

LEANDRO RODRIGUES NUNES

TOXICIDADE AGUDA E EFEITO SUBLETAL DO ROUNDUP
TRANSORB® NOS TESTÍCULOS DE MATO GROSSO
Hyphessobrycon eques (Steindachner, 1882)
(TELEOSTEI: CHARACIDAE)

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
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

N972t
2011

Nunes, Leandro Rodrigues, 1985-

Toxicidade aguda e efeito subletal do Roundup Transorb[®] nos
testículos de mato grosso *Hyphessobrycon eques*
(Steindachner, 1882) (Teleostei: Characidae) / Leandro
Rodrigues Nunes. – Viçosa, MG, 2011.
ix, 39f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Laércio dos Anjos Benjamin.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 34-39

1. Testículos - Toxidade. 2. Herbicida. 3. Glifosato.
4. *Hyphessobrycon eques*. 5. Testículos - Morfologia.
6. Peixe - Reprodução. 7. Peixe ornamental. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 597.48

LEANDRO RODRIGUES NUNES

TOXICIDADE AGUDA E EFEITO SUBLETAL DO ROUNDUP
TRANSORB® NOS TESTÍCULOS DE MATO GROSSO
Hyphessobrycon eques (Steindachner, 1882)
(TELEOSTEI: CHARACIDAE)

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: 16 de setembro de 2011

Prof. Dr. José Luiz Helmer

Prof^a. Dr^a. Ann Honor Mounteer
(Co-Orientadora)

Prof. Dr. Eduardo Paulino da Costa

Prof. Dr. Jorge A. Dergam dos Santos

Prof. Dr. Laércio dos Anjos Benjamin
(Orientador)

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José Saramago)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José e Kátia, por toda a dedicação que a mim despenderam, por apoiarem nas minhas decisões e por serem o órgão de fomento do meu mestrado. Sem vocês, não poderia chegar até aqui e muito menos seguir adiante!

À Luana pelo companheirismo, por me fazer sorrir nos momentos difíceis. “Sobrevivemos a essa etapa”.

Ao Laércio, por ter me recebido de braços abertos nesta cidade e nesta instituição, por todo o conhecimento passado. – “Tenha certeza que eu aprendi muito sendo seu orientado”.

Ao José Luiz, pela extensa contribuição na minha formação e pelas oportunidades preciosas de trabalho oferecidas.

A minha co-orientadora professora Ann, pelos conhecimentos passados durante a disciplina de Ecotoxicologia, e pela colaboração neste trabalho. – “Com certeza a senhora enriqueceu este trabalho”.

Ao professor Jorge Dergam pela troca de saberes em sua disciplina de Ictiologia Neo Tropical e por aceitar avaliar e contribuir para este trabalho.

Ao professor Eduardo Paulino por ter concedido o uso do seu laboratório para algumas etapas deste trabalho e por aceitar avaliá-lo e contribuir para este mesmo.

A professora Eliete e demais funcionários da FAESA que me incentivaram desde minha graduação e por permitirem que utilização do laboratório de microscopia para realização de algumas análises desta dissertação.

Ao professor Camilo Dias da UFES, por ter cedido os equipamentos de seu laboratório para análise de alguns dos meus dados.

Aos meus colegas de Laboratório pela troca de conhecimentos e por me ajudarem na realização do projeto.

Aos meus amigos de Viçosa e colegas de república por terem me acolhido como um irmão, com vocês aprendi a lidar com as diferenças e os valores que permeiam a boa convivência.

Aos meus Avós Aderaldo Nunes, Ila Nunes, Alaor Rodrigues e Adelci Rodrigues e demais familiares por todo apoio e carinho.

BIOGRAFIA

Leandro Rodrigues Nunes, filho de José Nunes Neto e Carla Kátia Rodrigues Nunes, nasceu na cidade de Vitória, Espírito Santo, em 18 de junho de 1985.

Sua carreira acadêmica teve início em 2005 quando ingressou na graduação em Ciências Biológicas, pela FAESA (Universidades Integradas de São Pedro), colando grau em 2009.

Em agosto de 2009, ingressou no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, pela Universidade Federal de Viçosa defendendo a dissertação em setembro de 2011.

Profissionalmente atua desde 2009 na área de consultoria ambiental, tendo como foco principal a avaliação dos impactos sobre ictiofauna.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	viii
1.INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. A agricultura e os agroquímicos no Brasil.....	2
2.2. Caracterização físico-química do Roundup Transorb®	3
2.3. Efeito tóxico do Roundup Transorb®	3
2.4. Panorama do mercado de peixes ornamentais.....	4
2.5. Biologia do <i>Hyphessobrycon eques</i>	4
2.6. Anatomia testicular de teleósteos	5
2.7. Anatomia testicular do <i>Hyphessobrycon eques</i>	5
2.8. Características histológicas testiculares do <i>Hyphessobrycon eques</i>	6
2.9. Bioindicadores	7
2.10. Biomarcadores	7
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	9
3.1 Justificativa	9
3.2. Objetivo geral.....	9
3.3. Objetivos específicos	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1. Normas de conduta para uso de animais na pesquisa	10
4.2. Infra-estrutura física e de equipamentos.....	10
4.3. Animais	10
4.3 Aclimação	11
4.4. Análise de água	11
4.5. Determinação da CL ₅₀ do Roundup Transorb®	11
4.6. Efeito subletal do Roundup Transorb®	12
4.7. Procedimentos para estudos histológicos.....	12
4.8. Análise histológica	13
4.9. Análise estatística	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1. Determinação da CL ₅₀ -96h do Roundup Transorb® para <i>H. eques</i>	18
5.2. Efeito subletal do Roundup Transorb®	21
5.2.1. Peso e comprimento dos peixes amostrados.....	21
5.2.2. Parâmetros físico-químicos da água	21
5.2.3. Análises morfométricas e histopatológicas.....	22
5.2.4. Análise histopatológica.....	29
6. CONCLUSÕES	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

RESUMO

NUNES, Leandro Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2011. **Toxicidade aguda e efeito subletal do Roundup Transorb® nos testículos de mato grosso *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882) (Teleostei: Characidae).** Orientador: Laércio dos Anjos Benjamin. Co-orientadora: Ann Honor Munteer.

A toxicidade de diversos poluentes ambientais tem sido investigada tanto em seres humanos como em outras espécies. Substâncias contidas em produtos agroquímicos, como herbicidas, podem afetar o sistema reprodutivo de machos e fêmeas. O presente estudo teve como objetivo determinar a CL_{50-96h} do Roundup Transorb® e o efeito subletal na morfologia testicular de machos maduros de *Hyphessobrycon eques*. Os testes de toxicidade seguiram as normas técnicas de teste em sistema estático da ABNT. Foram selecionados machos adultos de *H. eques* com comprimento padrão aproximado de 30mm, previamente aclimatados por um período de 10 dias. O teste de determinação da CL_{50} foi conduzido nas temperaturas de 22 e 24°C com diferentes concentrações do princípio ativo do Roundup Transorb® (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 e 32,0mg.L⁻¹). O cálculo da CL_{50} utilizou o programa Probit 1.5. O estudo do efeito subletal do Roundup Transorb® teve duração de 96 horas, testando-se três concentrações definidas de 1/2, 1/4 e 1/8 do limite inferior do valor da CL_{50-96h} encontrado. Ao final da exposição, 10 animais de cada tratamento foram anestesiados, eutanasiados, medidos, pesados e retirados os testículos. As amostras de tecido foram processadas rotineiramente para estudos histológicos. Foram analisados dados morfométricos e histopatológicos em 10 campos por animal. A CL_{50} do Roundup Transorb® a uma temperatura média de 22,0 °C foi de 2,64mg.L⁻¹, com o limite inferior de 2,09mg.L⁻¹ e superior de 3,33mg.L⁻¹. A CL_{50} do Roundup Transorb® a com a temperatura medida de 24,0°C foi de 2,18mg.L⁻¹, com o limite inferior de 1,75mg.L⁻¹ e superior de 2,72mg.L⁻¹. A toxicidade do Roundup Transorb® é maior cerca de quatro a 400 vezes maior que outros herbicidas de mesmo princípio ativo, já testado para essa mesma espécie de peixe. Observou-se com os dados morfométricos e histopatológicos, redução dos cistos de espermatídes e diâmetro tubular, redução do número de células da linhagem espermatogênica (espermatogônia A e B e espermatócito I), cisto de espermatócitos I, aumento de cistos rompidos. Foram diagnosticadas alterações

ligadas ao processo de necrose como picnose nuclear e vacuolização citoplasmática. Houve aumento dos índices de cistos rompidos (ICR) e vacuolização citoplasmática (IVC) da menor para a maior concentração. O Roundup Transorb® mostrou-se moderadamente tóxico para *Hyphessobrycon eques* e provocou alterações morfológicas prejudiciais a espermatogênese em concentrações subletais encontradas no ambiente ou até mesmo permitidas pela legislação brasileira.

ABSTRACT

NUNES, Leandro Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2011. **Acute toxicity and sublethal effect of Roundup Transorb® in testes of mato grosso *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882) (Teleostei: Characidae).** Adviser: Laércio dos Anjos Benjamin. Co-adviser: Ann Honor Mounteer.

The toxicity of several environmental pollutants has been investigated in humans and other species. Substances contained in agrochemicals, such as herbicides, can affect the reproductive systems of male and female animals. This study aimed to determine the LC₅₀ and sublethal effects of Roundup Transorb® on the testicular morphology of mature male *Hyphessobrycon eques*. Acute toxicity of Roundup Transorb® was determined in the static system according to the Brazilian standard (NBR 15088, ABNT, 2005). Adult male *Hyphessobrycon eques* of approximately 30mm length were selected for the experiments, conducted after a ten day acclimation period. Seven concentrations (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 and 32.0mg.L⁻¹), based on glyphosate, the active ingredient in Roundup Transorb® were tested and the LC₅₀ estimated using the Probit 1.5 program. The sublethal effects of Roundup Transorb® were evaluated after 96 hours of exposure at three concentrations defined as approximately 1/2, 1/4 and 1/8 of the LC₅₀. After exposure, 10 animals from each treatment were anesthetized, euthanized, weighed, measured and their testes removed. Tissue samples were fixed, embedded in historesin, sectioned with a rotating microtome and stained with toluidine blue and hematoxylin-eosin. Ten fields per animal were observed to collect histological and morphometric data. The LC₅₀ calculated at an average temperature 22.0 ± 0.71°C was 2.64 mg.L⁻¹, with a 95% confidence interval of 2.09 to 3.33 mg.L⁻¹. At an average temperature of 24.0 ± 0.20°C the LC₅₀ was 2.18 mg L⁻¹ with a 95% confidence interval of 1.75 to 2.72 mg.L⁻¹. Morphometric and histopathological changes observed at sublethal exposure concentrations included reduced tubule diameters, reduced numbers of spermatogenic cells lines (A and B spermatogonia, primary and secondary spermatocytes), spermatocyte and spermatid cysts, increased numbers of ruptured cysts and alterations related to necrosis (cytoplasmic vacuolization and nuclear pyknosis). Indices of ruptured cysts cytoplasmic vacuolization increased with increasing exposure concentration. Roundup Transorb® was found to be moderately

toxic to *Hiphessobrycon eques* and promoted morphological alterations harmful to spermatogenesis in this species at glyphosphate exposure concentrations reported to exist in the environment and permitted by Brazilian law.

1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos são os receptores de vários contaminantes, e estão susceptíveis à ação de contaminantes aéreos e terrestres que atingem estes ambientes principalmente através das chuvas.

O aumento do uso de agroquímicos começou no período da Segunda Guerra Mundial, e a partir daí intensificou-se a presença destes compostos no ambiente natural e em organismos que não constituíam o alvo inicial.

O glifosato é um dos herbicidas mais comercializados no mundo e apresenta uma toxicidade relativamente baixa. Formulações comerciais como Roundup® e Roundup Transorb® apresentam concentração grande desse princípio ativo, além da adição de surfactantes que são tóxicos para peixes.

Substâncias contidas em agroquímicos como pesticidas, herbicidas e inseticidas, podem causar efeitos negativos na reprodução de machos e fêmeas de muitas espécies. A toxicidade desses poluentes ambientais variam, conforme a concentração, tempo de exposição e temperatura da água.

O *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882) é um peixe sul-americano, onívoro, que está entre as espécies de peixes ornamentais de águas continentais mais exportadas pelo Brasil. Sua distribuição geográfica abrange a bacia do rio Paraguai e Amazonas. Atualmente, esta espécie tem sido introduzida em muitas bacias do Brasil pela prática da piscicultura (ALVES et al., 2007).

