

PAULO BURLAMAQUI DA SILVA FILHO

EFEITOS DO ROUNDUP™ E DO THIODAN® EM ADULTOS DE *Astyanax bimaculatus* (CHARACIDAE: TELEOSTEI): VALORES DE CL₅₀ E MORFOLOGIA TESTICULAR

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

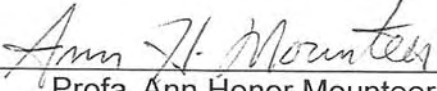
VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

PAULO BURLAMAQUI DA SILVA FILHO

**EFEITOS DO ROUNDUP™ E DO THIODAN® EM ADULTOS DE
Astyanax bimaculatus (Characidae: Teleostei):
VALORES DE CL₅₀ E MORFOLOGIA TESTICULAR**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 22 de julho de 2010.



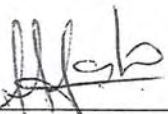
Profa. Ann Honor Munteer
(Co-orientadora)



Prof. Cláudio César Fonseca



Prof. Jorge Abdala Dergam dos Santos



Profa. Ana Lúcia Salaro



Prof. Laércio dos Anjos Benjamin
(Orientador)

Se já nos átomos não houvesse a propensão em se unir,
seria impossível ao amor surgir mais acima,
em nós....
(Pierre Teilhard Chardin)

Dedico esta dissertação à minha família, nas figuras dos meus falecidos avôs e avós, dos meus tios e tias, e principalmente minha mãe e meu pai que tanto me incentivaram, mostraram os caminhos e atalhos, mesmo quando todas as minhas forças e condições mostravam-se adversas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela divina comédia humana florida em um universo no qual a beleza encontra-se além da nossa vã filosofia e ciência psíquica;

Aos meus falecidos avôs e avós (José e Maria, José e Mura), que desde sempre me mostraram o caminho do amor e a busca por uma vida digna;

À minha mãe, por ser a pessoa mais amorosa, carinhosa e solidária que pode existir. Minha eterna gratidão por sempre ter feito as melhores escolhas para o meu caminho;

Ao meu pai, por ser a pessoa mais disciplinada e atenciosa que pode existir. Minha eterna gratidão por sempre ter cobrado que eu fizesse as melhores escolhas;

À memória das minhas tias Mary e Janet, que me mostraram o verdadeiro significado de amor infinito. Aos meus tios e tias que tanto me ajudaram na formação do meu ser e definição do meu caráter;

A toda a minha família, que através de encontros e desencontros me ensinaram sobre união e amor incondicional;

Ao meu amigo e orientador Laércio, pela amizade, incentivo e apoio incondicionais, além de me acolher dentro da sua família. Muito obrigado por ensinar-me a perdoar e superar os desencontros pessoais que a existência nos desafia. Tudo isso é fruto de muito esforço;

Ao meu co-orientador Edson, que me iniciou na pesquisa e me avisou sobre os desafios de tornar-me um pesquisador, bem como ajudou a ampliar meus horizontes;

A minha co-orientadora Ann, que foi paciente e atenciosa em todos os momentos nos quais a procurei, sempre com muita disposição e atenção;

À Brígida, minha namorada, por suportar essa distância intergaláctica e me apoiar tanto no final dessa obra;

Aos meus amigos e colegas de experimento, com os quais eu tanto me diverti, aprendi e consegui tantas conquistas. Um forte abraço: Marcus Vinícius de Oliveira Machado, Sônia Silva Sartori, Vinícius da Silva Duarte, Mayara Pereira Lotério, Lucas Marcon, Joelma Crespo Moraes, Polyana Galvão Bernardes Coelho e Leandro Rodrigues Nunes. Eu não teria conseguido sem vocês;

Em especial a José Eustáquio Matta (Piscicultura da Prata), Edgard da Silva Torres e Joelma Crespo Moraes pelo fornecimento dos espécimes utilizados na experimentação;

Ao Prof. Jorge Dergam, pelo reconhecimento e certificação dos espécimes;

À Rosi, todo meu carinho e respeito, pelo tempo no qual os desafios foram superados. Sempre contei com toda sua atenção, apoio e dedicação. Esse anjo fica no meu coração para sempre, viu...

Aos meus amigos de infância: Celo, Ado, Rafa, Binho, Marco e Julio, por me fazerem o homem mais rico do mundo;

A todos meus amigos de Campinas/SP, pelo apoio e presença à distância, e que sempre me confortaram nos melhores e piores momentos. Um milhão de folhas só para citá-los, e todos sabem que moram no meu coração;

A todos meus amigos de Viçosa/MG que me acolheram e fizeram minha estadia mais feliz, amena e próspera que eu poderia imaginar. Cláudio, Marinete, Margareth, Mixirica, Seu Carlos e Dona Maria José;

A todos da Escola Comunitária de Campinas (ECC) que me deixaram curiosos sobre o conhecimento e propiciaram a minha formação mais básica;

A todos da Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC-Campinas), da Biologia e da Química, que me ajudaram a tornar-me um profissional dedicado e pronto para enfrentar os primeiros desafios;

Aos bem intencionados comigo no Instituto de Biologia (IB) da Universidade de Campinas (UNICAMP) que me mostraram a vida de pesquisador;

À CAPES, pela bolsa de estudos e possibilidade de continuidade de minha formação acadêmica;

À FAPEMIG, por possibilitar a realização deste trabalho; e

Aos professores e colegas da Universidade Federal de Viçosa (UFV), que propiciaram meus estudos e esforços para a conclusão desse trabalho.

BIOGRAFIA

Filho de Mathilde Andery Burlamaqui da Silva e Paulo Burlamaqui da Silva, nascido em Campinas/SP, no dia 10/03/1982. Coursou o ensino fundamental (1996) e médio (1999), na Escola Comunitária de Campinas. Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas pela PUC-Campinas (2004), Bacharel em Química Tecnológica pela PUC-Campinas (2004), Licenciado em Química pela UNAR (2007). Iniciou o Mestrado em Medicina Veterinária pela UFV em março de 2008, titulando-se em julho de 2010. Possui experiência em pesquisa nas áreas de morfofisiologia da reprodução de animais, toxicologia ambiental, biologia celular e matriz extracelular. Possui experiência em docência de ensino fundamental (Matemática e Ciências) e médio (Matemática, Física, Química e Biologia) nas Escolas Estaduais Prof. Uacury Ribeiro Bastos, Prof. Carlos Lencastre e Prof. Tomás Alves, em Campinas/SP.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1. REVISÃO DE LITERATURA	3
Uso de agroquímicos na agricultura	5
Transporte e destino dos agroquímicos no ambiente aquático	7
Estudos de toxicidade aquática	7
Peixes como bioindicadores	8
Biotransformação	9
Caracterização do agroquímico Roundup™	12
Usos do glifosato	13
Toxicidade aguda do glifosato	13
Efeitos do glifosato sobre organismos aquáticos	14
Fatores determinantes da toxicidade do Roundup™ em peixes	15
Caracterização do agroquímico Thiodan®	16
Usos do endosulfan	17
Toxicidade aguda do endosulfan	17
Efeitos do endosulfan sobre organismos aquáticos	18
O lambari <i>Astyanax bimaculatus</i>	19
Morfologia dos testículos de <i>Astyanax bimaculatus</i>	21
Disfunção nos processos reprodutivos	24
Respostas biológicas como indicadoras de poluição ambiental	25
Objetivos	27
Objetivo geral	27
Objetivos específicos	27
Referências bibliográficas	27
CAPÍTULO 2. EFEITOS DO ROUNDUP™ EM <i>Astyanax bimaculatus</i> (CHARACIDAE: TELEOSTEI) ADULTOS: VALOR DE CL ₅₀ E MORFOLOGIA TESTICULAR	40
Resumo	40
Introdução	41
Objetivos	43
Material e métodos	43
Animais	43
CL ₅₀ -96h	44
Teste de toxicidade aguda (96h)	44
Análise de água	45
Procedimentos para estudo histológico	46
Eletroforese e dosagem de proteínas totais	48
Análises estatísticas	49
Resultados e discussão	49
Análise comportamental	49
CL ₅₀ -96h	50
Análise de água	51
Dados biométricos	53

<i>Análises morfológicas dos testículos</i>	53
<i>Análises morfométricas dos testículos</i>	56
<i>Eletroforese e dosagem de proteínas totais</i>	58
Conclusões	60
Referências bibliográficas	60
 CAPÍTULO 3. EFEITOS DO THIODAN® EM <i>Astyanax bimaculatus</i> (CHARACIDAE: TELEOSTEI) ADULTOS: VALOR DE CL₅₀ E MORFOLOGIA TESTICULAR	
	64
Resumo	64
Introdução	65
Objetivos	67
Material e métodos	67
<i>Animais</i>	67
<i>CL₅₀-96h</i>	68
<i>Teste de toxicidade aguda (96h)</i>	68
<i>Análise de água</i>	69
<i>Procedimentos para estudo histológico</i>	70
<i>Eletroforese e dosagem de proteínas totais</i>	72
<i>Análises estatísticas</i>	73
Resultados e discussão	73
<i>Análise comportamental</i>	73
<i>CL₅₀-96h</i>	74
<i>Análise de água</i>	75
<i>Dados biométricos</i>	76
<i>Análises morfológicas dos testículos</i>	77
<i>Análises morfométricas dos testículos</i>	83
<i>Eletroforese e dosagem de proteínas totais</i>	84
Conclusões	87
Referências bibliográficas	87
 CONCLUSÕES GERAIS	91

RESUMO

SILVA FILHO, Paulo Burlamaqui da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2010. **Efeitos do Roundup™ e do Thiodan® em adultos de *Astyanax bimaculatus* (Characidae: Teleostei): Valores de CL₅₀ e morfologia testicular.** Orientador: Laércio dos Anjos Benjamin. Co-orientadores: Ann Honor Mounteer e Edson Rosa Pimentel.

O uso indiscriminado de agroquímicos na agricultura moderna está desencadeando prejuízos graves para o meio ambiente e que representam séria ameaça para a sobrevivência de ecossistemas importantes. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi determinar a CL₅₀-96h e avaliar a influência do herbicida Roundup™ (Monsanto) e do inseticida Thiodan® (Bayer) sobre a morfologia testicular do lambari *Astyanax bimaculatus*. Para isso, foram selecionados lotes homogêneos de lambaris machos, adultos, com 4,0 a 6,0cm de comprimento padrão, que permaneceram em sistema de água estático para a determinação da CL₅₀ e para o teste de toxicidade. Para os estudos morfológicos e morfométricos, fragmentos de testículos foram fixados, incluídos em resina, seccionados em micrótomo rotativo e corados para análise histológica. No estudo com o Roundup™, a CL₅₀ gerada foi 14mg.L⁻¹ com intervalo de confiança de 9,3 a 22,6 mg.L⁻¹ (P<0,05). No teste de toxicidade aguda, observou-se tentativa de fuga, nado errático e busca por oxigênio na superfície na concentração de 5.2mg.L. As análises histológicas mostraram alterações morfológicas como descontinuidade e/ou destruição da albugínea, desorganização tecidual caracterizada pela presença de espermátides no parênquima testicular, espermátócitos na luz do túbulo, hemácias fora dos capilares sanguíneos e vacúolos citoplasma de espermatogônias e no interstício testicular. As análises morfométricas mostraram redução (P<0,05) no diâmetro de núcleos de espermátócitos II na concentração de 1,3mg.L⁻¹. Houve aumento (P<0,05) no número de espermatogônias B nas concentrações de 1,3 e 2,6 mg.L⁻¹. Isso permite inferir que o *A. bimaculatus* adulto pode ser utilizado como bioindicador e seus testículos como biomarcadores de poluição aquática. No estudo com o Thiodan®, a CL₅₀ obtida foi 17,7µg.L⁻¹ com intervalo de confiança de 11,1 a 29,6 µg.L⁻¹ (P<0.05). Nos grupos expostos, foi observado comportamento de tentativa de fuga na concecntração mais

alta, agitação intensa, nado errático, além de hiperventilação em todas as concentrações e mortalidade de 40% na maior concentração. Histologicamente, observou-se destacamento da albugínea testicular, degeneração das células da albugínea, descontinuidade ou até mesmo falta desta, hemorragia no interstício, vacuolização do citoplasma de células, desorganização tecidual com espermatozoides localizados fora da luz do túbulo seminífero, rompimento da parede de cistos, presença de ovócito no compartimento tubular, hemácias no interior de cistos de espermatócitos, e espermatócitos na luz do túbulo seminífero. Os dados morfométricos indicaram redução no diâmetro de cistos de espermatócitos II nas concentrações 1,15 e 2,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($P < 0,05$), aumento no diâmetro de núcleos de espermatócitos I em todas as concentrações ($P < 0,05$), redução no diâmetro do núcleo de espermatócitos II na menor concentração ($P < 0,05$), aumento no núcleo de espermatogônias A nos grupos 2,3 e 5,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($P < 0,05$). Além disso, foi observada redução no número de espermatócitos I nas concentrações 1,15 e 2,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($P < 0,05$), aumento de espermatogônias A e B na concentração 1,15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e redução na concentração 5,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($P < 0,05$). Conclui-se que o *A. bimaculatus* adulto não deve ser utilizado como bioindicador pois apresenta alta resistência a esse produto, mas os testículos podem ser usados como biomarcadores.

ABSTRACT

SILVA FILHO, Paulo Burlamaqui da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2010. **Effects of Roundup™ and the Thiodan® in adults of *Astyanax bimaculatus* (Characidae: Teleostei): Values of CL₅₀ and testicular morphology.** Adviser: Laércio dos Anjos Benjamin. Co-advisers: Ann Honor Munteer and Edson Rosa Pimentel.

The indiscriminated use of agrochemicals in modern agriculture is unleashing a series of damages to the environment posing serious threats to the survival of important ecosystems. The main objectives of the present study was to determine the LC₅₀-96h and investigate the effects of Roundup™ (Monsanto) and Thiodan® (Bayer) in testicular morphology of the fish species *Astyanax bimaculatus* adult males. For this purpose we selected adult males of this species in homogeneous lots with 4.0 to 6.0cm of standard-length, to determine the LC₅₀ and evaluate the toxicity by morphological and morphometrical studies. Fragments of testes were collected, fixed, embedded in historesin, sectioned and stained for histological analysis. The LC₅₀ of Roundup™ was 14mg.L⁻¹ with confidence interval 9.3 to 22.6 mg.L⁻¹ (P<0.05). The acute toxicity test showed abnormal behaviour such as attempted to escape, erratic swimming and searching for oxygen on the surface at concentration 5.2mg.L⁻¹ immediately after adding the product in aquariums. Histological analysis showed morphological changes when compared to the control group such as the discontinuity or even lack of the mesothelium; tissue disruption characterized by the presence of spermatids in the testicular parenchyma; presence of spermatocytes in the lumen of tubule; presence of erythrocytes outside the capillaries blood (hemorrhage); and vacuoles in intertubular space cells. The morphometric analysis showed a reduction in the measurement of the average nuclei diameter of secondary spermatocytes at the concentration of 1.3mg.L⁻¹; and increase in number of secondary spermatogonia at concentrations 1.3 and 2.6 mg.L⁻¹. The conclusion is that *A. bimaculatus* adult can be used as bioindicators organisms of aquatic environment and their testes as bioindicator organ. The LC₅₀ of Thiodan® was 17.7µg.L⁻¹ with

confidence interval 11.1 to 29.6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($P<0.05$). In the treated groups it had been observed the behaviour of attempt to escape and 40% mortality at the highest concentration, severe agitation, erratic swimming, and hyperventilation at all concentrations. Histological analysis had shown morphological changes compared to the control group as mesothelium detachment with discontinuity or even lack thereof; degeneration of mesothelium cells; hemorrhage; vacuoles in intertubular space cells; break of cysts, and spermatids located out in the intertubular space; red blood cells within cysts of spermatocytes; spermatocytes in the lumen of the tubule; as well as the presence of oocyte in the tubular compartment. Morphometric analysis indicated a decrease in the secondary spermatocytes cysts diameter at concentrations 1.15 e 2.3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($P<0.05$); increase in the primary spermatocytes nucleus diameter at all concentrations ($P<0.05$); reduction in the secondary spermatocytes nucleus diameter at lower concentration ($P<0.05$); increase in the primary spermatogonia nucleus diameter in groups 2.3 and 5.6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($P<0.05$); reduction on the count of primary spermatocytes at concentrations 1.15 and 2.3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($P<0.05$); increase of both spermatogonia cell types at concentration 1.15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and decrease in concentration 5.6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($P<0.05$).

These findings indicate that *A. bimaculatus* adult should not be used as bioindicator organism, because it has low sensibility to this product, but testes can be used as bioindicator organ.

INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de agroquímicos na agricultura moderna está desencadeando uma série de prejuízos graves para o meio ambiente que representam séria ameaça para a sobrevivência de ecossistemas importantes. Rüegg et al. (1987) relatam que o modelo de agricultura adotado no Brasil baseia-se no uso dos agroquímicos. Estes compostos são empregados há muito tempo, e a partir da segunda guerra mundial passaram a ser mais intensamente utilizados. Segundo a Agência para Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças - ATSDR (2000), os agroquímicos entram no ambiente aquático como consequência de lavagem de terras agricultáveis ou por meio de descargas acidentais. Os resíduos destas substâncias presentes nas águas podem aderir ao material orgânico em suspensão, depositar no sedimento ou serem absorvidos pelos organismos. Dessa forma, peixes e invertebrados podem acumular tais compostos ligados à matéria ingerida, ser passivamente absorvidos pela superfície corporal ou durante as trocas respiratórias.

Entre esses compostos encontram-se pesticidas de diferentes naturezas químicas e finalidades.

O Roundup™ (Monsanto), cuja base é o glifosato, é o herbicida com mais amplo uso na agricultura. A toxicidade aguda deste herbicida é considerada baixa, mas alguns dos componentes em sua fórmula apresentam níveis de toxicidade mais elevados que o próprio ingrediente ativo. O glifosato e seus derivados são tóxicos para peixes, alterando parâmetros hematológicos e metabólicos do fígado e coração, além da diminuição de atividade da acetilcolinesterase (Glusczak et al., 2006). Alterações no comportamento dos peixes e dificuldade respiratória são reações comuns ao glifosato (Monsanto, 2010).

Entre os inseticidas, um dos mais usados é o Thiodan® (Bayer), cuja base é o endosulfan, um acaricida organoclorado, classificado como altamente tóxico, perigoso, inflamável e corrosivo, recomendado para o controle de insetos chupadores e mastigadores em diversos tipos de culturas, com ação por contato e ingestão (Bayer, 2010).

Nos estudos dos fatores que determinam a toxicidade de agroquímicos em peixes, são características relevantes a maturidade sexual e o tamanho corporal do peixe, a temperatura da água, teor de oxigênio dissolvido, entre outros. Efeitos como mortalidade, comportamento de fuga e busca por oxigênio na superfície da lâmina d'água podem afetar os hábitos de alimentação, migração e reprodução desses animais. Nesse sentido, é necessário determinar os efeitos dos poluentes por meio de investigações da CL₅₀ para os peixes nativos, que podem ser úteis como bioindicadores, e sua ação na morfologia testicular e espermatogênese, o que pode tornar esse órgão um biomarcador.

CAPÍTULO 1. Revisão de Literatura

O uso de inseticidas e praguicidas na sociedade brasileira está aumentando conforme os dados da Associação Nacional de Defesa Vegetal, que indicam um consumo constante de pesticidas entre 1988 a 1993, em torno de um bilhão de dólares. Com o crescimento da produção agrícola a partir de 1994, esse valor já dobrou (Barbosa, 2004).

O uso desses produtos para o aumento da quantidade de produção de alimento e melhoria das condições gerais das plantações é histórico. Foi o químico alemão Friedrich Wöhler quem sintetizou a uréia a partir de cianato de amônio, em 1828, marcando assim a origem da síntese orgânica (Wikipédia, 2010). Em 1874, o químico alemão Zeidler sintetizou o 1,1,1-tricloro-2,2-bis-(4-clorofenil)etano, conhecido como DDT. Porém, somente a partir de 1939, na cidade da Basiléia, na Suíça, que a companhia Geigy AG aplicou-o como inseticida (Barbosa, 2004).

Zambolim (1999) defende a teoria que mesmo com o uso crescente desses produtos, ainda não é possível sustentar o ritmo de crescimento populacional com os níveis de produção dos alimentos, sugerindo que o crescimento da população supera o crescimento de área cultivada, reduzindo a proporção de área cultivada por habitante. Portanto, o autor reforça que os agroquímicos e demais tecnologias agrícolas são necessários para aumentar a produtividade da área cultivada e assim reduzir a escassez de alimentos.

Idéia controversa é destacada por Natarajan (2008) que defende como causa da crise de alimentos a má distribuição de renda entre as famílias de vários países do mundo.

Nessa discussão, também são importantes as considerações sobre quais agroquímicos podem/devem ser utilizados e em quais situações. Como exemplo, o banimento do DDT em quase todos os países membros da ONU é um dos indicativos, ao mesmo tempo em que produtos como o endossulfan e o glifosato ainda continuam a ser produzidos e comercializados no Brasil.

A preocupação crescente na regulamentação do uso dos agroquímicos pode ser demonstrada nos testes descritos por Cobb (1992)

como sendo requisições típicas para o registro desses produtos: avaliação da toxicidade aguda em algas e invertebrados aquáticos, abelhas, peixes, pássaros e ratos (por 30 a 90 dias); testes com cães ou similares (por pelo menos dois anos); estudos de reprodução em ratos por três gerações e exame da teratogenicidade em peixes, pássaros e roedores; estudos metabólicos em plantas, peixes, pássaros, ratos, cães; estudos de reprodução em *Daphnia*; efeitos sobre a fauna do solo, incluindo minhocas, e a taxa de decomposição dos resíduos vegetais; efeitos na nitrificação e na evolução de carbono a partir dos solos; taxa de biodegradação e movimentação nos solos; propriedades físico-químicas do composto; estudos dos efeitos sobre organismos não alvo; estudos de bioacumulação; e análises de resíduos em alimentos, com limite máximo de 0,01 ppm em vegetais, 0,1 ppm em carnes e 0,005 ppm em leite.

Mesmo assim, a sociedade, de uma forma geral, continua a sofrer com o uso inadequado e excessivo desses produtos, o que leva estes tóxicos aos leitos de rios e lagoas, poluindo o ambiente e prejudicando a fauna. Nesse sentido, Montoya (2008) demonstrou que o Thiodan[®] (endosulfan) é tóxico para indivíduos imaturos de *Oreochromis niloticus*. Outros indícios dos prejuízos desses tóxicos foram observados por Barbosa (2004), que indicaram para ratos, a DL₅₀ de 500 ppm para o endosulfan e de 5600 ppm para o glifosato.

Em contrapartida, os animais, incluindo peixes, desenvolvem sua capacidade de resposta aos agroquímicos, e de forma mais ampla, a todos os xenobióticos, sendo estas, reações de oxidação, redução ou hidrólise que podem ativar ou inativar a ação tóxica desses produtos (Nelson et al., 1996). Como exemplo, as oxidações por monooxigenases associadas ao citocromo P450, que ocorrem no retículo endoplasmático liso (Nelson et al., 1996). Essas monooxigenases possuem grande capacidade para metabolizar xenobióticos orgânicos e endobióticos, como esteróides e ácidos graxos, encontrando-se especialmente no fígado (Stegeman & Hahn, 1994). Isto demonstra um potencial de adaptação e resposta fisiológica às agressões que os peixes são expostos no meio ambiente.

Uso de agroquímicos na agricultura

O aumento na contaminação do solo por agroquímicos em áreas de agricultura intensa tem despertado o interesse de pesquisas para a avaliação de indicadores biológicos que atestem a qualidade desses solos. Conhecer e entender atributos da qualidade do solo permite manejá-los de forma satisfatória no presente, proporcionando condições para que o sistema seja sustentável no futuro (Santos, 2005).

Os agroquímicos constituem um grupo importante de defensivos agrícolas e, ano após ano, têm seu uso aumentado para labores do campo na América do Sul. Estes, nas últimas décadas, começaram a substituir inclusive o trabalho mecânico e manual dos agricultores. Nos últimos 40 anos, a agricultura brasileira sofreu inúmeras e profundas transformações que alteraram tanto a composição das culturas, como os processos de produção e padrões tecnológicos até então em vigor.

Assim, agroquímicos têm sido amplamente utilizados como uma das principais ferramentas para um bom programa de controle de plantas daninhas em culturas que aumentam sua importância na balança comercial brasileira (Rodrigues e Almeida, 2005). O emprego de tais agroquímicos tornou-se de uso generalizado, principalmente pelo menor custo e maior eficiência de controle das plantas daninhas comparados aos demais métodos convencionais de controle (Barbosa, 2004). Quanto ao impacto dos agroquímicos no solo, poucos são os estudos para condições brasileiras, tendo-se dado ênfase apenas na eficiência dos produtos sobre o controle das plantas daninhas (Souza et al., 1996; Pires et al., 2005).

A aplicação de agroquímicos, dependendo do princípio ativo, da formulação, da dose utilizada, dos microorganismos presentes e da sensibilidade desses aos diversos produtos (Royuela et al., 1998), das condições climáticas e do tipo de solo (Silva et al., 2002), pode trazer consequências indesejáveis. Por isso, o uso de moléculas e formulações menos agressivas a organismos não alvo deve ser objetivo de todos aqueles que utilizam dessa tecnologia para aumentar a produção de alimentos sem comprometer os recursos naturais que sustentam a vida no planeta. O monitoramento dessas moléculas pode ser dificultado pela falta de

indicadores que informem com maior precisão o real impacto da utilização desses produtos na agricultura (Santos, 2005).

Estudos que têm como objetivo gerar tecnologias que permitam elevada produtividade de alimentos com qualidade e custo financeiro viável, promovendo pequeno ou nenhum impacto ambiental, visando a sustentabilidade de sistemas agrários, passaram a fazer parte das pesquisas em todo o mundo (Stenberg, 1999; Tótola e Chaer, 2002). Além disso, novas técnicas para descontaminação de ambientes que receberam aplicação de agroquímicos residuais são desenvolvidas, principalmente no campo da biorremediação que emprega a utilização de plantas para diminuir o resíduo destes produtos no ambiente (Pires et al., 2003; Santos et al., 2004; Procópio et al., 2005).

Rüegg et al. (1987) e Tomita e Beyruth (2002) relatam que o modelo de agricultura adotado no Brasil baseia-se no uso dos agroquímicos. Estes compostos são empregados há muito tempo e, a partir da segunda guerra mundial, passaram a ser mais intensamente utilizados.

Rüegg et al. (1987) enfatizam que o processo de modernização, compreendido como uma série de transformações tecnológicas nos processos produtivos, intensificou o emprego de insumos com máquinas, fertilizantes e agroquímicos, que contam com preços favoráveis e estímulos como crédito farto a juros subsidiados, que facilitaram sua ampla adoção no meio rural.

Para Rosa (1998), este modelo baseado no uso intensivo de insumos químicos, de sementes melhoradas e mecanização, foi denominado de “Revolução Verde”, que na década de 1980 trouxe ao Brasil um novo alento em relação à produtividade, com grandes esperanças de colheitas fartas e novas tecnologias que propiciaram o domínio de áreas pouco exploradas. De fato, muitas destas expectativas se realizaram; entretanto, o impacto ambiental, na época denominado “ressaca ambiental”, implicou em custos ambientais e conseqüências, como por exemplo, a perda de biodiversidade e a exaustão de vários cursos d’água por assoreamento, além de contaminação de áreas produtivas e corpos de água.

Transporte e destino dos agroquímicos no ambiente aquático

Murty (1988) descreveu que os agrotóxicos entram no ambiente aquático por meio da aplicação intencional, implemento aéreo, escoamento das aplicações ou liberação accidental. A descarga dos resíduos da manufatura de agrotóxicos constitui a segunda maior fonte de contaminações dos corpos de água (Murty, 1988).

Segundo a ATSDR (2000), os agroquímicos entram no ambiente aquático como consequência de lavagem de terras agricultáveis ou por meio de descargas accidentais. A persistência no ambiente pode variar em função do grupo químico a que pertence ou se estes tóxicos são hidrolisados ou convertidos a subprodutos, que muitas vezes mantêm a toxicidade do produto. A persistência, ou meia-vida, depende do pH, oxigênio dissolvido e temperatura da água.

Os resíduos destas substâncias presentes nas águas podem tornar-se aderidos ao material orgânico em suspensão, depositar-se no sedimento ou serem absorvidos pelos organismos. Assim, peixes e invertebrados podem acumular tais compostos ligados à matéria ingerida, ou absorvê-los passivamente pela superfície corporal ou durante as trocas respiratórias.

Estudos de toxicidade aquática

O estudo dos efeitos de agentes tóxicos sobre a vida aquática pode ser realizado por meio de ensaios biológicos *in loco* ou em condições laboratoriais, sendo estes últimos os mais utilizados, por permitirem um controle mais efetivo dos fatores ocasionais, como temperatura e pH da água, duração de exposição, concentração do produto a ser estudado (ABNT, 2006). A exposição de organismos aquáticos a pesticidas em seu ambiente pode resultar em alterações bioquímicas, fisiológicas e histológicas em tecidos vitais de seu organismo (Dutta & Arends, 2003).

