

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – LICENCIATURA

Bruno Losi Menna

**EFEITO DO HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO SOBRE A MORFOLOGIA E
MORFOMETRIA DAS BRÂNQUIAS DO PEIXE ZEBRA *Danio rerio***

Florianópolis

2021

Bruno Losi Menna

**EFEITO DO HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO SOBRE A MORFOLOGIA E
MORFOMETRIA DAS BRÂNQUIAS DO PEIXE ZEBRA *Danio rerio***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa Catarina para a
obtenção do título de Licenciado em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Evelise Maria Nazari

Coorientadora: MSc. Carla Eliana Davico

Florianópolis

2021

Bruno Losi Menna

**EFEITO DO HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO SOBRE A MORFOLOGIA E
MORFOMETRIA DAS BRÂNQUIAS DO PEIXE ZEBRA *Danio rerio***

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Licenciado em Ciências Biológicas”, e aprovado em sua forma final pelo Curso em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 19 de maio de 2021.

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti

Banca Examinadora:

Prof.ª Dr.ª Evelise Maria Nazari

Orientadora

Universidade Federal de Santa Catarina

MSc. Carla Eliana Davico

Coorientadora

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.ª Dr.ª Viviane Glaser

Universidade Federal de Santa Catarina

MSc. Maico Roberto Luckmann Rodrigues Da Silva

Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, dedico meus agradecimentos à Universidade Federal de Santa Catarina, que possibilitou a minha formação. Agradeço imensamente a minha orientadora Prof^a. Dra. Evelise Maria Nazari, a minha coorientadora Carla Davico, e a Pós-doc. Aline Guimarães Pereira por todo o auxílio e contribuição durante o desenvolvimento do trabalho. Também agradeço ao LAMEB, aos meus colegas de laboratório, amigos, família e a todos que de alguma maneira contribuíram para este trabalho e a minha jornada durante a graduação, e me ajudaram ao longo deste período.

Muito obrigado a todos!

RESUMO

O Brasil é o país que mais utiliza agrotóxicos em litro por habitante, sendo o glifosato o herbicida mais utilizado no mundo. Seu modo de ação ocorre pela inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase, encontrada em plantas e alguns microrganismos. Embora essa enzima não seja encontrada em animais, estudos vêm mostrando efeitos tóxicos do glifosato e herbicidas a base de glifosato (HBG) nesses organismos, como peixes, abelhas, anfíbios, entre outros. Devido a grande quantidade de aplicações por conta de sua baixa persistência e sua meia vida em água variando entre 45-60 dias, sua presença em ambientes aquáticos próximo ao seu local de aplicação é constante. Tal presença ocorre principalmente na ocorrência de períodos de grande quantidade de chuva, que podem causar escoamento superficial ou lixiviação, tornando a exposição a organismos aquáticos não-alvos inevitável. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar o efeito do HBG Scout[®] sobre as brânquias do peixe zebra *Danio rerio*, focando na organização micromorfológica e dimensões das lamelas. Exemplares adultos do peixe zebra foram expostos *in vivo* as concentrações de 0,065 e 1 mg/L de glifosato contido no HBG Scout[®] por 7 dias. Foi feita a avaliação das alterações morfológicas utilizando microscopia de luz, assim como a análise morfométrica das lamelas primárias e secundárias por meio do software ImageJ[®]. Após a exposição ao HBG, foi observado um aumento na quantidade de hiperplasia/hipertrofia e fusão lamelar de uma maneira concentração dependente. Um aumento na largura das lamelas secundárias e uma diminuição da distância entre elas foi observado nos peixes expostos a 0,065 e 1 mg/L. No tratado de 1 mg/L foi também observado um aumento na largura da lamela primária, uma diminuição do comprimento das lamelas secundárias e a diminuição da área da superfície branquial. Porém, mais estudos são necessários para se obter uma estimativa do dano real causado pelo HBG Scout[®] nas brânquias do *D. rerio*. Esses resultados sugerem que a exposição de 0,065 e 1 mg/L de HBG por 7 dias pode causar alterações na organização micromorfológica, induzindo um aumento e aparecimento de alterações histológicas, assim como alterações nas dimensões das lamelas.

Palavras-chave: Agrotóxico; Toxicidade; *Zebrafish*; Scout[®].

ABSTRACT

Brazil is the country that most uses pesticides per liter per inhabitant, with glyphosate being the most widely used herbicide in the world. Its mode of action occurs by inhibiting the enzyme 5-enolpyruvylchiquimate-3-phosphate synthase, found in plants and some microorganisms. Although this enzyme is not found in animals, studies have been showing toxic effects of glyphosate and glyphosate-based herbicides (GBH) on these organisms, such as fish, bees, amphibians, among others. Due to the large number of applications because of its low persistence and its half-life in water varying between 45-60 days, its presence in aquatic environments near to its application site is constant. This presence occurs mainly in periods of rain, which can cause runoff or leaching, making the inevitable exposure to non-target aquatic organisms. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of GBH Scout® on the gills of the zebrafish *Danio rerio*, focusing on the micromorphological organization and dimensions of the lamellae. Adult specimens of zebrafish were exposed *in vivo* to 0.065 and 1 mg/L of glyphosate from the GBH Scout® for 7 days. The morphological changes were evaluated using light microscopy, as well as the morphometric analysis of the primary and secondary lamellae using the ImageJ® software. After exposure to GBH, an increase in the amount of hyperplasia/hypertrophy and lamellar fusion was observed in a concentration-dependent manner. An increase in the width of the secondary lamellae and a decrease in the distance between them was observed in those treated with 0.065 and 1 mg/L. Fish exposed to 1 mg/L also had an increase in the width of the primary lamella, a decrease in the length of the secondary lamellae and a decrease in the area of the branchial surface. However, further studies are needed to obtain an estimate of the actual damage caused by GBH Scout® in the gills of *D. rerio*. These results suggest that exposure to 0.065 and 1 mg/L of GBH for 7 days can cause changes in the micromorphological organization, inducing an increase and appearance of histological changes, as well as changes in the dimensions of the lamellae.

Keywords: Pesticide; Toxicity; Zebrafish; Scout®.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural do glifosato (ácido N-fosfometil glicina).....	3
Figura 2 - Esquema da aplicação e transporte de glifosato.	4
Figura 3 – Organização da brânquia do <i>Danio rerio</i>	7
Figura 4 - Desenho experimental da exposição do <i>Danio rerio</i> ao HBG Scout®.	9
Figura 5 - Secções histológicas das brânquias do <i>Danio rerio</i> : local onde as medidas foram realizadas.	11
Figura 6 - Alterações morfológicas das brânquias do <i>Danio rerio</i> expostas ao HBG Scout® por 7 dias.....	14
Figura 7 - Morfometrias das lamelas secundárias em exemplares adultos de <i>Danio rerio</i> expostos ao HBG Scout® por 7 dias.	16
Figura 8 - Morfometrias na lamela primária em exemplares adultos de <i>Danio rerio</i> expostos ao HBG Scout® por 7 dias	17
Figura 9 - Resumo gráfico dos efeitos do HBG Scout® nas brânquias do peixe zebra <i>Danio rerio</i>	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência de ocorrência das alterações morfológicas nas brânquias do peixe zebra <i>Danio rerio</i> após exposição ao HBG por 7 dias.....	12
Tabela 2 - Frequência de ocorrência de lamelas maiores, iguais e menores à média do comprimento das lamelas secundárias do grupo controle nas brânquias do peixe zebra <i>Danio rerio</i>	13
Tabela 3 - Parâmetros morfométricos da brânquia do <i>Danio rerio</i> e índice PAGE de exposição ao HBG por 7 dias.	18

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Cronologia do uso de agrotóxicos	2
---	---

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	Ácido aminometilfosfônico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CLS	Comprimento médio da lamela secundária
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DLS	Distância entre as lamelas secundárias
HBG	Herbicida a base de glifosato
HE	Hematoxilina-eosina
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LLP	Largura da lamela primária
LLS	Largura da lamela secundária
LSC	Largura do suporte cartilaginoso
LRDA	Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAGE	Proporção das lamelas secundárias disponíveis para troca gasosa
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	8
2.1. Objetivo geral	8
2.2. Objetivos específicos	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1. Modelo animal	8
3.2. Desenho experimental	8
3.3. Análise morfológica	9
3.4. Análises morfométricas	10
3.5. Análise estatística	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4.1. Efeito do HBG Scout [®] sobre a morfologia das brânquias	12
4.2. Efeito do HBG Scout [®] sobre a morfometria das brânquias	15
5. CONCLUSÕES	19
6. REFERÊNCIAS	20

1 INTRODUÇÃO

Agrotóxicos são definidos como substâncias químicas, agentes biológicos, antimicrobianos ou desinfetantes que visam prevenir, destruir ou controlar pragas em áreas agrícolas (SULUKAN *et al.*, 2017), urbanas e campos esportivos. Inseticidas, fungicidas, herbicidas, nematicidas e rodenticidas são exemplos comuns (NICOLOPOULOU-STAMATI *et al.*, 2016, TUDI *et al.*, 2021), que podem ser classificados pela natureza do seu alvo (herbicidas, fungicidas, etc), seu grupo químico (inorgânicos, organoclorados, organofosforados) e pelo seu efeito na saúde ambiental e humana (extremamente tóxico, altamente tóxico, medianamente tóxico e pouco tóxico) (PERES *et al.*, 2003).

