



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DALITA GOMES SILVA MORAIS CAVALCANTE

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS E
MUTAGÊNICOS DO ROUNDUP® EM PEIXES
*PROCHILODUS LINEATUS***

Londrina
2008

DALITA GOMES SILVA MORAIS CAVALCANTE

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS E
MUTAGÊNICOS DO ROUNDUP® EM PEIXES
*PROCHILODUS LINEATUS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Zoologia.

Orientação: Profa. Dra. Sílvia Helena Sofia
Co-Orientação: Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Londrina
2008

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C376a Cavalcante, Dalita Gomes Silva Morais.
Avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos do Roundup® em peixes
Prochilodus lineatus / Dalita Gomes Silva Morais Cavalcante. – Londrina,
2008.
72f. : il.
Orientador: Sílvia Helena Sofia.
Co-orientador: Cláudia Bueno dos Reis Martinez.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ci-
ências Biológicas, 2008.
Inclui bibliografia.
1. *Prochilodus lineatus* – Teses. 2. Peixe – Efeitos dos pesticidas – Teses.
3. Toxicidade – Testes – Teses. I. Sofia, Sílvia Helena. II. Martinez, Cláudia
Bueno dos Reis. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.
CDU 597.554.1

DALITA GOMES SILVA MORAIS CAVALCANTE

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS E
MUTAGÊNICOS DO ROUNDUP® EM PEIXES
*PROCHILODUS LINEATUS***

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sílvia Helena Sofia
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales
Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. Oscar Akio Shibatta
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 14 de março de 2008.

**"Para realizar grandes conquistas",
devemos não apenas agir, mas também sonhar;
não apenas planejar, mas também acreditar".**

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual de Londrina**, onde me formei no curso de Ciências Biológicas.

Ao **Programa de Mestrado em Ciências Biológicas** - Área de Concentração em Zoologia e Botânica pela oportunidade oferecida.

Ao **Departamento de Biologia Geral**, pelas condições oferecidas para o desenvolvimento deste trabalho.

A **todos os professores do Programa de Mestrado em Ciências Biológicas** - Área de Concentração em Zoologia e Botânica, que contribuíram com seus conhecimentos para a minha formação acadêmica.

Ao **CNPq** pelo auxílio financeiro para a execução desta dissertação e pela concessão da bolsa de mestrado.

À **Banca Examinadora**, meu muito obrigada pelas correções e sugestões, que colaboraram para a melhoria desse trabalho.

À **Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Sofia**, por me orientar desde a graduação com toda a paciência e dedicação. Meu muito obrigada professora, por me ensinar muito mais do que apenas conhecimentos científicos, mas também por me ajudar a amadurecer e me tornar uma pessoa melhor!

À **Prof^a. Dr^a. Claudia Bueno dos Reis Martinez**, por também me orientar e me auxiliar no desenvolvimento deste trabalho. Meu muito obrigada por estar sempre disposta a solucionar as minhas dúvidas e me ajudar a crescer tanto no pessoal quanto no profissional!

À **Prof^a. Dr^a. Leda M. K. Sodré** pelos conselhos e ajuda para o desenvolvimento deste trabalho.

Prof^a. **Dr^a. Fernanda Simões de Almeida**, pelos momentos de brincadeiras e descontração, meu muito obrigada!

Aos técnicos **Dário e Melyssa** e demais funcionários do Departamento de Biologia Geral pelo auxílio prestado.

Ao pessoal do Laboratório de Genética e Ecologia de Animal (LAGEA): **Rafael, Vanessa, Yuldi, Karen, Gabi, Douglas, Leandro, Carluxa, Fram, Natália, Alessandra, Rafael Caconde e Olavo!**

Ao Pessoal do Laboratório de Ecofisiologia e Ecologia Animal (LEFA): **Kathya, Lindalva, Renata, Lú (Loira), Luzinha, Gabriel, Juliana, Marina, Andréia, Esther, Mari, Jaque, Michel e Bel.**

Ao **Rafael, Vanessa e Renata** pela ajuda em todos os experimentos, sempre prontos a colaborar no que fosse preciso!!!

A **Kathya Asmann**, minha companheira em todos os experimentos, pela força!

Ao **Sergio**, meu namorado, pela paciência, compreensão e carinho, sempre me dando força para que eu conseguisse terminar esse trabalho!

Aos meus avós, **José e Maria**, que são pessoas muito especiais e estão sempre torcendo para mim!

Aos meus pais **Edinilton e Eloiza**, que sempre estiveram comigo, me apoiando e acreditando em mim. Meu muito obrigado por todo amor e carinho que vocês me dão, sempre me fortalecendo e me ajudando a crescer!!!

A **Deus**, força maior, que está sempre comigo me auxiliando!!!

CAVALCANTE, Dalita Gomes Silva Morais. **Avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos do Roundup® em peixes *Prochilodus lineatus***. 2008. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

Atualmente o glifosato é o herbicida mais extensamente usado no mundo e se caracteriza por ser um herbicida não seletivo, de amplo espectro, utilizado para inibição de crescimento de ervas indesejadas na agricultura. Um dos principais produtos encontrados no mercado, que contém como princípio ativo o glifosato é o Roundup®. Assim como vários outros agrotóxicos, o Roundup® pode alcançar o ecossistema aquático e atingir organismos não-alvos, como os peixes. Muitos agrotóxicos possuem potencial genotóxico, que é um fator de risco inicial para gerar efeitos carcinogênicos e reprodutivos em longo prazo. O objetivo desse estudo foi avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos da exposição aguda (6, 24 e 96h) ao herbicida Roundup®, na concentração de 10 mg.L⁻¹, para a espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. Para tanto, os eritrócitos foram usados no ensaio do cometa, teste do micronúcleo e análise da ocorrência de alterações nucleares e o ensaio do cometa foi padronizado para as células branquiais. Os resultados indicaram que o Roundup® promove danos genotóxicos em eritrócitos e células branquiais de *P. lineatus*. Os escores médios obtidos no ensaio do cometa para eritrócitos de *P. lineatus* após exposição de 6 e 96h ao Roundup® foram significativamente maiores do que seus respectivos controle-negativos. Já os escores médios para células branquiais mostraram aumento significativo para após exposição de 6 e 24h, em relação aos seus respectivos controles-negativos. A frequência de micronúcleos e das outras alterações eritrocíticas nucleares obtidas para os peixes expostos ao Roundup® não diferiram significativamente dos seus respectivos controles-negativos, para todos os tempos experimentais. Com base nestes resultados pode-se afirmar que nas condições testadas o Roundup® apresentou efeito genotóxico para *P. lineatus*, e que o teste do cometa realizado com células branquiais é uma ferramenta sensível para detectar danos genéticos em peixes.

Palavras-chave: Glifosato. Roundup®. Ensaio do cometa. Teste do micronúcleo. Peixe Neotropical.

CAVALCANTE, Dalita Gomes Silva Morais. **Evaluation of genotoxic and mutagenic effects of Roundup® to the fish *Prochilodus lineatus***. 2008. 86p. Dissertation (Master`s degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

Currently glyphosate is the most extensively used herbicide worldwide; it is a non selective herbicide, of wide spectrum, used to inhibit the growing of unwanted weeds in agriculture. The major commercial herbicide which uses glyphosate as the main active ingredient is Roundup®. As other agrochemicals, Roundup® can reach aquatic ecosystems and non target organisms. Many pesticides present genotoxic potential, which represent an early risk factor and can generate long term carcinogenic and reproductive effects. The aim of this study was to evaluate the genotoxic and mutagenic effects of acute exposures (6, 24 and 96h) to 10 mg.L⁻¹ of Roundup® on the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Accordingly, fish erythrocytes were used in the comet assay, micronucleus test and for the analysis of the occurrence of nuclear abnormalities and the comet assay was adjusted for branchial cells. The results showed that Roundup® produces genotoxic damage in erythrocytes and gills cells of *P. lineatus*. The mean damage scores obtained through comet assay for *P. lineatus* erythrocytes after 6 and 96h of exposure to Roundup® were significantly higher than the respective negative controls. For branchial cells the mean damage scores were significantly higher than negative controls after 6 and 24h exposures. The frequencies of micronucleus and other erythrocytes abnormalities were not significantly different between Roundup exposed fish and their respective negative controls, for all exposure periods. These results showed that Roundup® produced genotoxic effects to *P. lineatus* and that the comet assay using branchial cells represents an effective and sensitive tool to detect genetic damages on fish.

Keywords: Glyphosate. Roundup®. Comet assay. Micronucleus test. Neotropical fish.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	10
1.1 POLUIÇÃO AMBIENTAL	10
1.2 POLUIÇÃO AMBIENTAL AQUÁTICA	11
1.3 POLUIÇÃO AQUÁTICA POR AGROTÓXICOS	11
1.4 GLIFOSATO.....	14
1.5 ROUNDUP®BIENTE AQUÁTICO POR FORMULAÇÕES À BASE DE GLIFOSATO	15
1.6 CONTAMINAÇÃO DO AMBIENTE AQUÁTICO POR FORMULAÇÕES À BASE DE GLIFOSATO	16
1.7 O USO DE <i>Prochilodus Lineatus</i> COMO BIOINDICADOR.....	18
1.8 BIOMARCADORES.....	20
1.9 AGENTES E ALTERAÇÕES GENOTÓXICAS	21
1.10 TESTES DE GENOTOXICIDADE	22
1.10.1 Ensaio do Cometa.....	22
1.10.2 Teste do Micronúcleo	24
1.10.3 Alterações Eritrocíticas Nucleares.....	25
1.11 GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DAS FORMULAÇÕES A BASE DE GLIFOSATO	26
2 OBJETIVOS	29
3 ARTIGO	30
1 INTRODUÇÃO	32
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
2.1 ANIMAIS	35
2.2 TESTES DE TOXICIDADE DE 6, 24 E 96 H.....	35
2.3 CONTROLE POSITIVO.....	37
2.4 VIABILIDADE CELULAR.....	37
2.5 ENSAIO DO COMETA	38
2.6 TESTE DO MICRONÚCLEO E ALTERAÇÕES ERITROCÍTICAS NUCLEARES.....	39
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
3 RESULTADOS	41
3.1 CONTROLE - NEGATIVO X CONTROLE - POSITIVO.....	41

3.2 CONTROLE - NEGATIVO X ROUNDUP®.....	44
4 DISCUSSÃO	49
5 REFERÊNCIAS.....	57
4 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	74

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 POLUIÇÃO AMBIENTAL

Em consequência do crescimento da população humana e do desenvolvimento industrial, a produção, o consumo e a eliminação de resíduos aumentaram significativamente, originando maior poluição para os ecossistemas (JHA, 2004). No sentido amplo, poluição deve ser entendida como a modificação das características de um ambiente de modo a torná-lo impróprio aos organismos que normalmente o abriga (SILVA et al., 2003).

Milhares de poluentes orgânicos, tais como as bifenilas policloradas, agrotóxicos organoclorados, hidrocarbonetos aromáticos, furanos e dioxinas são produzidos e liberados nos ambientes, principalmente nos terrestres e aquáticos (VAN DER OOST et al., 2003). Os efeitos dessas substâncias químicas nesses ambientes, assim como seus efeitos sobre organismos vivos, têm gerado interesse e preocupação da comunidade científica e agências reguladoras (SILVA et al., 2003).

Refletindo a crescente preocupação com os efeitos de substâncias químicas presentes no ambiente sobre outras espécies, além da espécie humana, surgiu a ecotoxicologia, que pode ser definida como o estudo dos efeitos prejudiciais de substâncias químicas para o ecossistema (WALKER et al., 1998). Entre os vários ambientes impactados pelos diversos tipos de poluentes, os ecossistemas aquáticos estão altamente comprometidos e muitas vezes constituem o receptor final para muitos destes contaminantes (VAN DER OOST et al., 2003). A ecotoxicologia aquática estuda os efeitos de compostos químicos e outros poluentes sobre os organismos aquáticos (TOMITA; BEYRUTH, 2002).

Uma das modalidades experimentais, dentro da ecotoxicologia, amplamente empregadas para o monitoramento ambiental são os testes de toxicidade. Estes testes estão sendo cada vez mais utilizados para a determinação dos efeitos deletérios de poluentes em organismos aquáticos, em virtude, do risco potencial da transferência de poluentes do ambiente para os organismos, e também para a avaliação da qualidade da água (FERREIRA, 2002).

1.2 POLUIÇÃO AMBIENTAL AQUÁTICA

Os ambientes aquáticos são utilizados em todo o mundo com finalidades distintas, entre as quais se destacam o abastecimento de água, a geração de energia, a irrigação, a navegação, a aquicultura e a harmonia paisagística. (MORAES; JORDÃO; 2002). Entretanto, do volume total de água doce disponível no planeta, 75% estão distribuídos principalmente nos pólos, na forma de gelo e geleiras, e 23% constituem água subterrânea. Assim, apenas uma pequena quantidade da água doce (2%) está distribuída nos rios e lagos (LLOYD, 1992).

Os rios representam um recurso essencial à vida, porém escasso, e que vem se tornando cada vez mais reduzido em função, principalmente, do crescimento populacional acelerado (MANSON, 1996). Existem evidências que o aumento da degradação dos ecossistemas aquáticos atingiu os níveis máximos já registrados na história (BERNHARDT et al., 2005).

Dentre os ecossistemas que são atingidos por poluentes, os aquáticos merecem maiores estudos, pois além de serem mais suscetíveis, recebem indiretamente agentes químicos provenientes das águas de chuva ou aqueles carregados pelo escoamento superficial dos solos. De fato, o ambiente aquático é freqüentemente o último local onde os resíduos de contaminantes provenientes da ação antropogênica acabam desembocando (JHA, 2004).

Existem centenas, talvez milhares de poluentes que afetam o ambiente aquático e cujos efeitos são preocupantes. Como contaminantes do ambiente aquático, destacam-se o lixo, o esgoto, os metais, o petróleo, os produtos orgânicos sintéticos (onde se enquadram todos os agrotóxicos, inclusive os inseticidas de uso doméstico), os nutrientes (em quantidades acima do limite, tornam-se prejudiciais) e os elementos radioativos artificiais (NIENCHESKI, 2000).

1.3 POLUIÇÃO AQUÁTICA POR AGROTÓXICOS

O homem muitas vezes, sem conhecimento dos danos que pode causar ao ecossistema, utiliza o solo seja para o plantio ou pecuária sem critérios

conservacionistas. Estas atividades podem desagregar o solo, provocando fenômenos de erosão, desertificação, assoreamento dos rios e envenenamento de solos e cursos d'água, com o uso de produtos altamente tóxicos. Entre esses produtos estão os agrotóxicos usados na agricultura para combater as pragas e as doenças que se proliferam nas diferentes culturas vegetais (SILVA et al., 2003). Estes são divididos em diferentes classes, dentre as quais pode-se citar os herbicidas, fungicidas, acaricidas, algicidas, larvicidas e inseticidas. Suas funções básicas na agricultura incluem o aumento da produtividade, a melhoria da qualidade dos produtos e a redução do trabalho e dos gastos com energia (COUTINHO et al., 2005).

A contaminação ambiental por agrotóxicos causa efeitos negativos aos recursos naturais, à saúde humana, além de trazer problemas para a própria exploração agrícola. O impacto dos agrotóxicos na saúde humana e na qualidade ambiental é preocupante, mesmo que as exposições não sejam freqüentes e ocorram em pequenas doses (CASTRO, 2004).

A partir do final da década de 1960, ocorreu uma profunda transformação na agropecuária, com o uso em larga escala de agrotóxicos. No ano de 2002, estima-se que cerca de 2,5 a 3 milhões de toneladas de agrotóxicos são utilizados a cada ano na agricultura mundial. No Brasil, o consumo desses produtos encontra-se em franca expansão. O país é responsável pelo consumo de cerca de 50% da quantidade total de agrotóxicos utilizados na América Latina e ocupa o quarto lugar entre os países consumidores de agrotóxicos (MOREIRA et al., 2002).

Os riscos da ampla utilização desses produtos não se limitam ao homem do campo ou aos alimentos comercializados nas cidades que podem apresentar resíduos tóxicos. Os resíduos das aplicações também podem atingir os mananciais de água e o solo, causando a contaminação ambiental (MOREIRA et al., 2002).

Os agrotóxicos representam os produtos mais amplamente encontrados em corpos hídricos superficiais e subterrâneos no mundo todo, em função de seu amplo uso em áreas agrícolas e urbanas. Eles compreendem uma variedade de moléculas com propriedades distintas, que lhes conferem diferentes graus de persistência ambiental, mobilidade e potencial tóxico, carcinogênico, mutagênico e teratogênico ou, ainda, algum efeito endócrino a diversos organismos não alvos, inclusive o ser humano (ARMAS, 2006).

Os agrotóxicos podem alcançar os ambientes aquáticos através da aplicação intencional, deriva e escoamento superficial a partir de áreas onde ocorreram aplicações (Figura 1). Através da lixiviação do solo, os agrotóxicos podem alcançar os lençóis freáticos, cuja descontaminação apresenta grande dificuldade (TOMITA; BEYRUTH, 2002). O excesso de pesticida deposita-se no solo sendo arrastado para áreas adjacentes e rios através da chuva, ou para áreas mais distantes pelos ventos. Ao alcançarem os rios entram na rede trófica por meio do fito e zooplâncton, chegando ao homem através do consumo de moluscos, peixes e outros organismos aquáticos (SILVA et al., 2003).