Ao se avaliar a toxicidade de agentes tóxicos ou misturas destes, frente a um reativo biológico, geralmente se utiliza uma população homogênea, possuindo uma sensibilidade definida, determinando-se a concentração responsável por um efeito tóxico (efeito letal, subletal, crônico, imobilização ou modificação do comportamento, entre outros). Estes podem ser realizados utilizando-se sistemas de fluxo contínuo, semi estático ou

estático. Quanto ao meio aquático, pode-se utilizar água continental (água dura, rica em bicarbonatos e sulfatos dissolvidos; e água mole, isenta de íons cálcio e magnésio), marinha ou salobra, segundo as necessidades dos organismos avaliados (CETESB, 2010). Com relação ao organismo teste, por razões técnicas e econômicas, é impossível testar todas as espécies que fazem parte do ecossistema aquático. Assim, para esses estudos são relacionados, normalmente, os organismos mais representativos de cada nível trófico na cadeia alimentar, como algas, micro-crustáceos e peixes.

Para essas avaliações se faz necessário o entendimento de termos como DL₅₀, que é a dose calculada de um agente num meio e que causa mortalidade de 50% da população por qualquer via de administração, exceto por inalação (CETESB, 2010), e CL₅₀, que é a concentração letal que causa mortalidade de 50% da população, sendo utilizado em situações em que a substância é administrada em meio no qual o animal habita (CETESB, 2010).

Peixes como bioindicadores

No contexto da exposição a contaminantes, o termo "resposta biológica" refere-se ao conjunto de reações de um organismo no sentido da manutenção da homeostase, assim como a alterações mais severas, que configuram situações de toxicidade. Segundo Teles (2006), as respostas biológicas, moleculares e bioquímicas, resultantes da exposição a contaminantes, quando não devidamente compensadas por homeostasia, poderão expressar-se em níveis superiores de um modo progressivo, resultando, por exemplo, em alterações que afetam a reprodução, o crescimento e o comportamento. Estas alterações poderão afetar, em última análise, a sobrevivência dos organismos, levando ao declínio de populações, comunidades e ecossistemas. As respostas biológicas, moleculares e/ou bioquímicas são indicações precoces de situações de estresse, podendo ser utilizadas como um sistema de alerta que permita prever e evitar efeitos tóxicos significativos. Assim, um vasto leque de respostas biológicas, a diversos tipos de contaminantes do meio aquático, tem sido estudado em peixes (Teles, 2006; Capkin et al., 2006; Cengiz et al., 2001).

Bioindicadores são definidos como uma espécie capaz de indicar os primeiros sinais de estresse ambiental causado por contaminantes em diferentes níveis de organização biológica (Adams, 2002). O uso de bioindicadores na avaliação da toxicidade de compostos químicos de origem antrópica em áreas impactadas vem sendo amplamente utilizado nas últimas décadas (Oliveira Ribeiro et al., 2005). Quando peixes e outros organismos são expostos a ambientes muito degradados, os efeitos dos poluentes podem ser letais. No caso de poluição severa, pode haver mortalidade quase instantânea. Longos períodos de exposição a ambientes menos degradados podem resultar na morte de alguns indivíduos dentro de uma população, ou ainda em prejuízos bastante visíveis. Por outro lado, a curta exposição a estressores ambientais pode resultar em alterações que, mesmo não sendo letais, prejudicam a habilidade do peixe em realizar suas funções fisiológicas (Jobling, 1995).

É muito comum a utilização de invertebrados no monitoramento ambiental, por serem componentes majoritários dos ecossistemas e apresentarem abundância populacional (Péqueux, 1995). Porém, é crescente o número de trabalhos onde peixes são empregados como bioindicadores da qualidade dos ecossistemas aquáticos (Pacheco e Santos, 2002a e b; Thophon et al., 2003; Barcarolli e Martinez, 2004), embora ainda sejam necessárias mais pesquisas com peixes de espécies neotropicais.

Os peixes ocupam os mais diversos ambientes aquáticos (Vazzoler, 1996; Lowe-McConnell, 1999) e são de grande importância comercial, já que fazem parte da dieta em muitos países e, em vários outros, constituem-se na principal fonte de proteínas da população (Silva Filho et al., 2000).

Biotransformação

No meio aquático, o contato permanente dos peixes com a água promove a absorção direta de contaminantes a partir da ingestão ou via brânquias e, em menor grau, através do contato com a pele, além da absorção pelo aparelho digestório, por via alimentar. A distribuição dos contaminantes pelos tecidos após absorção é influenciada por vários processos fisiológicos e pelas propriedades químicas dos mesmos, tais como a lipofilicidade e a sua capacidade de ligação a macromoléculas (Voet

et al., 2000). Os compostos químicos podem encontrar-se na sua forma original (parental) ou sofrer biotransformação. A eliminação acontece através das brânquias, pele, bile e urina. A biotransformação de xenobióticos ocorre majoritariamente no fígado e no rim e, em menor grau, nas brânquias e mucosa intestinal (Teles, 2006).

Houaiss e Villar (2007) definem xenobióticos como, “xeno” (do grego ksénos) que significa estranho, estrangeiro ou hóspede; e “biótico” (do grego bíōsis) que significa fato vital, relativo ou pertencente à vida ou seres vivos. Neste trabalho, este termo é empregado em sua definição mais ampla, definindo-se xenobiótico como qualquer corpo ou substância não própria ao organismo. Esses produtos podem sofrer uma série de reações sequenciais promovendo sua ativação, desintoxicação, acumulação e excreção.

A biotransformação, em termos gerais, é entendida como a conversão de um composto em outro derivado, por meio de um conjunto de processos catalisados biologicamente. A função principal da biotransformação é a conversão de xenobióticos lipofílicos em produtos mais hidrossolúveis, facilitando a sua conjugação e respectiva excreção, reduzindo sua atividade biológica e tornando-os menos tóxicos. Contudo, convém salientar que a biotransformação conduz, por vezes, à bioativação dos contaminantes, formando metabólitos toxicologicamente mais potentes do que os compostos parentais, como em alguns fungicidas. No caso do endossulfan, por exemplo, os isômeros alfa e beta sofrem reação de sulfonação e derivam em endossulfan sulfatado (Teles, 2006).

Williams (1959) propôs a estruturação do processo de biotransformação em reações de fase I e fase II, mantendo-se presentes, contudo, os conceitos de interdependência e continuidade entre estas duas etapas. Alguns autores consideram, ainda, a existência de uma fase III, que consiste na metabolização adicional dos produtos resultantes das reações de conjugação da fase II, catalisadas por enzimas também envolvidas nas reações de fase I e/ou II (Vermeulen, 1996). Apesar da maioria dos xenobióticos serem submetidos consecutivamente às reações de fase I e II, alguns deles podem ser submetidos apenas a uma dessas fases.

Os mecanismos de fase I incluem reações de oxidação, redução ou hidrólise, que podem ativar ou inativar a ação tóxica dos xenobióticos. As

oxidações por monooxigenases associadas ao citocromo P450 ocorrem no retículo endoplasmático liso, pela inserção de um átomo de oxigênio no substrato (Nelson et al., 1996). As monooxigenases possuem grande capacidade para metabolizar xenobióticos orgânicos e endobióticos, como os esteróides e os ácidos graxos, e são encontradas especialmente no fígado de peixes (Stegeman e Hahn, 1994), embora a sua atividade também tenha sido detectada no rim, trato intestinal e tecido branquial (Teles, 2006).

Segundo Teles (2006), a análise de inúmeras investigações realizadas nesta área demonstra uma acentuada concentração de trabalhos no estudo da expressão do CYP1A (citocromo P4501A) e, em particular, das suas atividades enzimáticas de 7-etoxiresorufina O-desetilação (EROD), 7-etoxicumarina O-desetilação e aril hidrocarbono hidroxilação. Esta maior incidência de trabalhos está relacionada com o fato do CYP1A ser a principal forma de monooxigenase dependente do citocromo P450 em peixes, passível de ser induzida por xenobióticos orgânicos (Goksøyr et al., 1991). Assim, a indução da atividade das monooxigenases microssomais hepáticas associadas ao citocromo P450 tem sido largamente utilizada em estudos realizados em peixes como uma resposta característica à presença de poluentes naturais e sintéticos (Maria et al., 2002; Sorrentino et al., 2005), como policlorodibenzo-para-dioxinas, policloro dibenzofuranos (Orrego et al., 2005) e bifenis policlorados (PCB) (Vaccaro et al., 2005). A indução destas monooxigenases tem sido também utilizada no âmbito da exposição a outros contaminantes, como pesticidas (Egaas et al., 1999; Pacheco e Santos, 1999; Larsson et al., 2002). Diversos indutores da síntese de CYP1A podem também inibir a sua atividade catalítica, tendo sido esta duplicidade de ações encontrada em peixes expostos a concentrações elevadas de PCB (Hahn et al., 1993).

Os produtos da fase I e outros xenobióticos, contendo grupos funcionais como hidroxilas, amino, epóxido ou halogenados, sofrem na fase II da biotransformação, reações de conjugação com compostos polares endógenos, como ácido glucorônico, sulfato, glutatona e alguns aminoácidos, como a glicina e a glutamina (Teles, 2006). Os produtos de conjugação, com raras exceções, são menos tóxicos, mais polares e mais facilmente excretáveis que os compostos químicos parentais. A atividade de

enzimas de fase II, como a glutathione S-transferase (GST) e UDP-glucuronosil transferase (UDPGT), pode ser modulada em peixes pela exposição a uma variedade de compostos, como dioxinas (Guosheng et al., 1998), metais pesados (Ahmad et al., 2005), compostos organoestênicos (Wang et al., 2006) e pesticidas (Peixoto et al., 2006).

Caracterização do agroquímico Roundup™

Os herbicidas são substâncias químicas sintéticas muito variadas, algumas delas com toxicidade muito elevada; mas, em sua maioria, são menos tóxicos do que os inseticidas em geral.

Entre os herbicidas de maior propagação para uso na agricultura, encontra-se o Roundup™, um herbicida pós-emergente, pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas, que se caracteriza pelo amplo espectro de ação, não seletividade às plantas daninhas e ação sistêmica, cujo uso está difundido na agricultura mundial para o controle de ervas daninhas nos cultivos (Monsanto, 2010). O glifosato, base do herbicida Roundup™, é o produto de maior participação no mercado mundial de herbicidas. Ele é, hoje, o herbicida mais comercializado no país, devido às suas características de não seletividade, rápida ação herbicida nas plantas sensíveis e baixo custo (MAPA, 2010a).

A fórmula do glifosato demonstra sua alta capacidade reativa, oxidativa e de solubilidade em água, o que o torna altamente dispersado em quase todos os tipos de ambientes.

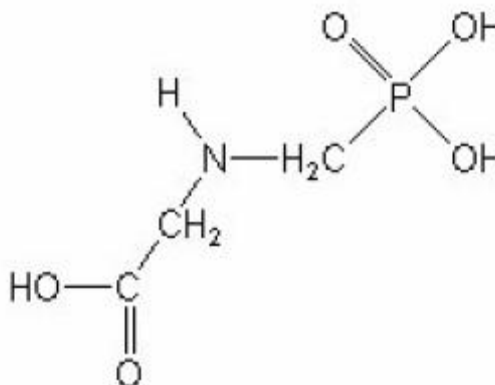


Figura 1: Fórmula estrutural do glifosato.

Monteiro (1987) descreveu quimicamente o Roundup™ como N-(fosfometil) glicina, composto por sal de isopropilamina de N (fosfometil) glicina (glifosato) 480g/l, correspondente a 356g/l do ácido equivalente, com fórmula bruta $C_3H_8NO_5P$.

Ele atua na rota da biossíntese de aminoácidos aromáticos, impedindo a síntese do triptofano, da tirosina e da fenilalanina em plantas superiores e microorganismos, resultando na acumulação do shiquimato e outros ácidos hidroxibenzóicos nessas células (Hernandez et al., 1999).

O Ministério da Agricultura do Brasil caracteriza o glifosato como um herbicida estável à luz, calor e umidade, pouco estável a ácidos e bases, corrosivo ao ferro e aço galvanizado. No Brasil, o Roundup™, registrado sob nº 898793, está enquadrado na classe toxicológica III, comercialmente vendido como moderadamente tóxico, e considerado como um composto químico pouco tóxico para humanos (MAPA, 2010a).

É importante a avaliação do efeito dos produtos formulados versus o glifosato puro, tendo em vista o grande número de marcas comerciais (mais de 90) encontradas no mercado mundial, que têm como base esse ingrediente ativo (Heap, 1997).

Usos do glifosato

O glifosato é indicado no controle de ervas daninhas anuais ou perenes, monocotiledôneas ou dicotiledôneas, em culturas de arroz irrigado, cana-de-açúcar, café, citros, maçã, milho, pastagens, soja (plantio direto ou indireto), fumo, uva e soqueira em cana-de-açúcar. É indicado, ainda, para as culturas de ameixa, banana, cacau, nectarina, pêra, pêssego, seringueira e plantio direto do algodão (Monsanto, 2010).

Toxicidade aguda do glifosato

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1994), a toxicidade aguda deste pesticida é considerada baixa. De acordo com a OMS, a dose letal (DL_{50}), oral do glifosato puro em ratos é de 4230 mg.Kg^{-1} , enquanto o fabricante cita DL_{50} de 5600 mg.Kg^{-1} em camundongos (Monsanto, 2010).

O termo DL_{50} define a dose calculada de um agente num meio que causa mortalidade em cinquenta por cento (50%) da população animal

testada em condições bem definidas, por qualquer via de administração, exceto por inalação (CETESB, 2010). O termo (CL₅₀) concentração letal que causa mortalidade em cinquenta por cento (50%) é utilizado em situações em que a substância é administrada em meio no qual o animal habita.

Apesar da toxicidade relativamente baixa do glifosato, alguns dos componentes de seus produtos formulados, como o Roundup™, apresentam níveis de toxicidade mais elevados que o ingrediente ativo. As formulações encontradas no mercado geralmente contêm surfactantes. De acordo com Atkins & Jones (2001), surfactante é uma molécula anfipática, que apresenta uma região polar e outra apolar, o capaz de reduzir a tensão superficial da água com o ar ou outro meio. A finalidade do surfactante na formulação do produto é impedir a formação de gotas e aumentar o alcance de áreas além das folhas que são pulverizadas. Alguns destes surfactantes são irritantes sérios, tóxicos para mamíferos, peixes, anfíbios, inclusive para o ser humano, onde as crianças são as mais susceptíveis às intoxicações, sofrendo consideráveis irritações e afecções nos olhos, aparelho respiratório, aparelho digestório e pele (Guyton & Hall, 2002).

Efeitos do glifosato sobre organismos aquáticos

Goldsborough e Beck (1989) e Cox (1995) relatam que a persistência do glifosato na água é menor que no solo. Este tem sido extraído de solos de 12 até 60 dias após sua aplicação. Segundo Goldsborough e Beck (1989), a meia-vida do glifosato em águas paradas é de 1,5 a 3,5 dias. Formulações como o Roundup são mais perigosas que glifosato em sistemas aquáticos, razão pela qual o fabricante do produto proíbe seu uso acima ou perto de corpos da água (Monsanto, 2010).

O glifosato e seus derivados são tóxicos para os peixes (Servizi et al., 1987). Parte da diferença pode ser explicada pela toxicidade do surfactante (ingrediente similar a detergente) no Roundup™. Este é 30 vezes mais tóxico para os peixes que o glifosato propriamente dito (Servizi et al., 1987).

Jiraungkoorskul et al. (2002) encontraram valores de CL₅₀ de 16,8 ppm e 36,8 ppm de Roundup™ para tilápia nilótica jovem e adulta, respectivamente, com 96 horas de exposição.

Estudando os efeitos de diferentes concentrações de Roundup™ sobre a piava *Leporinus obtusidens*, Glusczak et al. (2006) observaram redução de parâmetros hematológicos e metabólicos do fígado e coração, inclusive diminuição de atividade de acetilcolinesterase nos músculos e coração.

Efeitos subletais do glifosato já ocorrem em baixas concentrações. No caso da truta arco-íris e da tilápia, concentrações de cerca de $\frac{1}{3}$ a $\frac{1}{2}$ da CL₅₀ respectivamente, alteraram o comportamento dos peixes (Liong et al., 1988; Morgan et al., 1991). A truta também apresentou dificuldade respiratória (Morgan et al., 1991). Esses efeitos aumentam o risco de consumo humano dos peixes, além de afetarem os hábitos de alimentação, migração e reprodução dos peixes (Liong et al., 1988). Esses últimos autores reportaram que valores de 1% da CL₅₀ causaram danos às brânquias da carpa, e valores de 2% da CL₅₀ provocaram alterações na estrutura do fígado.

Para Solomon et al. (2005), a toxicidade não se limita somente a peixes, se estendendo aos anfíbios, insetos, invertebrados (incluindo crustáceos) e, sem dúvida, outras espécies encontradas nos rios e demais corpos da água. Para Bidwell e Gorrie (1995), o Roundup™ pode ser agudamente tóxico para as rãs adultas e girinos nas doses de aplicação recomendadas (1,8 a 5,4 kg/ha).

Fatores determinantes da toxicidade do Roundup™ em peixes

A toxicidade aguda (CL₅₀) do Roundup™ em peixes varia de 3,2 - 52 ppm (Mitchell et al., 1987).

Parte desta variabilidade se deve à idade, sendo que peixes jovens são mais sensíveis ao Roundup™ que peixes mais velhos (Folmar et al., 1979). Vasconcellos et al. (2000) reportaram o efeito nocivo do Roundup™ (glifosato) sobre o processo de diferenciação gonadal em bagres *Rhamdia hilarii* indiferenciados, o qual diminuiu notoriamente a quantidade de células germinativas primordiais nas gônadas dos peixes expostos.

Também depende da espécie exposta ao tóxico. Algumas espécies são mais susceptíveis que outras; o salmão coho é mais tolerante ao glifosato que salmão rosa (Wan et al., 1989).

A qualidade da água também é importante. O glifosato em água mole é 20 vezes mais tóxico para a truta arco-íris que em água dura. Mas para o Roundup™, devido ao surfactante, ocorre que o inverso é verdade: é mais tóxico em água dura do que em mole (Wan et al., 1989).

A toxicidade desse produto aumenta com a temperatura da água. Nos casos da truta arco-íris e bluegills, a toxicidade quase dobrou entre 7°C e 17°C (Folmar et al., 1979).

Caracterização do agroquímico Thiodan®

O Thiodan® é um inseticida acaricida organoclorado, do grupo químico éster do ácido sulfuroso de um diol cíclico. Sua formulação é do tipo concentrado emulsionável, e está registrado no Ministério da Agricultura sob o nº. 1048793 (MAPA, 2010b). Sua importação será proibida a partir de julho de 2013 e sua utilização a partir de 2015 (MAPA, 2010c). A concentração de ingrediente ativo é de 350g.L⁻¹, classificado toxicologicamente como altamente tóxico (Classe II), classificação ambiental como produto altamente perigoso, além de inflamável e corrosivo (Engelhardt e Sarmento, 2004).

A fórmula dos isômeros do endosulfan comprova que ele é um organoclorado com alta capacidade reativa e oxidação lenta, devido à região SO₃/SO₄²⁻, o que somado à sua capacidade lipofílica, demonstra ainda mais sua capacidade de bioacumulação nos níveis tróficos. A IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) define o nome químico: 6,7,8,9,10-hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxathie pin-3-óxido.

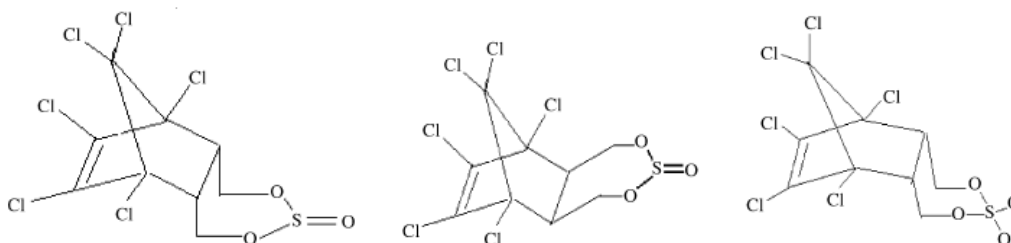


Figura 2: Fórmula geométrica dos isômeros de endosulfan α , β e sulfatado, respectivamente.

O endosulfan, inseticida desenvolvido pela Hoechst Aktiengesellschaft na Alemanha, foi introduzido no mercado em 1957 com o nome comercial de Thiodan (Goebel et al., 1982; Stumpf e Abhaver, 1986). O ingrediente ativo do endosulfan consiste na mistura de dois isômeros, sendo 70% de α -endosulfan e 30% de β -endosulfan. Entre os produtos derivados do metabolismo do endosulfan em mamíferos, o sulfato de endosulfan é o principal metabólito devido à sua importância toxicológica (Stumpf e Abhaver, 1986). Segundo a Environmental Protection Agency (EPA, 1980), contaminações por endosulfan são provenientes em 53% dos casos pela ingestão de água contaminada e em 47% dos casos pelo consumo de alimentos a base de peixes contaminados. A mesma agência define como valores de CL_{50} aguda entre $0,17\mu\text{g.L}^{-1}$ para truta arco-íris a $740\mu\text{g.L}^{-1}$ para *Daphnia magna*.

A Legislação Brasileira de Resíduos de Pesticidas vigente estabelece para resíduo de endosulfan em soja, o limite máximo de resíduo de $1\mu\text{g.g}^{-1}$ e período de carência de 30 dias (MAPA, 2010b). Da mesma forma, o fabricante adverte que não se devem colher frutos ou vegetais tratados até 21 dias após a última aplicação.

Usos do endosulfan

O Thiodan[®] (endosulfan) é um inseticida para o controle de insetos chupadores e mastigadores, com ação por contato e ingestão (Bayer, 2010). O endosulfan foi o único inseticida organoclorado amplamente utilizado no mundo todo (Capkin et al., 2006). Seu uso é recomendado especialmente em cultivos de café, cana, hortaliças, plantas cítricas, algodão, canola, girassol e forragens (Bayer, 2010) e seu uso e produção ainda encontram-se liberados no Brasil (MAPA, 2010b).

Toxicidade aguda do endosulfan

O endosulfan, apesar de pertencer à classe toxicológica II, é altamente tóxico para animais aquáticos e terrestres (espécies não alvo), segundo a Agência para Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças - ATSDR (2000), apresentando risco de moderado a alto e efeitos agudos e

crônicos. O endosulfan não dissolve facilmente na água e adere às partículas do solo, levando anos para sua degradação (Soares et al., 2003).

Montoya (2008), trabalhando com juvenis de tilápia *Oreochromis niloticus*, encontrou o valor de CL_{50} igual a $1,42\mu\text{g.L}^{-1}$ para 96h. Musanhi (1987) determinou a CL_{50} em 96, 48 e 24 horas de exposição ao endosulfan para tilapia nilótica adulta em águas temperadas. Os valores encontrados por esse autor foram de 1,42; 3,80 e $10,3\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente.

Efeitos do endosulfan sobre organismos aquáticos

Embora os mecanismos de toxicidade do endosulfan sejam extensivamente estudados (Naqvi e Vaishnavi, 1993), poucos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de avaliar efeitos histopatológicos desse produto em peixes, especialmente em suas gônadas.

Em um desses estudos, Capkin et al. (2006) reportaram uma CL_{50} de $19,78\mu\text{g.L}^{-1}$ para *Oreochromis mikiyss* para 24 horas de exposição ao tóxico, o que causou além da morte de 50% dos animais, convulsões, nado errático, edema e separação das lâminas branquiais, edema e necrose do fígado, dos túbulos renais e do tecido hematopoiético. Cengiz et al. (2001) reportaram lesões similares em brânquias do peixe-mosquito *Gambusia affinis*, além de congestão e hipertrofia do fígado. Segundo Capkin et al. (2006), alcalinidade e temperatura da água, e tamanho dos peixes, afetam a toxicidade do endosulfan. Para Cengiz et al. (2001), os efeitos do Thiodan[®] são tempo e dose dependentes. Dutta et al. (2006) descreveram num estudo de toxicidade crônica, as injúrias causadas pelo Thiodan[®] sobre os túbulos seminíferos do peixe bluegill *Lepomis macrochirus*, relatando alterações dos túbulos seminíferos, como perda dos padrões normais de organização celular e diminuição gradativa do diâmetro das espermatogônias primárias, desde as primeiras 24h de exposição até as duas semanas seguintes. Segundo os autores, este tipo de dano pode afetar as espermátides e os espermatozoides, apresentando no final um impacto negativo na espermatogênese e fertilidade do macho, comprometendo o número da população do bluegill *Lepomis macrochirus*.

O lambari *Astyanax bimaculatus*

O lambari *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758), conhecido popularmente pelos nomes de lambaris, tambuí, piabas, lambari-guaçu, mojarra e matupiris, era classificado na ordem Characiformes, família Characidae, sendo uma das espécies da subfamília Tetragonopterinae (CEMIG/CETEC, 2000; Britski, 1972). No entanto, revisões recentes colocam o gênero em "Incertae sedis". A antiga subfamília Tetragonopterinae continha 88 gêneros e 620 espécies, sendo que 86 espécies pertencem ao gênero *Astyanax* (Lima et al., 2003). Os representantes de distribuição mais ampla dos lambaris são os lambaris-do-rabo-vermelho (*A. fasciatus*) e os lambaris-do-rabo-amarelo (*A. bimaculatus*) (Araujo e Simoni, 1997). *Astyanax bimaculatus* é, na verdade, um complexo de espécies de ampla distribuição nas Américas do Sul e Central (Paiva et al., 2006).



Figura 3: Lambari *Astyanax bimaculatus*.

O *A. bimaculatus* é um peixe de pequeno porte, atingindo 10cm e 40g (Britisk, 1972). Possui corpo irregularmente elíptico, com nadadeiras amarelas, quatro a cinco dentes na série externa e cinco na série interna do pré-maxilar. Suas escamas possuem reflexos prateados, o dorso é castanho-escuro, mancha umeral ovalada em ambos os lados, pedúnculo caudal com mancha alongada que se prolonga até a ponta dos raios caudais medianos, faixa lateral que varia de prateada a escura, ao longo do flanco, até a mancha do fim do pedúnculo caudal, que continua até a ponta dos raios caudais medianos (Britski et al., 1984; Britski et al., 1988; CEMIG/CETEC, 2000).

O gênero *Astyanax* possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrado desde o sudoeste dos Estados Unidos até a Bacia do rio da Prata (Moreira Filho, 1989), inclusive na sub-bacia do rio Pomba, bacia do rio Paraíba do Sul (Paiva et al., 2006). Os lambaris são encontrados em cabeceiras de riachos, rios e lagos, e vivem sempre em cardumes, realizando curtas migrações na época das cheias para sua reprodução. Em relação ao período reprodutivo dos lambaris, este pode variar conforme a espécie e habitat. O *Astyanax bimaculatus* reproduz continuamente durante todo o ano, e o período reprodutivo mais intenso normalmente ocorre de setembro a março, variando de acordo com o ambiente em que vive (Vazzoler e Menezes, 1992; Santos, 2009). Da mesma forma que em outras espécies de *Astyanax*, um caráter sexual do macho é aspereza mais ou menos acentuada da nadadeira anal, resultado de inúmeras espículas que aparecem na época da reprodução. Em geral, o macho é menor que a fêmea (CEMIG/CETEC, 2000).

A biologia reprodutiva do lambari pode ser prejudicada com o desmatamento ciliar, poluição industrial e doméstica, e destruição de várzeas e lagoas marginais por projetos agrícolas que também constituem ameaça em várias regiões (CEMIG/CETEC, 2000). Esses fatores interferem na dinâmica da população desses peixes (Vitule e Aranha, 2002).

Os lambaris são considerados onívoros, se alimentando de algas, vegetais, sementes, larvas e insetos adultos (CEMIG/CETEC, 2000; Vitule e Aranha, 2002). Segundo Nomura (1975), no rio Mogi-Guaçu, SP, definiu-se *A. bimaculatus* como onívoro, com predominância de consumo de restos de vegetais superiores. Em estudo conduzido com o lambari da espécie *Astyanax janae*, verificaram-se que os principais hábitos alimentares se baseavam em algas, esporos vegetais, microcrustáceos e pequenos invertebrados (Santin et al., 2005).

Diversos são os relatos sobre a importância do lambari na estrutura trófica do ecossistema e sua variação alimentar diante de modificações ambientais (Esteves, 1998; Suarez et al. 1995; Motta e Uida, 1995). Nas construções de novas barragens o *A. bimaculatus* é uma das poucas espécies capazes de sobreviver nessas condições. Por esses motivos, A.

bimaculatus apresenta enorme potencial para se tornar um organismo modelo para estudos ecotoxicológicos (Paiva et al., 2006).

Além disso, é peixe de interesse alimentar para outros peixes consumidores terciários (Esteves, 1998). No trabalho conduzido por Loureiro et al. (1995) verificando a dieta alimentar na espécie *Hoplias malabaricus* (traíra) em Segredo/Paraná, os resultados mostraram que os hábitos alimentares preferenciais são os lambaris de diversas espécies. Em outro estudo, verificou-se a importância do lambari como alimento para as espécies *Hoplias malabaricus*, *Oligosarcus longirostris* e *Rhamdia branneri* após o represamento do Reservatório de Salto Caxias, Paraná, demonstrando ser o alimento preferido dessas espécies (Novakowski et al., 2007).