A utilização de agrotóxicos foi de grande auxílio no desenvolvimento da agricultura, permitindo um aumento no rendimento e qualidade da comida e diminuindo a perda de produtos (AKTAR *et al.*, 2009; FENIK *et al.*, 2011; STRASSEMAYER *et al.*, 2017). Devido à grande necessidade de um melhoramento da produção de alimentos, o desenvolvimento de agrotóxicos passou por um aumento durante a Segunda Guerra Mundial. Nos anos seguintes, houve o incremento da produção de alimentos, sem uma real preocupação dos potenciais danos causados ao ambiente e a saúde humana por conta da utilização de agrotóxicos (BERNARDES *et al.*, 2015).

O uso de agrotóxicos no Brasil ocorre desde aproximadamente a década de 1940 (FIRPO *et al.*, 2012) (Quadro 1). A sua utilização em massa nos Estados Unidos durante a Revolução Verde influenciou o aumento do uso no Brasil na década de 1960 (LOPES e ALBUQUERQUE, 2018). Devido à sua extensa área de plantio, somado com o contínuo avanço na agricultura e tecnologia, o Brasil é considerado desde 2008 o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, considerando a média de consumo de agrotóxicos em litros por habitante (CARNEIRO *et al.*, 2015; PIGNATI *et al.*, 2017; LOPES e ALBUQUERQUE, 2018). Por ser o segundo país que mais exporta produtos agropecuários, acaba-se por utilizar uma grande quantidade de sementes transgênicas e agrotóxicos (PIGNATI *et al.*, 2017).

Quadro 1. Cronologia do uso de agrotóxicos, desde o aumento de seu desenvolvimento até a sua nova classificação no Brasil.

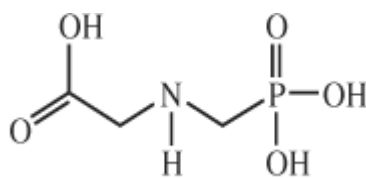
Ano	Evento
1939	Aumento no desenvolvimento de agrotóxicos devido a Segunda Guerra Mundial (BERNARDES <i>et al.</i> , 2015)
1940	Início do uso de agrotóxico no Brasil (FIRPO <i>et al.</i> , 2012)
1950	Revolução Verde e início da utilização em massa nos Estados Unidos (LOPES e ALBUQUERQUE, 2018)
1960	Aumento do uso de agrotóxicos no Brasil por consequência da Revolução Verde dos EUA (LOPES e ALBUQUERQUE, 2018) e isenção de impostos (FIRPO <i>et al.</i> , 2012)
1974	Introdução do glifosato no mercado mundial (DE ARAUJO <i>et al.</i> , 2016)
1990	Introdução da soja resistente ao glifosato (DE ARAUJO <i>et al.</i> , 2016)
1994	Brasil atinge o quarto lugar no mercado mundial de agrotóxicos (FIRPO <i>et al.</i> , 2012)
1998	Brasil atinge o terceiro lugar no mercado mundial de agrotóxicos (FIRPO <i>et al.</i> , 2012)
2003	Brasil já ocupa o segundo lugar no mercado mundial de agrotóxicos (FIRPO <i>et al.</i> , 2012)
2004	Glifosato é classificado como improvável de apresentar perigo agudo em uso normal (WHO, 2004)
2008	Brasil ultrapassa os Estados Unidos e se torna o maior mercado mundial de agrotóxicos (CARNEIRO <i>et al.</i> , 2015)
2009	Glifosato é classificado como pouco tóxico (WHO, 2010)
2015	Agência Internacional de Pesquisa Sobre o Câncer classifica o glifosato como “provavelmente carcinogênico para humanos” (IARC, 2015)
2016	Glifosato é classificado com “genotoxicidade pouco provável, e não representa risco carcinogênico para os seres humanos” (WHO, 2016)
2019	Nova classificação publicada pela ANVISA levando em consideração os efeitos toxicológicos em humanos (NUNES <i>et al.</i> , 2021)
2019	Glifosato é reclassificado pela ANVISA como “produto improvável de causar dano agudo” (ANVISA, 2019)

Os agrotóxicos são pulverizados sobre as lavouras utilizando-se tratores e aviões, atingindo não apenas seu alvo de ação (ervas daninhas, fungos e insetos), mas também o solo, águas superficiais, o ar e os alimentos (PIGNATI *et al.*, 2017), pondo em risco a fauna e a flora, e seu uso exacerbado está associado com uma piora na saúde populacional (IBGE, 2015; PIGNATI *et al.*, 2017), conforme a revisão proposta por SABARWAL *et al.* (2018).

Dentre os agrotóxicos, o glifosato (Figura 1) é um herbicida utilizado globalmente no controle de uma grande quantidade de ervas daninhas (DILL, 2005; MESNAGE *et al.*, 2015),

encontrando-se presente em mais de 750 produtos (GUYTON *et al.*, 2015). A partir de 1990, com a introdução da soja geneticamente modificada resistente ao glifosato, este agrotóxico se tornou o mais utilizado no Brasil (DE ARAUJO *et al.*, 2016). Hoje, sua utilização representa aproximadamente 65% dos herbicidas utilizados (ROMANO *et al.*, 2021). Sua aplicação pode ser feita tanto com o glifosato puro (geralmente em locais urbanos) como utilizado como princípio ativo de produtos formulados, como Roundup[®], Rodeo[®] e Scout[®]. Não há um consenso em relação aos seus efeitos tóxicos em organismos não-alvo, sendo considerada uma questão controversa. Alguns trabalhos observam variadas alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas em organismos não-alvo (WARDLE e PARKINSON, 1992; PAGANELLI *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2018), enquanto outros o consideram seguro, tendo um mínimo de toxicidade (WILLIAMS *et al.*, 2000; SOLOMON *et al.*, 2003; KIER e KIRKLAND, 2013).

Figura 1. Fórmula estrutural do glifosato (ácido N-fosfometil glicina).



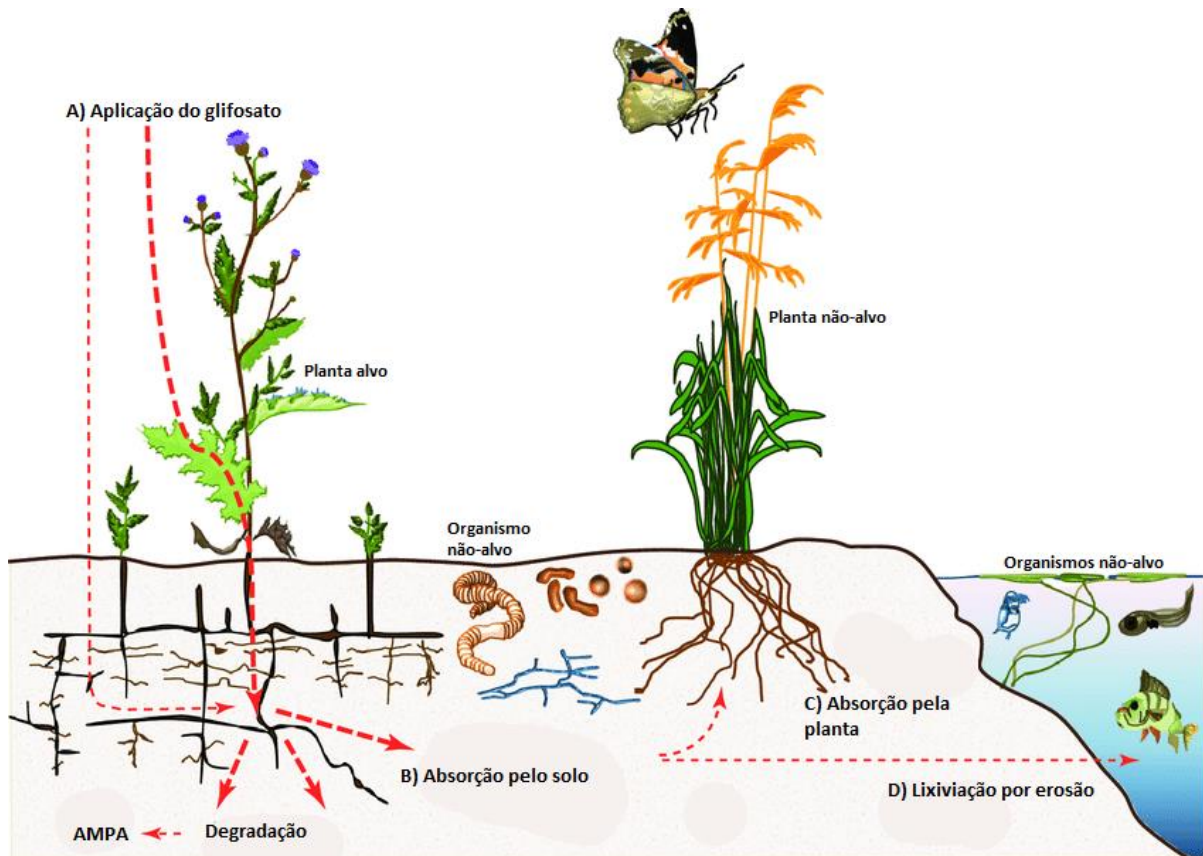
Fonte: ANVISA, 2016.

