

Concentrações crescentes de glifosato reduziram as taxas de fertilização e eclosão em jundiás. Possíveis explicações para este resultado, no que se refere ao insucesso na fertilização, pode ser atribuído ao dano potencial dos gametas que ocorre durante a gametogênese e/ou fertilização, e não devido à exposição direta ao glifosato (UREN WEBSTER et al., 2014). O insucesso na eclosão, pode estar relacionado aos déficits comportamentais, que resultam em enfraquecimento ou atraso do movimento muscular espontâneo (HAENDEL et al., 2004) e a inibição da corionase (WAIWOOD; HAYA, 1983). Zhang et al. (2017) reportaram aumento da taxa de eclosão em zebrafish (*Danio rerio*) expostos a concentrações crescentes de glifosato (0,0; 0,1; 1,0; 10,0; 100,0; 200,0 e 400,0 mg L^{-1}). Os autores não previam esse resultado, mas presumem que a exposição ao glifosato pode diminuir a tensão superficial do córion, fazendo com que as taxas de eclosão aumentem. Isto se deve ao fato de que o glifosato tem a capacidade de destruir a estrutura do córion, permitindo que ocorra um rompimento frágil e fácil.

Neste trabalho, a mistura dos herbicidas reduziu o sucesso da fertilização e da eclosão. Esses resultados indicam que o responsável pela redução nas taxas de fertilização e eclosão quando utilizado os herbicidas de forma combinada é o glifosato e não o 2,4-D. Gomes (2017) também verificou que concentrações crescentes (0,0; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 mg L^{-1}) do produto comercial Tordon® (2,4-D + picloram) diminuem as taxas de eclosão. A autora sugere que a redução da taxa de eclosão foi ocasionada pelo picloram ou pelos ingredientes inertes presentes na formulação comercial.

No presente trabalho, não foram observadas anormalidades morfológicas significativas em larvas de jundiá expostas ao glifosato, 2,4-D e a mistura de ambos. Entretanto, em estudo realizado por Zhang et al. (2017) a exposição de larvas de zebrafish (*Danio rerio*) a altas concentrações de glifosato (100,0; 200,0 e 400,0 mg L^{-1}) resultaram em menores comprimentos corporais, além de olhos e cabeças menores. Porém, não houve alterações morfológicas em concentrações mais baixas de glifosato (0,0; 0,1; 1,0; 10,0 mg L^{-1}). Os autores supunham que a toxicidade do glifosato pode estar relacionada à acidez presente em concentrações mais elevadas, já que quimicamente o glifosato é um ácido orgânico fraco.

A CAT é um dos catalisadores naturais mais eficientes, sendo capaz de decompor o peróxido de hidrogênio tóxico de um modo extremamente rápido (SCANDALIOS, 2005). Os resultados obtidos pelas análises de indicadores do estresse oxidativo, como a da catalase, demonstraram que não houve alteração da atividade enzimática em larvas de jundiá expostas ao 2,4-D, ao glifosato e a mistura de ambos. Tais resultados corroboram com os resultados

encontrados por Sobjak et al. (2017), que também não observaram alterações na atividade desta enzima em ovos/larvas de jundiá expostos a uma concentração de 6,5 mg L^{-1} de glifosato.

A glutationa-S-transferase exerce uma função importante na desintoxicação e eliminação de compostos eletrofílicos, incluindo os agrotóxicos (JONSSON et al., 2002), e a sua atividade é influenciada pelo tipo e concentração do contaminante, pelo tempo de exposição e pela espécie (ORUÇ; ÜNER, 2000). Neste estudo, não foi verificada alteração na atividade da GST em larvas de jundiá expostas ao 2,4-D, ao glifosato e a mistura de ambos. Esses resultados sugerem que a GST desempenhou um papel fraco na desintoxicação dos herbicidas (WU et al., 2011). Sobjak et al. (2017) também não constataram alteração na atividade da GST em ovos/larvas de jundiá expostos a uma concentração subletal de glifosato (6,5 mg L^{-1}). Hostovsky et al. (2012) investigaram os efeitos da exposição subcrônica ao herbicida terbutilazina (0,9; 160,0; 520,0 e 820 µg L^{-1}) na atividade da GST em estágios de desenvolvimento embrio-larval de carpa comum (*Cyprinus carpio* L.) e não encontraram alterações significativas na atividade da GST em nenhuma das concentrações de terbutilazina testadas.