A ecologia alimentar de uma determinada espécie faz parte e interfere diretamente na dinâmica de sua população, sendo primordial para a conservação do ecossistema como um todo (Vitule e Aranha, 2002). Os lambaris são de extrema importância em diversos habitats por equilibrarem o ecossistema e a cadeia alimentar, constituindo-se em fonte de alimentos para peixes maiores, carnívoros e aves.

Também são muito cultivados nas pisciculturas brasileiras pela destacada importância econômica, dado o seu volume de captura, e pela pesca esportiva (Barbieri et al., 1982).

Assim, devido à diversidade de ambientes em que se encontra a espécie, e também às suas características reprodutivas, que representam o comportamento de grande parte dos teleósteos, o estudo da espermatogênese da espécie em exposição aos agroquímicos pode ser representativa dos peixes neotropicais de pequeno porte. Isso os torna um ótimo modelo experimental, além da facilidade de obtenção e de manutenção em condições laboratoriais, por ser uma espécie nativa de grande interesse comercial e muito abundante nos rios de regiões brasileiras, inclusive na Zona da Mata Mineira.

Morfologia dos testículos de Astyanax bimaculatus

Os testículos do lambari são pares, alongados e de superfície lisa. Cada testículo apresenta uma extremidade cranial afilada, uma parte média

de forma triangular e uma porção caudal que se afila gradualmente até unir-se à do outro testículo, formando um ducto único que desemboca na papila urogenital (Nomura, 1975, Pelizaro et al., 1981).

Os testículos de *A. bimaculatus* apresentam características similares às de outros teleósteos, sendo envoltos por uma cápsula de tecido conjuntivo, denominada albugínea testicular. Possui dois compartimentos, o intersticial e o tubular. O primeiro apresenta vasos sanguíneos, fibras nervosas, tecido conjuntivo, além de células de Leydig que produzem testosterona, a qual é de extrema importância para a diferenciação gonadal, desenvolvimento das características sexuais secundárias, comportamento sexual e para a regulação da espermatogênese (Weltzien et al., 2004). O compartimento tubular é composto por células somáticas (células de Sertoli) e células germinativas que formarão os espermatozoides após passarem pela espermatogênese (Billard, 1990). As células germinativas geralmente se dividem e se diferenciam no interior de cistos germinativos, os quais são compostos de clones de células germinativas no mesmo estágio de desenvolvimento e cujas paredes são constituídas por células de Sertoli (Silva e Godinho, 1983; Pudney, 1995; Le Gac e Loir, 1999; Schulz et. al., 2005). As células de Sertoli fornecem às células germinativas suporte físico e fatores importantes para a sobrevivência, proliferação e diferenciação das mesmas, estando ainda envolvidas na intermediação hormonal e na fagocitose de restos celulares originados da espermiogênese (Weltzien et al., 2004).

O processo espermatogênico de teleósteo assemelha-se ao de outros vertebrados. Assim, a espermatogônia A ou primária, divide-se e origina uma espermatogônia igual (conservativa) e espermatogônias B ou secundárias que, depois de várias divisões mitóticas, diferenciam-se em espermátócitos primários. Estes entram em divisão meiótica formando os espermátócitos secundários, que por sua vez passam pela segunda divisão meiótica levando a formação das espermátides. Estas últimas passam pela fase espermiogênica, caracterizada por alterações morfológicas marcantes, principalmente relacionadas com a condensação nuclear e a formação da peça intermediária e flagelo, originando os espermatozóides, que são células altamente especializadas e equipadas para alcançar e fertilizar os ovócitos

(Miura, 1999). Durante a espermição, as células de Sertoli que formam a parede dos cistos se rompem e liberam as espermatídes ou espermatozoides, dependendo da espécie, em um lume cujo espaço aumenta gradualmente ao longo do período reprodutivo (Grier, 1980; Pudney, 1995). O esquema geral de organização histológica dos testículos de *A. bimaculatus* está representado na figura 4.

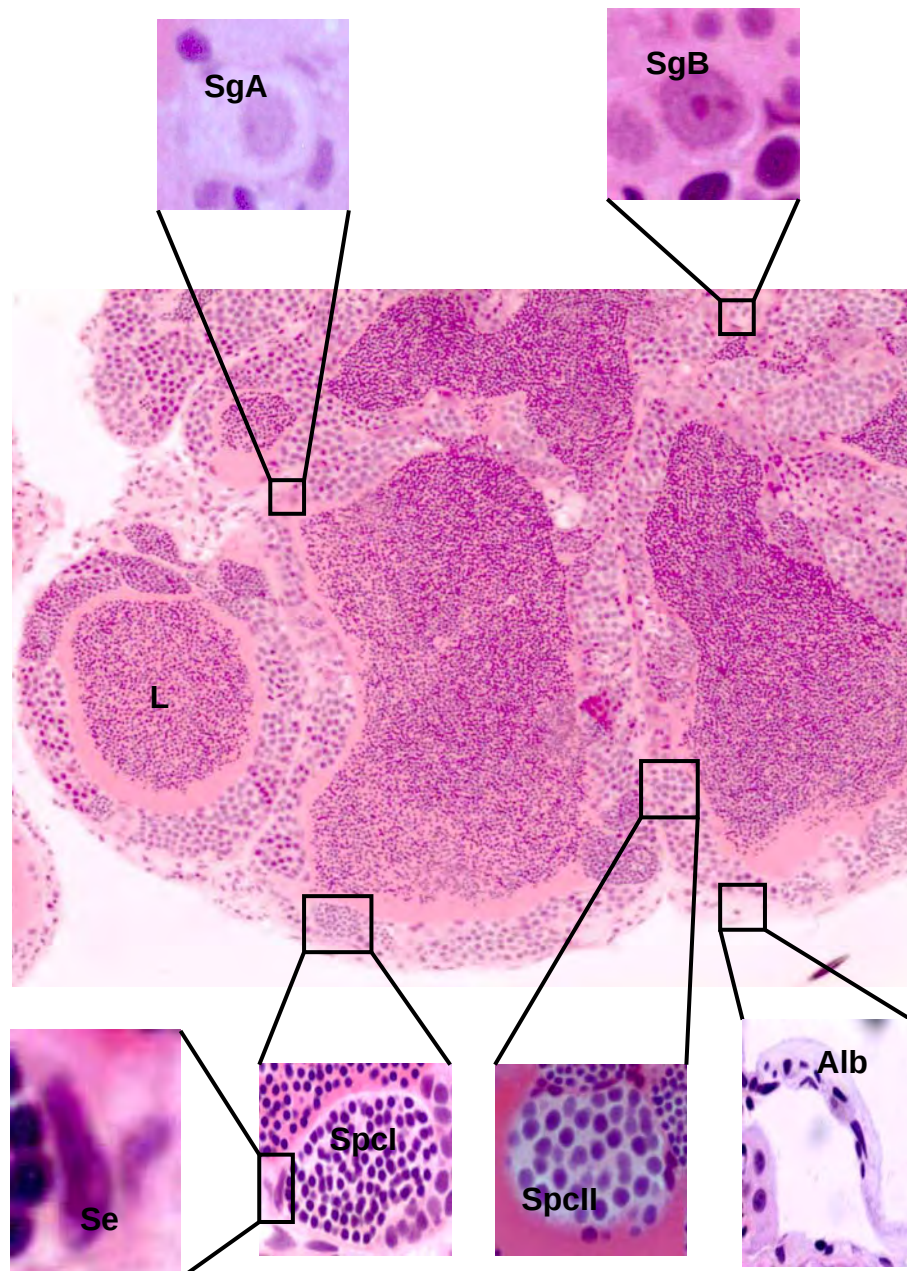


Figura 4: Organização estrutural do testículo. Em destaque: SgA- Espermatogônia A ou primária; SgB- Espermatogônia B ou secundária; L- Luz do túbulo com espermatozoides e secreção tubular; Se- Célula de Sertoli delimitando um cisto; Spcl- Cisto de espermatócito primário; Spcll- Cisto de espermatócito secundário; Alb- Albugínea testicular. HE. Aumento: 100X. Encartes: 400X.

Disfunção nos processos reprodutivos

O controle neuroendócrino da reprodução é dependente da ação coordenada de vários hormônios associados ao eixo hipotálamo-hipófise-gônada. Os estímulos sensoriais externos e internos condicionam a secreção do hormônio liberador da gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo, o qual, por sua vez, regula a liberação de gonadotrofinas (GTH-I e GTH-II) pela hipófise. A GTH-I é funcionalmente similar ao hormônio folículo estimulante (FSH) e a GTH-II é similar ao hormônio luteinizante (LH) dos mamíferos (Schulz et al., 2001). As principais células alvo das gonadotrofinas são as células da granulosa e da teca interna no ovário das fêmeas, e as células de Sertoli e de Leydig nos testículos dos machos (Janz, 2000). Estas células, após estimulação pelas gonadotrofinas, sintetizam esteróides sexuais (estrogênicos e androgênicos) e de maturação (progesteronas). O 17β -estradiol (E_2) e a estrona são os estrogênios mais importantes nas fêmeas, desempenhando um papel fundamental na diferenciação sexual, desenvolvimento dos órgãos reprodutores e indução do comportamento sexual. Nos machos, a 11-cetotestosterona e a testosterona são os androgênios mais importantes, sendo responsáveis pelo seu desenvolvimento sexual (Borg, 1994). Nos teleósteos, a produção de esteroides sexuais é controlada por um sistema de retrocontrole ligado ao eixo hipotálamo-hipófise-gônada.

A quantificação de E_2 no plasma de peixes tem sido utilizada como indicador da presença de disruptores endócrinos no ambiente aquático, em particular de xenoestrogênios (substâncias que modulam ou mimetizam a ação dos esteroides sexuais, principalmente do E_2). Assim, diversos autores observaram alteração dos níveis de E_2 plasmático após exposição a etoxilados de alquifenóis (Soverchia et al., 2005), pesticidas (Singh e Canário, 2004), PCBs (Jung et al., 2005), bem como a misturas complexas inespecíficas (Sepúlveda et al., 2002). Deste modo, alterações nos níveis plasmáticos de E_2 induzidas por contaminantes ambientais podem colocar em risco o sucesso reprodutivo. Por outro lado, elevados níveis de E_2 na água podem causar efeitos adversos nos peixes, tais como mudança de sexo em machos (Metcalf et al., 2001), redução do índice gonadosomático (Bjerselius et al., 2001) e da produção de ovos (Oshima et al., 2003), assim

como alteração do comportamento reprodutivo em machos (Bjerselius et al., 2001). Os peixes são animais que podem apresentar dimorfismo sexual, mas que sob o efeito de condições ambientais e/ou ação de disruptores endócrinos podem sofrer mudança de sexo (intersexo) semelhante ao demonstrado por DeFalco e Capel (2009).

Além dos efeitos anteriormente referidos, Teles (2006) destaca como uma das respostas mais importantes à presença de disruptores endócrinos, a indução da transcrição e tradução de determinadas proteínas, nomeadamente de uma fosfolipoglicoproteína, a vitelogenina. Sua síntese é um processo estimulado pelo E_2 , envolvendo o controle coordenado entre o hipotálamo, hipófise, fígado e gônadas (Thomas, 1990). A vitelogenina é sintetizada no fígado de peixes, transportada até aos ovários onde é sequestrada e incorporada nos ovócitos durante o seu desenvolvimento. Ela é clivada proteoliticamente após sequestro, formando as proteínas do vitelo (lipovitelina e fosvitina). Dessa forma, ela constitui a principal fonte de nutrição do embrião em desenvolvimento e pode ser encontrada no plasma de fêmeas maduras em concentrações elevadas. Normalmente, a presença de níveis significativos de vitelogenina no plasma ocorre apenas em fêmeas maduras. No entanto, os peixes juvenis e machos maduros possuem receptores de estrogênios (Kishida et al., 1992), assim como um gene silencioso da vitelogenina, geralmente presente mas não expresso (Moncaut et al., 2003). Deste modo, os machos e juvenis podem responder à presença de disruptores endócrinos, produzindo-a, e tendendo a permanecer no plasma em níveis elevados, devido à falta de mecanismos de eliminação (Funkenstein et al., 2000). Vários autores observaram aumentos de sua concentração plasmática em diferentes espécies de peixes após exposição a E_2 e disruptores endócrinos (Teles, 2006; Arukwe et al., 1998; Berg et al., 2004; Andreassen et al., 2005; Soverchia et al., 2005), o que forneceu evidência da grande sensibilidade deste parâmetro como indicador da exposição a eles.

Respostas biológicas como indicadoras de poluição ambiental

Para se proceder à avaliação do estado de um determinado ecossistema, cada vez mais se tem recorrido à adoção de programas de

biomonitoramento ambiental, baseando-se na medição de respostas biológicas, as quais são genericamente designadas de biomarcadores. Um biomarcador é definido como uma resposta biológica induzida, geralmente por xenobióticos, mensurável em sistemas biológicos, ou amostras destes, abrangendo diferentes níveis, desde molecular, celular ou fisiológico até comportamental (NRC, 1989; WHO, 1993). Num contexto ambiental, os biomarcadores são considerados ferramentas altamente informativas quanto à detecção da exposição a contaminantes e seus respectivos efeitos (Van der Oost et al., 2003; Teles, 2006). A utilização de biomarcadores oferece ainda a possibilidade de obter um entendimento do mecanismo de causa/efeito dos processos biológicos. Adicionalmente, esta estratégia apresenta a amplitude amostral como vantagem ao monitoramento químico, que resulta de eventuais interações toxicológicas da exposição a misturas de contaminantes (Van der Oost et al., 2003).

De acordo com o Conselho Nacional de Pesquisa americano (NRC, 1989) e a Organização Mundial da Saúde/OMS (WHO, 1993), os biomarcadores podem ser divididos em três classes: a) biomarcadores de exposição, que abrangem a detecção e quantificação de um composto exógeno, dos seus metabólitos ou da interação entre este e moléculas ou células alvo, sendo medidos num compartimento do organismo; b) biomarcadores de efeito, que incluem alterações bioquímicas, fisiológicas e outras, sendo mensuráveis nos tecidos ou fluidos corporais e reconhecidamente associadas a possíveis desequilíbrios; c) biomarcadores de susceptibilidade, que indicam a capacidade inerente ou adquirida de um organismo alterar a susceptibilidade a uma exposição, envolvendo fatores genéticos. Essa mesma classificação também foi usada em trabalhos recentes, como Teles (2006).

Essas respostas medidas em níveis organizacionais mais básicos da teia alimentar podem funcionar como um instrumento de vigilância ambiental permitindo identificar riscos a esses níveis e, também, podem possibilitar intervenções corretivas que impeçam os efeitos adversos de serem transpostos para níveis superiores da teia alimentar (Teles, 2006).

Objetivos

Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência do herbicida Roundup™ (MONSANTO) e do inseticida organoclorado Thiodan® (BAYER) na morfologia testicular e na espermatogênese de indivíduos adultos de lambaris da espécie *Astyanax bimaculatus*, após exposição aguda por 96 horas a esses agroquímicos.

Objetivos específicos

- Determinar a concentração letal para 50% da população de *A. bimaculatus* adultos (CL₅₀) exposta a cada um dos agroquímicos durante 96 horas, em sistema de água estático;
- Descrever morfologicamente o testículo e avaliar o processo espermatogênico de *A. bimaculatus* adultos, em microscopia de luz, caracterizando esse órgão para animais não expostos aos agroquímicos; e
- Comparar a estrutura dos testículos e a evolução do processo espermatogênico de animais controle com aqueles submetidos ao efeito dos agroquímicos Roundup™ e Thiodan® para se avaliar os prováveis efeitos tóxicos desses agroquímicos sobre a população, morfometria e morfologia celular do testículo.

Referências bibliográficas

ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS). **NBR 15088 – Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes**. 2. ed. ABNT: versão corrigida 31/03/2006, 19p, 2006.

ADAMS, M. (eds). **Biological indicators of aquatic ecosystem stress**. Maryland: American Fisheries Society Bethesda, 600p, 2002.

AHMAD, I.; OLIVEIRA, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. *Anguilla anguilla* L.oxidative stress biomarkers responses to copper exposure with or without β -naphthoflavone pre-exposure. **Chemosphere**. v.61, p.267-275, 2005.

ANDREASSEN, T. K.; SKJOEDT, K.; KORSGAARD, B. Upregulation of estrogen receptor and vitellogenin in eelpout (*Zoarces viviparus*) by waterborne exposure to 4-tert-octylphenol and 17 β -estradiol. **Comparative Biochemical Physiology C**. v.140, p.340-346, 2005.

ARAÚJO, F. G.; SIMONI, M. R. F. Relação peso-comprimento do lambari rabo vermelho (*Astyanax fasciatus paraybae*) e do lambari rabo amarelo (*Astyanax bimaculatus*) na represa de Ribeirão das Lajes, Rio de Janeiro. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**. v.40, n.2, p.453-458, 1997.

ARUKWE, A.; CELIUS, T.; WALTHER, B. T.; GOKSØYR, A. Plasma levels of vitellogenin and eggshell zona radiata proteins in 4-nonylphenol and *o,p'*-DDT treated juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Marine Environmental Research**. v.46, p.133-136, 1998.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química**. 1. ed. Porto Alegre: Bookman, 2001. 914 p.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2000. **Toxicological profile for endosulfan**. <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp41.html>> Acesso em dezembro de 2006.

BARBIERI G.; SANTOS, M. V. R.; SANTOS, J. M. Época de reprodução peso/comprimento de duas espécies de *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.17, n.7, p.1057-1065, 1982.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2004. 215 p.

BARCAROLLI, I. F.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of aluminum in acidic water on hematological and physiological parameters of the neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v.72, p.639-646, 2004.

BAYER. 2010. Bayer Crop Science. Propriedades do endosulfan <<http://www.bayercropscience.com.br/site/nossosprodutos/protecaodecultivo/sebiotecnologia/DetalheDoProduto.fss?Produto=52>> Acesso em julho de 2010.

BERG, A. H.; WESTERLUND, L.; OLSSON, P. E. Regulation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) egg shell proteins and vitellogenin during reproduction and in response to 17 β -estradiol and cortisol. **General and Comparative Endocrinology**. v.135, p.276-285, 2004.

BIDWELL, J. R.; GORRIE, J. R. **Acute toxicity of a herbicide to selected frog species: final report**. Technical series n.79. Western Australia. Department of Environmental Protection. Perth [W.A.], 9p, 1995.

BILLARD, R. Spermatogenesis in teleost fish. In: Lamming Ge. **Reproduction in the male**. ed. Londres: Churchill Livingstone. v.2, p.183-212, 1990.

BJERSELIUS, R.; LUNDSTEDT-ENKEL, K.; OLSEN, H.; MAYER, I.; DIMBERG, K. Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17 β -estradiol. **Aquatic Toxicology**. v.53, p.139-152, 2001.

BORG, B. Androgens in teleost fishes. **Comparative Biochemistry Physiology C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**. v.109, p.219-245, 1994.

BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do estado de São Paulo: sistemática. In: Comissão Inter Estadual da Bacia Paraná-Uruguaí. **Poluição e Piscicultura**. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca, p.79-108, 1972.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de Identificação de Peixes da Região de Três Marias**. Brasília: Câmara dos Deputados/CODEVASF. 128p, 1984.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco)**. Brasília: Câmara dos Deputados/CODEVASF, Divisão de Piscicultura e Pesca. 143p, 1988.

CAPKIN, E.; ALTINOK, I.; KARAHAN, B. Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. **Chemosphere**. v.64, p.1793-1800, 2006.

CEMIG/CETEC - COMPANHIA ENERGETICA DE MINAS GERAIS, FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Guia ilustrativo de peixes do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG. 144p, 2000.

CENGİZ, E. I.; ÜNLÜ, E.; BALCI, K. The histopathological effects of Thiodan® on the liver and gut of mosquitofish, *Gambusia affinis*. **Journal of Environmental Scientific Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**. v.36, n.1, p.75-85, 2001.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. <http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/produtos/ECO_HELP.htm> Informa coes_Ecotoxicologicas> Acesso em julho de 2010.

COBB, A. **Herbicides and plant physiology**. Londres: Chapman & Hall. 176p, 1992.

COX, C. Glyphosate 2. Human Exposure and ecological effects. **Journal of pesticide reform: a publication of the Northwest Coalition for Alternatives to Pesticides**. v.15, n.4, p.14-20. 1995.

DEFALCO, T; CAPEL, B. Gonad Morphogenesis in Vertebrates: Divergent Means to a Convergent End. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. v.25, p.457-482, 2009.

DUTTA, H. M.; ARENDS, D. A. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. **Environmental Research**. v.91, p.157-162, 2003.

DUTTA, H. M.; MISQUITA, D.; KHAN, S. The effects of endosulfan on the testes of bluegill fish, *Lepomis macrochirus*: a histopathological study. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v.51, p.149-56, 2006.

EGAAS, E.; SANDVIK, M.; FJELD, E.; KÄLLQVIST, T.; GOKSØYR, A.; SVENSEN, A. Some effects of the fungicide propiconazole on cytochrome P450 and glutathione S-transferase in brown trout (*Salmo trutta*). **Comparative Biochemistry Physiology C**. v.122, p.337-344, 1999.

ENGELHARDT, G. T.; SARMENTO, R. **Comportamento ambiental do thiodan CE (endosulfan) usado no controle químico da broca do fruto do cafeeiro**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal do Espírito Santo. 26p. 2004. <http://www.seculodiario.com.br/arquivo/2004/marco/23/noticiario/meio_ambiente/arquivo.doc> Acesso em janeiro de 2010.

EPA (Environmental Protection Agency). 1980. Toxicology Network. Endosulfan factsheet. **EPA-440/5-80-046**. <<http://toxnet.nlm.nih.gov>> Acesso em janeiro de 2010.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência. 575p, 1998.

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

FUNKENSTEIN, B.; BOWMAN, C. J.; DENSLOW, N. D.; CARDINALI, M.; CARNEVALI, O. Contrasting effects of estrogen on transthyretin and vitellogenin expression in males of the marine fish, *Sparus aurata*. **Molecular Cell Endocrinology**. v.167, p.33-41, 2000.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; CRESTANI, M.; FONSECA, M. B.; PEDRON, F. A.; DUARTE, M. F.; VIEIRA, V. L. P. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.65, n.2, p.237-241, 2006.

GOEBEL, H.; GORBACH, S.; KNAUF, W.; RIMPAU, R.H.; HÜTTENBACH, H. **Properties, effects, residues, and analytics of the insecticide endosulfan**. Boca Raton: Springer-Verlag, 174 p, 1982.

GOKSØYR, A.; ANDERSSON, T.; BUHLER, D. R.; STEGEMAN, J. J.; WILLIAMS, D. E.; FÖRLIN, L. Immunochemical cross-reactivity of β -naphthoflavone-inducible cytochrome P-450 (P4501A) in liver microsomes from different fish species and rat. **Fish Physiology Biochemistry**. v.9, p.1-13, 1991.

GOLDSBOROUGH, L. G.; BECK, A. E. Rapid dissipation of glyphosate in small forest ponds. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v.18, n.4, p.537-544, 1989.

GRIER, H. J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **American Zoologist**. v.21, p.345-357, 1980.

GUOSHENG, C.; YING, X.; LIHONG, X.; YONGYUAN, Z.; SCHRAMM, K.; KETTRUP, A. Influence of dioxin and metal-contaminated sediment on phase I and II biotransformation enzymes in silver crucian carp. **Ecotoxicology Environmental Safety**. v.40, p.234-238, 1998.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 408.

HAHN, M. E.; LAMB, T. M.; SCHULTZ, M. E.; SMOLOWITZ, M.; STEGEMAN, J. J. Cytochrome P4501A induction and inhibition by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in an Ah receptor-containing fish hepatoma cell line (PLHC-1). **Aquatic Toxicology**. v.26, p.185-208, 1993.

HEAP, I. M. The occurrence of herbicide resistant weeds world wide. **Pesticides Science**. v.51, n.2, p.235-243, 1997.

HERNANDEZ, A.; GARCIA-PLAZAOLA, J. I.; BACERRIL, J. M. Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). **Journal of Agricultural Food and Chemistry**. v.47, p.2920-2925, 1999.

HOUAISS, A.; VILLAR, M. S. **Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa**. 2ª reimpressão. Rio de Janeiro: Objetiva. 2922p, 2007.

JANZ, D. M. Endocrine System. In: Ostrander, G. K. ed. **The Laboratory Fish**. San Diego: Academic Press. 525p, 2000.

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

JOBLING, M. **Environmental biology of fishes**. Londres: Chapman & Hall. 455p, 1995.

JUNG, J. H.; JEON, J. K.; HAN, C. H. Effects of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB 153) on plasma sex steroids and vitellogenin in rockfish (*Sebastes schlegelii*). **Comparative Biochemistry Physiology C**. v.140, p.295-299, 2005.

KISHIDA, M.; ANDERSON, T. R.; SPECKER, J. L. Induction by β -estradiol of vitellogenin in striped bass (*Morone saxatilis*): characterization and quantification in plasma and mucus. **General Comparative Endocrinology**. v.88, p.29-39, 1992.

LARSSON, D. G. J.; KINNBERG, K.; STURVE, J.; STEPHENSEN, E.; SKÖN, M.; FÖRLIN, L. Studies of masculinization, detoxification, and oxidative stress responses in guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to effluent from a pulp mill. **Ecotoxicology Environmental Safety**. v.52, p.13-20, 2002.

LE GAC, F.; LOIR, M. Male reproductive system fish. In: KROBIL, E. NEILL, J. D. (Ed.). **Encyclopedia of reproduction**. San Diego: Academic Press. v.3, p.20-30, 1999.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; PEZZI DA SILVA, J. F.; VARI, R. P.; HAROLD, H.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. Genera Incertae Sedis in Characidae. p. 106-169, 2003. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C. J. (eds.) **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS. 729p, 2003.

LIONG, P. C.; HAMZAH, W. P.; MURUGAN, V. Toxicity of some pesticides towards freshwater fishes. **Malaysian Agricultural Journal**. v.54, n.3, p.147-156, 1988.

LOUREIRO, V. E.; HAHN, N. S.; ABUJANRA, F.; RUSSO, M. R.; FIGUEIREDO, H. R. Dieta e atividade alimentar de *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) (OSTEICHTHYES, ERTHRINIDAE) do reservatório da UHE de Segredo, PR, no primeiro ano de sua formação. In: **Anais... XI Encontro Brasileiro de Ictiologia**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ictiologia. 1995.

LOWE-McCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. (Tradutores: VAZZOLER, A. E. A. M.; AGOSTINHO, A. A.; CUNNINGHAM, P. T. M). São Paulo: USP. 535p, 1999.

MAPA (Ministério da Agricultura). <<http://www.agricultura.gov.br/>> Acesso em julho de 2010a.

MAPA (Ministério da Agricultura). **Ato n.12 de 01 de abril de 2008**. Publicado no Diário Oficial da União de 03/04/2008, Seção 1, Página 6. <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao>> Acesso em julho de 2010b.

MAPA (Ministério da Agricultura). **Resolução RDC n.28 de 9 de agosto de 2010**. Publicado no Diário Oficial da União de 16/08/10, Seção 1, Página 64, 2010c.

MARIA, V. L.; CORREIA, A. C.; SANTOS, M. A. *Anguilla anguilla* L. biochemical and genotoxic responses to benzo[a]pyrene. **Ecotoxicology Environmental Safety**. v.53, p.86-92, 2002.

METCALFE, C. D.; METCALFE, T. L.; KIPARISSIS, Y.; KOENIG, B. G.; KHAN, C.; HUGHES, R. J.; CROLEY, T. R.; MARCH, R. E.; POTTER, T. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental Toxicology Chemistry**. v.20, p.297-308, 2001.

MITCHELL, D. G.; CHAPMAN, P. M.; LONG, T. J. Acute toxicity of Roundup and Rodeo herbicides to rainbow trout, chinook, and coho salmon. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v.39, p.1028-1035, 1987.

MIURA, T. Spermatogenetic cycle in fish. In: KROBIL, E.; NEILL, J. D. (ed). **Encyclopedia of reproduction**. San Diego: Academic Press. v.4, p.571-578, 1999.

MONCAUT, N.; LO NOSTRO, F.; MAGGESE, M. C. Vitellogenin detection in surface mucus of the south american cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) induced by estradiol-17 β Effects on liver and gonads. **Aquatic Toxicology**. v.63, p.127-137, 2003.

MONSANTO. 2010. Site Monsanto. Glyphosate factsheet. <<http://www.monsanto.com.br/produtos/herbicidas/roundup/roundup-original/roundup-original.asp>> Acesso em julho de 2010.

MONTEIRO, L. F. **Compêndio de defensivos agrícolas: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola**. São Paulo: Andrei. 432p,1987.

MONTOYA, L. N. F. **Efeitos do endossulfan sobre a morfologia do testículo de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) imatura**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 76p. 2008.

MOREIRA FILHO, O. **Análises cariotípicas e morfológicas sobre a diversidade no "complexo" *Astyanax scabripinis* (Jenyns, 1842) (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae)**. Tese (Doutorado em Genética). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 135p.1989.

MORGAN, J. D.; VIGERS, G. A.; FARREL, A. P.; JANZ, D. M.; MANVILLE, J. F. Acute avoidance reactions and behavioral responses of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to Garlon 4, Garlon 3A and Vision herbicides. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.10, p.73-79, 1991.

