UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

ANGÉLICA TRONCO DE MORAES

EFEITOS DO GLIFOSATO PARA O TELEÓSTEO *Prochilodus lineatus* NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE GOETHITA

Londrina
2015

ANGÉLICA TRONCO DE MORAES

EFEITOS DO GLIFOSATO PARA O TELEÓSTEO *Prochilodus lineatus* NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE GOETHITA

Londrina- Paraná

2015

ANGÉLICA TRONCO DE MORAES

EFEITOS DO GLIFOSATO PARA O TELEÓSTEO *Prochilodus lineatus* NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE GOETHITA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profª Drª Cláudia Bueno dos Reis Martinez.

Londrina
2015

Catalogação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M687e Moraes, Angélica Tronco de.
Efeitos do glifosato para o teleósteo *Prochilodus lineatus* na presença e ausência de goethita / Angélica Tronco de Moraes. – Londrina, 2015.
82 f. : il.

Orientador: Cláudia Bueno dos Reis Martinez.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Prochilodus lineatus – Teses. 2. Peixe – Efeito dos herbicidas – Teses. 3. Marcadores biológicos – Teses. 4. Ferro – Teses. I. Martinez, Cláudia Bueno dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 597.554.1

ANGÉLICA TRONCO DE MORAES

EFEITOS DO GLIFOSATO PARA O TELEÓSTEO *Prochilodus lineatus* NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE GOETHITA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA

_____

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez
Universidade Estadual de Londrina – UEL

_____

Profa. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis
Universidade Federal do Paraná – UFPR

_____

Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 31 de março de 2015.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Discente: **Angélica Tronco de Moraes**

Título: "**Efeitos do glifosato para o teleósteo *Prochilodus lineatus* na presença e ausência de goethita**"

Data da Defesa: 31 de março de 2015 – 14:00 hs, na sala de aula da Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas, desta Universidade.

Banca Examinadora	**Parecer**
Presidente: Drª. Claudia Bueno dos Reis Martinez	Aprovada
Titulares:	
Drª. Helena Cristina da Silva de Assis	APROVADA
Dr. Halley Caixeta de Oliveira	APROVADO

Parecer Final Aprovada

Drª. Claudia Bueno dos Reis Martinez

Drª. Helena Cristina da Silva de Assis

Dr. Halley Caixeta de Oliveira

Dedico este trabalho a minha família por todo apoio,

em especial, aos meu pais pelo amor incondicional,

educação, e por me ensinarem a jamais desistir

dos meu ideais.

Grazie per tutto famiglia!

AGRADECIMENTOS

Ao **Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas** da UEL pela oportunidade de aprimoramento acadêmico.

À **Fundação Araucária e CNPq** (PRONEX: 24732/2012) e ao **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxicologia Aquática** (INCT-TA, CNPq: 573949/2008-5) pelo apoio financeiro que viabilizou a execução deste trabalho.

À **CAPES** pela bolsa de mestrado concedida.

À **Estação de Piscicultura** da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL) pelo fornecimento dos peixes.

À Profa. Dra. **Cláudia Martinez**. Obrigada por me aceitar em seu laboratório e pela orientação durante a graduação e o mestrado e, principalmente, por ajudar a tornar esse sonho realidade. Obrigada pela paciência, confiança e ensinamentos. Tenha certeza de que você contribui tanto para o meu crescimento profissional quanto pessoal.

Ao professor **Paulo** Meletti por ter proporcionado a minha primeira oportunidade de estágio e pelo suporte durante as etapas de análises histológicas.

À professora **Juliana** Simonato pelos ensinamentos, disposição e paciência para ajudar.

À banca examinadora da qualificação, Prof. Dr. **Paulo** Meletti e Profa. Dra. **Juliana** Simonato, que contribuíram para elaboração do trabalho.

À banca examinadora da dissertação, Profa. Dra. **Helena** Cristina e Prof. Dr. **Halley** Caixeta pela disponibilidade em participar desta avaliação e por colaborarem com este trabalho.

À **Cristine** Carneiro e **Dimas** Zaia pelo fornecimento da goethita.

Ao **Wagner** E. Risso pelo auxílio nas análises de ferro.

Ao **LEFA**, nas pessoas de: Bruna, Carlos, Carol, Cássia, Déia, Débora, Hellen, Laura, Luciana, Matheus, Milena, Nadjha, Natara, Thaís, Thiego e Wagner. Vocês são simplesmente demais! Obrigada pela ajuda nas amostragens, pelo carinho, conversas, conselhos, brincadeiras, risadas e por tornarem o laboratório um ambiente tão agradável do qual sentirei saudades.

À minha família, em especial aos meus pais, **Josseli** e **David**, pelo apoio, carinho, incentivo, amor e por estarem sempre ao meu lado. Saibam que vocês são meu

maior exemplo. E às minhas irmãs, **Débora** e **Bruna**, pelo companheirismo, amizade e apoio. Obrigada por tudo que vocês fazem por mim. Amo vocês!

Ao **Vander** Zanutto por me ensinar que nenhuma distância pode impedir um amor verdadeiro. Obrigada por ter encarado todos os desafios comigo e me ajudar nos momentos difíceis. Você trouxe luz, carinho, amor e muita felicidade à minha vida. Obrigada por ser a melhor parte do meu dia e saiba que te admiro muito. Te amo Lindo! E agradeço pelos novos membros que você acrescentou à minha família, que me receberam com muito carinho e amor.

Às minhas irmãs do coração, **Thaís** e **Maria** pelos vários anos de amizade, conversas, conselhos, companheirismo e por me mostrarem o real significado da amizade. Vocês são incríveis!

À **Deus** por ter me dado forças todos os dias para vencer os obstáculos e enfrentas as dificuldades.

À todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte deste trabalho. Muito obrigada!

MORAES, A.T. **Efeitos do glifosato para o teleósteo *Prochilodus lineatus* na presença e ausência de goethita.** 2015. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2015.

RESUMO

Atualmente, o glifosato é o herbicida mais utilizado no mundo e sua disponibilidade no ambiente pode ser reduzida em decorrência da adsorção ao óxido de ferro goethita. Entretanto, apesar da potencial aplicação da goethita na remediação ambiental, sua toxicidade e seus efeitos sobre a toxicidade do glifosato para peixes ainda são desconhecidos. Diante disso, no presente trabalho foram avaliados os possíveis efeitos do glifosato, da goethita e da associação de ambos em juvenis de *Prochilodus lineatus* após 24 h de exposição. Os peixes foram expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo: 3,6 $mg.L^{-1}$ de glifosato (GLI), goethita (GT), nas concentrações de 10 e 100 $mg.L^{-1}$ e às misturas GLI + GT10 e GLI + GT100. A concentração de ferro (Fe) foi analisada na água dos meios de exposição e nas brânquias, fígado, rim, cérebro, músculo e no sangue dos peixes. Também foram avaliados os parâmetros hematológicos e as concentrações de glicose e lactato no plasma dos peixes, o conteúdo de glutationa (GSH) e a ocorrência de peroxidação lipídica (LPO) e carbonilação proteica (PCO) no fígado e nas brânquias, a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em cérebro e músculo, ocorrência de danos no DNA nos eritrócitos e alterações histológicas nas brânquias. Aumento significativo na concentração de Fe foi detectado no cérebro dos peixes dos grupos GT10 e GT100 em relação aos animais CTR. Os resultados também evidenciaram a capacidade do glifosato em promover a diminuição do hematócrito e aumento de LPO e de danos no DNA, apesar do aumento da GSH. A exposição a GT100 promoveu alterações significativas em biomarcadores fisiológicos (diminuição do hematócrito e glicemia) e em apenas um biomarcador bioquímico (diminuição da PCO), enquanto que GT10 ocasionou redução da hemoglobina. Entretanto, a maioria dos efeitos causados pelo glifosato (redução do hematócrito e aumento de LPO e danos no DNA) foi revertida nos animais expostos do grupo GLI + GT10. Já a maior concentração de GT foi capaz de reverter apenas o efeito genotóxico do glifosato. Nos peixes expostos aos diferentes tratamentos, não foram verificadas alterações histológicas no tecido branquial que pudessem interferir no funcionamento normal deste órgão. Portanto, pode-se concluir que o glifosato causa danos em *P. lineatus* e que a goethita, na menor concentração testada, pode reverter estes danos, indicando o seu potencial como uma alternativa na remediação de ambientes aquáticos impactados por herbicidas à base de glifosato.

Palavras-chaves: Biomarcadores. Danos oxidativos. Ferro. Genotoxicidade, hematologia. Herbicida.

MORAES, A.T. **Effects of glyphosate on the teleost *Prochilodus lineatus* in the presence or absence of goethite.** 2015. 82 p. Dissertation (Master´s degree in Biological Science) - State University of Londrina, Londrina. 2015.

ABSTRACT

Currently, glyphosate is the most widely used herbicide in the world and its availability in the environment can be reduced by goethite, due to the large adsorption capacity of this iron oxide. However, despite the potential application of goethite in environmental remediation, its toxicity and protective effect over the toxicity of glyphosate on fish are still unknown. Therefore, the present study evaluated the possible effects of glyphosate, goethite and the association of glyphosate and goethite in juvenile *Prochilodus lineatus* after 24 h of exposure. The fishes were exposed only to water (CTR) or water containing: 3,6 $mg.L^{-1}$ glyphosate (GLY), goethite, at concentrations of 10 $mg.L^{-1}$ (GT10) e 100 $mg.L^{-1}$ (GT100) and mixture GLY+ GT10 and GLY + GT100. The concentration of iron (Fe) was analyzed in the exposure waters and in the gills, liver, kidney, brain, muscle and fish blood. We also evaluated hematological parameters, glucose and lactate concentrations in fish plasma, glutathione content (GSH), lipid peroxidation (LPO) and protein carbonyls (PCO) in the liver and gills, the activity of acetylcholinesterase (AChE) in brain and muscle, DNA damage in erythrocytes and histological changes in the gills. A significant increase in concentration of Fe was detected in the brain of fishes from GT10 and GT100 groups compared to CTR animals. The results showed the capacity of glyphosate to promote a decrease in hematocrit and an increase in LPO and DNA damage, despite GSH increase. The exposure to GT100 promoted significant changes in some physiological biomarkers (decrease in hematocrit and blood glucose) and in only one biochemical biomarker (PCO decrease), while GT10 caused reduction of hemoglobin. However, the most effects caused by glyphosate (hematocrit reduction and increase in LPO and DNA damage) were reverted in fish from GLI + GT10 group. On the other hand, the highest GT concentration was capable to revert only the genotoxic effect of glyphosate. Fishes submitted to all the treatments did not show histological alterations in the gills that could interfere on the normal functioning of this organ. In conclusion, these results show that glyphosate causes damages in *P. lineatus* and that goethite, in the lower concentration tested, can revert these damages, indicating its potential as an alternative in the remediation of aquatic environments contaminated by glyphosate based herbicides.

Keywords: Biomarkers. Oxidative damages. Iron. Genotoxicity. Hematology. Herbicide.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está constituída de uma introdução geral com uma revisão bibliográfica sucinta que objetiva apresentar os principais assuntos abordados ao longo do trabalho, fornecendo elementos teóricos necessários à compreensão da relevância deste estudo. Em seguida estão apresentados os objetivos que nortearam a realização deste trabalho e as referências que embasaram a introdução. Os resultados estão descritos e discutidos em um manuscrito composto por uma breve Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências. No último item desta dissertação são apresentadas as considerações finais que sintetizam o trabalho como um todo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL 1
1.1 CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA 1
1.2 AGROTÓXICOS E A CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA 1
1.3 GLIFOSATO 5
1.4 ÓXIDOS DE FERRO: GOETHITA E A REMEDIAÇÃO AMBIENTAL 7
1.5 BIOMARCADORES 11
1.5.1 Biomarcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes 12
1.5.2 Biomarcadores genotóxicos 14
1.5.3 Biomarcador neurotóxico 15
1.5.4 Biomarcadores fisiológicos 16
1.5.5 Biomarcadores histológicos 17
1.6 BIOMONITORAMENTO 17
1.6.1 Modelo experimental 18

2 OBJETIVOS 20
2.1 OBJETIVO GERAL 20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 20

3 REFERÊNCIAS 20

4 MANUSCRITO 34
4.1 INTRODUÇÃO 36
4.2 MATERIAL E MÉTODOS 40
4.2.1 Animais 40
4.2.2 Síntese da goethita 41
4.2.3 Testes de toxicidade 41
4.2.4 Amostragem 42
4.2.5 Determinação de ferro na água e nos tecidos 42
4.2.6 Determinação de glifosato na água 43
4.2.7 Biomarcadores fisiológicos 43
4.2.8 Biomarcadores bioquímicos 42
4.2.9 Biomarcador genotóxico 43

4.2.10 Biomarcadores histológicos 44
4.2.11 Análises estatísticas 45
4.3 RESULTADOS 45
4.3.1 Parâmetros físicos e químicos da água 45
4.3.2 Concentração de Ferro nos tecidos 47
4.3.3 Biomarcadores 51
4.4 DISCUSSÃO 60
4.5 AGRADECIMENTOS 65
4.6 REFERÊNCIAS 70

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 81

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA

O constante aumento na quantidade e variedade de compostos xenobióticos nos corpos hídricos pode ser avaliado como um impacto da atividade antropogênica sobre o ambiente (LIVINGSTONE, 1993; CAJARAVILLE et al., 2000). Enquanto o crescimento da população humana permaneceu pequeno, a influência antrópica sobre os ambientes aquáticos também se manteve reduzida e local (NIKIMNAA, 2014). Porém, a população mundial mais do que duplicou nos últimos 50 anos, e segundo a Organização das Nações Unidas, no ano de 2011 a população mundial atingiu a casa de 7 bilhões de habitantes.

Assim, as modificações nos ambientes aquáticos têm as suas principais fontes relacionadas ao crescimento populacional desordenado, como a descarga de lixos e esgotos domésticos, o desenvolvimento industrial e as atividades agrícolas (RASHED, 2001). Por meio destes processos, agentes químicos com efeitos preocupantes têm sido lançados no ambiente aquático, a exemplo dos agrotóxicos (VENTURA et al., 2008; GUILHERME et al., 2012).

Os efeitos tóxicos decorrentes da exposição a contaminantes podem ser letais ou subletais, como alterações no comportamento, crescimento, desenvolvimento e reprodução das populações aquáticas (RAND et al., 1995). Desta forma, a introdução de xenobióticos no ambiente contribui para a diminuição da qualidade dos recursos hídricos, além de interferir nas relações ecológicas e comprometer a sobrevivência da biota aquática (CAJARAVILLE et al., 2000).

1.2 AGROTÓXICOS E A CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA

De acordo com a Agência Nacional de Águas (ANA, 2013), 72% dos recursos hídricos são utilizados na irrigação, seguidos pela dessedentação animal (11%), consumo humano (9%), industrial (7%) e rural (1%), sendo assim, o setor agrícola é o maior usuário dos recursos hídricos. Ao mesmo

tempo, este setor é considerado um dos maiores poluidores desses recursos, visto que a contaminação dos corpos hídricos por agrotóxicos é um dos principais problemas relacionados à conservação dos ecossistemas aquáticos (MENÉNDEZ-HELMAN et al., 2015).

Os agrotóxicos apresentam extrema relevância no modelo de desenvolvimento da agricultura no Brasil (MMA, 2010). Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012), o Brasil se destaca no cenário mundial como o maior consumidor de agrotóxicos, respondendo, na América Latina, por 86% dos produtos comercializados. Em 2010, o mercado nacional movimentou cerca de U$ 7,3 bilhões e representou 19% do mercado global de agrotóxicos (ANVISA, 2012). No mercado nacional, o estado do Paraná representa o terceiro maior consumidor de agrotóxicos (Figura 1) e merecem destaque os Núcleos Regionais de Ponta Grossa, Cascavel e Londrina, nos quais foram registrados os maiores consumos, com valores superiores a 15 Kg/ha/ano (IPARDES, 2010).

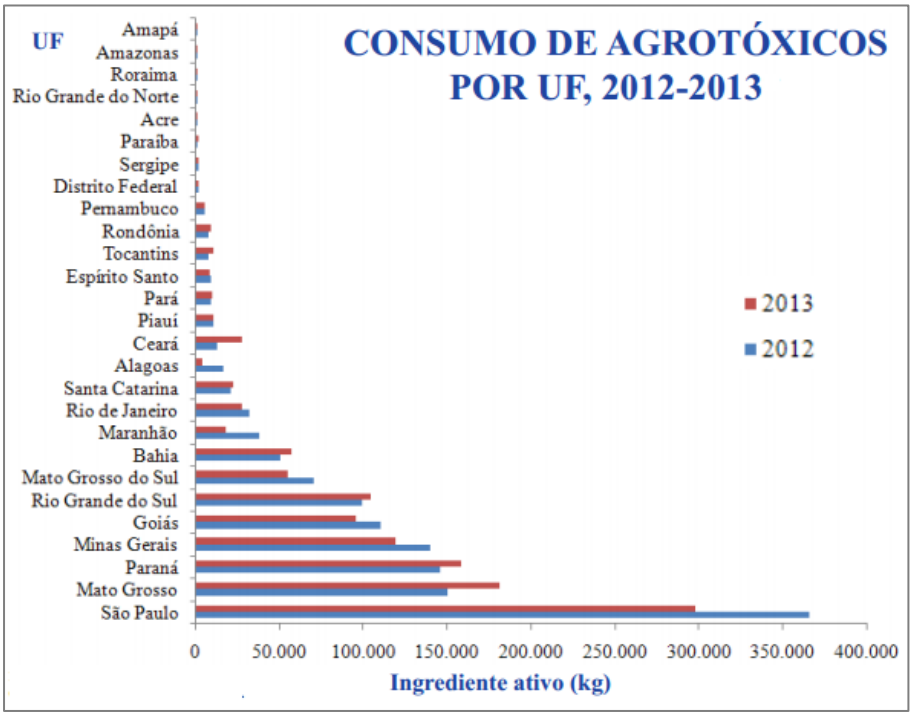

Figura 1- Consumo de agrotóxicos em diferentes Estados brasileiros (UF) nos anos de 2012 e 2013. Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2014).

Existem várias classes de agrotóxicos, porém os mais intensamente aplicados na agricultura são os herbicidas, inseticidas e fungicidas (ANVISA,

2012). No Brasil, do total de agrotóxicos consumidos, os herbicidas representam 58% do mercado (IBGE, 2010). No Estado do Paraná, os herbicidas representam o maior percentual de uso (56,69%), seguidos pelos inseticidas (21%) e fungicidas (10,79%) (IPARDES, 2010). O herbicida glifosato lidera o *ranking* de ingredientes ativos mais comercializados no Brasil. No ano de 2012 foram comercializadas mais de 180.000 toneladas deste herbicida (Figura 2), que representa mais de 41,20% do total de ingredientes ativos consumidos no País (IBGE, 2010).

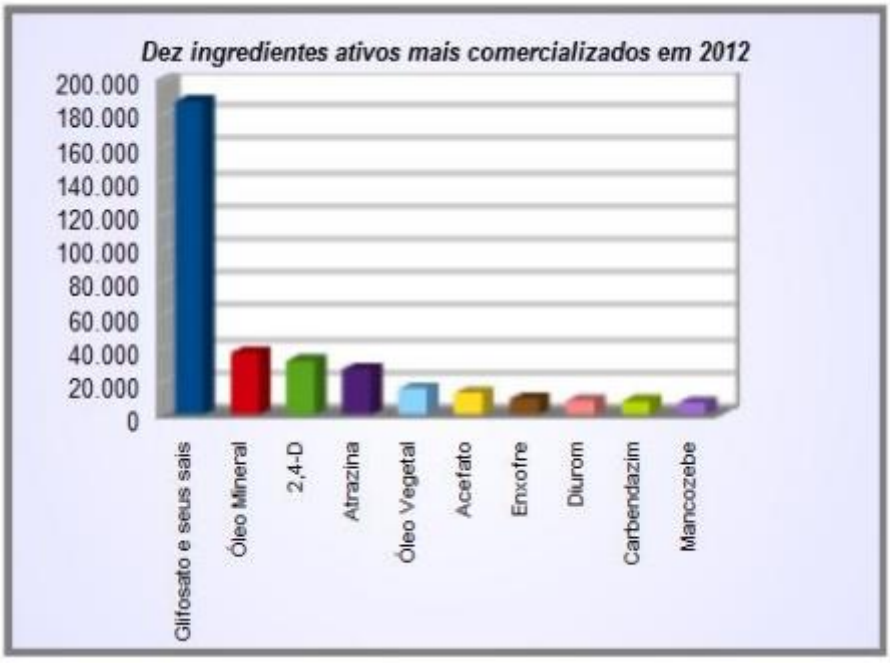

Figura 2 - Os dez ingredientes ativos mais comercializados em 2012 (em toneladas). Fonte: IBAMA- Boletim de comercialização de Agrotóxicos e Afins – Histórico das Vendas – 2000-2012. Brasília, DF, 2013.

A aplicação de agrotóxicos visa ao aumento da produtividade e a eliminação de espécies invasoras que transmitem doenças às plantações e aos seres humanos (AGRAWAL et al., 2010). No entanto, podem oferecer riscos ao homem e ao ambiente devido ao uso frequente e muitas vezes incorreto destes compostos. Logo, em termos de segurança ambiental e saúde pública, o aumento da utilização de agrotóxicos tem determinado um grande impacto negativo, em razão da contaminação ambiental e dos casos de intoxicação (SPADOTTO, 2006).

Os agrotóxicos podem alcançar os corpos d'água de maneira direta através da aplicação intencional, ou por meio da água da chuva e de escoamento superficial, a partir de áreas onde ocorreram aplicações (ARIAS et al., 2007; SILVA; SANTOS, 2007). A lixiviação do solo é uma das principais fontes de contaminação dos sistemas aquáticos por agrotóxicos e é influenciada diretamente pela precipitação, pois quanto mais chove, mais agrotóxicos podem alcançar os corpos hídricos (NIKIMNAA, 2014).

Dentre as maneiras indiretas que favorecem a entrada desses compostos nos corpos hídricos merece destaque a percolação da água no solo, pela qual pode haver a contaminação de lençóis freáticos; a volatilização em decorrência da formação de poeira de solo contaminado e a deriva que transporta os agrotóxicos pulverizados por meio de correntes aéreas podendo depositá-los em locais distantes da área onde foram inicialmente usados (COOPER, 1993, NIKIMNAA, 2014).

Uma vez na água, os resíduos de agrotóxicos podem se ligar a partículas em suspensão, depositar-se nos sedimentos ou serem absorvidos por organismos (TOMITA e BEYRUTH, 2002). Estudos indicam a ocorrência de alterações em parâmetros bioquímicos e metabólicos de animais aquáticos expostos a agrotóxicos (COPPATTI et al., 2009; SALBERGO et al., 2010). O acúmulo desses compostos pelos organismos aquáticos depende da disponibilidade e persistência dos contaminantes na água (SPACIE et al., 1985).

A disponibilidade e persistência no solo determinam a eficácia do agrotóxico utilizado, bem como o benefício de seu uso e o potencial efeito adverso em organismos não-alvo e outros componentes do ambiente. Outras condições relevantes na avaliação do potencial de contaminação de agrotóxicos em corpos d' água incluem a retenção no solo, transformação, transporte, destino e degradação, sendo todas essas reguladas pelas características químicas e físicas dos compostos, do meio e pelas condições climáticas (FALCONER, 2002). Fatores como a quantidade, frequência e os métodos de aplicação também devem ser considerados na determinação do destino dos agrotóxicos no ambiente (SPADOTTO et al., 2006).

1.3 GLIFOSATO

As propriedades herbicidas do composto glifosato foram descobertas pela Companhia Monsanto (EUA) em 1970 e, desde então, este agrotóxico é um dos herbicidas mais amplamente utilizados no mundo (ANNETT et al., 2014; REN et al., 2014). O glifosato também ocupa uma posição de destaque no mercado nacional por ser o herbicida mais consumido no Brasil (IBGE, 2010).