A superóxido dismutase é considerada a primeira linha de defesa contra a toxicidade causada pelas espécies reativas ao oxigênio (ROS) dentro de uma célula (ALSCHER et al., 2002), e é um biomarcador amplamente utilizado para avaliar o estresse oxidativo em organismos aquáticos (ATAMANIUK et al., 2013; HONG et al., 2018). A atividade da SOD em embriões de zebrafish expostos ao 2,4-D nas concentrações de 25,0 e 50,0 mg L^{-1} não foi alterada (LI et al., 2017). Porém, curiosamente a superóxido dismutase não apresentou atividade em larvas de jundiá expostas ao glifosato, ao 2,4-D e a mistura de ambos. Uma vez que existem poucas informações sobre a atividade desta enzima em larvas de peixes expostas a contaminantes agrícolas, novos estudos são necessários para elucidar a sua atuação no desenvolvimento embrionário e larval.

Durante o desenvolvimento larval é esperado o aumento da reação de lipoperoxidação, em consequência das várias transformações que ocorrem no organismo do animal (SOBJAK et al., 2017). Contudo, no presente trabalho não foi observado um aumento significativo na ocorrência de LPO em larvas de jundiá expostas ao glifosato, ao 2,4-D e a mistura de ambos. Hostovsky et al. (2012) também não verificaram um aumento significativo na lipoperoxidação, em estágios iniciais de desenvolvimento da carpa comum (*Cyprinus carpio* L.) após exposição subcrônica a terbutilazina (0,9; 160,0; 520,0 e 820 µg L^{-1}).

A exposição de peixes a herbicidas pode induzir o dano oxidativo em proteínas (CATTANEO et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2018; LORO et al., 2015). No entanto, neste

trabalho não foram observadas alterações significativas na ocorrência de PCO em larvas de jundiá expostas ao glifosato, ao 2,4-D e à mistura dos herbicidas. Atamaniuk et al. (2013) também não observaram diferenças nos níveis de PCO nas brânquias de goldfish (*Carassius auratus* L.) expostos ao 2,4-D (0,0; 1,0; 10,0 e 100,0 mg L^{-1}).

O ensaio cometa, demonstrou que o glifosato testado de forma isolada não foi genotóxico às larvas de jundiá, porém revelou aumento significativo de quebras ao DNA em larvas expostas as concentrações de 5,0; 20,0 e 30,0 mg e.a. L^{-1} de 2,4-D, e em larvas expostas a mistura dos herbicidas. Lajmanovich et al. (2015) pesquisaram os efeitos da exposição dérmica a formulações comerciais contendo clorpirifós (10,0 mg L^{-1}), 2,4-D (20,0 mg L^{-1}) e glifosato (20,0 mg L^{-1}) durante 48 horas nos danos ao DNA em eritrócitos de sapos (*Rhinella arenarum*). Os autores observaram que apenas o inseticida clorpirifós e o herbicida 2,4-D induziram danos ao DNA. Assim como verificado no presente trabalho, estes resultados indicam que, possivelmente, as concentrações testadas de glifosato não foram suficientes para induzirem danos ao DNA ou os efeitos deste herbicida sobre o DNA de organismos aquáticos, ocorrem apenas após longo período de exposição, já que a sua absorção pela pele é muito baixa (WESTER et al., 1991).