MOTTA, R. L.; UIDA, V. S. Hábito alimentar da comunidade de peixes de um ambiente lótico tropical (CUESTA de BOTUCATU). In: **Anais... XI Encontro Brasileiro de Ictiologia**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ictiologia, 1995.

MURTY, A. S. **Toxicity of pesticides to fish**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, v1, 178p, 1988.

MUSANHI, R. G. Influence of two organochlorine pesticides, Thiodan and Lindane on survival of fingerlings of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. United Nations Development Program - Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). **Nigerian Institute for Oceanography and Marine Research**. 1987. <<http://www.fao.org/docrep/field/003/AC162E/AC162E00.htm>> Acessado em julho de 2010.

NAQVI, S. M.; VAISHNAVI, C. Bioaccumulative potential and toxicity of endossulfan insecticide to non-target animals. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.105, p.347-361, 1993.

NATARAJAN, M. **Global food crisis**. Madras: Puthiya Parvai. 30p, 2008.

NELSON, D. R.; KOYMANS, L.; KAMATAKI, T.; STEGEMAN, J. J.; FEYEREISEN, R.; WAXMAN, D. J.; WATERMAN, M. R.; GOTOH, O.; COON, M. J.; ESTABROOK, R. W.; GUNSALUS, I. C.; NEBERT, D. W. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**. v.6, p.1-42, 1996.

NOMURA, H. Fecundidade, maturação sexual e índice gônado-somático de lambari do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (Osteichthyes, Characidae), relacionados com fatores ambientais. **Revista Brasileira de Biologia**. v.35, n.4, p.775-798, 1975.

NOVAKOWSKI, G. C.; HAHN, N. S.; FUGI, R. Alimentação de peixes piscívoros antes e após a formação do reservatório de Salto Caxias, Paraná, **Revista Brasileira de Biota Neotropical**. v.7, n.2, p.149-157, 2007.

NRC (National Research Council). **Biologic markers in reproductive toxicology**. Washington: National Academy Press. 420p, 1989.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue nature reserve, France. **Aquatic Toxicology**. v.74, p.53-69, 2005.

ORREGO, R.; JIMÉNEZ, B.; BORDAJANDI, L. R.; GAVILÁN, J. F.; INZUNZA, B.; ABAD, E.; GONZÁLEZ, M. J.; RIVERA, J.; BARRA, R. EROD induction and PCDD/F levels in fish liver from the Biobio River in Chile. **Chemosphere**. v.60, p.829-835, 2005.

OSHIMA, Y.; KANG, I. J.; KOBAYASHI, M.; NAKAYAMA, K.; IMADA, N.; HONJO, T. Suppression of sexual behavior in male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 β -estradiol. **Chemosphere**. v.50, p.429-36, 2003.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biochemical and genotoxic responses of adult eel (*Anguilla anguilla* L.) to resin acids and pulp mill effluent: laboratory and field experiments. **Ecotoxicology Environmental Safety**. v.42, p.81-93, 1999.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.53, p.331-347, 2002a.

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Naphthalene and β -naphthoflavone toxicity to *Anguilla anguilla* L.: hepatic metabolism and erythrocytic nuclear abnormalities. **Environment International**. v.28, p.285-293, 2002b.

PAIVA, S. R.; DERGAM, J. A.; MACHADO, F. Determining management units in southeastern Brazil: the case of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei: Ostariophysi: Characidae). **Hydrobiologia**. v.560, p.393-404, 2006.

PEIXOTO, F.; ALVES-FERNANDES, D.; SANTOS, D.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v.85, p.91-96, 2006.

PELIZARO, M. G.; LEME DOS SANTOS, H. S.; LOPES, R. A.; CASTAGNOLI, N. Rhythm of development in the oocyte of the tambuí *Astyanax bimaculatus* (Reinhardt, 1874) (Pisces: Characidae). A morphometric and histochemical study. **Archives of Biology**. v.92, p.41-431, 1981.

PÉQUEUX, A. Osmotic regulation in crustaceans. **Journal of Crustacean Biology**. v.1, n.15, p.1-60, 1995.

PIRES, F. R.; SOUZA, C. M.; CECOM, P. R. ; SANTOS, J. B. ; TOTOLA, M. R. ; PROCOPIO, S. O. ; SILVA, A. A. ; SILVA, C. S. W. Rhizospheric activity of potentially phytoremediative species for tebutiuron-contaminated soil. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**. v.29, p.627-634, 2005.

PIRES, F. R.; SOUZA, C. M.; CECOM, P. R. ; FERREIRA, L. R. Revisão bibliográfica: Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. **Planta Daninha**. v.21, p.335-341, 2003.

PROCÓPIO, S. O.; SANTOS, J. B.; SILVA, A. A.; PIRES, F. R.; RIBEIRO JUNIOR, J. I.; SANTOS, E. A. Potencial de espécies vegetais para remediação do herbicida trifloxysulfuron-sodium. **Planta Daninha**. v.23, p.9-16, 2005.

PUDNEY, J. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. **Microscopy Research and Technique**. v.6, p.459-497, 1995.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 5. ed. Londrina: Grafmarke. 591p, 2005.

ROSA, A. V. **Agricultura e meio ambiente**. ed. São Paulo: Atual. p.10-17, 1998.

ROYUELA, M.; GONZALEZ, A.; ARRESE-IGOR, C.; APARICIO-TEJO, P. M.; GONZALEZ-MURUA, C. Imazethapyr inhibition of acetolactate synthase in *Rhizobium* and its symbiosis with pea. **Pesticide Science**. v.52, p.372-380, 1998.

RÜEGG, E. F.; PUGA, F. R.; SOUZA, M. C. M.; ÚNGARO, M. T. S.; FERREIRA, M. S.; YOKOMIZO, Y.; LMEIDA, W. F. Impactos dos agrotóxicos sobre o ambiente e a saúde. In: MARTINE, G.; GARCIA, R. C.. **Os impactos sociais da modernização agrícola**. São Paulo: Caetés. p.171-207, 1987.

SANTIN, M.; DI BENEDETTO, M.; BIALETZKI, A.; NAKATANI, K.; SUIBERTO, M. R. Aspectos da dieta de larvas de *Astyanax janeiroensis* (EIGENMANN, 1908) (Osteichthyes, Characidae) no reservatório de Guaricana, Rio Arraial, Estado do Paraná. **Boletim do Instituto de Pesca**. v.31, p.73-80, 2005.

SANTOS, D. C. M. **Toxidez aguda do zinco em *Lambaris Astyanax aff.bimaculatus* (Linnaeus, 1758)**. Dissertação. (Mestrado em Biologia Animal). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 111p. 2009.

SANTOS, J. B. **Atividade microbiana após aplicação de herbicidas utilizados no cultivo do feijoeiro**. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 63p. 2005.

SANTOS, J. B.; PROCÓPIO, S. O.; SILVA, A. A.; PIRES, F. R.; RIBEIRO JUNIOR, J. I.; SANTOS, E. A.; FERREIRA, L. R. Fitorremediação do herbicida trifloxysulfuron-sodium. **Planta Daninha**. v.22, p.323-330, 2004.

SCHULZ, R. W.; MENTING, S.; BOGERD, J.; FRANCA, L. R.; VILELA, D. A.; GODINHO, H. P. Sertoli cell proliferation in the adult testis - evidence from two fish species belonging to different orders. **Biology of Reproduction**. v.73, n.5, p.891-898, 2005.

SCHULZ, R. W.; VISCHER, H. F.; CAVACO, J. E. B.; SANTOS, E. M.; TYLER, C. R.; GOOS, H. J. T.; BOGERD, J. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. **Comparative Biochemistry Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology**. v.129, p.407-417, 2001.

SEPÚLVEDA, M. S.; JOHNSON, W. E.; HIGMAN, J. C.; DENSLOW, N. D.; SCHOEB, T. R.; GROSS, T. S. An evaluation of biomarkers of reproductive function and potential contaminant effects in Florida largemouth bass (*Micropterus salmoides floridanus*) sampled from the St. Johns River. **Science of Total Environment**. v.289, p.133-144, 2002.

SERVIZI, J. A.; GORDON, R. W.; MARTENS, D. W. Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, Daphnia, and trout. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v.39, p.15-2, 1987.

SILVA FILHO, M. V.; OLIVEIRA, M. N.; CUNHA BASTOS, V. L. F.; ALVES, M. V.; CUNHA BASTOS, J. Validação de espécies sentinelas por biomarcação com colinesterase em peixes. In: ESPINDOLA, E. L. G.; PASCHOAL, C. M. B.; ROCHA, O.; BOHRER, M. B. C.; OLIVEIRA NETO, A. L. (eds). **Ecotoxicologia: perspectiva para o século XXI**. São Carlos: RIMA, p.147-164, 2000.

SILVA, A. A.; SILVA, J. F.; FERREIRA, F. A.; FERREIRA, L. R. **Controle de plantas daninhas**. Brasília: ABEAS. módulo 3, 260p, 2002.

SILVA, M.; GODINHO, H. P. Timing of some events of the gametogenesis in the male Nile tilapia, *Sarotherodon niloticus*. **Archives of Anatomy and Microscopy**. v.72, n.3, p.231-237, 1983.

SINGH, P. B.; CANÁRIO, A. V. M. Reproductive endocrine disruption in the freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* in response to the pesticide γ -hexachlorocyclohexane. **Ecotoxicology Environmental Safety**. v.58, p.77-83, 2004.

SOARES, W.; ALMEIDA, R. M. V. R.; MORO, S. Trabalho rural e fatores de risco associados ao regime de uso de agrotóxicos em Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v.19, p.1117-1127, 2003.

SOLOMON, K.; ANADÓN, A.. LUIZ, C.A.. MARSHALL, J. Y.; SANIN, L.H. **Estudio de los efectos del programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida Glifosato (PECIG) y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente**. Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD) – División de la Organización de los Estados Americanos (OEA). 143p, 2005.

SORRENTINO, C.; ROY, N. K.; COURTENAY, S. C.; WIRGIN, I. Co-exposure to metals modulates CYP1A mRNA inducibility in Atlantic tomcod *Microgadus tomcod* from two populations. **Aquatic Toxicology**. v.75, p.238-252, 2005.

SOUZA, A. P.; LOURES, E. G.; SILVA, J. F.; RUIZ, H. A. Efeito do oxyfluorfe, 2,4-d e glyphosate na atividade microbiana de solos com diferentes texturas e conteúdos de matéria orgânica. **Planta Daninha**. v.14, p.55-64, 1996.

SOVERCHIA, L.; RUGGERI, B.; PALERMO, F.; MOSCONI, G.; CARDINALETTI, G.; SCORTICHINI, G.; GATTI, G.; POLZONETTI-MAGNI, A. M. Modulation of vitellogenin synthesis through estrogen receptor beta-1 in goldfish (*Carassius auratus*) juveniles exposed to 17- β estradiol and nonylphenol. **Toxicology Applied to Pharmacology**. v.209, p.236-243, 2005.

STEGEMAN, J. J.; HAHN, M. E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: MALINS D. C., OSTRANDER G. K. (eds). **Aquatic toxicology: molecular, biochemical and cellular perspectives**. Boca Raton: CRC Press, p.87-206. 1994.

STENBERG, B. Monitoring soil quality of arable land: microbiological indicators. **Soil and Plant Science**. v.49, p.1-24, 1999.

STUMPF, K.; ABHAVER, J. An up-to-date review of the environmental chemistry of endosulfan. Frankfurt: HOECHST. v.23, p.81/86, 1986.

SUAREZ, Y. R.; SOUZA, R.; PEREIRA, R. A. C. Ecologia alimentar de *Astyanax bimaculatus* (CHARACIDAE, TETRAGONOPTERINAE), no canal do Tamengo Corumbá, MS. In: **Anais... XI Encontro Brasileiro de Ictiologia**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ictiologia, 1995.

TELES, M. P. M. **Efeitos fisiológicos e genotóxicos induzidos por contaminantes ambientais em peixes**. Tese (Doutorado no Departamento de Biologia). Universidade de Aveiro, Aveiro, 253p. 2006.

THOMAS, P. Teleost model for studying the effects of chemicals on female reproductive endocrine function. **Journal Experimental Zoology Supplied**. v.4, p.126-128, 1990.

THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E. S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**. v.121, p.307-320, 2003.

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental, Instituto Biológico. **O Biológico**. v.64, p.135-142, 2002.

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microorganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: VENEGAS, V. H. A.; SCHAEFER, C. E. G. R.; BARROS, N. F.; MELLO, J. W. V.; COSTA, L. M. (eds). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa:UFV. v.2, p.195-276, 2002.

VACCARO, E.; MEUCCI, V.; INTORRE, L.; SOLDANI, G.; DI BELLO, D.; LONGO, V.; GERVASI, P. G.; PRETTI, C. Effects of 17 β -estradiol, 4-nonylphenol and PCB 126 on the estrogenic activity and phase 1 and 2 biotransformation enzymes in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquatic Toxicology**. v.75, p.293-305, 2005.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v.13, p.57-149, 2003.

VASCONCELLOS, M. G.; VERANI, N. F.; DE SÁ, O. R. Avaliação dos efeitos toxicológicos crônicos do herbicida Roundup (Glifosato) sobre a diferenciação gonadal do Bagre *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840). **Revista Fafibe online**. <<http://www.fafibe.br/revistafafibeonline/>> 2000.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: UEM. 196p, 1996.

VAZZOLER, A. E. A. M.; MENEZES, N. A. Síntese de conhecimento sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei: Characiformes). **Revista Brasileira de Biologia**. v.52, p.627-540, 1992.

VERMEULEN, N. E. Role of metabolism in chemical toxicity. In: Costas, L. ed *Cytochrome P450. Metabolic and toxicological aspects*. Boca Raton: CRC Press. p.29-54, 1996.

VITULE, J. R. S.; ARANHA, J. M. R. Ecologia alimentando lambari, *Deuterodon langei* Travassos, 1957 (Characidae, Tetragonopterinae), de diferentes tamanhos em um riacho da Floresta Atlântica, Paraná (Brasil). **Acta Biologica Paranaense**. v.31, p.137-150, 2002.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed. 876p, 2000.

WAN, M. T.; WATTS, R. G.; MOUL, D. J. Effects of different dilution water types on the acute toxicity to juvenile Pacific salmonids and rainbow trout of glyphosate and its formulated products. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v.43, p.378-385, 1989.

WANG, C.; ZHAO, Y.; ZHENG, R.; DING, X.; WEI, W.; ZUO, Z.; CHEN, Y. Effects of tributyltin, benzo[a]pyrene, and their mixture on antioxidant defense systems in *Sebasticus marmoratus*. **Ecotoxicology Environmental Safety**. v.65, n.3, p.381-387, 2006.

WELTZIEN, F. A.; ANDERSSON, E.; SHALCHIAN-TABRIZI, K.; NORBERG, B. The brain.pituitary.gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). **Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular e Integrative Physiology**. v.137, p.447-477, 2004.

WHO (World Health Organization). **Biomarkers and risk assessment: concepts and principles**. Environmental Health Criteria 155, IPCS/WHO. Geneva; 1993.

WHO (World Health Organization). United Nations Environment Programme, the International Labour Organization. Glyphosate. Environmental Health Criteria #159. Geneva, Switzerland. In: **Journal of Pesticide Reform**. Herbicide Facsheet: GLYPHOSATE (ROUNDUP)/Fall, v.18, n.3, p.1998, 1994.

WIKIPÉDIA. 2010. The Digital Free Encyclopedic. <http://en.wikipedia.org/wiki/Friedrich_Wohler> Acesso em julho de 2010.

WILLIAMS, R. T. **Detoxification mechanisms**. 2. ed. Londres: Chapman & Hall. 858p, 1959.

ZAMBOLIM, L. Fungicidas: benefícios versus riscos. **Ação Ambiental**, v.2, p.24-27, 1999.

CAPITULO 2. Efeitos do Roundup™ em *Astyanax bimaculatus* (Characidae: Teleostei) adultos: valor de CL₅₀ e morfologia testicular

RESUMO

Astyanax bimaculatus é peixe de porte pequeno, onívoro, e apresenta importância em diversos habitats por equilibrar o ecossistema e a cadeia alimentar. O Roundup™ (glifosato) está entre os herbicidas de maior propagação na agricultura mundial. O glifosato e seus derivados são tóxicos para peixes, mas alguns dos componentes dos produtos formulados apresentam níveis de toxicidade mais elevados que o ingrediente ativo. O presente trabalho visou determinar a concentração letal 50% (CL₅₀) para *A. bimaculatus* machos adultos expostos ao agroquímico por um período de 96h e comparar a estrutura os testículos de animais mantidos como controle com aqueles submetidos à ação do Roundup™. Para a determinação da CL₅₀ foram utilizados 90 peixes. Foram testadas seis concentrações em três repetições contendo cinco peixes cada. O teste de toxicidade aguda foi realizado em sistema estático, utilizando-se 110 peixes, sendo um grupo controle formado por duas repetições, cada uma com 10 peixes, e três concentrações de Roundup™ (1,3; 2,6 e 5,2 mg.L⁻¹) com três repetições, cada uma com 10 peixes. Após a exposição os animais foram anestesiados para a coleta dos testículos que foram fixados, incluídos, seccionados em micrótomo para confecção de lâminas e corados para análise morfológica e morfométrica. Os parâmetros indicadores da qualidade da água utilizada para realização do experimento encontraram-se em conformidade com as condições de cultivo e criação de peixes tropicais. A CL₅₀ calculada nesse teste foi de 14,0mg.L⁻¹. As análises histológicas mostraram alterações morfológicas quando comparadas ao grupo controle. Foram observadas descontinuidade ou falta de albugínea, desorganização tecidual caracterizada pela presença de espermatídes no parênquima testicular, presença de espermatócitos na luz do túbulo, presença de hemácias fora dos capilares sanguíneos, presença de vacúolos no interstício testicular e no citoplasma de espermatogônias, hemorragia. As análises morfométricas mostraram redução ($P < 0,05$) no diâmetro de núcleos de espermatócitos II na

concentração de 1,3mg.L⁻¹. Houve aumento (P<0,05) no número de espermatogônias B nas concentrações de 1,3 e 2,6 mg.L⁻¹. Assim, *A. bimaculatus* pode ser utilizado como bioindicador e seus testículos como biomarcadores de poluição aquática.

Palavras-chave: Lambari; glifosato; testículo.

INTRODUÇÃO

Astyanax bimaculatus é classificado na ordem Characiformes, família Characidae (CEMIG/CETEC, 2000; Britski, 1972) e revisões recentes colocam o gênero em “Incertae sedis” (Lima et al., 2003). *A. bimaculatus* é, na verdade, um complexo de espécies de ampla distribuição nas Américas do Sul e Central, e deve ser revisada para melhor organizar sua filogenia (Paiva et al., 2006). É peixe de porte pequeno, com cerca de 20cm de comprimento total e pesando 40g (Britski, 1972), onívoro, constituindo-se em espécie forrageira, que além de importante na pesca esportiva, também apresenta importância em diversos habitats por equilibrar o ecossistema e a cadeia alimentar. Pode ter sua biologia reprodutiva prejudicada pelo desmatamento ciliar, poluição industrial e doméstica, destruição de várzeas e lagoas marginais (CEMIG/CETEC, 2000). Esses fatores interferem na dinâmica da população desses peixes (Vitule e Aranha, 2002). Nas construções de novas barragens, o *A. bimaculatus* é uma das poucas espécies capazes de sobreviver nessas condições. Por esses motivos, *A. bimaculatus* apresenta enorme potencial para se tornar um organismo modelo para estudos ecotoxicológicos (Paiva et al., 2006).

A base para estudos fisiológicos, toxicológicos e aplicados em reprodução, é o conhecimento dos eventos que ocorrem nas gônadas dos peixes (Van Oordt et al., 1987). *A. bimaculatus* apresenta testículos pares, parcialmente fundidos entre si, e tamanho similar entre o direito e o esquerdo. A análise histológica dos testículos do lambari mostra que eles são envolvidos por cápsula de tecido conjuntivo da qual partem septos conjuntivos fibrosos para o seu interior delimitando túbulos seminíferos (Nomura, 1975, Pelizaro et al., 1981). O interstício apresenta células de Leydig, fibroblastos típicos, capilares sangüíneos e fibras nervosas difusas,

sendo desprovido de sistema linfático. O conhecimento das características morfológicas dos testículos do lambari *A. bimaculatus* em condições naturais e expostos ao herbicida glifosato (Roundup™) poderá fornecer informações importantes para o entendimento dos efeitos provocados por esse produto nos testículos e se esses acúmulos podem comprometer o processo reprodutivo dessa espécie.

O Roundup™ está entre os herbicidas de maior propagação na agricultura mundial. O Roundup™ pertence ao grupo químico das glicinas substituídas, e se caracteriza pelo amplo espectro de ação, não seletividade às plantas daninhas e ação sistêmica. O glifosato, princípio ativo, possui baixa seletividade e rápida ação herbicida nas plantas sensíveis, além de baixo custo. O herbicida Roundup™ pode ser descrito quimicamente como N-(fosfonometil)glicina, com fórmula bruta $C_3H_8NO_5P$. A concentração letal 50 (CL₅₀) do agroquímico em peixes varia de 1,3-52 mg.L⁻¹. Sua atuação baseia-se na rota da biossíntese de aminoácidos aromáticos, impedindo a síntese do triptofano, da tirosina e da fenilalanina em plantas superiores e microorganismos, resultando na acumulação do shiquimato e outros ácidos hidroxibenzóicos nessas células (Hernandez et al., 1999).

A toxicidade aguda deste pesticida é considerada baixa, mas alguns dos componentes de seus produtos formulados apresentam níveis de toxicidade mais elevados que o ingrediente ativo. O glifosato e seus derivados são tóxicos para peixes, alterando parâmetros hematológicos e metabólicos do fígado e coração, além de diminuir a atividade da acetilcolinesterase (Gluszczak et al., 2006). Alterações no comportamento dos peixes e dificuldade respiratória são observações comuns, e fatores que determinam a toxicidade do Roundup™ em peixes são a maturidade sexual e a temperatura da água. Os efeitos do produto podem afetar os hábitos de alimentação, migração e reprodução dos mesmos.

Para avaliar a toxicidade de uma substância, deve-se utilizar população homogênea para determinar a concentração responsável por um efeito tóxico (ABNT, 2006). O estudo dos efeitos de agentes tóxicos sobre a vida aquática permite observar alterações bioquímicas, fisiológicas e histológicas em tecidos vitais desses organismos (Dutta e Arends, 2003).

OBJETIVOS

- Determinar a concentração letal para 50% da população de *A. bimaculatus* adultos (CL₅₀) exposta ao agroquímico por um período de 96h, em sistema de água estático; e
- Comparar a estrutura dos testículos e a morfologia das células espermatogênicas de animais mantidos como controle com aqueles submetidos à ação do Roundup™ durante o período experimental, para se avaliar os prováveis efeitos tóxicos desse agroquímico.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nos Departamentos de Veterinária (Laboratório de Peixes, Laboratório de Técnicas Histológicas e Laboratório de Histopatologia) e de Biologia Geral (Laboratório de Biologia Estrutural), da Universidade Federal de Viçosa. Todos os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram aprovados pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da UFV, protocolo n. 024/2009, realizados e supervisionados pelo médico veterinário Laércio dos Anjos Benjamin, CRMV-MG 3387.

Animais

Lambaris da espécie *Astyanax bimaculatus* foram doados pela Piscicultura da Prata, localizada no município de Eugenópolis/MG (21°05'56"S e 42°11'13"O) que encontra-se na sub-bacia do rio Pomba, bacia do rio Paraíba do Sul.

Os peixes foram mantidos no Biotério de Peixes do Departamento de Veterinária da UFV e aclimatados às condições do laboratório por um período de 20 dias. Foram utilizados aquários de vidro com volume total de 150L, contendo água tratada para consumo humano, livre de cloro, dotados de sistema contínuo de filtração, com temperatura controlada em 26±1°C por meio de termostatos e termômetros. O fotoperíodo foi de 12h, a aferição da temperatura ocorreu duas vezes ao dia, e a troca de água diária foi inferior a

10% do volume do aquário. Os peixes foram alimentados *ad libitum*, duas vezes ao dia, com ração comercial para peixes contendo 32% de proteína.

CL₅₀-96h

O teste de concentração letal com mortalidade de 50% da população (CL₅₀) foi realizado em sistema de água estático e com restrição alimentar (ABNT, 2006) com os animais mantidos sob restrição alimentar, que se iniciou 24h antes do início e perdurou durante todo o teste. Foram utilizadas três repetições com cinco peixes cada, para cada concentração de Roundup™ (Monsanto, 2010) adotada, sendo os grupos assim estabelecidos: controle, 3, 6, 12, 24 e 48 mg.L⁻¹ de glifosato. As concentrações foram distribuídas em recipientes plásticos com 1,5L de água dos próprios aquários. O Roundup™ foi usado do próprio frasco, e a observação da toxicidade foi do potencial tóxico total do agroquímico e não apenas do princípio ativo.

Para este teste, foram utilizados 90 lambaris machos, adultos, em atividade reprodutiva, com aproximadamente 4cm de comprimento padrão.

Foram realizadas verificações de mortalidade a cada seis horas até 96 horas, removendo-se os animais mortos. Para acompanhamento da temperatura, foi adicionado 1,5L de água do mesmo aquário em um recipiente idêntico ao adotado no teste, de forma que qualquer variação de temperatura pudesse ser acompanhada sem provocar estresse adicional a qualquer grupo. O início do teste foi dia 11/05/2009 às 12:00 horas, com término às 12:00 horas no dia 15/05/2009.

O programa utilizado para determinar a CL₅₀ foi o TOXCALC, com o cálculo de determinação binomial reduzindo o intervalo de confiança por média móvel (P<0,05).

Teste de toxicidade aguda (96h)

O teste de toxicidade aguda com o Roundup™ foi realizado no período de 15 a 19/06/2009, em aquários de 50L, sob os mesmos cuidados da aclimação, baseando-se nas normas técnicas para teste em sistema estático (ABNT, 2006).

Os grupos experimentais foram constituídos por grupo controle e grupos expostos ao Roundup™. O grupo controle formado por duas repetições, cada uma com 10 peixes, totalizando 20 animais. Com relação aos grupos expostos ao Roundup™, foram utilizadas três concentrações (1,3; 2,6 e 5,2 mg.L⁻¹) com três repetições cada, totalizando 30 peixes por concentração. Ao todo, foram utilizados 110 peixes na exposição aguda em sistema estático.

Durante a realização do teste, nas duas primeiras horas após os peixes terem sido colocados nos aquários com o tóxico, os mesmos foram observados para avaliar seu comportamento. A cada verificação de temperatura da água dos aquários, também se observou o comportamento dos animais. As mesmas observações foram realizadas a cada seis horas durante o teste de determinação da CL₅₀.

Após as 96h, foram coletados seis peixes por de cada aquário e obtidos dados biométricos de peso corporal, comprimento total e comprimento-padrão (Tabela 1). As medidas de comprimento, em centímetros, foram obtidas com auxílio de paquímetro, e o peso corporal, em gramas, determinado em balança de precisão com sensibilidade de 0,01g.

Tabela 1: Valores médios de peso corporal, comprimento total e comprimento padrão de *A. bimaculatus* em cada grupo experimental.

Tratamento	n	Peso corporal (g)	Comprimento total (cm)	Comprimento padrão (cm)
Controle	12	4,6 ±1,0a	7,1 ±0,6a	5,8 ±0,5a
1,3mg.L ⁻¹	18	4,7 ±1,1a	7,0 ±0,7a	5,8 ±0,6a
2,6mg.L ⁻¹	18	4,9 ±1,3a	7,3 ±0,7a	6,0 ±0,5a
5,2mg.L ⁻¹	18	3,6 ±1,9a	6,3 ±1,2a	5,2 ±0,9a

Valores expressos como média ± desvio padrão.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P<0,05).

Análise de água

No início do teste foi coletada uma amostra da água, e ao término, foi coletado um *pool* do grupo controle e de cada concentração em separado, a fim de monitorar as condições físicoquímicas da água em que o experimento foi conduzido. Os parâmetros aferidos com o método analítico padrão (Eaton et al., 2005) foram pH, para monitorar a acidez que influencia o estado de brânquias e toxicidade total; cor aparente, que indica a quantidade de

sólidos dissolvidos; turbidez (unidades nefelométricas de turbidez - NTU), que indica a quantidade de sólidos totais em suspensão na água; cloro molecular ($\text{Cl}_{2\text{aq}}$), para garantir que o uso da água tratada para consumo humano não provocasse um efeito oxidante; cloretos (Cl^-_{aq}), para determinar a salinidade da água; nitrato ($\text{NO}^{3-}_{\text{aq}}$), oxigênio dissolvido (OD) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) para controle da toxicidade proveniente da degradação da matéria orgânica presente na água e partição do agroquímico; e dureza (total, Ca^{2+} e Mg^{2+}), para verificar interferência ou não do biofiltro. A temperatura da água foi aferida duas vezes ao dia ao longo do período experimental.

Por se tratar de um sistema estático, não foram realizadas limpeza e troca de água dos aquários durante o período experimental (96h), a fim de conservar as concentrações do tóxico na água.

A alimentação foi suspensa 24h antes do início do experimento e perdurou durante todo o teste. A restrição alimentar visou minimizar o acúmulo de matéria orgânica que poderia interferir na partição do agroquímico.