Trata-se de um herbicida pós-emergente (aplicado após a germinação), sistêmico (absorção pela raiz), não-seletivo e com alta eficiência. É utilizado mundialmente na formulação de agrotóxicos para o controle de plantas infestantes em diversos ambientes, principalmente, agrícolas, florestais, aquáticos e domésticos (CHEN et al., 2007; JONSSON et al., 2008; TANG et al., 2015). Na agricultura tem sido utilizado em culturas de algodão, ameixa, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, milho, soja, trigo, entre outras.

A ação do glifosato nas plantas consiste na inibição de uma enzima, a 5-enolpiruvoil-chiquimato-3-fosfato, que participa da síntese de aminoácidos essenciais para sobrevivência da planta (ZABLOTOWICZ e REDY, 2004; TONI et al., 2006). Na ausência desta enzima, as plantas são incapazes de produzir proteínas necessárias ao seu crescimento e morrem após alguns dias ou semanas (YAMADA et al., 2007).

O glifosato, (N-(fosfometil)-glicina) (Figura 3) pertence ao grupo químico dos aminoácidos fosfonados e à classe dos herbicidas organofosforados. Uma característica importante deste herbicida refere-se à sua persistência variável no ambiente, sendo que a sua meia vida varia de 7 a 14 dias, porém em ambientes aquáticos pode ficar adsorvido na vegetação e no sedimento por mais de 30 dias (GIESY et al., 2000; TSUI e CHU, 2008). Além disso, o glifosato é bastante estável na presença de luz e apresenta alta solubilidade em água (15,700 $mg.L^{-1}$ a 25ºC e pH 7), mas é praticamente insolúvel em solventes orgânicos comuns (RODRIGUES e ALMEIDA, 2005). A alta solubilidade do glifosato favorece o risco de contaminação dos corpos hídricos, pois sugere elevada mobilidade na água, além da adsorção ao sedimento e a partículas que podem ser ingeridas por organismos aquáticos (QIAN et al., 2009). Silva et al. (2003) detectaram a presença de glifosato após 60 dias de

sua aplicação em águas superficiais próximas a uma região agrícola, no município de Pelotas (RS). Em amostras de água da bacia do Rio Corumbataí (SP), também foi observada a presença do ingrediente ativo em questão (ARMAS et al., 2007).

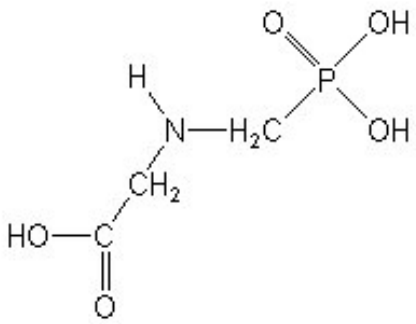

Figura 3- Fórmula estrutural do herbicida glifosato.

Quando o herbicida é aplicado espera-se que, após um determinado tempo de ação, este composto desapareça do ambiente. Porém, parte é absorvida pelas plantas e parte não atinge o alvo, sendo depositada no ambiente. A partir daí processos de adsorção, degradação microbiana, lixiviação e transporte vão determinar quanto do herbicida ficará disponível na solução do solo e na água (PRATA, 2002). O glifosato apresenta uma rápida e elevada taxa de adsorção aos óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio e à matéria orgânica do solo. Assim, componentes minerais comumente presentes no solo, como a goethita, adsorvem fortemente o glifosato (VEIGA et al., 2001). O grupo fosforado do herbicida é adsorvido por superfícies minerais, pois tem a habilidade de formar complexos fortes com metais (MCCONNEL e HOSSNER, 1985; JONSSON et al., 2008).

Embora seja classificado como medianamente ou pouco tóxico (ANVISA, 2011) e o risco ambiental decorrente da exposição direta ao glifosato seja considerado baixo (EPA, 1993), diante do seu amplo consumo e sua frequente presença no ambiente, este ingrediente ativo tem sido estudado em termos de efeitos tóxicos nos organismos aquáticos (KREUTZ et al., 2011; SANDRINI et al., 2013). Apesar de ser considerado não tóxico para mamíferos

e aves, os peixes são organismos mais sensíveis a este herbicida (CHEN et al., 2007).

Atualmente, diversos trabalhos têm avaliado a ocorrência de alterações em peixes em consequência da exposição a herbicidas a base de glifosato, como inibição da acetilcolinesterase em cérebro e músculo de *Prochilodus lineatus* (MODESTO e MARTINEZ, 2010a; MODESTO e MARTINEZ, 2010b), estresse oxidativo em peixes *Rhamdia quelen* (MENEZES et al., 2011) e danos genotóxicos em *Tilapia rendalli* (GRISOLIA, 2002). Tendo em vista a ampla utilização dos produtos formulados a base de glifosato, sua persistência no ambiente, o potencial de alcançar os corpos hídricos e ocasionar danos aos organismos aquáticos, medidas de remediação são necessárias para reduzir a disponibilidade e os possíveis efeitos deste herbicida no ambiente aquático.

Desta forma, técnicas para remoção do glifosato dos corpos hídricos são necessárias, uma vez que os métodos de tratamento de água já existentes, como microfiltração, ultrafiltração, adsorção por carvão ativado, filtração utilizando areia e degradação biológica, são procedimentos caros ou que demandam grandes investimentos em infraestrutura. Por isso, existe um interesse crescente em métodos alternativos e de baixo custo para a remoção do glifosato da água (CARNEIRO et al., 2015).

1.4 ÓXIDOS DE FERRO: GOETHITA E A REMEDIAÇÃO AMBIENTAL

O ferro é o quarto elemento mais abundante da crosta terrestre e seus óxidos são comuns e muito difundidos na natureza, estando presentes em componentes de solos, rochas, lagos, rios e fundo de oceanos (SCHWERTMANN e CORNELL, 2000; PONKA et al., 2007). A introdução destes compostos no ambiente ocorre, predominantemente, através do intemperismo de rochas magmáticas nos ambientes terrestres e marinhos. Neste processo, está envolvido o mecanismo de erosão decorrente de vento ou água que transporta os óxidos de ferro do ambiente (pedosfera, hidrosfera, biosfera) para a litosfera (crosta terrestre) (SCHWERTMANN e CORNELL, 2003).

Existem 16 óxidos que apresentam em sua composição o elemento ferro ligado ao oxigênio e/ou hidroxila, sendo que na maioria o ferro está no estado

trivalente. A superfície dos óxidos de ferro é muitas vezes mal cristalizada, ou seja, os cristais apresentam um tamanho nanométrico que lhes confere elevada área e atividade superficial. Além disso, são ricos em defeitos, contém impurezas, baixa solubilidade e apresentam cores marcantes que variam do vermelho ao amarelo (SCHWERTMANN e CORNELL, 2000).

A goethita (α-FeOOH) (Figura 4) é um dos óxidos de ferro mais termodinamicamente estáveis a temperatura ambiente (LIU et al., 2014). Em agregados de cristais maciços, a goethita apresenta uma coloração marrom escura ou preta, enquanto que o pó é amarelo e responsável pela cor de rochas e solos (SCHWERTMANN e CORNELL, 2003). Devido a sua intensa coloração é muito utilizada por indústrias de pigmentos.

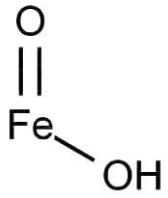

Figura 4: Fórmula estrutural da goethita.

Assim como os demais óxidos de ferro, a goethita apresenta uma superfície nanométrica com área específica elevada que varia de acordo com o ambiente (LIU et al., 2014). Estudo recente mostrou a estrutura da goethita sintetizada a partir de diferentes compostos, incluindo a água destilada (Figura 5) (CARNEIRO et al., 2013). Combinado ao tamanho nanométrico, a abundância de grupos hidróxidos na superfície da goethita favorece a adsorção de nutrientes, contaminantes contendo ânions e cátions e gases presentes no meio (DIDERIKSEN e STIPP, 2003). Portanto, a goethita desempenha um papel crucial no ambiente visto que interfere em processos de transporte (do solo para o sistema aquático) e transformação de compostos, diminuindo a perda de nutrientes no solo e reduzindo as concentrações de contaminantes que podem atingir os corpos hídricos.

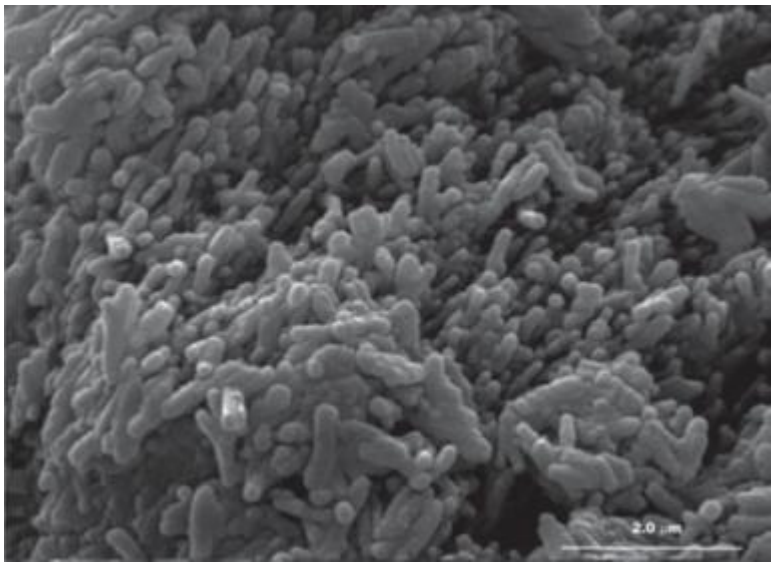

Figura 5: Eletromicrografia da estrutura da goethita (CARNEIRO et al., 2013).

Estudos avaliaram a adsorção do glifosato sobre a goethita e observaram interação entre ambos (SHEALS et al., 2002; DIDERIKSEN et al., 2003; JONSSON et al., 2008; WAIMAN et al., 2012). De forma geral, o grupo fosfato do glifosato se liga ao Fe^{3+} (Figura 6), enquanto que os grupos amino e carboxilato permanecem relativamente livres de complexação com a goethita e ficam sujeitos à degradação ou ligação com íons metálicos (SHEALS et al., 2002). Assim, a ligação entre o glifosato e o ferro pode ser uma maneira de diminuir a disponibilidade deste composto no ambiente (TONI et al., 2006).

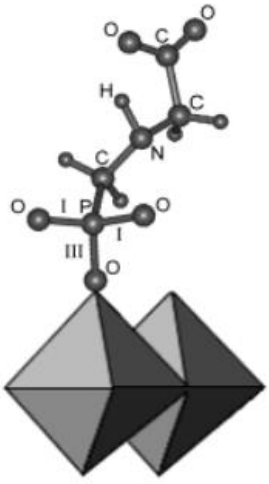

Figura 6: Ligação do glifosato sobre a goethita.

As propriedades físicas e químicas da goethita, tais como elevada área superficial e alta reatividade, são características associadas ao tamanho

nanométrico deste óxido de ferro no ambiente e têm atraído atenção devido a sua potencial aplicação na proteção ambiental. Com base na compreensão destas características, a goethita sintética tem sido produzida como precursora de nanopartículas de ferro que visam o tratamento de contaminantes em meio aquático (LIU et al., 2014).

A nanotecnologia envolve a produção e o uso de materiais cujas estruturas apresentam escala nanométrica (SHAW et al., 2011). Relaciona-se, portanto, com o domínio de partículas com dimensões extremamente pequenas, da ordem de 1 a 100 nanômetros. Partículas nesta escala de tamanho (nanopartículas) apresentam propriedades físicas, químicas e biológicas novas e/ou distintas daquelas de partículas em escala macroscópica (SHAW et al., 2011; FERREIRA et al., 2013; LIU et al., 2014). Tais características, consideradas únicas e incomuns, têm permitido a aplicação de nanopartículas em diversos campos e áreas de pesquisa, dentre estes estão a nanomedicina, indústrias de cosméticos, farmacêuticos, têxteis, eletrônicos, informática, aeroespacial, além de aplicações ambientais que incluem o tratamento de águas superficiais, subterrâneas e efluentes industriais (HANDY et al., 2008; FERREIRA et al., 2013).

As nanopartículas podem ser introduzidas no ambiente em decorrência do despejo de efluentes industriais ou com o intuito de remediação ambiental, visando à remoção de diversos contaminantes (BHATT et al., 2011; SAVINA et al., 2011). Esses processos podem resultar na formação de agregados de nanopartículas e contaminantes (ZHANG et al., 2011). Segundo a resolução CONAMA nº 420 (2009), a remediação de uma área contaminada consiste no conjunto de ações de intervenção para reabilitação desta, por meio de aplicações de técnicas que visam à remoção, contenção ou redução das concentrações dos contaminantes.

Embora existam estudos relacionados à remoção de contaminantes do ambiente, este assunto ainda é fonte considerável de debate e reforça a importância do desenvolvimento de novas tecnologias de remediação (O'CARROLL, 2014). A utilização de nanopartículas nesse processo está despertando interesse em virtude da grande área superficial que fica disponível para interação com os contaminantes e da alta reatividade dessas partículas

que podem proporcionar soluções de baixo custo para muitos desafios de remediação ambiental (MOORE, 2006; JU-NAM et al., 2008).

O conhecimento quanto à produção e aplicação de nanopartículas está em crescente aumento, enquanto que seus efeitos sobre os sistemas biológicos ainda não são bem elucidados. Assim, embora as características das nanopartículas sejam vantajosas do ponto de vista da remoção de contaminantes do meio, para os organismos aquáticos as consequências da absorção desses materiais ainda são pouco conhecidas. Estudos mostram que as nanopartículas podem resultar em danos na integridade de membrana e no DNA, além de efeitos mutagênicos e morte celular (BROWN et al., 2001; BHATT et al., 2011).

Uma propriedade importante na avaliação da toxicidade e disponibilidade das nanopartículas refere-se à mudança de estado desses materiais em função de suas características químicas (natureza da superfície) e do ambiente (circulação de água na vizinhança das nanopartículas) (NIKIMNAA, 2014). Logo, quando presentes no ambiente aquático, as nanopartículas podem ficar suspensas na coluna d'água ou podem formar aglomerados (associação fraca de nanopartículas) ou agregados (ligações químicas entre nanopartículas) (SCHIRMER et al, 2014). Dependendo do estado de aglomeração ou agregação, as nanopartículas podem afundar e permanecer no sedimento e, consequentemente, podem ser absorvidas tanto por organismos que ficam na coluna d'água como por aqueles que vivem próximo ao sedimento (SCHIRMER et al., 2014). A agregação das nanopartículas pode ocasionar efeitos sobre a possível toxicidade, pois interfere na reatividade superficial que efetivamente pode interagir com os organismos (CWIERTNY et al., 2009; SHAW et al., 2011).

Uma vez absorvidas pelos organismos aquáticos, por meio da alimentação ou adsorção a superfícies como as brânquias, por exemplo, as nanopartículas podem ser internalizadas após a passagem pelos epitélios branquial ou intestinal (HANDY et al., 2008). Se internalizados, esses materiais podem atingir organelas no interior de células ou serem distribuídos por meio da circulação dos fluidos (SCHIRMER et al., 2014). Por fim, é preciso considerar a possibilidade de transferência de nanopartículas ao longo da

cadeia alimentar e os potenciais efeitos em longo prazo quanto aos consumidores finais (CEDERVALL et al., 2012).

O estudo do destino e impacto das nanopartículas no ambiente está se tornando cada vez mais importante (JU-NAM et al., 2008), porém a falta de conhecimento sobre os riscos associados a esses materiais tem limitado sua aplicação na remediação da contaminação em corpos hídricos (CRANE et al., 2008; SAVINA et al., 2011). Neste contexto é preciso que seja feita uma avaliação quanto aos benefícios e aos potenciais riscos do uso de nanopartículas no ambiente (HE et al., 2011). Para tanto, metodologias de análise de riscos são necessárias (MOORE, 2006), e os testes de toxicidade podem ser uma alternativa para a avaliação dos efeitos das nanopartículas.

1.5 BIOMARCADORES

Os testes de toxicidade estão sendo cada vez mais utilizados a fim de avaliar os efeitos dos poluentes em organismos aquáticos e também auxiliar na análise de qualidade da água. Esses testes podem ser realizados associados com a utilização de biomarcadores, que são definidos como alterações biológicas que os organismos expressam diante de um contaminante (SARKAR et al., 2006), ou seja, são as características mensuráveis de um organismo que responde a agentes tóxicos (NIKIMNAA, 2014). Portanto, o uso de biomarcadores está intimamente associado ao estudo dos efeitos de substâncias químicas tóxicas nas comunidades naturais (CHAPMAN, 2002).

Os resultados dos biomarcadores devem permitir uma avaliação dos potenciais riscos para populações, comunidades ou ecossistemas (NIKIMNAA, 2014). Para tanto, biomarcadores bioquímicos, fisiológicos e histológicos têm sido estudados e propostos para avaliar a saúde dos peixes (VAN DER OOST et al., 2003). Dentre as vantagens oferecidas por estas ferramentas, está a sensibilidade a várias classes de contaminantes e o fornecimento de informações quanto ao efeito dos contaminantes, sendo, normalmente, os primeiros sinais de alterações no ambiente (VAN DER OOST et al., 2003).

Para predizer a contaminação do ambiente e suas consequências sobre os organismos, a resposta de um único biomarcador pode não ser tão precisa e resultar em interpretações errôneas, por isso, um conjunto de biomarcadores

deve ser analisado nos testes de toxicidade (ZORITA et al., 2008). Além disso, os biomarcadores têm maior relevância ecológica quando combinados com o conhecimento da sensibilidade das espécies aos contaminantes (NIKIMNAA, 2014). Assim, representam importantes ferramentas para monitorar o equilíbrio do ecossistema aquático e auxiliam na escolha de estratégias de remediação, antes da ocorrência de danos ambientais irreversíveis (CAJARAVILLE et al., 2000; SAKAR et al., 2006).

Dentre os biomarcadores mais investigados em estudos ecotoxicológicos estão as defesas antioxidantes, danos oxidativos, danos no DNA, parâmetros fisiológicos e histopatologia, os quais serão descritos a seguir.

1.5.1 Biomarcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes

Em condições normais, o oxigênio é reduzido à água por meio de reações oxidativas nos complexos que compõe a cadeia respiratória e que culminam na produção de energia (ATP). Portanto, o oxigênio é essencial à sobrevivência dos organismos aeróbicos. Durante o processo de transporte de elétrons na mitocôndria, uma pequena porcentagem do oxigênio é convertida em compostos do metabolismo do oxigênio, ao invés de água. Estes compostos são denominados espécies reativas de oxigênio (ERO) e incluem o ânion radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxil (•OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LUSHCHAK, 2011).

As ERO, em baixas concentrações, são importantes moléculas sinalizadoras no organismo, e são neutralizadas por sistemas de defesa celular, como antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (DOWNLING e SIMMONS, 2009). Entretanto, estes produtos passam a ter um efeito prejudicial quando presentes no organismo em altas concentrações, pois são potentes oxidantes, capazes de reagir com proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucléicos causando diferentes tipos de danos que podem levar à morte celular (MARTINEZ, 2006; LI et al., 2009).

Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que retarda significativamente ou impede a oxidação de um substrato em um organismo (NIKIMNAA, 2014) e os organismos dispõem de defesas

antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas para neutralizar as ERO. As defesas antioxidantes não enzimáticas podem reduzir a ação tóxica das ERO e são representadas, principalmente, por moléculas hidrossolúveis como o tripetídeo glutationa (GSH), o ácido ascórbico (vitamina C), e por moléculas lipossolúveis como o β – caroteno (vitamina B) e o α – tocoferol (vitamina E) (VAN DER OOST et al., 2003).

A GSH é o tiol não proteico mais abundante na célula e está envolvida na proteção das células contra danos oxidativos (SINHORIN et al., 2014). Este tripeptídeo está associado a diversas funções como a síntese de proteína e DNA, integridade do citoesqueleto e defesa contra moléculas oxidantes e compostos xenobióticos, atuando como primeira linha de defesa contra as ERO (PEÑA-LLOPIS et al., 2002). A GSH participa de reações enzimáticas, atuando como cofator para ação da Glutationa–S-Transferase (GST), que participa da detoxificação de substâncias, bem como para a ação da enzima glutationa peroxidase (GPx) que elimina o peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos. A GSH está presente em altas concentrações dentro das células e é considerada um ótimo biomarcador para contaminação, pois sua concentração pode variar em resposta a contaminação ambiental (MARTINEZ, 2006).

Quando ocorre um desequilíbrio a favor da produção de ERO e contra a capacidade de defesa antioxidante da célula é estabelecido o chamado estresse oxidativo (LIVINGSTONE, 2003; MONTEIRO et al., 2006). Dentre as consequências relacionadas ao estresse oxidativo estão a peroxidação lipídica (LPO), os danos ao DNA e a oxidação de proteínas (LIVINGSTONE, 2003), que podem auxiliar na avaliação da toxicidade de um determinado contaminante (VALAVANIDIS et al., 2006).

A LPO é caracterizada pelo conjunto de reações em cadeia iniciado pela ação das ERO que retiram átomos de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácidos graxos polinsaturados (LIMA e ABDALLA, 2001). Envolve, portanto, a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares, levando a perda de sua integridade e fluidez, além de alterar o fluxo transmembrana (VALAVANIDIS et al., 2006). A degradação dos produtos da LPO resulta em compostos como cetonas e aldeídos. Dentre esses, está o malondialdeído (MDA) que é considerado um bom biomarcador de

contaminação aquática e pode ser quantificado e usado como indicativo de estresse oxidativo (VAN DER OOST et al., 2003).

As proteínas também são um dos principais alvos das ERO e podem resultar em alterações reversíveis ou irreversíveis, sendo que estas últimas podem levar a danos estruturais com inativação e perda de funcionalidade. A principal modificação nas proteínas, decorrente da ação das ERO, relaciona-se com a oxidação de aminoácidos que produz derivados carbonilados altamente reativos (DALLE-DONNE et al., 2006). A carbonilação está ligada a processos que formam cetonas e/ou aldeídos que reagem com o DNPH (2,4dinitrofenilhidrazina) para formar compostos detectáveis por meio da espectrofotometria (REQUENA et al., 2001; SINHORIN et al., 2014). Os níveis de carbonilação proteica podem ser utilizados como biomarcadores em espécies de peixes expostos a herbicidas (MENEZES et al., 2011).

1.5.2 Biomarcadores genotóxicos

A genotoxicidade refere-se aos efeitos de substâncias tóxicas sobre a estrutura do DNA (NIKINMAA, 2014) e alguns compostos xenobióticos são denominados genotóxicos, pois podem interagir e ocasionar alterações na molécula de DNA. As alterações no DNA incluem modificações nos nucleotídeos, formação de adutos e quebras de fita, que quando não reparadas podem gerar mutações (ZHU et al., 2005). A ocorrência de danos no DNA é um biomarcador sensível a diversos contaminantes (TSANGARIS et al., 2011).

A avaliação do potencial genotóxico de contaminantes pode ser realizada por meio do teste do cometa que detecta quebras nas cadeias de DNA. Este teste é amplamente utilizado em estudos ecotoxicológicos por ter um custo relativamente baixo, ser rápido e sensível (DHAWAN et al., 2009). A técnica se baseia na detecção de fragmentos de DNA que migram durante a eletroforese formando caudas. Os estudos genotóxicos com peixes, frequentemente, realizam o ensaio do cometa em células sanguíneas, porém as brânquias e o fígado também têm sido utilizados (GUILHERME et al., 2012). Agrotóxicos, como os herbicidas formulados a base de glifosato, são capazes de induzir danos no DNA de peixes (CAVALCANTE et al., 2008; GUILHERME et al., 2014; MORENO et al., 2014).