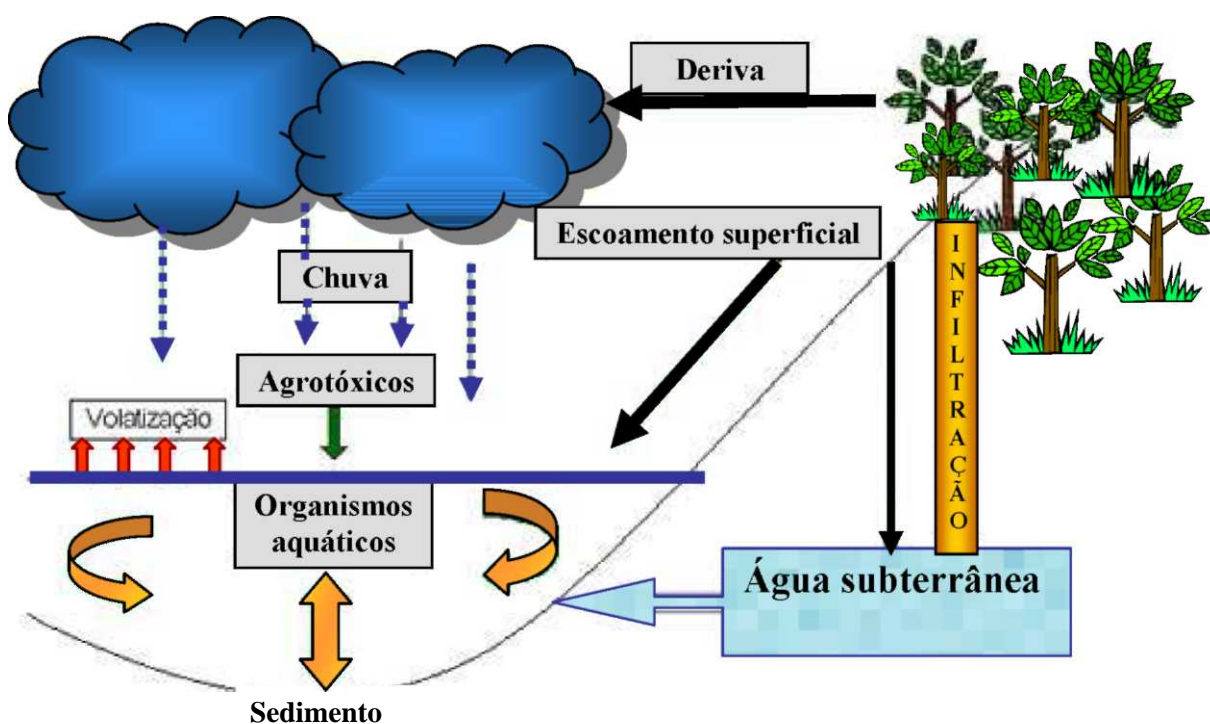


Figura 1 – Movimento dos agrotóxicos em ecossistemas aquáticos (Adaptado de NIMMO, 1985 e TOMITA; BEYRUTH, 2002).

Em vista do exposto, fica claro que o biomonitoramento das possíveis conseqüências da exposição aos agrotóxicos é uma linha de pesquisa importante. Há evidências, já a algum tempo, de que a exposição aos agrotóxicos resulta em alterações genéticas nas populações, que vão desde o aumento da incidência de anormalidades de desenvolvimento até as quebras cromossômicas e alterações na estrutura do gene. Atualmente, os testes para detecção de

substâncias genotóxicas são realizados mediante a avaliação de mutações gênicas, danos ao DNA, e alterações cromossômicas em análises *in vitro* e *in vivo* (CASTRO, 2004).

1.4 GLIFOSATO

Entre os vários agrotóxicos existentes, atualmente o glifosato é o herbicida mais extensamente usado no mundo (ÇAVAS; KONEN, 2007). Representa 60% do mercado mundial de herbicidas não seletivos, contabilizando um total de US\$ 1,2 bilhão/ano com vendas do produto (AMARANTE JUNIOR et al., 2002).

O glifosato é uma organofosfato, derivado da glicina, cuja estrutura química é o N-(fosfometil) glicina (Figura 2). Foi sintetizado pela primeira vez em 1950, mas a sua propriedade herbicida só foi descoberta pelos cientistas da Companhia Monsanto em 1970 (WILLIAMS et al., 2000).

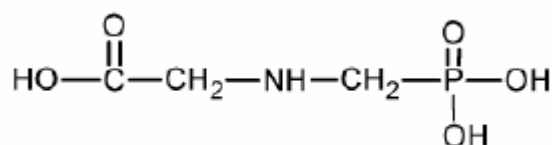


Figura 2 – Estrutura química da molécula de glifosato (WILLIAMS et al., 2000).

Em diversos tipos de cultivo, o glifosato costuma ser pulverizado e absorvido na planta pelas folhas e caulículos novos. O herbicida é, então, transportado por toda a planta, agindo sobre vários sistemas enzimáticos, inibindo o metabolismo de aminoácidos (AMARANTE JUNIOR et al., 2002). Por ser um herbicida não seletivo, de ação sistêmica e pós-emergente, interfere no crescimento das plantas, inibindo a enzima 5-enolpiruvil shiquimato-3-fosfato ácido sintetase (PEPS), comprometendo assim a biossíntese de aminoácidos aromáticos essenciais como o triptofano, fenilalanina e a tirosina (MENEZES et al., 2004).

O glifosato é usado no controle de plantas invasoras em meios agrícolas, urbanos, domésticos, aquáticos e florestais. Na agricultura é indicado no controle de plantas invasoras anuais e 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 (COX, 1998; AMARANTE JUNIOR et al., 2002).

O transporte do glifosato no solo é fortemente dependente da sua capacidade de complexação com metais, da adsorção dos constituintes do solo, bem como das suas propriedades físico-químicas no meio aquoso, como sua solubilidade em água. A taxa da degradação do glifosato em solos diferentes e/ou na água varia de acordo com o grau de atividade microbiana do solo e da presença de íons metálicos (BARJA et al., 2001).

O glifosato não se bioacumula em organismos aquáticos e terrestres (WILLIAMS et al., 2000) e quanto a sua toxicidade aguda, pertence à classe toxicológica IV, ou seja, não tóxico (ANVISA, 2003). Essa baixa toxicidade deve-se ao mecanismo de ação do glifosato, que atua em uma via metabólica exclusiva das plantas (AMARANTE JUNIOR et al., 2002).

A principal rota de degradação do glifosato são os microrganismos de solo e água (por processos aeróbicos e anaeróbicos), que o decompõem por meio de duas rotas catabólicas, produzindo o ácido aminometil fosfônico (AMPA) como o principal metabólito e sarcosina como metabólito intermediário na rota alternativa (GALLI; MONTEZUMA, 2005). Este último consiste na transformação do glifosato em sarcosina por ação da bactéria *Agrobacterium radiobacter* ou da *Enterobacter aeroneges*. A sarcosina entra no metabolismo destes microrganismos e de outros, degradando-se (AMARANTE JUNIOR et al., 2002).

1.5 ROUNDUP®

O Roundup® é o nome comercial de um herbicida produzido pela Companhia Monsanto, que contém como princípio ativo o glifosato, o qual é

formulado como sal de isopropilamina (IPA), e um surfactante, o amino polioxietileno (POEA), que é adicionado para facilitar a incorporação do herbicida à planta.

Os herbicidas à base de glifosato estão entre os mais usados do mundo, porque são altamente eficientes, têm baixo custo, são praticamente não tóxicos e rapidamente se degradam no ambiente (MONHEIT, 2002). Devido à sua elevada solubilidade em água e uso extensivo no ambiente (especialmente em sistemas de água rasa), a exposição de organismos aquáticos não-alvo a esses herbicidas é de interesse para os ecotoxicologistas (TSUI; CHU, 2003).

A toxicidade aguda do glifosato é considerada como baixa pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1994). No entanto, as formulações comerciais à base de glifosato são mais agudamente tóxicas do que o glifosato puro (AMARANTE et al., 2002; PEIXOTO, 2005). Surfactantes como POEA encontrados no Roundup® viabilizam a toxicidade dos produtos formulados à base de glifosato para os organismos aquáticos (TSUI; CHU, 2003). Giesy et al. (2000) encontraram que o POEA foi mais tóxico para peixes que o glifosato puro. Neskovic et al. (1996) realizaram testes de toxicidade aguda com carpas (*Cyprinus carpio*) e encontraram que a concentração letal média para 96 horas (96 horas - LC50) de glifosato foi bastante elevada, 620 mg.L⁻¹. No entanto, considerando o produto formulado Roundup®, a CL50 - 96 horas variou de 2 a 55 mg.L⁻¹, dependendo da espécie de peixe, da fase de vida e condições dos testes (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2002). Langiano e Martinez (2008) encontraram em testes de toxicidade aguda com o herbicida Roundup®, que a CL50 - 96horas com juvenis de *Prochilodus lineatus* foi de 13,69 mg.L⁻¹.

1.6 CONTAMINAÇÃO DO AMBIENTE AQUÁTICO POR FORMULAÇÕES À BASE DE GLIFOSATO

A presença de agrotóxicos em águas brasileiras passou a ser evidenciada por diversos estudos, sendo os organoclorados as moléculas mais monitoradas. Um número restrito de programas de monitoramento ou simples caracterização, constando de um pequeno número de outras moléculas de diferentes classes de agrotóxicos e grupos químicos, já foi conduzido em distintas bacias hidrográficas brasileiras (ARMAS, 2006).

Com o intuito de monitorar resíduos de agrotóxicos no ambiente e em alimentos, métodos analíticos foram desenvolvidos para avaliar o risco de contaminação do solo e das águas subterrâneas e superficiais (BRITO et al., 2001). Alguns trabalhos já avaliaram a presença da molécula do glifosato no ambiente aquático. Em amostras de águas coletadas em área orizícola submetida a plantio direto no Rio Grande do Sul foram detectados níveis de glifosato variando de 5 a 14,5 Mg.L⁻¹. Essas concentrações encontradas de glifosato estão acima do limite máximo permitido (7,0 Mg.L⁻¹) pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados, para água potável (MATTOS et al., 2002), porém em âmbito nacional, as concentrações encontradas estão abaixo do permitido pela resolução Conama 357/2005, que estabelece o valor máximo de 65 ug.L⁻¹ de glifosato para água doce de classe I.

Avaliação preliminar de agrotóxicos aplicados em plantações de eucaliptos e coqueiros no Nordeste brasileiro quanto ao risco de contaminação de águas superficiais e subterrâneas foi realizada. Com base em critérios sugeridos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), vários agrotóxicos inclusive o glifosato, apresentaram potencial de contaminação das águas, exigindo assim monitoramento (BRITO et al., 2001).

Um levantamento dos agrotóxicos empregados na cultura de cana de açúcar, na sub-bacia do rio Corumbataí (SP), no período de 2000-2003, mostra que os herbicidas representam a classe de agrotóxicos mais utilizados (ARMAS, 2006). Neste trabalho, verificou-se que o glifosato apresentou o maior volume de agrotóxico consumido na cultura de cana de açúcar, enfatizando assim a importância de seu monitoramento nos recursos hídricos. Níveis não quantificáveis de glifosato foram encontrados nas amostras de água e sedimentos dessa sub-bacia, porém o glifosato foi a molécula mais freqüentemente detectada. Isso pode ser explicado pela enorme solubilidade desse herbicida, tornando-o passível de atingir fontes de água.

Percebe-se então, que a contaminação aquática pelo herbicida glifosato é real, sendo fundamental a realização de um monitoramento ambiental constante. Embora as metodologias tradicionais de monitoramento baseadas em características físico-químicas dos agrotóxicos sejam de grande valia, é de fundamental importância a aplicação de análises integradas da qualidade da água, unindo os resultados das metodologias tradicionais de avaliação aos aspectos

biológicos do sistema (ARIAS et al., 2007). Desta forma, é importante também em estudos que visam avaliar os efeitos de um agrotóxico ou outro poluente qualquer no ambiente, a utilização de organismos vivos ou ainda culturas de células, os quais podem atuar como sistemas biológicos nos quais atuam tais agentes contaminantes.

1.7 O USO DE *Prochilodus lineatus* COMO BIOINDICADOR

Define-se como bioindicador, um organismo que fornece informações sobre as condições ambientais de seu hábitat por sua presença ou ausência ou pelo seu comportamento (VAN GESTEL; VAN BRUMMELEN, 1996). No ambiente aquático, moluscos e peixes têm sido empregados como organismos - sentinelas em programas de biomonitoramento. Em destaque, os peixes estão sendo escolhidos como bioindicadores, devido à posição chave que esses organismos ocupam na cadeia trófica e também devido ao seu elevado valor comercial (VIARENGO et al., 2007).

Atualmente, a maioria dos estudos relacionados com a exposição a contaminantes foi realizada com espécies de regiões temperadas, enquanto poucas pesquisas tenham investigado o impacto de poluentes em espécies presentes em ecossistemas tropicais (LACHER JR; GOLDSTEIN, 1997). Castillo et al. (1997) chamam a atenção para a necessidade de que sejam desenvolvidos métodos sensíveis de monitoramento dos efeitos de poluentes em regiões tropicais, bem como a identificação de espécies sensíveis, de valor econômico e ecológico, que possam ser usados em testes de toxicidade.

Na região Neotropical, a espécie de peixe *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1847), conhecida popularmente como curimba, constitui uma espécie bioindicadora em potencial, pois sua distribuição está restrita a locais pouco impactados. Em um levantamento ictiofaunístico realizado na bacia do rio Tibagi (Estado do Paraná), Bennemann *et al.* (1995) mostraram que *P. lineatus* ocorria com maior frequência em Sapopema e Ipiranga, que correspondem às regiões menos impactadas ao longo do rio Tibagi. Esses autores não registraram a presença de *P. lineatus* em Telêmaco Borba, região onde se encontra a indústria de papel e celulose Klabin S.A



Figura 3 – Exemplar juvenil de *Prochilodus lineatus*.

De acordo com a classificação taxonômica atual, a espécie *Prochilodus lineatus* pertence à família Prochilodontidae, ordem Characiformes e superordem Ostariophysi. Quanto à biologia, esta espécie tem seu desenvolvimento inicial em lagoas marginais na planície de inundação, onde os ovos permanecem por cerca de 24 horas, dando origem a diminutas larvas que medem cerca de 3 mm de comprimento. Essas larvas se alimentam de zooplâncton, que se formam nas lagoas marginais. Após 25 dias de vida, a larva perde a primeira denticção e a boca se torna protáctil. Seu hábito alimentar muda, passando a ser detritívoro (PAIVA et al., 2002) isto é, passa a consumir quase que exclusivamente finas partículas do lodo, onde estão contidos sedimentos inorgânicos, além de detritos orgânicos e diatomáceas (DOMINGUES; HAYASHI, 1998). Por se alimentar de detritos, estes peixes ficam expostos a substâncias químicas, que eventualmente, tenham ficado retidas no sedimento (MARTINEZ; CÓLUS, 2002).

Segundo Paiva et al. (2002), *P. lineatus* é uma espécie que precisa migrar contra a correnteza dos rios para os estímulos do desenvolvimento sexual, da maturação das gônadas e para o próprio ato reprodutivo (desova). Como espécie migradora, este peixe está sujeito aos ambientes eventualmente impactados por insumos agrícolas, durante seu deslocamento na piracema. Quanto à sua distribuição, *P. lineatus* é encontrado principalmente nos rios das regiões Sul e Sudeste do Brasil e em países limítrofes como Paraguai, Argentina e Uruguai.

1.8 BIOMARCADORES

Antes de atingir níveis superiores de organização biológica, como comunidades e ecossistemas, os efeitos dos contaminantes podem ser verificados em níveis de organização biológica inferiores, que ocorrem mais rapidamente e permitem que esses efeitos ou alterações sejam observados com certa antecedência (Figura 4), possibilitando a identificação de problemas antes que o ambiente como um todo seja afetado (JONSSON; CASTRO, 2005). Além do que, a especificidade das alterações biológicas e a compreensão sobre os efeitos dos contaminantes são, geralmente, maiores nos níveis mais baixos de organização (ARIAS et al., 2007).

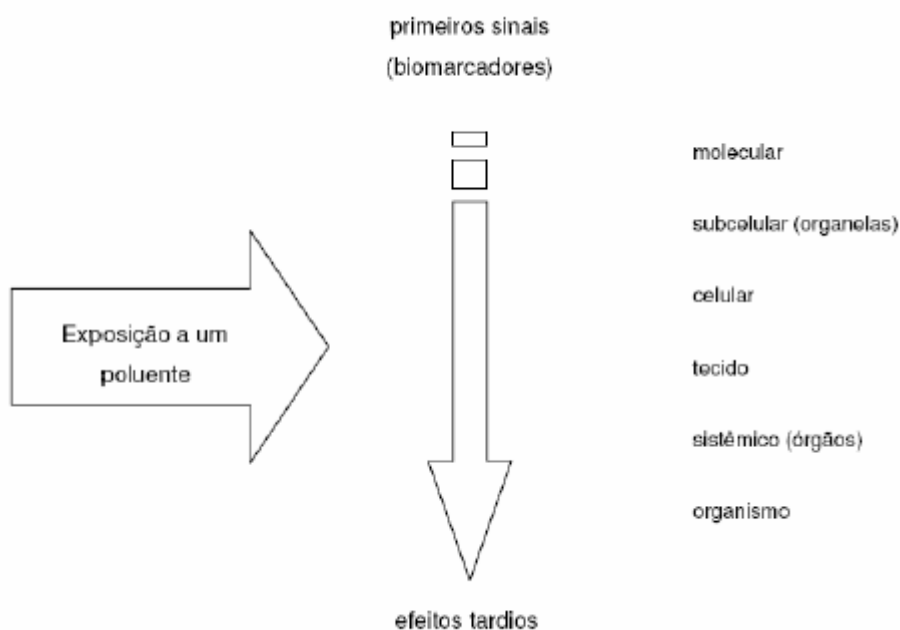


Figura 4 – Representação esquemática da ordem sequencial de alterações biológicas devido à presença de poluentes dentro de um sistema biológico (Retirado de ARIAS et al., 2007 baseado em VAN DER OST, 2003).

Qualquer alteração biológica relacionada à presença de um composto químico no ambiente no nível sub-individual, medida dentro do organismo ou em seus produtos (urina, fezes, pêlos ou penas), que indica um desvio do estado normal e que não pode ser detectada no organismo intacto, é definida como

biomarcador (VAN GESTEL; VAN BRUMMELEN, 1996). Desta forma, o biomarcador é utilizado como um sinal prévio refletindo a alteração biológica causada por uma substância (VAN DER OOST et al., 2003).

Diferentes parâmetros biológicos são utilizados como indicadores para sinalizar as mudanças associadas à presença de contaminantes. O grau de integridade do DNA tem sido proposto como um indicador sensível de genotoxicidade e um biomarcador efetivo para monitoramento ambiental. Os danos no DNA dos organismos aquáticos que vivem em ambiente poluídos podem ser usados para estudar a genotoxicidade de agentes tóxicos em organismos, como também para a avaliação de risco ecotoxicológico e ambiental (ZHU et al., 2005).

1.9 AGENTES E ALTERAÇÕES GENOTÓXICAS

Compostos que têm o potencial de causar danos no DNA dos organismos são chamados de agentes genotóxicos. Essas substâncias podem agir diretamente, alterando a estrutura do DNA. Tais efeitos podem incluir rupturas na cadeia de DNA, modificações nos nucleotídeos, aberrações cromossômicas e mutações de ponto (FRENZILLI et al., 2004). Estes são efeitos, que, na sua maioria, ocorrem em tecidos somáticos e se manifestam no nível molecular da organização biológica (THEODORAKIS et al., 1998). Entretanto, quando tais efeitos atingem células reprodutoras, as mudanças produzidas no DNA poderão ser transmitidas aos descendentes, comprometendo as futuras gerações (LYONS et al., 1997; THEODORAKIS et al., 1998).