Procedimentos para estudo histológico

Os animais foram anestesiados em solução de benzocaína 1:10000 com posterior aprofundamento do plano anestésico até a eutanásia, após o que foi realizada secção na transição cabeça-tronco. Na sequência, foi realizada incisão longitudinal ventral da parede celomática para a coleta dos testículos, observando-se os devidos cuidados para evitar danos mecânicos ao tecido.

Os testículos foram fixados em paraformaldeído com tampão fosfato 0,1M e pH 7,2 durante 24h. Em seguida, foram lavados e mantidos em álcool 70% para preservação e posterior processamento.

A desidratação foi realizada em álcool absoluto por quatro horas, seguindo-se para solução álcool absoluto/resina 1:1 por 12h, e resina pura por 24h. O material foi emblocado com resina glicolmetacrilato (Historesina Leica®) em moldes plásticos, que foram mantidos em estufa a 58°C por 48h.

Os fragmentos foram seccionados em micrótomo rotativo Reichert Jung 2045 utilizando-se navalhas de vidro. Foram obtidos cortes com 3µm

de espessura no sistema semiseriado 1:5, baseando-se no diâmetro nuclear previamente estabelecido para cada linhagem de células espermatogênicas em peixes.

As secções histológicas foram utilizadas para descrição das características morfológicas e análises morfométricas no grupo controle e nos grupos tratados, segundo Matta et al. (2002). As colorações utilizadas para análises histológicas e morfométricas foram hematoxilina-eosina e azul de toluidina com borato de sódio pH 6,5. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck®), analisadas em microscópio de luz Olympus CX40, e as imagens foram obtidas em câmera digital CANON A580 zoom de 4X.

Foram realizadas mensurações do diâmetro de seis núcleos de espermatogônias A e B, de seis núcleos de espermatócitos I e II, de seis túbulos seminíferos, e de seis cistos de espermatócitos I e II para cada animal. As medidas foram analisadas por meio do programa Image-ProPlus 4.5, traçando-se duas linhas perpendiculares respeitando-se os limites do túbulo, do cisto ou do núcleo da célula em questão, conforme figura 1. Desta forma, foram obtidos dois diâmetros, a partir dos quais se calculou o diâmetro médio de cada túbulo, cisto ou núcleo de célula. O diâmetro médio desses parâmetros para o grupo controle e para cada concentração foi calculado a partir do somatório dos valores individuais da variável para cada animal. Também foram realizadas contagens de núcleos de espermatogônias A e B e de espermatócitos I e II em dez campos aleatórios por lâmina, para cada animal, em seis animais por tratamento, utilizando-se retículo micrométrico com 1mm² de área.

Para análises morfológicas foram consideradas, aleatoriamente, seis lâminas por grupo (seis animais). Essas lâminas foram examinadas em toda sua extensão em busca de alterações histopatológicas representativas da ação do Roundup™ no tecido testicular, sempre comparando estas alterações com o padrão de organização dos testículos das lâminas do grupo controle e com descrições da literatura.

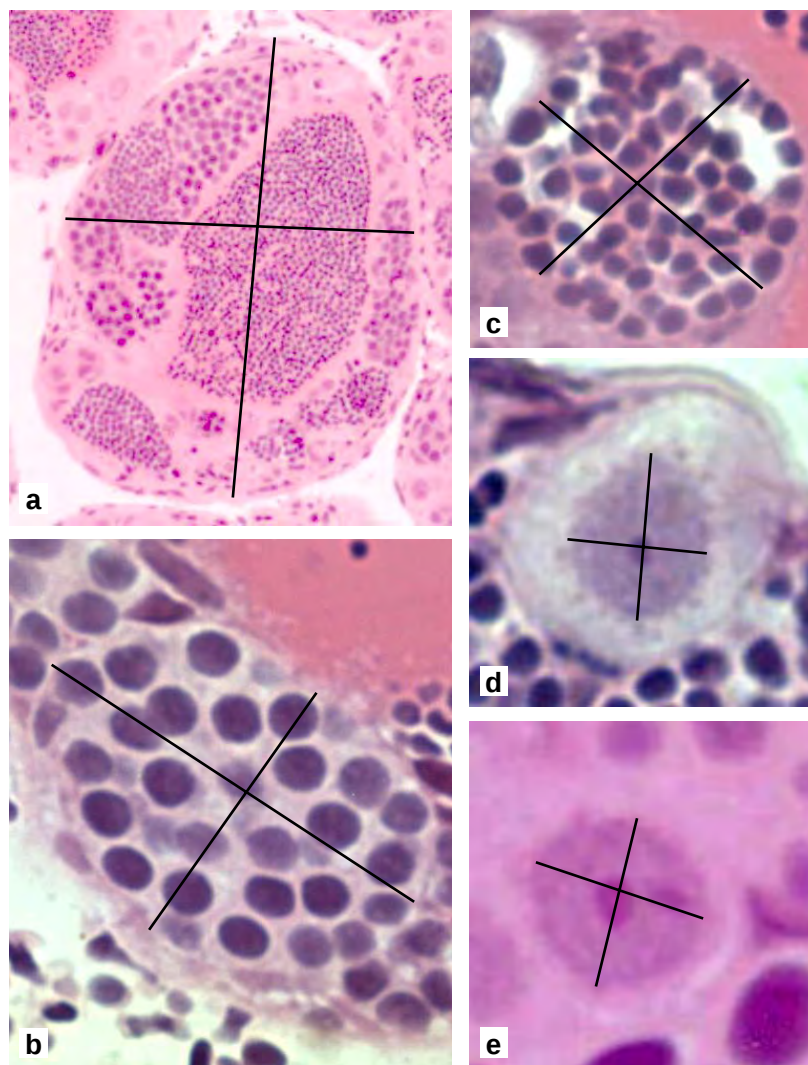


Figura 1: Morfometria tubular, dos cistos de espermatócitos e dos núcleos espermatogônias. a. Diâmetro de túbulos seminíferos; b. Diâmetro de cistos de espermatócitos I; c. Diâmetro de cistos de espermatócitos II; d. Diâmetro do núcleo de espermatogônia A; e. Diâmetro do núcleo de espermatogônia B. a. 100X, b,c,d,e. 400X. HE.

Eletroforese e dosagem de proteínas totais

Foi coletado um conjunto amostral de fígados de 12 lambaris expostos por 96h às concentrações de 1,3; 2,6 e 5,2 mg.L⁻¹ de Roundup™, além do grupo controle. Esses órgãos foram congelados imediatamente após a coleta, e transportados em gelo para análises no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia/ UNICAMP.

Os fígados foram submetidos a uma solução extratora contendo 0,1g de fígado em 1mL de Triton X-100 1%, glicerol 5%, PBS 0,1M pH 7,2, homogeneizados em homogenizador de Doucen e, posteriormente, centrifugados a 7200rpm/10min (protocolo adaptado de Szczesna-Skorupa e

Kemper, 1991; Ding e Conn, 1991; McManus e McKinnon, 1991). O sobrenadante foi separado e o precipitado congelado.

Para realização da dosagem de proteínas totais foi utilizado o micrométodo Bradford a 590nm de absorbância, utilizando-se 3µL do sobrenadante por amostra e refazendo a curva padrão de análise.

As amostras da eletroforese foram preparadas por precipitação do sobrenadante por choque etanólico, ressuspenso em tampão de corrida, aquecido a 100°C por cinco minutos. Foram padronizados slots com 50µg.g⁻¹ de proteína e outra com 15µL de sobrenadante. A corrida do gel de eletroforese foi padronizada com corrente de 300mA em gel SDS-Page com concentração crescente de 4 a 16% de poliacrilamida. Os padrões de referência utilizados foram um padrão de baixo peso molecular, e outro com proteína purificada do soro bovino (BSA).

Análises estatísticas

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de normalidade (Lilliefors) e homocedasticidade (Cochran e Bartlett), e posteriormente a análise de variância. Quando apresentaram significância, foi realizado o teste de Duncan. Quando não atenderam as premissas de normalidade e homocedasticidade, mesmo após transformações apropriadas, os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (SAS,1985). As variáveis de experimentos com 1 grau de liberdade foram comparadas pelo teste F, adotando-se o nível de 5% de probabilidade. Quando não atenderam as premissas de normalidade e homocedasticidade, mesmo após as transformações apropriadas, os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Wilcoxon (SAS, 1985).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise comportamental

Durante a exposição dos peixes ao Roundup™ foi observado comportamento anormal nos peixes, caracterizado por nado errático, tentativa de fuga dos aquários, busca de oxigênio na superfície e demonstração de agressividade com os demais peixes. Apesar de presente

em todas as concentrações, houve maior intensidade e frequência na concentração de 5,2mg.L⁻¹. Esse comportamento também foi observado durante a realização do teste para determinação da CL₅₀, com observação de maior intensidade e frequência nas concentrações de 48 e 96 mg.L⁻¹.

CL₅₀-96h

O teste demonstrou que a concentração de 48mg.L⁻¹ de Roundup™ foi suficiente para levar à morte todos os lambaris em apenas 36 horas. Na concentração de 24mg.L⁻¹, a mortalidade foi de 60% em 96h, enquanto concentrações iguais ou inferiores a 12mg.L⁻¹ apresentaram mortalidades inferiores a 33,3%.

A CL₅₀ calculada nesse teste foi de 14,0mg.L⁻¹, e o intervalo de confiança obtido pela média móvel foi de 9,3 a 22,6 mg.L⁻¹ (P<0,05). Segundo Folmar et al. (1979), a CL₅₀ para truta arco-íris (*Salmo gairdnerii*) é de 140mg.L⁻¹, enquanto para *Pimephales promelas* foi de apenas 2,3mg.L⁻¹. Segundo a EXTOKNET (2009), a CL₅₀ do bluegill *Lepomis macrochirus* é de 120mg.L⁻¹. Jiraungkoorskul et al. (2002) encontraram valores de CL₅₀ de 16,8 ppm e 36,8 ppm de Roundup™ para tilápia nilótica jovem e adulta, respectivamente, com 96 horas de exposição. A toxicidade aguda (CL₅₀) do Roundup™ em peixes varia de 3,2 - 52 ppm (Mitchell et al., 1987). Esses valores confirmam que o intervalo de confiança encontra-se em conformidade com a literatura e respaldam a CL₅₀ de 14,0mg.L⁻¹ encontrada para o lambari *Astyanax bimaculatus*. Destaca-se, nesse experimento, a remoção dos peixes mortos de seis em seis horas, proporcionando menores interferências pela decomposição dos mesmos, e que a mortalidade foi função do potencial tóxico total do Roundup™. Este é 30 vezes mais tóxico para os peixes do que o glifosato propriamente dito (Servizi et al., 1987) devido à presença do surfactante na formulação.

A mortalidade do grupo controle foi inferior a 20%, dentro do limite máximo aceito pela norma vigente para realização do teste de toxicidade aguda em sistema de água estático, validando os dados (ABNT, 2006).

A temperatura da água variou entre 20,5°C e 23,0°C, sendo a menor temperatura registrada no horário de 66h, e a maior nos horários seis e 30h. A média de temperatura das dezessete aferições apresentou o valor de 21,4

$\pm 0,73^{\circ}\text{C}$. A toxicidade do Roundup™ aumenta com a temperatura da água e, segundo observações com truta arco-íris e bluegill, a toxicidade quase dobrou entre 7°C e 17°C (Folmar et al., 1979). A temperatura observada no presente experimento apresentou baixa oscilação. Há, ainda, indicações que a temperatura interfere na concentração de oxigênio dissolvido, pois quanto maior a temperatura menor o teor de oxigênio dissolvido (Folmar et al., 1979).

O *Astyanax bimaculatus* é um complexo de espécies de ampla distribuição geográfica nas Américas do Sul e Central, capazes de sobreviver as alterações ambientais nas construções de novas barragens (Paiva et al., 2006), o que aumenta o potencial de uso do lambari como bioindicador da qualidade da água na detecção de intoxicações agudas e de níveis elevados de Roundup™ nos córregos e rios brasileiros.

Ressalta-se a importância na avaliação do efeito do Roundup™ e de outros produtos formulados versus o glifosato puro, tendo em vista o grande número de marcas comerciais (mais de 90) encontrados no mercado mundial à base desse ingrediente ativo (Heap, 1997).

Análise de água

Os parâmetros indicadores da qualidade da água utilizada para realização do experimento foram aferidos para garantir que estas alterações não ocasionassem a mortalidade ou mesmo um aumento na toxicidade do produto sobre os testículos.

As tabelas 2 e 3 mostram que todos os parâmetros mensurados encontraram-se em conformidade com as condições de cultivo e criação de peixes tropicais em geral (Huet, 1983), bem como com a resolução nº 357 do CONAMA (2005).

A escolha do uso de água tratada para consumo humano, livre de cloro, mantida em caixa d'água de 1000L mostrou-se adequada, minimizou o risco de resíduos, contaminações cruzadas e demais interferências nos parâmetros aferidos; a manutenção da água durante 10 dias, com aeração contínua, antes da aclimação dos animais nos aquários visou minimizar o estresse dos animais, controlar a temperatura, reduzir o cloro molecular e estabilizar os demais parâmetros físicoquímicos.

Tabela 2: Parâmetros físicoquímicos de qualidade da água utilizada.

Análise \ Amostras	Início	Fim			
		controle	1,3mg.L ⁻¹	2,6mg.L ⁻¹	5,2mg.L ⁻¹
pH	6,6	6,7	6,8	6,7	7,0
Cor Aparente	0	0	5	10	10
Turbidez (NTU)	0,72	0,74	0,98	1,24	1,80
O ₂ aq (mg.L ⁻¹)	7,5	8,1	8,0	8,2	7,9
DBO (mg.L ⁻¹)	1,2	0,5	1,2	1,2	1,2
Cl ₂ (mg.L ⁻¹)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cl ⁻ (mg.L ⁻¹)	8,1	9,4	8,5	11,9	8,5
NO ₃ ⁻ (mg.L ⁻¹)	3,1	4,3	3,9	3,5	1,7
Dureza Total (CaCO ₃ mg.L ⁻¹)	24,2	32,3	28,2	25,2	26,2
Dureza Ca ²⁺ (mg.L ⁻¹)	14,5	19,3	16,9	15,1	15,7
Dureza Mg ²⁺ (mg.L ⁻¹)	9,7	13	11,3	10,1	10,5

Os valores de oxigênio dissolvido permaneceram altos do início ao fim do experimento, bem como os valores de demanda bioquímica de oxigênio ficaram abaixo do limite de detecção (2,0mg.L⁻¹) do método (Eaton et al., 2005), garantindo com isso oxigênio disponível para os peixes ao longo do experimento. Esse valor de oxigênio dissolvido mostra que o comportamento dos peixes em buscarem oxigênio na superfície do aquário se deve à ação tóxica do produto sobre os animais.

Tabela 3: Valores médios das temperaturas dos aquários.

Aquários	Temperatura média (°C)	Média do grupo (°C)
Controle A	25,8 ±1,0	26,1 ±1,3
Controle B	26,4 ±1,6	
1,3mg.L ⁻¹ A	26,3 ±0,3	
1,3mg.L ⁻¹ B	26,1 ±0,7	26,6 ±1,7
1,3mg.L ⁻¹ C	27,4 ±2,7	
2,6mg.L ⁻¹ A	25,9 ±0,4	
2,6mg.L ⁻¹ B	26,4 ±1,8	26,3 ±1,2
2,6mg.L ⁻¹ C	26,6 ±0,8	
5,2mg.L ⁻¹ A	24,6 ±2,5	
5,2mg.L ⁻¹ B	25,9 ±2,0	25,6 ±2,1
5,2mg.L ⁻¹ C	26,3 ±1,6	

Valores expressos como média ± desvio padrão.

Letras indicam os aquários dentro de cada repetição.

Os valores da temperatura aferida ficaram entre os desejados para o cultivo e criação de peixes tropicais, que varia entre 24,0 a 28,0°C (Huet, 1983; Kubitza, 2000), propiciando o estudo da resposta ao agroquímico em condições ideais nesse parâmetro.

Dados biométricos

A tabela 1 mostra as médias de peso, comprimento total e padrão de cada grupo experimental, em cada uma das três repetições para cada concentração do agroquímico. Não se observou diferença estatística ($P>0,05$) para nenhuma das variáveis.

Considerando que dentro da mesma espécie, peixes menores apresentam menor resistência ao Roundup™ quando comparados com peixes maiores (Teles, 2006; Santos, 2009), foram coletados parâmetros biométricos de cada animal buscando-se formar lotes de tamanhos homogêneos para a composição dos grupos, evitando-se assim que a ação do tóxico sofresse interferência deste fator, garantindo-se também que todos os animais estivessem em estado de maturação reprodutiva.

Análises morfológicas dos testículos

As análises histológicas mostraram alterações morfológicas quando comparadas ao grupo controle. Foram observadas destruição da albugínea, desorganização tecidual caracterizada pela presença de espermátides no parênquima testicular, presença de espermatócitos na luz do túbulo, presença de hemácias fora dos capilares sanguíneos, presença de vacúolos no citoplasma celular e fibrose no tecido intersticial (Figuras 2 e 3).

A descontinuidade ou falta de albugínea pode estar relacionada a alguma agressão mecânica ou morte celular. A degeneração das células da albugínea está relacionada com a necrose tecidual ocorrida em várias áreas do testículo, à semelhança do observado por Montoya (2008) quando analisou o testículo de tilápia juvenil sob o efeito do inseticida organoclorado Thiodan®. A hemorragia encontrada em várias áreas do tecido intersticial e em cistos de espermatócitos pode ter ocorrido devido ao aumento da pressão no interior dos vasos sanguíneos, o que causou o rompimento do endotélio vascular e extravasamento sanguíneo. Os vacúolos observados

nas espermatogônias podem representar degeneração hidrópica e, portanto, necrose. Houve aumento de células com vacuolizações, que, em estágio mais avançado, podem se tornar células necróticas. Nos peixes que não foram expostos ao agroquímico, a vacuolização foi considerada baixa em relação aos animais que foram expostos.

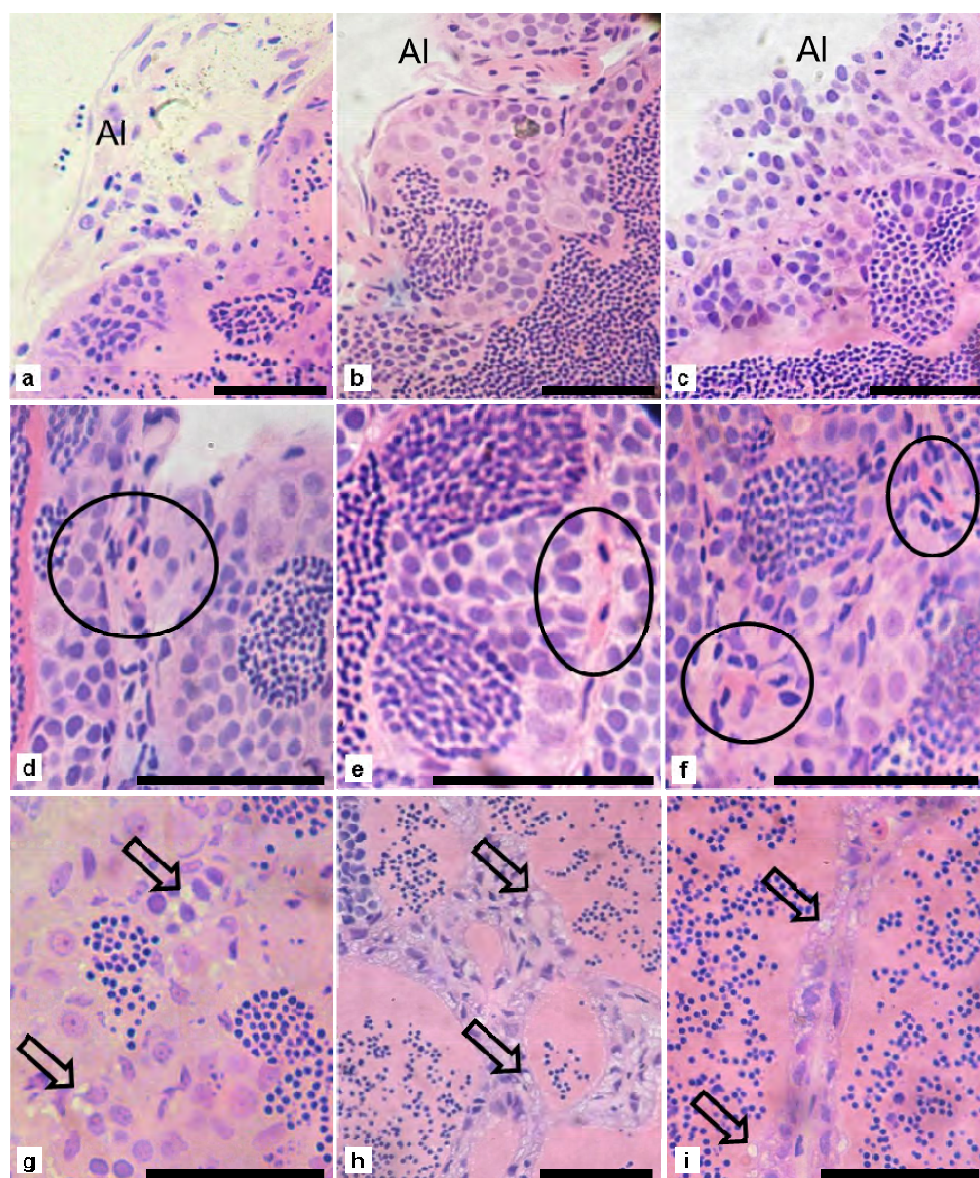


Figura 2: Alterações histológicas no arranjo testicular de peixes expostos ao Roundup™. a, b, c. Destruição da albugínea (Alb); d, e, f. Presença de hemácias fora dos capilares sanguíneos (círculo); g, h, i. Presença de vacúolos no citoplasma celular (setas); a, d, g. Concentração $1,3\text{mg.L}^{-1}$; b, e, h. Concentração $2,6\text{mg.L}^{-1}$; c, f, h. Concentração $5,2\text{mg.L}^{-1}$. HE. Barra: $50\mu\text{m}$.

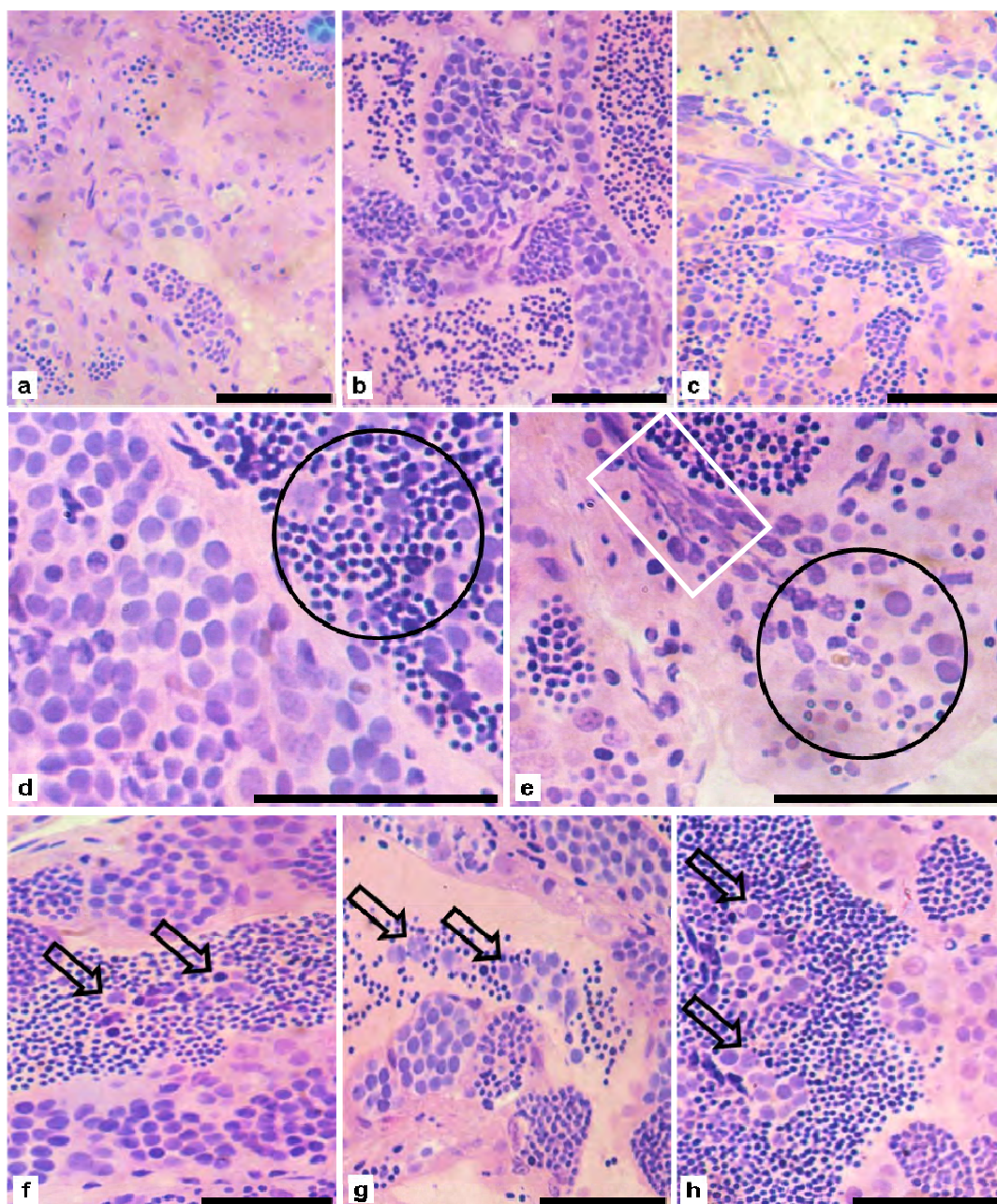


Figura 3: Alterações histológicas no arranjo testicular de peixes expostos ao Roundup™. a, b, c. Desorganização tecidual generalizada; d, e. Presença de espermátides no parênquima testicular (círculo), e fibrose (retângulo branco); f, g, h. Presença de espermátócitos na luz do túbulo seminífero (setas); a, d, f. concentração $1,3\text{mg.L}^{-1}$; b, g. concentração $2,6\text{mg.L}^{-1}$; c, e, h. concentração $5,2\text{ mg.L}^{-1}$. HE. Barra: $50\mu\text{m}$.

A desorganização tecidual do testículo pode promover uma redução na funcionalidade e interferir na ação dos hormônios nas células alvo, como nos estudos realizados por Dutta e Arends (2003) e Dutta et al. (2006). Além disso, os autores também acreditam que a espermiacção também pode ser comprometida. Espermatozóides encontrados fora da luz tubular podem ser indicativos de rompimento do túbulo seminífero, assim como espermátócitos encontrados na luz tubular também podem ser indicativos de

rompimento de cistos. Santos (2009) observa o mesmo ao analisar a toxicidade aguda do zinco também em *A. bimaculatus*.

As exposições a substâncias tóxicas em diferentes fases do ciclo de vida têm como características gerais, relacionadas ao aparelho reprodutor, o retardamento de fases de desenvolvimento e da maturação gonadal, a redução no número e viabilidade de gametas, histopatologias e a redução do número e viabilidade de descendentes (Rand e Petrocelli, 1985; Adams, 1990).

No estudo realizado por Wester e Canton (1986), citado por Hinton e Laurén (1990) sobre a diferenciação gonadal do killifish japonês (*Oryzias latipes*), com amostras contaminadas com concentrações subletais do inseticida lindano, foi constatada a ocorrência de alterações morfológicas severas (células espessadas, massas celulares sólidas em formas arredondadas ou alongadas, e células de forma triangular).

Porém, Dutta et al. (2006) pesquisando o efeito dos poluentes na reprodução dos peixes, relataram a interrupção da fase de proliferação na espermatogênese do bluegill (*Lepomis macrochirus*) após exposição aguda ao diazinon, inseticida organofosforado. As observações destacadas nesse experimento sugerem que a espermatogênese foi atrasada e teve seu rendimento reduzido, não havendo, entretanto, interrupção da mesma.

No estudo com zinco realizado por Santos (2009), foi observada correlação positiva entre a concentração de zinco e o aumento na ruptura e no deslocamento de cistos causando retração na parede dos túbulos seminíferos, o que não foi verificado em animais do grupo controle, resultado que corrobora a observação deste estudo.

Análises morfométricas dos testículos

Para as análises morfométricas foram avaliados diâmetros médios de túbulos seminíferos, de cistos de espermatócitos I e II, de núcleos de espermatócitos I e II, e de núcleos de espermatogônias A e B (Tabela 4).

Tabela 4: Diâmetro médio (μm) de túbulos seminíferos, cistos e núcleos de espermatócitos (Spc) I e II, núcleos de espermatogônias (Spg) A e B de *A. bimaculatus* dos grupos controle e expostos ao Roundup™.