1.5.3 Biomarcador neurotóxico

A AChE é um biomarcador bioquímico que tem sido largamente usado por diversos autores para monitorar os efeitos de agrotóxicos em organismos aquáticos, especialmente em peixes (VAN DER OOST et al., 2003; COPPATTI et al., 2009). Dentre as vantagens deste biomarcador destacam-se a seletividade, a sensibilidade aos contaminantes e a obtenção rápida de resultados (PUNDIR e CHAURAN, 2012). Neste contexto, os inseticidas organofosforados e carbamatos destacam-se por serem reconhecidamente anticolinesterásicos, para os quais a AChE pode ser utilizada como biomarcador.

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor sintetizado no terminal axônico que permanece empacotado e estocado nas vesículas sinápticas até que a chegada de um potencial de ação dispare sua liberação. A ACh se difunde na sinapse e se liga a receptores na membrana pós-sináptica. Durante a transmissão do impulso nervoso, a sinalização é finalizada pela enzima AChE, que remove a ACh de seu receptor, clivando-a em colina e acetato (XUEREB et al., 2007). A colina é captada pelo neurônio e reutilizada para formar ACh, ao passo que o acetato se difunde para fora da fenda sináptica.

A atividade da AChE é um dos principais biomarcadores utilizados para o monitoramento de ambientes aquáticos contaminados por agrotóxicos (PUNDIR e CHAURAN, 2012). Além de inseticidas organofosforados e carbamatos, estudos demonstraram a sensibilidade da AChE a outros tipos de contaminantes ambientais, como os agrotóxicos a base de glifosato (GLUSCZAK et al., 2006; MODESTO e MARTINEZ, 2010a; SALBERGO et al., 2010). Estes compostos ligam-se ao sítio esterásico da AChE, impedindo-a de exercer sua função de hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético (MEERDINK, 1989). Assim, ocorre acúmulo de ACh na fenda sináptica, que promove aumento na transmissão do impulso nervoso, gerando várias alterações nos organismos como exaustão do nervo, disfunções do miocárdio, convulsões, parada respiratória e coma, podendo levar a morte (PUNDIR; CHAURAN, 2012). Em peixes, a inibição da AChE pode interferir em funções importantes, como a localização de presas, fuga de predadores e

orientação em relação aos alimentos (MIRON et al., 2005; SAMANTA et al., 2014).

1.5.4 Biomarcadores fisiológicos

Os biomarcadores fisiológicos são utilizados para indicar e quantificar os efeitos de contaminantes ambientais (WINKALER et al., 2001). Dentre estes, os parâmetros hematológicos, tais como o hematócrito (porcentagem de células vermelhas no volume total de sangue), o conteúdo de hemoglobina e o número de eritrócitos por mm^3 de sangue (RBC) podem fornecer informações sobre o estado estrutural e funcional dos peixes expostos a agentes tóxicos (LI et al., 2010; YONAR et al., 2014). Dessa forma, auxiliam na detecção de desvio das condições normais, e são importantes na avaliação da contaminação ambiental (OLIVEIRA-RIBEIRO et al., 2000; LI et al., 2011). Estudos mostram que os parâmetros hematológicos podem ser alterados na presença de diversos contaminantes, como metais, (AL-ASGAH et al., 2015) incluindo o ferro (ELAHEE e BAGWANT, 2007), e agrotóxicos (KOPROCU et al., 2006; SIANG et al., 2007; HARABAWY et al., 2014).

A glicose plasmática é um indicador sensível e confiável na determinação de situações de estresse em peixes expostos a contaminantes ambientais (AL-ASGAH et al., 2015). Níveis elevados de glicose estão relacionados ao aumento da demanda energética que está envolvida no mecanismo de adaptação do animal ao agente estressor (WENDELAAR BONGA, 1997). Essa mobilização de energia é importante para o reestabelecimento da homeostase do organismo (RAMESH et al., 2009). Testes de toxicidade com agrotóxicos indicaram hiperglicemia em peixes expostos a estes compostos (GLUSCZAK et al., 2006; HARABAWY et al., 2014).

1.5.5 Biomarcadores histológicos

Os biomarcadores histológicos são instrumentos sensíveis e eficazes na detecção dos efeitos de agentes tóxicos em órgãos específicos de peixes, a

exemplo das brânquias que podem acumular diversos contaminantes (THOPHON et al., 2003; ABDEL-MONEIM et al., 2012; PAULINO et al., 2014; MUÑOZ et al., 2015). As brânquias desempenham um papel importante nas trocas gasosas, osmorregulação, manutenção do equilíbrio ácido-base e na excreção de compostos nitrogenados (MUÑOZ et al., 2015).

Na maioria dos teleósteos, as brânquias estão alojadas na cavidade opercular e são formadas por arcos branquiais, de onde partem os filamentos que são constituídos por lamelas. As lamelas são muito vascularizadas e são suportadas por células pilares, que delimitam lacunas por onde o sangue flui. As brânquias ficam em contato constante com a água para efetuar as trocas gasosas, e devido a isso, são as portas de entrada para contaminantes presentes na água (MALLATT, 1985; AU et al., 2004).

A grande área superficial e a localização das brânquias face ao meio externo favorece a absorção de substâncias dissolvidas na água (MAZON et al, 2000; PAULINO et al., 2012). Logo, como as brânquias ficam em contato com o ambiente aquático e são a principal barreira contra a entrada de agentes tóxicos, representam um órgão vulnerável a uma variedade de injúrias traumáticas, infecciosas e toxicológicas (WOLF et al., 2014). Neste contexto, as alterações histológicas branquiais podem indicar possíveis danos funcionais e seu estudo é útil na avaliação de sistemas aquáticos contaminados (FANTA et al., 2003; CENGIZ e UNLU, 2006).

1.6 BIOMONITORAMENTO

A análise dos parâmetros químicos e físicos da água é importante na avaliação de alterações na integridade e homeostase dos sistemas aquáticos. A integração destes parâmetros com a análise de impactos sofridos pela biota é de fundamental importância na compreensão dos efeitos ocasionados por agente tóxicos presentes no ambiente (ARIAS et al., 2007; CAZENAVE et al., 2009; LAM, 2009).

O processo chamado de biomonitoramento ambiental utiliza organismos vivos como ferramenta para avaliar os efeitos dos contaminantes (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008, NIKINMAA et al., 2014), pois suas

respostas podem indicar mudanças ocorridas no ambiente, geralmente decorrentes de atividades antropogênicas. Os organismos biomonitores são utilizados nesse processo, pois alteram suas funções vitais e podem acumular agentes tóxicos em resposta a alterações ambientais, e portanto, são capazes de fornecer informações sobre a situação ambiental local (VAN DER OOST et al., 2003; TOTTI et al., 2007).

Os peixes são avaliados como bons biomonitores em testes toxicológicos, pois são importantes na composição da cadeia alimentar e sensíveis a diversos contaminantes (MISHRA et al., 2005). Outros critérios importantes na escolha de organismos testes são: ampla distribuição geográfica; fácil manutenção e aclimatação a condições laboratoriais e características da biologia e ecologia da espécie conhecidas. A importância dos peixes de água doce é ecológica e econômica, sendo que podem ser considerados uma das principais rotas de contaminação humana (AL-SABTI e METCALFE, 1985).

1.6.1 Modelo experimental

A espécie de peixe *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Figura 7), popularmente conhecida como curimba, curimbatá, curimatã ou papa-terra pertence à ordem Characiformes e família Prochilodontidae. O gênero *Prochilodus* está amplamente distribuído nas principais bacias hidrográficas da América do Sul, podendo ser encontrado nos rios das bacias Solimões-Amazonas, Tocantins, São Francisco, Paraná-Paraguai, Paraíba do Sul e Uruguai (SIVASUNDAR et al., 2001; IWERSEN, 2010). A espécie *P. lineatus* pode ser localizada em toda a bacia do Rio Paraná-Rio Paraguai, em rios do Brasil, Argentina, Uruguai, Paraguai e Bolívia, e rio Paraíba do Sul (CASTRO e VARI, 2004).

As características de *P. lineatus* incluem corpo fusiforme de médio a grande porte, coloração cinza-esverdeada, sendo o dorso mais escuro e o ventre mais claro de cor prateada, um espinho curto na origem da nadadeira dorsal e boca circular com lábios grossos e móveis providos de dentículos diminutos (PEREIRA, 2006).

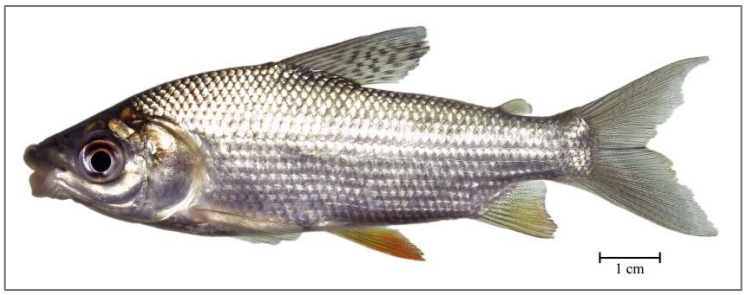

Figura 7 - Exemplar juvenil de *Prochilodus lineatus*. Foto: Birindeli, J. L.O.

P. lineatus realiza migrações para fins reprodutivos e apresenta hábito detritívoro, sendo sua dieta composta principalmente de detritos e sedimento (SCHENONE et al., 2014). Como os indivíduos se alimentam das partículas presentes no fundo, podem ficar mais suscetíveis aos contaminantes presentes na água e retidos no sedimento e, devido a isso, são considerados adequados para estudos de monitoramento ambiental. Neste contexto, testes de toxicidade em laboratório comprovaram a sensibilidade de *P. lineatus* em exposições aos agrotóxicos glifosato (LANGIANO e MARTINEZ, 2008), atrazina (SANTOS e MARTINEZ, 2008) e clomazone (PEREIRA et al., 2013), aos metais cobre (NASCIMENTO et al., 2012), chumbo (MONTEIRO et al., 2011), alumínio (CAMARGO et al, 2009) e a derivados de petróleo como a gasolina (SIMONATO et al., 2011).

Com vista ao que foi exposto, este trabalho foi desenvolvido para avaliar as seguintes hipóteses:

- ✓ Os peixes expostos ao glifosato apresentarão variações em diversos biomarcadores analisados.
- ✓ A goethita não promoverá alterações nos parâmetros avaliados.
- ✓ Os efeitos promovidos pelo glifosato serão modificados na presença da goethita.
- ✓ A goethita protegerá *P. lineatus* dos efeitos resultantes da presença do glifosato.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar os efeitos do glifosato e da goethita em biomarcadores bioquímicos, genotóxicos, fisiológicos e histológicos do teleósteo *Prochilodus lineatus* e verificar se a goethita protege o peixe dos eventuais efeitos do herbicida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar os efeitos da exposição aguda (24 h) de *P. lineatus* ao glifosato (3,6 mg. L^{-1}) e a goethita, em duas concentrações (10 e 100 mg.L^{-1}), separadamente e em mistura, por meio dos biomarcadores: glutationa, peroxidação lipídica, proteínas carboniladas, atividade da acetilcolinesterase e danos no DNA.
- ✓ Verificar os efeitos do glifosato e da goethita, isolados e em mistura, sobre parâmetros hematológicos (hematócrito, conteúdo de hemoglobina e número de eritrócitos) e na concentração de glicose e lactato;
- ✓ Determinar se a exposição aguda ao glifosato e à goethita, separadamente e em mistura, promovem alterações histológicas nas brânquias de *P. lineatus*;
- ✓ Verificar se a exposição à goethita promove o aumento nas concentrações de ferro em diferentes tecidos dos peixes;
- ✓ Avaliar se as alterações promovidas pelo herbicida são mantidas ou modificadas em peixes expostos ao herbicida na presença de goethita;
- ✓ Identificar quais os biomarcadores mais sensíveis para avaliação dos efeitos da exposição ao herbicida e à goethita separadamente e em mistura.

3 REFERÊNCIAS

ABDEL-MONEIM, A.M.; SHAWY, O.M.; AL-KAHTANI, M.A.; ELMEN A.Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. **Chemosphere**, v.88, p.1028–1035, 2012.

AGRAWAL, A.; PANDEY, R.S.; SHARMA, B. Water pollution with special reference to pesticide contamination in India. **Journal of Water Resource and Protection**, v.2, p. 432-448, 2010.

AL-ASGAH, N.A.; ABDEL-WARITH, A.A.; YOUNIS, E.M.; ALLAM, H.Y. Haematological and biochemical parameters and tissue accumulations of cadmium in *Oreochromis niloticus* exposed to various concentrations of cadmium chloride. **Saudi Journal of Biological Sciences**. 2015. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.01.002.

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

ANA – Agência Nacional de Recursos Hídricos. Irrigação é a finalidade mais outorgada de 2012. 2013. Disponível em: http://www2.ana.gov.br/Paginas/imprensa/noticia.aspx?id_noticia=11655. Acesso em: 6 jan. 2015.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Seminário volta a discutir o mercado de agrotóxicos. 2012. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+noticias+anos/2012+noticias/seminario+volta+a+discutir+mercado+de+agrotoxicos+em+2012. Acesso em: 23 dez. 2014.

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 Coletiva,** v. 12, p. 61–72, 2007.

ARMAS, E.D.; MONTEIRO, R.T.R.; ANTUNES, P.M.; SANTOS, M.A.P.F.; CAMARGO, P.B. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**, v. 30, p.1119-1127, 2007.

AU, D.W.T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. **Marine Pollution Bulletin**, v.48, p.817–834, 2004.

BHATT, I.; TRIPATHI, B.N. Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. **Chemosphere**, v.82, p.308-317, 2011.

BROWN, D.M.; WILSON, M.R.; MACNEE, W.; STONE, V.; DONALDSON, K. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. **Toxicology Applied Pharmacology**, v.175, p.191–200, 2001.

CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, J.M.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment,** v. 247, p. 295-311, 2000.

CAMARGO, M.M.; FERNANDES, M.N.; MARTINEZ, C.B.R. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v.94, p.40-46, 2009.

CARNEIRO, C.E.A.; IVASHITA, F.F.; JUNIOR, I.G.S.; SOUZA, C.M.D.; JR, A.P.; COSTA, A.C.S.; MAURO, E.; SANTANA, H.; ZAIA, C.T.B.V.; ZAIA, D.A.M. Synthesis of goethite in solutions of artificial seawater and amino acids: a prebiotic chemistry study. **International Journal of Astrobiology**, v. 12, p.149-160, 2013.

CARNEIRO, R.T.A.; TAKETA, T.B.; GOMES NETO, R.J.; OLIVEIRA, J.L.; CAMPOS, E.V.R; DE MORAES, M.A.; DA SILVA, C.M.G., BEPPU, M.M.; FRACETO, L.F. Removal of glyphosate herbicide from water using biopolymer membranes. **Journal of Environmental Management,** v. 151, p. 353-360, 2015.

CASTRO, R.M.C.; VARI, R.P. Detritivores of the South American Fish Family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): A Phylogenetic and Revisionary Study. **Smithsonian Contributions to Zoology**, n.622, 2004.

CAVALCANTE, D.G.S.M.; MARTINEZ, C.B.R.; SOFIA, S.H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus.* **Mutation Research**, v. 655, p.41–46, 2008.

CAZENAVE, J.; BACCHETTA, C.; PARMA, M. J.; SCARABOTTI, P. A.; WUNDERLIN, D. A. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). **Environmental Pollution**, v.157, p.3025–3033, 2009.

CEDERVALL, T.; LYNCH, I.; LINDMAN, S.; BERGGARD, T.; THULIN, E.; NILSSON, H.; DAWSON, K. A.; LINSE, S. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.104, p.2050–2055, 2007.

CENGIZ, E. I.; UNLU, E. Sublethal effects of comercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: A microscopic study. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, p. 246-253, 2006.

CHAPMAN, P.M. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. **Marine Pollution Bulletin**, v.44, p.7-15, 2002.

CHEN, Y.; WU, F.; LIN, Y.; DENG, N.; BAZHIN, N.; GLEBOV, E. Photodegradation of glyphosate in the ferrioxalate system. **Journal of Hazardous Materials**, v. 148, p. 360-365. 2007.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Nº 460 de 30 de dezembro de 2009. Disponível em: http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620. Acesso em: 4 jan. 2015.

COPPATTI, C.E.; GARCIA, L.O.; BALDISSEROTTO, B. Revisão Temática. Revisão sobre o impacto de agroquímicos da cultura de arroz em peixes. **Biota Neotropica**, v.9, p.235-2424, 2009.

COPPER, C.M. Biological effects of agriculturally derived surface-water pollutants on aquatic systems- a review. **Journal Environmental Quality**, v. 22, p. 402-408, 1993.

CRANE, M.; HANDY, R.D.; GARROD, J.; OWEN, R. Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. **Ecotoxicology**, v.17, p. 421–431, 2008.

CWIERTNY, D. M.; HANDLER, R. M.; SCHAEFER, M. V.; GRASSIAN, V. H.; SCHERER, M. M. Interpreting nanoscale size-effects in aggregated Fe-oxide suspensions: Reaction of Fe(II) with Goethite. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 72, p.1365 – 1380, 2009.

DALLE-DONNE, I.; ALDINI, G.; CARINI, M.; COLOMBO, R.; ROSSIC, R.; MILZANI, A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.10, p.389-406, 2006.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biology Toxicology**, v. 25, p. 5-32, 2009.

DIDERIKSEN, K.; STIPP, S. L. S. The adsorption of glyphosate and phosphate to goethite: A molecular-scale atomic force microscopy study. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.67, p. 3313–3327. 2003.

DOWLING, D.K.; SIMMONS, L.W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proceedings of the Royal Society of London**, v.276, p.1737-1745, 2009.

EPA (United States Environmental Protection Agency). 1993. Registration eligibility decision: glyphosate. Disponível em: http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDs/old_reds/glyphosate.pdf. Acesso em: 20 dez. 2014.

FALCONER, K. Pesticide environmental indicators and environmental policy. **Journal of Environmental Management**, v. 65, p. 285-300, 2002.

FANTA, E.; RIOS, F. S.; ROMÃO, S.; VIANNA, A. C. C.; FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, p. 119 –130, 2003.

FERREIRA, A.J.; CEMLYN-JONES, J.; COREDEIRO, R.C. Nanoparticles, nanotechnology and pulmonary nanotoxicology. **Revista Portuguesa de Pneumologia,** v. 19, p. 28-37, 2013.

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

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

GRISOLIA, C.K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosohamide, mitomycin C and various pesticides**. Mutation Research**, v.518, p.145-159, 2002.

GUILHERME, S.; GAIVÃO, I.; SANTOS, M.A.; PACHECO, M. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide- Elucidation of organ-specifity and the role of oxidative stress. **Mutation**

Reserch/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 743, p. 1-9, 2012.

GUILHERME, S.; SANTOS, M.A.; GAIVÃO, I.; PACHECO, M. Are DNA-damaging effects induced by herbicide formulations (Roundup® and Garlon®) in fish transient and reversible upon cessation of exposure? **Aquatic Toxicology**, v. 155, p. 213–221, 2014.

HANDY, R.D.; HENRY, T.B.; SCOW, T.M.; JOHNSTON, B.D.; TYLER, C.R. Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish—a mechanistic analysis. **Ecotoxicology**, v. 17, p.396–409, 2008.

HARABAWY, A.S.A.; IBRAHIM A. TH. A. Sublethal toxicity of carbofuran pesticide on the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822): Hematological, biochemical and cytogenetic response. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 103, p.61–67, 2014.

HE, S.; FENG, Y.; GU, N.; ZHANG, Y.; LIN, X. The effect of γ-Fe_2O_3 nanoparticles on *Escherichia coli* genome. **Environmental Pollution**, v.159, p.3468-3473, 2011.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Índice de Desenvolvimento Sustentável – Brasil**, p. 43-51. 2010.

IPARDES – Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. **Indicadores de Sustentabilidade Ambiental por bacias hidrográficas do estado do Paraná.** Curitiba: IPARDES, 223p. 2010.

IWERSEN, L.H.L. **Diversidade genética em curimba *Prochilodus lineatus* (Pisces, Characiformes) na Bacia do Alto Rio Uruguai, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

JONSSON, C.M.; PERSSON, P.; SJOBERG, S.; LORING, J.S. Adsorption of glyphosate on goethite (α-FeOOH): surface complexation modeling combining spectroscopic and adsorption data. **Environmental Science & Technology**, v.42, p.2464-2469, 2008.

JU-NAM, Y.; LEAD, J.R. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. **Science of the Total Environment**, v.400, p.396-414, 2008.

KOPRUCU, S.O.; KOPROCU, K.; URAL, M.S.; ISPIR, U.; PALA, M. Acute toxicity of organophosphorus pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis L*.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 86, p. 99–105, 2006.

KREUTZ, L.C.; BARCELLOS, L.J.G.; VALLE, S.F.; SILVA, T.O.; ANZILIERO, D.; SANTOS, E.D.; PIVATO, M.; ZANATTA, R. Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. **Fish & Immunology**, v.30, p.51-57, 2011.

LAM, P.K.S. Use of biomarkers in environmental monitoring. **Ocean** & **Coastal Management**, v. 52, p. 348-354. 2009.

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 C, Toxicology & Pharmacology**, v.147, p.222-231, 2008.

LI, H.; ZHOU, Q.; WU, Y.; FU, J.; WANG, T.; JIANG, G. Effects of waterborne nano-iron on medaka (*Oryzias latipes*): Antioxidant enzymatic activity, lipid peroxidation and histopathology. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.684-692, 2009.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, p.293-303, 2001.

LIU, H.; CHEN, T.; FROST, R.L. An overview of the role of goethite surfaces in the environment. **Chemosphere,** v. 103, p. 1-11. 2014.

LIVINGSTONE, D.R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v.57, p. 195-211, 1993.

LIVINGSTONE, D.R. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. **Revue de Médecine Véterinaire**, v.154, p.427-430, 2003.

LUSHCHAK, O.V.; KUBRAK, O.I.; STOREY, M.J.; STOREY, B.K.; LUSHCHAK, I.V. Low toxic herbicide roundup induces mild oxidative stress in gold fish, **Chemosphere,** v.76, p.932–937, 2009.

LUSHCHAK, V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v.101, p. 13–30, 2011.

MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A.S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, p.355-381, 2008.

MARTINEZ, C.B.R. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: Angela Teresa Silva-Souza. (org.). Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil. Maringá: **Abrapoa**, p. 43-62, 2006.

MAZON, A.F.; CERQUEIRA, C.C.C.; FERNANDES, M.N.Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. **Environmental Research**, v. 88, p.52-63, 2002.

MCCONNEL, J. S.; HOSSNER, L. R. pH-dependent adsorption isotherms of glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, p. 1075-1078, 1985.

MEERDINK, G.L. Organophosphorus and carbamate insecticide poisoning in large animals. **Veterinary Clinics North America Food Animal Practice**, v. 5, p. 375-389, 1989.

MENÉNDEZ-HELMAN, R.J.; MIRANDA, L.A.; AFONSO, M.S.; SALIBIÁN, A. Subcellular energy balance of *Odontesthes bonariensis* exposed to a glyphosate-based herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.114, p.157-163, 2015.

MENEZES, C.C.; FONSECA, M.B.; LORO, V.L.; SANTI, A.; CATTAENO,R. Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen.* **Archives Environmental Contamination Toxicology**, v.60, p. 665-671, 2011.

MIRON, D. S.; CRESTANI, M.; SHETTINGER, M. R.; MORSCH, V. M.; BALDISSEROTTO, B.; TIERNO, M. A.; MORAES, G.; VIEIRA, V. L. P. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 61, p. 398-403, 2005.