A motilidade dos espermatozoides ativados com diferentes concentrações de 2,4-D foi significativamente reduzida. Trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostas ao inseticida cipermetrina (1,025; 2,05 e 4,1 µg L^{-1}) também apresentaram redução significativa da motilidade espermática (KUTLUYER et al., 2016). Em *Salmo coruhensis* a motilidade dos espermatozoides diminuiu significativamente com a exposição aos inseticidas clorpirifós (5,0; 10,0 e 15,0 µg L^{-1}) (KUTLUYER et al., 2017) e malation (75,0; 100,0 e 125,0 µg L^{-1}) (KOCABAŞ et al., 2018). O inseticida diazinon (0,01; 0,1; 0,2 e 0,5 mg L^{-1}) também provocou efeitos adversos sobre a porcentagem de espermatozoides móveis em *Rutilus frisii kutum* (MASOULEH et al., 2011). A porcentagem de espermatozoides móveis em *Barbonymus gonionotus* também foi afetada negativamente pela exposição ao inseticida quinalphos (0,94 mg L^{-1}) (MISHU et al., 2020). Betancourt et al. (2006) sugerem que a redução da motilidade espermática, induzidas por herbicidas, pode ser causada pela ação adversa destes poluentes sobre a cadeia respiratória mitocondrial, que é essencial para a geração de energia durante o movimento dos espermatozoides.

A motilidade dos espermatozoides de jundiá foi negativamente afetada pela exposição ao glifosato. Gonçalves et al. (2018) observaram que a motilidade espermática em *Astyanax lacustres*, após a ativação com concentrações crescentes de glifosato (50,0; 300,0 e 1800,0 µg L^{-1}) foi zero. Lopes et al. (2014) relataram que concentrações crescentes de glifosato (0,0; 5,0

e 10,0 mg L^{-1}) reduziram significativamente a motilidade espermática em zebrafish (*Danio rerio*). Harayashiki et al. (2013) também reportaram a redução da motilidade espermática em *Poecilia vivipara* expostos a 700,0 μg L^{-1} de glifosato. Sánchez et al. (2017) reportaram a mesma observação com relação a redução da motilidade espermática em *Jenynsia multidentata* expostos a três formulações comerciais de glifosato na concentração de 0,5 mg e.a. L^{-1}. O glifosato pode inibir a atividade da succinato desidrogenase mitocondrial (BENACHOUR; SÉRALINI, 2009), contribuindo para a redução da porcentagem de espermatozoides móveis, já que a inibição desta enzima prejudica a produção de ATP (adenosina trifosfato) e o batimento dos flagelos (GONÇALVES et al., 2018).

As outras variáveis de movimento espermático como a linearidade, a VCL, a VAP e a VSL não foram afetadas pelo uso do glifosato, do 2,4-D e da mistura dos herbicidas na ativação dos espermatozoides. Resultados divergentes foram observados por Silveira et al. (2019) para a linearidade, VCL, VAP e VSL em *Odontesthes humensis* expostos ao glifosato (7,8 mg e.a. L^{-1}) por 24 horas onde ocorreu uma diminuição significativa nestes parâmetros, por Gonçalves et al. (2018) para VCL, VAP e VSL em *Astyanax lacustres*, após a ativação com concentrações crescentes de glifosato (50,0; 300,0 e 1800,0 μg L^{-1}) onde todas as variáveis medidas apresentaram um valor zero e por Mishu et al. (2020) que evidenciaram uma influência negativa sobre a linearidade, VCL e VSL em espermatozoides de *Barbonymus gonionotus* expostos ao inseticida quinalphos (0,94 mg L^{-1}). Estudo semelhante sobre o efeito da atrazina nos parâmetros espermáticos de carpa comum (*Cyprinus carpio*) (ÖZGÜR, 2019) mostrou que diferentes concentrações (0,001; 0,01; 0,1 e 0,5 mg L^{-1}) deste herbicida não impactou negativamente a linearidade, a VCL e a VAP, estando de acordo com os resultados do nosso trabalho.

A velocidade espermática é um fator determinante no sucesso da fertilização (LEVITAN, 2000; GAGE et al., 2004; GASPARINI et al., 2010). Como neste trabalho, a velocidade espermática não foi prejudicada pelo uso do glifosato, do 2,4-D e da mistura de ambos, podemos inferir que a ativação do sêmen com estes herbicidas não afeta o sucesso reprodutivo de jundiás, uma vez que a velocidade espermática está positivamente e significativamente associada ao sucesso da reprodução (GASPARINI et al., 2010).

3.5 CONCLUSÃO

O glifosato mostrou-se pouco tóxico, nas concentrações testadas, para gametas, embriões e larvas de jundiá quando isolado. Apresentou alterações somente nas três maiores concentrações testadas, na motilidade espermática e nas duas maiores concentrações testadas, nas taxas de fertilização e eclosão.