Tratamento	Controle	1,3mg.L ⁻¹	2,6mg.L ⁻¹	5,2mg.L ⁻¹
N	36	36	36	36
Túbulos seminíferos	168,0 $\pm$ 28,3a	162,0 $\pm$ 20,8a	167,0 $\pm$ 30,6a	161,5 $\pm$ 20,6a
Cistos Spc I	35,2 $\pm$ 2,8a	32,4 $\pm$ 2,9a	29,2 $\pm$ 4,4a	31,6 $\pm$ 3,5a
Cistos Spc II	30,0 $\pm$ 4,0a	25,9 $\pm$ 3,8a	25,1 $\pm$ 2,0a	27,6 $\pm$ 3,0a
Spc I	4,2 $\pm$ 0,5a	4,2 $\pm$ 0,5a	4,2 $\pm$ 0,6a	4,1 $\pm$ 0,4a
Spc II	3,8 $\pm$ 0,8ab	3,2 $\pm$ 0,5c	3,4 $\pm$ 0,9bc	4,0 $\pm$ 0,9a
Spg A	6,5 $\pm$ 0,5a	6,7 $\pm$ 0,8a	6,8 $\pm$ 0,6a	6,8 $\pm$ 0,4a
Spg B	6,1 $\pm$ 0,4a	5,8 $\pm$ 0,4a	5,9 $\pm$ 0,6a	5,5 $\pm$ 0,8a

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Diferenças estatísticas ($P < 0,05$) foram observadas somente para o diâmetro de núcleos de espermatócitos II entre os diferentes grupos, inferindo que o Roundup™ não interferiu nos demais parâmetros. A medida do diâmetro apresentou o menor valor na concentração 1,3mg.L⁻¹; porém, este valor foi estatisticamente igual à concentração 2,6mg.L⁻¹ ($P > 0,05$).

Também foram realizadas contagens de núcleos de espermatócitos I e II, e de núcleos de espermatogônias A e B, conforme tabela 5.

Tabela 5: Número médio de núcleos de espermatócitos (Spc) I e II, e de espermatogônias (Spg) A e B por unidade de área testicular (1mm²) de *A. bimaculatus* dos grupos controle e expostos ao Roundup™.

Tratamento	Controle	1,3mg.L ⁻¹	2,6mg.L ⁻¹	5,2mg.L ⁻¹
N	60	60	60	60
Spc I	31,1 $\pm$ 13,4a	39,0 $\pm$ 13,5a	39,2 $\pm$ 11,0a	42,9 $\pm$ 10,9a
Spc II	14,2 $\pm$ 4,9a	16,9 $\pm$ 9,6a	19,0 $\pm$ 9,3a	18,5 $\pm$ 5,8a
Spg A	4,2 $\pm$ 2,0a	5,7 $\pm$ 1,9a	6,6 $\pm$ 2,0a	4,6 $\pm$ 2,6a
Spg B	11,5 $\pm$ 3,6a	14,5 $\pm$ 3,0b	15,6 $\pm$ 2,3b	13,4 $\pm$ 4,7ab

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Observou-se aumento no número de espermatogônias B nos grupos expostos ao tóxico quando comparado ao grupo controle; porém, o grupo com a maior concentração (5,2mg.L⁻¹) foi estatisticamente semelhante ao grupo controle.

Para que o peixe mantenha o número de espermatócitos esperados para sua espécie, o testículo precisa manter sua função hormonal (Matta, 2000). Os resultados do presente estudo mostram que o Roundup™ não alterou o número de espermatócitos I e II. Ao analisar os resultados obtidos na morfometria em conjunto com os resultados obtidos na morfologia é possível perceber que as contagens e medições indicam menor prejuízo ao arranjo testicular que as alterações morfológicas sugerem. Teles (2006) indica que, por meio de mecanismos de resposta fisiológica encontrados no fígado, os peixes podem minimizar impactos tóxicos da ação de praguicidas. Para verificar se o mesmo ocorre com *A. bimaculatus*, são necessários estudos que busquem esclarecer se há ou não correlação entre as respostas hepáticas e as alterações encontradas no testículo.

Eletroforese e dosagem de proteínas totais

A absorbância da leitura de todas as amostras encontrava-se dentro da curva-padrão, com concentrações crescentes do controle para a maior concentração. Esse aumento pode ser devido à maior expressão na produção de proteínas ou a maior extração devido a uma possível desestruturação do tecido hepático nos grupos tratados (Tabela 6).

Tabela 6: Dosagem de proteínas totais de extratos de fígado de *A. bimaculatus* dos grupos controle e expostos ao Roundup™.

Tratamento	Controle	1,3mg.L ⁻¹	2,6 mg.L ⁻¹	5,2 mg.L ⁻¹
Concentração (µg. µL ⁻¹)	2,6	2,9	2,9	3,5

O gel de eletroforese (Figura 4) mostra repetição de todas as bandas protéicas, e sugere que as proteínas dosadas que tiveram concentração variável e crescente. As proteínas de resposta fisiológica a xenobióticos (citocromo P-450, EROD, E₂, entre outras) citadas por Teles (2006), necessitam de métodos específicos de dosagem, por não serem retidas pelo gel de poliacrilamida.

A coluna 1 apresenta bandas do padrão de BSA (67KDa) e bandas de baixos pesos moleculares previamente conhecidos (14,1 a 94 KDa).

As colunas 2, 3, 4 e 5 apresentam bandas de proteínas do grupo controle e das concentrações 1,3, 2,6 e 5,2 mg.L⁻¹, respectivamente, com aplicação de 15µL de extrato por slot.

As colunas 6, 7, 8 e 9 apresentam bandas de proteínas do grupo controle e das concentrações 1,3, 2,6 e 5,2 mg.L⁻¹, respectivamente, com aplicação de 50µg.g⁻¹ de proteína do extrato por slots.

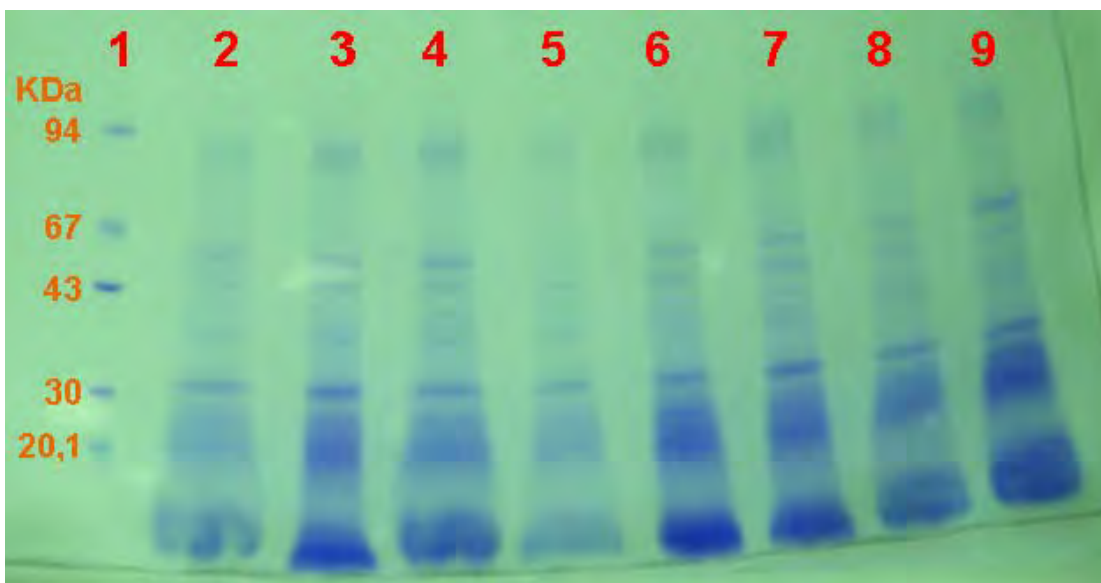


Figura 4: Gel SDS-Page 4-16% com extratos de fígados de *A. bimaculatus* do grupo controle e dos grupos expostos ao Roundup™.

Na corrida do grupo controle (colunas 2 e 6) as proteínas apresentaram peso molecular em ordem decrescente, de aproximadamente 80, 62, 58, 43, 37, 30, 20, 20, e 15 KDa. Todas as proteínas foram expressas em todas as concentrações, exceto pela proteína de peso 58KDa que sofreu redução de sua expressão na maior concentração de Roundup™. A dosagem dessas proteínas de resposta e mais repetições para fins estatísticos são importantes para maiores discussões sobre estes resultados, bem como mais estudos sobre a natureza e composição da proteína de peso 58KDa, pelo fato apresentar modificação na sua expressão.

CONCLUSÕES

A CL_{50-96h} do Roundup™ para lambaris *A. bimaculatus* foi de 14mg.L⁻¹ com intervalo de confiança de 9,3 a 22,6 mg.L⁻¹, classificando o lambari como uma espécie sensível ao produto, o que permite utilizá-lo como um bioindicador da qualidade da água na detecção de contaminações e de níveis elevados de Roundup™ nos córregos e rios brasileiros.

O agroquímico mostrou ação tóxica mesmo na menor concentração (1,3mg.L⁻¹), causando alterações histológicas e morfométricas nos testículos, podendo ser utilizados como biomarcadores de poluição aquática.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS). **NBR 15088 – Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes**. 2. ed. ABNT: versão corrigida 31/03/2006, 19p, 2006.

ADAMS, S. M. **Biological indicators of stress in fish**. American Fisheries Society Symposium 8. 190p, 1990.

BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do estado de São Paulo: sistemática. In: Comissão Inter Estadual da Bacia Paraná-Uruguaí. **Poluição e piscicultura**. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca, p.79-108, 1972.

CEMIG/CETEC - COMPANHIA ENERGETICA DE MINAS GERAIS, FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Guia ilustrativo de peixes do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG. 144p, 2000.

CONAMA. 2005. Resolução n.357 de 17 de março de 2005. <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> Acesso em julho de 2010.

DEFALCO, T; CAPEL, B. Gonad Morphogenesis in Vertebrates: Divergent Means to a Convergent End. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. v.25, p.457-482, 2009.

DING, X.; COON, M. J. Purification and characterization of cytochromes P450 in rabbit nasal microsomes. **Methods in Enzymology**. v.206, p.603-612, 1991.

DUTTA, H. M.; ARENDS, D. A. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. **Environmental Research**. v.91, p.157-162, 2003.

DUTTA, H. M.; MISQUITA, D.; KHAN, S. The effects of endosulfan on the testes of bluegill fish, *Lepomis macrochirus*: a histopathological study. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v.51, p.149-56, 2006.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; RICE, E. W.; GREENBERG, A. E. **Standard methods for the examination of water e wastewater**. 21. ed Maryland: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. 1082p, 2005.

EXTOXNET - **The Extention Toxicology Network** 5/94. <<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/dienochlor-glyphosate/index.html>> Acesso em maio de 2009.

FOLMAR, L. C.; SANDERS, H. O.; JULIN, A. M. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. **Archives of Environmental Contaminantion and Toxicology**. v.8, p.269-278, 1979.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; CRESTANI, M.; FONSECA, M. B.; PEDRON, F. A.; DUARTE, M. F.; VIEIRA, V. L. P. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.65, n.2, p.237-241, 2006.

HEAP, I. M. The occurrence of herbicide resistant weeds world wide. **Pesticides Science**. v.51, n.2, p.235-243, 1997.

HERNANDEZ, A.; GARCIA-PLAZAOLA, J. I.; BACERRIL, J. M. Glyphosate effects on phenolic metabolismo f nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). **Journal of Agricultural Food and Chemistry**. v.47, p.2920-2925, 1999.

HINTON, D. E.; LAURÉN, D. J. Interactive histopatological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. In: ADAMS, S. M. **Biological indicators of stress in fish**. American Fisheries Society Symposium 8, 1990.

HUET, M. **Tratado de piscicultura**. Madri: Mundi Prensa, 788p, 1983.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. 1. ed. Jundiaí: Acqua Supre. 285p, 2000.

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

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; PEZZI DA SILVA, J. F.; VARI, R. P.; HAROLD, H.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. Genera Incertae Sedis in Characidae. p. 106-169, 2003. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C. J. (eds) **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS. 729p, 2003.

MATTA, S. L. P.; VILELA, D. A. R.; GODINHO, H. P.; FRANÇA, L. R. The goitrogen 6-*n*-Propyl-2-Thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: The tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Endocrinology**. v.143, n. 3, p.970–978, 2002.

McMANUS, M. E.; MCKINNON, R. A. Measurement of cytochrome P450 activation of xenobiotics using the ames *Salmonella* test. **Methods in Enzymology**. v.206, p.501-509, 1991.

MITCHELL, D. G.; CHAPMAN, P. M.; LONG, T. J. Acute toxicity of Roundup and Rodeo herbicides to rainbow trout, chinook, and coho salmon. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v.39, p.1028-1035, 1987.

MONSANTO. 2010. Site Monsanto. Glyphosate factsheet. <<http://www.monsanto.com.br/produtos/herbicidas/roundup/roundup-original/roundup-original.asp>> Acesso em julho de 2010.

MONTOYA, L. N. F. **Efeitos do endossulfan sobre a morfologia do testículo de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) imatura**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 76p. 2008.

NOMURA, H. Fecundidade, maturação sexual e índice gônado-somático de lambari do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (Osteichthyes, Characidae), relacionados com fatores ambientais. **Revista Brasileira de Biologia**. v.35, n.4, p.775-798, 1975.

PAIVA, S. R.; DERGAM, J. A.; MACHADO, F. Determining management units in southeastern Brazil: the case of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei: Ostariophysi: Characidae). **Hydrobiologia**. v.560, p.393-404, 2006.

PELIZARO, M. G.; LEME DOS SANTOS, H. S.; LOPES, R. A.; CASTAGNOLI, N. Rhythm of development in the oocyte of the tambuí *Astyanax bimaculatus* (Reinhardt, 1874) (Pisces: Characidae). A morphometric and histochemical study. **Archives of Biology**. v.92, p.41-431, 1981.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. Introduction. In: RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. New York: Hemisphere. p.1-28, 1985.

SANTOS, D. C. M. **Toxidez aguda do zinco em *Lambaris Astyanax aff.bimaculatus* (Linnaeus, 1758)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 111p. 2009.

SAS INSTITUTE INC. **SAS User's Guide**. Statistics, version 5 edition, Cary, N.C., SAS Institute Inc., 1985, 956p.

SERVIZI, J. A.; GORDON, R. W.; MARTENS, D. W. Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, Daphnia, and trout. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.39, p.15-2, 1987.

SZCZESNA-SKORUPA, E.; KEMPER, B. Cell-free analysis of targeting of cytochrome P450 to microsomal membranes. **Methods in Enzymology**. v.206, p.64-75, 1991.

TELES, M. P. M. **Efeitos fisiológicos e genotóxicos induzidos por contaminantes ambientais em peixes**. Tese (Doutorado Departamento de Biologia). Universidade de Aveiro, Aveiro, 253p. 2006.

VAN OORDT, P. G. W. J.; PEUTE. J.; VAN DEN HURK, R.; VIVEN, W. J.. A. R. Annual correlative changes in gonads and pituitary gonadotrofes of feral African catfish, *Clarias gariepinus*. **Aquaculture**. v.63, p.27-41, 1987.

VITULE, J. R. S.; ARANHA, J. M. R. Ecologia alimentardo lambari, *Deuterodon langei* Travassos, 1957 (Characidae, Tetragonopterinae), de diferentes tamanhos em um riacho da Floresta Atlântica, Paraná (Brasil). **Acta Biologica Paranaense**. v.31, p.137-150, 2002.

WESTER, P. W.; CANTON, J. H. The usefulness of histopathology in aquatic toxicity studies. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.100, p.115-117, 1986.

CAPITULO 3. Efeitos do Thiodan® em *Astyanax bimaculatus*
(Characidae: Teleostei) adultos: valor de CL₅₀ e morfologia testicular

RESUMO

O uso indiscriminado de agroquímicos na agricultura moderna está desencadeando prejuízos graves para o meio ambiente que representam séria ameaça para a sobrevivência de ecossistemas importantes. Os resíduos destas substâncias presentes nas águas podem aderir ao material orgânico em suspensão, depositar no sedimento ou serem absorvidos pelos organismos. Dessa forma, peixes e invertebrados podem acumular tais compostos ligados à matéria ingerida, ser passivamente absorvidos pela superfície corporal ou durante as trocas respiratórias. Entre esses compostos encontram-se pesticidas de diferentes naturezas químicas e finalidades, como o inseticida Thiodan® (Bayer), cuja base é o endosulfan, um acaricida organoclorado classificado como altamente tóxico. Como organismo-teste selecionado como representativo de diversos níveis tróficos na cadeia alimentar, foi escolhido o lambari *Astyanax bimaculatus*. O objetivo do presente trabalho foi determinar a CL₅₀-96h e avaliar a influência desse produto na morfologia testicular de indivíduos adultos após exposição aguda por 96 horas a esse agroquímico. Para a determinação da CL₅₀ foram utilizados 90 peixes. Foram testadas seis concentrações em três repetições contendo cinco peixes cada. O teste de toxicidade aguda foi realizado em sistema estático, utilizando-se 110 peixes, sendo um grupo controle formado por duas repetições, cada uma com 10 peixes, e três concentrações de Thiodan® (1,15; 2,3 e 5,6 µg.L⁻¹) com três repetições, cada uma com 10 peixes. Após a exposição, os animais foram anestesiados para a coleta dos testículos que foram fixados, incluídos, seccionados em micrótomo para confecção de lâminas e corados para análise histológica. Os parâmetros indicadores da qualidade da água utilizada para realização do experimento encontraram-se em conformidade com as condições de cultivo e criação de peixes tropicais. A CL₅₀ calculada nesse teste foi de 17.7µg.L⁻¹. Histologicamente, observou-se destacamento da albugínea testicular, degeneração das células da albugínea, descontinuidade ou até mesmo falta

desta, hemorragia no interstício, vacuolização do citoplasma de células, desorganização tecidual com espermatozoides localizados fora da luz do túbulo seminífero, rompimento da parede de cistos, presença de ovócito no compartimento tubular, hemácias no interior de cistos de espermatócitos, e espermatócitos na luz do túbulo seminífero. Os dados morfométricos indicaram redução no diâmetro de cistos de espermatócitos II nas concentrações 1,15 e 2,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($P<0,05$), aumento no diâmetro de núcleos de espermatócitos I em todas as concentrações ($P<0,05$), redução no diâmetro do núcleo de espermatócitos II na menor concentração ($P<0,05$), aumento no núcleo de espermatogônias A nos grupos 2,3 e 5,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($P<0,05$). Além disso, foi observada redução no número de espermatócitos I nas concentrações 1,15 e 2,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($P<0,05$), aumento de espermatogônias A e B na concentração 1,15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e redução na concentração 5,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($P<0,05$). Conclui-se que o *A. bimaculatus* adulto não deve ser utilizado como bioindicador pois apresenta alta resistência a esse produto, mas os testículos podem ser usados como biomarcadores.

Palavras-chave: Lambari; endosulfan; testículo.

INTRODUÇÃO

O uso de agroquímicos pode trazer consequências indesejáveis ao ambiente. O uso de formulações menos agressivas aos organismos não alvo deve ser objetivo daqueles que utilizam essa tecnologia sem comprometer os recursos naturais que sustentam a vida no planeta. O monitoramento pode ser dificultado pela falta de indicadores nativos que informem o real impacto da utilização desses produtos.

O Thiodan[®] (Bayer, 2010) é um inseticida acaricida organoclorado, do grupo químico éster do ácido sulfuroso de um diol cíclico, recomendado para o controle de insetos chupadores e mastigadores em diversos tipos de culturas, com ação por contato e ingestão. Sua classificação toxicológica no MAPA é Classe II (altamente tóxico) e sua formulação é do tipo concentrado emulsionável. A concentração de ingrediente ativo é de 350 g.L^{-1} de endosulfan, e este é considerado perigoso, inflamável e corrosivo (Engelhardt e Sarmiento, 2004). O Thiodan[®] apresenta em sua formulação

dois isômeros, o α -endosulfan (70%) e o β -endosulfan (30%), que podem ser biotransformados em sulfato de endosulfan (Correa et al., 2001). O endosulfan não dissolve facilmente na água e adere às partículas do solo, levando anos para sua degradação (Soares et al., 2003).

Nos estudos de toxicidade, geralmente se utiliza uma população homogênea com sensibilidade definida, determinando-se a concentração do tóxico responsável pela letalidade. Testes de toxicidade podem ser realizados em diferentes sistemas de fluxo, de acordo com as necessidades dos organismos avaliados (ABNT, 2006). Para esses estudos selecionam-se organismos representativos de cada nível trófico na cadeia alimentar e, no caso da aquicultura, os peixes.

Astyanax bimaculatus até então classificado como uma das espécies da subfamília Tetragonopterinae (CEMIG/CETEC, 2000; Britski, 1972) é classificado com base em revisões recentes em “Incertae sedis” (Lima et al., 2003) na ordem Characiformes, família Characidae. A antiga subfamília Tetragonopterinae continha 88 gêneros e 620 espécies, sendo que 86 espécies pertencem ao gênero *Astyanax* (Lima et al., 2003; Paiva et al., 2006). *A. bimaculatus* é, na verdade, um complexo de espécies de ampla distribuição nas Américas do Sul e Central, e deve ser revisada para melhor organizar sua filogenia (Paiva et al., 2006). É peixe de porte pequeno, com cerca de 20cm de comprimento total e pesando 40g (Britski et al., 1988), onívoro, constituindo-se em espécie forrageira, que além de importante na pesca esportiva, também apresenta importância em diversos habitats por equilibrar o ecossistema e a cadeia alimentar. Pode ter sua biologia reprodutiva prejudicada pelo desmatamento ciliar, poluição industrial e doméstica, destruição de várzeas e lagoas marginais (CEMIG/CETEC, 2000). Esses fatores interferem na dinâmica da população desses peixes (Vitule e Aranha, 2002). Nas construções de novas barragens o *A. bimaculatus* é uma das poucas espécies capazes de sobreviver nessas condições. Por esses motivos, *A. bimaculatus* apresenta enorme potencial para se tornar um organismo modelo para estudos ecotoxicológicos (Paiva et al., 2006).

OBJETIVOS

- Determinar a concentração letal para 50% da população de *A. bimaculatus* adultos (CL₅₀) exposta ao Thiodan® durante 96h, em sistema de água estático;
- Comparar a estrutura dos testículos e a morfologia das células do processo espermatogênico de animais mantidos como controle com aqueles submetidos à ação do Thiodan® durante o período experimental para se avaliar os prováveis efeitos tóxicos desse agroquímico.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nos Departamentos de Veterinária (Laboratório de Peixes, Laboratório de Técnicas Histológicas e Laboratório de Histopatologia) e de Biologia Geral (Laboratório de Biologia Estrutural), da Universidade Federal de Viçosa. Todos os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram aprovados pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da UFV, protocolo n. 024/2009, realizados e supervisionados pelo médico veterinário Laércio dos Anjos Benjamin, CRMV-MG 3387.

Animais

Lambaris da espécie *Astyanax bimaculatus* foram doados pela Piscicultura da Prata, localizada no município de Eugenópolis/MG (21°05'56"S e 42°11'13"O) que encontra-se na sub-bacia do rio Pomba, bacia do rio Paraíba do Sul.

Os peixes foram mantidos no Biotério de Peixes do Departamento de Veterinária da UFV e aclimatados às condições do laboratório por um período de 20 dias. Foram utilizados aquários de vidro com volume total de 150L, contendo água tratada para consumo humano, livre de cloro, dotados de sistema contínuo de filtração, com temperatura controlada em 26±1°C por meio de termostatos e termômetros. O fotoperíodo foi de 12h, a aferição da temperatura ocorreu duas vezes ao dia, e a troca de água diária foi inferior a

10% do volume do aquário. Os peixes foram alimentados *ad libitum*, duas vezes ao dia, com ração comercial para peixes contendo 32% de proteína.

CL₅₀-96h

O teste de concentração letal com mortalidade de 50% da população (CL₅₀) foi realizado em sistema de água estático e com restrição alimentar (ABNT, 2006) com os animais mantidos sob restrição alimentar, que se iniciou 24h antes do início e perdurou durante todo o teste. Foram utilizadas três repetições com cinco peixes cada, para cada concentração de Thiodan® (Bayer, 2010) adotada, sendo os grupos assim estabelecidos: controle; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30 e 100 µg.L⁻¹ de endosulfan. As concentrações foram distribuídas em recipientes plásticos com 1,5L de água dos próprios aquários. O Thiodan® foi diluído uma primeira vez 1:100, solução padrão intermediária, e esta diluída uma segunda vez 1:100, formando uma solução padrão final, com o propósito de facilitar a obtenção das concentrações para o teste e a observação do potencial tóxico total do agroquímico e não apenas do princípio ativo.

Para este teste, foram utilizados 90 lambaris machos, adultos, em atividade reprodutiva, com aproximadamente 4cm de comprimento padrão.

Foram realizadas verificações de mortalidade a cada seis horas até 96h, removendo-se os animais mortos. Para acompanhar a temperatura, foi adicionado 1,5L de água do mesmo aquário, em um recipiente idêntico, de forma que qualquer variação de temperatura pudesse ser verificada sem provocar estresse adicional a qualquer grupo. O início do teste foi dia 06/07/2009 às 12:00 horas, com término às 12:00 horas do dia 10/07/2009.

O programa utilizado para determinar a CL₅₀ foi o TOXCALC, por meio do método PROBITUS, com intervalo de confiança (P<0,05).

Teste de toxicidade aguda (96h)

O teste de toxicidade aguda com o Thiodan® foi realizado no período de 08 a 12/09/2009, em aquários de 50L, sob os mesmos cuidados da aclimação, baseando-se nas normas técnicas para teste em sistema estático (ABNT, 2006).

Os grupos experimentais foram constituídos por grupo controle e grupos expostos ao Thiodan®. O grupo controle formado por duas repetições, cada uma com 10 peixes cada, totalizando 20 animais. Com relação aos grupos expostos ao Thiodan®, foram utilizadas três concentrações (1,15; 2,3 e 5,6 µg.L⁻¹) com três repetições cada, totalizando 30 peixes por concentração. Ao todo, foram utilizados 110 peixes no teste de toxicidade aguda em sistema estático.

Durante a realização do teste, nas duas primeiras horas após os peixes terem sido colocados nos aquários com o tóxico, os mesmos foram observados para avaliar seu comportamento. A cada verificação de temperatura da água dos aquários, também se observou o comportamento dos animais. As mesmas observações foram realizadas a cada seis horas durante o teste de determinação da CL₅₀.

Após as 96h, foram coletados seis peixes por de cada aquário e obtidos dados biométricos de peso corporal, comprimento total e comprimento-padrão (Tabela 1). As medidas de comprimento, em centímetros, foram obtidas com auxílio de paquímetro, e o peso corporal, em gramas, determinado em balança de precisão com sensibilidade de 0,01g.

Tabela 1: Valores médios de peso corporal, comprimento total e comprimento padrão de *A. bimaculatus* em cada grupo experimental.

Tratamentos	n	Peso (g)	Comprimento total (cm)	Comprimento padrão (cm)
Controle	12	3,12 ±1,07a	6,35 ±0,69a	5,14 ±0,61a
1.15µg.L ⁻¹	18	3,73 ±1,57a	6,63 ±0,85a	5,52 ±0,67a
2.3µg.L ⁻¹	18	3,97 ±1,44a	6,84 ±0,91a	5,57 ±0,75a
5.6µg.L ⁻¹	18	2,85 ±0,78a	6,16 ±0,56a	5,02 ±0,42a

Valores expressos como média ± desvio padrão.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P<0,05).

Análise de água

No início do teste foi coletada uma amostra da água, e ao término, foi coletado um *pool* do grupo controle e de cada concentração em separado, a fim de monitorar as condições físicoquímicas da água em que o experimento foi conduzido. Os parâmetros aferidos com o método analítico padrão (Eaton et al., 2005) foram pH, para monitorar a acidez que influencia o estado de brânquias e toxicidade total; cor aparente, que indica a quantidade de

sólidos dissolvidos; turbidez (unidades nefelométricas de turbidez - NTU), que indica a quantidade de sólidos totais em suspensão na água; cloro molecular ($\text{Cl}_{2\text{aq}}$), para garantir que o uso da água tratada para consumo humano não provocasse efeito oxidante; cloretos (Cl^-_{aq}), para determinar a salinidade da água; nitrato ($\text{NO}^{3-}_{\text{aq}}$), oxigênio dissolvido (OD) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) para controle da toxicidade proveniente da degradação da matéria orgânica presente na água e partição do agroquímico; e dureza (total, Ca^{2+} e Mg^{2+}), para verificar interferência ou não do biofiltro. A temperatura da água foi aferida duas vezes ao dia ao longo do período experimental.

Por se tratar de um sistema estático, não foram realizadas limpeza e troca de água dos aquários durante o período experimental (96h), a fim de conservar as concentrações do tóxico na água.

A alimentação foi suspensa 24h antes do início do experimento e perdurou durante todo o teste. A restrição alimentar visou minimizar o acúmulo de matéria orgânica que poderia interferir na partição do agroquímico.

Procedimentos para estudo histológico

Os animais foram anestesiados em solução de benzocaína 1:10000 com posterior aprofundamento do plano anestésico até a eutanásia, após o que foi realizada secção na transição cabeça-tronco. Na sequência, foi realizada incisão longitudinal ventral da parede celomática para a coleta dos testículos, observando-se os devidos cuidados para evitar danos mecânicos ao tecido.

Os testículos foram fixados em paraformaldeído com tampão fosfato 0,1M e pH 7,2 durante 24h. Em seguida, foram lavados e mantidos em álcool 70% para preservação e posterior processamento.