MISHRA, D.; SRIVASTAV, S. K.; SRIVASTAV, A. K. Effects of the insecticide cypermethrin on plasma calcium and ultimobranchial gland of a teleost, *Heteropneustes fossilis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 193-197, 2005.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. Agrotóxicos. 2010. Disponível em: http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos. Acesso em: 23 dez. 2014.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, p. 294 – 299, 2010a.

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

MONTEIRO, D.A.; ALMEIDA, J.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.143, p.141-149, 2006.

MONTEIRO, V.; CAVALCANTE, D.G.; VILÉLA, M.B.; SOFIA, S.H.; MARTINEZ, C.B. In vivo and in vitro exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v.104, p.291-298, 2011.

MOORE, M.N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? **Environment International**, v.32, p. 967-976, 2006.

MORENO, N. C.; SOFIA S. H.; MARTINEZ, C. B.R. Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb® and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus.* **Environmental Toxicology and Pharmacology***,* v.37, p. 448-454, 2014.

MUÑOZ, L.; WEBER, P.; DRESSLER, V.; BALDISSEROTTO, B.; VIGLIANO, F.A. Histopathological biomarkers in juvenile silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to a sublethal lead concentration. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.113, p.241–247, 2015.

NASCIMENTO, C.R.; SOUZA, M.M.; MARTINEZ, C.B. Copper and the herbicide atrazine impair the stress response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology & Pharmacology**, v.155, p.456-461, 2012.

NIKINMAA, M. **An Introduction to Aquatic Toxicology**. Academic Press of Elsevier, Oxford, 240p. 2014.

O'CARROLL, D.M. Nanotechnology for Contaminated Subsurface Remediation: Possibilities and Challenges. In: STREET, A.; SUSTICH, R.C.; DUNCAN, J.S.; SAVAGE, N. **Nanotechnology Applications for Clean Water**, 2ed, Elsevier. 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4557-3116-9.00028-7.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A.; PELLETIER, E.; PFEIFFER, W. C.; ROULEAU. Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and Nordic freshwater fish. **Environmental Research**, v. 83, p. 286-292, 2000.

PAULINO, M.G.; SAKURAGUI, M.M.; FERNANDES, M.N. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus.* **Chemosphere**, v.86, p.1-7, 2012.

PAULINO, M.G.; BENZE, T.P.; SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; SAKURAGUIA, M.M.; FERNANDES, J.B.; FERNANDES, M.N. The impact of organochlorines and metals on wild fish living in a tropical hydroelectric reservoir: bioaccumulation and histopathological biomarkers. **Science of Total Environmental**, v. 497–498, p. 293–306, 2014.

PEÑA-LLOPIS, S.; FERRANDO, M.D.; PEÑA, J.B. Impaired glutathione redox status in associated with decreased survival in two organophosphate poisoned marine bivalves. **Chemosphere***,* v.47, p.485-497, 2002.

PEREIRA, G.J.M. **Utilização de gonadotropina coriônica equína e/ou extrato bruto de hipófise de carpa na indução da reprodução de curimba (*Prochilodus lineatus*).** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

PONKA, P.; TENENBEIN, M.; EATON, J.W. Iron. In: NORDBERG, G.F.; FOWLER, B.A.; NORDBERG, M. **Handbook on the Toxicology of Metals**, 3ed, Elsevier, 992p. 2007.

PRATA, F. **Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazina.** Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2002.

PUNDIR, C.S.; CHAUHAN,N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. **Analytical Biochemistry**, v.429, p.19-31, 2012.

QUIAN, K.; TANG, T.; SHI, TY.; WANG, F.; LI, J.Q.; CAO, YS. Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4 chloro 3,5 dinitrobenzotrifluoride. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, p.222-226, 2009.

RAMESH, M.; SARAVANAN, M.; KAVITHA, C. Hormonal responses of the fish, *Cyprinus carpio*, to environmental lead exposure. **African Journal of Biotechnology**, v.8, p. 4154-4158, 2009.

RAND, G.M.; WELLS, P.G.; MCCARTY, L.S. Introduction to aquatic toxicology. In: RAND, G.M. Effects, environmental fate, and risk assessment. **Fundamentals of Aquatic Toxicology,** 2.ed. Ed Taylor & Francis, 1995.

RASHED M.N. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. **Environment International**, v. 27, p. 27-33, 2001.

REN, Z.; DONG, Y.; LIU, Y. Enhanced glyphosate removal by montmorillonite in the presence of Fe(III). **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v.53, p.14485−14492, 2014.

REQUENA, J.R.; CHAO, C.C.; LEVINE, R.L.; STADTMAN, E.R. Glutamic and aminoadipic semi aldehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p.69-74, 2001.

RODRIGUES, A.C.F. **Estudo de variações bioquímicas e morfológicas induzidas por pesticidas organofosforado e carbamato em tilápia (*Oreochromis niloticus)* e cascudo (*Pterygoplichthys anisitsi*), como biomarcadores de contaminação ambiental.** Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 2009.

SALBEGO, J.; PRETTO, A.; GIODA, C.R.; MENEZES, C.C.; LAZZARI, R.; NETO, J.R.;BALDISSEROTTO, B.; LORO, V.L. Herbicide Formulation with Glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in Piava (*Leporinus obtusidens)*. **Archives Environmental Contamination Toxicology**, v. 58, p.740 - 745, 2010.

SAMANTA, P; PAL S.; MUKHERJEE, A. K.; GHOSH, A. R. Biochemical effects of glyphosate based herbicide, ExcelMera71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v.107, p.120-125. 2014.

SANDRINI, J.Z.; ROLA, R.C.; LOPES, F.M..; BUFFON, H.F.; FREITAS, M.M.; MARTINS, C.M.G.; ROSA, C.E. Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: In vitro studies. **Aquatic Toxicology**, v.130, p.171-173, 2013.

SANTOS, T.G.; MARTINEZ, C.B. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. **Chemosphere**, v.89, p.1118-1125, 2012.

SARKAR, A. R. D.; SHRIVASTAVA, A.N.; SARKER, S. Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. **Ecotoxicology,** v. 15, p.333–340, 2006.

SAVINA, I.N; ENGLISH, C.J.; WHITBY, R.L.D.; ZHENG, Y.; LEISTNER, A.; MIKHALOVSKY, S.V.; CUNDY, A.B. High efficiency removal of dissolved

As(III) using iron nanoparticle-embedded macroporus polymer composites. **Journal of Hazardous Materials**, v.192, p.1002-1008, 2011.

SCHIRMER, K. Mechanisms of Nanotoxicity. In: LEAD, J.R.; VALSAMI-JONES, E. (Eds) **Frontiers of Nanoscience**, v.7, p.2-227, 2014.

SCHENONE, N.F.; AVIGLIANO, E.; GOESSLER, W.; CIRELLI , A.F. Toxic metals, trace and major elements determined by ICPMS in tissues Of *Parapimelodus valenciennis* and *Prochilodus lineatus* from Chascomus Lake, Argentina. **Microchemical Journal**, v.112, p.127–131, 2014.

SCHWERTMANN, U.; CORNELL, R. M. **Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization**. Wiley-VCH, Germany, 188p. 2000.

SCHWERTMANN, U.; CORNELL, R.M. **The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses**. Wiley-VCH, Germany, 659p. 2003.

SHAW, B.J; HANDY, R.H. Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals versus metal ions. **Environment International**, v.37, p.1083–1097, 2011.

SHEALS, J.; JOBERG, S.; PERSSON, P. Adsorption of Glyphosate on Goethite: Molecular Characterization of Surface Complexes. **Environmental Science & Technology,** v.36, p.3090-3095. 2002.

SIANG, H.Y.; YEE, L.M.; SENG, C.T. Acute toxicity of organochlorine insecticide endosulfan and its effect on behaviour and some hematological parameters of Asian swamp eel (*Monopterus albus*, Zuiew). **Pesticide Biochemistry and Physiology***,* v. 89, p.46–53, 2007.

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

SILVA, J.M.; SANTOS, J.R. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v.11, p.565-573, 2007.

SIMONATO, J.D.; GUEDES, C.L.B.; MARTINEZ, C.B.R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.69, p.112-120, 2008.

SINHORIN, V. D. G.; SINHORIN, A. P.; TEIXEIRA, J. M. S.; MILÉSKI, K. M. L.; HANSEN, P. C.; MOREIRA, P. S. A.; KAWASHITA, N. H., BAVIERA, A. M.;

LORO, V. L. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma sp*). **Ecotoxicology and Environmental**, v. 106, p.181-187, 2014.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, v.10, p.407-417, 2001.

SPACIE, A; MC CARTY, L.S.; RANDY, G.M. Bioaccumulation and Bioavailability in Multiphase Systems. In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. (Eds). **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**. Hemisphere, Washington, p. 495-525, 1985.

SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A.F.; LUCHINI, L.C.; ANDRÉA, M.M. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 42), 29p. 2004.

SPADOTTO, C. A. **Avaliação de riscos ambientais de agrotóxicos em condições brasileiras.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente (Embrapa Meio Ambiente. Documentos; 58), 20p. 2006.

TANG, T.; BOËNNE, W.; DESMET, N.; SEUNTJENS, P.; BRONDERS, J.; GRIENSVEN, A. V. Quantification and characterization of glyphosate use and loss in a residential area. **Science of Total Environmental**, v.517, p.207-214, 2015.

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

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

TONI, L.R.; SANTANA, H.; ZAIA, D.A.M. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. **Química Nova**, v.29, p.829-833. 2006.

TOTTI, A.; CHIDA, A.Y.; TOMITA, H.K.; PORTO, J.; OGURA, L.L.; LEAL, S. Marcadores de Poluição. **Química das Águas**, QFL – 3201, São Paulo, 2007.

TSANGARIS, C.; VERGOLYAS, M.; FOUNTOULAKI, E.; GONCHARUK, V.V. Genotoxicity and oxidative stress biomarkers in *Carassius gibelioas*

endpoints for toxicity testing of Ukrainian polluted river Waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p. 2240–2244, 2011.

TSUI, M.T.K.; CHU, L.M. Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: aqueous sediment pore water exposures. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology,** v.46, p.316-323, 2004.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.64, p.178-189, 2006.

VALBONESI, P.; SARTOR, G.; FABBRI, E. Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programs. **The Science of the Total Environment**, v. 312, p. 79-88, 2003.

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.

VEIGA, F.; ZAPATTA, J. M.; MARCOS, F.; ALVAREZ, E. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. **Science of Total Environment**, v. 271, p.135-144, 2001.

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 Physiology**, v. 90, p.42-51, 2008.

XUEREB, B.; NOURY, P.; FELTEN, V.; GARRIE, J.; GEFFARD, O. Cholinesterase activity in *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda): characterization and effects of chlorpyrifos. **Toxicology**, v. 236, p. 178-189, 2007.

ZABLOTOWICZ, R.M.; REDY, K.N. Impact of Glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* Symbiosis with Glyphosate-Resistant Transgenic Soybean: A minireview. **Journal of Environmental Quality**, v. 33, p.825-831, 2004.

ZHANG, Y.; LI, Y.; ZHENG, X. Removal of atrazine by nanoscale zero valent iron supported on organobentonite. **Science of the Total Environment**, v.409, p.625-630, 2011.

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.

ZORITA, I.; ORTIZ-ZARRAGOITIA, M.; APRAIZ, I.; CANCIO, I.; ORBEA, A.; SOTO, M.; MARIGÓMEZ, I.; CAJARAVILLE, M.P. Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using red mullets as sentinel organisms. **Environmental Pollution,** v.153, 157-168, 2008.

WAIMAN, C.V.; AVENA, M.J.; GARRIDO, M.; BAND, B.F.; ZANINI, G.P. A simple and rapid spectrophotometric method to quantify the herbicide glyphosate in aqueous media. Application to adsorption isotherms on soils and goethite. **Geoderma**, v. 170, p.154–158. 2012.

WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 591-625, 1997.

WINKALER, E.U.; SILVA, A.G.; GALINDO, H.C.; MARTINEZ, C.B.R. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, v. 23, p. 507-514, 2001.

WOLF, J.C.; BAUMGARTNER, W.A.; BLAZER, V.S.; CAMUS, A.C.; ENGELHARDT, J.A.; FOURNIE, J.W.; FRASCA, S. GROMAN, D.B.; KENT, M.L.; KHOO, L.H.; LAW, J.M.; LOMBARDINI, E.D.; RUEHL-FEHLERT, C.; SEGNER, H.E.; SMITH, S.A.; SPITSBERGEN, J.M.; WEBER, K.; WOLFE, M.J. Nonlesions, Misdiagnoses, Missed Diagnoses, and Other Interpretive Challenges in Fish Histopathology Studies: A Guide for Investigators, Authors, Reviewers, and Readers. **Toxicologic Pathology**, v.20, p.1-29, 2014

YAMADA, T.; CASTRO, P. R. C. Efeitos do glifosato nas plantas: Implicações fisiológicas e agronômicas. **Encarte de informações agronômicas**, n.119, 2007.

4 MANUSCRITO

A associação do glifosato à goethita reduz os efeitos do herbicida para um peixe neotropical?

Angélica Tronco de Moraes, Cláudia Bueno dos Reis Martinez*

[1]Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina. C.P.6001.CEP:86051-990.Londrina, Paraná, Brasil.

*Autor para correspondência. Tel:+55 43 3371.4650 – Fax: +55 43 4471.4467
E-mail: cbueno@uel.br

Manuscrito em fase de preparação para submissão no periódico *Chemosphere*

RESUMO

O herbicida glifosato é potencialmente tóxico para os organismos aquáticos e uma das maneiras de diminuir sua disponibilidade no ambiente seria através de sua adsorção ao óxido de ferro goethita. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos da goethita e de sua associação ao glifosato para organismos nativos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do glifosato e da goethita, isolados e em mistura, para o peixe *Prochilodus lineatus*, por meio de biomarcadores bioquímicos, genéticos, fisiológicos e histológicos, além de quantificar a concentração de ferro nos tecidos. Para tanto, foram realizados dois experimentos independentes, sendo que os peixes foram expostos, durante 24 h, a quatro tratamentos: 3,6 $mg.L^{-1}$ de glifosato (GLI), 10 $mg.L^{-1}$ de goethita (GT10), GLI + GT10 ou apenas água (CTR). No outro grupo, os peixes foram expostos ao GLI, 100 $mg.L^{-1}$ de goethita (GT100), GLI+GT100 e CTR. A concentração de ferro foi analisada no sangue, brânquias, fígado, rim, cérebro, músculo e na água dos meios de exposição. Parâmetros hematológicos, glicose e lactato foram avaliados. Além da análise do conteúdo de glutationa (GSH), peroxidação lipídica (LPO), carbonilação proteica (PCO) em fígado e brânquias, atividade da acetilcolinesterase em cérebro e músculo, ocorrência de danos no DNA dos eritrócitos e histologia do tecido branquial. Os resultados mostraram valores semelhantes de ferro dissolvido nos tratamentos em que foram adicionadas as diferentes concentrações de goethita, provavelmente devido à aglomeração e sedimentação da goethita. No cérebro foi verificado aumento de ferro nos tratamentos que continham a goethita. O glifosato induziu a diminuição do hematócrito, o aumento de GSH e LPO, e a ocorrência de danos no DNA. Decorrida a exposição a GT100 foi evidenciada a redução de hematócrito, glicose e PCO, enquanto que GT10 promoveu diminuição da hemoglobina. No entanto, a exposição dos peixes ao tratamento GLI+GT10 reverteu alterações promovidos pelo glifosato que incluem redução de hematócrito e aumento de LPO e danos no DNA. Não foram evidenciadas alterações histológicas prejudiciais ao funcionamento das brânquias. Desta forma, pode-se concluir que o glifosato causou danos em *P. lineatus* e que a concentração de 10 $mg.L^{-1}$ de goethita evitou os principais efeitos promovidos pelo herbicida indicando que a goethita pode ser uma alternativa na remediação de ambientes aquáticos contaminados por herbicidas à base de glifosato.

Palavras-chaves: glicose, carbonilação proteica, acetilcolinesterase**,** danos no DNA, histologia branquial, ferro.

4.1 INTRODUÇÃO

A introdução de agrotóxicos nos ecossistemas aquáticos é consequência da ação antrópica sobre o ambiente, a qual resulta na redução da qualidade dos recursos hídricos. Através desse processo, diversos xenobióticos são lançados nos sistemas aquáticos e podem comprometer a sobrevivência da biota que habita esses ambientes (Cajaraville et al., 2000). O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (Anvisa, 2012) e, neste cenário, o glifosato se destaca por ser o herbicida mais consumido no País e no mundo, sendo utilizado em diversos ambientes, principalmente, agrícolas, florestais, aquáticos e urbanos (Jonsson et al., 2008; Annett et al., 2014; Tang et al., 2015).

Quando aplicado, parte do herbicida é absorvida pelas plantas e parte não atinge o alvo, ficando disponível no ambiente. Processos de adsorção com óxidos de ferro presentes no solo como a goethita, por exemplo, podem inativar o glifosato (Sheals et al., 2002). Entretanto, a frequência de aplicação associada à persistência do glifosato no ambiente e condições que envolvem o escoamento superficial e a lixiviação podem favorecer o transporte do herbicida para os corpos hídricos (Spadotto, 2006; Tang et al., 2015). A presença de glifosato já foi detectada em águas superficiais próximas a áreas agrícolas (Silva et al., 2003; Armas et al., 2007). Neste contexto, alterações em peixes têm sido descritas em decorrência da exposição a herbicidas formulados a base de glifosato, como estresse oxidativo (Nwani et al., 2013; Samanta et al., 2014; Sinhorin et al., 2014), danos genotóxicos (Guilherme et al., 2012; Moreno et al., 2014), variações na atividade da acetilcolinesterase (Modesto e Martinez, 2010a, 2010b; Cattaneo et al., 2011) e alterações histológicas nos tecidos branquial e hepático (Langiano e Martinez, 2008; Shiorigi et al., 2012).

Tendo em vista a intensa utilização do glifosato e o seu potencial de alcançar os corpos hídricos e promover danos em organismos aquáticos, medidas de remediação são necessárias para reduzir a disponibilidade deste herbicida no ambiente aquático (Carneiro et al., 2015). Neste contexto, a goethita tem despertado interesse como uma solução de baixo custo a diversos desafios de contaminação ambiental (Grieger et al., 2010; Savina et al., 2011). A goethita (α-FeOOH) é um dos óxidos de ferro mais termodinamicamente

estáveis ao qual o glifosato se adere fortemente e assim pode interferir na mobilidade e diminuir a disponibilidade do herbicida (Schwertmann e Cornell, 2003; Toni et al., 2006; Liu et al., 2014). No ambiente, a goethita apresenta tamanho nanométrico que lhe confere características especiais, pois as dimensões nanométricas refletem em elevada área superficial e alta reatividade, permitindo a interação e remoção de contaminantes (Moore et al., 2006; Ju-Nam et al., 2008). Embora essas características sejam vantajosas do ponto de vista da remediação ambiental, poucos estudos investigaram a toxicidade de nanopartículas de óxidos de ferro, especialmente em ambientes aquáticos (Li et al., 2009; Sánchez et al., 2011).

Os testes de toxicidade podem ser uma alternativa na avaliação dos potenciais riscos da adição de goethita no ambiente aquático. Estes testes integram os parâmetros físicos e químicos da água com a análise de impactos sofridos pela biota, que são de fundamental importância na compreensão dos efeitos ocasionados por agente tóxicos presentes no ambiente (Cazenave et al., 2009; Lam, 2009). Para tanto, os peixes tem sido extensamente utilizados em estudos ecotoxicológicos, pois são sensíveis a diversos contaminantes e, portanto, podem apresentar alterações em parâmetros biológicos frente a mudanças ocorridas no ambiente (Van der Oost, 2003; Harabawy e Ibrahim, 2014). O peixe neotropical *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) é indicado como uma espécie biomonitora em testes de toxicidade e estudos de monitoramento ambiental, pois apresenta hábito detritívoro e sensibilidade a diferentes contaminantes como agrotóxicos (Langiano e Martinez, 2008; Santos e Martinez, 2012), metais (Nascimento et al., 2012) e derivados de petróleo (Simonato et al., 2008).

Os biomarcadores apresentam grande relevância nos testes de toxicidade, pois são as alterações biológicas mensuráveis nos organismos expostos a agentes tóxicos (Nikimnaa, 2014). A entrada de um composto xenobiótico no organismo pode levar a um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio que, se não forem adequadamente neutralizadas pelas defesas antioxidantes, podem resultar em efeitos prejudiciais ao organismo. Estes efeitos podem ser consequência da ocorrência de danos oxidativos e podem ser avaliados através das defesas antioxidantes, peroxidação lipídica e carbonilação proteica (Livingstone, 2001; Sinhorin et al., 2014), além de danos

no DNA que podem resultar da ação de ERO ou da ação direta de contaminantes ou de seus metabólitos sobre a molécula de DNA (Lee e Steinert, 2003; Moreno et al., 2014). A atividade da acetilcolinesterase é outro biomarcador frequentemente utilizado no monitoramento de áreas contaminadas, visto que pode indicar danos neurotóxicos na presença de contaminantes (Miron et al., 2005; Cattaneo et al., 2011). Aliado a essas análises, parâmetros fisiológicos são importantes ferramentas na avaliação da saúde de peixes expostos a agentes tóxicos (Li et al., 2010). A análise histológica de brânquias pode complementar as respostas dos biomarcadores citados, pois as brânquias constituem um órgão vulnerável a presença de contaminantes no meio externo e a análise histológica pode ser útil na avaliação de sistemas aquáticos contaminados (Fanta et al., 2003; Cengiz e Unlu, 2006).

Diante dos fatos expostos e devido à necessidade de informações acerca da toxicidade e da potencial aplicação da goethita na remediação ambiental, o objetivo do presente trabalho foi avaliar alterações em biomarcadores bioquímicos, genotóxicos, fisiológicos e histológicos, além de quantificar a concentração de ferro nos tecidos de *P. lineatus* expostos ao glifosato, à goethita e à mistura de ambos por 24 h.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Animais

Juvenis de *Prochilodus lineatus* medindo 11,61 ± 0,14 cm e pesando 13,35 ± 0,39 g (média ± EP, n=192, idade de aproximadamente 11 meses) foram obtidos na Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina, PR (EPUEL) e levados para a sala de bioensaios, onde foram aclimatados durante 6 dias em tanques de 300 litros, contendo água desclorada e aeração constante e com fotoperíodo de 12/12 h. A temperatura, pH, condutividade, turbidez e oxigênio dissolvido da água foram monitorados diariamente por meio de um medidor multiparâmetros (Horiba, U52, Japão). Os

animais foram alimentados com ração comercial (Guabi®, 36% de conteúdo proteico) no 2º e 4º dia de aclimatação e a alimentação foi cessada durante a realização dos experimentos.

4.2.2 Síntese da goethita

A goethita foi fornecida pelo Laboratório de Química Prebiótica, do Departamento de Química da UEL. A goethita foi preparada de acordo com o método descrito por Carneiro et al. (2013) a partir da mistura de $Fe(NO_3)_3$ (0,15 M) com KOH (2,5 M) em recipiente plástico, seguida de agitação vigorosa até a completa homogeneização. Após esse processo, a solução foi mantida a 70ºC por 60 horas e o precipitado formado foi filtrado e disperso em HNO_3 (0,01M) para a lavagem do material, sendo que este último procedimento foi repetido por mais 5 vezes. Finalizada a lavagem com HNO_3, foram feitas mais 3 lavagens do material em água ultra pura e então a solução foi liofilizada (Schwertmann e Cornell, 2000).