Herbicidas a base de glifosato (HBG) são compostos que possuem em sua formulação a molécula de glifosato, além de outros ingredientes inertes (surfactantes, penetrantes, adjuvantes), os quais são adicionados para intensificar os efeitos do herbicida e aumentar sua eficiência. Alguns desses químicos melhoram a aderência do glifosato à superfície das folhas, enquanto outros podem facilitar a sua entrada na planta (LIU, 2004; VANDENBERG *et al.*, 2017). Devido a toxicidade dos surfactantes presentes na formulação, HBG tem se demonstrado mais tóxicos do que o glifosato puro (TSUI e CHU, 2003; HOWE *et al.*, 2004; BENACHOUR e SÉRALINI, 2009). Infelizmente, poucas informações são encontradas sobre os ingredientes inertes nos rótulos dos produtos, ocasionando um baixo acesso a informações sobre a composição de HBG (MESNAGE *et al.*, 2019).

A ação do glifosato como herbicida ocorre principalmente a partir do contato e entrada pelas folhas (WILLIAMS *et al.*, 2000) (Figura 2). O método de ação do glifosato consiste na inibição do crescimento de plantas pela inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase, necessária para a biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano (WILLIAMS *et al.*, 2000). Esses aminoácidos são necessários na formação de

proteínas e vários metabólitos. Fenilalanina, por exemplo, é um intermediário comum na formação dos mais de 8000 compostos fenólicos das plantas (QIAN *et al.*, 2019). Esses aminoácidos também servem como precursores de pigmentos, hormônios e componentes da parede celular (MAEDA e DUDAREVA, 2012).

Figura 2. Esquema da aplicação e transporte de glifosato.



As flechas vermelhas indicam o seu transporte. A) Durante sua aplicação, o glifosato pode acabar caindo diretamente no solo. Em contato com as folhas, ele é absorvido e transportado por toda planta. B) Na raiz, o glifosato pode passar diretamente para o solo, onde pode: ser consumido e afetar animais presentes no solo, ser degradado por microrganismos, ou mineralizar, sendo o ácido aminometilfosfônico (AMPA) o principal metabólito. C) O glifosato presente no solo pode ser absorvido pelas raízes e afetar plantas não-alvo próximas da aplicação. D) A erosão e lixiviação pode transportar o glifosato para ambientes aquáticos. Adaptado de: HELANDER *et al.* (2012).

Embora a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase seja encontrada apenas em plantas e alguns microrganismos, estudos com concentrações documentadas no solo, que geralmente varia entre 1,4 e 7,6 mg/L (HERBERT *et al.*, 2014), têm demonstrado efeitos nocivos do glifosato e HBG em organismos não-alvo. Organismos não-alvo são todas as espécies direta e/ou indiretamente expostas ao herbicida, seja por se alimentar da planta afetada

pelo agrotóxico, ou por ingestão e/ou exposição no ambiente. Há uma grande diversidade de organismos que são utilizados no estudo de efeitos do glifosato e HBG com concentrações encontradas no ambiente, dentre os quais destacamos as aves, abelhas, anfíbios e peixes.

Em embriões de galinha, HBG afetou a organização dos rombômeros, levou a redução das vesículas ópticas e microcefalia (PAGANELLI *et al.*, 2010). MOTTA *et al.* (2018) mostraram que abelhas expostas ao glifosato tiveram uma diminuição de sua microbiota, reduzindo o seu efeito protetor contra patógenos oportunistas. A presença de glifosato foi inclusive confirmada em amostras de mel. RUBIO *et al.* (2014) encontraram glifosato em 45,5% das amostras que se classificavam como orgânicas, e 70% das amostras de países que permitem a utilização de organismos geneticamente modificados resistentes ao glifosato, contra 21% das amostras de países que não o permitem.

Em anfíbios, girinos de *Rana pipens* expostos a HBG apresentaram anormalidades na gônada e danos na cauda (HOWE *et al.*, 2004). Já embriões de *Xenopus laevis* apresentaram alterações no desenvolvimento cefálico e da crista neural e encurtamento do eixo anteroposterior, o que culminou em deformidades craniais em estágios mais avançados do desenvolvimento (PAGANELLI *et al.*, 2010).

Em peixes, HUED *et al.* (2012) demonstraram que exposição de *Jenynsia multidentata* a HBG induziu diversas alterações histológicas nas brânquias, como hiperplasia e descolamento epitelial, e degeneração hidrópica no fígado. NEŠKOVIĆ *et al.*, (1996) observaram que as brânquias de *Cyprinus carpio* também expostas a glifosato apresentaram hiperplasia e edema. Muitos trabalhos apontam que HBG são mais tóxicos aos organismos aquáticos que o glifosato puro por causa dos surfactantes presentes na formulação (FOLMAR *et al.*, 1979, MITCHELL *et al.*, 1987, MANN e BIDWELL, 1999, GIESY *et al.*, 2000).

No solo, sua meia-vida pode variar de 1,7 a 142 dias, devido a fatores como mineralização, sua degradação por bactérias e por seu transporte ser bastante variado em águas superficiais, o que depende das propriedades físicas e químicas do solo, como por exemplo a concentração de fosfato e quantidade de argila (ANNETT *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2017). Embora possa ser degradado por microrganismos, estudos de campo demonstraram que o glifosato pode ser tóxico para várias bactérias (BUSSE *et al.*, 2001) e fungos (WARDLE e PARKINSON, 1992). Sua principal forma de degradação é a mineralização, produzindo ácido aminometilfosfônico (AMPA), glicina e sarcosina (BAI e OGBOURNE, 2016).

Devido a sua baixa mobilidade no solo, o glifosato tem baixa capacidade de contaminar lençóis freáticos (WHO, 2005), porém a grande quantidade de aplicações por conta de sua baixa

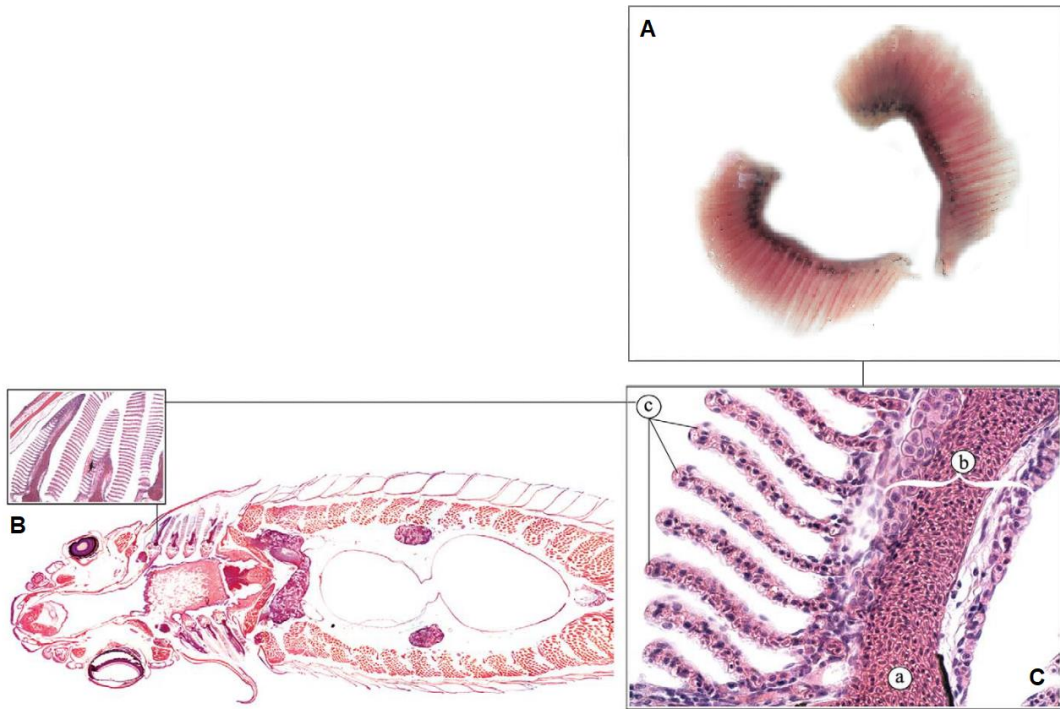
persistência, somado com sua meia vida em água (geralmente de 45-60 dias), torna-o constantemente presente em ambientes aquáticos próximo ao seu local de aplicação (BRIDI *et al.*, 2017). Tal presença ocorre principalmente na ocorrência de períodos de grande quantidade de chuva, que podem causar escoamento superficial ou lixiviação, tornando a exposição a organismos aquáticos não-alvos inevitável (WHO, 2005; BRIDI *et al.*, 2017).