O 2,4-D causou toxicidade em todas as concentrações testadas, alterando a motilidade dos espermatozoides e nas concentrações de 5,0; 20,0 e 30,0 mg e.a. L^{-1}, provocando danos ao material genético das larvas de jundiá.

A mistura de ambos os herbicidas teve um padrão de alterações semelhante ao do glifosato quando isolado, no que se refere as taxas de fertilização, eclosão e motilidade espermática, e um padrão de alterações semelhante ao do 2,4-D quando isolado, no que se refere a indução da quebra na fita do DNA de larvas de jundiá e a motilidade dos espermatozoides.

3.6 REFERÊNCIAS

ADAMES, M.S.; DE TOLEDO, C.P.R.; NEUMANN, G.; BUZZI, A.H.; BURATTO, C.N.; PIANA, P.A.; BOMBARDELLI, R.A. Optimization of the sperm: oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. **Animal Reproduction Science**, v. 161, p. 119-128, 2015.

AEBI, H. Catalase *in Vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AKCHA, F.; SPAGNOL, C.; ROUXEL, J. Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 106, p. 104-113, 2012.

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.

ATAMANIUK, T.M.; KUBRAK, O.I.; STOREY, K.B.; LUSHCHAK, V.I. Oxidative stress as a mechanism for toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D): studies with goldfish gills. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 10, p. 1498-1508, 2013.

BENACHOUR, N.; SÉRALINI, G.E. Glyphosate Formulations Induce Apoptosis and Necrosis in Human Umbilical, Embryonic, and Placental Cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, n. 1, p. 97-105, 2009.

BETANCOURT, M.; RESÉNDIZ, A.; CASAS, E.; FIERRO, R. Effect of two insecticides and two herbicides on the porcine sperm motility patterns using computer-assisted semen analysis (CASA) in vitro. **Reproductive Toxicology**, v. 22, n. 3, p. 508-512, 2006.

BOMBARDELLI, R.A.; MÖRSCHBÄCHER, E.F.; CAMPAGNOLO, R.; SANCHES, E.A.; SYPERRECK, M.A. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1251-1257, 2006.

BOMBARDELLI, R.A.; NEUMANN, G.; TOLEDO, C.P.R.; SANCHES, E.A.; BASTOS, D.N.; OLIVEIRA, J.D.S. Sperm motility, fertilization, and larval development of silver catfish (*Rhamdia quelen*) in copper-contaminated water. **Semina**: Ciências Agrárias, v. 37, n. 3, p. 1667-1677, 2016.

BRADBERRY, S.M.; PROUDFOOT, A.T.; VALE, J.A. Poisoning Due to Chlorophenoxy Herbicides. **Toxicological Reviews**, v. 23, n. 2, p. 65-73, 2004a.

BRADBERRY, S.M.; PROUDFOOT, A.T.; VALE, J.A. Glyphosate Poisoning. **Toxicological Reviews**, v. 23, n. 3, p. 159-167, 2004b.

BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAND, R.M.; SPALDING, M.; MUELLER, C. Sunscreens Can Increase Dermal Penetration of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 40, n. 7, p. 827-832, 2002.

BRINGOLF, R.B.; BELDEN, J.B.; SUMMERFELT, R.C. Effects of atrazine on fathead minnow in a short-term reproduction assay. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 1019-1025, 2004.

BRITO. I.A. **Avaliação integrada da qualidade da água do Alto Iguaçu, utilizando *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824) como modelo de estudo**. 2015. Tese (Doutorado em Ecologia e Conservação) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BUKOWSKA, B. Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid - Molecular Mechanisms. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 3, p. 365-374, 2006.

ÇAĞLAR, S.; KOLANKAYA, D. The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 25, n. 1, p. 57-62, 2008.

CARDOSO, A.P.; NETO, J.R.; MEDEIROS, T.S.; KNÖPKER, M.A.; LAZZARI, R. Criação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentadas com rações granuladas contendo fígados ou hidrolisados. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 26, n. 4, p. 457-462, 2004.