Alguns trabalhos (tese de doutorado, dissertação de mestrado e iniciação científica) relacionados com o efeito tóxico de agroquímicos em peixes já foram realizados no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, os quais estudaram o efeito do Thiodan® em testículos e brânquias de tilápia nilótica imatura, efeitos do Roundup® e do Thiodan® sobre testículos maduros de lambaris adultos e efeitos do Thiodan® sobre brânquias, ovários e fígados de fêmeas de lambaris em maturação avançada. Desta maneira o presente trabalho garante a continuidade da linha dos trabalhos ora em desenvolvimento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A agricultura e os agroquímicos no Brasil

A transformação tecnológica do processo produtivo da agricultura brasileira está relacionada com o incremento e utilização de ferramentas como agroquímicos, fertilizantes e máquinas agrícolas para aumentar a sua eficiência (RÜEGG *et al.* 1987). O agronegócio brasileiro aumentou suas exportações em US\$10 bilhões em 2005, refletindo em uma expansão na área de cultivo equivalente a 10 milhões de hectares quando comparada ao ano anterior. As principais culturas responsáveis por esse aumento foram o algodão, a soja e o trigo (BALSADI, 2005).

Os agroquímicos têm sido amplamente empregados para o controle de pragas em culturas de destaque na agricultura nacional (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005).

Em 2006, a soja foi o principal produto agrícola exportado no país, cultivada em 215.977 estabelecimentos, sendo o estado do Mato Grosso o maior produtor nacional, com 10,7 milhões de toneladas (26,2% da produção brasileira). Neste mesmo período, 46,4% dos estabelecimentos agropecuários cultivaram a soja geneticamente modificada, totalizando uma área de 4,0 milhões de hectares. Em 95,1% da área total dessa cultura foi feito o uso de agroquímico (IBGE, 2009).

Segundo a Lei 7.802/89, são considerados agroquímicos, os produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens e na proteção de florestas nativas, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. Os agroquímicos são classificados de acordo com os seus organismos-alvo, podendo então ser denominados de herbicidas, inseticidas, rodenticidas, fungicidas, dentre outros (MONSANTO, 2002; KOTAKA & ZAMBRONE, 2001).

O glifosato é o herbicida mais utilizado do mundo, sendo o Roundup® a sua principal formulação. Esse agroquímico tornou-se popular com o desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas (transgênicos) resistentes ao herbicida. O seu uso foi ampliado devido principalmente ao seu baixo custo, incentivo a crédito e juros subsidiados (MONSANTO, 2002; BAYLIS, 2000; WILLIAMS, *et al.* 2000).

2.2. Caracterização físico-química do Roundup Transorb®

O Roundup Transorb® é um herbicida produzido pela Monsanto, composto por sal de potássio de glifosato 588g/L e equivalente ácido de glifosato N-(fosfonometil)glicina 480g/L e outros ingredientes 820g/L (Figura 1).

O estado físico do Roundup Transorb® é líquido, apresenta cor amarelo clara (translúcido) e é viscoso. O seu pH (1% m/v; 20°C) é de 4,80, a densidade igual a 1326,70 kg/m³, sendo um composto miscível em água e estável em temperatura ambiente. A decomposição dessa formulação tem como produtos, algumas substâncias perigosas: o monóxido de carbono (CO), óxidos de fósforo (PxOy) e óxidos de nitrogênio (NOx) (MONSANTO, 2008).

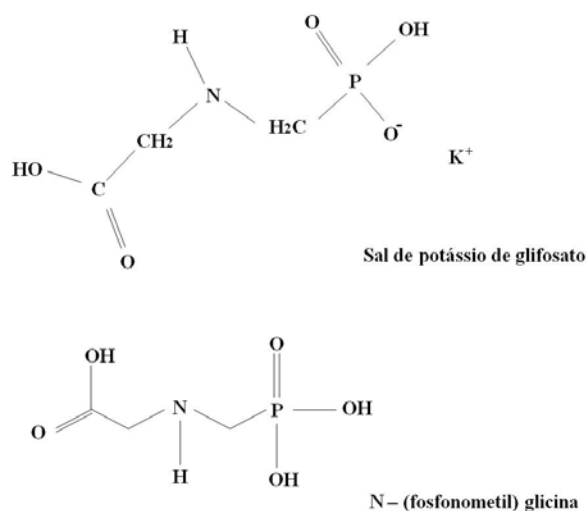


Figura 1: Fórmula estrutural do sal de potássio de glifosato e do equivalente ácido de glifosato N-(fosfonometil) glicina

2.3. Efeito tóxico do Roundup Transorb®

O Roundup Transorb® é uma formulação mais recente do glifosato, registrado no ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA) em 2007. Poucas informações se têm do seu efeito em peixes, principalmente no que diz respeito à reprodução desses animais. Sabe-se que o R. Transorb® promove alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos de *Prochilodus lineatus*. Os peixes expostos a esse tóxico apresentam um aumento nos valores de hematócrito, glóbulos vermelhos, globulos brancos e redução da atividade da acetilcolinesterase (AChE) no

cérebro e músculo, porem em níveis que não sugerem risco de vida para o animal (MODESTO E MARTINEZ, 2010).

É classificado pelo IBAMA como perigoso para o meio ambiente (MONSANTO, 2008). Algumas informações podem ser encontradas na ficha técnica do produto, que mostra que o produto apresenta toxicidade considerada moderada para a truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*.

2.4. Panorama do mercado de peixes ornamentais

Em 2005, a produção mundial de pescado foi de 142 milhões de toneladas. A maior parte deste pescado é oriunda do extrativismo, responsável por cerca de 66% da produção mundial.

O comércio de peixes ornamentais representa menos de 1% do total de todo o comércio de pescado no mundo. Mesmo assim, esse comércio alcançou US\$ 1 bilhão no atacado e ultrapassa US\$ 5 bilhões no varejo. Este mercado vem crescendo desde a década de 1980 atingindo a marca de 14% ao ano, em média (FAO, 2006). No Brasil, em 2007, a exportação de peixes ornamentais de água doce rendeu mais de 5,5 milhões de dólares. O Amazonas é o estado que mais exporta peixes ornamentais, alcançando a marca 3,5 milhões de dólares no mesmo ano, sendo o *Hyphessobrycon eques* um dos peixes mais comercializados (IBAMA, 2008).

2.5. Biologia do *Hyphessobrycon eques*

O *Hyphessobrycon eques*, conhecido popularmente como Tetra Serpa ou Mato Grosso, ocorre naturalmente desde a Amazônia até as bacias dos rios Guaporé e Paraguai. É uma espécie de pequeno porte, alcançando 4,0 cm de comprimento nos machos. Seu hábito alimentar é onívoro, alimentando-se de vermes, crustáceos, insetos e plantas. Encontra-se em ambientes bentopelágicos, com temperaturas entre 22 e 26°C, e pH entre 5,0 e 7,8. Seu modo reprodutivo é ovíparo. Esta espécie faz parte de um complexo de tetras “sangüíneos”, híbridos, que são facilmente produzidos em cativeiro, e muito comercializados para fins ornamentais (CASAL, 2010).

A sua classificação zoológica é:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Characiformes

Família: Characidae

Gênero: *Hyphessobrycon*

Espécies: *Hyphessobrycon eques*

O mato grosso, é uma presa importante para alguns peixes piscívoros, como observado por Carvalho et al. (2002) que apontam esta espécie como um dos principais itens alimentares de *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) do rio Vermelho, localizado no Pantanal Sul Mato-grossense.

2.6. Anatomia testicular de teleósteos

Os testículos de peixes teleósteos caracterizam-se, principalmente, por serem órgãos pares alongados, envolvidos por uma camada de tecido conjuntivo (túnica albugínea). Estão localizados na cavidade celômica, dorsalmente ao canal alimentar, ventralmente aos rins, e ventrolateralmente à bexiga natatória, onde encontra-se preso juntamente ao celoma pelo mesórquio. Os testículos mostram-se individualizados em toda a sua extensão, podendo se unir na extremidade caudal para formar o ducto espermático comum, que se abre na papila urogenital (LE GAC e LOIR, 1999; GRIER, 1993).

2.7. Anatomia testicular do *Hyphessobrycon eques*

O *Hyphessobrycon eques* apresenta testículos pares, alongados, localizados dorsalmente na cavidade celomática, unidos à bexiga natatória na região cranial e aos rins na região caudal. A coloração dos testículos nas três espécies do gênero *Hyphessobrycon* apresenta-se branco-leitosa quando maduros, semelhantemente aos demais teleósteos. Os testículos apresentam comprimento médio de 11,9 mm e largura média de 0,95 mm (MOJICA, 2007).

Os testículos estão individualizados na maior parte de sua extensão, revestidos por uma túnica albugínea, unindo-se na extremidade caudal formando o ducto espermático comum, que conflui para a papila urogenital (MOJICA, 2007).

2.8. Características histológicas testiculares do *Hyphessobrycon eques*

Estão presentes seis tipos de células da linhagem espermatogênica, de acordo com as fases do processo espermatogênico: espermatogônias primária e secundária, espermatócitos primário e secundário, espermatíde, e espermatozóide. Sua caracterização foi conduzida por MOJICA (2007) como transcrita a seguir.

As espermatogônias primárias são as maiores células germinativas encontradas em *H. eques*, apresentam citoplasma acidófilo, claro e abundante, cujo limite pode ser observado com dificuldade devido ao grande número de ribossomos ao redor. O núcleo é grande e esférico, localiza-se na região central do citoplasma.

As espermatogônias secundárias são semelhantes às espermatogônias primárias; contudo, são menores, com núcleo basófilo e grande, ocupando quase todo o volume celular.

Os espermatócitos primários são menores que as espermatogônias secundárias e estão aglomerados em cistos envolvidos por prolongamentos das células de Sertoli. Apresentam citoplasma hialino e escasso, quase totalmente ocupado pelo núcleo. Dentro de cada cisto encontram-se espermatócitos primários em diferentes fases de divisão celular.

Os espermatócitos secundários dificilmente são observados. Normalmente é mais comum a visualização de cistos contendo espermatócitos primários no estágio de metáfase para produzir espermatócitos secundários.

As espermatídes são menores que os espermatócitos secundários, são numerosos dentro dos cistos e apresentam núcleo esférico com cromatina em diferentes graus de condensação.

Espermatozóides são encontrados agrupados dentro dos cistos, sendo as menores células da linhagem espermatogênica, e presentes na região mais central dos túbulos; em algumas vezes, o flagelo é visível.

2.9. Bioindicadores

Tradicionalmente, a avaliação de impactos ambientais em ecossistemas aquáticos tem sido realizada por meio da medição de alterações nas concentrações de variáveis físicas e químicas. Este sistema de monitoramento, juntamente com a avaliação de variáveis microbiológicas (coliformes totais e fecais), constitui ferramenta fundamental na classificação e enquadramento de rios e córregos em classes de qualidade de água e padrões de potabilidade e balneabilidade humanas (WHITFIELD, 2001).

As amostragens de variáveis físicas e químicas fornecem somente uma fotografia momentânea do que pode ser uma situação altamente dinâmica (WHITFIELD, 2001).

Impacto ambiental pode ser definido como qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente resultante de atividades humanas que, direta ou indiretamente, afetem a saúde, a segurança e o bem-estar da população; as atividades sociais e econômicas; a biota; as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente e a qualidade dos recursos ambientais (Resolução do CONAMA n.º 01 de 23/01/86).

As comunidades biológicas de ecossistemas aquáticos são formadas por organismos que apresentam adaptações evolutivas a determinadas condições ambientais e apresentam limites de tolerância a diferentes alterações das mesmas (ALBA-TERCEDOR, 1996). Um bioindicador é definido como um organismo capaz de dar informações sobre as condições ambientais de seu habitat, por sua presença ou ausência, ou pelo seu comportamento, e como um indicador ecológico, como um parâmetro do ecossistema, descrevendo a estrutura e o funcionamento dos mesmos (VAN DER OOST et al., 2003). Desta forma, o monitoramento biológico constitui-se como uma ferramenta na avaliação das respostas destas comunidades biológicas a modificações nas condições ambientais originais.

2.10. Biomarcadores

Biomarcadores são definidos como alterações biológicas nos fluídos corporais, células ou tecidos indicativas da exposição a concentrações subletais de poluentes ambientais, detectadas em nível molecular, celular e fisiológico (LIVINGSTONE,

1993). Alterações histológicas em tecidos de peixes são ferramentas sensíveis para a detecção dos efeitos tóxicos diretos de compostos químicos em órgãos-alvo e, portanto, são indicadores potentes da exposição prévia a estressores ambientais (SCHWAIGER et al., 1997; HINTON et al., 1992). A histopatologia traduz a lesão integrada em função da duração e da intensidade da exposição ao elemento tóxico e a capacidade adaptativa de um determinado tecido (FERREIRA, 2004). Peixes são relativamente sensíveis a mudanças no ambiente. Assim, efeitos tóxicos de poluentes podem ser evidentes em células e tecidos, antes que mudanças significativas no comportamento ou na aparência externa possam ser identificadas (VAN DYK, 2005).