O peixe zebra (*Danio rerio*) é um peixe tropical que vem sendo bastante utilizado como modelo de estudos em toxicologia. As principais justificativas para seu uso decorrem de: (i) sua biologia ser amplamente descrita (ii) pequeno tamanho, o que minimiza a quantidade de reagentes utilizado em experimentos e o espaço ocupado em laboratório; (iii) alta taxa de fecundidade e embrião transparente; (iv) facilidade na administração de drogas, as quais são depositadas na água e então absorvidas pela pele e brânquias; e (v) um já otimizado modo de criação (HILL *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2017).

Em peixes, os principais órgãos afetados por agentes tóxicos são as brânquias, os rins e o fígado (TAVARES CARVALHO, 2016). As brânquias são sensíveis a agentes tóxicos devido a sua extensa superfície que se encontra sempre em contato direto com a água, sendo uns dos primeiros órgãos a reagir a mudanças desfavoráveis no ambiente (PEREIRA NAVARRO LINS *et al.*, 2017).

As brânquias do peixe zebra são compostas de filamentos branquiais onde estão inseridas duas fileiras de lamelas secundárias (Figura 3) (PEREIRA NAVARRO LINS *et al.*, 2017). As lamelas são revestidas por uma camada de epitélio, sustentadas por células pilares e bem vascularizadas. Além de trocas gasosas, possui um importante papel no balanço ácido-base, osmorregulação e excreção (MENKE *et al.*, 2011).

Figura 3. Organização das brânquias do *Danio rerio*.



(A) Brânquias do peixe zebra observadas em estereomicroscópio. (B) Secção histológica de exemplar de peixe zebra destacando a organização das brânquias. (C) Organização das brânquias, sendo (a) artéria lamelar, (b) lamela primária e (c) lamela secundária. Fonte: Adaptado de MENKE *et al.* (2011).

Considerando o contínuo aumento do uso do glifosato no Brasil, sua presença constante em ambientes aquáticos próximos ao seu local de aplicação, a sua capacidade de afetar organismos não-alvos, assim como a possível diferença nos efeitos dos HBG devido a presença de diferentes surfactantes, e os poucos estudos relatando os efeitos do HBG Scout[®] nas brânquias de peixes, foi proposto a realização do presente estudo. Assim, este estudo tem como hipótese que o HBG Scout[®] causa alterações morfométricas e morfológicas nas brânquias do *Danio rerio*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar o efeito de diferentes concentrações de HBG Scout® sobre a organização tecidual e celular das lamelas primárias e secundárias das brânquias, utilizando exemplares adultos de *D. rerio* como modelo experimental.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar o efeito do HBG Scout® sobre a organização micromorfológica e morfométrica das lamelas das brânquias do *D. rerio*;
- Analisar o potencial do HBG Scout® em induzir alterações morfológicas nas brânquias do *D. rerio*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados peixes machos e fêmeas adultos da espécie *Danio rerio* obtidos em estabelecimento comercial de animais aquáticos, os quais foram trazidos em embalagem adequada para o Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA) no Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

No laboratório, tanto a aclimação como a exposição ocorreram em aquários de 20 L sob aeração constante, sendo colocado 2 peixes/L, em água corrente declorada de pH 7 (± 0.2) por 7 dias, em temperatura controlada de 27,5°C ($\pm 0,5$) e fotoperíodo claro/escuro natural. Os peixes foram alimentados uma vez por dia com ração comercial para peixes.

3.2 EXPOSIÇÃO

Neste estudo foi utilizado a formulação comercial Scout® (Monsanto do Brasil LTDA., contendo 720 g de glifosato/Kg) o qual foi diluído a partir de uma solução estoque em água declorada.

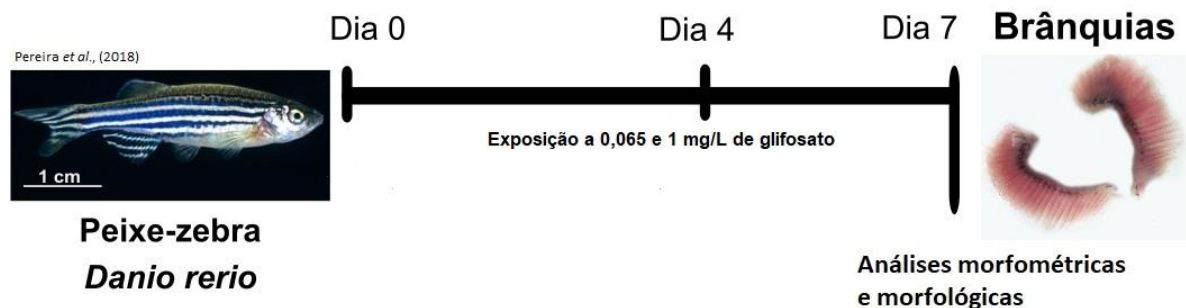
Os peixes adultos foram aleatoriamente divididos em três grupos:

- Grupo 1: peixes não expostos ao HBG, mantidos no aquário por 7 dias, sendo assim o grupo controle.
- Grupo 2: peixes expostos a concentração de 0,065 mg/L de glifosato contido no herbicida Scout® por 7 dias.

- Grupo 3: peixes expostos a concentração de 1 mg/L de glifosato contido no herbicida Scout® por 7 dias.

A concentração do HBG no aquário foi renovada quatro dias após o início do experimento, baseado em GHOLAMI-SEYEDKOLAEI et al. (2013). A concentração de 0,065 mg/L é a concentração máxima do glifosato estabelecida para corpos de água de classe 1 e 2 pela resolução nº 357 do CONAMA (2005). A concentração de 1 mg/L foi referenciada em outros estudos de toxicidade onde se utilizou glifosato e/ou HBG em peixes (MODESTO e MARTINEZ, 2010; UREN WEBSTER *et al.*, 2014; SULUKAN *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2018). O desenho experimental se encontra resumido na Figura 4. Os peixes (n = 3/grupo) foram submetidos à eutanásia de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013). Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA-UFSC), protocolo número 5466040416/2016.

Figura 4. Desenho experimental da exposição do *Danio rerio* ao HBG Scout®.



Dia 0 marca o início da exposição, Dia 4 a renovação da concentração de glifosato no aquário, e Dia 7 a remoção das brânquias e subsequente análises.

3.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS BRÂNQUIAS

Para a análise em microscopia de luz, as brânquias foram fixadas em solução de glutaraldeído 1,5% + paraformaldeído 1,5% por 24 h. Após essa etapa, foram feitos banhos em etanol 70% a cada 24 h para a remoção do fixador, e então as peças foram armazenadas em etanol 70% à temperatura ambiente. Posteriormente, foi feita a desidratação em série alcoólica crescente a 70% por 30 min, 80% por 30 min, 90% por 30 min, 100% por 50 min e 100% novamente por 50 min. A diafanização foi feita sob agitação, primeiramente substituindo 50%