4.2.3 Testes de toxicidade

Os animais foram submetidos a testes de toxicidade aguda em aquários de vidro de 100 L contendo 80 L de água desclorada. Os experimentos foram realizados de forma independente, sendo constituídos de dois grupos. Em cada grupo foram utilizados quatro aquários, com oito animais em cada. No primeiro grupo (G10), os animais foram expostos a quatro tratamentos: apenas a água desclorada (CTR), 3,6 $mg.L^{-1}$ de glifosato (GLI), 10 $mg.L^{-1}$ de goethita (GT10) e a mistura de 3,6 $mg.L^{-1}$ de glifosato (GLI) com 10 $mg.L^{-1}$ de goethita (GLI+GT10). No outro grupo (G100), os peixes foram expostos aos seguintes tratamentos: CTR, GLI, 100 $mg.L^{-1}$ de goethita (GT100) e a mistura de 3,6 $mg.L^{-1}$ de glifosato (GLI) com 100 $mg.L^{-1}$ de goethita (GLI+GT100). Os peixes foram submetidos aos diferentes tratamentos por 24 horas e foram realizadas três repetições dos experimentos, sendo que foram utilizados os resultados de um experimento por serem representativos dos demais. Os parâmetros físicos

e químicos da água (pH, condutividade, turbidez e oxigênio dissolvido) foram monitorados no início e no final dos experimentos por um aparelho medidor multiparâmetros (Horiba, U-52, Japão).

As concentrações de goethita de 10 e 100 $mg.L^{-1}$ foram definidas com base em testes preliminares realizados no laboratório, nos quais não se verificou mortalidade dos peixes. A escolha da concentração de 3,6 $mg.L^{-1}$ de glifosato foi baseada na concentração deste ingrediente ativo no Roundup®, que foi utilizada em trabalhos que avaliaram os efeitos deste produto formulado para *P. lineatus* (Langiano e Martinez, 2008; Modesto e Martinez, 2010a).

Durante os testes foram realizadas coletas de água, tanto do aquário controle quanto dos experimentais, para a determinação de ferro total e dissolvido. Para a detecção de ferro total, as amostras de água foram acidificadas (HNO_3 1%), enquanto que para análise de ferro dissolvido, a água foi filtrada (filtro de 0,45 µm) e acidificada. As amostras foram armazenadas a 4ºC até o momento das análises para determinação da concentração de ferro.

4.2.4 Amostragem

Após a exposição (24 h), os animais foram anestesiados com benzocaína (0,1 $g.L^{-1}$), medidos, pesados e, em seguida, o sangue foi retirado pela veia caudal, com o auxílio de seringas heparinizadas. Após a coleta de sangue, os animais foram mortos por secção medular para retirada das brânquias, fígado, rim, músculo e cérebro, sendo que o 2º arco branquial esquerdo de cada animal foi fixado para posterior processamento histológico. A outra parte das brânquias e os demais órgãos foram mantidos em gelo e transportados para o laboratório, onde foram armazenados em ultrafreezer a -70^{o}C, até o momento das análises bioquímicas.

O delineamento experimental e procedimento amostral foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UEL (Processo nº 16062.2013.41).

4.2.5 Determinação de ferro na água e nos tecidos

O ferro foi quantificado no sangue, brânquias, fígado, rim, músculo e cérebro dos peixes. As amostras de sangue e os órgãos foram mantidos em

estufa a 60ºC para secagem total. Em seguida, foram submetidos à digestão em ácido nítrico suprapuro 5N, em estufa a 60ºC por 48 h. O material digerido foi utilizado na determinação de ferro.

As amostras de água e tecidos foram analisadas, em duplicata, na chama em espectrofotômetro de absorção atômica (EAA-AAnalyst 700, Perkin Elmer, EUA) e para as leituras foi utilizado um padrão de ferro (solução de 1000 µg/ml diluída em HNO_3 2% - Ultra Scientific, Analytical Solutions).

4.2.6 Determinação de glifosato na água

A concentração de glifosato foi determinada a partir do método descrito por Bhaskara e Nagaraja (2006). O método é baseado na reação de glifosato com ninidrina 5% (m/v), na presença de molibdato de sódio 5% (m/v), a 100ºC por 4 min. O produto formado apresenta uma coloração intensa e foi determinado em 570 nm, a partir de uma curva padrão de glifosato.

4.2.7 Biomarcadores fisiológicos

Do sangue coletado, uma alíquota foi imediatamente utilizada para determinação do hematócrito e do conteúdo de hemoglobina. A determinação do hematócrito foi realizada com o acondicionamento do sangue em tubo capilar seguido de micro centrifugação (Luguimac, Argentina) a 1.200 *g* por 5 min. As leituras foram feitas com o auxílio de uma cartela padronizada para estimar a porcentagem de células sanguíneas (hematócrito). O conteúdo de hemoglobina foi mensurado pelo método colorimétrico com cianeto de meta-hemoglobina utilizando-se kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Libra S32, Biochrom, Reino Unido) a 540 nm. Os resultados foram comparados com uma solução padrão de concentração conhecida (10 $g.dL^{-1}$) e foram expressos em gramas por decilitro ($g.dL^{-1}$). Para a contagem do número de eritrócitos (RBC), amostras de sangue foram fixadas em tampão formol citrato (citrato de sódio diluído em 0,4% de formol em solução) e analisadas em câmera de Neubauer ao microscópio

óptico. Os resultados do RBC foram expressos em número de células por milímetro cúbico (nº cels.mm^{-3}).

Após a determinação dos parâmetros hematológicos, o sangue total foi centrifugado (1.870 *g*, 10 min - MCD2000, Hsiangtai, Taiwan) para separação das células sanguíneas e do plasma. O plasma foi utilizado para a dosagem das concentrações de lactato e glicose por meio de kits comerciais. O lactato foi mensurado através de um kit enzimático (Labtest Diagnóstica, Brasil) adaptado para leitura em espectrofotômetro de microplacas (550 nm). A glicemia (Doles, Brasil) foi medida por meio do método enzimático da glicose-oxidase em leitora de microplaca (Victor^3, PerkinElmer, USA) a 510 nm.

4.2.8 Biomarcadores bioquímicos

As amostras de brânquias e fígado foram pesadas, homogeneizadas (1:5 - m/v para as brânquias e 1:10 – m/v para o fígado) em tampão fosfato de potássio (0,1M), pH 7, posteriormente centrifugadas (15000 *g*, 20 min, 4ºC – Universal 320 R, Hettich, Alemanha) e o sobrenadante foi separado para as análises dos parâmetros bioquímicos: conteúdo total de GSH, ocorrência de peroxidação lipídica e carbonilação proteica. Para determinação da atividade da acetilcolinesterase, as amostras de cérebro e músculo foram pesadas, homogeneizadas (1:10 – m/v) em tampão fosfato de potássio (0,1M), pH 7,5, centrifugadas (15000 *g*, 20 min, 4ºC) e o sobrenadante foi separado para o ensaio enzimático.

a) Antioxidante não enzimático: glutationa (GSH)

A concentração de glutationa foi determinada a partir do método descrito por Beutler et al. (1963). A glutationa reage com o ácido 5,5'–ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), formando um tiolato (TNB) de cor amarelada, que foi determinado em 412 nm. A concentração de GSH foi expressa em µg de GSH. mg de proteína^{-1}, obtida a partir de uma curva padrão de GSH.

b) Peroxidação lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica foi quantificada pela produção do malondialdeído (MDA), um dos produtos finais da peroxidação lipídica. Foi utilizado o ensaio TBARS, seguindo a metodologia de Camejo et al. (1998), que se baseia na quantificação de MDA pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) e foi realizada a leitura da fluorescência (excitação:535 nm/ emissão: 590 nm). A peroxidação lipídica foi expressa em µmol.MDA.mg de proteína^{-1}, utilizando uma curva padrão de MDA.

c) Carbonilação de proteínas (PCO)

A oxidação de proteínas foi avaliada de acordo com Levine et al. (1994), por meio da reação de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) com as proteínas carboniladas. A formação de dinitrofenil-hidrazonas foi determinada a 360 nm. Os resultados foram expressos em nmol.carbonilas.mg de proteína^{-1}.

d) Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da acetilcolinesterase foi determinada com base no método colorimétrico desenvolvido por Ellman et al. (1961) adaptado para a leitura em microplacas, de acordo com Alves Costa et al. (2007) a partir da reação do iodeto de acetilcolina com o reagente de cor DTNB. O produto da degradação do iodeto de acetilcolina pela AChE reage com o DTNB, formando o nitrobenzoato, de coloração amarela. As leituras de absorbância foram feitas durante 6 min a 415 nm e a atividade da AChE foi expressa em nmol min^{-1}.mg de proteína^{-1}.

e) Proteínas totais

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), que se baseia na reação de proteínas com o corante Coomassie Brilliant Blue G-250, utilizando uma curva de calibração com albumina de soro bovino (BSA) e a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 595 nm.

4.2.9 Biomarcador genotóxico

A metodologia utilizada no ensaio alcalino do cometa foi descrita por Singh et al. (1988) com algumas modificações de Ramsdorf et al. (2009). Após a coleta, o sangue foi adicionado em soro bovino fetal (1:100 – v/v), a fim de manter as células viáveis até o momento do teste. Esta solução foi misturada com agarose de baixo ponto de fusão e a mistura foi distribuída e dividida em duas lâminas previamente cobertas com agarose normal (1,5%) e, em seguida, foram cobertas com lamínulas e mantidas a 4ºC por cerca de 30 min. Decorrido esse período, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram imersas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 Mm, DMSO 10%, Tris 10 Mm, 1 mL Triton X-100, pH 10) por 2 horas. Em seguida, as lâminas foram transferidas para cubas de eletroforese, contendo solução tampão de eletroforese (NaOH 10 N e EDTA 200 mM, pH > 13) e permaneceram nesta situação por 30 minutos, para posterior corrida de eletroforese, a 25 volts e 300mA, durante 20 minutos. Após o término da corrida, as lâminas foram neutralizadas com tampão (Tris 0,4 M, pH 7,5) em 3 lavagens de 5 min. Para finalizar, as lâminas foram fixadas em etanol por 10 min e, após a secagem, foram armazenadas a 4ºC até o momento das análises.

Para as análises, as lâminas foram coradas com GelRed (Uniscience), cobertas com lamínula e, em seguida, foi realizada a contagem de 100 nucleoides por animal, em microscópio de fluorescência, ao aumento de 400 vezes. As análises foram realizadas por meio de teste cego e os danos no DNA foram classificados em 4 classes, considerando-se o tamanho da cauda do nucleóide, de acordo com Kobayashi et al. (1995): classe 0 = sem dano aparente; classe 1 = cauda curta, menor que o diâmetro do nucleóide; classe 2 = comprimento da cauda correspondente a uma ou duas vezes o diâmetro do nucleóide e classe 3 = comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do nucleóide. A partir dessa classificação foram feitos os cálculos do escore de danos no DNA para cada indivíduo, através da soma do valor da multiplicação do número de nucleoides observados em cada classe pelo valor da classe.

4.2.10 Biomarcadores histológicos

Para análise histológica, os arcos branquiais foram lavados com solução salina e fixados em solução de Bouin (3 h e meia). Após esse período, a solução foi substituída por álcool 70% e as amostras foram desidratadas em séries alcoólicas crescentes (80, 90 e 95%, 1 hora cada e 100%, 1h30min), diafanizadas em xilol (15 min) e incluídas em parafina. Os blocos foram cortados, em micrótomo (American Optical, 820), em cortes de 5 µm de espessura para a montagem das lâminas que foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e analisadas em microscópio óptico (Zeiss, Primo Star, Alemanha) acoplado a um sistema de análise e captura de imagens (Zeiss, AxioVision 4.8, Alemanha). Para análise semi-quantitativa de alterações histopatológicas nas brânquias, foi calculado o Índice de Alteração Histológica (IAH), proposto por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994), que se baseia na severidade das lesões observadas, classificando-as em estágios progressivos quanto ao comprometimento das funções teciduais: estágio I, alterações que não comprometem o funcionamento do órgão; estágio II, para alterações mais severas que comprometem o funcionamento do órgão, mas são reversíveis e estágio III, refere-se a alterações mais graves que comprometem de forma irreversível o funcionamento do órgão. Um valor de IAH foi calculado para cada animal através da fórmula: $IAH = 10^0 \sum I + 10^1 \sum II + 10^2 \sum III$, sendo I, II e III correspondente ao número de alterações de estágios I, II e III, respectivamente. A classificação quanto ao prejuízo ocasionado ao tecido branquial foi classificado de acordo com os valores de IAH da seguinte maneira: 0 a 10- funcionamento normal do órgão; 11 a 20 – danos leves a moderados; 21 a 50- danos de moderados a severos; 51 a 100 - danos muito severos e valores maiores que 100 indicam danos irreversíveis no tecido.

4.2.11 Análises estatísticas

Os resultados obtidos para cada tratamento experimental foram comparados entre si, considerando-se separadamente os grupos G10 (CTR x GLI x GT10 x GLI+GT10) e G100 (CTR x GLI x GT100 x GLI+GT100). Para estas comparações foi utilizada a análise de variância paramétrica (ANOVA) ou

não paramétrica (Kruskall- Wallis), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância), seguido por testes de comparações múltiplas (Student- Newman Keuls ou Dunn's, respectivamente) para a localização das diferenças. Foram considerados significativos valores de $P< 0,05$.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Parâmetros físicos e químicos da água

Os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados e estão apresentados na Tabela 1. Os valores de temperatura, pH, condutividade e oxigênio dissolvido (OD) não variaram significativamente entre os tratamentos. Os valores de turbidez variaram nos tratamentos em que foi adicionada a goethita em relação aos demais, sendo maiores naqueles que continham a maior concentração de goethita.

Tabela 1: Parâmetros físicos e químicos da água analisados nos diferentes tratamentos durante o período de aclimatação (análises diárias) e período experimental (análises no início e no final da exposição).

Tratamento	Temperatura (ºC)	pH	Condutividade ($mS.cm^{-1}$)	OD ($mg.L^{-1}$)	Turbidez (NTU)
Aclimatação	22,93 ± 0,13	7,03 ± 0,07	0,11 ± 0,002	7,59 ± 0,18	0
CTR	23,61 ± 0,22	7,07 ± 0,21	0,10 ± 0,002	7,90 ± 0,37	0
GLI	23,58 ± 0,21	6,87 ± 0,22	0,10 ± 0,001	7,99 ± 0,20	0
GT10	23,32 ± 0,18	7,23 ± 0,13	0,10 ± 0,001	8,06 ± 0,14	9,10 ± 0,2
GLI+GT10	23,23 ± 0,17	7,42 ± 0,39	0,10 ± 0,004	8,18 ± 0,62	8,95 ± 0,15
GT100	23,54 ± 0,27	7,08 ± 0,78	0,11 ± 0,006	8,24 ± 0,31	101,75 ± 1,25
GLI+GT100	23,55 ± 0,40	6,55 ± 0,52	0,11 ± 0,004	7,77 ± 0,13	104,0 ± 2,0

Valores indicam a média ± EP (n=4 -12).

Os resultados da concentração de ferro, total e dissolvido, nas águas coletadas dos aquários controles e experimentais estão apresentados na

Tabela 2. Os tratamentos nos quais os peixes foram expostos à goethita (GT10, GLI+GT10, GT100, GLI+GT100) apresentaram valores maiores de ferro total em relação ao controle. A análise de ferro dissolvido não detectou variações entre os tratamentos em que foi adicionada a goethita.

Tabela 2: Concentrações de ferro total e dissolvido ($mg.L^{-1}$) na água dos diferentes tratamentos experimentais.

Tratamentos	Fe Total ($mg.\ L^{-1}$)	Fe Dissolvido ($mg.\ L^{-1}$)
CTR	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,05
GLI	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,06
GT10	3,17 ± 0,56	2,43 ± 0,08
GLI+GT10	3,40 ± 0,65	2,53 ± 0,07
GT100	12,65 ± 1,86	2,67 ± 0,10
GLI+ GT100	20,31 ± 1,14	2,92 ± 0,15

A concentração de glifosato detectada na água do tratamento em que os peixes foram expostos apenas ao herbicida quantificou 3,84 $mg.L^{-1}$ do glifosato. Este valor foi próximo ao esperado, visto que foi adicionada a concentração de 3,6 $mg.L^{-1}$ de glifosato. Nos tratamentos que continham a goethita não possível dosar a concentração de ferro, pois íons metálicos interferem na metodologia utilizada (Bhaskara e Nagaraja, 2006).

4.3.2 Concentração de Ferro nos tecidos

As concentrações de ferro nos diferentes tecidos dos peixes estão representadas na Figura 8. A maior concentração de ferro foi verificada no fígado (10 a 16,5 µg Fe.g tec^{-1} seco), seguido pelo rim (2 a 4,3 µg Fe.g tec^{-1} seco), sangue (2,3 a 2,5 µg Fe.g tec^{-1} seco), brânquias (1,2 a 1,6 µg Fe.g tec^{-1} seco), cérebro (0,15 a 0,35 µg Fe.g tec^{-1} seco) e músculo (0,05 a 0,09 µg Fe.g tec^{-1} seco). Com exceção do cérebro, os demais tecidos dos peixes expostos aos diferentes tratamentos não apresentaram variações significativas na concentração de ferro em relação aos respectivos CTR. A análise de ferro no cérebro indicou maior concentração (P<0,001) desse metal no tratamento GT10 e nas misturas (GLI+GT10 e GLI+GT100) em relação ao respectivo CTR.

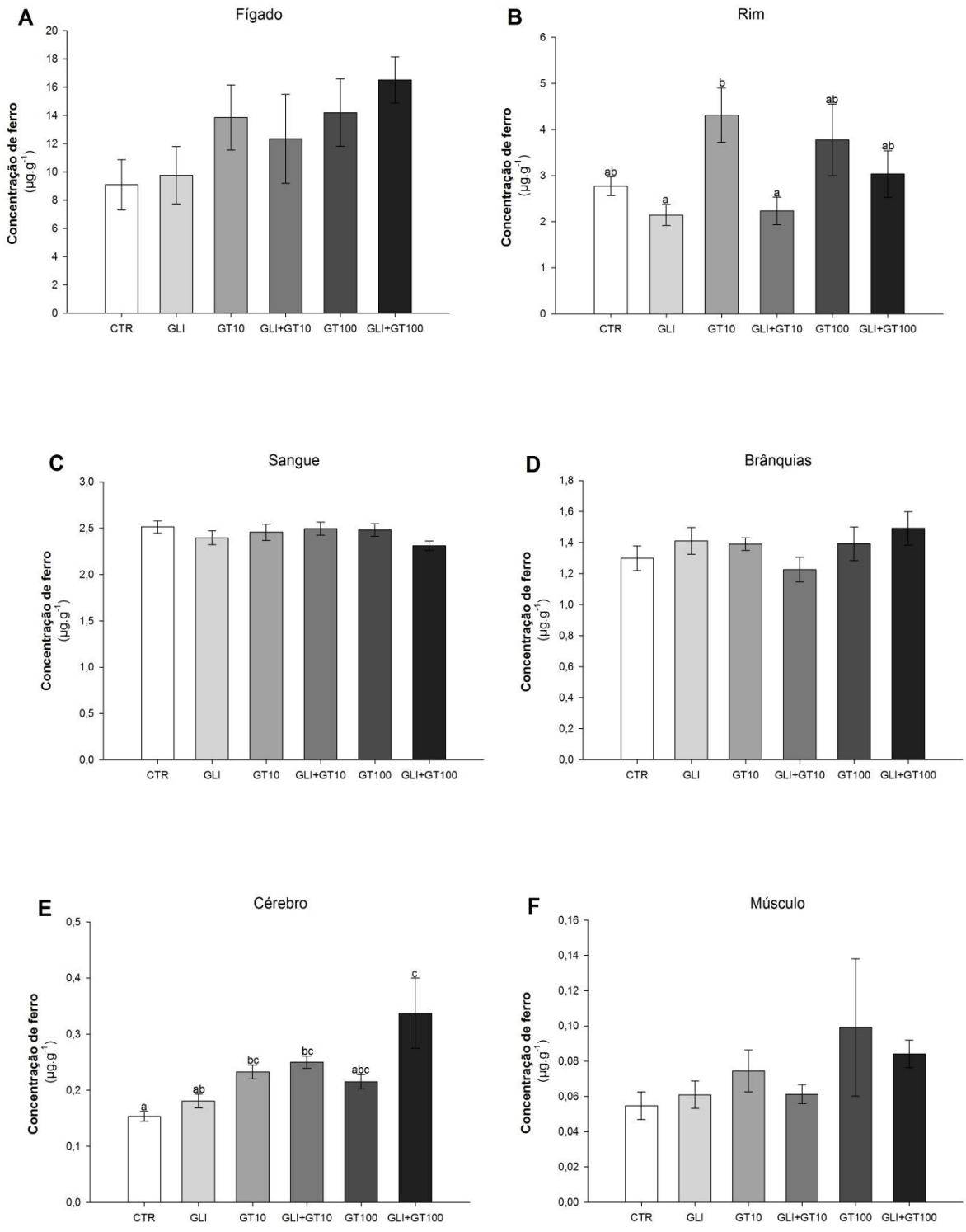

Figura 8: Concentração de ferro (µg.g^{-1} tecido seco) em fígado (A), rim (B), sangue (C), brânquias (D), cérebro (E) e músculo (F) de *P. lineatus* expostos aos seguintes tratamentos: água (CTR); glifosato (GLI); goethita na concentração de 10 mg.L^{-1} (GT10); mistura GLI+GT10; goethita na concentração de 100 mg.L^{-1} (GT100) e mistura GLI+GT100 por 24 h. As barras representam as médias ± EP (n= 6-8) e letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (P < 0,05).

4.3.3 Biomarcadores

Parâmetros fisiológicos

Os peixes expostos ao tratamento GLI apresentaram valores de hematócrito significativamente menores (P<0,001) quando comparados ao respectivo CTR (Figura 9A), porém na presença de GT10 essa alteração não foi observada. No grupo G100, a goethita não reverteu o efeito do glifosato, uma vez que foram verificados valores de hematócrito significativamente menores (P= 0,04) nas condições experimentais que continham a goethita (GT100 e GLI+GT100), em relação ao respectivo CTR. O conteúdo de hemoglobina foi significativamente menor (P= 0,01) nos peixes dos tratamentos GT10 e GLI+GT10 em relação ao respectivo CTR (Figura 9B). No entanto, os peixes do grupo G100 não apresentaram alterações na hemoglobina. Quanto ao RBC o grupo GLI+GT100 apresentou valor significativamente menor (P= 0,02) quando comparado ao respectivo CTR (Figura 9C). Nos peixes do grupo G10 não foram evidenciadas variações entre os valores de RBC dos diferentes tratamentos.