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

3.1 Justificativa

O *Hyphessobrycon eques* é uma espécie onívora, importante para o meio ambiente. Além disso, o tetra serpa é uma das espécies de peixe mais comercializadas, tanto para fins de exportação quanto para abastecimento do mercado interno do país, sendo muitas vezes a principal fonte de renda de famílias que vivem da comercialização desses peixes por meio de cultivo ou extrativismo. Estudar a toxicidade do Roundup Transorb® e seus efeitos na reprodução deste animal trará informações importantes que auxiliarão na investigação dos impactos ambientais causados por este herbicida, embasando projetos de conservação dos ecossistemas de água doce.

3.2. Objetivo geral

O presente trabalho pretende estudar os efeitos agudos do Roundup Transorb® nas características morfológicas do testículo de machos maduros de *Hyphessobrycon eques*.

3.3. Objetivos específicos

- Determinar a CL₅₀-96h para machos adultos de *Hyphessobrycon eques* sexualmente maduros expostos ao Roundup Transorb®;
- Avaliar histopatologicamente os testículos de machos maduros de *Hyphessobrycon eques* expostos a doses subletais do Roundup Transorb®, comparando-os com os animais do grupo controle.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Normas de conduta para uso de animais na pesquisa

Todos os procedimentos realizados no projeto seguiram as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do Departamento de Veterinária, da Universidade Federal de Viçosa (Protocolo n. 027/2011).

4.2. Infra-estrutura física e de equipamentos

Os experimentos para determinação da CL_{50} e para estudo do efeito subletal, microtomia, coloração de lâminas histológicas e as análises histológicas e morfométricas foram realizados no Departamento de Veterinária e as análises de água na Divisão de água e esgoto da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

4.3. Animais

Foram utilizados 340 peixes machos adultos da espécie *Hyphessobrycon eques*, criados em tanque de terra na Piscicultura da Prata, Eugenópolis/MG. Selecionaram-se machos adultos com comprimento padrão aproximado de 30mm (Figura 2). A sexagem baseou-se na morfologia externa do animal, como formato do corpo (mais esguio nos machos) e coloração (cores mais intensas nos machos). Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial AlconBasic contendo no mínimo 44% de proteína bruta.



Figura 2: Aspecto lateral do *Hyphessobrycon eques*. Foto de Jorge A. Dergam dos Santos, modificada por Leandro R. Nunes).

4.3 Aclimação

Os peixes foram transportados da piscicultura para o Biotério de Peixes do DVT, onde foram aclimatados por 10 dias, em aquários de 150 litros, com densidade de 1g de peixe/litro de água mantida a uma temperatura de $24,0 \pm 1^\circ\text{C}$ por meio de termostato. Foi utilizado sistema de filtração (250L/h) e aeração. Antes do início dos dois experimentos (determinação da CL_{50} -96h e teste de toxicidade) e os peixes foram submetidos a um jejum de 24 horas.

4.4. Análise de água

Foram coletadas amostras de água no início e no final do experimento com o Roundup Transorb®, sendo estas submetidas a análises na Divisão de Água e Esgoto da UFV quanto ao pH, dureza, oxigênio dissolvido (OD), nitrato, turbidez e cloreto, de acordo com os procedimentos dispostos no *Standard Methods* (APHA, 1998).

4.5. Determinação da CL_{50} do Roundup Transorb®

Foram utilizados 180 macho de *Hyphessobrycon* eques com comprimento padrão aproximado de 30mm. Foram realizados dois testes para determinação da CL_{50} , sendo primeiro realizado a uma temperatura média de 22°C e o segundo uma temperatura média de 24°C seguindo as normas técnicas de testes em sistema estático NBR 15088 (ABNT, 2005). A duração do teste foi de 96 horas, com monitoramento da mortalidade, do comportamento dos peixes e da temperatura da água a cada 6 horas. Utilizaram-se baldes com 1,5L de água sem cloro, na proporção de cinco peixes por balde. Foram utilizadas sete concentrações (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 e $32,0\text{mg.L}^{-1}$) para o primeiro experimento e quatro concentrações (1,0; 2,0; 4,0 $32,0\text{mg.L}^{-1}$) para o segundo experimento. Em ambos os experimentos foram utilizados três repetições para cada grupo tratado e controle. As concentrações utilizadas foram baseadas nos valores de CL_{50} desse agroquímico para a truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (MONSANTO, 2008). A CL_{50} foi calculada através do programa de análises Probit 1.5 (EPA, 1994).



Figura 3: Teste de determinação da CL₅₀-96h para Roundup Transorb®

4.6. Efeito subletal do Roundup Transorb®

O estudo do efeito subletal do Roundup Transorb® teve duração de 96 horas. Para mesmo, foram utilizados três tratamentos e um controle com três repetições. Os peixes foram colocados em aquários de 50L na proporção de 20 peixes por aquário. Os peixes não foram alimentados durante o experimento

As concentrações do princípio ativo do agroquímico na água foram definidas de acordo com o resultado encontrado no teste de toxicidade aguda, sendo estas 1/2, 1/4 e 1/8 do limite inferior do valor da CL₅₀.

4.7. Procedimentos para estudos histológicos

Ao final das 96 horas de exposição ao tóxico, os peixes foram retirados dos aquários, pesados e anestesiados por imersão em benzocaína na concentração de 100mg/L de água. O comprimento-padrão foi medido com auxílio de paquímetro e peso corporal em balança de precisão. A eutanásia foi conduzida pela secção medular na transição cranial cabeça-corpo.

Os peixes foram dissecados, e seu testículo direito retirado, fixado por 24 horas em paraformaldeído com tampão fosfato 0,1M e pH 7,2 e preservados em álcool 70%.

Após a fixação, foi retirado um fragmento da porção média do testículo. As amostras foram desidratadas em solução de álcool 95% por quatro horas, pré-infiltradas em solução de álcool 100% e resina glicolmetacrilato (Leica, Histoiresin) na proporção de 1:1 por 12 horas e em seguida infiltrada em resina pura por 12 horas. Após estes procedimentos o material foi incluído em resina glicolmetacrilato (Leica, Histoiresin) seguindo as especificações do fabricante.

Na microtomia os fragmentos foram seccionados em cortes de 3µm de espessura em micrótomo rotativo Leica RM2155 dotado de navalha de vidro. Os cortes foram selecionados, no sistema semi-seriado 1:6 (coletando-se um e descartando-se cinco subsequentes). Foram utilizados 12 cortes por lâmina, sendo produzidas duas lâminas por animal.

Os corantes utilizados foram hematoxilina-eosina e azul de toluidina. A montagem das lâminas foi realizada com Entellan (Merck). Os cortes foram analisados em fotomicroscópio Olympus CX31 e as imagens digitais obtidas em câmera digital SC 020 por meio do software Olympus analySIS getIT, nos aumentos de 10X e 40X.

4.8. Análise histológica

A análise histológica constituiu-se basicamente de duas etapas: análise morfométrica e análise histopatológica.

Foram amostrados 10 animais por tratamento, e para cada animal foram analisados 10 campos, comparando-se o arranjo estrutural do tecido dos animais de cada tratamento com o arranjo dos animais do grupo controle.

Os dados morfométricos foram obtidos por meio de contagens e mensurações de núcleos de células da linhagem espermatogênica (espermatogônias A e B, espermatócitos I e II), dos cistos de espermatócitos I e II e de espermatíde e de túbulos seminíferos.

Para a contagem, utilizou-se quadrícula de $0,01\text{mm}^2$ com 400 pontos de interseção (Figura 4). No presente trabalho contou-se o número absoluto dos cistos e células posicionados no limite da área da gradícula.

Foram mensurados seis núcleos de espermatogônia A e B, espermatócito I e II, seis cistos de espermatócitos I e II e de espermátides e seis túbulos seminíferos por animal.

O diâmetro médio foi calculado a partir, do valor de dois diâmetros dispostos perpendicularmente entre si (Figura 5). As mensurações foram realizadas no programa Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, 2005).

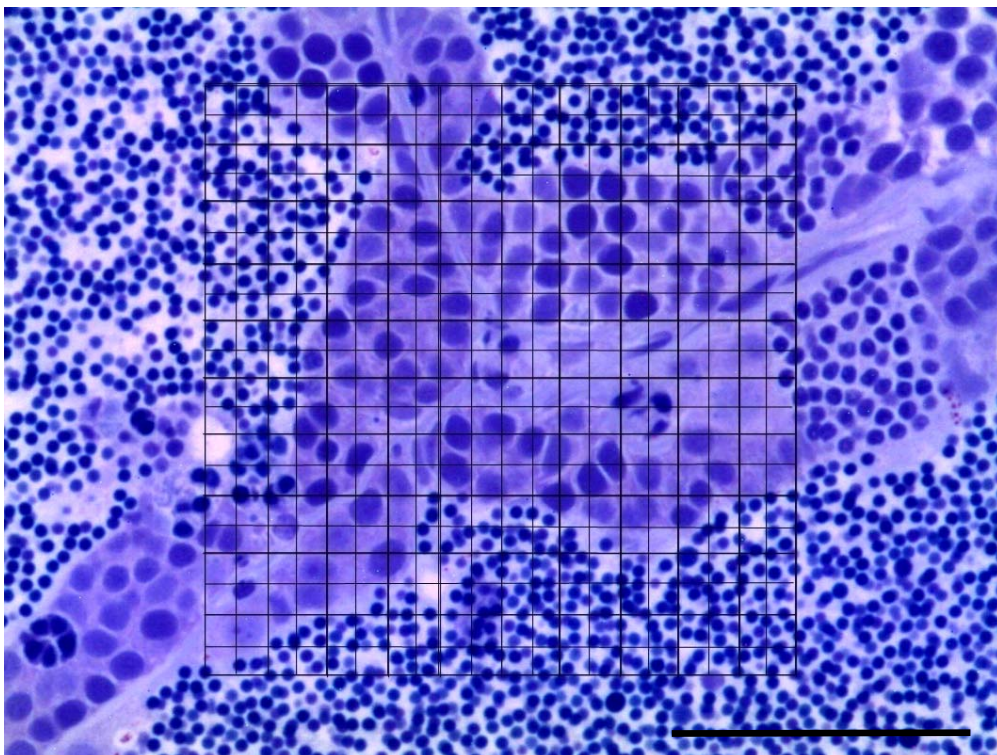


Figura 4: Fotomicrografia de testículo de *Hyphessobrycon eques* submetidos ao teste de efeito subletal do Roundup Transorb®. Gradícula de $0,01\text{mm}^2$ com 400 pontos de interseção, utilizada para as contagens nas análises morfológicas. Barra $50\mu\text{m}$. Azul de toluidina.

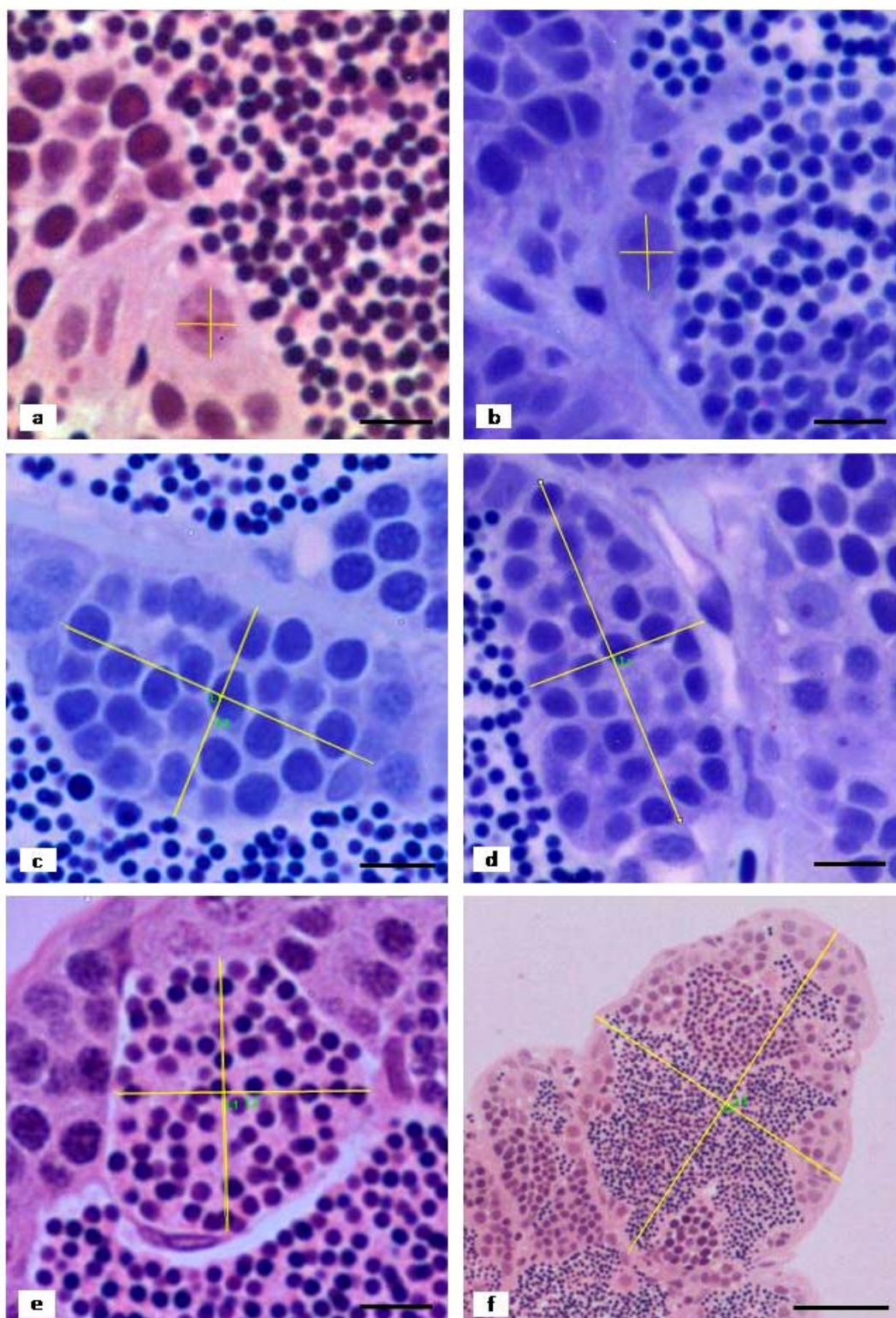


Figura 5: Fotomicrografia de testículos de *Hyphessobrycon eques* submetidos ao teste de efeito subletal do Roundup Transorb®, demonstrando a medição das estruturas estudadas. Em (a) núcleo de espermatogônia A, (b) núcleo de espermatogônia B, (c) cisto de espermatócitos I, (d) cisto de espermatócitos II, (e) cisto de espermatídes e em (f) túbulos seminíferos. Barra a, b, c, d, e (10µm); f (50µm). Azul de toluidina (b, c, d) e hematoxilina-eosina (a, e, f).