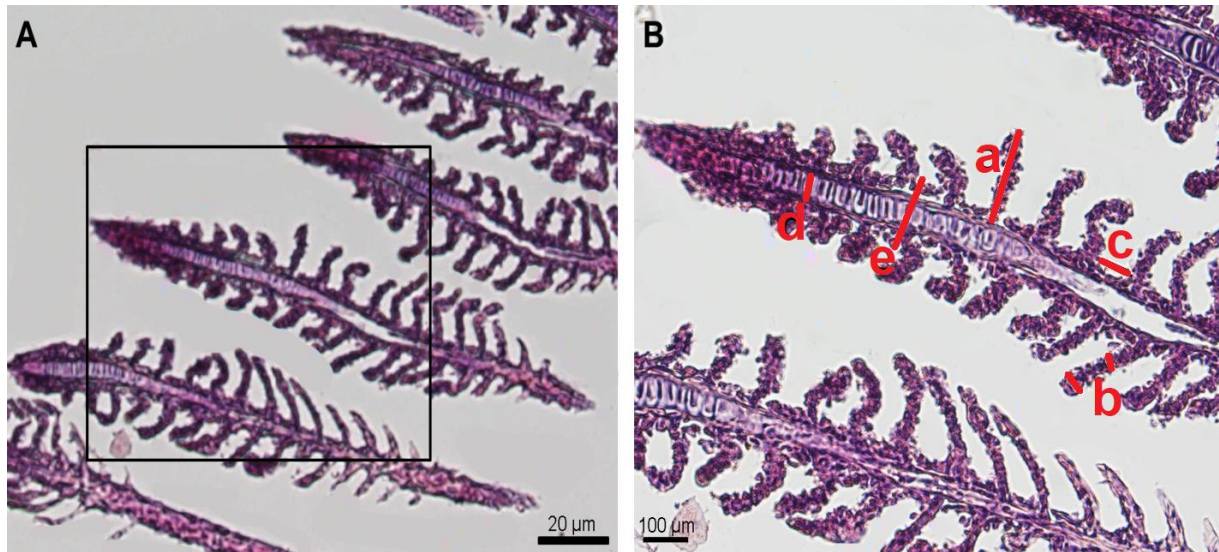
do etanol 100% por 50% de xilol por 5 min, seguindo com xilol por 10 min, e novamente xilol por 5 min. Após, ocorreram 3 banhos de parafina com 1 h cada, sendo que o último banho foi utilizado para a formação do bloco de parafina. Depois de incluído em parafina, foram seccionados a 6 μm em micrótomo rotativo. Para análise morfológica das brânquias foi realizada coloração com hematoxilina-eosina (HE). Para isso, os cortes foram desparafinizados em xilol, sendo dois banhos de 10 min, e hidratados em série alcoólica decrescente 100% duas vezes por 10 min cada, 90% por 5 min, 80% por 5 min e 70% por 5 min. Após, os cortes foram lavados em água corrente e corados com Hematoxilina de Harris por 10 seg, lavados com água corrente por 10 min, corados com eosina aquosa por 25 seg e então colocados em água destilada por 10 min. Na sequência os cortes foram desidratados em série alcoólica crescente 70% por 5 min, 80% por 5 min, 90% por 5 min, 100% por 10 min e 100% novamente por 10 min, e então diafanizados em xilol, sendo dois banhos de 5 min, para montagem das lâminas com Entellan. Os cortes corados foram então fotografados no Microscópio Invertido Olympus IX83 em aumento de 10 x e 40 x no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB).

Foram analisadas 10 brânquias/3peixes/grupo. Foi avaliada a presença de alterações morfológicas gerais nas brânquias, considerando o surgimento de: hiperplasia/hipertrofia da lamela secundária, fusão das lamelas secundárias, encurtamento da lamela secundária e Hiperplasia/hipertrofia dos condrócitos (modificado de MONTEIRO et al., 2008). A porcentagem da ocorrência de cada alteração nas brânquias foi feita pela divisão do número de brânquias com tal alteração pelo total de brânquias analisadas.

3.4 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS

A análise morfométrica das brânquias foi realizada de acordo com HUED *et al.* (2012), com algumas modificações. Foram realizadas as medidas do comprimento e largura da lamela secundária, distância entre as lamelas secundárias e largura da lamela primária, que são as principais dimensões da brânquia influenciando a distância de trocas gasosas em peixes (HUGHES e PERRY, 1976). Além disso, foi medido a largura do suporte cartilaginoso (Figura 5). Para isso, as fotos obtidas no microscópio invertido Olympus IX83 em aumento de 40 x foram utilizadas, e as medidas (μm) foram obtidas utilizando-se o software ImageJ (RASBAND, 1997).

Figura 5. Secções histológicas das brânquias do *Danio rerio*.



(A) Secções histológicas das brânquias do *Danio rerio*, indicando o local do aumento. (B) Local onde as medidas foram realizadas nas brânquias, sendo (a) comprimento das lamelas secundárias (CLS); (b) Largura das lamelas secundárias (LLS); (c) Distância basal entre as lamelas secundárias (DLS); (d) Largura do suporte cartilaginoso (LSC); (e) Largura da lamela primária (LLP). Fonte: O autor (2021).

Foram obtidas as medidas da largura da lamela primária (LLP), secundária (LLS), largura do suporte cartilaginoso (LSC) e comprimento médio da lamela secundária (CLS) em três locais diferentes (na parte basal, medial e distal), obtendo-se o valor médio para cada medida de lamela. Para as lamelas primárias e suporte cartilaginoso foi utilizado $n = 3$ peixes; 8 lamelas/peixe e para a LLS $n = 3$ peixes; 29 lamelas/peixe. A distância entre as lamelas secundárias (DLS) também foi medida da mesma forma ($n = 3$ peixes; 27 espaços entre lamelas/peixe). Para o CLS foi utilizado $n = 3$ peixes; 22 lamelas/peixe. A proporção das lamelas secundárias disponíveis para troca gasosa (PAGE) foi calculada em média para cada filamento de um indivíduo e calculada da seguinte forma: $\text{PAGE} = 100 * (\text{média CLS} / [\text{média LLP} + \text{média CLS}])$ (HUED *et al.*, 2012). O índice PAGE representa o tamanho da área da brânquia disponível para a realização de trocas gasosas. Também foi calculada a média do comprimento das lamelas secundárias do grupo controle ($n = 3$ peixes; 21 lamelas/peixe), e a partir desse comprimento médio foi realizada a quantificação das lamelas de cada grupo, diferenciando em maiores, iguais e menores que essa média do controle.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Previamente, foi testada a normalidade e homocedastidade dos dados para a comparação das médias obtidas por ANOVA de uma via, seguida pelo Teste de Tukey. As diferenças significativas entre os grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EFEITO DO HBG SCOUT® SOBRE A MORFOLOGIA DAS BRÂNQUIAS

Indivíduos do grupo tratado tanto com 0,065 quanto 1 mg/L de glifosato apresentaram hiperplasia/hipertrofia das lamelas secundárias, fusão de lamelas secundárias e hiperplasia/hipertrofia dos condrócitos (Figura 6). Hiperplasia/hipertrofia das lamelas secundárias e fusão de lamelas secundárias também foram observadas no grupo controle, porém em menor frequência que nos grupos tratados. A hiperplasia/hipertrofia dos condrócitos não foi observada no grupo controle. A frequência da ocorrência das alterações morfológicas pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1. Frequência de ocorrência das alterações morfológicas nas brânquias do peixe zebra *Danio rerio* no controle, e nos grupos tratados com 0,065 e 1 mg/L de HBG Scout® por 7 dias.

Alterações morfológicas	Controle	0,065 mg/L	1 mg/L
Hiperplasia/hipertrofia das lamelas secundárias	3/30 (10%)	5/28 (17,85%)	14/28 (50%)
Hiperplasia/hipertrofia dos condrócitos	0%	2/28 (7,14%)	3/28 (10,71%)
Fusão de lamelas secundárias	3/30 (10%)	4/28 (14,28%)	5/28 (17,85%)
Encurtamento das lamelas secundárias	42.86%	52.38%	76.19%

A porcentagem da ocorrência de cada alteração nas brânquias foi feita pela divisão do número de brânquias com tal alteração pelo total de brânquias analisadas. Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

No grupo controle, o número de lamelas secundárias menores que o comprimento médio das lamelas secundárias foi de 42,86% (Tabela 2). Indivíduos expostos a concentração de 0,065 mg/L apresentaram 52,38% das lamelas secundárias menores que o grupo controle, e os expostos a 1 mg/L, 76,19%. O número de lamelas secundárias maiores que o comprimento médio das lamelas secundárias foi de 57,14%, 47,62% e 23,81% nos grupos controle, tratado com 0,065 mg/L e tratado com 1 mg/L de glifosato, respectivamente. Não houve lamelas secundárias com o mesmo tamanho da que a média.

Tabela 2. Frequência de ocorrência de lamelas maiores, iguais e menores à média do comprimento das lamelas secundárias do grupo controle nas brânquias do peixe zebra *Danio rerio* no controle, e nos grupos tratados com 0,065 e 1 mg/L de HBG Scout® por 7 dias.