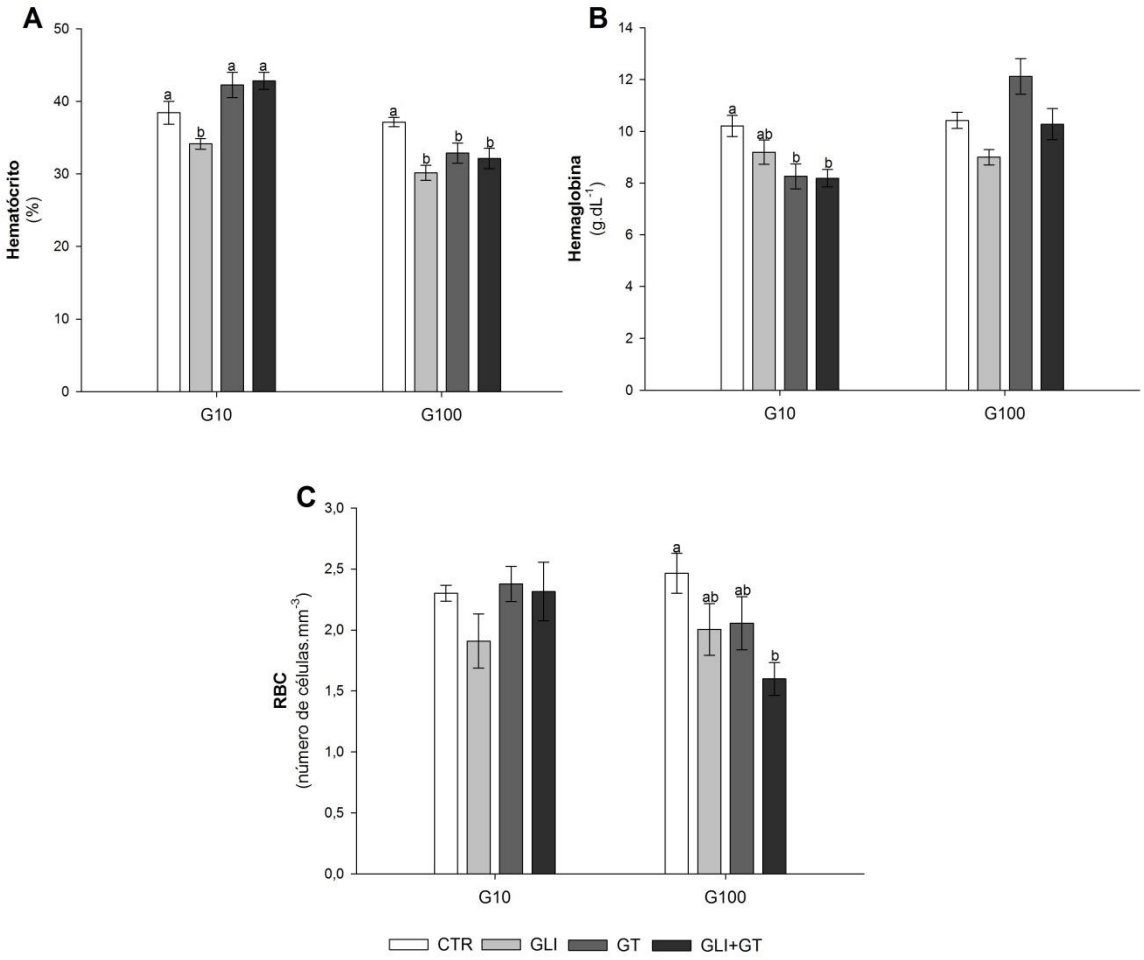

Figura 9: Parâmetros hematológicos (média ± EP, n= 6-8): hematócrito (A), conteúdo de hemoglobina (B) e número de eritrócitos por mm^3 de sangue (C) em *P. lineatus* expostos à água (CTR), a 3,6 $mg.L^{-1}$ de glifosato (GLI), a goethita (GT), e a mistura de ambos (GLI+GT) por 24 h. Nos grupos G10 e G100 foram utilizadas, respectivamente, as concentrações de 10 e 100 $mg.L^{-1}$ de goethita nos tratamentos GT e GLI+GT. Letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05) entre os tratamentos de um mesmo grupo (G10 e G100).

No grupo G10, a concentração de glicose plasmática (Figura 10A) foi significativamente maior (P= 0,015) no tratamento GLI+GT10 em relação ao respetivo CTR. Já os peixes do grupo G100 apresentaram menor concentração (P= 0,02) de glicose no tratamento GT100 quando comparado ao respectivo CTR. Além da glicemia, a concentração de lactato (Figura 10B) no plasma dos peixes do tratamento GLI+GT10 também foi significativamente maior (P= 0,029) em relação ao respectivo CTR. Nos tratamentos do grupo G100 não foram evidenciadas alterações na concentração de lactato em relação ao respectivo CTR.

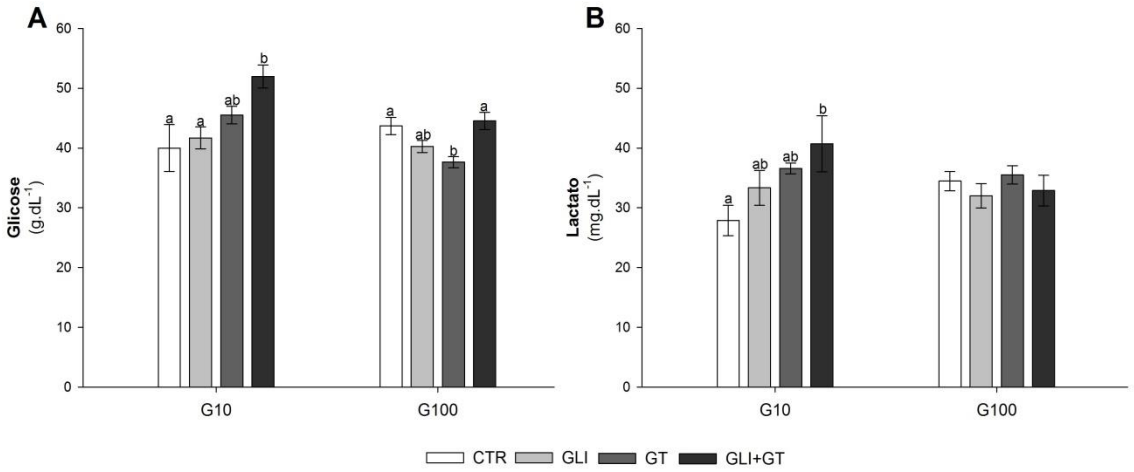

Figura 10: Concentrações plasmáticas (média ± EP, n= 6-8) de glicose (A) e lactato (B) em *P. lineatus* expostos à água (CTR), a 3,6 mg.L^{-1} de glifosato (GLI), a goethita (GT), e a mistura de ambos (GLI+GT) por 24 h. Nos grupos G10 e G100 foram utilizadas, respectivamente, as concentrações de 10 e 100 mg.L^{-1} de goethita nos tratamentos GT e GLI+GT. Letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05) entre os tratamentos de um mesmo grupo (G10 e G100).

Defesa antioxidante não enzimática: GSH

A GSH (Figura 11A) nos peixes do tratamento GLI foi significativamente maior do que a concentração do respectivo CTR e a goethita não reverteu o efeito do glifosato sobre a GSH, tanto para o G10 (P=0,015) quanto para o G100 (P= 0,017). Entretanto nas brânquias não foram verificadas alterações significativas no conteúdo de GSH dentre os tratamentos analisados (Figura 11B).

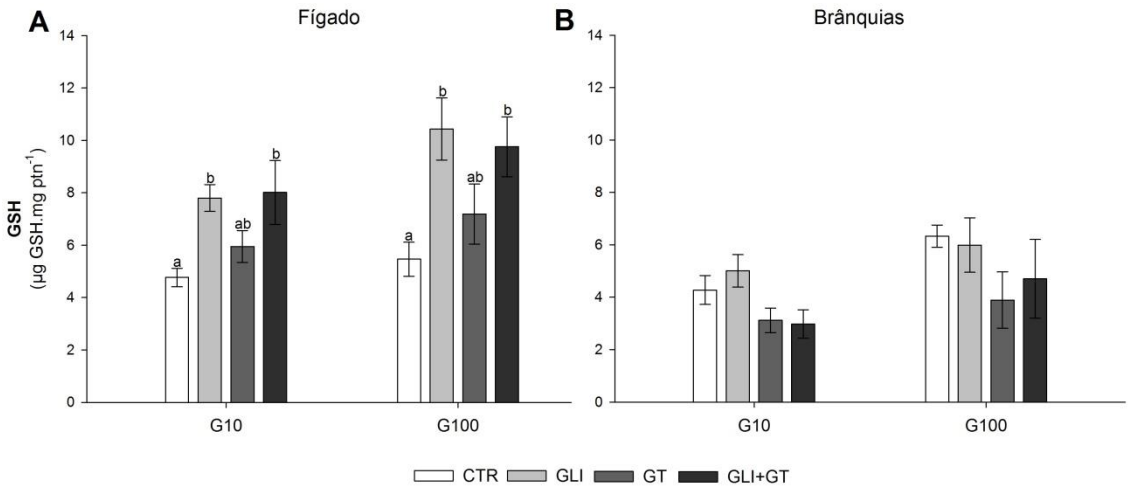

Figura 11: Conteúdo de GSH (média ± EP, n= 6-8) no fígado (A) e nas brânquias (B) de *P. lineatus* expostos à água (CTR), a 3,6 mg.L^{-1} de glifosato (GLI), a goethita (GT), e a mistura de ambos (GLI+GT) por 24 h. Nos grupos G10 e G100 foram utilizadas, respectivamente, as concentrações de 10 e 100 mg.L^{-1} de goethita nos tratamentos GT e GLI+GT. Letras diferentes indicam diferenças significativas (*P*<0,05) entre os tratamentos de um mesmo grupo (G10 e G100).

Peroxidação lipídica

No tratamento GLI foi observado aumento significativo no conteúdo de MDA no fígado dos peixes expostos aos grupos G10 (*P*= 0,006) e G100 (*P*< 0,001) em relação ao respectivo CTR (Figura 12A). O efeito protetor da goethita foi verificado após exposição ao tratamento GLI+GT10, entretanto na mistura de GLI+GT100 foram verificados valores de LPO significativamente maiores (*P*<0,001), quando comparados ao respectivo CTR (Figura 12B). Nas brânquias não foram constatadas variações significativas na ocorrência de LPO entre os tratamentos dos grupos analisados em relação aos respectivos CTR.

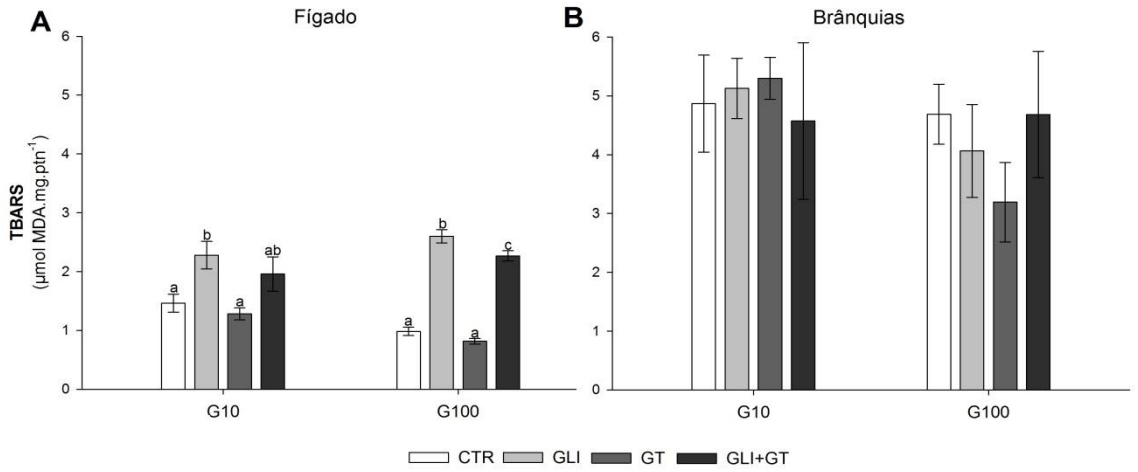

Figura 12: Conteúdo de MDA (média ± EP, n= 6-8) no fígado (A) e nas brânquias (B) de *P. lineatus* expostos à água (CTR), a 3,6 mg.L^{-1} de glifosato (GLI), a goethita (GT), e a mistura de ambos (GLI+GT) por 24 h. Nos grupos G10 e G100 foram utilizadas, respectivamente, as concentrações de 10 e 100 mg.L^{-1} de goethita nos tratamentos GT e GLI+GT. Letras diferentes indicam diferenças significativas (*P*<0,05) entre os tratamentos de um mesmo grupo (G10 e G100).

Carbonilação de proteínas

A concentração de proteínas carboniladas no fígado (Figura 13A) dos peixes do grupo G10 não apresentou alterações significativas quando comparada ao CTR. Por outro lado, os peixes do tratamento GT100 apresentaram uma concentração significativamente menor (*P*= 0,04) em relação ao respectivo CTR. Nas brânquias (Figura 13B) não foram evidenciadas variações significativas entre os tratamentos avaliados.

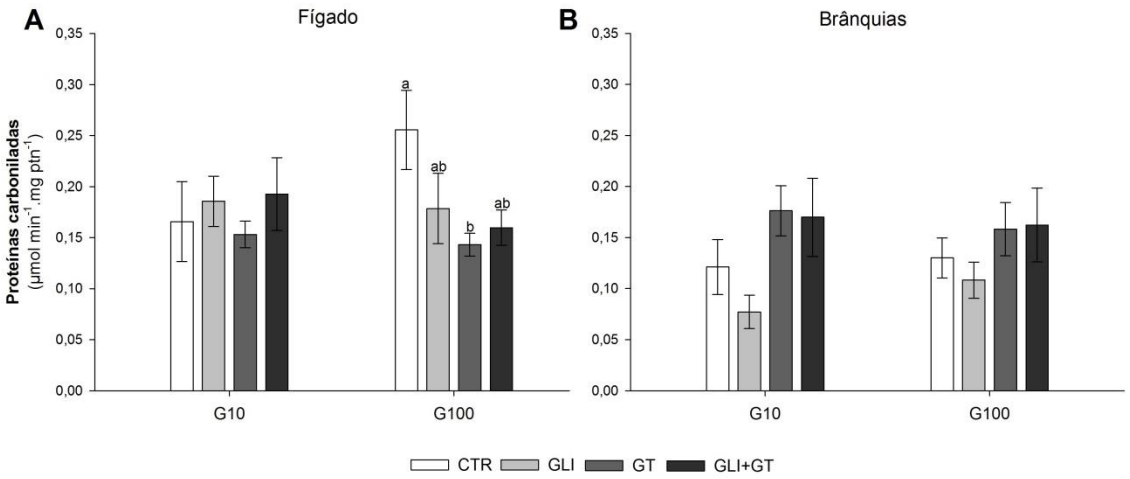

Figura 13: Concentração de proteínas carboniladas (média ± EP, n= 6-8) no fígado (A) e nas brânquias (B) de *P. lineatus* expostos à água (CTR), a 3,6 mg.L^{-1} de glifosato (GLI), a goethita (GT), e a mistura de ambos (GLI+GT) por 24 h. Nos grupos G10 e G100 foram utilizadas, respectivamente, as concentrações de 10 e 100 mg.L^{-1} de goethita nos tratamentos GT e GLI+GT. Letras diferentes indicam diferenças significativas (*P*<0,05) entre os tratamentos de um mesmo grupo (G10 e G100).

Acetilcolinesterase

A atividade da acetilcolinesterase no cérebro (Figura 14A) e no músculo (Figura 14B) dos peixes expostos aos diferentes tratamentos não apresentaram diferenças significativas nos grupos analisados em relação aos respectivos CTR.

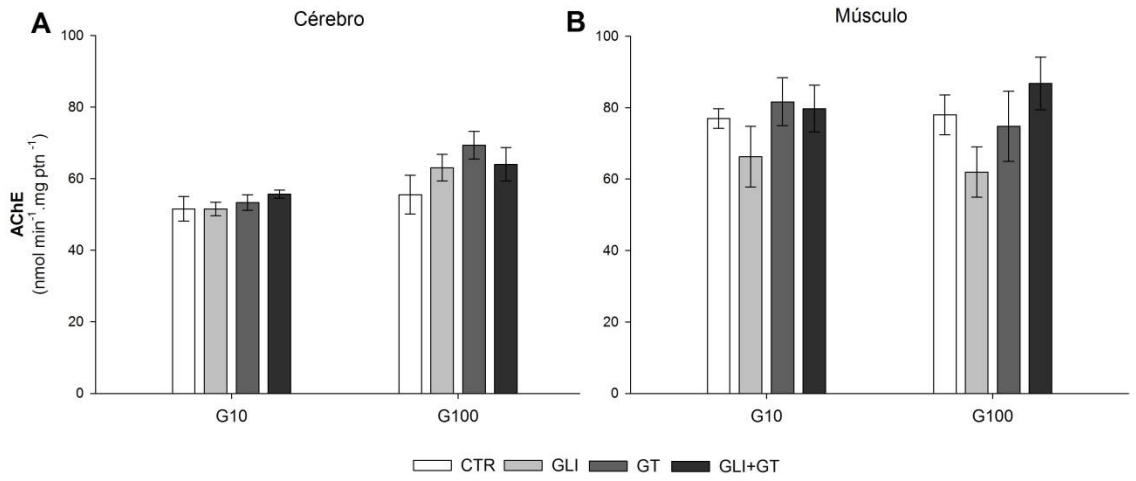

Figura 14: Atividade da acetilcolinesterase (média ± EP, n= 6-8) no cérebro (A) e no músculo (B) de *P. lineatus* expostos à água (CTR), a 3,6 mg.L^{-1} de glifosato (GLI), a goethita (GT), e a mistura de ambos (GLI+GT) por 24 h. Nos grupos G10 e G100 foram utilizadas, respectivamente, as concentrações de 10 e 100 mg.L^{-1} de goethita nos tratamentos GT e GLI+GT. Letras diferentes indicam diferenças significativas (*P*<0,05) entre os tratamentos de um mesmo grupo (G10 e G100).

Danos no DNA

Na Figura 15 estão representados os escores médios de danos no DNA dos eritrócitos dos peixes. No tratamento GLI foi verificado um escore de danos no DNA significativamente maior tanto no grupo G10 (*P*= 0,017), quanto no grupo G100 (*P*= 0,037), em relação aos respectivos CTR. Entretanto, na presença da goethita em ambas as concentrações, separadamente e em mistura com o herbicida, não foram observadas variações significativas em comparação aos respectivos CTR.

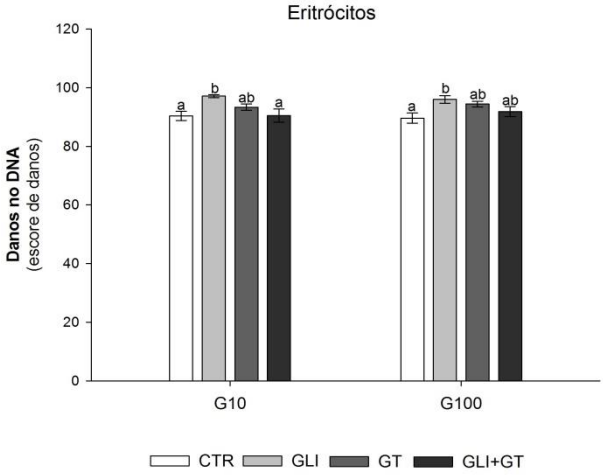

Figura 15: Escore de danos em eritrócitos (média ± EP, n= 6-8) de *P. lineatus* expostos à água (CTR), a 3,6 mg.L^{-1} de glifosato (GLI), a goethita (GT), e a mistura de ambos (GLI+GT) por 24 h. Nos grupos G10 e G100 foram utilizadas, respectivamente, as concentrações de 10 e 100 mg.L^{-1} de goethita nos tratamentos GT e GLI+GT. Letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05) entre os tratamentos de um mesmo grupo (G10 e G100).

Alterações histológicas

As brânquias dos peixes dos grupos CTR apresentaram a histologia normal deste órgão (Figura 16A). As alterações branquiais mais frequentemente encontradas nos animais CTR constituíram-se de hiperplasia na base das lamelas e desorganização de capilares. Os peixes expostos aos demais tratamentos apresentaram uma maior frequência de dilatação do canal marginal, hiperplasia na base e ao longo das lamelas (Figura 16B) e descolamento do epitélio lamelar (Figura 16C). Além disso, no tratamento GLI+GT100 foi evidenciado, frequentemente, a fusão completa de algumas lamelas (Figura 16D). Outras alterações encontradas estão descritas na Tabela 3.

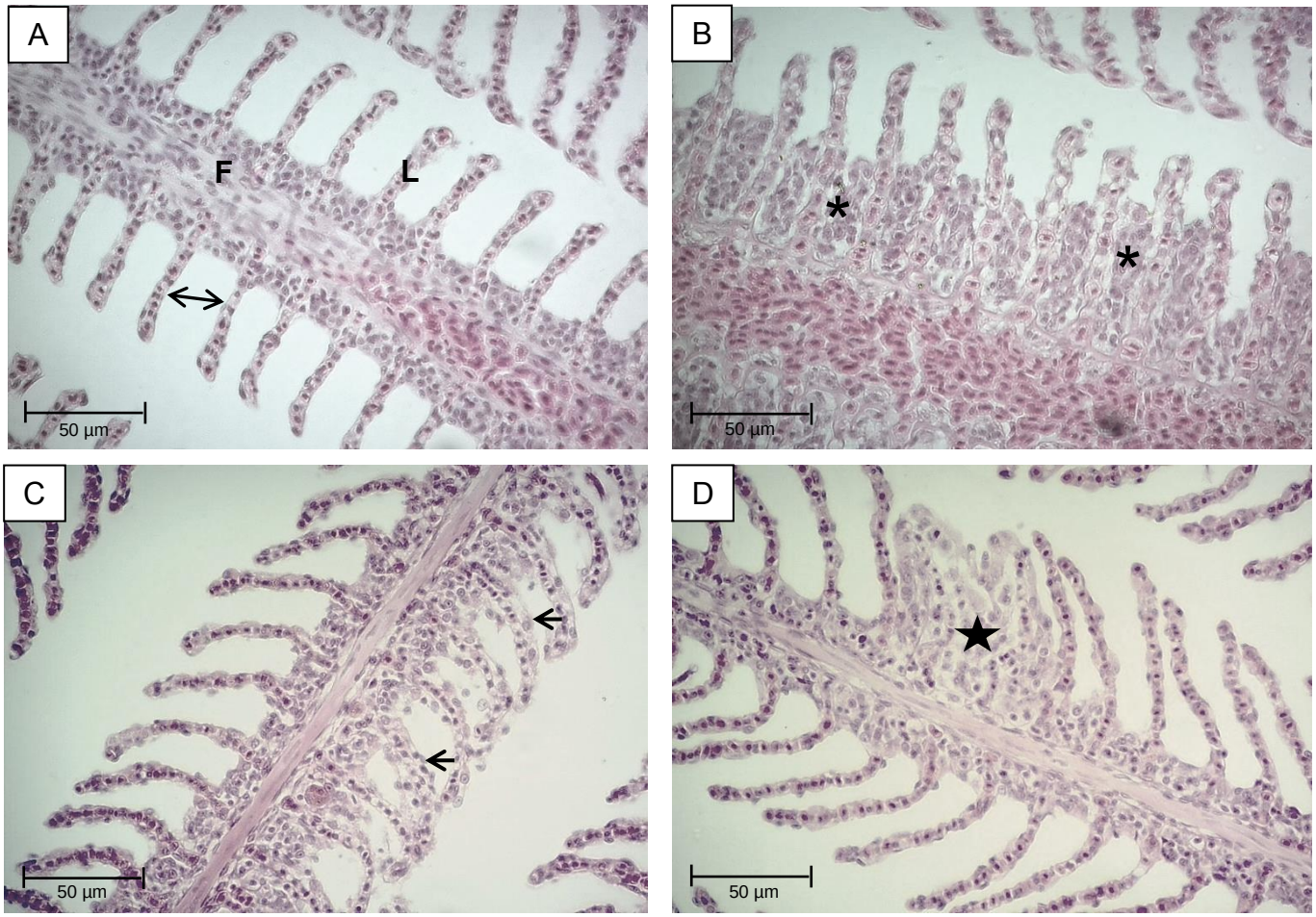

Figura 16: Fotomicrografias de brânquias de *P. lineatus* mostrando em A o aspecto normal dos filamentos (F) e das lamelas (L) e o espaço interlamelar preservado (seta dupla). Em B observa-se hiperplasia ao longo das lamelas (*); em C a elevação do epitélio lamelar (cabeça da seta preta) e em D a fusão total de algumas lamelas (estrela).

Tabela 3: Principais alterações histológicas encontradas nas brânquias de *P. lineatus* expostos aos tratamentos CTR, GLI, GT10, GLI+GT10, GT100 e GLI+GT100 por 24 h, e seus respectivos estágios de severidade.