Foram analisados os seguintes parâmetros histopatológicos: hipotrofia nuclear e redução do número de células da linhagem espermatogênica (espermatogonia A e B, espermatócito I e II); hipotrofia, rompimento e redução do número de cistos de espermatócito I e II e espermátide; vacuolização citoplasmática, bem como alterações dos índices de cistos rompidos ICR (%), índice de vacuolização citoplasmática IVC (%) determinados por este trabalho; picnose nuclear e fibrose.

O índice de cistos rompidos é dado pela porcentagem dos mesmos em relação ao número total de cistos, e foram aplicados para espermatócitos primários, espermatócitos secundários e espermátides, como seguem:

Índice de cistos rompidos de espermatócitos primários (Spc I):

$$ICR = \left(\frac{n^{\circ} \text{ cistos de Spc I rompidos}}{n^{\circ} \text{ total de cistos de Spc I}} \right) \times 100$$

Índice de cistos rompidos de espermatócitos secundários (Spc II):

$$ICR = \left(\frac{n^{\circ} \text{ cistos de Spc II rompidos}}{n^{\circ} \text{ total de cistos de Spc II}} \right) \times 100$$

Índice de cistos rompidos de espermátides (Sptd):

$$ICR = \left(\frac{n^{\circ} \text{ cistos de Sptd rompidos}}{n^{\circ} \text{ total de cistos de Sptd}} \right) \times 100$$

O índice de vacuolização citoplasmática é dado pela porcentagem de células afetadas por esta histopatologia em relação ao número total de células do mesmo tipo, sendo calculada para espermatogônias, espermatócitos primários e espermatócitos secundários. Como em muitos casos não foi possível diferenciar espermatogonia A e B devido ao nível de vacuolização e picnose nas células, o índice de vacuolização citoplasmática em espermatogônias foi obtido pela razão entre o número de espermatogônias vacuolizadas e o número total de espermatogônias.

Índice de vacuolização citoplasmática em espermatogônias (Spg):

$$IVC = \left(\frac{n^{\circ} \text{ Spgs vacuolizadas}}{n^{\circ} \text{ total Spgs}} \right) \times 100$$

Índice de vacuolização citoplasmática em espermatócitos I (Spc I):

$$IVC = \left(\frac{n^{\circ} \text{ Spc I vacuolizados}}{n^{\circ} \text{ total de Spc I}} \right) \times 100$$

Índice de vacuolização citoplasmática em espermatócitos II (Spc II):

$$IVC = \left(\frac{n^{\circ} \text{ Spc II vacuolizado}}{n^{\circ} \text{ total de Spc II}} \right) \times 100$$

4.9. Análise estatística

Os dados foram submetidos aos testes de homocedasticidade (Levene's) e normalidade (Kolmogorov Smirnov). Quando os dados analisados atenderam as premissas de homogeneidade e normalidade, foi conduzida análise de variância. Ocorrendo significância foi realizado o teste de comparação de médias de Duncan e Tukey, dependendo da instabilidade da variável para evitar erros estatísticos tipo I e II. Foi utilizado o programa Statistica 8.0 (Statsoft, EUA, 2009), com grau de significância de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação da CL₅₀-96h do Roundup Transorb® para *H. eques*.

Foram observadas alterações comportamentais dos peixes submetidos a ação do tóxico, ao longo dos experimentos. No instante inicial da contaminação (0h), os animais submetidos às maiores concentrações apresentaram um comportamento agitado e batimento opercular acelerado. Entre 1 e 24 horas de intoxicação alguns peixes apresentavam natação errática, outros, perda do equilíbrio e batimento opercular reduzido. As alterações comportamentais foram semelhantes nos dois testes de toxicidade (22°C e 24 °C). Tais alterações foram observadas também por Montoya (2008), em *Oreochromis niloticus* e por Silva Filho (2010) e Moraes (2011) em *Astyanax aff. bimaculatus*.

A maior mortalidade foi observada nas primeiras 24 horas nos dois experimentos. Ao final das 96 horas não foi constatada mortalidade nos grupos controle dos dois experimentos de determinação da CL₅₀, validando o teste de toxicidade segundo as normas da ABNT (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1: Mortalidade acumulada em função do tempo de exposição do *H. eques* durante o teste de determinação da CL₅₀-96h do Roundup Transorb® com temperatura média de 22°C.

Tratamento	Mortalidade acumulada (%) / Tempo de exposição			
	24h	48h	72h	96h
Controle	0,0	0,0	0,0	0,0
0,5mg.L ⁻¹	0,0	0,0	0,0	0,0
1,0mg.L ⁻¹	0,0	0,0	6,7	6,7
2,0mg.L ⁻¹	0,0	6,7	6,7	13,3
4,0mg.L ⁻¹	0,0	60,0	80,0	86,7
8,0mg.L ⁻¹	100	100	100	100
16,0mg.L ⁻¹	100	100	100	100
32,0mg.L ⁻¹	100	100	100	100

Tabela 2: Mortalidade acumulada em função do tempo de exposição do *H. eques* durante o teste de determinação da CL₅₀-96h do Roundup Transorb® com temperatura média de 24°C.

Tratamento	Mortalidade acumulada (%) / Tempo de exposição			
	24h	48h	72h	96h
Controle	0,0	0,0	0,0	0,0
1,0mg.L ⁻¹	0,0	0,0	6,7	6,7
2,0mg.L ⁻¹	6,7	6,7	20,0	26,7
4,0mg.L ⁻¹	6,7	13,3	100	100
8,0mg.L ⁻¹	100	100	100	100

A CL_{50} calculada, a uma temperatura média foi de $22,0 \pm 0,71^{\circ}C$ foi de $2,64 \text{ mg.L}^{-1}$, com o limite inferior de $2,09 \text{ mg.L}^{-1}$ e superior de $3,33 \text{ mg.L}^{-1}$. Com temperatura de $24,0 \pm 0,20^{\circ}C$ a CL_{50} foi de $2,18 \text{ mg.L}^{-1}$ com o limite inferior de $1,75 \text{ mg.L}^{-1}$ e superior de $2,72 \text{ mg.L}^{-1}$, considerando o produto moderadamente tóxico de acordo com a classificação de Zucker (1985) (Tabela 3; Figuras 6 e 7).

A toxicidade do Roundup Transorb[®] é aproximadamente de 4 a 400 vezes maior que a toxicidade dos dois herbicidas de mesmo princípio ativo, já testado para essa mesma espécie de peixe. Cruz et al. (2007) e Gomes, (2007), relataram uma CL_{50} de $9,30 \text{ mg.L}^{-1}$ (Roundup WG[®]) e maior que $975,0 \text{ mg.L}^{-1}$ para Roundup Rodeo[®], respectivamente (Tabela 3). A diferença de toxicidade entre os herbicidas de mesmo princípio ativo deve-se ao fato de que os mesmos apresentam diferentes componentes inertes. Os surfactantes são ingredientes que contribuem com aproximadamente 50% da toxicidade dos herbicidas, e podem ser mais tóxicos que o ingrediente ativo para os organismos aquáticos (OAKES & POLLAK, 2000).

Carrachi et al. (2011) estudaram a toxicidade dos surfactantes em mato grosso e observaram que, os valores de CL_{50} dos surfactantes Energic[®], Agral[®], Gotafix[®], Aterbane[®] BR e Fixade[®] variam entre $2,34$ (Energic[®]) e $34,95 \text{ mg.L}^{-1}$ (Ag-Bem[®]). Tais surfactantes foram classificados como moderadamente tóxicos (CL_{50} entre $1,00$ e $10,00 \text{ mg.L}^{-1}$), e o Ag-Bem[®], como pouco tóxico (CL_{50} entre $10,00$ e $100,00 \text{ mg.L}^{-1}$) de acordo com a classificação de Zucker (1985). Não é sabida a composição dos ingredientes inertes referenciados no rótulo do Roundup Transorb[®].

O manejo inadequado destes agroquímicos pode acarretar a deriva destas substâncias no ambiente, atingindo organismos não alvos como os peixes, com uma toxicidade 375 vezes maior que outras formulações de herbicidas como o Roundup Rodeo[®].

Tabela 3: CL_{50} de diferentes herbicidas a base de glifosato para *H. eques*.

Parâmetro	Rodeo ^{®(a)}	Roundup WG ^{®(b)}	Transorb [®] 22°C ^(c)	Transorb [®] 24°C ^(c)
CL_{50} <i>h. eques</i>	>975,00	9,30	2,64	2,18
Limite superior	-	9,84	3,33	2,75
Limite inferior	-	8,80	2,09	1,72

(a) Cruz et al. (2007).

(b) Gomes, G.R. (2007).

(c) CL_{50} calculada pelo presente trabalho.

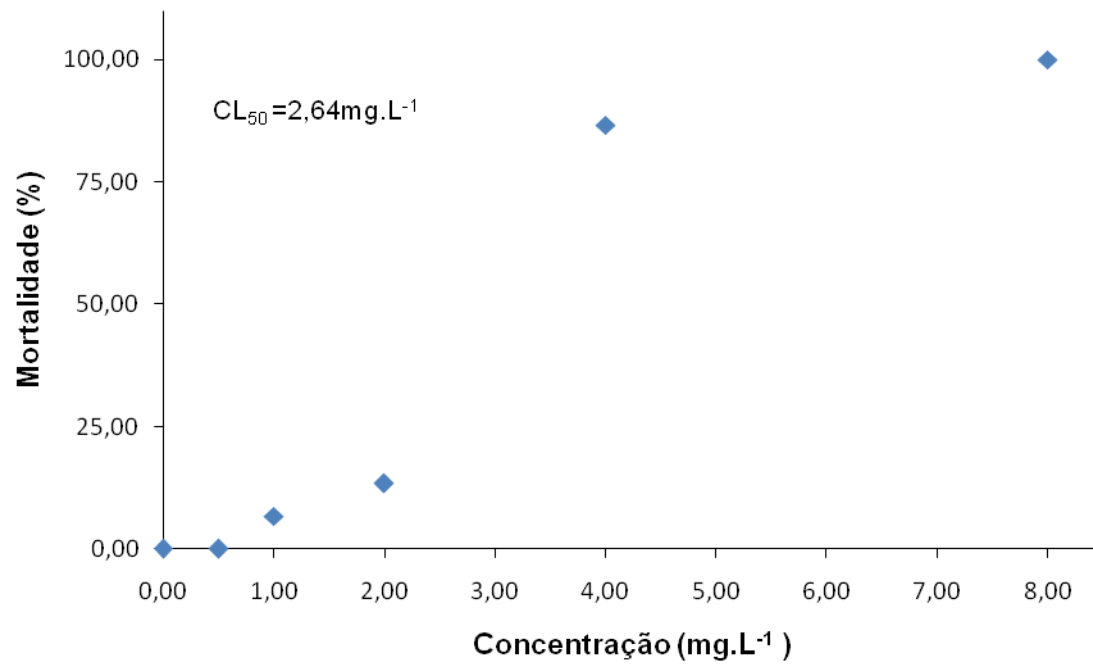


Figura 6: Concentração-resposta do teste de determinação da CL₅₀ do herbicida Roundup Transorb[®] para *H. eques* em temperatura média de 22°C