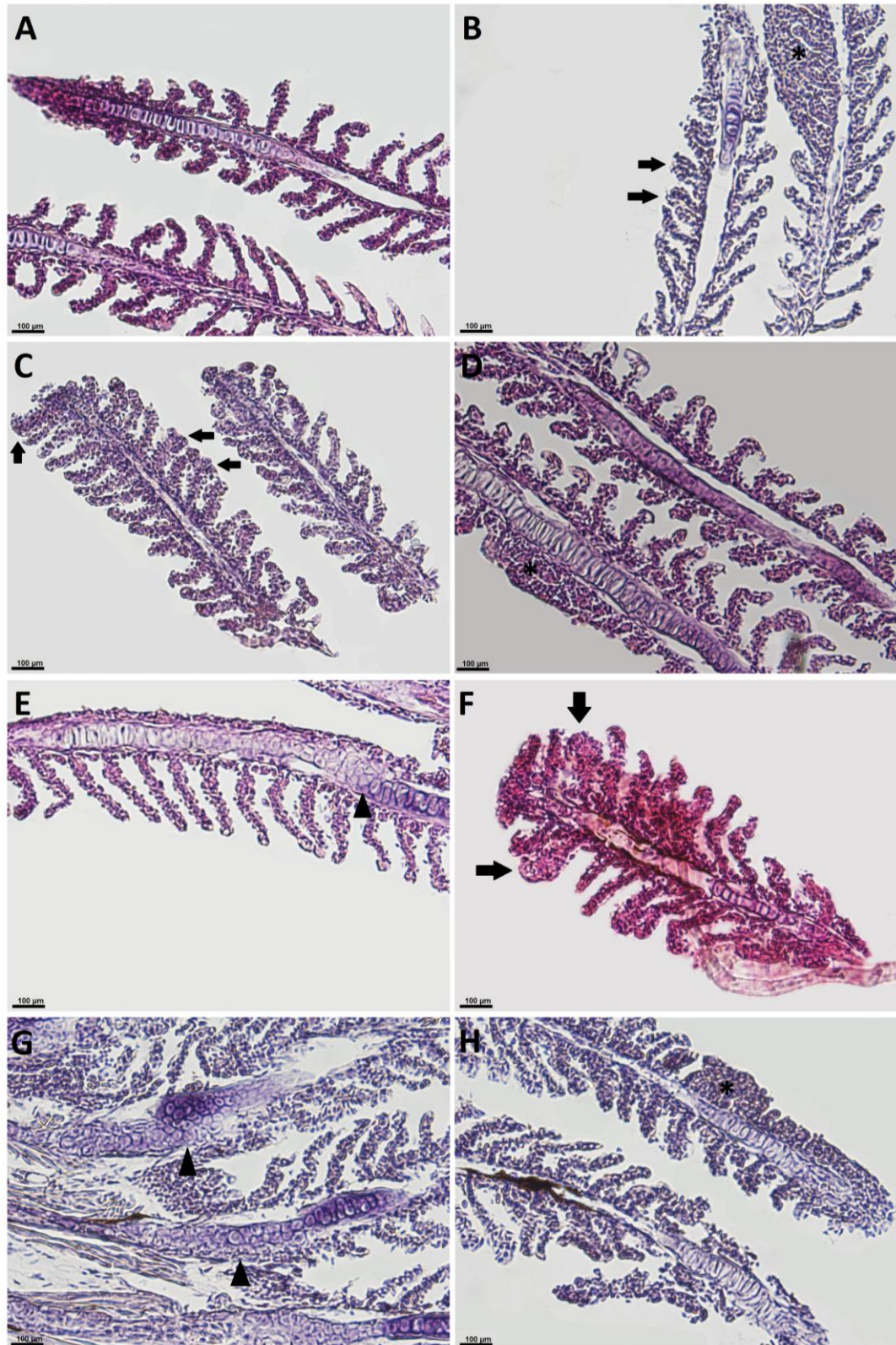
Alterações de comprimento nas lamelas secundárias	Controle	0,065 mg/L	1 mg/L
Alongamento das lamelas secundárias	57,14%	47,62%	23,81%
Lamelas secundárias de tamanho igual a média	0%	0%	0%
Encurtamento das lamelas secundárias	42,86%	52,38%	76,19%

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

A brânquia é um considerada um bom indicador de qualidade de água devido a sua grande área de superfície que se encontra em constante contato com a água (RANKIN *et al.*, 1982; WONG e WONG, 2000; BALLESTEROS *et al.* 2007; ALBINATI *et al.* 2009), sendo um dos principais locais de entrada de contaminantes. Exposição a herbicidas causam alterações histológicas nas brânquias de peixes (HUED *et al.*, 2012; SHIOGIRI *et al.*, 2012; BRAZ-MOTA *et al.*, 2015; MA *et al.*, 2019), e dependendo do local e intensidade, podem afetar o funcionamento do órgão (BERNET *et al.*, 1999). Alterações histológicas são importantes biomarcadores principalmente nas brânquias, devido ao fato de ser sensível as mudanças nas condições do ambiente (MA *et al.*, 2019).

A severidade das alterações observadas foram concentração dependentes, sendo consideradas uma forma de proteção do organismo contra a difusão de tóxicos. A hiperplasia e hipertrofia do tecido causa a fusão de lamelas, que por sua vez diminui a superfície da brânquia e aumenta a distância que o tóxico precisa difundir para alcançar o sangue (CENGIZ e ÜNLÜ, 2003). De acordo com a revisão proposta por AU (2004), hiperplasia, hipertrofia, e fusão lamelar são alterações tipicamente observadas em brânquias expostas a contaminantes, incluindo herbicidas. Essas alterações podem afetar a função do órgão dependendo da sua distribuição e intensidade, reduzindo a captação de oxigênio para o metabolismo oxidativo e processos de desintoxicação (SHIOGIRI *et al.*, 2012).

Figura 6. Secção histológica transversal das brânquias do *Danio rerio* expostas ao HBG Scout® por 7 dias.



(A) Controle. Visão geral da brânquia. (B) Controle. (C-E) Grupo exposto a 0,065 mg/L de glifosato. (F-H) Grupo exposto a 1 mg/L de glifosato. (*), fusão de lamelas secundárias; (seta), hiperplasia/hipertrofia de lamelas secundárias; (cabeça de seta), hiperplasia/hipertrofia de condrocitos. Coloração HE. Fonte: O autor (2021).

Hiperplasia dos condrócitos também foi reportado por GEORGIEVA *et al.*, (2018) nas brânquias de *Aristichthys nobilis* expostas ao HBG IUPAC, mas em geral essa alteração não é frequentemente encontrada em brânquias de peixes expostos a herbicidas.

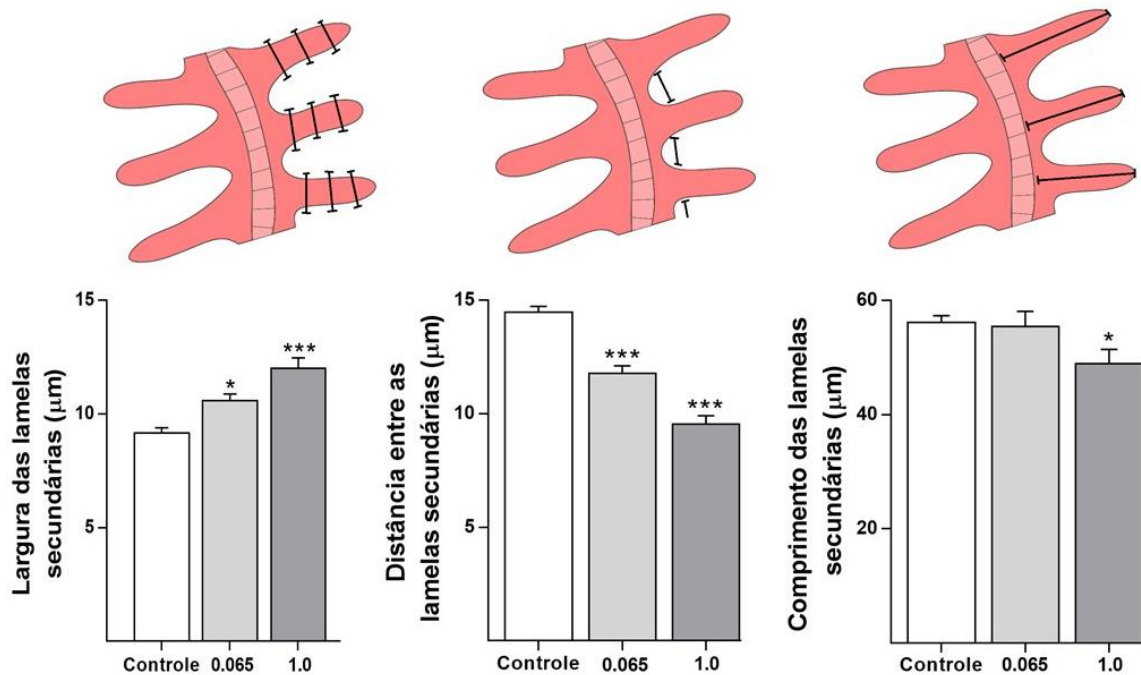
Segundo a bibliografia encontrada (LUPI *et al.*, 2007; NOGUEIRA *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2014) as alterações observadas neste trabalho são consideradas leves e podem ser reversíveis, porém, mais estudos são necessários para se obter uma estimativa do dano real causado pelo HBG Scout® nas brânquias do *D. rerio*.