Alterações histológicas branquiais	**Estágio**
Adelgaçamento do epitélio	I
Congestão vascular	I
Desorganização de capilares	I
Dilatação do canal marginal	I
Descolamento do epitélio da lamela	I
Fusão parcial da lamela	I
Fusão total da lamela	I
Hiperplasia na base da lamela	I
Hiperplasia ao longo da lamela	I
Hipertrofia de células epiteliais	I
Ruptura epitelial	II

A análise semi-quantitativa da ocorrência de alterações histológicas nas brânquias dos peixes não indicou diferenças significativas após exposição aos diferentes tratamentos (Figura 17). Entretanto, algumas alterações foram observadas com maior frequência nos tratamentos experimentais em comparação ao CTR. O tratamento GLI+GT100 apresentou um valor de IAH maior do que 10, sendo classificado como dano de leve a moderado.

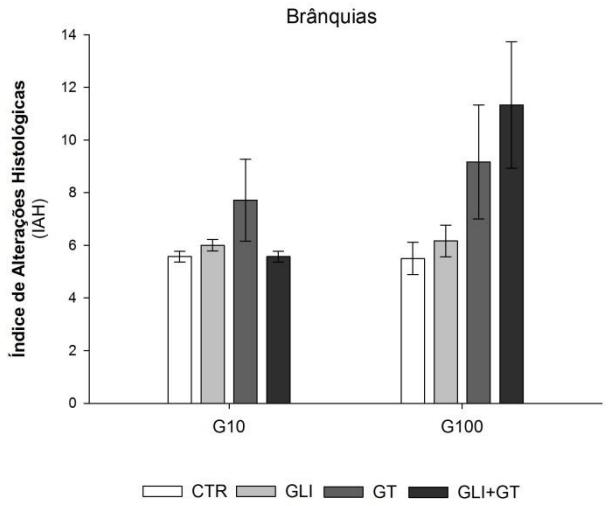

Figura 17: Índice de alterações histopatológicas (IAH) calculado (média ± EP, n=6) para as brânquias de *P. lineatus* expostos à água (CTR), a 3,6 mg.L^{-1} de glifosato (GLI), a goethita (GT), e a mistura de ambos (GLI+GT) por 24 h. Nos grupos G10 e G100 foram utilizadas, respectivamente, as concentrações de 10 e 100 mg.L^{-1} de goethita nos tratamentos GT e GLI+GT. Letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05) entre os tratamentos de um mesmo grupo (G10 e G100).

4.4 DISCUSSÃO

Este é um dos primeiros trabalhos que avalia os efeitos da goethita, bem como os efeitos resultantes da associação deste óxido de ferro ao herbicida glifosato em peixe. Os resultados mostraram que o glifosato promoveu alterações significativas no hematócrito e, apesar de ter induzir o aumento da defesa antioxidante não-enzimática (GSH), houve aumento da peroxidação lipídica no fígado bem como na ocorrência de danos no DNA dos eritrócitos. A maior concentração de goethita testada induziu variações em alguns biomarcadores fisiológicos (redução do hematócrito e glicemia) e bioquímicos

(redução da PCO no fígado), enquanto que a menor concentração promoveu apenas redução de hemoglobina. A mistura da maior concentração de goethita com o herbicida induziu alterações em parâmetros fisiológicos (redução do hematócrito e RBC) e bioquímicos (aumento de GSH e LPO no fígado), enquanto que a mistura com a concentração mais baixa de goethita resultou em variações em alguns biomarcadores fisiológicos (redução da hemoglobina, aumento de glicose e lactato) e promoveu aumento da GSH. Entretanto, a menor concentração de goethita utilizada reverteu alguns dos efeitos ocasionados pelo glifosato, evitando a diminuição do hematócrito, a ocorrência de danos oxidativos e de danos no DNA promovidos pelo herbicida. Assim, os resultados deste estudo demonstraram a toxicidade do glifosato para uma espécie nativa neotropical e a ação protetora da goethita sobre os efeitos do herbicida. Estudos como este são importantes, pois podem servir como referência para a possível aplicação da goethita na remediação de ambientes aquáticos contaminados por herbicidas à base de glifosato.

No ambiente, os óxidos de ferro tendem a formar agregados, assim como a maioria das nanopartículas, portanto, o estado de agregação precisa ser considerado na análise dos efeitos de óxidos de ferro em nanoescala (Cwiertny et al., 2009; Louie et al., 2014). A goethita é um óxido de ferro que apresenta uma coloração amarronzada intensa e quando foi adicionada à água dos tratamentos resultou em elevada turbidez, principalmente na maior concentração de goethita utilizada (100 $mg.L^{-1}$). Embora a turbidez tenha sido aproximadamente 10 vezes maior nos tratamentos que continham a maior concentração de goethita (GT100 e GLI+GT100) em relação àqueles com a concentração mais baixa deste óxido de ferro (GT10 e GLI+GT10), os valores de ferro dissolvido não apresentaram variações entre os tratamentos citados. Provavelmente as propriedades de agregação e sedimentação interferiram nos parâmetros analisados. Dependendo das condições do meio, o estado de agregação de nanopartículas pode variar significativamente, sendo que as próprias características da água, como pH e força iônica, podem levar a formação de agregados (Cheng et al., 2007; Liu et al., 2014). Além disso, o tamanho e a sedimentação das nanopartículas são influenciados pela circulação de água no entorno do nanomaterial (Nikinmaa, 2014). Assim, a agregação pode aumentar o tamanho das nanopartículas e,

consequentemente, afetar o transporte, sedimentação, reatividade, a captação por organismos e a toxicidade destes materiais (Liu et al., 2014; Louie et al., 2014).

Como a goethita é um óxido de ferro, foi realizada a quantificação deste metal nos tecidos dos peixes. O ferro é essencial para a vida da maioria dos organismos, pois é um componente importante de metaloproteínas e desempenha um papel crucial na transferência de elétrons e no transporte de oxigênio, além de estar envolvido na resposta imunológica (Aisen et al., 2001; Bury et al., 2012). No entanto, em excesso pode ser prejudicial, visto que pode resultar na formação de radicais de oxigênio que são tóxicos para a célula (Bury et al., 2003).

O fígado foi o tecido que apresentou a maior concentração de ferro, seguido do rim, sangue, brânquias, cérebro e músculo. Diversos trabalhos demonstraram que o ferro pode se acumular de forma distinta nos tecidos e pode variar de acordo com a espécie de peixe avaliada (Canli et al., 2003; Tuzen, 2009; Dhanakumar et al., 2015). Kojadinovic et al. (2007) detectaram maiores concentrações de ferro em fígado e rim, em relação ao músculo, nas diferentes espécies de peixes estudadas. O fígado é o principal órgão de armazenamento do ferro e elevada expressão da proteína ferritina foi evidenciada no fígado de peixes (Neves et al., 2009). Esta proteína apresenta uma importante função no metabolismo do ferro, uma vez que é responsável pelo armazenamento deste metal, mantendo-o em uma forma solúvel e não tóxica (Carriquiriborde et al., 2004; Neves et al., 2009). A presença de ferro no rim pode estar relacionada com a função fisiológica deste tecido que possui capacidade hematopoiética (Zapata et al., 1996; Salem et al., 2014). Como o ferro é um dos componentes da hemoglobina, a presença desta proteína no sangue é um fator importante no que se refere à concentração de ferro quantificada neste tecido.

Com relação aos demais tecidos, as brânquias podem apresentar concentrações relativamente altas de ferro, devido a sua importância na captação deste metal a partir da água (Bury et al., 2003). Quanto ao cérebro, não foram encontrados dados na literatura com peixes, porém estudos com vertebrados demonstraram relação entre o ferro e funcionamento do cérebro, sendo que este atua como cofator de enzimas envolvidas na atividade de

neurotransmissores (Bury et al., 2012). No tecido muscular foi encontrada a menor concentração de ferro em relação aos tecidos avaliados. Outros estudos investigaram a concentração de ferro em tecidos de peixes e registraram baixas concentrações deste metal no músculo em comparação aos tecidos hepático e branquial (El-Moselhy et al., 2014; Salem et al., 2014).

No cérebro, embora tenha sido detectada uma baixa concentração de ferro, foi o único tecido avaliado que apresentou aumento de ferro em relação ao CTR. Assim, foram evidenciados maiores valores deste metal nos tratamentos em que foi adicionada a goethita. No entanto, não houve variação significativa de ferro entre os tratamentos que continham diferentes concentrações de goethita. No geral, as concentrações de ferro avaliadas nos tecidos de *P. lineatus* do CTR e dos diferentes tratamentos experimentais não apresentaram alterações significativas. Estes resultados, provavelmente, refletiram a baixa concentração de ferro dissolvido encontrada na água, que não variou entre os tratamentos com concentrações distintas de goethita. Os resultados encontrados são importantes, pois na hipótese de se utilizar a goethita na remediação ambiental, é interessante que o ferro não se acumule nos tecidos dos organismos.

Parâmetros sanguíneos podem fornecer importantes informações quanto ao ambiente interno dos organismos e têm sido amplamente utilizados na detecção de alterações fisiológicas em peixes após a exposição a condições de estresse (Li et al., 2011; Yonar et al., 2014). Nesse sentido, estes parâmetros representam um instrumento útil na avaliação dos efeitos de agrotóxicos (Pimpão et al., 2007; Harabawy et al., 2014). Neste trabalho, após 24 h de exposição, foram verificados valores significativamente menores de hematócrito nos tratamentos GLI, GT100 e GLI+GT100 em relação ao CTR. Os valores de RBC, embora menores nos tratamentos GLI e GT100 foram significativamente diferentes apenas nos peixes expostos ao GLI+GT100 em comparação ao CTR. Portanto, a menor porcentagem de células sanguíneas provavelmente deve estar associada a diminuição no número de células e foram efeitos ocasionados pelo herbicida e pela maior concentração de goethita, sugerindo uma sobreposição de efeitos em mistura que pode ter induzido o aumento da destruição dos eritrócitos (Al-Asgah et al., 2015). Kwiatkowska et al. (2014a) registrou hemólise de eritrócitos expostos ao

glifosato e seus metabólitos por 24 h. Alterações em parâmetros hematológicos de diferentes espécies de peixes foram reportadas na literatura na presença de nanopartículas de ferro, as quais foram associadas a mudanças estruturais nas brânquias em decorrência do acúmulo das nanopartículas (Remya et al., 2014), e após exposição a agrotóxicos como o Roundup® (produto formulado a base de glifosato) (Glusczak et al., 2006).

Os peixes respondem aos contaminantes presentes na água através da alteração ou adaptação de suas funções metabólicas (Li et al., 2010). Níveis elevados de glicemia plasmática foram verificados nos peixes expostos ao tratamento GLI+GT10. O aumento da glicose é uma resposta comum em peixes expostos a condições de estresse (Langiano e Martinez, 2008), sendo esta uma estratégia para lidar com a demanda energética e fornecer energia para os tecidos (Langiano e Martinez, 2008; Nascimento et al., 2012). No mesmo tratamento experimental também foi atestado aumento dos níveis de lactato plasmático. A elevação de glicose e lactato são consideradas típicas respostas ao estresse e representam um mecanismo adaptativo que disponibiliza energia ao organismo para responder aos agentes estressores (Wendelaar Bonga, 1997). Alguns estudos sugerem que a elevação do lactato na presença de herbicidas pode ser uma resposta contra a depleção de energia (Glusczak et al., 2007; Navarro e Martinez, 2014).

A glutationa (GSH) é um tiol não proteico fundamental na defesa antioxidante, capaz de neutralizar espécies reativas de oxigênio (ERO) e prevenir o dano oxidativo (Sharbidre et al., 2011; Sinhorin et al., 2014). Desta maneira, a GSH constitui a primeira linha de defesa contra as ERO (Peña-Llopis et al., 2002; Van der Oost et al., 2003). Concentrações maiores de GSH hepática nos peixes expostos ao glifosato e a mistura deste com a goethita, podem ter sido induzidas pela presença do herbicida, uma vez que a exposição apenas a goethita não alterou o conteúdo de GSH. A concentração elevada de GSH pode representar um mecanismo adaptativo ao estresse oxidativo frente à exposição a herbicidas (Zhang et al., 2004, Modesto e Martinez, 2010b). Nesse sentido, a presença da goethita não interferiu na ação do glifosato que pode ter sido resultante do aumento da produção de ERO, visto que a GSH age diretamente sobre estes compostos.

No presente estudo não foram verificadas alterações significativas na LPO em fígado e brânquias dos peixes expostos aos tratamentos que continham somente a goethita. Logo, a goethita não causou modificações nos níveis de LPO após 24 h de exposição. Estudo realizado por Li et al. (2009) também mostrou que mesmo após exposição crônica a 0,5, 5 e 50 $\mu g.ml^{-1}$ de nanopartículas de ferro não foi evidenciado aumento de LPO em brânquias e fígados de peixes *Oryzias latipes*.

A LPO é uma das consequências do estresse oxidativo que pode ocorrer quando o equilíbrio entre a geração e a neutralização de espécies de ERO é interrompido, em razão da inativação ou insuficiência dos sistemas de defesa antioxidante (Livingstone, 2001; Yonar et al., 2014). Vários trabalhos já demonstraram que a toxicidade de herbicidas está relacionada à peroxidação lipídica (Sharbidre et al., 2011; Nwani et al., 2013; Sinhorin et al., 2014), corroborando o presente estudo que verificou indução de LPO após exposição dos peixes ao glifosato. Modesto e Martinez (2010b) detectaram alterações nos níveis de LPO de *P. lineatus* após 6 h de exposição a um herbicida a base de glifosato, porém decorrido 24 e 96 h não foram evidenciadas variações neste biomarcador. Essa diferença pode ter ocorrido, pois no estudo descrito foi utilizado o Roundup Transorb® que contém outros compostos em sua formulação, além do glifosato. Em decorrência da LPO pode haver perda integridade e fluidez da membrana e alterações no fluxo dos íons transmembrana (Valavanidis et al., 2006).

Decorrida a exposição à mistura de 10 $mg.L^{-1}$ de goethita com o glifosato, a peroxidação lipídica não foi observada. A hipótese para este resultado pode ser baseada na adsorção do glifosato à goethita tornando o herbicida menos disponível aos organismos. Na literatura, foi registrada a associação entre o glifosato e a goethita (Dideriksen e Stipp, 2003; Jonsson et al., 2008; Waiman et al., 2012) de forma que o grupo fosfato do glifosato se liga ao íon Fe^{+3} (Sheals et al., 2002). No ambiente, a goethita pode inativar o glifosato, visto que o herbicida adsorve fortemente compostos minerais presentes no solo (Veiga et al., 2001). Portanto, a ligação entre o glifosato e metais pode ser uma maneira de diminuir a disponibilidade deste composto no ambiente (Toni et al., 2006). Após exposição à mistura de 100 $mg.L^{-1}$ de goethita com o glifosato foi evidenciado aumento de LPO, que provavelmente

está relacionado ao herbicida, visto que a goethita não causou alterações neste parâmetro.

A presença de danos oxidativos também pode ser avaliada através da carbonilação de proteínas (PCO), que é considerada um biomarcador útil na exposição de peixes a contaminantes ambientais (Raisuddin e Parvez, 2005). As ERO podem modificar os grupos amino das proteínas e catalisar a formação de grupos carbonilas e, desta forma, alteram a conformação e diminuem a atividade catalítica das proteínas podendo resultar na quebra destes compostos (Almroth et al., 2008).

No presente estudo não foi verificado aumento de PCO, entretanto, valores mais baixos de PCO foram encontrados no fígado dos peixes expostos ao tratamento GT100. Segundo Almroth et al. (2005) tanto o aumento quanto a diminuição dos níveis de carbonilação proteica podem servir como biomarcadores, sendo que a redução da concentração de proteínas carboniladas pode indicar houve um aumento da degradação proteolítica em razão da oxidação moderada de proteínas. Portanto, danos às proteínas ocorreram no fígado dos peixes expostos ao GT100. Singh et al. (2010) sugerem que nanopartículas de ferro podem danificar as proteínas devido aos radicais hidroxila gerados pelo ferro. No entanto, não foram observados danos em proteínas na presença da mistura de 100 $mg.L^{-1}$ de goethita com o glifosato, demonstrando que a goethita pode ter adsorvido o herbicida e interferido em sua ação de maneira a evitar os danos.

A atividade da AChE tem sido largamente utilizada no monitoramento de ambientes aquáticos contaminados por agrotóxicos (Miron et al., 2005; Pundir e Chauran, 2012). A AChE catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) a colina e ácido acético e, desta forma, é responsável pelo término da transmissão do impulso nervoso (Cattaneo et al., 2011). Neste estudo, a AChE cerebral e muscular dos peixes expostos aos diferentes tratamentos não apresentou variações significativas. Estudo in vitro mostrou a ausência de alterações na atividade da AChE em eritrócitos após exposição ao glifosato, sugerindo uma inibição não competitiva pela enzima (Kwiatkowska et al., 2014b). Entretanto, diversos trabalhos têm associado o mecanismo de ação de diferentes agrotóxicos, a exemplo dos herbicidas a base de glifosato, com a diminuição da atividade da AChE em *P. lineatus* (Modesto e Martinez, 2010a;

2010b) e em outras espécies de peixes (Glusczak et al., 2006; Cattaneo et al., 2011). As respostas distintas quanto a atividade da AChE podem ter ocorrido em razão do tempo de exposição mais prolongado e, além disso, a redução da AChE pode estar relacionada a presença do surfactante que constitui os produtos formulados a base de glifosato.

Neste estudo, verificou-se que o glifosato é genotóxico para *P.lineatus*, uma vez que foram observados maiores escores de danos nos eritrócitos dos peixes expostos ao tratamento GLI. Efeitos do glifosato sobre o material genético de peixes foram relatados por diversos autores após a exposição às formulações comerciais deste herbicida (Cavalcante et al., 2008; Nwani et al., 2013; Marques et al., 2014). Recentemente, Moreno et al. (2014) reportou a indução de danos no DNA de eritrócitos de *P.lineatus* após 6 e 96 horas de exposição ao glifosato (0,48 e 2,4 $mg.L^{-1}$) A integridade do DNA pode ser afetada por ataque direto do agente genotóxico ou de seus metabólitos, bem como, de forma indireta por meio do excesso da geração de ERO que pode resultar em aumento de eventos que danificam o DNA ou em uma diminuição no reparo desta molécula (Çavas e Konen, 2007). Em relação aos tratamentos em que foi adicionada apenas a goethita, não foi evidenciada genotoxicidade. Este resultado é importante quando observados os dados referentes ao tratamento GLI+GT10, que similarmente aos resultados de hematócrito e LPO hepática, não ocasionaram danos no DNA, sugerindo que estes compostos impediram o efeito genotóxico do glifosato.

A histologia representa uma importante ferramenta na avaliação de alterações patológicas em peixes frente à contaminação, especialmente, em estudos de exposições subletais e crônicas (Cengiz e Unlu et al., 2006). As brânquias representam um dos principais órgãos–alvo na análise de qualidade da água, uma vez que sua superfície fica em contato direto e constante com a água, condição esta que favorece a absorção de agentes tóxicos presentes no meio (Palaniappan et al., 2009; Paulino et al., 2014). Shiorigi et al. (2012) investigaram os efeitos das concentrações de 3, 3,5, 4 e 4,5 $mg.L^{-1}$ de glifosato na morfologia branquial de peixes *Piaractus mesopotamicus* após 48 h de exposição. Os autores verificaram que a hipertrofia e a hiperplasia do epitélio lamelar foram as principais alterações ocasionadas pelo glifosato, porém foi observada uma baixa frequência de alterações histológicas.

No presente trabalho, as anomalias epiteliais mais comumente encontradas nas brânquias de *P. lineatus* expostos aos diferentes tratamentos experimentais foram constituídas de hiperplasia na base e ao longo das lamelas, resultando em alguns casos, em fusão lamelar. Estas alterações foram destacadas no levantamento realizado por Mallat et al. (1985) por serem frequentemente evidenciadas em teleósteos expostos a contaminantes. Alterações histológicas branquiais, tais como descolamento epitelial, hiperplasia epitelial e fusão de lamelas secundárias, estão entre os principais efeitos relatados após a exposição a diversos agentes tóxicos, a exemplo de agrotóxicos (Cengiz e Unlu et al., 2006; Ba-Omar et al., 2011) e nanopartículas metálicas, sendo que neste último caso as alterações foram resultantes do contato direto entre as nanopartículas e os tecidos avaliados (Govindasamy e Rahuman, 2012; Jayaseelan et al., 2014).

Neste estudo, embora a análise semi-quantitativa da ocorrência de alterações histológicas nas brânquias de *P. lineatus* não tenha indicado diferenças significativas entre os tratamentos após 24 h, o valor de IAH foi maior nos tratamentos GT100 e GLI+GT100 em relação ao CTR, sendo maior que 10 nesta última condição. Assim, os tratamentos em que foi adicionado 100 $mg.L^{-1}$ de goethita apresentaram os maiores valores de IAH, no entanto, estes valores ainda são considerados abaixo dos níveis prejudiciais ao funcionamento do órgão.

Diante dos resultados deste trabalho, pode-se inferir que a goethita promoveu aumento significativo da concentração de ferro no cérebro, porém nos demais tecidos não foi verificado este aumento. A exposição ao glifosato diminuiu o hematócrito, estimulou a síntese da defesa antioxidante não-enzimática dos organismos, e ocasionou aumento de danos oxidativos e danos no DNA. Os peixes expostos a concentração de 100 $mg.L^{-1}$ de goethita apresentaram variações em um maior número de biomarcadores em relação a menor concentração utilizada (10 $mg.L^{-1}$). Embora as exposições às misturas tenham promovido alterações em alguns dos parâmetros avaliados, a menor concentração de goethita evitou a ocorrência de alterações ocasionadas pelo glifosato, que incluíram a redução do hematócrito, peroxidação lipídica e os danos no DNA em *P. lineatus* decorrido 24 h. Visto que o glifosato é tóxico para a espécie de peixe neotropical e que a goethita apresenta a capacidade de

impedir danos em parâmetros biológicos ocasionados pelo herbicida, este estudo apresenta uma possível alternativa para a remediação ambiental de áreas contaminadas por herbicidas à base de glifosato.

4.5 AGRADECIMENTOS

À Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL) pelo fornecimento dos peixes. À Cristine E.A. Carneiro e Dimas A.M. Zaia pelo fornecimento da goethita. Ao Wagner E. Risso pelo auxílio nas análises de ferro. À Fundação Araucária e CNPq (PRONEX: 24732/2012), ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxicologia Aquática (INCT-TA, CNPq: 573949/2008-5) pelo apoio financeiro. À CAPES pela bolsa de mestrado concedida à A.T. Moraes e ao CNPq pela bolsa de pesquisador concedida à C.B.R. Martinez. Este trabalho faz parte da dissertação de mestrado de A.T. Moraes pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina.

4.6 REFERÊNCIAS

Aisen, P., Enns, C., Wessling-Resnick, M., 2001. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. Int. J. Biochem. Cell Biol. 33, 940–959.

Al-Asgah, N.A., Abdel-Warith, A.A., Younis, E.M., Allam, H.Y. 2015. Haematological and biochemical parameters and tissue accumulations of cadmium in *Oreochromis niloticus* exposed to various concentrations of cádmium chloride. Saudi J. Biol Sci, http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.01.002.

Almroth, B. C., Sturve, J., Berglund, A., Forlin, L. 2005. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. Aquat.Toxicol. 73, 171–180.

Almroth, B. C., Sturve, J., Stephensen, E., Holth, T. F., A., Forlin, L. 2008. Protein carbonyls and antioxidant defenses in corkwing wrasse (*Symphodus melops*) from a heavy metal polluted and a PAH polluted site. Mar. Environ. Res. 66, 271-277.