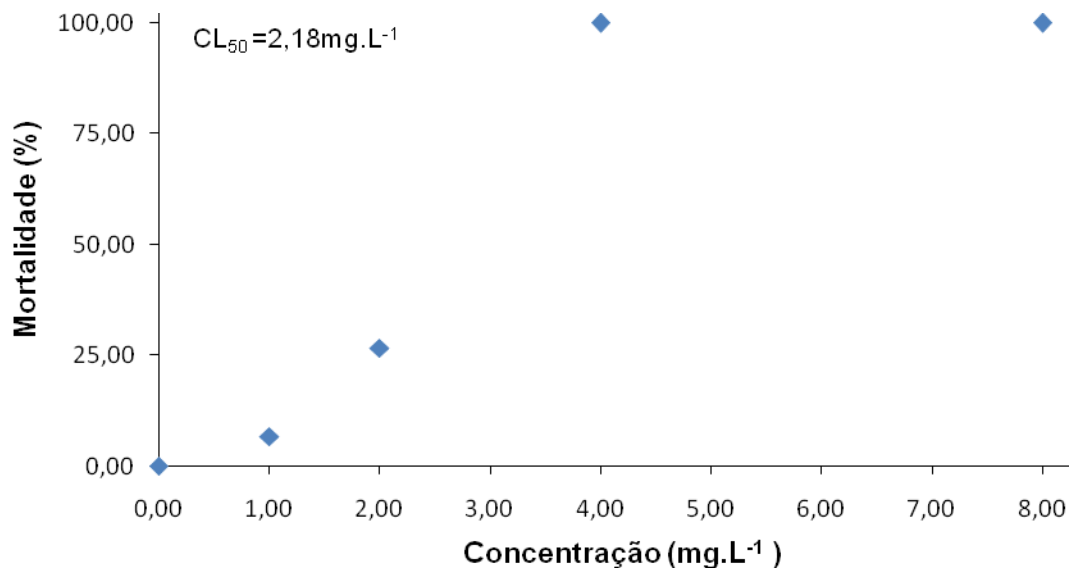


Figura 7: Concentração-resposta do teste de determinação da CL₅₀ do herbicida Roundup Transorb[®] para *H. eques* em temperatura média de 24°C

5.2. Efeito subletal do Roundup Transorb®

5.2.1. Peso e comprimento dos peixes amostrados

Os peixes utilizados neste experimento apresentaram peso médio de 0,49g, comprimento padrão de 27,95mm e total de 35,45mm, não havendo diferença ($P>0,05$) desses valores entre os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4: Valores médios e desvio-padrão do peso corporal e comprimentos padrão e total do *H. eques* submetidos ao teste de efeito subletal do Roundup Transorb®.

Tratamento	Peso corporal (g)	Comprimento padrão (mm)	Comprimento total (mm)
Controle	0,49±0,10	27,75±1,00	31,13±1,61
0,25mg.L ⁻¹	0,50±0,10	28,36±1,90	31,33±1,78
0,50mg.L ⁻¹	0,50±0,13	27,81±2,78	31,36±2,10
1,00mg.L ⁻¹	0,47±0,05	27,78±1,18	31,06±1,17

Não houve diferença ($P>0,05$) pelo teste de Tukey.

5.2.2. Parâmetros físico-químicos da água

Os parâmetros físico-químicos (pH, OD, DBO, Nitrato, Cloreto e Turbidez) da água utilizada no experimento, mostram que a mesma está enquadrada nos padrões de qualidade de água do CONAMA e padrões referenciados para teleósteos e para a espécie na literatura (Tabela 5). As águas de Classe 1 são aquelas que podem ser destinadas ao consumo humano (tratamento simplificado prévio), irrigação de hortaliças, bem como a proteção das comunidades aquáticas (CONAMA nº 357/2005).

A temperatura média da água dos grupos experimentais variou entre 25,0±0,20°C; 25,0±0,23°C, não havendo diferença ($P>0,05$) entre as mesmas (Tabela 5). A temperatura da água no experimento esteve dentro da faixa ideal para *Hyphessobrycon eques* que é de 22 a 26°C (CASAL, 2010).

O pH variou entre 6,51 à 6,93 dentre os tratamentos (Tabela 5), estando dentro da faixa ideal para a espécie que é de 5,0 a 7,8 (CASAL, 2010).

Os valores de dureza total variaram entre 34,27 e 34,64mg.L⁻¹ (CaCO₃), o que está dentro da margem ideal para cultivo de peixes de água doce que é de 20 a 400mg.L⁻¹ (SWANN, 2008).

Tabela 5: Parâmetros físico-químicos da água utilizada em cada tratamento no teste de efeito subletal do Roundup Transorb® na morfologia testicular de *Hyphessobrycon eques* e valores de referência da Legislação brasileira e literatura.

Parâmetro	Tratamentos				Valor de referência
	Controle	0,25mg.L ⁻¹	0,50mg.L ⁻¹	1,00mg.L ⁻¹	
Temperatura (°C)	25,0 ± 0,2	25,0 ± 0,2	25,0 ± 0,2	25,0 ± 0,1	22-26 °C (**)
pH	6,5	6,8	6,5	6,9	6,0-9,0 (*)
OD (mg.L ⁻¹ O ₂)	7,0	7,5	7,0	7,0	>6,0 (**)
DBO (mg.L ⁻¹ O ₂)	1,2	2,9	2,2	1,8	<3, 0 (*)
Nitrato (mg.L ⁻¹ N)	2,9	2,4	2,3	1,9	<10,00 (*)
Cloreto (mg.L ⁻¹ Cl)	4,1	4,5	4,5	5,0	<250,00 (*)
Dureza total (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	34,3	32,6	32,6	34,3	20-400 (***)
Turbidez (NTU)	0,1	1,1	1,1	1,1	<40,00 (*)

Temperatura - Média e desvio-padrão. Não houve diferença (P>0,05) pelo teste de Tukey.

(*) CONAMA 357/05 (Classe 1) - Conselho Nacional do Meio Ambiente.

(**) CASAL (2010).

(***) SWANN (2008).

5.2.3. Análises morfométricas e histopatológicas

Não foi constatada diferença (P<0,05) no diâmetro médio dos núcleos de espermatogônia A e B (Spg A e B), espermátócitos I e II (Spc I e II) e dos cistos de Spc I e II. O diâmetro médio de cistos de espermátides (Sptd) foi menor nos grupos tratados em relação ao grupo controle (Tabela 6).

A redução do diâmetro médio dos cistos de espermátides poderia estar associada à redução do número destas células nos cistos. Experimentos em ratos e em tilápia nilótica mostram que a capacidade de suporte dos cistos é reduzida à medida que ocorre o aumento da densidade de células de Sertoli formando os cistos, reduzindo o número de células germinativas nos mesmos (MATTA et al. 2002 e HESS et al. 1993). Como o presente trabalho não teve o objetivo de quantificar as células de Sertoli nem núcleos de espermátide, não foi possível inferir que existe relação entre a redução do diâmetro dos cistos de espermátides e número de células de Sertoli nos mesmos (Tabela 6).

Houve redução do diâmetro médio dos túbulos seminíferos do grupo tratado com a maior concentração (1,0mg.L⁻¹) em relação aos demais tratamentos e grupo controle (P<0,05). Segundo Van Haaster et al. (1992), a redução do diâmetro tubular

está relacionada com a redução do número de células germinativas e da secreção de fluido produzido pela célula de Sertoli (Tabela 6).

Tabela 6: Valores médios e desvio-padrão para diâmetro dos núcleos de espermatogônia A e B (Spg A e B), núcleos de espermatócito I e II (Spc I, Spc II), dos cistos de Spc I, Spc II e espermatídes (Sptd) e dos túbulos seminíferos de *Hyphessobrycon eques* submetidos ao teste de efeito subletal do Roundup Transorb[®], em função do tratamento.

Parâmetro (µm)	Controle	0,25mg.L ⁻¹	0,50mg.L ⁻¹	1,00mg.L ⁻¹
n	60	60	60	60
SpGA	7,20 ± 0,23	7,20 ± 0,25	7,10 ± 0,29	7,10 ± 0,33
SpGB	6,10 ± 0,28	6,10 ± 0,25	6,10 ± 0,23	6,00 ± 0,16
SpCI	5,30 ± 0,29	5,30 ± 0,26	5,20 ± 0,51	5,10 ± 0,61
SpCII	4,00 ± 0,18	4,10 ± 0,31	4,10 ± 0,21	4,10 ± 0,20
Cisto Spc I	40,40 ± 5,99	40,80 ± 5,80	41,80 ± 6,30	40,50 ± 6,42
Cisto Spc II	30,80 ± 3,63	31,80 ± 4,92	32,60 ± 4,15	30,10 ± 2,75
Cisto Sptd	29,14 ± 3,27c	23,28 ± 3,06b	20,98 ± 1,69a	20,02 ± 1,95a
Túbulo seminífero	228,00 ± 43,30b	206,38 ± 41,69b	202,10 ± 40,93b	175,17 ± 25,59a

Valores com letras subscritas distintas nas linhas indicam diferença (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Houve redução no número de células da linhagem espermatogênica (SpG A, SpG B, SpC I) e cistos de SpC I. A redução do número de SpC I nos grupos tratados com as duas maiores concentrações (0,5; 1,0mg.L⁻¹) estaria relacionada com a redução do número de cistos, visto que, não foram encontradas diferença no diâmetro dos mesmos em nenhum tratamento. Não foi constatada diferença no número de SpC II, bem como no número de cistos dos mesmos e de cistos de Sptd. (Tabela 7).

O número médio de cistos de SpC I rompidos variou entre os grupos tratados, com o menor valor sendo encontrado no grupo controle e no grupo tratado com 1,0mg.L⁻¹ do princípio ativo do agroquímico testado. Houve diferença do número de cistos de SpC II (P<0,05) apenas entre os grupos tratados com a concentração de 1,0mg.L⁻¹ e grupo controle. Para SpC II houve diferença (P<0,05) entre os grupos tratados com as concentrações de 0,50 e 1,0mg.L⁻¹ e o grupo controle. Os valores médios de cistos rompidos de SpC II e Sptd foram maior nos grupos tratados em relação ao controle (Tabela 7).

Houve um aumento no número de cistos rompidos e uma redução na quantidade cistos nos tratamentos para alguns tipos celulares (Figuras 8, 10 e 12). É evidente que o rompimento dos cistos em animais, que já possuem um número

reduzido dos mesmos, é mais representativo em relação a animais que possuem quantidade de cistos dentro da faixa normal dos mesmos.

Nota-se que houve aumento do ICR de Spc I, Spc II e Sptd, principalmente nos grupos tratados com as maiores concentrações, chegando a 25,78; 25,81 e 26,32% dos cistos Spc I, Spc II e Sptd, respectivamente (Tabela 9) (Figuras 9, 11 e 13), com comprometimento da manutenção do ambiente ideal para o desenvolvimento sincrônico de suas células germinativas.

É importante salientar que em grupos que não apresentaram diferença ($P>0,05$) para o número absoluto de cistos rompidos, ao compará-los novamente utilizando os valores de ICR passaram a apresentar diferença ($P<0,05$). Tal fato pode ser percebido nos grupos tratados com as concentrações de 0,25 e 0,50mg.L⁻¹, para os cistos de Spc I e Spc II, mostrando que este modelo é mais sensível para a avaliação histopatológica (Tabelas 8 e 9).

A célula de Sertoli tem como principais funções, a formação da barreira hemotesticular, síntese de esteróides, nutrição das células germinativas e fagocitose de corpos residuais e excesso de citoplasma formado com o desenvolvimento das espermatídes (GRIER et al., 1989; SILVA & GODINHO, 1989; GRIER et al., 1980 GRIER et al., 1978). Desta maneira, a manutenção do ambiente dos cistos para o desenvolvimento sincrônico das células germinativas estaria comprometida com o rompimento de tais células, seja pela redução ou perda de suas funções.

Tabela 7: Número médio e desvio-padrão dos núcleos de espermatogônias A e B (Spg A e B), espermatócito I e II (Spc I e II), de cistos de Spc I e Spc II e Sptd em 0,01mm² de área de testículo de *H. eques* submetidos ao teste de efeito subletal do Roundup Transorb[®].