A desidratação foi realizada em álcool absoluto por quatro horas, seguindo-se para solução álcool absoluto/resina 1:1 por 12h, e resina pura por 24h. O material foi emblocado com resina glicolmetacrilato (Historesina Leica®) em moldes plásticos, que foram mantidos em estufa a 58°C por 48h.

Os fragmentos foram seccionados em micrótomo rotativo Reichert Jung 2045 utilizando-se navalhas de vidro. Foram obtidos cortes com 3µm

de espessura no sistema semiseriado 1:5, baseando-se no diâmetro nuclear previamente estabelecido para cada linhagem de células espermatogênicas em peixes.

As secções histológicas foram utilizadas para descrição das características morfológicas e análises morfométricas no grupo controle e nos grupos tratados, segundo Matta et al. (2002). As colorações utilizadas para análises histológicas e morfométricas foram hematoxilina-eosina e azul de toluidina com borato de sódio pH 6,5. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck®), analisadas em microscópio de luz Olympus CX31, e as imagens foram obtidas em câmera digital SC 020 por meio do software Olympus Analysis GetIt.

Foram realizadas mensurações do diâmetro de seis núcleos de espermatogônias A e B, de seis núcleos de espermatócitos I e II, de seis túbulos seminíferos, e de seis cistos de espermatócitos I e II para cada animal. As medidas foram analisadas por meio do programa Image-ProPlus 4.5, traçando-se duas linhas perpendiculares respeitando-se os limites do túbulo, do cisto ou do núcleo da célula em questão, conforme figura 1. Desta forma, foram obtidos dois diâmetros, a partir dos quais se calculou o diâmetro médio de cada túbulo, cisto ou núcleo de célula. O diâmetro médio desses parâmetros para o grupo controle e para cada concentração foi calculado a partir do somatório dos valores individuais da variável para cada animal. Também foram realizadas contagens de núcleos de espermatogônias A e B e de espermatócitos I e II em dez campos aleatórios por lâmina, para cada animal, em seis animais por tratamento, utilizando-se retículo micrométrico com 1mm² de área.

Para análises morfológicas foram consideradas, aleatoriamente, seis lâminas por grupo (seis animais). Essas lâminas foram examinadas em toda sua extensão em busca de alterações histopatológicas representativas da ação do Thiodan® no tecido testicular, sempre comparando estas alterações com o padrão de organização dos testículos das lâminas do grupo controle e com descrições da literatura.

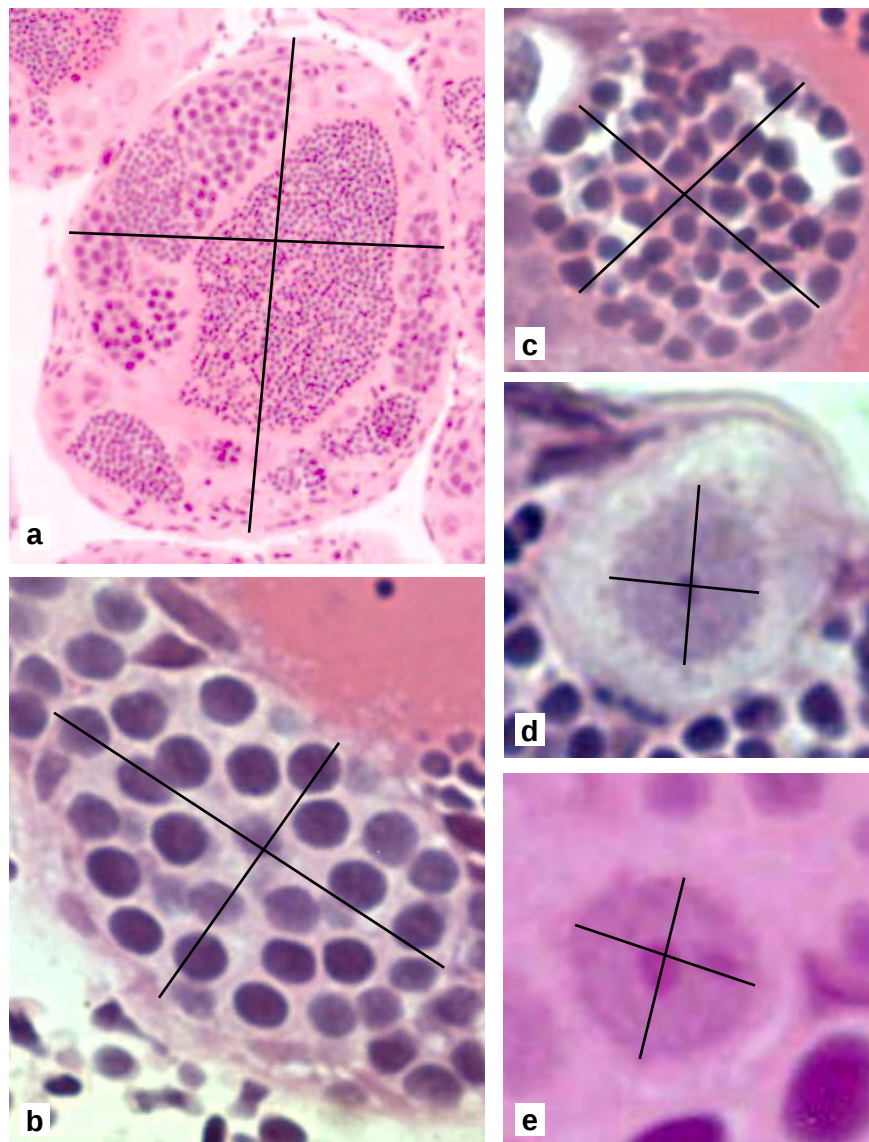


Figura 1: Morfometria tubular, dos cistos de espermatócitos e dos núcleos espermatogônias. a. Diâmetro de túbulos seminíferos; b. Diâmetro de cistos de espermatócitos I; c. Diâmetro de cistos de espermatócitos II; d. Diâmetro do núcleo de espermatogônia A; e. Diâmetro do núcleo de espermatogônia B. a. 100X; b,c,d,e. 400X. HE.

Eletroforese e dosagem de proteínas totais

Foi coletado um conjunto amostral de fígados de 12 lambaris expostos por 96h às concentrações de 1,15; 2,3 e 5,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Thiodan®, além de um grupo controle Esses órgãos foram congelados imediatamente após a coleta, e transportados em gelo para análises no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia/ UNICAMP.

Os fígados foram submetidos a uma solução extratora contendo 0,1g de fígado em 1mL de Triton X-100 1%, glicerol 5%, PBS 0,1M pH 7,2, homogeneizados em homogenizador de Doucen e, posteriormente,

centrifugados a 7200rpm/10min (protocolo adaptado de Szczesna-Skorupa e Kemper, 1991; Ding e Conn, 1991; McManus e McKinnon, 1991). O sobrenadante foi separado e o precipitado congelado.

Para realização da dosagem de proteínas totais foi utilizado o micrométodo Bradford a 590nm de absorbância, utilizando-se 3µL do sobrenadante por amostra e refazendo a curva padrão de análise.

As amostras da eletroforese foram preparadas por precipitação do sobrenadante por choque etanólico, ressuspenso em tampão de corrida, aquecido a 100°C por cinco minutos. Foram padronizados slots com 50µg.g⁻¹ de proteína. A corrida do gel de eletroforese foi padronizada com corrente de 300mA em gel SDS-Page com concentração crescente de 4 a 16% de poliacrilamida. Os padrões de referência utilizados foram um padrão de baixo peso molecular, e outro com proteína purificada do soro bovino (BSA).

Análises estatísticas

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de normalidade (Lilliefors) e homocedasticidade (Cochran e Bartlett), e posteriormente a análise de variância. Quando apresentaram significância, foi realizado o teste de Duncan. Quando não atenderam as premissas de normalidade e homocedasticidade, mesmo após transformações apropriadas, os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (SAS,1985). As variáveis de experimentos com 1 grau de liberdade foram comparadas pelo teste F, adotando-se o nível de 5% de probabilidade. Quando não atenderam as premissas de normalidade e homocedasticidade, mesmo após as transformações apropriadas, os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Wilcoxon (SAS,1985).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise comportamental

Durante a exposição dos peixes ao Thiodan® no teste de toxicidade, foi observado comportamento anormal nos peixes dos grupos de 2,3 e 5,6 µg.L⁻¹. Este comportamento anormal foi caracterizado por nado errático, tentativa de fuga dos aquários, busca de oxigênio na superfície e

demonstração de agressividade com os demais peixes. Além do comportamento anormal, foi observada mortalidade de 12 dos 30 animais iniciais no grupo de $5,6\mu\text{g.L}^{-1}$, apesar desta concentração ser considerada subletal, quando se observa a CL_{50} do Thiodan® de $17,7\mu\text{g.L}^{-1}$ e o intervalo de confiança mínimo de $11,1\mu\text{g.L}^{-1}$.

CL₅₀-96h

O teste apresentou uniformidade nos resultados, com mortalidade crescente e suficiente para determinar a CL_{50} ,

A média de temperatura da água nas dezessete aferições (96h) foi de $18,8 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$. A estabilidade térmica é importante, pois se sabe que a ação do tóxico varia de acordo com a temperatura (Correa et al., 2001), além desta interferir na concentração de oxigênio dissolvido, que é maior em temperaturas inferiores.

O grupo controle e as concentrações $0,1$ e $0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ não apresentaram mortalidade. A não ocorrência de mortalidade no grupo controle é importante pois valida o teste realizado, segundo normas da ABNT (2006).

As concentrações 1 e $3 \mu\text{g.L}^{-1}$ apresentaram mortalidade de $6,67\%$, considerada baixa, demonstrando que o lambari tem boa resistência ao endosulfan e os demais constituintes do Thiodan®.

A concentração de $10\mu\text{g.L}^{-1}$ apresentou mortalidade de $13,33\%$, e a de $30\mu\text{g.L}^{-1}$ foi de $66,67\%$. Isso indica alta resistência a ação tóxica do agroquímico.

A última concentração testada foi a de $100\mu\text{g.L}^{-1}$ e levou à mortalidade de toda a população em 12h. Também foram observados comportamentos descritos na literatura como nado errático, busca por oxigênio na superfície dos recipientes, tentativa de fuga e paralisia da natação pré-morte.

Segundo o programa TOXCALC, a CL_{50} calculada pelo método PROBITUS foi de $17,7\mu\text{g.L}^{-1}$ com intervalo de confiança entre $11,1$ a $29,6 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Montoya (2008), trabalhando com juvenis de tilápia *Oreochromis niloticus*, encontrou o valor de CL_{50} igual a $1,42\mu\text{g.L}^{-1}$ para 96h. Musanhi

(1987) determinou a CL₅₀ em 96, 48 e 24 horas de exposição ao endossulfan para tilapia nilótica adulta em águas temperadas. Os valores encontrados por esse autor foram de 1,42; 3,80 e 10,3 µg.L⁻¹, respectivamente.

Análise de água

Os parâmetros indicadores da qualidade da água utilizada para realização do experimento foram aferidos para garantir que estas alterações não ocasionassem a mortalidade ou mesmo um aumento na toxicidade do produto sobre os testículos.

As tabelas 2 e 3 mostram que todos os parâmetros mensurados encontraram-se em conformidade com as condições de cultivo e criação de peixes tropicais em geral (Huet, 1983), bem como com a resolução n.357 do CONAMA (2005).

Tabela 2: Parâmetros físicoquímicos de qualidade da água utilizada

Análise \ Amostras	Início	Fim			
		controle	1,15µg.L ⁻¹	2,3µg.L ⁻¹	5,6µg.L ⁻¹
pH	6,3	6,4	6,4	6,4	5,9
Cor Aparente	0	5	5	5	5
Turbidez (NTU)	1,22	1,60	1,32	1,32	1,20
O ₂ aq (mg.L ⁻¹)	7,5	7,1	6,9	6,9	6,5
DBO (mg.L ⁻¹)	1,2	2,7	2,0	3,1	1,8
Cl ₂ (mg.L ⁻¹)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cl ⁻ (mg.L ⁻¹)	6,0	6,4	6,0	6,8	12,8
NO ₃ ⁻ (mg.L ⁻¹)	10,2	8,7	8,2	14,3	7,1
Dureza Total (CaCO ₃ mg.L ⁻¹)	26,2	31,1	24,3	30,1	29,2
Dureza Ca ²⁺ (mg.L ⁻¹)	10,5	12,5	9,7	12,1	11,7
Dureza Mg ²⁺ (mg.L ⁻¹)	15,7	18,6	14,6	18	17,5

A escolha do uso de água tratada para consumo humano, livre de cloro, mantida em caixa d'água de 1000L mostrou-se adequada, minimizou os risco de resíduos, contaminações cruzadas e demais interferências nos parâmetros aferidos; a manutenção da água durante 10 dias, com aeração

contínua, antes da aclimação dos animais nos aquários visou minimizar o estresse dos animais, controlar a temperatura, reduzir o cloro molecular e estabilizar os demais parâmetros físicoquímicos.

Os valores de oxigênio dissolvido permaneceram altos do início ao fim do experimento, bem como os valores de DBO ficaram abaixo do limite de detecção ($2,0\text{mg.L}^{-1}$) do método (Eaton et al., 2005), garantindo com isso oxigênio disponível para os peixes ao longo do experimento. Esse resultado de OD mostra que o comportamento dos peixes em buscarem oxigênio na superfície do aquário se deve à ação tóxica do produto sobre os animais.

Tabela 3: Valores médios das temperaturas dos aquários

Aquários	Temperatura média (°C)	Média do grupo (°C)
Controle A	25,2 ±1,0	25,5 ±0,9
Controle B	25,8 ±0,7	
1,15µg.L ⁻¹ A	25,4 ±0,7	
1,15µg.L ⁻¹ B	25,4 ±0,5	25,3 ±0,5
1,15µg.L ⁻¹ C	25,1 ±0,4	
2,3µg.L ⁻¹ A	25,4 ±0,7	
2,3µg.L ⁻¹ B	25,9 ±0,6	25,7 ±0,6
2,3µg.L ⁻¹ C	25,7 ±0,4	
5,6µg.L ⁻¹ A	25,7 ±0,5	
5,6µg.L ⁻¹ B	25,3 ±0,5	25,5 ±0,7
5,6µg.L ⁻¹ C	25,7 ±1,0	

Valores expressos como média ± desvio padrão.

Letras indicam os aquários dentro de cada repetição.

Os valores da temperatura aferida ficaram entre os desejados para o cultivo e criação de peixes tropicais, que varia entre 24,0 a 28,0°C (Huet, 1983; Kubitzka, 2000), propiciando o estudo da resposta ao agroquímico em condições ideais nesse parâmetro.

Dados biométricos

A tabela 1 mostra as médias de peso, comprimento total e padrão de cada grupo experimental, em cada uma das três repetições para cada concentração do agroquímico. Não se observou diferença estatística ($P>0,05$) para nenhuma das variáveis.

Considerando que dentro da mesma espécie, peixes menores apresentam menor resistência ao Thiodan® quando comparados com peixes maiores (Teles, 2006; Santos, 2009), foram coletados parâmetros biométricos de cada animal buscando-se formar lotes de tamanhos

homogêneos para a composição dos grupos, evitando-se assim que a ação do tóxico sofresse interferência deste fator, garantindo-se também que todos os animais estivessem em estado de maturação reprodutiva.

Análises morfológicas dos testículos

A análise histológica dos grupos expostos ao Thiodan® revelou alterações morfológicas, comparando-se com o grupo controle. Foram observados destacamento, descontinuidade ou até mesmo ausência da albugínea testicular; hemácias fora de vasos sanguíneos profundamente a albugínea, indicativo de hemorragia; e degeneração das células da albugínea (Figura 2). Outras alterações encontradas foram hemorragia no tecido intertubular, vacúolos citoplasmáticos em células do tecido conjuntivo que muitas vezes se projetam da albugínea em direção ao estroma testicular e em células do processo espermatogênico, o que resulta em uma desestruturação tecidual (Figura 3); esta é agravada pelo rompimento da parede de cistos, desorganização do interstício, espermatozóides localizados no espaço intertubular, e a presença de ovócito no interior de túbulo seminífero (Figura 4). Além destas alterações, foram observadas vacuolização em espermatogônia A e B, e em espermatócitos, o que pode representar degeneração hidrópica e, portanto, necrose; as alterações observadas também incluem hemácias em cistos de espermatócitos, indicando hemorragia dentro dos cistos; e espermatócitos I e II na luz do túbulo (Figura 5). Fibrose do tecido intersticial também foi alteração notada neste estudo.

Os vacúolos observados nas espermatogônias podem representar degeneração hidrópica e, portanto, necrose. Houve aumento de células com vacuolizações, que, em estágio mais avançado, podem se tornar células necróticas. Nos peixes que não foram expostos ao agroquímico, a vacuolização não foi nula, porém, este valor é consideravelmente baixo em relação aos animais que foram expostos.

A exposição a substâncias tóxicas em diferentes fases do ciclo de vida tem como características gerais, relacionadas ao aparelho reprodutor, o retardamento de fases de desenvolvimento e da maturação gonadal, a redução no número e viabilidade de gametas, histopatologias e a redução do

número e viabilidade de descendentes (Rand e Petrocelli, 1985; Adams, 1990).

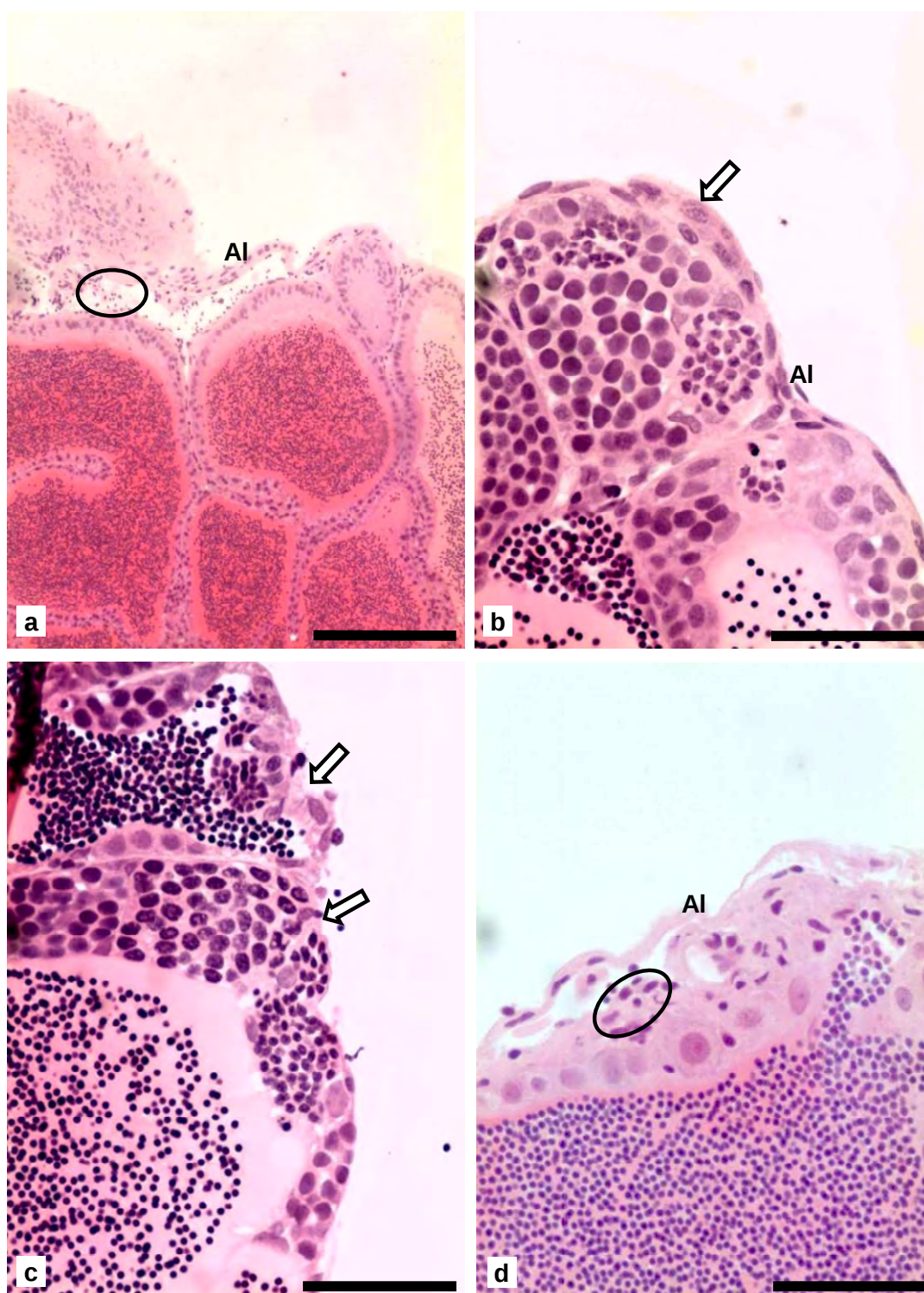


Figura 2: Alterações histológicas no arranjo testicular de peixes expostos ao Thiodan®. a. Descolamento da albugínea (AI) e presença de hemorragia (círculo); b. Degeneração de células da albugínea (seta branca); c. Ausência de albugínea (setas brancas); d. Hemorragia discreta próxima a albugínea (círculo). a. Concentração $1,15\mu\text{g.L}^{-1}$; b. Concentração $5,6\mu\text{g.L}^{-1}$; c. Concentração $5,6\mu\text{g.L}^{-1}$; d. Concentração $1,15\mu\text{g.L}^{-1}$. HE. Barra: a. $100\mu\text{m}$; b,c,d. $30\mu\text{m}$.

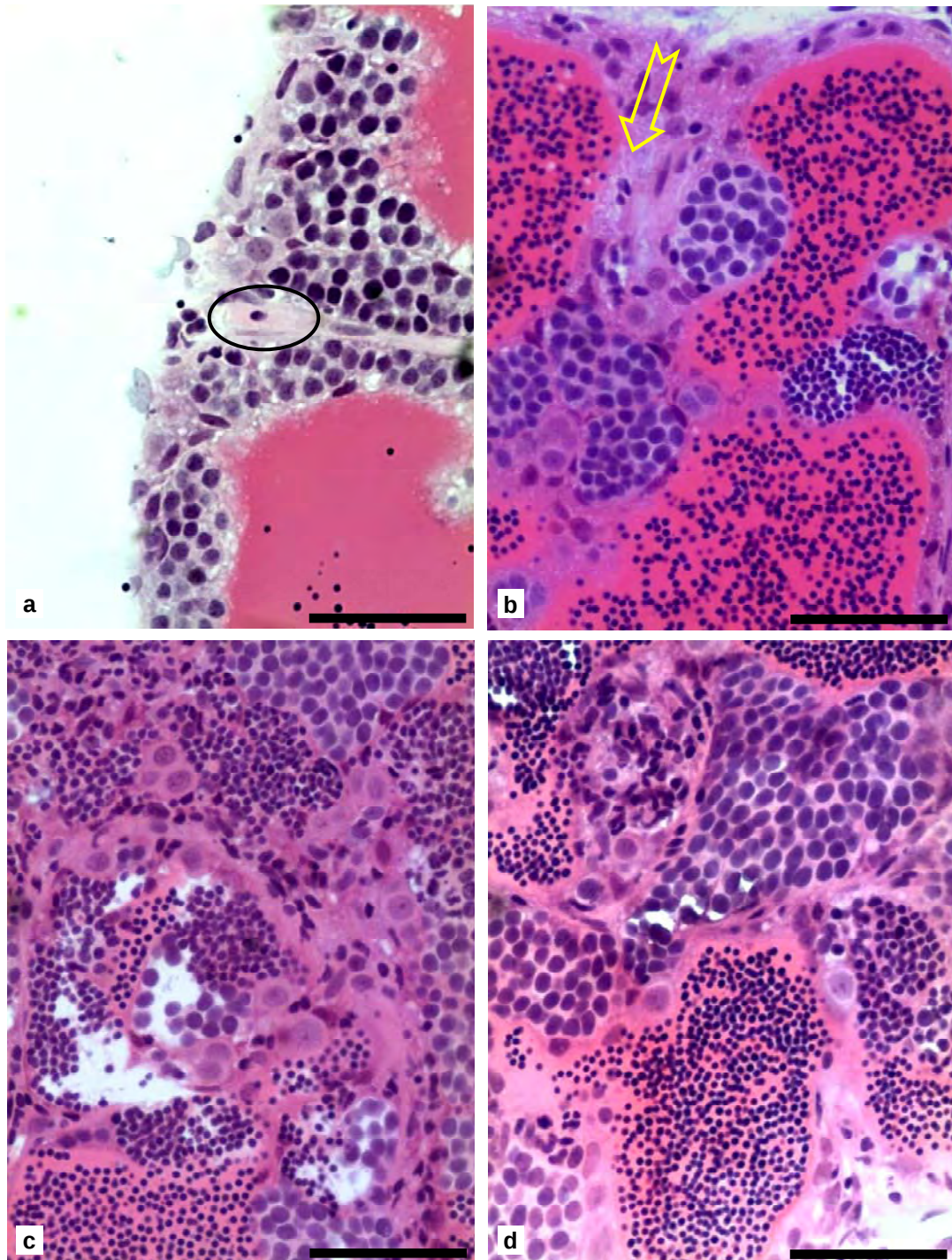


Figura 3: Alterações histológicas no arranjo testicular de peixes expostos ao Thiodan®. a. Ausência de albugínea e presença de hemácias fora de vasos sanguíneos (círculo); b. Vacúolos citoplasmáticos em células do tecido conjuntivo em direção ao estroma testicular (seta amarela); c,d. Desorganização estrutural de túbulos seminíferos e cistos; a. Concentração $2,3\mu\text{g.L}^{-1}$; b. Concentração $1,15\mu\text{g.L}^{-1}$; c. Concentração $1,15\mu\text{g.L}^{-1}$; d. Concentração $5,6\mu\text{g.L}^{-1}$. HE. Barra: $30\mu\text{m}$.

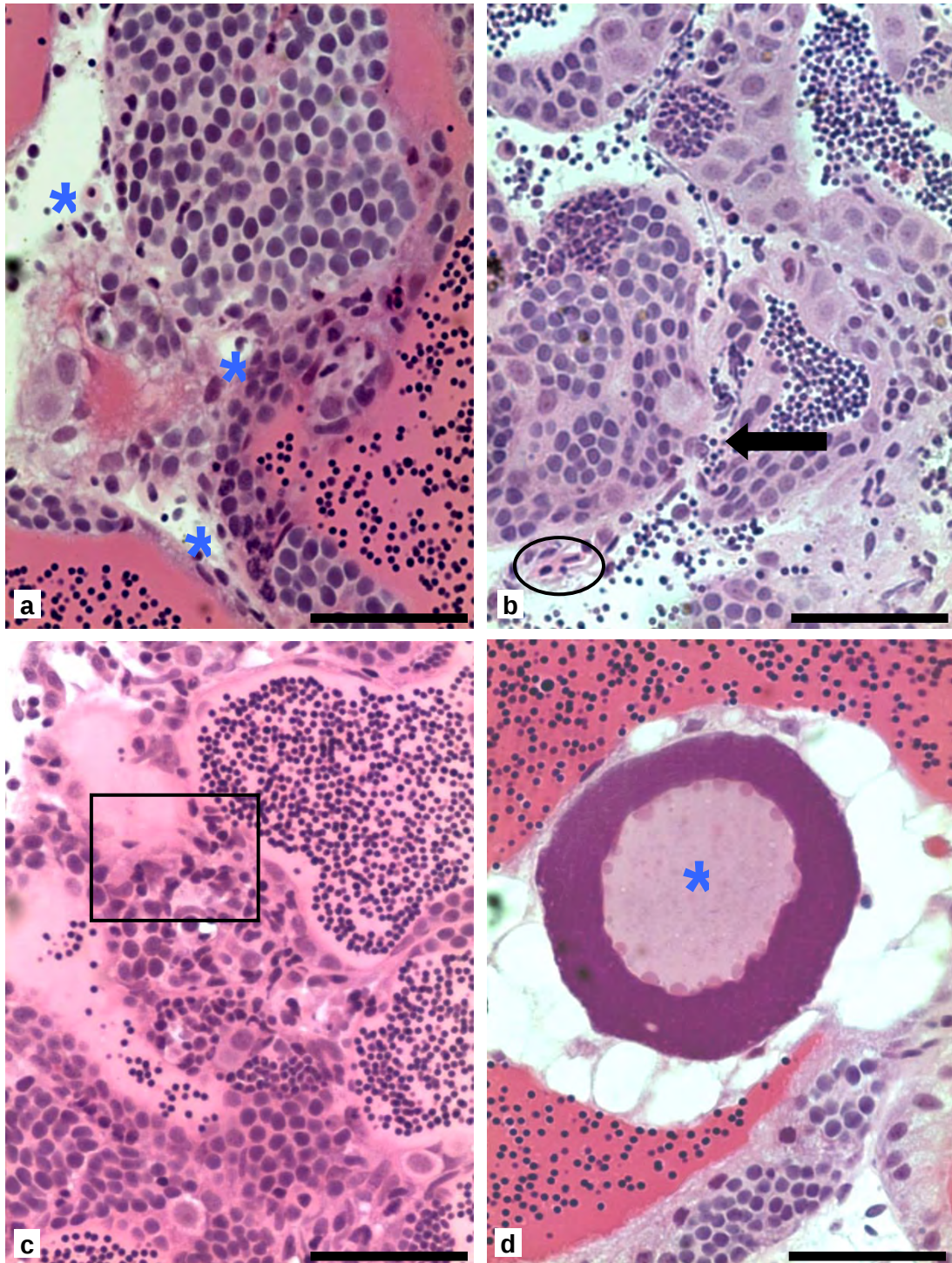


Figura 4: Alterações histológicas no arranjo testicular de peixes expostos ao Thiodan®. a. Desorganização no tecido intersticial (*); b. Desestruturação tecidual, hemorragia discreta (círculo) e espermatozoides no interstício (seta preta); c. Rompimento da parede de cisto (retângulo); d. Ovócito pré-vitelogênico (*) presente na luz do túbulo seminífero do testículo. a. Concentração $2,3\mu\text{g.L}^{-1}$; b. Concentração $2,3\mu\text{g.L}^{-1}$; c. Concentração $5,6\mu\text{g.L}^{-1}$; d. Concentração $2,3\mu\text{g.L}^{-1}$. HE. Barra: $30\mu\text{m}$.