Diversos contaminantes aquáticos têm sido reconhecidos como passíveis de interagir com o DNA de células vivas e, portanto, de produzir efeitos genotóxicos (FRENZILLI et al., 2004). De acordo com estes autores, a perda da integridade do DNA, se não propriamente reparada, pode determinar a indução de mutações, aberrações cromossômicas, defeitos congênitos e surgimento de doenças como o câncer em vertebrados. Assim, existe um grande interesse por parte dos pesquisadores de avaliar o impacto de substâncias potencialmente genotóxicas liberadas em ambientes aquáticos.

1.10 TESTES DE GENOTOXICIDADE

Os recentes avanços na genética toxicológica resultaram em uma variedade de metodologias que podem ser usadas para avaliar o impacto de agentes potencialmente genotóxicos aos organismos (LYONS et al., 1997; BICKHAM et al., 2000; JHA, 2004).

1.10.1 Ensaio do Cometa

Nos últimos anos houve um aumento de interesse na metodologia do Ensaio do Cometa ou SCGE (*Single Cell Gel Electrophoresis Assay*), pois este teste pode ser usado em vários estudos, tanto *in vivo* como *in vitro*, para avaliar dano e reparo no DNA (CASTRO, 2004). Trata-se de um método rápido, no qual as lesões no DNA podem ser vistas na ausência da atividade mitótica. Essa técnica possui vantagens de utilização por necessitar de um pequeno número de células, ter boa reprodutividade e ser aplicável em qualquer organismo eucarioto (CASTRO, 2004). É um teste de genotoxicidade capaz de detectar danos no DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes, porém não é um teste de mutagênese, pois avalia a ocorrência de danos passíveis de reparos. O teste do cometa pode ser realizado tanto em animais como em plantas.

Dois protocolos principais estão disponíveis para a execução do teste, de acordo com o pH. A versão neutra detecta quebras de fitas duplas nas moléculas de DNA e *crosslinks* e a alcalina detecta quebras de fita única e dupla, sítios álcali-lábeis e *crosslinks* (SILVA et al., 2003). Ostling e Johanson (1984) foram os primeiros a desenvolver a técnica de eletroforese em microgel para detectar danos no DNA em célula individual, sob condição de pH neutro. Subseqüentemente, Singh et al. (1988) introduziram uma técnica de microgel que envolve eletroforese sob condição alcalina (pH 13). Com a elevação do pH, a sensibilidade do teste foi aumentada, podendo-se visualizar além de quebras de fita dupla de DNA, também quebras de fita simples e sítios álcali-lábeis (TICE et al., 1990).

O teste do cometa se baseia na detecção de fragmentos de DNA que na eletroforese migram do centro nuclear muito mais rapidamente do que o DNA intacto, resultando na formação de um cometa com cauda (TICE et al., 1990). A técnica consiste, inicialmente, na disposição de uma suspensão de células embebidas em gel de agarose sobre a superfície de uma lâmina. Em seguida, as lâminas são transferidas para uma solução com alta concentração de sais e detergentes afim de romper as células, removendo o seu conteúdo citoplasmático e membrana nuclear. Posteriormente, as lâminas são imersas em um tampão de pH variável de acordo com a versão do teste empregado. Tal processo visa o desenovelamento das cadeias de DNA, pelo rompimento das estruturas secundária e terciária presentes no núcleo celular. Imediatamente após o desenovelamento, as lâminas são submetidas a uma corrente elétrica de modo a induzir a migração dos fragmentos de DNA no sentido da corrente elétrica (VILLELA et al., 2006).

Várias pesquisas estão utilizando o ensaio do cometa para detectar danos no DNA de peixes causados por diversos poluentes, como por exemplo, o benzeno (BÜCKER et al., 2006), a atrazina (VENTURA et al., 2007), o óleo diesel (VANZELLA et al., 2007), os metais pesados (CESTARI et al., 2004), entre outros.

Para os organismos aquáticos, diferentes células foram usadas no ensaio do cometa. Enquanto que para os peixes, os eritrócitos são as principais células utilizadas neste tipo de ensaio, nos estudos envolvendo moluscos e crustáceos, os hemócitos da hemolinfa são as células mais comumente utilizadas (LEE; STEINERT, 2003). Vanzella et al. (2007) utilizaram eritrócitos de *Prochilodus lineatus* para avaliar danos no DNA de peixes expostos à fração do diesel solúvel em água. Eritrócitos também foram usados para detectar os efeitos do herbicida atrazina, em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (VENTURA et al., 2007).

Além disso, células de diferentes tecidos dos organismos aquáticos foram isoladas e usadas no ensaio do cometa. Vários tecidos potencialmente sujeitos a agentes genotóxicos são removidos e, a partir deles são feitas suspensões celulares. Em peixes, diferentes tecidos como intestino, fígado, rim, brânquias, gônadas, baço e músculo foram escolhidos para se avaliar danos no DNA por meio do ensaio do cometa (LEE; STEINERT, 2003). Em especial, as brânquias, por estarem em contato direto com o meio ambiente e conseqüentemente com os poluentes presentes na água, são escolhidas como tecido- alvo. Kilemade et al. (2004) analisaram danos no DNA de vários tecidos como epiderme, brânquias,

baço e fígado de peixe *Scophthalmus maximus L.* e observaram que as células do fígado e das brânquias se mostraram mais sensíveis que as células de baço e epiderme.

1.10.2 Teste do Micronúcleo

O Teste do Micronúcleo (MN) é uma outra metodologia que tem sido amplamente empregada por um grande número de autores para avaliar alterações mutagênicas em diferentes organismos, incluindo peixes (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Os micronúcleos (MN) são pequenos corpúsculos, compostos por material cromossômico, presentes no citoplasma. Eles aparecem nas células filhas, em decorrência de danos induzidos nas células parentais. Esses micronúcleos podem ser resultante de quebras cromossômicas ou de perdas de cromossomos inteiros que podem não ser incorporados ao núcleo principal das células filhas após a mitose. Uma membrana nuclear se formará em volta do fragmento, o qual será visível como um pequeno núcleo separado do núcleo principal da célula (RIBEIRO et al., 2003). Assim, os MN podem ser originados a partir de agentes clastogênicos, ou seja, compostos que induzem a perda de fragmentos cromossômicos, ou por agentes aneugênicos, que são aqueles que induzem a perda de cromossomos inteiros por segregação cromossômica anormal. Este teste tem sido utilizado para estimar danos citogenéticos induzidos por agentes químicos ou físicos. Entretanto, uma grande parte dos trabalhos publicados até agora realizou este teste com espécies de mamíferos (especialmente roedores), embora o teste do micronúcleo seja uma ferramenta útil também com amostras obtidas de outros animais que não mamíferos.

Esta técnica permite detectar as propriedades genotóxicas de componentes presentes no ambiente aquático (UDROIU, 2006). De fato, o teste do micronúcleo em peixes tem mostrado ser útil em técnicas *in vivo*, para testar a mutagenicidade e também mostra potencial para monitoramento *in situ* da qualidade da água (AL-SABIT; METCALFE, 1995).

Vários trabalhos já utilizaram o teste do micronúcleo para detectar a mutagenicidade de diversos poluentes em animais aquáticos, como peixes. Por

exemplo, na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) exposta a 6 compostos genotóxicos, como a mitomicina e a ciclofosfamida (AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2001); em tilápia coletadas no lago Paranoá (GRISOLIA; STARLING, 2001); em tilápias expostas a efluentes de uma refinaria de petróleo (ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005); em tilápia coletadas no rio Paraíba do Sul (SP) (SOUZA; FONTANETTI, 2006), em peixes-dourados (*Carassius auratus*) expostos a chorume de um aterro sanitário (DEGUCHI et al., 2007).

Contudo, até o momento, apenas um número restrito de trabalhos tem empregado o teste do micronúcleo para avaliar a ação de poluentes em espécies de peixes neotropicais. Martinez e Cólus (2002) empregaram este teste para a avaliação do efeito de diferentes poluentes em duas espécies de peixes neotropicais (*Prochilodus lineatus* e *Astyanax altiparanae*) encontrando um aumento na frequência de micronúcleos para substâncias como herbicidas, inseticidas e metais como chumbo e alumínio. Vanzella et al. (2007) também utilizaram o teste do micronúcleo para avaliar o potencial mutagênico da fração solúvel de diesel em água em peixes *Prochilodus lineatus*, observando um aumento na frequência de eritrócitos micronucleados.

1.10.3 Alterações Eritrocíticas Nucleares

Além da frequência de micronúcleos, a ocorrência de alterações nucleares nos eritrócitos também foi considerada como um indicador de danos genotóxicos. Estas alterações foram descritas, primeiramente, em eritrócitos de peixes por Carrasco et al. (1990) e foram classificadas em: 1) células binucleadas; 2) núcleo segmentado; 3) núcleo lobulado; 4) núcleo com constrição ou em "forma de rim" e 5) núcleos com vacúolos. Os mecanismos responsáveis pelas alterações eritrocíticas nucleares ainda não foram inteiramente explicados (ÇAVAS; KONEN, 2007).

Paralelamente ao teste do micronúcleo, muitos autores estão utilizando a ocorrência dessas alterações nucleares como indicativo do dano citogenético em espécies de peixes. Ayllon e Garcia-Vazquez (2001) encontraram, além de micronúcleos, a ocorrência de alterações nucleares em eritrócitos

periféricos de truta induzidos por ciclofosfamida e mitomicina-c, dois produtos com forte ação clastogênica. Alta incidência de micronúcleos e alterações nucleares também foi observada por Souza e Fontanetti (2006) em eritrócitos de tilápias de um rio contaminado por efluentes de uma fábrica de transformação de xisto. Além disso, aumento na frequência de alterações eritrocíticas nucleares em peixes expostos à água do mar contaminada, tanto na exposição em bioensaios quanto *in situ*, foram observados por Van Ngan et al. (2007).

1.11 GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DAS FORMULAÇÕES A BASE DE GLIFOSATO

Agências reguladoras como a Organização Mundial da Saúde - OMS (1994) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos - EPA (1993) concluíram que o glifosato não possui propriedades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas. Porém, estudos científicos têm demonstrado que tanto o glifosato como os produtos à base de glifosato podem ter potencial mutagênico. Já foi constatado que os produtos à base de glifosato como o Roundup® são potencialmente mais mutagênicos do que o próprio glifosato em decorrência da presença dos surfactantes, os quais potencializam a ação do glifosato (COX, 1998). Bolognesi et al. (1997) mostraram a ação mutagênica do Roundup®, quando compararam a ação deste produto comercial com a do glifosato, em uma bateria de ensaios com ratos (Swiss CD1), para avaliar a indução de danos do DNA e de efeitos cromossômicos *in vivo* e *in vitro*.

Vários estudos envolvendo diferentes organismos e diferentes técnicas já foram realizados para verificar se o glifosato e formulações relacionadas se mostravam genotóxicos e mutagênicos. Adicionalmente, diversos ensaios *in vitro* com a bactéria *Salmonella typhimurium* também foram realizados por alguns autores, tendo sido observado que o princípio ativo glifosato não se mostrou mutagênico (WILDEMAN; NAZAR, 1982, MORIYA et al., 1983, LI; LONG, 1988). Testes de mutação reversa com *S. typhimurium* expostos ao Roundup®, também não demonstraram indução de mutações (NJAGI; GOPALAN, 1980; RANK et al., 1993; KIER et al., 1997).

Aberrações cromossômicas foram observadas em células de *Allium cepa* expostas ao Roundup® , mas não ao glifosato (RANK et al., 1993). Também em plantas, Dimitrov et al. (2006) não observaram o aumento na frequência de micronúcleos em células meristemáticas de raízes de *Crepis capillaris* expostas a várias concentrações de Roundup®, mostrando que nas condições analisadas este não se mostrou mutagênico. Já Lioi et al. (1998ab), utilizando estudos *in vitro*, encontraram aberrações cromossômicas em linfócitos periféricos, tanto humanos quanto bovinos expostos ao glifosato.

Estudos têm também revelado que as formulações à base de glifosato mostram resultados controversos em relação à formulação testada, dose da aplicação, uso da metodologia e do organismo (ÇAVAS; KONEN, 2007). Para avaliar possíveis danos ao DNA causados por formulações à base de glifosato, vários trabalhos estão utilizando como metodologias o ensaio do cometa, o teste do micronúcleo e a ocorrência de alterações nucleares com diferentes organismos.

Vários trabalhos já foram realizados utilizando o teste do micronúcleo para avaliar a mutagenicidade do glifosato e formulações, como o Roundup®, em diferentes dosagens com células de medula óssea de camundongos. Foram obtidos resultados negativos (RANK et al., 1993a,b; KIER et al., 1997; GRISOLIA, 2002) e positivos (BOLOGNESI et al., 1997; TORRES et al., 2006), quanto a mutagenicidade desses produtos. Dimitrov et al. (2006) não encontraram uma resposta mutagênica, quando avaliaram a frequência de micronúcleos em eritrocitos policromáticos de camundongos, após administração oral de doses de Roundup®. Já Torres et al. (2006) encontraram um aumento na frequência de micronúcleos em eritrocitos policromáticos de medula óssea de camundongos injetados com várias doses de glifosato.

O teste do micronúcleo com eritrocitos de medula óssea é usado atualmente como um sistema-teste modelo em muitos países e organizações. Porém, muitos trabalhos também têm mostrado que o teste do micronúcleo em peixes é bastante sensível para detectar agentes genotóxicos. Considerando a distância filogenética entre camundongos e peixes, resultados mostram que os peixes são mais sensíveis a toxicidade dos agrotóxicos. Grisolia (2002) utilizou como sistema-teste camundongos e peixes (*Tilapia rendalli*) injetados com várias dosagens de Roundup®. Enquanto este autor observou um aumento significativo na frequência de micronúcleos nesta espécie de peixe, nenhuma alteração significativa

foi detectada em relação às células dos camundongos, indicando que o ensaio do micronúcleo em peixes pode ser usado como um sistema-teste genotoxicológico.

Além de testes citogenéticos, a presença de lesões no DNA relacionadas com o glifosato e suas formulações tem também sido objeto de investigação por parte de alguns autores. Em um estudo utilizando o ensaio do cometa, Clements et al. (1997) encontraram danos genotóxicos em rãs da espécie *Rana catesbeiana* expostas durante 24h ao Roundup®. Vários estudos envolvendo os efeitos da toxicidade do glifosato em peixes têm sido realizados recentemente, porém na literatura científica são encontrados somente dois estudos que examinam os efeitos citogenéticos e lesões no DNA de peixes utilizando o ensaio do cometa, causados pelo Roundup®.

Além do estudo de Grisolia (2002), danos genéticos foram avaliados pelo ensaio do cometa, teste do micronúcleo e alterações eritrocíticas nucleares em eritrócitos do peixinho dourado (*Carassius auratus*) expostos a concentrações de 5, 10 e 15 ppm de glifosato diluídos a partir do Roundup®. Diferenças significativas foram observadas em ambos os testes, mostrando que no estudo em questão, o Roundup® se mostrou genotóxico e mutagênico (ÇAVAS; KONEN, 2007).

As formulações a base de glifosato são consideradas de baixo risco a saúde dos seres humanos, porém alguns estudos estão mostrando o contrário. Resultado positivo, quanto à genotoxicidade do glifosato adicionado a surfactantes, foi encontrado pelo ensaio do cometa em cidadãos equatorianos expostos por pulverização aérea a esse composto (PAZ-Y-MINO et al., 2007). Efeitos citotóxicos e genotóxicos também foram vistos em células humanas expostas *in vitro* ao glifosato, sugerindo que o mecanismo de ação do glifosato não está limitado às células das plantas (MONROY et al., 2005).

Com base no exposto, o propósito desse trabalho foi avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos do herbicida Roundup® em peixes da espécie *Prochilodus lineatus*, utilizando o ensaio do cometa, teste do micronúcleo e alterações eritrocíticas nucleares.

2 OBJETIVOS

- Avaliar a ocorrência de danos no DNA dos peixes *P. lineatus* expostos a concentração de 10 mg.L^{-1} do produto comercial Roundup®, em testes de toxicidade aguda, empregando o ensaio do cometa com células sanguíneas e branquiais, teste do micronúcleo e das alterações eritrocíticas nucleares;
- Verificar a aplicabilidade do ensaio do cometa com células brânquias como uma ferramenta para detectar alterações genéticas em peixes da espécie *P. lineatus* quando expostos ao herbicida Roundup® ;
- Avaliar a utilização destes testes como biomarcadores capazes de fornecer informações relevantes para o monitoramento de recursos hídricos que recebem efluentes oriundos de atividades agrícolas.

3. ARTIGO

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO

Mutation Research

Efeitos genotóxicos e mutagênicos do herbicida Roundup® em peixes *Prochilodus lineatus*

Dalita Gomes Silva Morais Cavalcante¹, Claudia Bueno dos Reis Martinez², Silvia Helena Sofia^{1*}

¹*Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina*

²*Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina*

Endereço: Rodovia Celso Garcia Cid – PR 445 – Km 380 – Campus Universitário
Cx. Postal – 6001 CEP – 86051-990
Londrina – PR – Brasil
Telefone: 55-43-3371-4437
E-mail: shsofia@uel.br

* Autor para Correspondência

Resumo

Atualmente o glifosato é o herbicida mais extensamente usado no mundo e se caracteriza por ser um herbicida não seletivo, de amplo espectro, utilizado para inibição de crescimento de ervas indesejadas na agricultura. Um dos principais produtos encontrados no mercado, que contém como princípio ativo o glifosato é o Roundup®. Assim como vários outros agrotóxicos, o Roundup® pode alcançar o ecossistema aquático e atingir organismos não-alvos, como os peixes. Muitos agrotóxicos possuem potencial genotóxico, que é um fator de risco inicial para gerar efeitos carcinogênicos e reprodutivos em longo prazo. O objetivo desse estudo foi avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos da exposição aguda (6, 24 e 96h) ao herbicida Roundup®, na concentração de 10 mg.L⁻¹, para a espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. Para tanto, os eritrócitos foram usados no ensaio do cometa, teste do micronúcleo e análise da ocorrência de alterações nucleares e o ensaio do cometa foi padronizado para as células branquiais. Os resultados indicaram que o Roundup® promove danos genotóxicos em eritrócitos e células branquiais de *P. lineatus*. Os escores médios obtidos no ensaio do cometa para eritrócitos de *P. lineatus* após exposição de 6 e 96h ao Roundup® foram significativamente maiores do que seus respectivos controle-negativos. Já os escores médios para células branquiais mostraram aumento significativo para após exposição de 6 e 24h, em relação aos seus respectivos controles-negativos. A frequência de micronúcleos e das outras alterações eritrocíticas nucleares obtidas para os peixes expostos ao Roundup® não diferiram significativamente dos seus respectivos controles-negativos, para todos os tempos experimentais. Com base nestes resultados pode-se afirmar que nas condições testadas o Roundup® apresentou efeito genotóxico para *P. lineatus*, e que o teste do cometa realizado com células branquiais é uma ferramenta sensível para detectar danos genéticos em peixes.