Tratamentos	Controle	0,25mg.L ⁻¹	0,50mg.L ⁻¹	1,00mg.L ⁻¹
n	10	10	10	10
SpgA	2,49 ± 1,28c	2,42 ± 1,29cb	1,83 ± 1,47ba	1,63 ± 1,01a
SpgB	5,82 ± 2,75b	4,15 ± 2,46ab	3,16 ± 2,37a	3,11 ± 2,14a
SpcI	24,84 ± 9,36b	23,53 ± 10,65b	18,72 ± 11,04a	16,55 ± 11,8a
SpcII	19,09 ± 7,20	18,47 ± 10,61	15,03 ± 9,28	14,54 ± 10,73
Cistos Spc I	1,68 ± 0,32b	1,12 ± 0,48a	0,91 ± 0,64a	0,97 ± 0,36a
Cistos Spc II	1,46 ± 0,48	1,25 ± 0,57	1,15 ± 0,41	1,24 ± 0,44
Cistos Sptd	1,31 ± 0,44	1,03 ± 0,26	0,98 ± 0,53	0,95 ± 0,54

Valores com letras subscritas distintas nas linhas indicam diferença ($P<0,05$) pelo teste de Duncan.

Tabela 8: Número médio e desvio-padrão de cistos totais (CT) e cistos rompidos (CR) de espermatócitos I e II (Spc I e II) e espermatíde (Sptd) por 0,01mm² de área de testículo de *H. eques* submetidos ao teste de efeito subletal do Roundup Transorb[®].

Parâmetro	Controle	0,25mg.L ⁻¹	0,50mg.L ⁻¹	1,00mg.L ⁻¹
n	10	10	10	10
CT Spc I	1,68 ± 0,32b	1,12 ± 0,48a	0,91 ± 0,64a	0,97 ± 0,36a
CT Spc II	1,46 ± 0,48	1,25 ± 0,57	1,15 ± 0,41	1,24 ± 0,44
CT Sptd	1,31 ± 0,44	1,03 ± 0,26	0,98 ± 0,53	0,95 ± 0,54
CR Spc I	0,05 ± 0,05a	0,16 ± 0,20ab	0,21 ± 0,29ab	0,25 ± 0,18b
CR Spc II	0,06 ± 0,07a	0,16 ± 0,20ab	0,28 ± 0,27b	0,32 ± 0,18b
CR Sptd	0,07 ± 0,05a	0,22 ± 0,15b	0,26 ± 0,21b	0,25 ± 0,23b

Valores com letras subscritas distintas nas linhas indicam diferença (P<0,05) pelo teste de Duncan.

Tabela 9: Índice ± desvio-padrão de cistos rompidos (ICR) de espermatócitos I e II (Spc I e II) e espermatídes (Sptd) por 0,01mm² de área de testículo, de *H. eques* submetidos ao teste de efeito subletal do Roundup Transorb[®].

Parâmetro	Índice de cistos rompidos (ICR(%))			
	Controle	0,25mg.L ⁻¹	0,50mg.L ⁻¹	1,00mg.L ⁻¹
N	10	10	10	10
Spc I	2,98±2,83a	14,29 ±19,63ab	23,08±20,47b	25,78±24,52b
Spc II	3,56±4,37a	12,80±10,82a	24,35±23,11b	25,81±13,78b
Sptd	5,34±3,94a	21,36±16,10b	26,53±17,23b	26,32±16,84b

Valores com letras subscritas distintas nas linhas indicam diferença (P<0,05) pelo teste de Duncan.

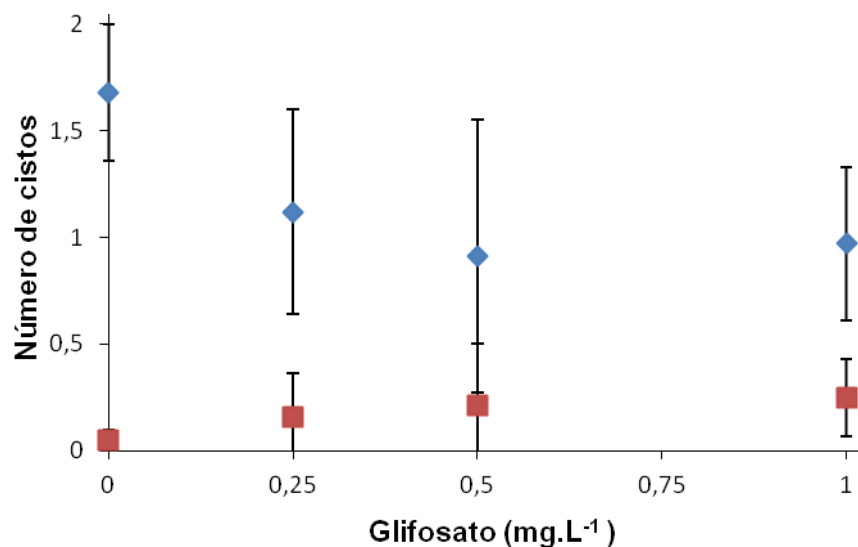


Figura 8: Número médio e barras de desvio-padrão do total de cistos (azul) e de cistos rompidos (vermelho) de espermatócitos primário (Spc I), por 0,01mm² de área de testículo de *H. eques* submetidos ao teste de efeito subletal do Roundup Transorb[®].

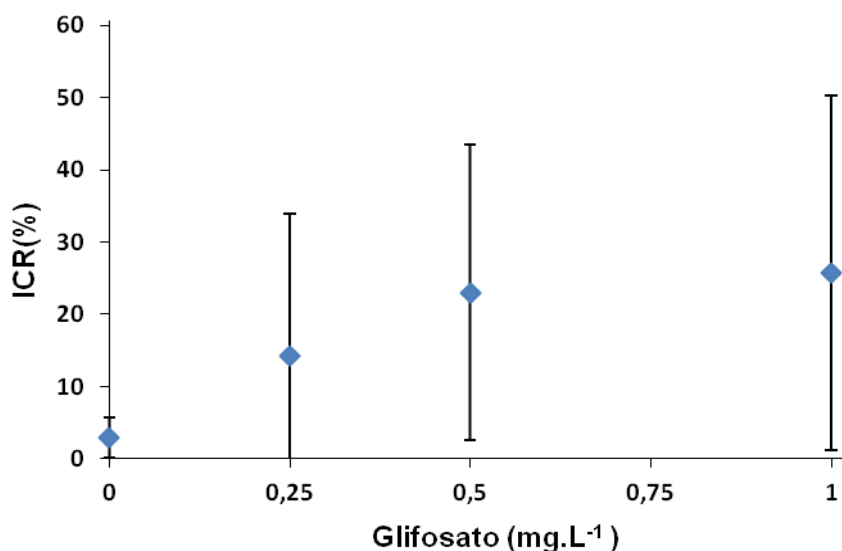


Figura 9: Índice de cistos rompidos (ICR) e barras de desvio-padrão de espermatócito I (Spc I) por 0,01mm² de área de testículo de *H. eques* submetidos ao teste de efeito subletal do Roundup Transorb[®].

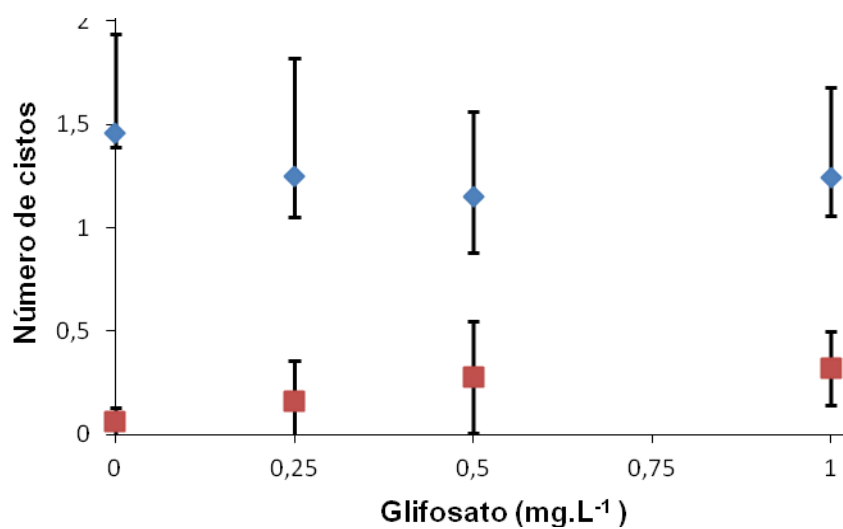


Figura 10: Número médio e barras de desvio-padrão do total de cistos (azul) e cistos rompidos (vermelho) de espermatócito II (Spc II), por 0,01mm² de área de testículo de *H. eques* submetidos ao teste de efeito subletal do R. Transorb[®].

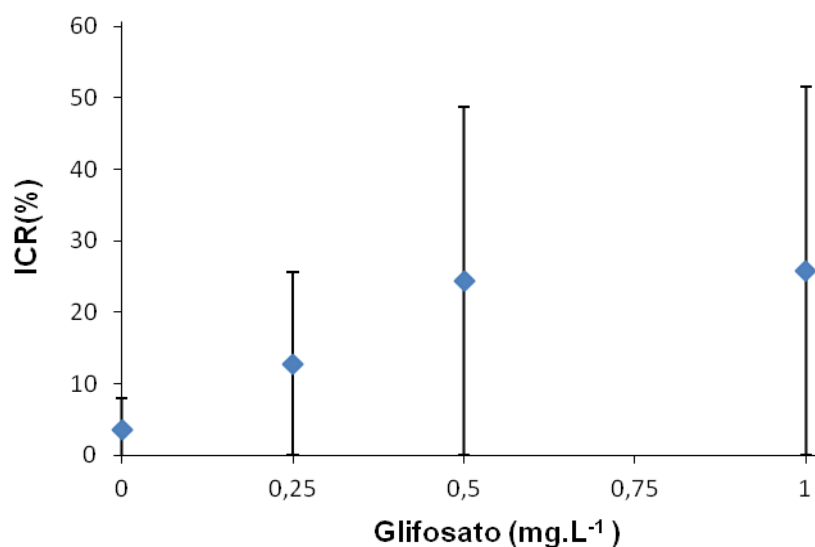


Figura 11: Índice de cistos rompidos (ICR) e barras de desvio-padrão de espermatócito II (Spc II) por 0,01mm² de área de testículo de *H. eques* submetidos ao teste de efeito subletal do Roundup Transorb[®].

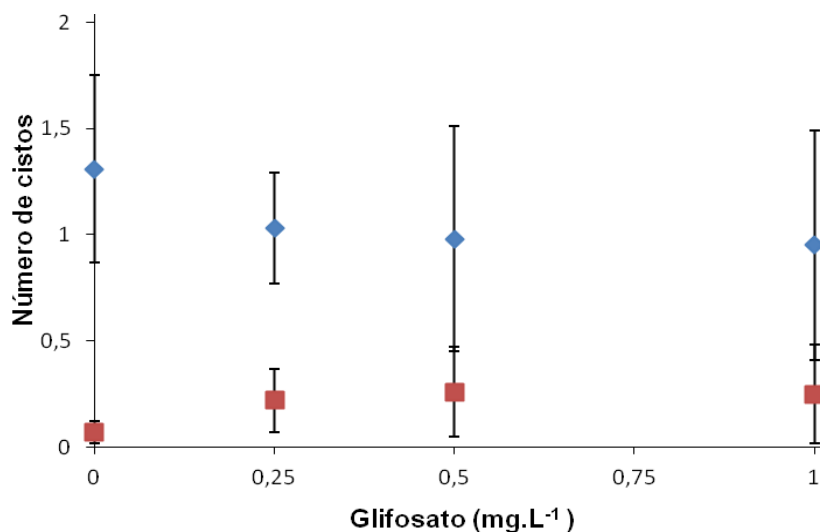


Figura 12: Número médio e barras de desvio-padrão do total de cistos (azul) e cistos rompidos (vermelho) de espermatide (Sptd), por 0,01mm² de área de testículo de *H. eques* submetidos ao teste de efeito subletal do Roundup. Transorb[®].

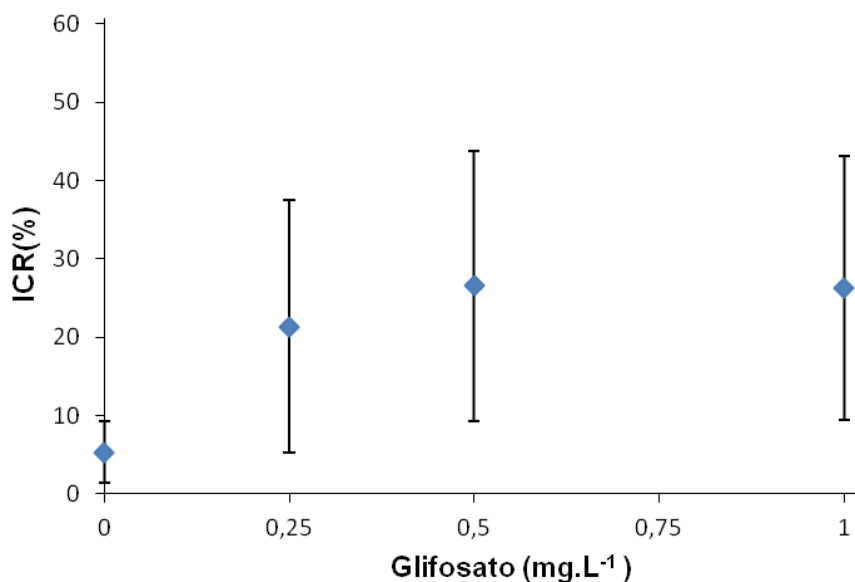


Figura 13: Índice de cistos rompidos (ICR) e barras de desvio-padrão de espermatide Sptd por 0,01mm² de área de testículo de *H. eques* submetidos ao teste de efeito subletal do Roundup Transorb[®].