CATTANEO, R.; LORO, V.L.; SPANEVELLO, R.; SILVEIRA, F.A.; LUZ, L.; MIRON, D.S.; FONSECA, M.B.; MORAES, B.S.; CLASEN, B. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxiacetic acid (2,4-D) herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 92, n. 3, p. 133-137, 2008.

CATTANEO, R.; MORAES, B.S.; LORO, V.L.; PRETTO, A.; MENEZES, C.; SARTORI, G.M.S.; CLASEN, B.; AVILA, L.A.; MARCHESAN, E.; ZANELLA, R. Tissue Biochemical Alterations of *Cyprinus carpio* Exposed to Commercial Herbicide Containing Clomazone Under Rice-Field Conditions. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 62, n. 1, p. 97-106, 2012.

CHAIM, C.F.; PLESE, L.P.M.; CONSOLIN-FILHO, N. **Monitoramento do Rio Iquiri no Município de Capixaba/AC do herbicida 2,4-D Utilizado na Cultura da Cana-de-Açúcar**. V Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica - CONNEPI, 2010.

COLLINS, A.R.; DOBSON, V.L.; DUSINSKA, M.; KENNEDY, G.; STETINA, R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research**, v. 375, p. 183-193, 1997.

CROUCH, R.K.; GANDY, S.E.; KIMSEY, G.; GALBRAITH, R.A.; GALBRAITH, G.M.P.; BUSE, M.G. The Inhibition of Islet Superoxide Dismutase by Diabetogenic Drugs. **Diabetes**, v. 30, n. 3, p. 235-241, 1981.

DELMONICO, E.L.; BERTOZZI, J.; DE SOUZA, N.E.; OLIVEIRA, C.C. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid for assessing the quality tap water using SPE and HPLC. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 36, n. 3, p. 513-519, 2014.

FREIRE, R.; SCHNEIDER, R.M.; DE FREITAS, F.H.; BONIFÁCIO, C.M.; TAVARES, C.R.G. Monitoring of toxic chemical in the basin of Maringá stream. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 34, n. 3, p. 295-302, 2012.

GAGE, M.J.G.; MACFARLANE, C.P.; YEATES, S.; WARD, R.G.; SEARLE, J.B.; PARKER, G.A. Spermatozoal Traits and Sperm Competition in Atlantic Salmon: Relative Sperm Velocity Is the Primary Determinant of Fertilization Success. **Current Biology**, v. 14, n. 1, p. 44-47, 2004.

GASPARINI, C.; SIMMONS, L.W.; BEVERIDGE, M.; EVANS, J.P. Sperm Swimming Velocity Predicts Competitive Fertilization Success in the Green Swordtail *Xiphophorus helleri*. **PloS one**, v. 5, n. 8, p. e12146, 2010.

GOMES, D.S.F. **Os efeitos do ácido 2,4-diclorofenoxiacético e do Tordon® no desenvolvimento embrionário e no metabolismo energético do peixe-zebra (*Danio rerio*)**. 2017. 78f. Dissertação (Mestrado em Produtos Bioativos e Biociências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé.

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

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

HAENDEL, M.A.; TILTON, F.; BAILEY, G. S.; TANGUAY, R.L. Developmental Toxicity of the Dithiocarbamate Pesticide Sodium Metam in Zebrafish. **Toxicological Sciences**, v. 81, n. 2, p. 390-400, 2004.

HARAYASHIKI, C.A.Y.; JUNIOR, A.S.V.; MACHADO, A.A.S.; CABRERA, L.C.; PRIMEL, E.G.; BIANCHINI, A.; CORCINI, C.D. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. **Aquatic Toxicology**, v. 142, p. 176-184, 2013.

HONG, Y.; YANG, X.; HUANG, Y.; YAN, G.; CHENG, Y. Assessment of the oxidative and genotoxic effects of the glyphosate-based herbicide Roundup on the freshwater shrimp, *Macrobrachium nipponensis*. **Chemosphere**, v. 210, p. 896-906, 2018.