Palavras-chave: Glifosato. Roundup®. Ensaio do cometa. Teste do micronúcleo. Peixe Neotropical.

1. Introdução

Herbicidas constituem uma categoria heterogênea de produtos químicos especificamente fabricados para o controle de plantas invasoras [1], podendo alcançar o ecossistema aquático de forma intencional ou, indiretamente, por meio de escoamento superficial do solo a partir de áreas onde ocorreram aplicações [2]. Dados experimentais revelam que vários agrotóxicos possuem propriedades genotóxicas ou mutagênicas, que constituem fatores de risco inicial para gerar efeitos carcinogênicos e reprodutivos em longo prazo [1].

Atualmente, dentre os vários agrotóxicos existentes no mercado, o glifosato é o mais extensamente usado e seu uso na agricultura está em contínua expansão em plantações que envolvem vegetais geneticamente modificados para tolerar o tratamento com este herbicida [3]. O glifosato caracteriza-se por ser um herbicida não seletivo de amplo espectro utilizado para inibição de ervas indesejadas na agricultura e nas paisagens industriais, urbanas, florestais e aquáticas [4].

O Roundup[®] é o nome comercial de um herbicida que contém como princípio ativo o glifosato, o qual é formulado como sal de isopropilamina (IPA), e um surfactante, o amino polioxietileno (POEA), que é adicionado para facilitar a incorporação do herbicida à planta [5,6]. Devido à sua elevada hidrossolubilidade e seu extenso uso, especialmente em sistemas de águas rasas, a exposição de organismos aquáticos não-alvo a esse herbicida é preocupante [7].

A toxicidade aguda do glifosato é considerada como baixa pela Organização Mundial da Saúde [8]. No entanto, as formulações comerciais à base de glifosato são geralmente mais tóxicas do que glifosato puro [9,10]. Surfactantes, como o POEA do Roundup[®], são o principal componente tóxico dos produtos formulados à base de glifosato para os organismos aquáticos [7]. Giesy et al. [11]

observaram que o POEA foi mais tóxico para os peixes que o glifosato puro. Testes de toxicidade aguda, realizados com carpas (*Cyprinus carpio*), revelaram que a concentração letal média para 96 horas (CL₅₀96h) de glifosato é bastante elevada, ou seja, de 620 mg.L⁻¹ [12]. De forma diversa, os valores de CL₅₀96h do produto formulado Roundup[®] foram bem menores, variando de 2 a 55 mg.L⁻¹, dependendo da espécie de peixe, da fase de vida e condições dos testes [13]. Langiano e Martinez [14] determinaram em testes de toxicidade aguda a CL₅₀96h do herbicida Roundup[®] para juvenis de *Prochilodus lineatus* como 13,69 mg.L⁻¹.

Embora os estudos sobre os efeitos biológicos dos agrotóxicos tenham aumentado nos últimos anos, muitas vezes os resultados sobre a genotoxicidade destes produtos são incompletos e, por vezes contraditórios. O potencial genotóxico do Roundup[®] vem sendo estudado extensivamente por meio de diferentes metodologias, contudo resultados conflitantes têm sido encontrados, sejam estes baseados em um mesmo tipo de ensaio ou em diferentes testes [15].

Os efeitos genotóxicos de poluentes podem ser monitorados usando ensaios *in vitro* e *in vivo*, porém, o teste do micronúcleo e o ensaio do cometa são os mais amplamente utilizados em avaliações mutagênicas e genotóxicas, respectivamente, devido, em parte, à sensibilidade de ambos os testes em detectar os danos no DNA e à rapidez na obtenção de resultados [4]. Em peixes, o teste do micronúcleo envolvendo eritrócitos de sangue periférico é o mais amplamente utilizado [16]. Como complemento ao teste do micronúcleo, muitos autores estão avaliando a ocorrência de alterações morfológicas no núcleo dos eritrócitos dos peixes, também chamadas de alterações eritrocíticas nucleares (AENs), como possíveis indicadores de genotoxicidade [17].

No Brasil, os herbicidas a base de glifosato são os mais utilizados e seu consumo aumentou 95%, no período de 2000 a 2004. Apenas no estado do Paraná 4.562 toneladas de glifosato foram usadas nas culturas de soja e milho, entre 2000 e 2002 [18] e concentrações elevadas de glifosato já foram detectadas em corpos de água próximos a áreas de cultura intensiva [19] Apesar de sua extensa utilização, pouco se conhece sobre os efeitos genotóxico e mutagênico deste herbicida para espécies de peixes brasileiras. Diversos estudos têm mostrado que *Prochilodus lineatus*, um peixe neotropical de hábito detritívoro, comumente encontrado em rios das regiões sul e sudeste do Brasil é uma espécie bioindicadora em potencial [20,21]. Além dos poluentes presentes na água, estes peixes, por se alimentarem de detritos, ficam expostos a substâncias químicas que eventualmente tenham ficado retidas no sedimento [22].

Em estudos com peixes, principalmente pela facilidade de obtenção e de uso, os eritrócitos de sangue periférico têm sido o principal tipo de célula analisada no ensaio do cometa e teste do micronúcleo [17,23-27]. Contudo, pesquisas revelam que células de brânquias de peixes expostas a um poluente podem mostrar danos mais freqüentes ao DNA que os eritrócitos destes animais [23]. Isto pode ser explicado pelo fato das células branquiais estarem continuamente se dividindo e também por estarem diretamente em contato com o contaminante no ambiente aquático [24].

Dentro deste contexto o propósito desse trabalho foi avaliar, com base no ensaio do cometa, teste do micronúcleo e alterações eritrocíticas nucleares (AENs), os possíveis efeitos genotóxicos da exposição aguda ao herbicida Roundup® para peixes da espécie *P. lineatus*.

2. Materiais e métodos

2.1. Animais

Foram utilizados exemplares jovens de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847), apresentando peso médio de $9,57\text{g} \pm 5,42$ e comprimento total de $9,7\text{cm} \pm 1,81$ (média \pm DP, $n= 50$), cedidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL). Os peixes foram submetidos a um período de aclimação por pelo menos uma semana antes dos experimentos. Durante este período os peixes foram mantidos em tanques de 300 L, com água continuamente aerada, temperatura em torno de 20°C , pH em torno de 7,0, fotoperíodo de 14 h de escuro e 10 h de luz. Os peixes foram alimentados com ração comercial a cada 48 horas, exceto durante e no dia anterior aos testes.

2.2. Testes de toxicidade

Após a aclimação, os peixes foram divididos em dois grupos (experimental e controle), contendo 6 peixes cada um. Uma réplica de cada grupo foi também feita. Os animais foram mantidos em aquários de 100L, em uma densidade inferior a relação de 1g de peixe para cada litro de água. Os aquários dos grupos controle foram preenchidos apenas com água desclorada, enquanto os aquários dos grupos experimentais foram preenchidos com água contendo o herbicida Roundup[®] em uma concentração de $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, que corresponde a 75% do valor da CL_{50} 96h deste herbicida para *P. lineatus*. Esta mesma concentração foi usada para avaliar os efeitos fisiológicos deste herbicida para a mesma espécie de peixe por Langiano e Martinez [14].).

Os peixes foram mantidos nos aquários em testes de toxicidade estáticos e agudos (6, 24 e 96h). Durante os testes, a água foi constantemente monitorada

para temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade. As características físico-químicas da água dos grupos controle e experimentais, em todos os períodos de exposição, mantiveram-se estáveis durante os experimentos, e os valores médios (média \pm desvio padrão) obtidos para os grupos controle e experimentais foram, respectivamente: temperatura $25,67 \pm 0,52$ e 25 ± 0 °C; pH $7,37 \pm 0,17$ e $7,39 \pm 0,10$; OD $6,98 \pm 0,81$ e $7,02 \pm 0,84$ O₂. L⁻¹; condutividade $53,67 \pm 10,40$ e $62,83 \pm 4,35$ $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Os peixes foram anestesiados com benzocaína e, então, sacrificados por secção medular. A retirada do sangue, para os ensaios do cometa, micronúcleo e avaliações das alterações eritrocíticas nucleares (AENs), foi feita por meio da veia caudal, utilizando-se uma seringa heparinizada. Um volume de 10 μL do sangue coletado dos peixes foi transferido para um tubo de microcentrífuga contendo 700 μL de salina (PBS: NaCl 126,6mM, KCl 4,8mM, CaCl 1,5mM, NaHCO₃ 3,7mM, Na₂HPO₄ 8,9mM, NaH₂PO₄ 2,9 mM) e mantido em gelo até o momento de se realizar o ensaio do cometa.

As brânquias dos peixes também foram removidas para o ensaio do cometa. Imediatamente após a remoção, os filamentos branquiais foram separados e limpos, com o auxílio de pincel e solução salina, para a retirada da maior quantidade possível de sangue. Em seguida, o arco branquial foi cortado e descartado e os filamentos branquiais foram armazenados em 700 μL de solução salina e mantidos em gelo até o momento da preparação da suspensão celular. A metodologia para a obtenção da suspensão de células brânquias foi baseada em protocolo descrito por Kilemade et al. [28], com modificações. Os filamentos foram seccionados com o auxílio de navalhas de aço descartáveis, sobre uma placa de cera e o material resultante foi colocado em um tubo de microcentrífuga. Para a dissociação das células foram adicionados 200 μL de tripsina a 0,25% (0,125 gramas de tripsina em

pó + 50 mL de H₂O + 0,5 mL de EDTA 0,5M), à temperatura ambiente, sendo homogeneizados manualmente por inversão periódica durante 15 min. Após esse período, foi acrescentado aos tubos 200 µL de soro bovino fetal, que tem a função de inibir a ação da tripsina. Após 15 minutos com o auxílio de uma pipeta Pasteur, o homogeneizado foi coletado e filtrado, para a obtenção da suspensão celular branquial.

2.3. Controle Positivo

Foram também montados três grupos controles-positivos, nos quais os animais (N = 24), após o período de aclimatação, foram anestesiados e receberam uma injeção intraperitoneal de ciclofosfamida (0,04 mg de ciclofosfamida / g de animal), reconhecido agente mutagênico [17, 29]. Estes peixes foram mantidos em aquários com água desclorada e aerada e após 6, 24 ou 96h, tiveram o sangue e as brânquias amostrados, como descrito anteriormente.

2.4. Viabilidade celular

Antes da realização do ensaio do cometa, com o objetivo de se avaliar integridade das células sanguíneas e branquiais a serem analisadas foi realizada um teste de viabilidade celular utilizando-se a metodologia da exclusão de células pelo corante azul de Trypan. No protocolo empregado, 20µL de sangue misturados a 1mL de solução salina ou 20µL de suspensão de células brânquias foram misturados a 50µL do corante azul de Trypan; em seguida alíquotas destas misturas foram colocadas em câmara de Neubauer e analisadas em um microscópio de luz. Foram contadas 100 células, discriminando as células brancas (célula viável) das células azuis. A mudança de coloração da célula para azul indica que a célula não possui mais a sua membrana íntegra, permitindo a passagem do corante por esta. Foram

consideradas viáveis amostras com células sanguíneas ou branquiais com, pelo menos, 80% de viabilidade.

2.5. *Ensaio do Cometa*

A metodologia empregada no ensaio alcalino do cometa foi baseada no protocolo de Singh et al. [30] e Speit e Hartmann [31], com algumas modificações. Para as análises do sangue e das células das brânquias, respectivamente, 10 μ L e 15 μ L das soluções contendo as células destes tecidos foram misturadas com 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% (100 mg em 20 mL PBS) e mantidas em banho-maria a 37°C. Em ambos os casos, da suspensão celular obtida desta mistura com agarose, 130 μ L foram divididos e pipetados sobre duas lâminas de vidro previamente cobertas com uma película de agarose normal 1,5% (300 mg em 20 mL PBS). Após serem cobertas com lamínula, a lâmina foi colocada no refrigerador por 30 min para permitir a completa solidificação da agarose com as células.

Após a solidificação da agarose, a lamínula foi removida e a lâmina foi colocada em uma solução de lise recém preparada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 10% DMSO, 1 mL Triton X-100, pH 10,0) por, no mínimo, 1 h. Após a lise, a lâmina foi colocada em uma cuba de eletroforese horizontal e uma solução tampão recém preparada (0,3 N NaOH/1 mM EDTA, pH > 13) foi adicionada à cuba, que permaneceu por 30 minutos, em gelo dentro de um recipiente escuro, para evitar entrada de luz. A seguir, a lâmina foi exposta por 20 minutos, a 4°C, às condições de eletroforese: 25V, com a corrente elétrica ajustada para 300mA através da alteração lenta do nível de tampão da cuba. Após a eletroforese, a lâmina foi coberta com tampão de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 5 minutos. Este passo foi repetido por mais 2 vezes. Após a terceira neutralização, a lâmina foi seca

em posição inclinada e fixada com etanol durante 10 minutos. As lâminas foram estocadas na geladeira por, no máximo, 30 dias.

Para a coloração foram adicionados 50 μ L de brometo de etídeo (20 μ g/mL) a cada lâmina, que foram examinadas ao microscópio de fluorescência em objetiva de 100X. Foram confeccionadas duas lâminas por animal. Utilizando-se lâminas codificadas, foram analisadas 100 células por animal. Para cada célula analisada os danos ao DNA foram classificados em 4 categorias: classe 0 = sem dano; classe 1 = dano mínimo; classe 2 = dano médio e classe 3 = dano máximo; de acordo com o tamanho da cauda do cometa e a dispersão dos fragmentos de DNA. Com base nesta análise, as células receberam escores de 0 (dano mínimo = nenhuma célula danificada) a 3 (dano máximo). Para o cálculo do escore de dano, o número de células em cada classe (0, 1, 2 ou 3) foi multiplicado pelo valor de cada classe e o escore foi calculado pela fórmula: $(0 \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D)$, onde: A, B, C e D correspondem ao número de células em cada uma das classes. Assim, o valor de escore pode variar de um mínimo de 0 e um valor máximo de 300. Também foi calculado para cada animal o número de nucleóides danificados, que corresponde à soma das células observadas com danos de classes 1, 2 e 3. Para cada grupo experimental, calculou-se o número médio de nucleóides danificados, pela média do número de nucleóides danificados considerando-se todos os animais de cada grupo.

2.6. Teste do micronúcleo (MN) e ocorrência de alterações eritrocíticas nucleares (AENs)

O teste do micronúcleo foi realizado de acordo com a metodologia de Hooffman e Raat [32]. Para os testes do micronúcleo e análise da ocorrência de AENs foram feitos esfregaços sangüíneos, a partir de uma alíquota de 5 μ L de sangue dos peixes

e foram confeccionadas duas lâminas por animal. Após secagem por 24 horas em temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em metanol absoluto por 10 min e, coradas com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato pH 6,8 (0,06M Na₂HPO₄, 0,06M KH₂PO₄), durante 20 minutos. Por fim, após lavagem com água destilada e secagem à temperatura ambiente, as lâminas foram preparadas para o uso permanente. A análise citológica das lâminas foi realizada em microscópio de luz (Olympus), sob a objetiva de 100x. Para cada animal, foram analisados 3000 eritrócitos, anotando-se as freqüências de micronúcleos e também a presença de alterações nos núcleos das células. Ambas as lâminas foram codificadas para se evitar uma análise tendenciosa.

Para ser considerado um micronúcleo, as características observadas foram:

- 1) ser morfológicamente semelhante ao núcleo principal;
- 2) ter diâmetro entre 1/16 até 1/3 do núcleo principal;
- 3) não ser refringente;
- 4) não estar ligado ou conectado ao núcleo principal;
- 5) possuir a mesma intensidade de coloração do núcleo principal, embora às vezes possa apresentar coloração um pouco mais intensa.

A classificação das alterações eritrocíticas nucleares foram baseadas em Carrasco et al. [33] sendo: 1) núcleo segmentado (NS); 2) núcleo lobulado (NL) e 3) núcleo com constricção ou em “forma de rim” (NR). Os resultados referentes à ocorrência de MN, NS, NL e NR estão apresentados como número de eritrócitos micronucleados ou com alterações por cada 1000 células analisadas (em ‰). As análises comparativas foram feitas separadamente para os resultados de micronúcleo e para as AENs. Para a comparação da ocorrência de AENs entre os diferentes grupos experimentais (CTR negativo X CTR positivo e CTR negativo X Roundup) considerou-se a soma dos eritrócitos com NS+NL+NR por animal.

2.7. Análise estatística

Os resultados obtidos para os grupos controle e experimental, e os controle-negativo e controle-positivo em um mesmo tempo de exposição, foram comparados entre si por meio do teste *t* de Student. As análises estatísticas foram feitas separadamente para os resultados do teste do micronúcleo e das alterações eritrocíticas nucleares. Os resultados obtidos nos 3 tempos experimentais (6,24 e 96h) no ensaio do cometa, tanto para sangue quanto para brânquias para os grupos controle positivo foram comparados entre si pela análise de variância - critério único (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas SNK (Student-Newman-Keuls) quando necessário [34].

3. Resultados

3.1 Controle - negativo X Controle – positivo

3.1.1 Ensaio do Cometa

Os resultados obtidos com o ensaio do cometa aplicado às células de sangue dos animais dos grupos controle-negativo e controle-positivo revelaram que, em todos os tempos experimentais, os animais expostos a ciclofosfamida (controle-positivo) apresentaram tanto as médias de nucleóides danificados, quanto os escores médios significativamente mais elevados que os seus respectivos controles-negativos (Fig. 1a). Após tratamento de 6h com a ciclofosfamida (CF), o número médio de nucleóides de eritrócitos danificados foi de aproximadamente 75%, cerca de três vezes a quantidade apresentada pelo respectivo controle-negativo. Este efeito de danos aumentou de forma significativa com o tempo de exposição, com os animais do controle-positivo de 24h apresentando cerca de 90% de eritrócitos com

danos, aumento este acompanhado também por uma elevação significativa no escore médio de danos e, seguido por uma diminuição significativa declinando na média de eritrócitos com nucleóides e escores de danos para os animais expostos a CF por 96h (Fig. 1a-b).