4.2 EFEITO DO HBG SCOUT® SOBRE A MORFOMETRIA DAS BRÂNQUIAS

A largura da lamela secundária dos peixes expostos a 0,065 mg/L ($10,58 \mu\text{m} \pm 1,61$) e 1 mg/L ($12 \mu\text{m} \pm 2,36$) de glifosato apresentou um aumento significativo quando comparado ao grupo controle ($9,15 \mu\text{m} \pm 1,32$) (Figura 7). Já a distância entre as lamelas secundárias dos peixes expostos a 0,065 mg/L ($11,78 \mu\text{m} \pm 1,63$) e 1 mg/L ($9,55 \mu\text{m} \pm 1,93$) de glifosato apresentou uma diminuição significativa quando comparado ao grupo controle ($14,22 \mu\text{m} \pm 1,33$).

O comprimento das lamelas secundárias dos peixes expostos a concentração de 0,065 mg/L ($52,87 \mu\text{m} \pm 11,28$) de glifosato não apresentou uma diminuição significativa quando comparado ao grupo controle ($54,69 \mu\text{m} \pm 6,45$). Entretanto, o comprimento das lamelas secundárias dos indivíduos expostos a concentração de 1 mg/L ($48,97 \mu\text{m} \pm 11,85$) de glifosato apresentou uma diminuição significativa quando comparado ao grupo controle.

Figura 7. Morfometrias das lamelas secundárias em brânquias de exemplares adultos de *Danio rerio* expostos ao HBG Scout® por 7 dias.

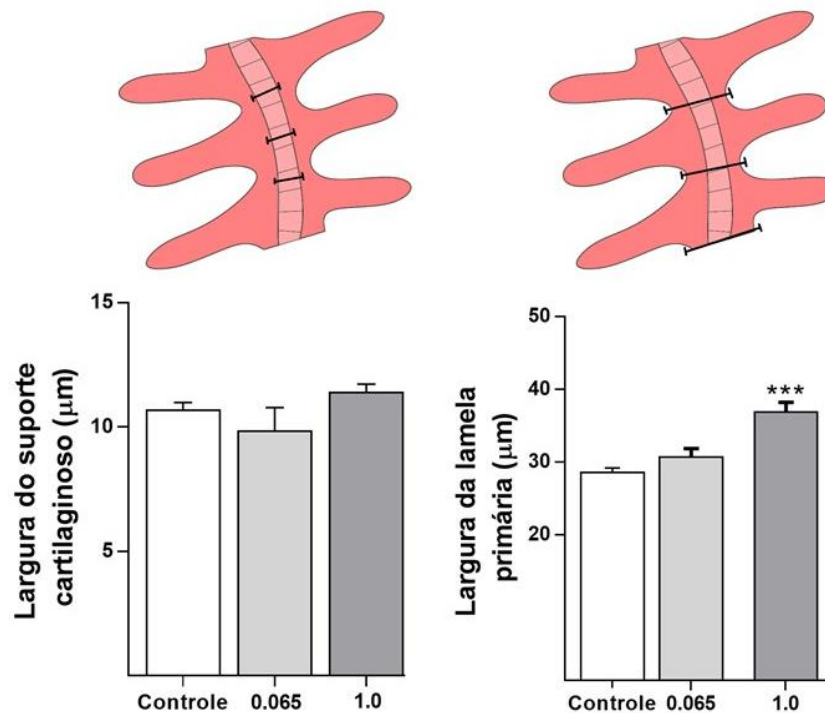


N = 3 peixes/grupo. Dados expressos em média \pm desvio padrão (ANOVA de uma via) *P < 0,05; ***P < 0,001 quando comparado ao controle. Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

A largura do suporte cartilaginoso de indivíduos expostos as concentrações de 0,065 mg/L ($10,78 \mu\text{m} \pm 3,30$) e 1 mg/L ($11,39 \mu\text{m} \pm 1,76$) de glifosato não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle ($10,67 \mu\text{m} \pm 1,56$) (Figura 8).

A largura da lamela primária das brânquias dos peixes expostos a concentração de 0,065 mg/L de glifosato não apresentou diferença significativa ($30,73 \mu\text{m} \pm 5,11$), quando comparado ao grupo controle ($28,58 \mu\text{m} \pm 2,82$). Entretanto, a largura da lamela primária dos indivíduos expostos a concentração de 1 mg/L ($36,85 \mu\text{m} \pm 6,26$) de glifosato apresentou um aumento significativo, quando comparado ao grupo controle.

Figura 8. Morfometrias na lamela primária em brânquias de exemplares adultos de *Danio rerio* expostos ao HBG Scout® por 7 dias.



N = 3 peixes/grupo. Dados expressos em média \pm desvio padrão (ANOVA de uma via) ***P < 0,001 quando comparado ao controle. Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Não foi observado diferença significativa entre a área de superfície da brânquia de indivíduos do controle ($65,59 \mu\text{m} \pm 3,51$) e de indivíduos expostos a $0,065 \text{ mg/L}$ ($63,13 \mu\text{m} \pm 4,67$). Entretanto, a área da brânquia de indivíduos expostos a 1 mg/L apresentou uma diminuição significativa ($55,64 \mu\text{m} \pm 9,27$) quando comparada com a do controle. Isso sugere que os peixes expostos a 1 mg/L de HBG, além da diminuição da superfície da brânquia causada pelas fusões lamelares, também tiveram uma diminuição significativa da área da superfície branquial (PAGE, redução de 16% quando comparado ao controle), o que poderia causar dificuldades na troca gasosa. O resultado da proporção das lamelas secundárias disponíveis para troca gasosa, juntamente com as demais medidas realizadas, se encontra na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros morfométricos da brânquia em exemplares adultos de *Danio rerio* e índice PAGE de exposição ao HBG Scout® por 7 dias.

Tratamento	LLP (µm)	LLS (µm)	CLS (µm)	DLS (µm)	LSC (µm)	PAGE (µm)
Controle	28,58 ± 2,82	9,15 ± 1,32	54,69 ± 6,45	14,22 ± 1,33	10,67 ± 1,56	65,59 ± 3,51
0,065 mg/L	30,73 ± 5,11	10,58 ± 1,61	52,87 ± 11,28	11,78 ± 1,63	10,78 ± 3,30	63,13 ± 4,67
1 mg/L	36,85 ± 6,26	12 ± 2,36	48,97 ± 11,85	9,55 ± 1,93	11,39 ± 1,76	55,64 ± 9,27 ***

Valores estão expressos como média ± desvio padrão (ANOVA de uma via) ***P < 0,001, quando comparado ao controle. Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

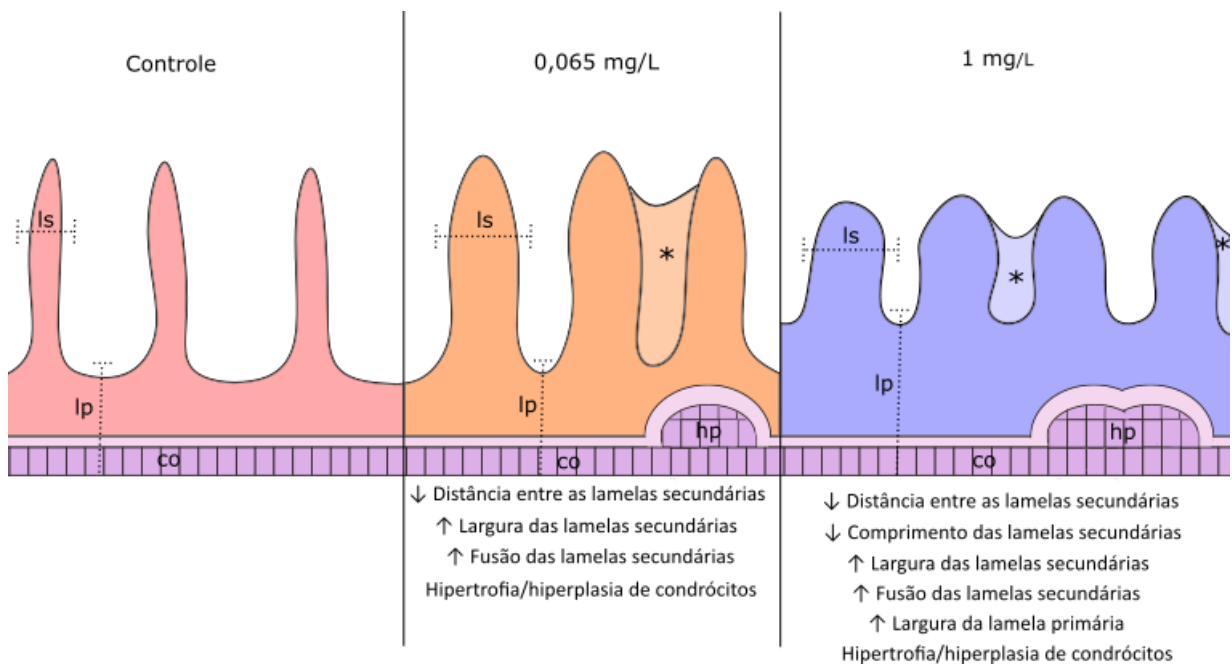
Os resultados morfométricos coincidem com os observados nas alterações morfológicas e sugerem mudanças nas dimensões das brânquias devido as alterações morfológicas (hiperplasia/hipertrofia, fusão e encurtamento das lamelas secundárias). Ambos os resultados corroboram com o observado nas alterações morfológicas, o que sugere que o aumento na largura das lamelas secundárias pode levar a uma diminuição do espaço interlamelar de uma forma concentração dependente, o que pode causar a fusão de lamelas (SANTOS *et al.*, 2014).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o glifosato é considerado de baixa toxicidade (WHO, 2005). Embora os HBG compartilhem o mesmo ingrediente ativo, suas diferenças na formulação deveriam ser levadas em consideração na escolha de uma concentração considerada segura em corpos d'água, devido a presença de diferentes ingredientes inertes encontrados em cada HBG (BONFANTI *et al.*, 2018), e sua toxicidade depender em parte da toxicidade de seus compostos associados, principalmente surfactantes (SHIOGIRI *et al.*, 2012). É importante ressaltar que muitos trabalhos têm demonstrado que HBG são mais tóxicos que o glifosato puro (FOLMAR *et al.*, 1979; TSUI e CHU, 2003; MESNAGE *et al.*, 2013; DEFARGE *et al.*, 2016) e, devido a isso, avaliações de segurança focando apenas no glifosato puro podem subestimar a capacidade tóxica dos HBG (VANDENBERG *et al.*, 2017).