HOSTOVSKY, M.; BLAHOVA, J.; PLHALOVA, L.; STEPANOVA, S.; PRASKOVA, E.; MARSALEK, P.; SVOBODOVA, Z. Oxidative stress parameters in early developmental stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.) after subchronic exposure to terbuthylazine and metribuzin. **Neuroendocrinology Letters**, v. 33, p. 124-129, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Os 10 ingredientes ativos mais vendidos - 2019**. 2020. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>. Acesso em: 08/10/2020.

JEZIERSKA, B.; LUGOWSKA, K.; WITESKA, M.; SARNOWSKI, P. Malformations of newly hatched common carp larvae. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v. 3, n. 2, p. 1-10, 2000.

JIANG, Z.Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous Ion Oxidation in the Presence of Xylenol Orange for Detection of Lipid Hydroperoxide in Low Density Lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384-389, 1992.

JONSSON, C.M.; FERRACINI, V.L.; PARAÍBA, L.C.; RANGEL, M.; AGUIAR, S.R. Alterações bioquímicas e acúmulo em pacus (*Metynnis argenteus*) expostos ao paclobutrazol. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 441-446, 2002.

KOCABAŞ, M.; KUTLUYER, F.; BENZER, F.; ERIŞIR, M. Malathion-induced spermatozoal oxidative damage and alterations in sperm quality of endangered trout *Salmo coruhensis*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 3, p. 2588-2593, 2018.

KOPPEN, G.; AZQUETA, A.; POURRUT, B.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A.R., LANGIE, S.A.S. The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, v. 00, p. 1-12, 2017.

KUTLUYER, F.; BENZER, F.; ERIŞIR, M.; ÖĞRETMEN, F.; İNANAN, B.E. The *in vitro* effect of cypermethrin on quality and oxidative stress indices of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 128, p. 63-67, 2016.

KUTLUYER, F.; KOCABAŞ, M.; ERIŞIR, M.; BENZER, F. Effect of the organophosphate insecticide chlorpyrifos exposure on oxidative stress and quality of *Salmo coruhensis* spermatozoa. **Toxin Reviews**, v. 38, n. 1, p. 71-76, 2017.

LAJMANOVICH, R.C.; ATTADEMO, A.M.; SIMONIELLO, M.F.; POLETTA, G.L.; JUNGES, C.M.; PELTZER, P.M.; GRENÓN, P.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M.C. Harmful Effects of the Dermal Intake of Commercial Formulations Containing Chlorpyrifos, 2,4-D, and Glyphosate on the Common Toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). **Water, Air & Soil Pollution**, v. 226, p. 1-12, 2015.

LEVINE, R.L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.G.; AHN, B.W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E.R. [49] Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464-478, 1990.

LEVITAN, D. R. Sperm velocity and longevity trade off each other and influence fertilization in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 267, n. 1443, p. 531-534, 2000.

LI, K.; WU, J.Q.; JIANG, L.L.; SHEN, L.Z.; LI, J.Y.; HE, Z.H.; WEI, P.; LV, Z.; HE, M.F. Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. **Chemosphere**, v. 171, p. 40-48, 2017.

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

LORO, V.L.; GLUSCZAK, L.; MORAES, B.S.; LEAL, C.A.M.; MENEZES, C.; MURUSSI, C.R.; LEITEMPERGER, J.; SCHETINGER, M.R.C; MORSCH, V.M. Glyphosate-based herbicide affects biochemical parameters in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824 and) *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837). **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 1, p. 229-236, 2015.

MASOULEH, F.F.; AMIRI, B.M.; MIRVAGHEFI, A.R.; NEMTOLLAHI, M.A. *In vitro* Effects of Diazinon on Male Reproductive Tissue and Sperm Motility of Caspian Kutum (*Rutilus frisii kutum*). **Research Journal of Environmental Toxicology**, v. 5, n. 2, p. 108-116, 2011.

MENEZES, C.C.; DA FONSECA, M.B.; LORO, V.L.; SANTI, A.; CATTANEO, R.; CLASEN, B.; PRETTO, A.; MORSCH, V.M. Roundup Effects on Oxidative Stress Parameters and Recovery Pattern of *Rhamdia quelen*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 4, p. 665-671, 2011.