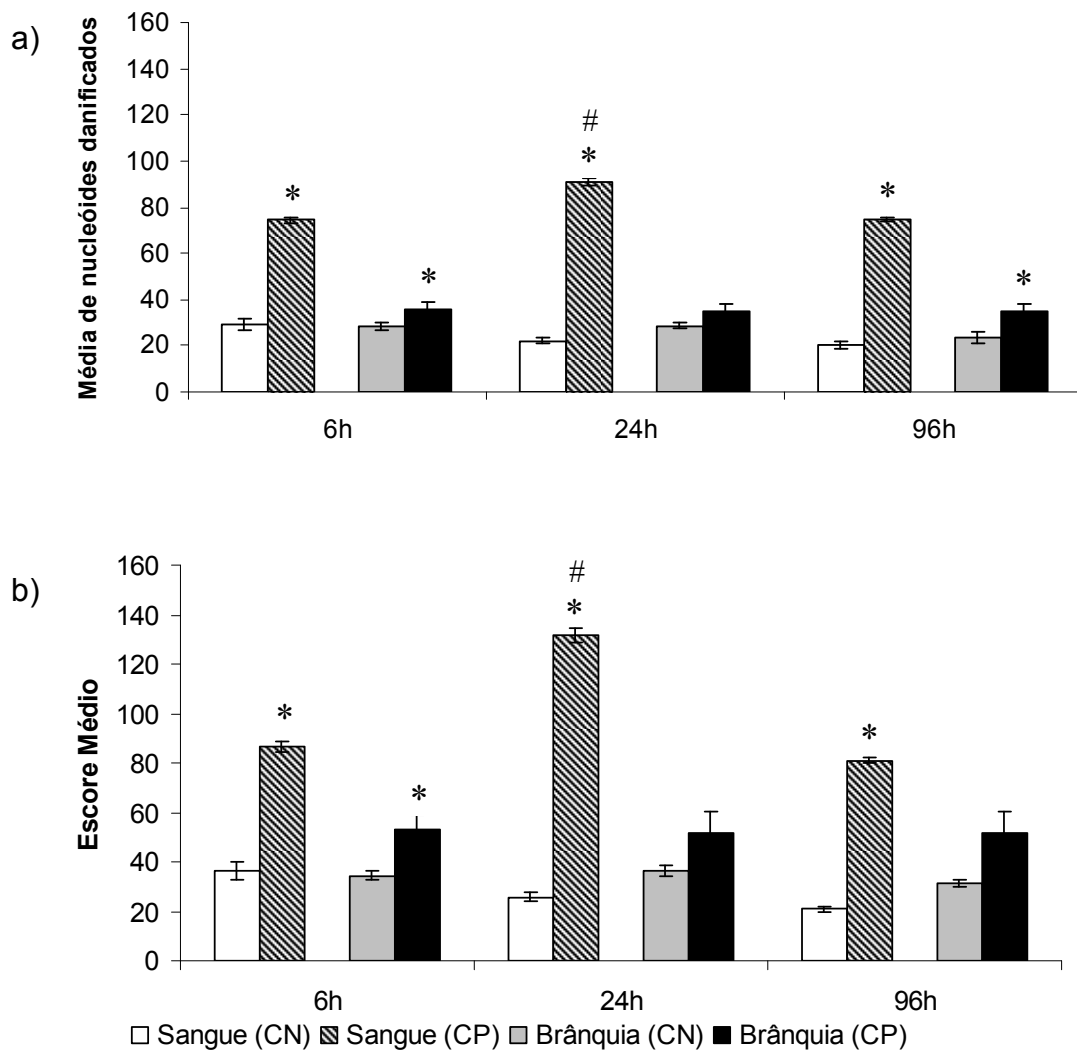


Fig. 1. Número médio de nucleóides danificados por animal e escores de cometa em eritrócitos e células branquiais de *P. lineatus*, nos grupos controle-negativo (CN) e controle-positivo (CP), durante os tempos de exposição de 6, 24 e 96h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão. O número de animais analisados em cada grupo variou de 4 a 8. * = controle positivo significativamente diferente do controle negativo ($p < 0,01$); # = diferença significativa entre os controles positivos dos três tempos experimentais ($p < 0,05$).

Nas análises de células de brânquias, apenas os peixes do controle-positivo, expostos por 6h à CF apresentaram um aumento significativo nas médias de nucleóides danificados e no escore médio de danos, quando comparados com seu controle-negativo. No caso dos animais do grupo controle-positivo de 96h foi detectado apenas um aumento significativo na média de nucleóides com danos (Fig. 1b). De forma diversa aos resultados obtidos para eritrócitos de sangue periférico, não foram detectadas diferenças significativas no número médio de nucleóides danificados e escores médios em células de brânquias dos animais dos três controles-positivos.

3.1.2 Teste do micronúcleo e AENS

As análises de eritrócitos de sangue revelaram um aumento significativo na frequência de micronúcleos apenas entre os animais dos controles-positivos e seus respectivos controles-negativos nos tempos de 24h e 96h (Fig. 2). Para os três tempos experimentais foram detectadas alterações eritrocíticas nucleares em animais dos grupos controle-negativo e controle-positivo, contudo as frequências destas alterações se mostraram baixas, variando de 0,41 a 2,18. O tipo de alteração mais comum foi o de núcleo em constricção, detectada em maior quantidade para os animais do controle-negativo e do controle-positivo, no tempo de 96h. Nenhuma diferença significativa nas frequências destas alterações entre os animais dos grupos controle-negativo e controle-positivo foi detectada, para qualquer um dos tempos experimentais.

Na Fig. 3 são apresentadas as frequências médias de ocorrência do conjunto de alterações nucleares (exceto MN) obtidas em cada tempo experimental, para os grupos controle-negativo e controle-positivo.

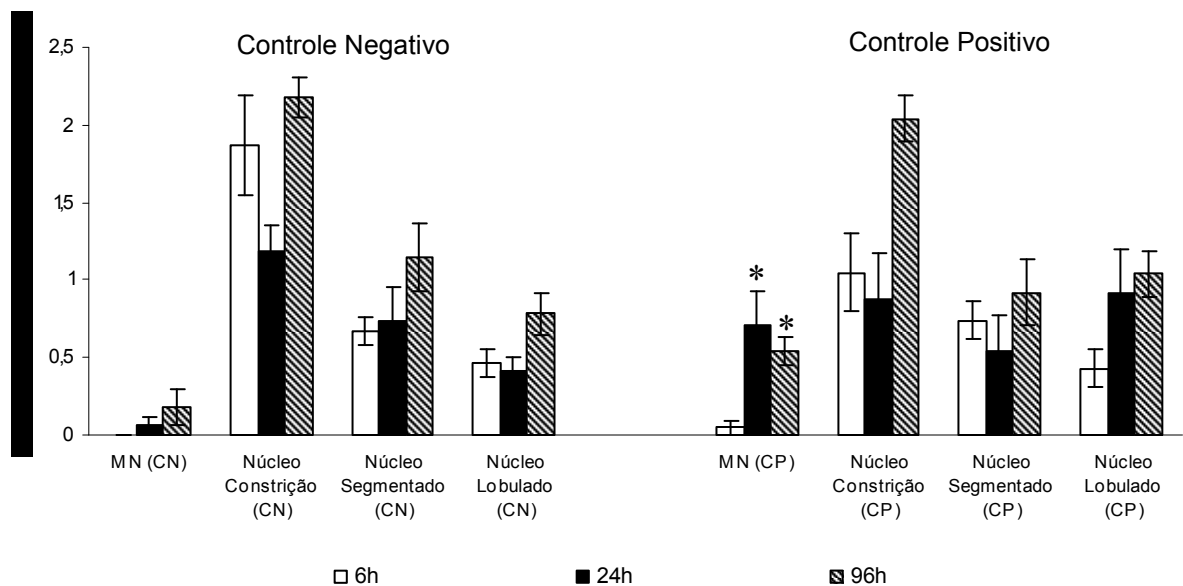


Fig. 2. Frequência de ocorrência (para cada 1000 eritrócitos analisados) de micronúcleos (MN) e das diferentes alterações eritrocíticas nucleares nos peixes dos grupos controle-negativo (CN) e controle-positivo (CP) após 6, 24 e 96h de exposição. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão. O número de animais analisados em cada grupo variou de 7 a 9. * indica diferença significativa do respectivo controle negativo ($p < 0,01$).

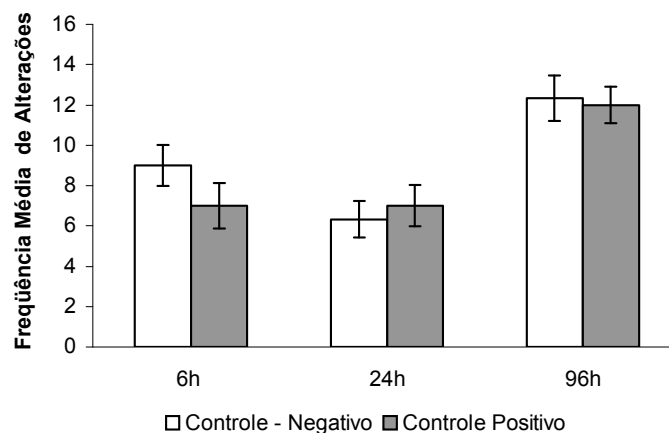


Fig. 3. Frequências de ocorrência de alterações eritrocíticas nucleares (sem contabilizar os micronúcleos), por animal, nos peixes dos grupos controle-negativo e controle-positivo, durante os tempos de exposição de 6, 24 e 96h. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão.

3.2 Controle – Negativo X Roundup®

3.2.1 Ensaio do Cometa

No ensaio do cometa com eritrócitos, a média de nucleóides danificados dos animais do grupo Roundup® diferiu, significativamente, do seu respectivo controle-

negativo no tempo experimental de 6h, mas não nas exposições de 24h e 96h (Tabela 1). Para as células branquiais, a média de nucleóides danificados do grupo Roundup® demonstrou significativamente maior que os seus respectivos controles-negativos para as exposições de 6 e 24h.

Tabela 1 – Frequência relativa de nucleóides (%) observados em cada uma das classes de cometa (0, 1, 2 e 3) nos grupos controle-negativo (CN) e grupo Roundup® (RDP), média de nucleóides danificados em eritrócitos e células branquiais de *P. lineatus*, durante os tempos de exposição de 6, 24 e 96h. N = número de animais analisados.

Tecido	Tempo	Grupo	N	Classes de danos				Média de nucleóides danificados ± Erro Padrão
				0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	
Sangue	6h	CN	6	70,5	23,0	3,16	3,33	29,50 ± 2,41
		RDP	6	54,5	33,3	8,83	3,33	45,5 ± 6,11 *
	24h	CN	5	77,8	17,6	2,83	1,67	22,17 ± 1,42
		RDP	6	78,5	18,7	2,17	0,67	21,50 ± 2,43
	96h	CN	9	78,4	20,9	0,66	0,00	20,25 ± 1,60
		RDP	12	76,7	21,3	1,58	0,33	23,25 ± 1,11
Brânquias	6h	CN	6	71,5	24,5	2,17	1,83	28,50 ± 1,45
		RDP	5	66,6	28,0	3,20	2,60	33,80 ± 1,07*
	24h	CN	6	71,2	23,4	3,00	2,40	28,80 ± 1,02
		RDP	6	61,2	29,2	4,83	4,50	38,5 ± 1,33*
	96h	CN	4	76,7	13,2	5,75	4,25	23,50 ± 2,29
		RDP	3	74,3	11,7	9,33	4,67	25,67 ± 1,67

* indica diferença em relação ao respectivo controle negativo ($p < 0,01$).

Os resultados mostraram que nos tempos de 6 e 96h, os escores médios obtidos no ensaio do cometa para eritrócitos de *P. lineatus* expostos ao Roundup® foram significativamente maiores que os seus respectivos controle-negativos (Fig. 4). Já os escores médios para células branquiais mostraram aumento significativo para os tempos experimentais de 6 e 24h (Fig. 5).

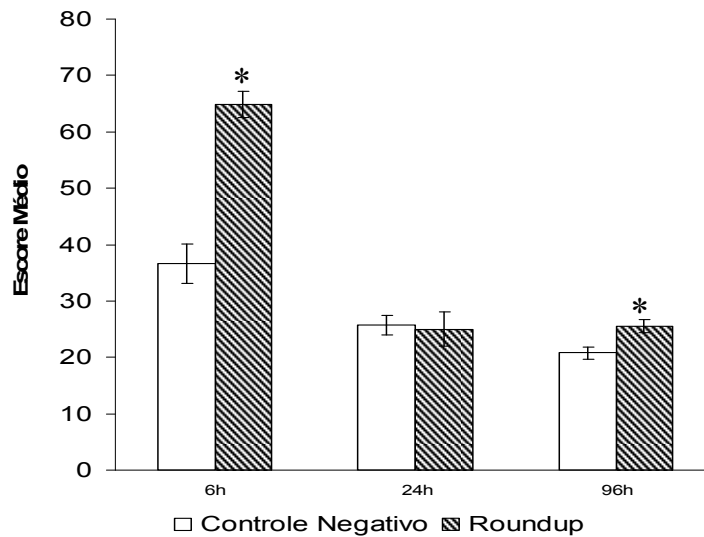


Fig. 4. Escores médios obtidos no ensaio do cometa para eritrócitos de *P. lineatus* dos grupos controle-negativo e experimental (Roundup®), durante os tempos de exposição de 6, 24 e 96h. As barras representam a média e a linha vertical o erro padrão. * indica diferença em relação ao respectivo controle negativo ($p < 0,01$).

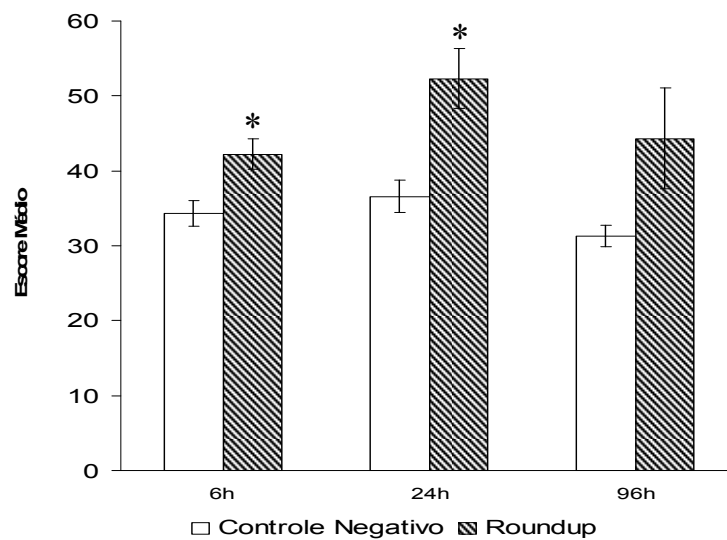


Fig. 5. Escores médios obtidos no ensaio do cometa para as células branquiais de *P. lineatus* dos grupos controle-negativo e experimental (Roundup®), durante os tempos de exposição de 6, 24 e 96h. As barras representam a média e a linha vertical o erro padrão. * indica diferença em relação ao respectivo controle negativo ($p < 0,01$).

3.2.2 Teste do micronúcleo e AENS

Na Tabela 2 são discriminados os tipos de alterações nucleares encontradas e as freqüências em que estas ocorreram. As análises mostraram que nem as freqüências absolutas de MN e outras alterações eritrocíticas nucleares obtidas nos diferentes tempos experimentais (Tabela 2), nem as freqüências médias de MN e demais alterações (Fig. 6) diferiram estatisticamente entre os grupos Roundup[®] e controle-negativo.

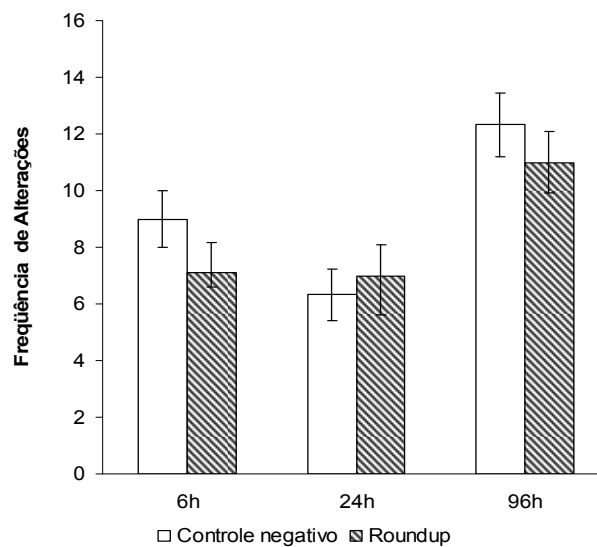


Fig. 6. Freqüência média do total de alterações eritrocíticas nucleares (sem contabilizar os micronúcleos) dos grupos controle-negativo e Roundup[®] de *P. lineatus*, durante os tempos de exposição de 6, 24 e 96 h. As barras representam a média e a linha vertical o erro padrão.

Tabela 2 – Frequência média de ocorrência (para cada 1000 eritrócitos analisados) de micronúcleos e das diferentes alterações eritrocíticas nucleares nos peixes do grupo controle negativo (CN) e Roundup® (RDP) após 6, 24 e 96h de exposição. N = número de animais analisados. Os resultados representam o valor da média \pm erro padrão.

Alterações	Tempo	Tratamento	N	Número total da alteração	Frequência média de ocorrência (‰)
Micronúcleo	6h	CN	8	0	0
		RDP	10	0	0
	24h	CN	9	2	0,07 \pm 0,05
		RDP	12	2	0,05 \pm 0,05
	96h	CN	9	5	0,18 \pm 0,11
		RDP	12	4	0,11 \pm 0,08
Núcleo em constricção	6h	CN	8	45	1,87 \pm 0,32
		RDP	10	46	1,53 \pm 0,17
	24h	CN	9	32	1,18 \pm 0,17
		RDP	12	42	1,17 \pm 0,25
	96h	CN	9	59	2,18 \pm 0,13
		RDP	12	69	1,92 \pm 0,18
Núcleo segmentado	6h	CN	8	16	0,67 \pm 0,09
		RDP	10	12	0,40 \pm 0,10
	24h	CN	9	20	0,74 \pm 0,21
		RDP	12	30	0,83 \pm 0,17
	96h	CN	9	31	1,15 \pm 0,22
		RDP	12	36	1,00 \pm 0,16
Núcleo lobulado	6h	CN	8	11	0,46 \pm 0,09
		RDP	10	13	0,43 \pm 0,11
	24h	CN	9	11	0,41 \pm 0,09
		RDP	12	13	0,36 \pm 0,14
	96h	CN	9	21	0,78 \pm 0,14
		RDP	12	27	0,75 \pm 0,12

4. Discussão

Nas últimas décadas avanços significativos têm sido alcançados na avaliação dos impactos de agentes potencialmente genotóxicos e mutagênicos a organismos aquáticos [35]. O desenvolvimento de novas metodologias e a aplicação de ensaios mais sensíveis na detecção da genotoxicidade de poluentes diversos sobre a biota aquática têm sido os principais determinantes para o alcance de avanços [36,37]. No presente trabalho, a genotoxicidade e mutagenicidade do herbicida Roundup® para *P. lineatus*, foi avaliada com base no ensaio do cometa, aplicado à análise de eritrócitos de sangue periférico e de células de brânquias desta espécie de peixe e com base no teste do micronúcleo e alterações eritrocíticas nucleares (AENs), ambos empregados às análises de possíveis danos aos eritrócitos dos animais.