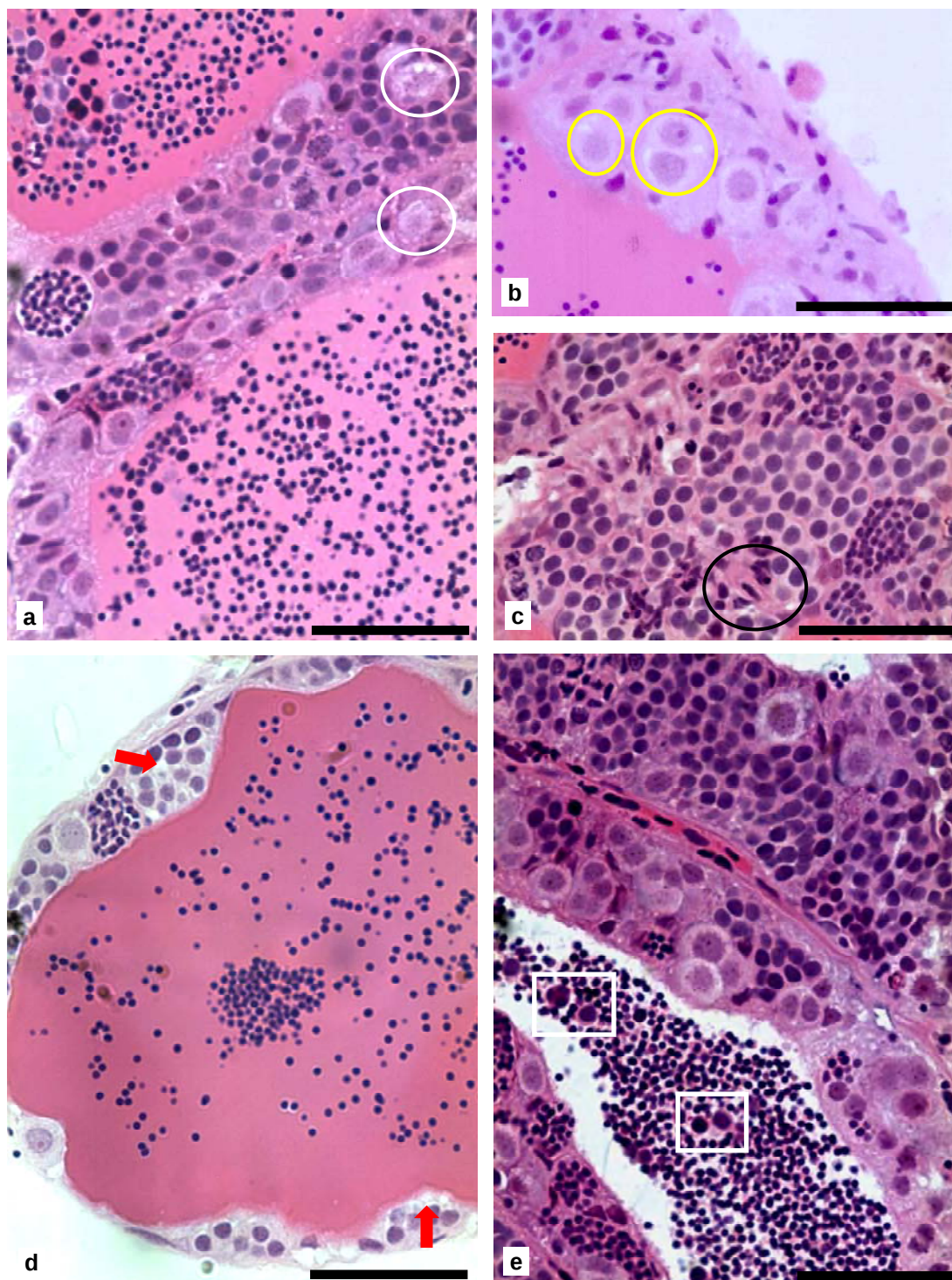


Figura 5: Alterações histológicas no arranjo testicular de peixes expostos ao Thiodan®. a. Degeneração de espermatogônia (círculos brancos); b. Vacuolização citoplasmática em espermatogônia B (círculos amarelos); c. Presença de hemácias no interior do cisto de espermatócito (círculo preto); d. Presença de vacúolos em citoplasma de espermatócitos (setas vermelhas); e. Presença de espermatócitos soltos na luz do túbulo seminífero (retângulos brancos). a. Concentração $2,3\mu\text{g.L}^{-1}$; b. Concentração $1,15\mu\text{g.L}^{-1}$; c. Concentração $2,3\mu\text{g.L}^{-1}$; d. Concentração $2,3\mu\text{g.L}^{-1}$; e. Concentração $2,3\mu\text{g.L}^{-1}$. HE. Barra: $30\mu\text{m}$.

No estudo realizado por Wester e Canton (1986) apud Hinton e Laurén (1990), sobre a diferenciação gonadal do “killifish” japonês *Oryzias latipes*, com amostras contaminadas com concentrações subletais do inseticida lindano, constatou-se a ocorrência de alterações morfológicas severas (células espessadas, massas celulares sólidas em formas arredondadas ou alongadas, e células de forma triangular) e taxas significativas de intersexualidade provocada pelo agente contaminante. Essas observações mostram o efeito tóxico de organoclorados sobre a gônada, o que vai de encontro aos resultados do presente estudo, além de relatarem seu potencial como disruptor endócrino. Esta última observação levanta possibilidade de novos estudos com o Thiodan®, uma vez que seu papel como disruptor endócrino deve ser investigado, devido à presença de ovócitos encontrados nos testículos de animais expostos ao agroquímico, como também foi descrito por DeFalco e Capel (2009) para zebrafish (*Danio rerio*) e medaka (*Oryzias latipes*) em seu estudo comparativo de morfologia gonadal de vertebrados.

O destacamento da albugínea testicular pode ser explicado pela redução da ligação entre o tecido da albugínea e o tecido conjuntivo da parede do túbulo. A descontinuidade ou falta de albugínea pode estar relacionada a agressão mecânica ou por morte celular. A degeneração das células da albugínea está relacionada com a necrose tecidual ocorrida em várias áreas do testículo como observado por Montoya (2008) estudando o efeito do Thiodan® nos testículos de tilápias nilóticas imaturas.

A hemorragia encontrada em várias áreas do tecido intersticial e em cistos de espermatócitos pode ter ocorrido devido ao aumento da pressão no interior dos vasos sanguíneos, o que causou o rompimento do endotélio vascular e extravasamento sanguíneo. A desorganização tecidual leva a uma perda da funcionalidade por interferir na ação dos hormônios nas células alvos. Além disso, como as estruturas que conferem motilidade ao órgão estão comprometidas, a espermição também fica prejudicada. Espermatozóides encontrados fora da luz tubular podem ser indicativos de rompimento do túbulo seminífero, assim como espermatócitos encontrados na luz tubular podem ser indicativo de rompimento de cistos como descrito

por Santos (2009) ao analisar a toxicidade aguda do zinco também em lambaris.

Dutta e Arends (2003) e Dutta et al., (2006), pesquisando o efeito dos poluentes na reprodução dos peixes, relataram a interrupção da fase de proliferação na espermatogênese do bluegill (*Lepomis macrochirus*) após exposição aguda ao diazinon, inseticida organofosforado. As observações destacadas nesse experimento sugerem que a espermatogênese foi atrasada e teve seu rendimento reduzido, mas não ocorreu interrupção.

No estudo com zinco realizado por (Santos, 2009), foi observada correlação positiva entre a concentração de zinco e o aumento na ruptura e no deslocamento de cistos causando retração na parede dos túbulos seminíferos, o que não foi verificado em animais do grupo controle, resultado que corrobora a observação deste estudo.

Análises morfométricas dos testículos

Para as análises morfométricas foram avaliados diâmetros médios de túbulos seminíferos, cistos espermatócitos (Spc) I e II, núcleos de Spc I e II, e núcleos de espermatogônias (Spg) A e B (Tabela 4).

Tabela 4: Diâmetro médio (μm) de túbulos seminíferos, cistos e núcleos de espermatócitos (Spc) I e II, núcleos de espermatogônias (Spg) A e B de *A. bimaculatus* dos grupos controle e expostos ao Thiodan®.

Parâmetros	Controle	1,15 $\mu\text{g.L}^{-1}$	2,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	5,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$
n	36	36	36	36
Túbulos seminíferos	136,90 $\pm$ 15,65a	141,80 $\pm$ 31,13a	174,28 $\pm$ 59,08a	126,56 $\pm$ 19,62a
Cisto de Spc I	28,18 $\pm$ 3,57a	32,42 $\pm$ 3,90a	34,36 $\pm$ 4,54a	31,18 $\pm$ 4,40a
Cisto de Spc II	30,42 $\pm$ 3,94a	25,37 $\pm$ 3,72b	24,78 $\pm$ 1,81b	27,26 $\pm$ 2,94a
Spc I	3,32 $\pm$ 1,47a	5,31 $\pm$ 0,57b	5,30 $\pm$ 0,56b	5,18 $\pm$ 0,25b
Spc II	2,63 $\pm$ 0,41a	2,29 $\pm$ 0,29b	2,81 $\pm$ 0,21a	2,78 $\pm$ 0,17a
Spg A	6,14 $\pm$ 0,42a	6,70 $\pm$ 0,60ab	6,83 $\pm$ 0,51b	6,94 $\pm$ 0,25b
Spg B	5,45 $\pm$ 0,83a	5,80 $\pm$ 0,24a	6,09 $\pm$ 0,36a	5,87 $\pm$ 0,42a

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Os túbulos seminíferos não apresentaram diferença estatística ($P > 0,05$) entre si. Os cistos de espermatócitos II dos grupos expostos ao Thiodan® apresentaram menor diâmetro nas concentrações 1,15 e 2,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($P < 0,05$), provavelmente devido à interrupção da fase de proliferação graças

a morte de células germinativas imaturas como descrito por Dutta et al. (2006). Observou-se aumento no diâmetro de núcleos de espermatócitos I em todas as concentrações ($P < 0,05$) e redução no diâmetro do núcleo de espermatócitos II na menor concentração ($P < 0,05$). Os dados morfométricos para espermatogônias tanto A quanto B demonstraram um aumento de diâmetro do núcleo nos grupos tratados em comparação com o grupo controle, sendo significativo ($P < 0,05$) apenas para espermatogônia A nas concentrações 2,3 e 5,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Também foram realizadas contagens de núcleos de espermatócitos I e II, e de núcleos de espermatogônias A e B, conforme tabela 5.

Tabela 5: Número médio de núcleos de espermatócitos (Spc) I e II, e de espermatogônias (Spg) A e B por unidade de área testicular (1mm^2) de *A. bimaculatus* dos grupos controle e expostos ao Thiodan®.

Tratamento	Controle	1,15 $\mu\text{g.L}^{-1}$	2,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	5,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$
n	60	60	60	60
Spc I	51,6 $\pm$ 12,0a	29,7 $\pm$ 8,3b	32,2 $\pm$ 10,2b	45,1 $\pm$ 10,7a
Spc II	20,2 $\pm$ 8,7a	11,0 $\pm$ 5,3a	14,8 $\pm$ 6,9a	15,9 $\pm$ 7,3a
Spg A	2,8 $\pm$ 1,5a	3,3 $\pm$ 0,7b	2,9 $\pm$ 0,8a	2,3 $\pm$ 0,4c
Spg B	8,1 $\pm$ 2,8a	10,1 $\pm$ 2,5b	8,8 $\pm$ 2,4ab	6,3 $\pm$ 1,2c

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

A tabela 5 demonstra uma variação significativa ($P < 0,05$) no número de núcleos de espermatócitos I nas concentrações 1,15 e 2,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em relação ao controle e ao grupo 5,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$, e aumento de espermatogônias A e B na concentração 1,15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e redução na concentração 5,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($P < 0,05$). Não foi possível relacionar o número de núcleos com as alterações morfológicas observadas.

Eletroforese e dosagem de proteínas totais

As medidas de todas as amostras enquadraram-se dentro da curva-padrão, com concentrações não foram crescentes do controle para a maior concentração. Esse aumento pode ser devido à maior expressão na produção de proteínas ou a maior extração devido a uma possível desestruturação do tecido hepático nos grupos tratados (Tabela 6).

Tabela 6: Dosagem de proteínas totais de extratos de fígado de *A. bimaculatus* dos grupos controle e expostos ao Thiodan[®].

Tratamento	Controle	1,15µg.L ⁻¹	2,3µg.L ⁻¹	5,6µg.L ⁻¹
Concentração (µg.µL ⁻¹)	1,6	2,7	3,1	2,2

O gel de eletroforese (Figura 6) mostra repetição de todas as bandas protéicas, e sugere que as proteínas dosadas tiveram concentração variável e crescente. As proteínas de resposta fisiológica a xenobióticos (citocromo P-450, EROD, E₂, entre outras) citadas por Teles (2006), necessitam de métodos específicos de dosagem, por não serem retidas pelo gel de poliacrilamida.

A coluna 1 apresenta bandas do padrão de BSA (67KDa) e bandas com baixos pesos moleculares previamente conhecidos (14,1 a 43 KDa). A coluna 2 apresenta bandas de proteínas do grupo controle, as colunas 3 e 4 são repetições das bandas de proteínas da concentração 1,15µg.L⁻¹, a coluna 5 são bandas da concentração 2,3µg.L⁻¹, e a coluna 6 são bandas da concentração 5,6µg.L⁻¹.

Na corrida do grupo controle (coluna 2) as proteínas apresentaram peso molecular em ordem decrescente de aproximadamente 112, 80, 64, 59, 38, 29, 27, 25, 20, 14 e 10 KDa. Todas as proteínas expressas nas demais concentrações estão presentes no grupo controle, sendo as bandas referentes aos pesos 112, 80, 64 e 25 KDa foram expressas exclusivamente no grupo controle. Observa-se que, enquanto as bandas referentes as proteínas de pesos 38, 28, 27 e 20 KDa estão presentes de forma idêntica em todos os tratamentos, as bandas referentes as proteínas 59 e 38 não aparecem nos tratamentos das concentrações 2,3 e 5,6 µg.L⁻¹, e a proteína de peso 20KDa apresentou redução em sua quantidade nos mesmos tratamentos.

Em relação às bandas presentes em todos os grupos, pode se observar que, as proteínas de pesos 29, 27 e 20 KDa, estão presentes de forma idêntica em todos os tratamentos. A proteína de peso 20KDa apresenta redução em sua quantidade nas concentrações 2,3 e 5,6 µg.L⁻¹. As bandas referentes às proteínas 59 e 38 não aparecem nos tratamentos das concentrações 2,3 e 5,6 µg.L⁻¹. Também pode ser observado aumento

na expressão das proteínas de peso 14 e 10 KDa, prováveis responsáveis pelo aumento da concentração de proteínas totais presentes na tabela 6.

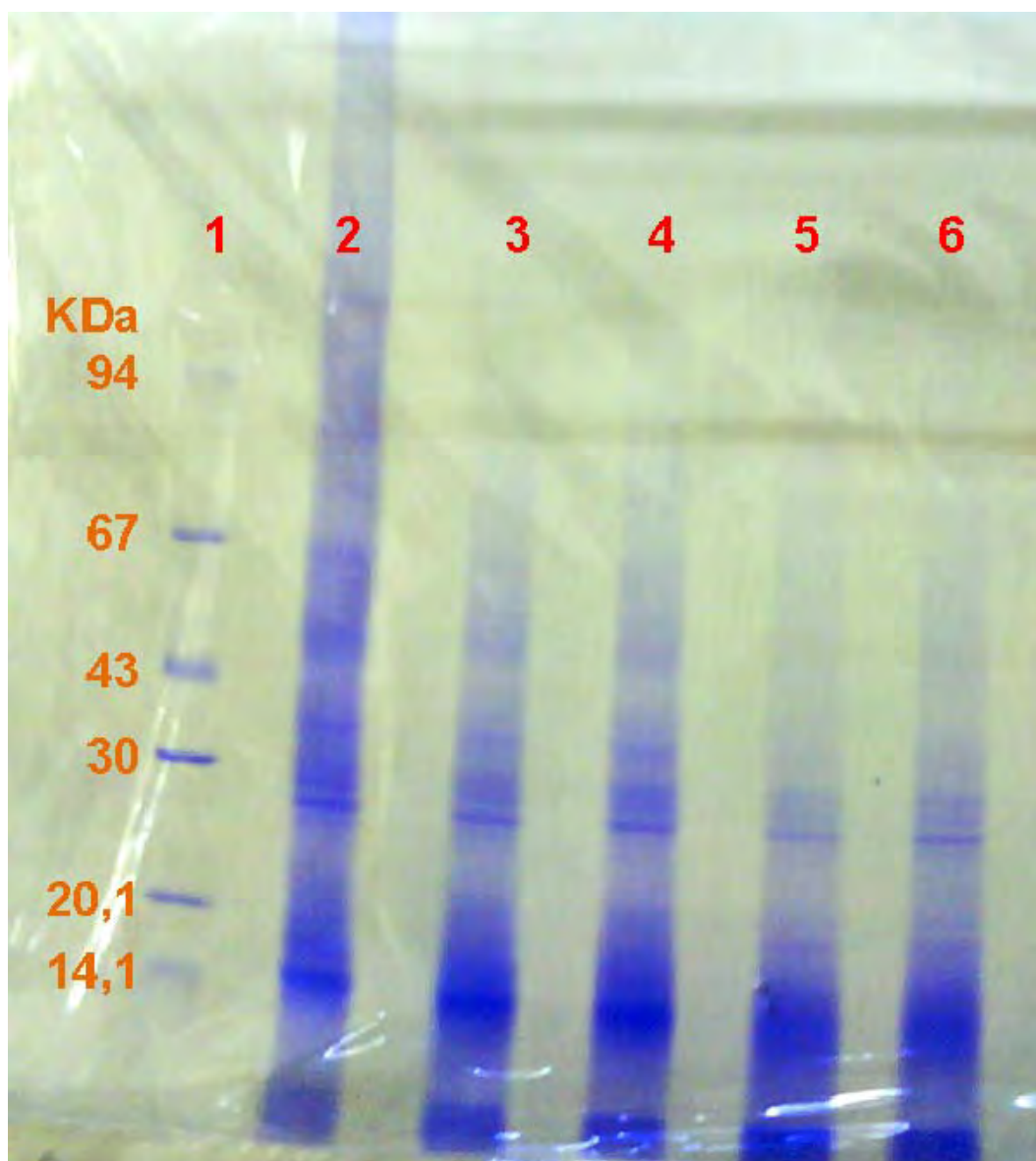


Figura 6: Gel SDS-Page 4-16% com extratos de fígados de *A. bimaculatus* do grupo controle e dos grupos expostos ao Thiodan®.

A dosagem dessas proteínas de resposta e mais repetições para fins estatísticos são importantes para maiores discussões sobre estes resultados. Bem como mais estudos sobre a natureza e composição das proteínas de peso 10, 14, 20, 38 e 59 KDa pelo fato apresentarem modificações na sua expressão.

CONCLUSÕES

A CL₅₀-96h do Thiodan® para *A. bimaculatus* foi de 17,7µg.L⁻¹ com intervalo de confiança entre 11,1 a 29,6 µg.L⁻¹, resultado que demonstra alta resistência ao produto e, por isso, não deve ser utilizado como bioindicador.

O agroquímico causou comportamento anormal nos peixes e mortalidade de 40% no grupo de maior concentração (5.6µg.L⁻¹).

O Thiodan® mostrou-se tóxico para os testículos, comprometendo a função reprodutiva do lambari ao reduzir a produção de células da linhagem espermatogênica e os testículos podem ser usados como biomarcadores de contaminação ambiental por esse agroquímico.

O Thiodan® pode ter atuado como disruptor endócrino no *A. bimaculatus*, pela observação de ovócitos na luz do túbulo seminífero.

O efeito tóxico é dependente da concentração, observado mesmo em concentrações muito baixas (1,15µg.L⁻¹).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS). **NBR 15088 – Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes**. 2. ed. ABNT: versão corrigida 31/03/2006, 19p, 2006.

ADAMS, S. M. **Biological indicators of stress in fish**. American Fisheries Society Symposium 8. 190p, 1990.

BAYER. 2010. Bayer Crop Science. Propriedades do endossulfan <<http://www.bayercropscience.com.br/site/nossosprodutos/protecaodecultivo-sebiotecnologia/DetalheDoProduto.fss?Produto=52>> Acesso em julho de 2010.

BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do estado de São Paulo: sistemática. In: Comissão Inter Estadual da Bacia Paraná-Uruguaí. **Poluição e piscicultura**. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca, p.79-108, 1972.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco)**. Brasília: Câmara dos Deputados/CODEVASF, Divisão de Piscicultura e Pesca. 143p, 1988.

CEMIG/CETEC - COMPANHIA ENERGETICA DE MINAS GERAIS, FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Guia ilustrativo de peixes do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG. 144p, 2000.

CONAMA. 2005. **Resolução n.357 de 17 de março de 2005.** <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> Acesso em julho de 2010.

CORREA, C. M. D.; OLIVEIRA, J. J. V.; TORNISIELO, V. L. Avaliação do nível residual teórico e experimental de endosulfan em óleo de soja (glycine max. (L) Merrill). **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente.** v.11, p.137-148, 2001.

DEFALCO, T; CAPEL, B. Gonad Morphogenesis in Vertebrates: Divergent Means to a Convergent End. **Annual Review of Cell and Developmental Biology.** v.25, p.457-482, 2009.

DING, X.; COON, M. J. Purification and characterization of cytochromes P450 in rabbit nasal microsomes. **Methods in Enzymology.** v.206, p.603-612, 1991.

DUTTA, H. M.; ARENDS, D. A. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. **Environmental Research.** v.91, p.157-162, 2003.

DUTTA, H. M.; MISQUITA, D.; KHAN, S. The effects of endosulfan on the testes of bluegill fish, *Lepomis macrochirus*: a histopathological study. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology.** v.51, p.149-56, 2006.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; RICE, E. W.; GREENBERG, A. E. **Standard Methods for the examination of water e wastewater.** 21. ed. Maryland: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. 1082p, 2005.

ENGELHARDT, G. T.; SARMENTO, R. **Comportamento ambiental do thiodan CE (endosulfan) usado no controle químico da broca do fruto do cafeeiro.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal do Espírito Santo. 26p. 2004. <http://www.seculodiario.com.br/arquivo/2004/marco/23/noticiario/meio_ambiente/arquivo.doc> Acesso em janeiro de 2010.

HINTON, D. E.; LAURÉN, D. J. Interactive histopatological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. In: ADAMS, S. M. **Biological indicators of stress in fish.** American Fisheries Society Symposium 8, 1990.

HUET, M. **Tratado de piscicultura.** 3. ed. Madri: Mundi Prensa. 788p, 1983.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial.** 1. ed. Jundiaí: Acqua Supre. 285p, 2000.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; PEZZI DA SILVA, J. F.; VARI, R. P.; HAROLD, H.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. Genera Incertae Sedis in Characidae. p. 106-169, 2003. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C. J. (Orgs.) **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS. 729p, 2003.

MATTA, S. L. P.; VILELA, D. A. R.; GODINHO, H. P.; FRANÇA, L. R. The goitrogen 6-*n*-Propyl-2-Thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: The tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Endocrinology**. v.143, n. 3, p.970–978, 2002.

MCMANUS, M. E.; MCKINNON, R. A. Measurement of cytochrome P450 activation of xenobiotics using the ames *Salmonella* test. **Methods in Enzymology**. v.206, p.501-509, 1991.

MONTOYA, L. N. F. **Efeitos do endosulfan sobre a morfologia do testículo de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) imatura**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 76p. 2008.

MUSANHI, R. G. Influence of two organochlorine pesticides, Thiodan and Lindane on survival of fingerlings of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. United Nations Development Program - Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). **Nigerian Institute for Oceanography and Marine Research**. 1987. <<http://www.fao.org/docrep/field/003/AC162E/AC162E00.htm>> Acessado em julho de 2010.

PAIVA, S. R.; DERGAM, J. A.; MACHADO, F. Determining management units in southeastern Brazil: the case of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei: Ostariophysi: Characidae). **Hydrobiologia**. v.560, p.393-404, 2006.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R.. Introduction. In: RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. ed. New York: Hemisphere. p.1-28, 1985.

SANTOS, D. C. M. **Toxidez aguda do zinco em Lambaris *Astyanax aff.bimaculatus* (Linnaeus, 1758)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 111p. 2009.

SAS INSTITUTE INC. **SAS User's Guide**. Statistics, version 5 edition, Cary, N.C., SAS Institute Inc., 1985, 956p.

SOARES, W.; ALMEIDA, R. M. V. R.; MORO, S. Trabalho rural e fatores de risco associados ao regime de uso de agrotóxicos em Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, p.1117-1127, 2003.

SZCZESNA-SKORUPA, E.; KEMPER, B. Cell-free analysis of targeting of cytochrome P450 to microsomal membranes. **Methods in Enzymology**. v.206, p.64-75, 1991.

TELES, M. P. M. **Efeitos fisiológicos e genotóxicos induzidos por contaminantes ambientais em peixes**. Tese (Doutorado no Departamento de Biologia). Universidade de Aveiro, Aveiro, 253p. 2006.

VITULE, J. R. S.; ARANHA, J. M. R. Ecologia alimentando lambari, *Deuterodon langei* Travassos, 1957 (Characidae, Tetragonopterinae), de diferentes tamanhos em um riacho da Floresta Atlântica, Paraná (Brasil). **Acta Biologica Paranaense**. v.31, p.137-150, 2002.

WESTER, P. W.; CANTON, J. H. The usefulness of histopathology in aquatic toxicity studies. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.100, p.115-117, 1986.

CONCLUSÕES GERAIS

A produção de conhecimento básico a respeito da ação dos agroquímicos em representantes dos diferentes ecossistemas é fundamental para prevenção de contaminações.

O Roundup™ é um herbicida utilizado em larga escala no Brasil, e mostra a necessidade de estudos de seus efeitos tóxicos. O conhecimento da CL_{50-96h} (14mg.L^{-1}) com intervalo de confiança (9,3 a $22,6\text{ mg.L}^{-1}$) desse produto permitiu o estabelecimento de concentrações tóxicas com características subletais, como as utilizadas nesse experimento, além de estabelecer o bom potencial do lambari como bioindicador.

A mortalidade observada durante o teste de determinação da CL_{50} foi em função da ação tóxica total do Roundup™, ou seja, toxicidade do princípio ativo glifosato combinado à ação dos solventes e demais compostos contidos no herbicida.

As análises morfológica e morfométrica mostraram que o Roundup™ é tóxico para os testículos do lambari, desde a concentração de $1,3\text{mg.L}^{-1}$ e, portanto, pode ser considerada como impactante para o lambari.

O Thiodan® é um inseticida organoclorado muito tóxico, e sua utilização ao longo de décadas, no Brasil, pode ter produzido alterações ambientais que justificam a continuidade de estudos dos seus efeitos no meio ambiente.

A CL_{50-96h} ($17,7\mu\text{g.L}^{-1}$) é considerada alta quando comparada com os demais peixes teleósteos, o que demonstra que o lambari não deve ser considerado como parâmetro bioindicador.

O Thiodan® mostrou-se tóxico para os testículos, comprometendo a função reprodutiva do lambari ao alterar a morfometria de células da linhagem espermatogênica. Além disso, o agroquímico pode ter atuado como um disruptor endócrino no lambari, devido ao surgimento de ovócitos na luz do túbulo seminífero, o que mostra a necessidade de novos estudos.

A mortalidade do peixe frente ao produto gera a clara necessidade de estudos direcionados ao comportamento evolutivo da espécie e a importância da sazonalidade no fator toxicidade que busquem esclarecer os mecanismos de resistência do lambari a esse organoclorado,

É importante ressaltar a necessidade de avaliações e novos estudos direcionados aos mecanismos de ação desses agroquímicos no testículo e na espermatogênese do lambari e de outros peixes neotropicais. A divulgação desses estudos e o incentivo a novas pesquisas na área de toxicologia dos agroquímicos que podem ser impactantes ao meio ambiente são essenciais a um país que tradicionalmente pauta grande parte de sua economia na agroindústria.