5.2.4. Análise histopatológica

Alem das alterações morfológicas já relatadas discutidas no tópico anterior, foram encontradas também patologias ligadas ao processo de necrose como vacuolização citoplasmática em espermatogônias A e B (Spg A e Spg B), espermatócitos I e II (Spc I e Spc II), pichnose nuclear e fibrose (Figura 14).

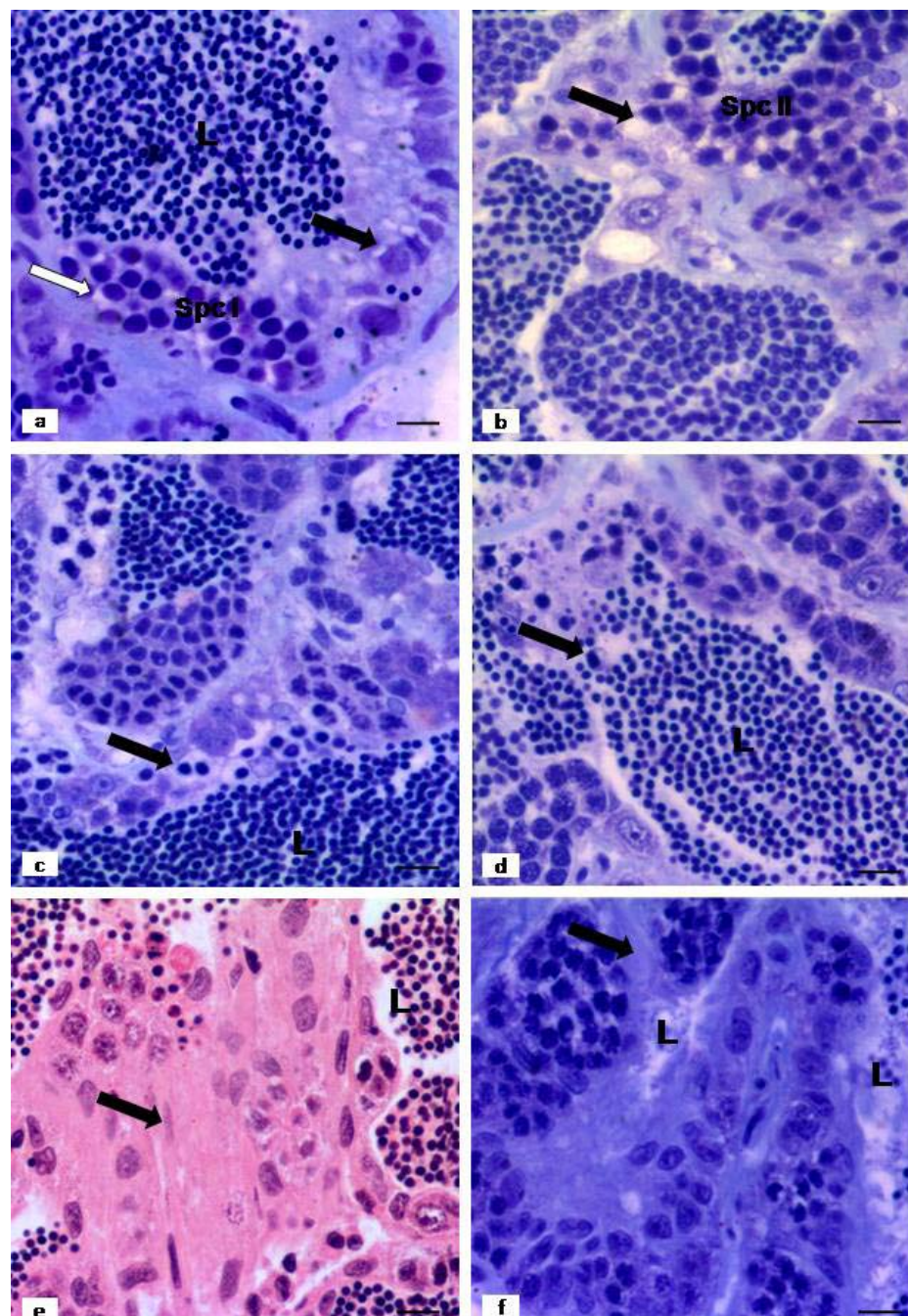


Figura 14: Fotomicrografia de testículo de *H. equus* expostos ao R. Transorb®, demonstrando patologias ligadas aos processos de necrose. Em (a) Vacuolização citoplasmática em Spg (seta preta) e Spc I (seta branca), (b) Vacuolização Spc II, (c) e (d) pichnose nuclear (setas pretas) e em (e) e (f) Fibrose.

A necrose é descrita como um fenômeno multicelular, com estudos moleculares revelando que o primeiro evento observado é a alteração na bomba de sódio e potássio da membrana celular, provocando edema intracelular. Quando as enzimas lisos somais digerem as organelas citoplasmáticas, o citoplasma adquire um aspecto vacuolizado (ZAKERI & LOCKSHIN, 2002).

O número médio de vacuolizações citoplasmáticas foi maior ($P < 0,05$) nos grupos tratados, em relação ao grupo controle. O maior índice de vacuolização foi constatado no grupo tratado com a maior concentração, onde cerca de 25% das espermatogônias apresentaram citoplasma com aspecto vacuolizado (Tabela 10). Foi encontrada também, vacuolização no citoplasma de Spc I e II; porém, o número foi pouco expressivo em Spc I e II quando comparados, com os valores encontrados para espermatogônias, para o grupo tratado com a maior concentração ($1,00\text{mg.L}^{-1}$) (Tabela 11 e 12). Estas alterações foram encontradas também em machos de *Lebistes reticulatus*, tratados com sulfato de zinco por 20 dias (SEHGAL & SAXENA, 1986) e em espermatogônias de *Astyanax aff. bimaculatus* tratados com RoundupTM e Thiodan[®] por um período de 96h (SILVA FILHO, 2010).

Tabela 10: Índice $\pm$ desvio-padrão de vacuolização citoplasmática (IVC) em espermatogônias (Spg) por $0,01\text{mm}^2$ de área de testículo de *H. eques* submetidos ao teste de efeito subletal do Roundup Transorb[®].

Parâmetros	Controle	$0,25\text{mg.L}^{-1}$	$0,50\text{mg.L}^{-1}$	$1,00\text{mg.L}^{-1}$
n	10	10	10	10
Vacuolização Spg	$0,14 \pm 0,18a$	$0,65 \pm 0,46b$	$0,63 \pm 0,55b$	$1,27 \pm 0,94b$
Total de Spg	$8,31 \pm 2,81c$	$6,57 \pm 1,62bc$	$4,99 \pm 1,59ab$	$4,74 \pm 1,25a$
IVC (%)	$1,68 \pm 2,71a$	$9,90 \pm 10,58b$	$12,63 \pm 10,71b$	$26,80 \pm 20,67c$

Valores com letras subscritas distintas nas linhas indicam diferença ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

Tabela 11: Índice $\pm$ desvio-padrão de vacuolização citoplasmática (IVC) em espermatócito I (Spc I) por $0,01\text{mm}^2$ de área de em testículo de *H. eques* submetidos ao teste de efeito subletal do Roundup Transorb[®].

Parâmetros	Controle	$0,25\text{mg.L}^{-1}$	$0,50\text{mg.L}^{-1}$	$1,00\text{mg.L}^{-1}$
n	10	10	10	10
Vacuolização Spc I	$0,06 \pm 0,6a$	$0,32 \pm 1,36a$	$0,53 \pm 1,72a$	$1,12 \pm 2,91b$
Total de Spl	$24,84 \pm 9,36b$	$23,53 \pm 10,65b$	$18,72 \pm 11,04a$	$16,55 \pm 11,8a$
IVC (%)	$0,30 \pm 0,98a$	$1,66 \pm 1,89ab$	$3,38 \pm 3,57bc$	$13,74 \pm 17,79c$

Valores com letras subscritas distintas nas linhas indicam diferença ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

Tabela 11: Índice e desvio-padrão de vacuolização citoplasmática (IVC) em Spc II por 0,01mm² de área de testículo de *H. eques* submetidos ao teste de efeito subletal do Roundup Transorb®.

Parâmetro	Controle	0,25mg.L ⁻¹	0,50mg.L ⁻¹	1,00mg.L ⁻¹
n	10	10	10	10
Vacuolização Spc II	0,12 ±0,89a	0,26±1,19ab	0,5±2,01bc	0,93±2,92c
Total de Spc II	19,09 ± 7,20a	18,47 ± 10,61a	15,03 ± 9,28a	14,54 ± 10,73a
IVC(%)	0,6±1,89a	2,06±2,46ab	4,70±5,80bc	16,95±39,15c

Valores com letras subscritas distintas nas linhas indicam diferença (P<0,05) pelo teste de Duncan.

A vacuolização é uma alteração histopatológica reversível, desde que haja interrupção do contato com a substância lesiva ainda neste estágio. Persistindo o contato, podem ocorrer alterações nucleares. As alterações nucleares podem ser revertidas até a etapa da condensação da cromatina, formando blocos nucleares ligados à membrana nuclear e ao nucléolo (cariorrexe). Entretanto, quando as alterações degenerativas progridem, pode aparecer retração do núcleo, que se transforma em uma massa densa e enrugada de cromatina, denominada de picnose (ZAKERI & LOCKSHIN, 2002).

O número médio de células com núcleo picnótico foi cerca de 4 a 9 vezes maior nos grupos tratados em relação ao grupo controle (Tabela 13). Essa alteração foi encontrada também em machos de *Lebistes reticulatus* tratados com sulfato de zinco por 20 dias (SEHGAL & SAXENA, 1986) e em espermatozônias de *Astyanax aff. bimaculatus* tratados com Roundup™ e Thiodan® em um período de 96h (SILVA FILHO, 2010).

O núcleo picnótico sofre uma dissolução progressiva como resultado da ação hidrolítica das DNases de origem lisossomal (cariólise), o citoplasma perde a basofilia e o limite celular torna-se indistinto, ocorrendo a morte celular (ZAKERI & LOCKSHIN, 2002).

Substâncias xenobióticas, como os herbicidas, por interferências no RNA e DNA, provocam o comprometimento da respiração aeróbia celular, síntese protéica, manutenção da integridade das membranas celulares e manutenção da capacidade de multiplicação celular. A ação de tais substâncias provoca a perda da homeostase celular, de maneira que a célula perde sua viabilidade (KAIOUMOVA et al., 2001).

A destruição tecidual, estimula a angiogênese, a proliferação de fibroblastos deposição de matriz extracelular e a reorganização do tecido fibroso. A substituição do tecido lesado por tecido conjuntivo denomina-se fibrose (cicatriz). Quando há

perda de grande quantidade de tecido, as células são incapazes de recompor a arquitetura original do tecido (BALBINO et al., 2005). Foi constatado processo fibramento no testículo de 10% dos peixes nas concentrações de 0,25 e 0,50 mg.L⁻¹, e de 40% dos peixes submetidos à maior concentração. Esta alteração histopatológica foi encontrada também em *Astyanax aff. bimaculatus* (lambari) tratado com Roundup™ (SILVA FILHO, 2010) e lambaris coletados próximos a efluentes domésticos e industriais sem tratamento no rio Piracicaba em Minas Gerais (MORAES, 2009).

Tabela 13: Número médio e desvio-padrão de núcleos picnóticos por 0,01mm² de área de testículo de *H. eques* submetidos ao teste de efeito subletal do Roundup Transorb®.

Parâmetro	Controle	0,25mg.L ⁻¹	0,50mg.L ⁻¹	1,00mg.L ⁻¹
n	10	10	10	10
Núcleos picnóticos	0,14±0,18a	0,65±0,17b	0,63±0,29b	1,27±0,28b
Aumento da média (Vezez)*	-	4,6	4,5	9,1

* Aumento da média do número de núcleos picnóticos nos grupos tratados em relação ao controle. Valores com letras subscritas distintas na linha indicam diferença (P<0,05) pelo teste de Duncan.