Embora o ensaio do cometa seja uma metodologia amplamente utilizada, bem como adequada para avaliações genotóxicas de qualquer célula eucariótica nucleada [38], o pré-requisito de células isoladas para a aplicação desta técnica pode constituir uma limitação prática para o seu uso [39]. Para que se possa aplicar o teste cometa de forma segura em células de tecidos como, por exemplo, das brânquias e fígado, faz-se necessário o uso de uma técnica de isolamento das células que não cause injúrias no DNA das mesmas [40]. Em peixes, um tecido freqüentemente escolhido para se realizar o ensaio do cometa é o sangue em virtude da facilidade de coleta e não ser necessária a etapa de isolamento das células [28]. Além de eritrócitos, outros tipos celulares estão sendo utilizados para monitorar a genotoxicidade de poluentes, explorando assim respostas tecido-específicas [38]. Em estudos com estes organismos, diferentes tecidos como intestino, fígado, brânquias, gônadas, rim, baço e músculo estão sendo escolhidos para se avaliar danos no DNA por meio do ensaio do cometa [41]. Contudo,

qualquer que seja o tipo de célula a ser estudada, para que os resultados obtidos em testes de genotoxicidade sejam validados, critérios mínimos são exigidos para que um resultado seja aceito. Neste contexto, a utilização dos grupos controle negativo e positivo constitui uma das normas recomendadas [42]. Particularmente, o uso de um grupo controle-positivo (CP) assegura que um teste está sendo realizado de acordo com padrões estabelecidos, permitindo identificar de forma inequívoca uma resposta positiva [43] e, deste modo, a eficiência do procedimento empregado.

No presente estudo, os resultados com o ensaio do cometa indicaram que a ciclofosfamida, um agente alquilante indireto, amplamente utilizado em muitos sistemas-teste [44] se mostrou genotóxica tanto para as células de sangue, como para as células de brânquias dos animais (Fig. 1). Aparentemente, as células do sangue se mostraram mais sensíveis do que as de brânquias aos danos causados pela CF. Os eritrócitos dos animais do grupo controle-positivo (CP) apresentaram, em todos os tempos experimentais, tanto o escore médio quanto o número de nucleóides danificados, significativamente, maiores que os seus respectivos controles-negativos, indicando, como esperado, um maior número de danos no DNA dos animais expostos a ciclofosfamida (Fig. 1a).

De forma diversa, ao que foi observado para os eritrócitos, as células das brânquias mostraram danos ao material genético somente nos tempos 6h e 96h de exposição a CF, com um aumento significativo no escore médio de danos apenas nos peixes do CP de 6h (Fig. 1a). Neste estudo, a escolha pela análise de células branquiais deve-se ao fato deste tecido estar em contato direto com o meio ambiente e conseqüentemente com os poluentes presentes na água [24]. O maior efeito da ciclofosfamida para as células de sangue pode ser em parte atribuído à via de administração utilizada para a exposição dos peixes a este agente genotóxico,

que foi feita por injeção intraperitoneal, resultando possivelmente em uma maior exposição de eritrócitos do que as células das brânquias à ação da CF. A via de administração é um fator importante que pode afetar os resultados de testes de genotoxicidade *in vivo*, pois tecidos diferentes podem apresentar sensibilidades variáveis a um agente conforme a rota de administração deste [45].

Os resultados obtidos a partir do ensaio do cometa com células branquiais mostraram-se mais heterogêneos do que os obtidos com eritrócitos, devido à maior variação dos resultados dos diferentes animais de um mesmo grupo. Segundo Mitchelmore e Chipman [39] alguns tecidos, constituído por vários tipos celulares, como é o caso das brânquias, podem apresentar uma maior heterogeneidade de resultados. Cabe ressaltar também que o tratamento enzimático com tripsina para a obtenção da suspensão celular das brânquias não parece ter gerado quebras adicionais ao DNA, como já sugerido por outros autores [39], visto que os resultados referentes ao escores de danos e número médio de nucleóides danificados obtidos para os animais do controle-negativo, tanto para eritrócitos quanto para brânquias foram semelhantes.

Além de genotóxica, a ciclofosfamida também se mostrou mutagênica para os peixes dos grupos controle-positivo de 24h e 96h (Fig. 2), mas não para os peixes expostos por 6h a este agente. O teste do micronúcleo detecta quebras cromossômicas que derivam de danos no DNA, fixados na sua replicação, portanto é necessário que a população celular esteja em mitose e que ocorra pelo menos um ciclo celular para a detecção de MN [16]. Entretanto, existe pouca informação sobre a duração do ciclo celular nos tecidos de teleósteos, considerando-se que este ciclo varia de acordo com a temperatura nos peilótermos [46,47]. De acordo com a literatura, em peixes os eritrócitos micronucleados ocorrem de 1 a 5 dias após a

exposição, mas é possível visualizar micronúcleos depois de 2 a 3 dias [16]. Grisolia e Cordeiro [48] analisando o efeito da CF e outros agentes químicos em eritrócitos de sangue periférico de três espécies de peixes detectaram um aumento crescente nas freqüências de MN durante o 2º e 7º dias de exposição aos agentes testados, com algumas espécies se mostrando mais sensíveis do que outras. Assim, a ausência de alterações significativas nas freqüências de MN para os peixes expostos por 6h a CF, pode estar relacionada à cinética da hematopoiese da espécie estudada, ou seja, provavelmente seja resultante do curto intervalo de tempo de exposição, o qual foi insuficiente para a ocorrência de um ciclo celular completo e, conseqüentemente, para a detecção de micronúcleos nas células analisadas.

Em peixes, além da presença de micronúcleos, existem vários tipos de lesões nucleares nos eritrócitos, cuja origem não está ainda muito bem esclarecida [49]. Tais alterações estão sendo usadas por diversos autores como indicadoras de genotoxicidade em espécies de peixes [28,50-52]. Embora o uso desta metodologia tenha indicado que a ciclofosfamida induziu a uma maior incidência de alterações nucleares em outras espécies de peixes [17,23,53], isto não ocorreu no presente trabalho, em relação a *P. lineatus* (Figs. 2-3).

Estudos sobre o potencial genotóxico do glifosato e de formulações a base deste produto, como o Roundup[®], exibem uma grande variação em virtude das diferentes formulações testadas, doses da aplicação, metodologias empregadas e dos organismos estudados [4]. Tal fato poderia explicar, em parte, os resultados controversos que têm sido publicados quanto aos efeitos desses produtos nos organismos testados. De acordo com alguns desses estudos, o glifosato e

formulações à base desse agrotóxico podem tanto resultar na ausência [54-57] quanto na incidência [56-62] de danos ao material genético.

Diferentes estratégias, como reparo dos erros no genoma danificado, morte celular por citotoxicidade e/ou por apoptose e modulação da expressão gênica são utilizadas como resposta celular dos organismos para se defender de agentes genotóxicos [63]. No presente estudo, o teste do cometa revelou um aumento significativo de danos no DNA de eritrócitos e das células branquiais para os animais expostos ao Roundup[®] durante 6h. Porém, após 24h de exposição, foi verificado um comportamento distinto entre eritrócitos e células branquiais (Tabela 1). Os danos no DNA dos eritrócitos de *P. lineatus* expostos ao Roundup[®] diminuíram, retornando ao escore médio encontrado no grupo controle respectivo (Fig. 4). É possível que o sistema de reparo dos peixes tenha atuado sobre o DNA dos eritrócitos ou que as células danificadas tenham sido removidas pelo baço [16]. Estudo realizado com eritrócitos de *Tilapia mossambica* também mostrou uma redução de danos no DNA após 48h de exposição ao agrotóxico monocrotophos [64]. Já para as células das brânquias, os danos no DNA dos peixes expostos ao Roundup[®] por 24h mantiveram-se maiores, em relação ao respectivo controle (Fig. 5). Neste caso, é possível que o sistema de reparo tenha agido nas células branquiais danificadas pelo Roundup[®], uma vez que o sistema de reparo de DNA em células de brânquias de peixes pode já se mostrar efetivo dentro de 24 horas após exposição ao agente genotóxico [65]. Contudo, como as brânquias estão em contato direto com os poluentes presentes na água, estas poderiam sofrer continuamente novas lesões no seu DNA e, assim, a velocidade de produção de danos ao DNA das células pode ter sido maior que a capacidade das enzimas de atuarem e repararem estes danos. Outra hipótese seria que o sistema de reparo das células branquiais seja mais lento,

de modo que as células danificadas tenham permanecido mais tempo no tecido branquial, resultando em escore de cometa aumentado após 24h. Em comparação com as células de mamíferos, o reparo do DNA em organismos aquáticos é mais lento [39]. Assim como o presente estudo, Kilemade et al. [28] encontraram danos no DNA de células branquiais expostas a sedimentos contaminados com PAHs. Segundo esses autores, as brânquias mostraram-se boas indicadoras de danos no DNA, desde que sejam tomados os devidos cuidados durante as etapas de isolamento das células para não gerar excessivos danos mecânicos no DNA.

A biotransformação de poluentes resulta freqüentemente na produção de substâncias reativas intermediárias como as espécies reativas de oxigênio (EROS) que são altamente tóxicas e podem ocasionar danos oxidativos ao DNA. Embora os organismos sejam dotados de um sistema de defesa antioxidante para proteger os tecidos contra lesões oxidativas, se a velocidade de produção de EROS exceder a capacidade dos mecanismos de defesa, pode ocorrer lesão nas células e no DNA [66]. Assim, pode-se supor que o aumento de danos no DNA de eritrócitos de *P. lineatus*, detectado pelo teste do cometa para o tempo de 96h de exposição ao Roundup[®], possa estar relacionado às espécies reativas de oxigênio (EROs), geradas na metabolização do Roundup[®], que teriam agido sobre o DNA dos animais expostos, resultando nas lesões detectadas pelo ensaio do cometa. De fato, Langiano e Martinez [14] verificaram que indivíduos de *P. lineatus* expostos a 10 mg.L⁻¹ de Roundup[®], por até 96h, apresentaram aumento significativo na atividade hepática da catalase, indicando ativação das defesas antioxidantes, provavelmente em decorrência da produção aumentada de peróxido de hidrogênio. Vanzella et al. [26] também relacionaram os danos genéticos observados em *P. lineatus* após 96h e 15 dias de exposição à fração solúvel do óleo diesel, aos processos oxidativos

resultantes da metabolização de hidrocarbonetos presentes nesta fração do óleo, considerando-se que neste caso os animais também apresentaram ativação das defesas antioxidantes [21].

O teste do micronúcleo é um ensaio citogenético amplamente utilizado para a avaliação de danos cromossômicos *in vivo* ou *in vitro* [50]. O tempo para atingir o pico de Indução de micronúcleos no sangue periférico varia enormemente entre os teleósteos [16]. A ausência de indução de micronúcleos nos três tempos experimentais testados neste trabalho indica que a concentração sub-letal de 10 mg.L⁻¹ de Roundup® utilizada, a qual corresponde a 4,1 mg.L⁻¹ de glifosato, não se mostrou mutagênica para a espécie *P. lineatus*. Deve-se destacar que a concentração utilizada neste estudo (10 mg.L⁻¹) é ambientalmente realista, levando-se em consideração que as doses de aplicação máxima perto de corpos d'água sem vegetação marginal são em torno de 3,7 mg.L⁻¹ de glifosato [11]. Çavas e Konen [4], investigando o efeito mutagênico do glifosato para *Carassius auratus* (peixinho dourado) observaram que a menor concentração capaz de induzir a um aumento significativo no número de micronúcleos nos animais expostos ao glifosato durante 96 h foi de 5 mg.L⁻¹.

Das três metodologias empregadas neste estudo, a detecção de alterações nucleares foi a que se mostrou menos eficaz na identificação de danos ao material genético causado pelo herbicida Roundup® (Tabela 2). Considerando-se que nem a ciclofosfamida foi capaz de resultar em aumentos de AENs detectáveis para a espécie de peixe estudada, recomenda-se que pelo menos para *P. lineatus* os testes do cometa e MN sejam adotados como ferramentas em estudos de genotoxicidade. Porém, muitos autores estão mostrando que a ocorrência dessas alterações nucleares pode ser indicativo do dano citogenético em espécies de peixes. Ayllon e

Garcia-Vazquez [17] encontraram, além de micronúcleos, a ocorrência de alterações nucleares em eritrócitos periféricos de truta induzidos por ciclofosfamida e mitomicina-c, dois produtos com forte ação clastogênica. Alta incidência de micronúcleos e alterações nucleares também foi observada por Souza e Fontanetti [50] em eritrócitos de tilápias de um rio contaminado por efluentes de uma fábrica de transformação de xisto. Os resultados apresentados por Ventura et al. [27] também mostraram uma diferença significativa na taxa de alterações eritrocíticas nucleares em tilápias expostas a várias concentrações do herbicida atrazina.

Como principais conclusões deste estudo, podemos afirmar que nas condições utilizadas, o Roundup[®] se mostrou genotóxico, mas não mutagênico para a espécie de peixe *P. lineatus*. O ensaio do cometa com brânquias se mostrou uma ferramenta sensível para indicar danos no DNA. Já as AENs para este trabalho, não se mostraram um bom indicador de genotoxicidade, sendo necessários mais estudos para se entender bem a origem dessas alterações. Por fim, a combinação do ensaio do cometa e o teste do micronúcleo parece ser uma eficiente ferramenta para monitorar agentes genotóxicos e mutagênicos no ecossistema aquático.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina e da CAPES. À Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina pelo fornecimento dos peixes. Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CT-Hidro/CNPq Processo 55.2785/2005 - 9). D.G.S.M.Cavalcante agradece ao CNPq pela bolsa de mestrado. C.B.R.Martinez agradece ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa.

5. Referências

- [1] C. Bolognesi, Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies, *Mutat. Res.* 543 (2003) 251–272.
- [2] R.Y. Tomita, Z. Beyruth, Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático, *Biológico* 64 (2002) 135-142.
- [3] G.M. Williams, R. Kroes, I.C. Munro, Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup® and its active ingredient, glyphosate, for humans, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 31 (2000) 117-165.
- [4] T. Çavas, S. Konen, Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay, *Mutagenesis* 22 (2007) 263-268.
- [5] M.T.K. Tsui, L.M. Chu, Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: aqueous sediment porewater exposures, *Arch. Environ. Con. Tox.* 46 (2004) 316-323.
- [6] R.A. Releya, The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities, *Appl. Soil Ecol.* 15 (2005) 618-627.
- [7] M.T.K. Tsui, L.M. Chu, Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors, *Chemosphere* 52 (2003) 1189–1197
- [8] WHO, World Health Organization, Glyphosate: Environmental Health Criteria 159. Geneve. 1994.
- [9] O.P. Amarante Jr., T.C.R. Santos, N.M. Brito, M.L. Ribeiro, Glifosato: propriedades, toxicidade, uso e legislação, *Química Nova*, 25 (2002) 589-593.
- [10] F. Peixoto, Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation, *Chemosphere* 61 (2005) 1115-1122.

- [11] J.P. Giesy, S. Dobson, K.R. Solomon, Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide, *Rev. Environ. Contam. T.* 167 (2000) 35-120
- [12] N.K. Neskovic, V. Poleksic, I. Elezovic, V. Karan, M. Budimir, Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp (*Cyprinus carpio*). *Bull. Environ. Cont.Toxicol.* 56 (1996) 295-302.
- [13] W. Jiraungkoorskul, E.S. Upatham, M. Kruatrachue, S. Sahaphong, S. Vichasri-Grams, P. Pokethitiyook, Histopathological effects of Roundup®, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Science Asia*, 28 (2002) 121-127.
- [14] V.C. Langiano, C.B.R. Martinez, Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*, *Comp. Biochem. Phys. C* 147 (2008) 222-231.
- [15] B.D. Dimitrov, P.G. Gadeva, D.K. Benova, M.V. Bineva, Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup®, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems, *Mutagenesis* 21 (2006) 375–382.
- [16] I. Udriou, The micronucleus test in piscine erythrocytes, *Aquat. Toxicol.* 79 (2006) 201-204.
- [17] F. Ayllon, E. Garcia-Vazquez, Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, *Ecotox. Environ. Safe.* 49 (2001) 221-225.
- [18] M.H. Inoue, R.S. Oliveira Jr., J.B. Regitano, C.A. Tormena, V.L. Tornisielo, J. Constantin. Critérios para avaliação do potencial de lixiviação dos herbicidas comercializados no Estado do Paraná. *Planta Daninha* 21 (2003) 313–323.

- [19] M.D. da Silva, M.D.R. Peralba, M.L.T. Mattos. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do arroio passo do pilão. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. Meio Ambient.* 13 (2003) 19–28.
- [20] M.P. Camargo, C.B.R. Martinez, Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil, *Environ. Toxicol. Phar.* 21 (2006) 61-69.
- [21] J.D. Simonato, C.L.B. Guedes, C.B.R. Martinez, Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil, *Ecotox. Environ. Safe.* 68 (2007) 112-120.
- [22] C.B.R. Martinez, I.M.S. Cólus, Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi, in: M.E. Medri, E. Bianchini, O.A. Shibatta, J.A. Pimenta, (Eds.), *A Bacia do Rio Tibagi*, Edição dos Editores, Londrina, 2002, pp. 551-577.
- [23] T. Cavas, S. Ergene-Gozukara, Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plants effluents, *Aquat. Toxicol.* 74 (2005) 264-271.
- [24] K. Al-Sabti, C.D. Metcalfe, Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water, *Mutat. Res.* 343 (1995) 121-135.
- [25] C.K. Grisolia, F.L.R.M. Starling, Micronuclei monitoring of fishes from lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges, *Mutat. Res.* 491 (2001) 39-44.
- [26] T.P. Vanzella, C.B.R. Martinez, I.M.S. Colus, Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutat. Res.* 631 (2007) 36–43.