MENEZES, C.; FONSECA, M.B.; LEITEMPERGER, J.; PRETTO, A.; MORAES, B.S.; MURUSSI, C.R.; BALDISSEROTTO, B.; LORO, V.L. Commercial formulation containing 2,4-D affects biochemical parameters and morphological indices of silver catfish exposed for 90 days. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 323-330, 2014.

MISHU, M.M.; MOSTAKIM, G.M.; KHATUN, M.M.; RAHMAN, M.K.; SHAHJAHAN, M.; ISLAM, M.S. Sperm movement and morphological changes in the silver barb (*Barbonymus gonionotus*) exposed to quinalphos. **Environmental and Sustainability Indicators**, v. 8, p. 100083, 2020.

MODESTO, K.A.; MARTINEZ, C.B.R. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**, v. 81, n. 6, p. 781-787, 2010.

MOSSINI, S.A.G.; NISHIYAMA, P. Agrotóxicos – aspectos gerais e implicações para a saúde humana. In: VILLALOBOS, J.U.G.; FAZOLLI, S.A. (Ed.). **Agrotóxicos**: um enfoque multidisciplinar. Maringá: EDUEM, 2017. 214p.

ORUÇ, E.Ö.; ÜNER, N. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 127, n. 3, p. 291-296, 2000.

ÖZGÜR, M.E. The *in vitro* toxicity of atrazine on kinematics and DNA fragmentation in common carp (*Cyprinus carpio*) sperm cells. **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, v. 70, n. 3, p. 1639-1646, 2019.

PINHEIRO, A.; SILVA, M.R.; KRAISCH, R. Presença de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas na bacia do Itajaí, SC. **Revista de Gestão de Água da América Latina**, v. 7, n. 2, p. 17-26, 2010.

RAMSDORF, W.A.; FERRARO, M.V.M.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A.; COSTA, J.R.M.; CESTARI, M.M. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 158, p. 77-85, 2009.

ROMANO, R.M.; ROMANO, M.A.; DE OLIVEIRA, C.A. Glifosato como desregulador endócrino químico. **Ambiência**, v. 5, n. 2, p. 359-372, 2009.

SANCHES, E.A.; BOMBARDELLI, R.A.; BAGGIO, D.M.; SOUZA, B.E. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 11, p. 2091-2098, 2009.

SANCHES, E.A.; OKAWARA, R.Y.; CANEPPELE, D.; TOLEDO, C.P.R.; BOMBARDELLI, R.A.; ROMAGOSA, E. Sperm characteristics of *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) throughout 112 h of storage at four temperatures. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 31, p. 79-88, 2015.

SÁNCHEZ, J.A.A.; JUNIOR, A.S.V.; CORCINI, C.D.; DA SILVA, J.C.; PRIMEL, E.G.; CALDAS, S.; KLEIN, R.D.; MARTINS, C.M.G. Effects of Roundup formulations on biochemical biomarkers and male sperm quality of the livebearing *Jenynsia multidentata*. **Chemosphere**, v. 177, p. 200-210, 2017.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SILVA, M.A.; COLEONE, A.C.; IGNÁCIO, N.F.; MACHADO, A.A.; AMÉRICO, J.H.P.; VELINI, E.D.; NETO, J.G.M. **As águas de abastecimento e de tanque de uma piscicultura em área de cultivo de cana-de-açúcar são tóxicas para organismos aquáticos, nas estações de inverno e primavera?** XII Congresso Nacional de Meio Ambiente de Poços de Caldas, 2015.

SILVEIRA, T.; JUNIOR, A.S.V.; CORCINI, C.D.; DOMINGUES, W.B.; REMIÃO, M.; SANTOS, L.; BARRETO, B.; LESSA, I.; MARTINS, D.; BOYLE, R.T.; COSTA, P.G.; BIANCHINI, A.; ROBALDO, R.B.; CAMPOS, V.F. Roundup® Herbicide Decreases Quality Parameters of Spermatozoa of Silversides *Odontesthes Humensis*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 102, n. 1, p. 1-6, 2019.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A Simple Technique for Quantification of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SOBJAK, T.M.; ROMÃO, S.; NASCIMENTO, C.Z.; SANTOS, A.F.P.; VOGEL, L.; GUIMARÃES, A.T.B. Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of *Rhamdia quelen* fish. **Chemosphere**, v. 182, p. 267-275, 2017.