Alves costa, J.R.M., Mela, M., Silva de Assis, H.C., Pelletier, E., Randi, M.A.F., Oliveira ribeiro, C. A. 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury**.** Ecotoxicol. Environ. Saf. 67, 82-88.

Armas, E.D., Monteiro, R.T.R.; Antunes, P.M., Santos, M.A.P.F., Camargo, P.B. 2007. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do rio Corumbataí e principais afluentes. Quím. Nova 30, 1119-1127.

Annett, R., Habibi, H.R.; Hontela, A. 2014. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. J. Appl. Toxicol. 34, 458-479.

Anvisa, 2012. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+noticias+anos/2012+noticias/seminario+volta+a+discutir+mercado+de+agrotoxicos+em+2012. (acesso 10.03.15).

Ba-Omar, T.A., Al-Jardini, S., Victor, R. 2011. Effects of pesticide temephos on the gills of *Aphanius dispar* (Pisces: Cyprinodontidae). Tissue Cell 43, 29–38.

Barton, B.A. 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integr. Comp. Biol. 42, 517-525.

Beutler, E., Duron, O., Kelly, B.M. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. J. Lab. Clin. Med. 61, 882–888.

Bhaskara, B. L., Nagaraja, P. 2006. Direct sensitive spectrophotometric determination of glyphosate by using ninhydrin as a chromogenic reagent in formulations and environmental water samples. Helv. Chim. Acta 89, 2687-2693.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive assay of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Bury, N. R., Walker, P. A., Glover, C. N., 2003. Nutritive metal uptake in teleost fish. J. Exp. Biol. 206, 11-23.

Bury, N. R., Boyle, D., Cooper, C. A. 2012. Iron. In: Wood C.M., Farrell A.P., Brauner C.J., (Eds.), Homeostasis and toxicology of non- 3 essential metals, Fish Physiology series v. 31B. Academic Press, London, pp. 185–236.

Cajaraville, M.P., Bebianno, J.M., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A. 2000.The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. Sci. Total Environ. 247, 295-311.

Camejo, G., Wallin, B., Enojärvi, M. 1998. Analyses of oxidation and antioxidants using microtiter plates. In: Amstrong, D., (Ed.). Free radical and antioxidants protocols. Humana Press, New Jersey, pp. 377-387.

Canli, M., Atli G., 2003. The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. Environ. Pollut. 121, 129–136.

Carneiro, C.E.A., Ivashita, F.F., Junior, I.G.S., Souza, C.M.D., JR, A.P., Costa, A.C.S., Mauro, E., Santana, H., Zaia, C.T.B.V.; Zaia, D.A.M. 2013. Synthesis of goethite in solutions of artificial seawater and amino acids: a prebiotic chemistry study. Int. J. Astrobiology 12, 149-160.

Carneiro, R.T.A., Taketa, T.B., Gomes neto, R.J., Oliveira, J.L., Campos, E.V.R; De Moraes, M.A., Da Silva, C.M.G., Beppu, M.M., Fraceto, L.F. 2015. Removal of glyphosate herbicide from water using biopolymer membranes. J. Environ. Manage. 151, 353-360.

Carriquiriborde, P., Handy, R.D.; Davies, S.J. 2004. Physiological modulation of iron metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed low and high iron diets. J. Exp. Biol. 207, 74-86.

Cattaneo, R., Clasen, B., Loro, V. L., Menezes, C. C., Pretto, A., Baldisserotto, B., Santi, A., Avila, L. A. 2011. Toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposed to a commercial formulation containing glyphosate. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 87, 597–602.

Cavalcante, D.G.S.M., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H. 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. Mutat. Res. 655, 41–46.

Cazenave, J., Bacchetta, C., Parma, M. J., Scarabotti, P. A., Wunderlin, D. A. 2009. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). Environ. Pollut.157, 3025–3033.

Çavas, T., Könen, S. 2007. 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, 263–268.

Cengiz, E. I., Unlu, E. 2006. Sublethal effects of comercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: A microscopic study. Environ. Toxicol. Phar. 21, 246-253.

Chen, Y., Wu, F., Lin, Y., Deng, N., Bazhin, N., Glebov, E. 2007. Photodegradation of glyphosate in the ferrioxalate system. J. Hazard. Mater. 148, 360-365.

Cwiertny, D. M., Handler R. M., Schaefer, M. V., Grassian, V. H., Scherer, M. M. 2009. Interpreting nanoscale size-effects in aggregated Fe-oxide suspensions: Reaction of Fe(II) with Goethite. Geochim. Cosmochim. Acta 72, 1365 – 1380.

Dhanakumar, S., Solaraj, G., Mohanraj, R. 2015. Heavy metal partitioning in sediments and bioaccumulation in commercial fish species of three major reservoirs of river Cauvery delta region, India. Ecotoxicol. Environ. Saf. 113, 145–151.

Dideriksen, K., Stipp, S.L.S. 2003. The adsorption of glyphosate and phosphate to goethite: A molecular-scale atomic force microscopy study. Geochim. Cosmochim. Acta 67, 3313–3327.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88-95.

El-Moselhy, Kh. M., Othman, A.I., El-Azem, H. A., El-Metwally, M.E.A. 2014. Bioaccumulation of heavy metals in some tissues of fish in the Red Sea. EJBAS, http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbas.2014.06.001.

Fanta, E., Rios, F.S., Romão, S., Vianna, A.C.C., Freiberger, S. 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. Ecotoxicol. Environ. Saf. 54, 119-130.

Gholami-Seyedkolaei, S.J.; Mirvaghefi, A., Farahmand, H., Kosari, A. A. 2013. Effect of a glyphosate-based herbicide in *Cyprinus carpio*: Assessment of acetylcholinesterase activity, hematological responses and serum biochemical parameters. Ecotoxicol. Environ. Saf. 98, 135-141.

Glusczak, L., Miron, D.S., Crestani, M., Fonseca, M.B, Pedron, F.A., Duarte, M.F., Vieira, V.L. 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 65, 237– 241.

Glusczak, L., Miron, D.S., Moraes, B.S., Simões, R.R., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Loro, V.L. 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). Comp. Biochem. Physiol. C 146, 519–524.

Govindasamy, R., Rahuman, A.A. 2012. Histopathological studies and oxidative stress of synthesized silver nanoparticles in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). J. Environ. Sci. 24, 1091–1098.

Grieger, K.D., Fjordboge, A., Hartmann, N.B., Eriksson, E., Bjerg, P.L., Baun, A. 2010. Environmental benefits and risks of zero-valent iron nanoparticles (nZVI) for in situ remediation: Risk mitigation or trade-off? J. Contam. Hydrol.118,165-183.

Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A., Pacheco, M. 2012. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide- Elucidation of organ-specifity and the role of oxidative stress. Mutat. Res-Gen. Tox. En. 743, 1-9.

Harabawy, A.S.A., Ibrahim A. Th. A. 2014. Sublethal toxicity of carbofuran

pesticide on the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822): Hematological, biochemical and cytogenetic response. Ecotox. Environ. Safe. 103, 61–67.

Jayaseelan, C., Rahuman, A.A., Ramkumar, R., Perumal, P., Rajakumar, G., Kirthi, A.V., Santhoshkumar, T., Marimuthu, S. 2014. Effect of sub-acute exposure to nickel nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Ecotoxicol. Environ.Saf. 107, 220–228.

Jonsson, C.M., Persson, P., SJoberg, S., Loring, J.S. 2008. Adorption of glyphosate on goethite (α-FeOOH): surface complexation modeling combining spectroscopic and adsorption Data. Environ. Sci. Technol. 42, 2464-2469.

JU-NAM, Y., LEAD, J.R. 2008. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. Sci. Total Environ. 400, 396-414.

Kwiatkowska, M., Huras, B.,Bukowska, B. 2014a. The effect of metabolites and impurities of glyphosate on human erythrocytes (*in vitro*). Pest. Biochem. Physiol. 109, 34-43.

Kwiatkowska, M., Nowacka-Krukowska, H.,Bukowska, B. 2014b. The effect of glyphosate, its metabolites and impurities on erythrocyte acetylcholinesterase activity. Environ. Toxicol. Phar. 37, 1101-1108.

Kobayashi, H., Suguyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T. 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. MMS Comum 3, 103–115.

Kojadinovic, J., Potier, M., Corre, M. L., Cosson, R. P., Bustamante, P. 2007. Bioaccumulation of trace elements in pelagic fish from the Western Indian Ocean. Environ Pollut. 146, 548-566.

Koprucu, S.O., Koprocu, K., Ural, M.S., Ispir, U., Pala, M. 2006. Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis L.*). Pestic. Biochem. Phys. 86, 99–105.

Langiano, V.C., Martinez, C.B.R. 2008. Toxicity and effects of a glyphosate - based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 147, 222-231.

Lam, P.K.S. 2009. Use of biomarkers in environmental monitoring. Ocean Coast Manage. 52, 348-354.

Lee, R.F., Steinert, S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mutat. Res. Ver. Mutat. 544, 43-64.

Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.P., Shacter, E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. Method. Enzymol. 233, 346-357.

Li, H., Zhou, Q., Wu, Y., Fu, J., Wang, T., Jiang, G. 2009. Effects of waterborne nano-iron on medaka (*Oryzias latipes*): Antioxidant enzymatic activity, lipid peroxidation and histopathology. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72, 684-692.

Li, Zhi-Hua, Velisek, J., Zlabek, V., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J., Randak, T. 2010. Hepatic antioxidant status and hematological parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after chronic exposure to carbamazepine. Chem. Biol. Interact. 183, 98–104.

Li, Zhi-Hua, Velisek, J., Zlabek, V., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J., Randak. 2011. Use of hematological and plasma biochemical parameters to assess the chronic effects of a fungicide propiconazole on a freshwater teleost. Chemosphere 83, 572–578.

Liu, H., Chen, T., Frost, R.L. 2014. An overview of the role of goethite surfaces in the environment. Chemosphere. 103, 1-11.

Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Marine Pollut. Bull. 42, 656–666.

Louie, S. M., Ma, R., Lowry, G. V. 2014. Transformations of Nanomaterials in the Environment. In: Lead, J.R., Valsami-Jones, E., (Eds.), Frontiers of Nanoscience 7, 2-227.

Mallatt, J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42, 630-648.

Marques, A., Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M. A., Pacheco, M. 2014. Progression of DNA damage induced by a glyphosate-based herbicide in fish (*Anguilla anguilla*) upon exposure and post-exposure periods — Insights into the mechanisms of genotoxicity and DNA repair. Comp. Biochem. Physiol.C 166, 126-133.

Miron, D. S., Crestani, M., Shettinger, M. R., Morsch, V. M., Baldisserotto, B., Tierno, M. A., Moraes, G., Vieira V. L. P. 2005. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). Ecotoxicol. Environ. Saf. 61, 398-403.

Modesto, K. A., Martinez, C. B. R. 2010a. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. Chemosphere 78, 294 – 299.

Modesto, K.A., Martinez, C.B.R. 2010b. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. Chemosphere 81, 781–787.

Moore, M.N. 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? Environ. Int. 32, 967-976.

Moreno, N. C., Sofia S. H., Martinez, C. B.R. 2014. Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb® and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 37, 448-454.

Nascimento, C.R.; Souza, M.M.; Martinez, C.B. 2012. Copper and the herbicide atrazine impair the stress response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. Comp. Biochem. Physiol. C 155, 456-461.

Navarro, C. D.C., Martinez, C. B.R. 2014. Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genotoxic, biochemical and physiological parameters of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. Comp. Biochem. Physiol. C 165, 83-90.

Neves, J.V., Wilson, J.N., Rodrigues, P.N.S. 2009. Transferrin and ferritin response to bacterial infection: The role of the liver and brain in fish. Dev. Comp. Immunol. 33, 848-857.

Nikinmaa, M. 2014. An Introduction to Aquatic Toxicology. Academic Press, Elsevier, 240p.

Nwani, C. D., Nagpure, N S, Kumar, R., Kushwaha, B., Lakra, W. S. 2013. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. Environ. Toxicol. Pharmacol. http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2013.06.001.

Palaniappan P.L.R.M., Krishnakumar, N., Vadivelu M., 2009. Bioaccumulation of lead and the influence of chelating agents in *Catla catla* fingerlings. Environ. Chem. Lett. 7, 51-54.

Paulino, M.G., Benze, T.P., Sadauskas-Henrique, H., Sakuraguia, M.M., Fernandes, J.B., Fernandes, M.N. 2014. The impact of organochlorines and metals on wildfish living in a tropical hydroelectric reservoir: bioaccumulation and histopathological biomarkers. Sci. Total Environ. 497, 293–306.

Peña-Llopis, S., Ferrando, M.D., Peña, J.B. 2002. Impaired glutathione redox status in associated with decreased survival in two organophosphate - poisoned marine bivalves. Chemosphere 47, 485-497.

Pimpão, C.T., Zampronio, A.R., Silva de Assis, H.C. 2007. Efects of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei). Pest. Biochem. Physiol. 88, 122–127.

Poleksic, V., Mitrovic-Tutundžic, V. 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Müller, R.; Lloyd, R., (Eds.), Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Fishing News Books, Oxford, 30, 339-352.

Pundir, C. S., Chauhan, N. 2012. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. Anal. Biochem. 429, 19-31.

Raisuddin, S., Parvez, S. 2005. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). Environ. Toxicol. Pharmacol. 20, 112-117.

Ramsdorf, W. A.; Guimarães, F. S. F.; Ferraro, M. V. M.; Gabardo, J.; Trindade, E. S.; Cestari, M. M. 2009. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. Mutat. Res. 673, 78-81.

Remya, A. S., Ramesh, M., Saravanan, M., Poopal, R.K. Bharathi, S., Nataraj, D. Iron oxide nanoparticles to an Indian major carp, *Labeo rohita*: Impacts on hematology, iono regulation and gill Na^+/K^+ATPase activity. J. King Saud. Univ. Sci. http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2014.11.002.

Salbego, J., Pretto, A., Gioda, C.R., Menezes, C.C., Lazzari, R., Neto, J.R., Baldisserotto, B., Loro, V.L. 2010. Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). Arch. Environ.

Contam. Toxicol. 58, 740 – 745.

Salem, Z. B., Capelli, N., Laffray, X., Elisea, G., Ayadi, H., Aleya, L. 2014. Seasonal variation of heavy metals in water, sediment and roach tissues in a landfill draining system pond (Etueffont, France). Ecol. Eng. 69, 25-37.

Samanta, P, PAL, S., Mukherjee, A. K., Ghosh, A. R. Biochemical effects of glyphosate based herbicide, ExcelMera71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. Ecotoxicol. Environ. Saf.107, p.120-125. 2014.

Sánchez, A., Recillas, S., Font, X., Casals, E., González, E., Puntes,V. 2011. Ecotoxicology of, and remediation with, engineered inorganic nanoparticles in the environment. Trends Anal. Chem. 30, 507-516.

Santos, T.G., Martinez, C.B. 2012. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. Chemosphere 89, 1118-1125.

Savina, I.N., English, C.J., Whitby, R.L.D., Zheng, Y., Leistner, A., Mikhalovsky, S.V., Cundy, A.B. 2011. High efficiency removal of dissolved As(III) using iron nanoparticle-embedded macroporus polymer composites. J. Hazard. Mater. 192, 1002-1008.

Schwertmann, U., Cornell, R. M. 2000. Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization. Wiley-VCH, Germany, 188p.

Schwertmann, U., Cornell, R.M. 2003. The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, occurences and Uses. Wiley-VCH, Germany 659p.

Sharbidre, A. A., Metkari, V., Patode, Patode, P. 2011. Effect of methyl parathion and chlorpyrifos on certain biomarkers in various tissues of guppy fish, *Poecilia reticulate*. Pestic. Biochem. Physiol. 101, 132-141.

Shiogiri, N. S., Paulino, M. G., Carraschi, S. P., Baraldi, F. G., Cruz, C., Fernandes, M. N. 2012. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 34, 388-396.

Sheals, J., Joberg, S., Persson, P. 2002. Adsorption of Glyphosate on Goehite: Molecular Characterization of Surface Complexes. Environ. Sci. Technol. 36, 3090-3095.

Siang, H.Y., Yee, L.M., Seng, C.T. 2007. Acute toxicity of organochlorine insecticide endosulfan and its effect on behaviour and some hematological

parameters of Asian swamp eel (*Monopterus albus*, Zuiew). Pestic. Biochem. Phys. 89, 46–53.

Silva, M.D., Peralba, M.C.R., Mattos, M.L.M.T. 2003. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do arroio Passo do Pilão. Pesticidas: R. Ecotox. Meio Ambiente 13, 19-28.

Simonato, J.D., Guedes, C.L.B., Martinez, C.B.R. 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. Ecotoxicol. Environ. Saf. 69, 112-120.

Singh, N. P., Mccoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. A. 1988. Single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res. 175, 184–191.

Singh, N., Jenkins, G. J.S., Asadi, R., Doak, S. H. 2010. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). Nano Rev. http://dx.doi.org/10.3402/nano.v1i0.5358.

Sinhorin V. D. G., Sinhorin A. P., Teixeira, J. M. S., Miléski, K. M. L., Hansen, P. C., Moreira, P. S. A., Kawashita, N. H., Baviera, A. M., Loro, V. L. 2014. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp). Ecotoxicol. Environ. Saf. 106, 181-187.

Spadotto, C. A. Avaliação de riscos ambientais de agrotóxicos em condições brasileiras. 2006. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente (Embrapa Meio Ambiente. Documentos; 58), 20p.

Tang, T., Boënne, W., Desmet, N., Seuntjens, P., Bronders, J., Griensven, A. V. 2015. Quantification and characterization of ghyphosate use and loss in a residential área. Sci. Total Environ. 517, 207-214.

Toni, L.R., Santana, H., Zaia, D.A.M. 2006. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. Quim. Nova 29, 829-833.

Tuzen, M. 2009. Toxic and essential trace elemental contents in fish species from the Black Sea, Turkey. Food Chem. Toxicol. 47, 1785–1790.

Valavandis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, Scoullo, M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicol. Environ. Saf. 64, 178- 189.

Valbonesi, P., Sartor, G., Fabbri, E. 2003. Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic sea and their possible

use as sentinel organisms for biosurveillance programmes. Sci. Total Environ. 312, 79-88.

Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Phar. 13, 57–149.

Veiga, F.; Zapatta, J. M.; Marcos, F.; Alvarez, E. 2001. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. Sci. Total Environ. 271, 135-144.

Ventura, B.C., Angelis, D.F., Marin-Morales, M.A. 2008. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. Pest. Biochem. Physio. 90, 42-51.

Xing, H., Wang, J., Li J., Fan, Z., Wang, M., Xu, S. 2010. Effects of atrazine and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and carboxylesterase in brain and muscle of common carp. Environ. Toxicol. Pharmacol. 30, 26-30.

Zapata, G.A., Chiba, A., Varas, A. 1996. Cells and tissues of the immune system of fish. In: Iwanma, G., Nakanishi, T., (Eds.), The fish immune system: organism, pathogen, and environment. Academic Press, San Diego, pp.255-287.

Zhang, J., Shen, H., Wang, X., Wu, J., Xue, Y., 2004. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. Chemosphere 55, 167–174.

Waiman, C.V., Avena, M.J., Garrido, M., Band, B,F Zanini, G.P. 2012. A simple and rapid spectrophotometric method to quantify the herbicide glyphosate in aqueous media. Application to adsorption isotherms on soils and goethite. Geoderma 170, 154–158.

Wendelaar Bonga, S.E.1997. The stress response in fish. Physiol. Rev.77, 591-625.

Yonar, S. M., Ural, M. S., Silici, S., Yonar, M.E. 2014. Malathion-induced changes in the haematological profile, the immune response, and theoxidative/antioxidant status of *Cyprinus carpio*: Protective role of propolis. Ecotoxicol. Environ. Saf. 102, 202-209.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho indicaram que no sangue, brânquias, fígado, rim e músculo não foi identificado aumento de ferro. Estes dados são importantes, pois mostram que o uso da goethita na remediação ambiental em concentrações até 100 $mg.L^{-1}$ não deve resultar em uma elevação na concentração de ferro nos tecidos citados. Entretanto, a goethita promoveu aumento significativo da concentração de ferro no cérebro, porém ainda não são conhecidas as implicações do aumento deste metal em cérebro de peixes.

No quadro abaixo estão apresentados de forma resumida os resultados encontrados em biomarcadores fisiológicos, bioquímicos, genotóxicos e histológicos após exposição dos peixes aos tratamentos GLI, GT10, GLI+GT10, GT100 e GLI+GT100 em relação aos respectivos CTR.

Biomarcadores	GLI	GT10	GLI+GT10	GT100	GLI+GT100
Hematócrito	⇩	=	***	⇩	⇩
Hemoglobina	=	⇩	⇩	=	=
RBC	=	=	=	=	⇩
Glicose	=	=	⇧	⇩	=
Lactato	=	=	⇧	=	=
GSH fígado	⇧	=	⇧	=	⇧
GSH brânquias	=	=	=	=	=
LPO fígado	⇧	=	***	=	⇧
LPO brânquias	=	=	=	=	=
PCO fígado	=	=	=	⇩	=
PCO brânquias	=	=	=	=	=
AChE cérebro	=	=	=	=	=
AChE músculo	=	=	=	=	=
Danos do DNA	⇧	=	***	=	***
Histologia branquial	=	=	=	=	=

As setas indicam aumento (⇧) ou redução (⇩) significativa do biomarcador em relação ao controle. Os casos onde não foi constatada variação significativa estão indicados com o sinal =. Os asteriscos (***) representam os efeitos do glifosato que foram revertidos na presença da goethita.

No presente trabalho foi evidenciada a capacidade do glifosato em promover a diminuição do hematócrito e a ocorrência de danos oxidativos e genotóxicos, indicados pelo aumento de LPO no fígado e de danos no DNA nos eritrócitos dos peixes, após 24 h de exposição, apesar do aumento da GSH

hepática. A exposição a maior concentração de goethita promoveu alterações significativas em alguns biomarcadores fisiológicos (diminuição do hematócrito e glicemia) e em apenas um biomarcador bioquímico (diminuição da carbonilação proteica), enquanto que a menor concentração de goethita ocasionou redução do conteúdo de hemoglobina. Entretanto, a maioria dos efeitos causados pelo glifosato (redução do hematócrito e aumento de LPO e danos no DNA) foi revertida nos animais expostos ao herbicida na presença de 10 $mg.L^{-1}$ de goethita. Já a maior concentração de goethita (100 $mg.L^{-1}$) foi capaz de reverter apenas o efeito genotóxico do glifosato, mas a redução do hematócrito e o aumento de GSH e danos oxidativo no fígado permaneceram. Apesar de terem sido observadas variações nos biomarcadores bioquímicos, genotóxicos e fisiológicos nos peixes expostos tanto ao glifosato quanto à goethita, não foram verificadas alterações histológicas no tecido branquial que pudessem interferir no funcionamento normal deste órgão.

Dentre os biomarcadores analisados, apenas o hematócrito, GSH, LPO e a ocorrência de danos no DNA foram sensíveis aos efeitos promovidos pelo glifosato. Já para a exposição à goethita, os parâmetros fisiológicos, hematócrito, hemoglobina e glicemia e a medida de carbonilação proteica (PCO) foram os mais sensíveis. Para a avaliação dos efeitos da mistura, com exceção dos biomarcadores histológicos, todas as demais classes de biomarcadores avaliadas (bioquímicos, genotóxicos e fisiológicos) mostraram-se sensíveis, porém o hematócrito, a LPO e a ocorrência de danos no DNA merecem destaque, pois indicaram a função protetora da goethita em relação aos efeitos do herbicida. Estes resultados mostram que a exposição ao glifosato e a goethita, separadamente e em mistura, alteraram diferentes parâmetros, indicando a importância da análise integrada de múltiplos biomarcadores na avaliação dos efeitos.