- [27] B.C. Ventura, D.F. Angelis, M.A. Marin-Morales, Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay, *Pestic. Biochem. Phys.* 90 (2008) 42-51.
- [28] M.F. Kilemade, M.G.J. Hartl, D. Sheehan, C. Mothersill, F.N.A.M. Van Pelt, J. O'Halloran, N.M. O'Brien, Genotoxicity of field-collected inter-tidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus L.*) as measured by the comet assay, *Environ. Mol. Mutagen.* 44 (2004) 56-64.
- [29] M. J. Winter, L.J.Ellis, T.H. Hutchinson. Formation of micronuclei in erythrocytes of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) after acute treatment with mitomycin C or cyclophosphamide. *Mut.Res.* 629 (2007) 89-99.
- [30] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191.
- [31] G. Speit, A. Hartmann, The comet assay (single cell gel test) - a sensitive genotoxicity test for detection of DNA damage and repair, in: D.S. Henderson (Ed.), *Methods in Molecular Biology* 113, DNA-repair Protocols: Eukaryotic Systems, Human Press Inc., Totowa, NY, 1999, pp. 203–212.
- [32] R.N. Hoftman, W.K. de Raat. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulfonate. *Mutat.Res.* 104 (1982) 147-152.
- [33] K.R. Carrasco, K.L. Tilbury, M.S. Myers. Assessment of the piscine micronucleus test as an situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can.J.Fish Aquat.Sci.* 47(1990) 2123-2136.

- [34] J.H. Zar, in: W.D. McElroy, C.P. Swanson (Eds.), *Biostatistical Analysis*, 3rd ed., Prentice Hall, New Jersey, USA, 1996, p. 662.
- [35] A.N. Jha, Genotoxic studies in aquatic organisms: an overview, *Mutat. Res.* 552 (2004) 1-17.
- [36] L.R. Shugart. DNA damage as a biomarker of the exposure, *Ecotoxicology* 9 (2000) 329-340
- [37] R. Van Der Oost, J. Beyer, N.P.E. Vermeulen, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13 (2003) 57-149.
- [38] S. Sharma, N. S. Nagpure, R. Kumar, S. Pandey, S. K. Srivastava, P. J. Singh, P. K. Mathur, Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water fish *Mystus vittatus*, using the comet assay, *Arch. Environ. Con. Tox.* 53 (2007) 617-623.
- [39] C.L Mitchelmore, J.K. Chipman, DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring, *Mutat. Res.* 399 (1998) 135-147.
- [40] Y. Miyamae, M. Yamamoto, Y. F. Sasaki, H. Kobayashi, M. Igarashi-Soga, K. Shimoi, M. Hayashi Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories, *Mutat. Res.* 418 (1998) 131-140.
- [41] R.F. Lee, S. Steinert, Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals, *Mutat. Research* 544 (2003) 43–64.

- [42] F.E. Matsumoto, I.M.S. Cólus. Micronucleus frequencies in *Astianax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate, *Genet. Mol. Biol.* 23 (2000) 489-492.
- [43] L.R. Ribeiro, D.M.F. Salvadori, C.S. Tahahashi, C.C. Grisolia, Teste do micronúcleo em eritrócitos de medula óssea de camundongo, *Série Documentos – SBMCTA N^o 01*, 2004. Disponível em <http://www.sbmcta.org.br/>.
- [44] D. Anderson, J. B. Bishop, R. Colin Garner, P. Ostrosky-Wegman, P. B. Selby, Cyclophosphamide: Review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks, *Mutat. Res.* 330 (1995) 115-181.
- [45] J. Gaudin, S. Huet, G. Jarry, V. Fessard, *In vivo* DNA damage induced by the cyanotoxin microcystin-LR: Comparison of intra-peritoneal and oral administrations by use of the comet assay, *Mutat. Res.* (2008) *in press*.
- [46] K. Al-Sabtit, C.D. Metcalfe, Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water, *Mutat. Res.* 343 (1995) 121–135.
- [4] W.M. Ahmad, M.N. Ali, M.A. Farah, B. Ateeq, Computerized automated morphometric assay including frequency estimation of pentachlorophenol induced nuclear anomalies (micronucleus) in catfish *Heteropneustes fossilis*, *Chromosoma* 110 (2002) 570–574.
- [48] C.K Grisolia, C.M.T. Cordeiro, Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish, *Genet. Mol. Biol.* 23 (2000) 253-259.
- [49] F. Ayllon, E. Garcia-Vazquez, Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test, *Mutat. Res.* 467 (2000) 177–186.

- [50] T.S. Souza, C.S. Fontanetti, Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent, *Mutat. Res.* 605 (2006) 87-93.
- [51] T. Çavas, S. Ergene-Gözükara, Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent, *Mutat. Res.* 538 (2003) 81-91.
- [52] S. Ergene, T. Çavas, A. Celik, N. Koleli, F. Kaya, A. Karahan, Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution, *Ecotoxicology* (2007) 16:385-391.
- [53] T. Ohe, T. Watanabe, K. Wakabayashi, Mutagens in surface waters: a review, *Mutat. Res.* 567 (2004) 109-149.
- [54] A.G. Wildeman, R.N. Nazar, Significance of plant metabolism in the mutagenicity and toxicity of pesticides, *Can. J. Genet. Cytol.* 24 (1982) 437-449.
- [55] M. Moriya, T. Ohta, K. Watanabe, T. Miyazawa, K. Kato, Y. Shirasu, Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems, *Mutat. Res.* 116 (1983) 185-216.
- [56] A.P. Li, T.J. Long, An evaluation of the genotoxic potential of glyphosate, *Fund. Appl. Toxicol.* 10 (1988) 537-546.
- [57] C.K. Grisolia, A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides, *Mutat. Res.* 518 (2002) 145-150.
- [58] C. Bolognesi, S. Bonatti, P. Degan, E. Gallerani, M. Peluso, R. Rabboni, P. Roggeri, A. Abbondandolo, Genotoxic Activity of Glyphosate and Its Technical Formulation Roundup[®], *J. Agr. Food Chem.* 45 (1997) 1957-1962.

- [59] J. Rank, A. Jensen, B. Skov, L.H. Pedersen, K. Jensen, Genotoxicity testing of the herbicide Roundup[®] and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, Salmonella mutagenicity test, and *Allium* anaphase–telophase test, *Mutat. Res.* 300 (1993) 29–36.
- [60] M.B. Lioi, M.R. Scarfi, A. Santoro, R. Barbieri, O. Zeni, F. Salvemini, D. Di Bernardino, M.V. Ursini, Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636, *Environ. Mol. Mutagen.* 32 (1998) 39–46.
- [61] F.M. Torres, M.B.G.C. Urroz, H.G. Ovando, I.W. Anchordoqui, L.U. Vera, I.B.L. Hand, N.G. Abrate, La genotoxicidad del herbicida glifosato evaluada por el ensayo cometa y por la formación de micrunúcleus em ratones tratados, *Teoría* (2006) 53-60.
- [62] C. Clements, S. Ralph, M. Petras, Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet), *Environ. Mol. Mutagen.* 29 (1997) 277-288.
- [63] E. Moustacchi, DNA damage and repair: consequences on dose-responses, *Mutat. Res.* 464 (2000) 35–40.
- [64] B. Saleha Banu, K. Danadevi, M. F. Rahman, Y. R. Ahuja, J. Kaiser, Genotoxic effect of monocrotophos to sentinel species using comet assay, *Food Chem. Toxicol.* 39 (2001) 361-366.
- [65] K. Deventer, Detection of genotóxica effects on cells of liver and gills of *B. rerio* by means of single cell gel electrophoresis, *Bull. Environm. Toxicol.* 56 (1996) 911-918.
- [66] J. Cadet, T. Douki, D. Gasparutto, J. Luc Ravanat, Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features, *Mutat. Res.* 531 (2003) 5–23.

4. CONCLUSÕES

Como conclusões finais deste trabalho, pode-se afirmar que nas condições utilizadas:

- O herbicida Roundup[®] se mostrou genotóxico para a espécie de peixe *P. lineatus*, em testes de toxicidade aguda, empregando o ensaio do cometa com células sanguíneas e branquiais;
- O herbicida Roundup[®] não se mostrou mutagênico para a espécie de peixe *P. lineatus* em testes de toxicidade aguda, empregando o teste do micronúcleo e alterações eritrocíticas nucleares;
- O ensaio do cometa com brânquias se mostrou uma ferramenta sensível para detectar alterações genéticas em peixes da espécie *P. lineatus* quando expostos ao herbicida Roundup[®];
- As AENs não se mostraram um bom indicador de genotoxicidade em peixes da espécie *P. lineatus*;
- A associação da mesma técnica, no caso o ensaio do Cometa, em tecidos diferentes e a combinação do ensaio do cometa e o teste do micronúcleo se mostraram ferramentas eficientes para monitorar agentes genotóxicos e mutagênicos, capazes de fornecer informações relevantes para o monitoramento de recursos hídricos que recebem efluentes oriundos de atividades agrícolas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v.343, p.121-135, 1995.

AMARANTE JUNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v.25, p. 589-593, 2002.

ANVISA. Agência de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 84, disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B5780-1-0%5D.PDF>, 2003.

ARIAS, A.R.L.; BUSS, D.F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A.F.; FREIRE, M.M.; EGLER, M. MUGNAI, R.; BAPTISTA, D.F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência e Saúde**, v.12, p.61-72, 2007.

ARMAS E.D. (2006). **Biogeodinâmica de herbicidas utilizados em cana-de-açúcar (*Saccharum ssp.*) na sub-bacia do rio Corumbataí**. Tese (Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas) – Universidade de São Paulo, 187p.

AYLLON F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and Other Nuclear Lesions as Genotoxicity Indicators in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.49, p.221-225, 2001.

BARJA, B.C.; HERSZAGE, J.; SANTOS AFONSO, M. Iron (III) – phosphonate complexes. **Polyhedron**, v.20, p.1821-1830, 2001.

BENNEMANN, S.T.; SILVA-SOUZA, A.T.; ROCHA, G.R.A. Composición ictiofaunística em cinco localidades de la cuenca Del rio Tibagi, PR - Brasil. **Interciencia**, v.20, p. 7-13, 1995.

BERNHARDT, E.S., PALMER, M.A., ALLAN, J.D., ALEXANDER, G., BARNAS, K., BROOKS, S., CARR, J., CLAYTON, S., DAHM, C., FOLLSTAD-SHAH, J., GALAT, D., GLOSS, S., GOODWIN, P., HART, D., HASSETT, B., JENKINSON, R., KATZ, S., KONDOLF, G.M., LAKE, P.S., LAVE, R., MEYER, J.L., O'DONNELL, T.K., PAGANO, L., POWELL, B. & SUDDUTH, E. Synthesizing U.S. River restoration efforts. **Science**, v.308, 636-637, 2005.

BICKHAM, J.W.; SANDHU, S.; HEBER, P.D.N; CHIKHI, L; ANTHWAL, R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutation Research**, v.463, p.33-51, 2000.

BRITO, N.M., AMARANTE JR, O.P., ABAKERLI, R., SANTOS, T.C.R., RIBEIRO, M.L. Risco de contaminação de águas por pesticidas aplicados em plantações de eucaliptos e coqueiros: análise preliminar. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.11, p. 93-104, 2001.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J.A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazônica**, v.36, p.357-364, 2006.

BOLOGNESI, C.; BONATTI, S.; DEGAN, P.; GALLERANI, E.; PELUSO, M.; RABBONI, R.; ROGGIERI, P.; ABBONDANDOLO, A. Genotoxic Activity of Glyphosate and Its Technical Formulation Roundup®. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.45, p.1957-1962, 1997.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.47, p.2123 -2136, 1990.

CASTILLO, L.E.; LA CRUZ, E.; RUEPERT, C. Ecotoxicology and pesticides in tropical aquatic ecosystems of Central America. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.16, p.41-51, 1997.

CASTRO, V.L. Aspectos da exposição ambiental aos agroquímicos no desenvolvimento animal. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v.21, p.469-497, 2004.

ÇAVAS, T.; KONEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. **Mutagenesis**, v.22, p.263-268, 2007.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GOZUKARA; S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plants effluents. **Aquatic Toxicology**, v.74, p.264-271, 2005.

CESTARI, M.M, LEMOS, P.M.M., RIBEIRO, C.A.O., COSTA, J.R.M.A., PELLETIER, E., FERRARO, M.V.M., MANTOVANI. M.S., Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, p.270-274, 2004.

CLEMENTS, C.; RALPH, S.; PETRAS, M. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 29, p.277-288, 1997.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente. Resolução Nº 357 de 17 de março de 2005. in: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2005>, 2005.

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

COX, C. Glyphosate factsheet. **Journal of Pesticide Reform**, v.108, 1998.

DEGUCHI, Y.; TOYOIZUMI, T.; MASUDA, S.; YASUHARA, A.; MOHRI, S.; YAMADA, M.; INOUE, Y.; KINAE, N. Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. **Mutation Research**, v.627, p.178–185, 2007.

DIMITROV, B.D.; GADEVA, P.G.; BENOVA, D.K.; BINEVA, M.V. Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup[®], Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems. **Mutagenesis**, v. 21, p.375-382, 2006.

DOMINGUES, W.M.; HAYASHI, C. Estudo experimental sobre anéis diários em escamas nas fases iniciais do desenvolvimento do curimba, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes, Prochilodontidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v.58, p.609-617, 1998.

EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Registration Eligibility Decision (RED) Glyphosate, 1993.

FERREIRA, C.M. Testes de toxicidade aquática para monitoramento ambiental **Biológico**, v.65, p.17-18, 2002.

GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. São Paulo: Monsanto do Brasil; 2005. 60p.

GIESY J.P.; DOBSON, S.; SOLOMON. K.R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup[®] herbicide. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v.167, p. 35-120, 2000.

GRISOLIA, C.K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research**, v.518, p.145-150, 2002.

GRISOLIA, C.K.; STARLING, F.L.R.M. Micronuclei monitoring of fishes from lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges, **Mutation Research**, v.491, p.39-44, 2001.

JHA, A.N. Genotoxic studies in aquatic organisms: an overview. **Mutation Research**, v.552, p.1-17, 2004.

JONSSON, C.M.; CASTRO, V.L. Bioindicadores e biomarcadores de agroquímicos no contexto da relação saúde-ambiente. EMBRAPA, 2005. in: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Jonsson_Castro_biomarcadoresID-U4Vhi5C93K.pdf

KIER, L. D.; STEGEMAN, S. D.; DUDEK, S.; MCADAMS, J. G.; FLOWERS, F. J.; HUFFMAN, M. B.; HEYDENS, W. F. Genotoxicity studies of glyphosate, alachlor and butachlor herbicide formulations, **Fundamental and Applied Toxicology**, v.36, p.305,1997.

KILEMADE, M.F.; HARTL, M.G.J.; SHEEHAN, D.; MOTHERSILL, C.; VAN PELT, F.N.A.M.; O'HALLORAN, J.; O'BRIEN, N.M. Genotoxicity of field-collected inter-tidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*scophthalmus maximus l.*) as measured by the comet assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.44, p.56-64, 2004.

JIRAUNGKOORSKUL, W; UPATHAMA, E.S.; KRUATRACHUEA, M; SAHAPHONGC, S.; VICHASRI-GRAMSA, S; POKETHITIYOOKA, P. Histopathological effects of Roundup[®], a glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Science Asia**, v.28, p.121-127, 2002.

LACHER JUNIOR, T.E.; GOLDSTEIN, M.I. Tropical ecotoxicology: status and needs. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.16, p.100-111, 1997.

LANGIANO, V.C.; MARTINEZ, C.B.R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v.147, 22-231, 2008.

LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**, v. 544, p. 43–64, 2003.

LI, A.P.; LONG, T.J. An evaluation of the genotoxic potential of glyphosate, **Fundamental and Applied Toxicology**, v.10, p.537–546, 1988.

LIOI, M.B.; SCARFI, M.R.; SANTORO, A.; BARBIERI, R.; ZENI, O.; SALVEMINI, F.; DI BERARDINO, D.; URSINI, M.V. Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.32, p.39–46, 1998a.

LIOI, M.B.; SCARFI, M. R.; SANTORO, A.; BARBIERI, R.; ZENI, O.; DI BERARDINO, D.; URSINI, M.V. Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures in vitro. **Mutation Research**, v. 403, p.13–20, 1998b.

LYONS, B.P.; HARVEY, J.S.; PARRY, J.M. An initial assessment of the genotoxic impact of the Sea Empress oil spill by the measurement of DNA adduct levels in the intertidal teleost *Lipophrys pholis*. **Mutation Research**, v.390, p.263-268, 1997.

LLOYD, R. **Pollution and Freshwater Fish**. Fishing News Books. 1992.

MANSON, A. F., **Biology of Freshwater Pollution**. 3^a edição. Longmann, Essex, 1996.

MARTINEZ, C.B.R; CÓLUS, I.M.S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M.E et al. (eds). **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: Edição dos editores, p. 551-577. 2002.

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

MENEZES, S.M.; TILLMANN, M.Â.A.; DODE, L.B.; VILLELA, F.A. Detecção de soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por métodos baseados na atividade de enzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, p.150-155, 2004.

MONHEIT, S. Glyphosate- based aquatic herbicide an overview risk. **Noxius Times**, v.4, p.5-9, 2002.

MONROY, C.M.; CORTÉS, A.C.; SICARD, D.M.; RESTREPO, H.G. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. **Biomédica**, v.25, p.335-45, 2005.

MORAES, D.S.L.; JORDÃO, B.Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v.36, p.370-4, 2002.

MOREIRA, J.C.; JACOB, S.C.; PERES, F.; LIMA, J.S.; MEYER,A.; OLIVEIRA-SILVA, J.; SARCINELLI, P.; BATISTA, D.F.; EGLER,M.; CASTRO FARIA, M.V.; ARAÚJO, J.A.; KUBOTA, A.H.; SOARES, M; ALVES, S.R.; MOURA,C.M. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.7, p.299-311, 2002.

MORIYA, M.; OHTA, T.; WATANABE, K.; MIYAZAWA, T.; KATO, K.; SHIRASU, Y. Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems. **Mutation Research**, v.116, p.185–216, 1983.

NEŠKOVIC, N.K.; POLEKSIC, V.; ELEZOVIC, I.; KARAN, V.; BUDIMIR, M. Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L., **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, p.295-302, 1996.

NIENCHESKI, L.P.H. Recursos vivos do mar e poluição. **Revista do Centro de Estudos Judiciários do Conselho da Justiça Federal**, n. 12, p. 58-62, 2000.

NJAGI, G.D.E.; GOPALAN, H.N.B. Mutagenicity testing of some selected food preservatives, herbicides and insecticides. II. Ames test. **Bangladesh Journal of Botany**, v.9, p.141–146, 1980.