SOSO, A.B.; BARCELLOS, L.J.G.; RANZANI-PAIVA, M.J.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; ANZILIERO, D.; LIMA, M.; SILVA, L.B.; RITTER, F.; BEDIN, A.C.; FINCO, J. A. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters

hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, n. 3, p. 308-313, 2007.

TEIXEIRA, J.M.S.; LIMA, V.S.; MOURA, F.R.; MARISCO, P.C.; SINHORIN, A.P.; SINHORIN, V.D.G. Acute toxicity and effects of Roundup Original® on pintado da Amazônia. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 25, p. 25383-25389, 2018.

TESSARO, L.; TOLEDO, C.P.R.; NEUMANN, G.; KRAUSE, R.A.; MEURER, F.; NATALI, M.R.M.; BOMBARDELLI, R.A. Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia quelen* males fed on different digestible energy levels in the reproductive phase. **Aquaculture**, v. 326, p. 74-80, 2012.

UREN WEBSTER, T.M.; LAING, L.V.; FLORANCE, H.; SANTOS, E.M. Effects of Glyphosate and its Formulation, Roundup, on Reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 2, p. 1271-1279, 2014.

WAIWOOD, B.A.; HAYA, K. Levels of Chorionase Activity During Embyronic Development of *Salmo salar* Under Acid Conditions. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 30, p. 511-515, 1983.

WESTER, R.C.; MELENDRES, J.; SARASON, R.; MCMASTER, J.; MAIBACH, H.I. Glyphosate Skin Binding, Absorption, Residual Tissue Distribution, and Skin Decontamination. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 16, n. 4, p. 725-732, 1991.

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

WITECK, L.; BOMBARDELLI, R.A.; SANCHES, E.A.; OLIVEIRA, J.D.S.; BAGGIO, D.M.; SOUZA, B.E. Motilidade espermática, fertilização dos ovócitos e eclosão dos ovos de jundiá em água contaminada por cádmio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 3, p. 477-481, 2011.

WU, H.; ZHANG, R.; LIU, J.; GUO, Y.; MA, E. Effects of malathion and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and antioxidant defense system in *Oxya chinensis* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae). **Chemosphere**, v. 83, n. 4, p. 599-604, 2011.

ZHANG, Q.; ZHOU, H.; LI, Z.; ZHU, J.; ZHOU, C.; ZHAO, M. Effects of glyphosate at environmentally relevant concentrations on the growth of and microcystin production by *Microcystis aeruginosa*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 11, p. 632, 2016.

ZHANG, S.; XU, J.; KUANG, X.; LI, S.; LI, X.; CHEN, D.; ZHAO, X.; FENG, X. Biological impacts of glyphosate on morphology, embryo biomechanics and larval behavior in zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 181, p. 270-280, 2017.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso associado de diferentes biomarcadores, possibilitou um melhor entendimento dos efeitos tóxicos dos herbicidas 2,4-D, glifosato e da mistura de ambos em gametas, embriões e larvas de jundiá.

O glifosato isolado e a mistura dos herbicidas apresentaram um comportamento similar em relação a porcentagem de ovócitos fertilizados, de ovos eclodidos e de espermatozoides móveis. O 2,4-D isolado e a mistura dos herbicidas resultaram em uma resposta similar em relação aos danos ao DNA de larvas de jundiá e a motilidade espermática.

Embora as concentrações de glifosato e 2,4-D presentes em ambientes aquáticos sejam relativamente baixas, altas concentrações podem ser encontradas em corpos de água receptores durante o período de aplicação destes herbicidas. Por isso, os resultados deste trabalho são imprescindíveis para a conscientização da população em geral, e principalmente dos agricultores e aquicultores, de como esses herbicidas são potencialmente prejudiciais, tanto para as populações naturais quanto para as espécies nativas produzidas em cativeiro.

Diante do exposto, dado a necessidade de se conhecer os impactos dos agrotóxicos em peixes, os estudos futuros devem se concentrar na toxicidade reprodutiva do 2,4-D, do glifosato e da mistura de ambos em espécies nativas não-alvo, visto que esses herbicidas são amplamente utilizados no país.