A maioria dos estudos relatam concentrações bastante baixas em ecossistemas de água doce de superfície em regiões onde o uso do glifosato é muito elevado. No entanto, nos Estados Unidos alguns estudos descrevem concentrações elevadas de glifosato, como 0,70 e 1,70mg.L⁻¹ (MONSANTO, 1990). Em áreas de cultivo de soja na Argentina, foram mensuradas, em quatro córregos, concentrações de glifosato entre 0,1 a 0,7 mg L⁻¹ (PERUZZO et al., 2008). Silva et al. (2003) estudaram a concentração de glifosato na microbacia hidrográfica do Arroio Passo Pilão em Pelotas, Rio Grande do Sul, constatando a presença de glifosato em concentrações acima de 0,1mg.L⁻¹, 60 h após a aplicação do produto. As concentrações de glifosato detectadas foram todas menores que 0,7mg.L⁻¹. Essas diferenças podem estar ligadas a fatores como proximidade do local de aplicação em relação aos corpos de água, tipos de solo e pulverização em excesso (overspray) (WHO, 1994). Em geral, estas diferenças sugerem fenômenos de curta duração, prováveis de ocorrer nos corpos d'água, em alguns casos ultrapassando os limites permitidos pela legislação brasileira. Os limites de concentrações máximas permitidas para a substância pela legislação brasileira são de 0,065 mg.L⁻¹ para águas Classe I e II e de 0,28 mg.L⁻¹ para águas classe III (CONAMA 357/05) que como discutido neste trabalho, causariam danos a espermatogênese do *H. eques*.

6. CONCLUSÕES

O Roundup Transorb[®] mostrou-se moderadamente tóxico para *Hiphessobrycon eques*;

O Roundup Transorb[®] provocou alterações morfométricas e histopatológicas, como o aumento dos valores dos índices de cistos rompidos (ICR) e vacuolização citoplasmática (IVC) em concentrações encontradas no meio ambiente ou até mesmo permitidas pela legislação brasileira; e

O *Hyphessobrycon eques* mostrou-se uma espécie sensível mesmo quando exposta a baixas concentrações do princípio ativo do Roundup Transorb[®] na água, sendo, portanto, adequado como bioindicador de ecossistemas aquáticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT -ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088 - Ecotoxicoogia aquática - Toxicidade Aguda – Método de ensaio com peixes**. 2. Ed. ABNT: versão corrigida 31/03/2006, 19p. 2006 - Parte 1 - Sistema Estático - Método de Ensaio. Rio de Janeiro, NBR 15088, 2004.
- APHA, AWWA, WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. ed. 20, Washington: APHA, 1998.
- ALBA-TERCEDOR J. Macroinvertebrados acuáticos y calidad de las aguas de los ríos. **IV SIAGA**, Almeria, v.2, p. 203-213, 1996.
- ALVES CBM, VIEIRA F, MAGALHÃES ALB, BRITO MFG (2007) Impacts of non-native fish species in Minas Gerais, Brazil: present situation and prospects. In: Bert TM (ed.), **Ecological and Genetic Implications of Aquaculture Activities**. Dordrecht, Kluwer Scientific Publications, The Netherlands, pp 291-314
- APHA - American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. ed.20, Washington: AWWA/APHA/WEF, 1998.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.
- BALSADI, O. V. Comportamento das ocupações na agropecuária brasileira no período de 1999-2003. **Informações econômicas**, São Paulo, v. 35, n. 9, set. 2005.
- BAYLIS, A. D. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. **Pest Management Science**, v. 56, p. 299-308, 2000.
- CARRASCHI, S. P.; CUBO, P.; SCHIAVETTI, B. L.; SHIOGIRI, N. S., DA CRUZ, C.; PITELLI, R. A. Efeitos tóxicos de surfactantes fitossanitários para o peixe mato grosso (*Hyphessobrycon eques*). **Acta Scientiarum. Biological Science**. Maringá, v. 33, n. 2, p. 191-196, 2011.
- CARVALHO, L. N.; FERNANDES, C. H. V.; MOREIRA, V. S. S. M. Alimentação de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Osteichthyes, Erythrinidae) no rio Vermelho, Pantanal Sul Mato-Grossense. **Revista Brasileira de Zootecias**, Juiz de Fora, v. 4, n. 2, p. 227-236.
- CASAL, C. M. V. FishBase. **World Wide Web Electronic Publication**. 2010. Disponível em < <http://www.fishbase.org> >, Acessado em 11 mai.2010.

- CETESB. **Companhia de Tecnologia de Saneamento ambiental**. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Emergencia/produtos/g_tecnico.pdf> Help Informações Ecotoxicológicas. Acessado em maio de 2010.
- CONAMA. Resolução nº 357/2005. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional de Meio Ambiente. Brasília, DF. 2005.
- CRUZ, C., SHIOGIRI, N.S., GOMES, G.R., LUNA, L.A.V., SCHIAVETTI, B.L., CUBO, P. & PITELLI, R.A. Toxicidade aguda do glyphosate na formulação Rodeo e do surfactante Aterbane para peixes neotropicais. In: **Anais do I Simpósio internacional sobre glyphosate**. Botucatu. 2007. p. 54-7.
- EPA. Environmental Protection Agency. 1994. **Probit Program 1.5**, Ecological Monitoring Research Division, Environmental Monitoring Systems Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. **FAOSTAT database**, 2006. Disponível em <www.faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture> Acessado em abril de 2010.
- FERREIRA, C.M. Análises complementares obtidas a partir de testes de toxicidade aquática. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (Eds). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, p.273-284, 2004.
- GOMES, G.R. Toxicidade aguda do glyphosate (Roundup® WG) para os peixes *Hyphessobrycon eques* e *Brachydanio rerio*. In. **I Simpósio Internacional sobre glyphosate**. Botucatu. Anais do I Simpósio Internacional sobre glyphosate, p. 48-50, 2007.
- GRIER, H.J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: Russel, L.D., Griswold, M.D. (Eds.), **The Sertoli Cell**. Cache River Press. p. 704-739, 1993.
- GRIER, H. J.; FITZSIMONS, J. M.; LINTON, J. R. Structure and ultrastructure of the testis and sperm formation in a Goodeid teleost. **Journal of Morphology**. v. 150, p. 419-438, 1978.
- GRIER, H. J.; HORNER, J.; MAHESH, V. B. The morphology of enclosed testicular tubules in a teleost fish, *Poecilia latipinna*. **Transactions of the American Microscopical Society**. v. 99, n. 3, p. 268-276, 1980.
- GRIER, H. J.; VAN der HURK, R; BILLARD, R. Cytological identification of cell types in the testis of *Esox lucius* and *E. niger*. **Cell Tissue Research**, v. 257, p. 491-496, 1989.

- HESS, R. A.; SCHAEFFER, D. J.; EROSCHENKO, V. P.; KEEN, J. E. Frequency of the stages in the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 3, p. 517-24, 1990.
- HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R. et al. Histopathology biomarkers. In: HUGGET, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE Jr., P.M. et al. **Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of antroponemic stress**. Florida: Lewis, p.155-209, 1992.
- IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS. **Controle de Registros de Exportação de Peixes Ornamentais de Águas Continentais**. 2008. Disponível em <<http://www.ibama.gov.br/recursospesqueiros/wp-content/files/valoresexportxestados2007doce.pdf>>. Acessado em abril de 2010.
- IBGE - INSTITUTO NACIONAL DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário – 2006**. 2009. Disponível em: < www.ibge.gov.br/presidência/noticiavisualiza.php?idnoticia=1464&id_pagina=1>. Acessado em abril de 2010.
- JERÓNIMO, A. C. Gestão circular de resíduos integrando agricultura e pesca. **Caderno CEIFA**. Lisboa, nº 02/2003, 2003.
- KAIOUMOVA, D.; SÜSAL, C.; OPELZ, G. Induction of apoptosis in human lymphocytes by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Human Immunology**, Heidelberg, v. 62, p. 64-74, 2001.
- KOTAKA, E. T.; ZAMBRONE, F. A. D. **Contribuições para a construção de diretrizes de avaliação do risco toxicológico de agrotóxicos**. p. 60, 2001.
- LE GAC, F., LOIR, M. Male Reproductive System, Fish In: Knobil, E., Neill, J. D. (Ed.), **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press, v. 3, p. 20-30, 1999.
- LIVINGSTONE, D.R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment. **Journal Chemical Technology and Biotechnology**, v. 57, p. 195-211, 1993.
- MATTA, S.L.; VILELA, D.A.; GODINHO, H.P. et al. 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.
- MEDIA CYBERNETICS, 2005. **Image-Pro Plus 6.0**. United State of America.

- MODESTO, K.A.; MARTINEZ, C.B.R.. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**, v. 81, p. 781-787, 2010.
- MOJICA, C. A. P. **Morfologia testicular e estrutura da espermatogênese em peixes ornamentais Tetra Negro, *Gymnocorymbus ternetzi*; Tetra Amarelo, *Hyphessobrycon bifasciatus* e Mato Grosso, *Hyphessobrycon eques* (Teleostei, Characiformes)**, 2007. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
- MONSANTO. **Safety Data Sheet Comercial Product. Roundup Transorb®**. Versão 1.1, 2009.
- MONSANTO. **Backgrounder: History of Monsanto's glyphosate herbicides**. 2002. Disponível em <www.monsanto.com/monsanto/layout/sci_tech/crop_chemicals/default.asp> Acessado em abril de 2010.
- MONSANTO. Roundup Transorb, **Registro no ministério da agricultura, pecuária e abastecimento - MAPA SOB Nº 04229**. Monsanto do Brasil Ltda, Brasil, 2007.
- MONSANTO DO BRASIL LTDA. **FISPQ - Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos**. ROUNDUP TRANSORB R., 2008.
- MONSANTO. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in forestry sites (Unpublished report No. MSL-9940) (1990), In: WHO (1994). **Glyphosate - Environmental Health Criteria** n.159. International Programme on Chemical Safety (IPCS), Geneva.
- MORAES, J. C. **Efeitos do Thiodan® (Endosulfan) nas brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus***. 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- MORAES, A. C. T. **Concentração de metais pesados em peixes teleósteos do rio Piracicaba**, Minas Gerais, Brasil. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- OAKES, D. J.; POLLAK, J. K. The in vitro evaluation of toxicities of there related herbicide formulation containing ester derivatives of 2,4,5-t and 2,4-d using sub mitochondrial particles. **Toxicology**, v. 151, n. 1-3, p. 1-9, 2000.
- PERUZZO, P. J.; PORTA, A. A.; RONCO, A. E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in northpampasic region of Argentina. **Environmental Pollution**, v. 156, p. 61-66 (2008).

- RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. ed.5, p.591, Londrina 2005.
- RÜEGG, E.F.; PUGA, F.R.; SOUZA, M.C.M.; ÚNGARO, M.T.S.; FERREIRA, M.S.; YOKOMIZO, Y.; ALMEIDA, W.F. Impactos dos agrotóxicos sobre o ambiente e a saúde. In: MARTINE, G. & GARCIA, R.C. (Eds.). **Os impactos sociais da modernização agrícola**. São Paulo: Ed. Caetés, p. 171-207, 1987.
- SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S. et al. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress Recovery**, v. 6, p. 75-86, 1997.
- SEHGAL, R.; SAXENA, A.B. Toxicity of Zinc to a Viviparous Fish, *Lebistes reticulatus*(Peters). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 36, p. 888-894, 1986.
- SILVA FILHO, P. B. **Efeitos do Roundup™ e do Thiodan® em adultos de *Astyanax bimaculatus* (Characidae: Teleostei): Valores de CL₅₀ e morfologia testicular**. 2010. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- SILVA M, D.; PERALBA, M. C. R.; MATTOS, L. T. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do Arroio Passo do Pilão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 19-28, jan./dez. 2003
- SILVA, M. E GODINHO, H. P. Barreira hemotesticular em *Oreochromis niloticus* (Peixe, Teleosteo). **Revisita Brasileira de Ciências Morfológicas**. v. 6, n. 1, p. 9-13, 1989.
- SWANN, L. A. A Fish Farmer's Guide to Understanding Water Quality. Department of Animal Sciences. **I Illinois-Indiana Sea Grant Program, Purdue University**. Disponível em: <<http://www.extension.purdue.edu/extmedia/AS/AS-503.html>>. Acessado em 2011.
- VAN DER OOST, R; BEYER, J; VERMEULEN, NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.
- VAN DYK, J.C. **Fish histopathology as a monitoring tool for aquatic health: a preliminary investigation**. 2005. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - University of Johannesburg, Johannesburg, South Africa.
- VAN HAASTER, L.H.; DE JONG, F.H.; DOCTER R.; DE ROOIJ D.G. High neonatal triiodothyronine levels reduce the period of Sertoli cell proliferation and accelerate tubular lumen formation in the rat testis, and increase serum inhibin levels. **Endocrinology**, v. 133, p. 755–760, 1993.

WHITFIELD, J. Vital signs. **Nature**, v.411, n.28, p. 989-990, 2001.

WHO (1994). Glyphosate - Environmental Health Criteria No 159. **International Programme on Chemical Safety (IPCS)**, Geneva.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 3, p. 117-165. 2000.

ZAKERI, Z.; LOCKSHIN, R.A. Cell death during development. **Journal of Immunological Methods**, (Supl. I), v. 265, p. 3-20, 2002.

ZUCKER, E. Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure – Acute toxicity test for freshwater fish. **U.S.EPA** Publication 540/9-85-006. 1985.