OSTLING, O; JOHANSON, K.J. Microeletrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual cells. Biochem. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.12, p.291-298, 1984.

PAIVA, M.; ANDRADE-TUBINO, M.; GODOY, M. **As represas e os peixes nativos do rio Grande**: bacia do Paraná, Brasil. Rio de Janeiro: Interciência Ltda, 2002.

PAZ Y MINO, C.; SÁNCHEZ, M.E; ARÉVALO, M.; MUNÓZ, M.J; WITTE, T.; DE-LA-CARRERA, G.O.; LEONE, P.E. Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.456-460, 2007.

PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere**, v.61, p.1115-1122, 2005.

RANK, J.; JENSEN, A.; SKOV, B.; PEDERSEN, L.H.; JENSEN, K. Genotoxicity testing of the herbicide Roundup[®] and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, Salmonella mutagenicity test, and allium anaphase–telophase test. **Mutation Research**, v. 300, p.29–36, 1993.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K.. **Mutagênese Ambiental**. Editora Ulbra. Canoas: 1ª edição, 2003.

SILVA, J; ERDTMANN, B; PEGAS HENRIQUE, J.A. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research**, v.605, p.87-93, 2006.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE R.R.; SCHNEIDER E.L. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, p.184-191, 1998.

THEODORAKIS, C.W.; BICKHAM, J.W.; ELBL, T.; SHUGART, L.R.; CHESSER, R.K. Genetics of radionuclide - contaminated mosquito fish populations and homology between *Gambusia affinis* and *G. holbrooki*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.17, p.1992-1998, 1998.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single Cell Gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p.206-221, 2000.

TOMITA, R.Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático **Biológico**, v.64, p.135-142, 2002.

TORRES, F.M.; URROZ, M.B.G.C.; OVANDO, H.G.; ANCHORDOQUI, I.W.; VERA, L.U.; HAND, I.B.L.; ABRATE, N.G. La genotoxicidad del herbicida glifosato evaluada por el ensayo cometa y por la formación de micronucleus en ratones tratados. **Teoría**, v.15, p.53-60, 2006.

TSUI, M.T.K.; L.M.; CHU. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors **Chemosphere**, v. 52, p.1189-1197, 2003.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, v.79, p.201-204, 2006.

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.

VAN GESTEL, C.A.M.; VAN BRUMMELEN, T.C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, v.5, p.217-225, 1996.

VAN NGAN, P.; GOMES, V.; PASSOS, M.J.A.C.R.; USSAM, K.A. CAMPOS, D.Y. F.; ROCHA, A.J.S.; PEREIRA, B.A. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Research Station “Comandante Ferraz,” King George Island. **Polar Biology**, v. 30, p.209–217, 2007.

VANZELLA, T.P.; MARTINEZ, C.B.R. COLUS, I.M.S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mutation Research**, v.631, p.36-43, 2008.

VENTURA, B.C.; ANGELIS, D.F; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.90, p.42-51, 2007.

VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.146, p.281–300, 2007.

VILLELA, I.V.; OLIVEIRA, I.M.A.; SILVA, J.; PEGAS HENRIQUES J.A. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutation Research**, v.605, p.78–86, 2006.

WALKER, C.H. The Use of Biomarkers to Measure the Interactive Effects of Chemicals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.40, p.65-70, 1998.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Programme on Chemical Safety. Glyphosate. Environmental Health Criteria 159, 1994.

WILDEMAN, A.G.; NAZAR, R.N. Significance of plant metabolism in the mutagenicity and toxicity of pesticides. **Canadian Journal Genetics Cytology**, v.24, p.437–449, 1982.

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.31, p.117-65, 2000.

ZHU, L.; HUANG, Y.; LIU, G. Using DNA damage to monitor water environment. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v.23, p.340-348, 2005.

4 CONCLUSÕES

Como conclusões finais deste trabalho, pode-se afirmar que nas condições utilizadas:

- O herbicida Roundup® se mostrou genotóxico para a espécie de peixe *P. lineatus*, em testes de toxicidade aguda, empregando o ensaio do cometa com células sanguíneas e branquiais;
- O herbicida Roundup® não se mostrou mutagênico para a espécie de peixe *P. lineatus* em testes de toxicidade aguda, empregando o teste do micronúcleo e alterações eritrocíticas nucleares;
- O ensaio do cometa com branquias se mostrou uma ferramenta sensível para detectar alterações genéticas em peixes da espécie *P. lineatus* quando expostos ao herbicida Roundup®;
- As AENs não se mostraram um bom indicador de genotoxicidade em peixes da espécie *P. lineatus*;
- A associação da mesma técnica, no caso o ensaio do Cometa, em tecidos diferentes e a combinação do ensaio do cometa e o teste do micronúcleo se mostraram ferramentas eficientes para monitorar agentes genotóxicos e mutagênicos, capazes de fornecer informações relevantes para o monitoramento de recursos hídricos que recebem efluentes oriundos de atividades agrícolas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v.343, p.121-135, 1995.

AMARANTE JUNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v.25, p. 589-593, 2002.

ANVISA. Agência de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 84, disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B5780-1-0%5D.PDF>, 2003.

ARIAS, A.R.L.; BUSS, D.F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A.F.; FREIRE, M.M.; EGLER, M. MUGNAI, R.; BAPTISTA, D.F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência e Saúde**, v.12, p.61-72, 2007.

ARMAS E.D. (2006). **Biogeodinâmica de herbicidas utilizados em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) na sub-bacia do rio Corumbataí**. Tese (Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas) - Universidade de São Paulo, 187p.

AYLLON F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and Other Nuclear Lesions as Genotoxicity Indicators in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.49, p.221-225, 2001.

BARJA, B.C.; HERSZAGE, J.; SANTOS AFONSO, M. Iron (III) - phosphonate complexes. **Polyhedron**, v.20, p.1821-1830, 2001.

BENNEMANN, S.T.; SILVA-SOUZA, A.T.; ROCHA, G.R.A. Composición ictiofaunística em cinco localidades de la cuenca Del rio Tibagi, PR - Brasil. **Interciencia**, v.20, p. 7-13, 1995.

BERNHARDT, E.S., PALMER, M.A., ALLAN, J.D., ALEXANDER, G., BARNAS, K., BROOKS, S., CARR, J., CLAYTON, S., DAHM, C., FOLLSTAD-SHAH, J., GALAT, D., GLOSS, S., GOODWIN, P., HART, D., HASSETT, B., JENKINSON, R., KATZ, S., KONDOLF, G.M., LAKE, P.S., LAVE, R., MEYER, J.L., O'DONNELL, T.K., PAGANO, L., POWELL, B. & SUDDUTH, E. Synthesizing U.S. River restoration efforts. **Science**, v.308, 636-637, 2005.

BICKHAM, J.W.; SANDHU, S.; HEBER, P.D.N; CHIKHI, L; ANTHWAL, R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutation Research**, v.463, p.33-51, 2000.

BRITO, N.M., AMARANTE JR, O.P., ABAKERLI, R., SANTOS, T.C.R., RIBEIRO, M.L. Risco de contaminação de águas por pesticidas aplicados em plantações de eucaliptos e coqueiros: análise preliminar. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.11, p. 93-104, 2001.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J.A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazônica**, v.36, p.357-364, 2006.

BOLOGNESI, C.; BONATTI, S.; DEGAN, P.; GALLERANI, E.; PELUSO, M.; RABBONI, R.; ROGGIERI, P.; ABBONDANDOLO, A. Genotoxic Activity of Glyphosate and Its Technical Formulation Roundup®. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.45, p.1957-1962, 1997.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.47, p.2123 -2136, 1990.

CASTILLO, L.E.; LA CRUZ, E.; RUEPERT, C. Ecotoxicology and pesticides in tropical aquatic ecosystems of Central America. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.16, p.41-51, 1997.

CASTRO, V.L. Aspectos da exposição ambiental aos agroquímicos no desenvolvimento animal. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v.21, p.469-497, 2004.

ÇAVAS, T.; KONEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. **Mutagenesis**, v.22, p.263-268, 2007.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GOZUKARA; S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plants effluents. **Aquatic Toxicology**, v.74, p.264-271, 2005.

CESTARI, M.M, LEMOS, P.M.M., RIBEIRO, C.A.O., COSTA, J.R.M.A., PELLETIER, E., FERRARO, M.V.M., MANTOVANI, M.S., Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, p.270-274, 2004.

CLEMENTS, C.; RALPH, S.; PETRAS, M. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 29, p.277-288, 1997.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente. Resolução N° 357 de 17 de março de 2005. in: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legianol.cfm?codlegitipo=3&ano=2005>, 2005.

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

COX, C. Glyphosate factsheet. **Journal of Pesticide Reform**, v.108, 1998.

DEGUCHI, Y.; TOYOIZUMI, T.; MASUDA, S.; YASUHARA, A.; MOHRI, S.; YAMADA, M.; INOUE, Y.; KINAE, N. Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. **Mutation Research**, v.627, p.178-185, 2007.

DIMITROV, B.D.; GADEVA, P.G.; BENOVA, D.K.; BINEVA, M.V. Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup®, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems. **Mutagenesis**, v. 21, p.375-382, 2006.

DOMINGUES, W.M.; HAYASHI, C. Estudo experimental sobre anéis diários em escamas nas fases iniciais do desenvolvimento do curimba, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes, Prochilodontidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v.58, p.609-617, 1998.

EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Registration Eligibility Decision (RED) Glyphosate, 1993.

FERREIRA, C.M. Testes de toxicidade aquática para monitoramento ambiental **Biológico**, v.65, p.17-18, 2002.

GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura.** São Paulo: Monsanto do Brasil; 2005. 60p.

GIESY J.P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K.R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v.167, p. 35-120, 2000.

GRISOLIA, C.K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research**, v.518, p.145-150, 2002.

GRISOLIA, C.K.; STARLING, F.L.R.M. Micronuclei monitoring of fishes from lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges, **Mutation Research**, v.491, p.39-44, 2001.

JHA, A.N. Genotoxic studies in aquatic organisms: an overview. **Mutation Research**, v.552, p.1-17, 2004.

JONSSON, C.M.; CASTRO, V.L. Bioindicadores e biomarcadores de agroquímicos no contexto da relação saúde-ambiente. EMBRAPA, 2005. in: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Jonsson Castro biomarcadoresID-U4Vhi5C93K.pdf](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Jonsson%20Castro%20biomarcadoresID-U4Vhi5C93K.pdf)

KIER, L. D.; STEGEMAN, S. D.; DUDEK, S.; MCADAMS, J. G.; FLOWERS, F. J.; HUFFMAN, M. B.; HEYDENS, W. F. Genotoxicity studies of glyphosate, alachlor and butachlor herbicide formulations, **Fundamental and Applied Toxicology**, v.36, p.305,1997.

KILEMADE, M.F.; HARTL, M.G.J.; SHEEHAN, D.; MOTHERSILL, C.; VAN PELT, F.N.A.M.; O'HALLORAN, J.; O'BRIEN, N.M. Genotoxicity of field-collected inter-tidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*scophthalmus maximus* l.) as measured by the comet assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.44, p.56-64, 2004.

JIRAUNGKOORSKUL, W; UPATHAMA, E.S.; KRUATRACHUEA, M; SAHAPHONGC, S.; VICHASRI-GRAMSA, S; POKETHITIYOOKA, P. Histopathological effects of Roundup®, a glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Science Asia**, v.28, p.121-127, 2002.

LACHER JUNIOR, T.E.; GOLDSTEIN, M.I. Tropical ecotoxicology: status and needs. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.16, p.100-111, 1997.

LANGIANO, V.C.; MARTINEZ, C.B.R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v.147, 22-231, 2008.

LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**, v. 544, p. 43-64, 2003.

LI, A.P.; LONG, T.J. An evaluation of the genotoxic potential of glyphosate, **Fundamental and Applied Toxicology**, v.10, p.537-546, 1988.

LIOI, M.B.; SCARFI, M.R.; SANTORO, A.; BARBIERI, R.; ZENI, O.; SALVEMINI, F.; DI BERARDINO, D.; URSINI, M.V. Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.32, p.39-46, 1998a.

LIOI, M.B.; SCARFI, M. R.; SANTORO, A.; BARBIERI, R.; ZENI, O.; DI BERARDINO, D.; URSINI, M.V. Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures in vitro. **Mutation Research**, v. 403, p. 13-20, 1998b.

LYONS, B.P.; HARVEY, J.S.; PARRY, J.M. An initial assessment of the genotoxic impact of the Sea Empress oil spill by the measurement of DNA adduct levels in the intertidal teleost *Lipophrys pholis*. **Mutation Research**, v.390, p.263-268, 1997.

LLOYD, R. **Pollution and Freshwater Fish**. Fishing News Books. 1992.

MANSON, A. F., **Biology of Freshwater Pollution**. 3^a edição. Longmann, Essex, 1996.

MARTINEZ, C.B.R; CÓLUS, I.M.S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M.E et al. (eds). **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: Edição dos editores, p. 551-577. 2002.

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

MENEZES, S.M.; TILLMANN, M.Â.A.; DODE, L.B.; VILLELA, F.A. Detecção de soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por métodos baseados na atividade de enzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, p.150-155, 2004.

MONHEIT, S. Glyphosate- based aquatic herbicide an overview risk. **Noxius Times**, v.4, p.5-9, 2002.

MONROY, C.M.; CORTÉS, A.C.; SICARD, D.M.; RESTREPO, H.G. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. **Biomédica**, v.25, p.335-45, 2005.

MORAES, D.S.L.; JORDÃO, B.Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v.36, p.370-4, 2002.

MOREIRA, J.C.; JACOB, S.C.; PERES, F.; LIMA, J.S.; MEYER, A.; OLIVEIRA-SILVA, J.; SARCINELLI, P.; BATISTA, D.F.; EGLER, M.; CASTRO FARIA, M.V.; ARAÚJO, J.A.; KUBOTA, A.H.; SOARES, M; ALVES, S.R.; MOURA, C.M. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.7, p.299-311, 2002.

MORIYA, M.; OHTA, T.; WATANABE, K.; MIYAZAWA, T.; KATO, K.; SHIRASU, Y. Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems. **Mutation Research**, v.116, p.185-216, 1983.

NESKOVIC, N.K.; POLEKSIC, V.; ELEZOVIC, I.; KARAN, V.; BUDIMIR, M. Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L., **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, p.295-302, 1996.

NIENCHESKI, L.P.H. Recursos vivos do mar e poluição. **Revista do Centro de Estudos Judiciários do Conselho da Justiça Federal**, n. 12, p. 58-62, 2000.

NJAGI, G.D.E.; GOPALAN, H.N.B. Mutagenicity testing of some selected food preservatives, herbicides and insecticides. II. Ames test. **Bangladesh Journal of Botany**, v.9, p.141-146, 1980.

OSTLING, O; JOHANSON, K.J. Microeletrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual cells. Biochem. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.12, p.291-298, 1984.

PAIVA, M.; ANDRADE-TUBINO, M.; GODOY, M. **As represas e os peixes nativos do rio Grande:** bacia do Paraná, Brasil. Rio de Janeiro: Interciência Ltda, 2002.

PAZ Y MINO, C.; SÁNCHEZ, M.E; ARÉVALO, M.; MUNÓZ, M.J; WITTE, T.; DE-LA-CARRERA, G.O.; LEONE, P.E. Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.456-460, 2007.

PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere**, v.61, p.1115-1122, 2005.

RANK, J.; JENSEN, A.; SKOV, B.; PEDERSEN, L.H.; JENSEN, K. Genotoxicity testing of the herbicide Roundup[®] and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, Salmonella mutagenicity test, and allium anaphase-telophase test. **Mutation Research**, v. 300, p.29-36, 1993.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K.. **Mutagênese Ambiental.** Editora Ulbra. Canoas: 1^a edição, 2003.

SILVA, J; ERDTMANN, B; PEGAS HENRIQUE, J.A. **Genética toxicológica.** Porto Alegre: Alcance, 2003.

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research**, v.605, p.87-93, 2006.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE R.R.; SCHNEIDER E.L. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, p.184-191, 1998.

THEODORAKIS, C.W.; BICKHAM, J.W.; ELBL, T.; SHUGART, L.R.; CHESSER, R.K. Genetics of radionuclide - contaminated mosquito fish populations and homology between *Gambusia affinis* and *G. holbrooki*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.17, p.1992-1998, 1998.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single Cell Gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p.206-221, 2000.

TOMITA, R.Y.; BEYRUTH, Z. Toxicología de agrotóxicos em ambiente aquático **Biológico**, v.64, p.135-142, 2002.

TORRES, F.M.; URROZ, M.B.G.C.; OVANDO, H.G.; ANCHORDOQUI, I.W.; VERA, L.U.; HAND, I.B.L.; ABRATE, N.G. La genotoxicidad del herbicida glifosato evaluada por el ensayo cometa y por la formación de micronucleus en ratones tratados. **Teoría**, v.15, p.53-60, 2006.

TSUI, M.T.K.; L.M.; CHU. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors **Chemosphere**, v. 52, p.1189-1197, 2003.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, v.79, p.201-204, 2006.

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.

VAN GESTEL, C.A.M.; VAN BRUMMELEN, T.C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, v.5, p.217-225, 1996.

VAN NGAN, P.; GOMES, V.; PASSOS, M.J.A.C.R.; USSAM, K.A. CAMPOS, D.Y. F.; ROCHA, A.J.S.; PEREIRA, B.A. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Research Station "Comandante Ferraz," King George Island. **Polar Biology**, v. 30, p.209-217, 2007.

VANZELLA, T.P.; MARTINEZ, C.B.R. COLUS, I.M.S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mutation Research**, v.631, p.36-43, 2008.

VENTURA, B.C.; ANGELIS, D.F; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.90, p.42-51, 2007.

VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.146, p.281-300, 2007.

VILLELA, I.V.; OLIVEIRA, I.M.A.; SILVA, J.; PEGAS HENRIQUES J.A. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutation Research**, v.605, p.78-86, 2006.

WALKER, C.H. The Use of Biomarkers to Measure the Interactive Effects of Chemicals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.40, p.65-70, 1998.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Programme on Chemical Safety. Glyphosate. Environmental Health Criteria 159, 1994.

WILDEMAN, A.G.; NAZAR, R.N. Significance of plant metabolism in the mutagenicity and toxicity of pesticides. **Canadian Journal Genetics Cytology**, v.24, p.437-449, 1982.

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.31, p.117-65, 2000.

ZHU, L.; HUANG, Y.; LIU, G. Using DNA damage to monitor water environment. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v.23, p.340-348, 2005.