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram a toxicidade de concentrações documentadas no ambiente aquático do HBG Scout® nas brânquias do peixe *D. rerio*, através de alterações morfológicas e morfométricas no órgão responsável pelas trocas gasosas (Figura 9), mostrando que a concentração de 0,065 (permitida em corpos de água de classe 1 e 2) e 1 mg/L apresentam toxicidade de uma maneira concentração dependente. Dessa forma, as concentrações máximas permitidas deveriam ser revisadas, de modo a diminuir as concentrações encontradas no meio ambiente e minimizar os danos causados à organismos não-alvo.

Figura 9. Resumo gráfico dos efeitos do HBG Scout® nas brânquias do peixe zebra *Danio rerio* expostos as concentrações de 0,065 e 1 mg/L por 7 dias.



ls – lamela secundária; lp – lamela primária; co – condrócitos; hp – hipertrofia/hiperplasia; (*) – fusão lamelar.
 Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

6. REFERÊNCIAS

- AKTAR, W., SENGUPTA, D., CHOWDHURY, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary toxicology**, 2(1), p. 1–12.
- ALBINATI, A. C. L., MOREIRA, E. L. T., ALBINATI, R. C. B., CARVALHO, J. V., DE LIRA, A. D., SANTOS, G. B., VIDAL, L. V. O. (2009). Biomarcadores histológicos – toxicidade crônica pelo Roundup em piaçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 61(3), p. 621-627.
- ANNETT, R., HABIBI, H. R., HONTELA, A. (2014). Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **Journal of Applied Toxicology**, 34(5), 458–479.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2016). Reavaliação de agrotóxicos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. (Acesso em 20/01/17).
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2019). Marco Regulatório. Publicada reclassificação toxicológica de agrotóxicos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. (Acesso em 26/05/21).
- AU, D. W. T. (2004). The application of histocytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: A review, **Marine Pollution Bulletin**, 48(9–10), p. 817–834.
- BAI, S. H., OGBOURNE, S. M. (2016). Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. **Environmental Science and Pollution Research International**, p. 1-14.
- BALLESTEROS, M. L., BIANCHI, G., CARRANZA, M., BISTONI, M. (2007). Endosul-fan acute toxicity and histomorphological alterations in *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). **Journal of Environmental Science and Health B**, 42, p. 351–357.
- BENACHOUR, N., SÉRALINI, G. E. (2009). Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. **Chemical Research in Toxicology**, 22, p. 97-105.
- BERNARDES, M. F. F., PAZIN, M., PEREIRA, L. C. DORTA, D. J. (2015). Impact of pesticides on environmental and human health. **In Toxicology Studies—Cells, Drugs and Environment**, IntechOpen: London, UK, p. 195–233.
- BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P., WAHLI, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, 22, p. 25–34.
- BONFANTI, P., SAIBENE, M., BACCHETTA, R., MANTECCA, P., COLOMBO, A. (2018). A glyphosate micro-emulsion formulation displays teratogenicity in *Xenopus laevis*. **Aquatic Toxicology**, 195, p. 103–113.

- BRAZ-MOTA, S., SADAUSKAS-HENRIQUE, H., DUARTE, R. M., VAL, A. L., ALMEIDA-VAL, V. M. F. (2015). Roundup[®] exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*., **Chemosphere**, 135, p. 53–60.
- BRIDI, D., ALTENHOFEN, S., GONZALEZ, J. B., REOLON, G. K., BONAN, C. D. (2017). Glyphosate and Roundup[®] alter morphology and behavior in zebrafish. **Toxicology**, 392, p. 32–39.
- BUSSE, M. D., RATCLIFF, A. W., SHESTAK, C. J., POWERS, R. F. (2001). Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, 33, p. 1777-1789.
- CENGIZ, E. I., ÜNLÜ, E. (2003). Histopathology of gills in mosquitofish, *Gambusia affinis* after long-term exposure to sublethal concentrations of malathion. **Journal of Environmental Science and Health B**, 38, p. 581–589.
- CARNEIRO, F. F., RIGOTTO, R. M., AUGUSTO, L. G. DA S., FRIEDRICH, K., BÚRIGO, A. C. (2015). **Dos Agrotóxicos Na Saúde**. Disponível em: de <http://abrasco.org.br/dossieagrotoxicos/>. (Acesso em 22/05/2021).
- CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente (2005). Resolução N° 357. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, p. 1–27.
- CONCEA. (2013). Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. **Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal**, Brasília.
- DE ARAUJO, J. S. A., DELGADO, I. F., PAUMGARTTEN, F. J. R. (2016). Glyphosate and adverse pregnancy outcomes, a systematic review of observational studies. **BMC Public Health**, 16(1), p. 472.
- DEFARGE, N., TAKÁCS, E., LOZANO, V. L., MESNAGE, R., SPIROUX DE VENDÔMOIS, J., SÉRALINI, G. E., SZÉKÁCS, A. (2016). Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 13, p. 264.
- DILL, G. M. (2005). Glyphosate-resistant crops: History, status and future. **Pest Management Science**, 61(3), p. 219–224.
- FAO/WHO (2016). Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. Disponível em: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/2016_JMPR_Summary_Special.pdf. (Acesso em 26/05/21).
- FENIK, J., TANKIEWICZ, M., BIZIUK, M. (2011). Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 30, p. 814–826.

- FIRPO, M., WAGNER, P., SOARES, L., PORTO, M. F. (2012). Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, 37(125), p. 17–50.
- FOLMAR, L. C., SANDERS, H. O., JULIN, A. M. (1979). Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 8, p. 269–278.
- GEORGIEVA, E., YANCHEVA, V., VELCHEVA, I., MOLLOV, I., TODOROVA, K., TOMOV, S., TSVETANOVA, V., STOYANOVA, S. (2018). Glyphosate-based herbicide alters the histological structure of gills of two economically important cyprinid species (Common carp, *Cyprinus carpio* and bighead carp, *Aristichthys nobilis*), **Applied Ecology and Environmental Research**, 16(3), p. 2295–2305.
- GHOLAMI-SEYEDKOLAEI, S. J., MIRVAGHEFI, A., FARAHMAND, H., KOSARI, A. A., GHOLAMI-SEYEDKOLAEI, S. J., GHOLAMI-SEYEDKOLAEI, S. J. (2013). Optimization of recovery patterns in common carp exposed to roundup using response surface methodology: Evaluation of neurotoxicity and genotoxicity effects and biochemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 98, p. 152–161.
- GIESY, J. P., DOBSON, S., SOLOMON, K. R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, 167, p. 35–120.
- GUYTON, K. Z., LOOMIS, D., GROSSE, Y., EL GHISSASSI, F., BENBRAHIM-TALLAA, L., GUHA, N., SCOCCIANI, C., MATTOCK, H., STRAIF, K. (2015). Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **The Lancet Oncology**, 16(5), p. 490–491.
- HELANDER, M. SALONIEMI, I., SAIKKONEN, K. (2012). Glyphosate in northern ecosystems. **Trends in Plant Science**, 17(10), p. 569–574.
- HERBERT, L. T., VÁZQUEZ, D. E., ARENAS, A., FARINA, W. M. (2014). Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour, **Journal of Experimental Biology**, 217(19), p. 3457–3464.
- HILL, A. J., TERAOKA, H., HEIDEMAN, W., PETERSON, R. E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological Sciences**, 86(1), p. 6–19.
- HOWE, C. M., BERRILL, M., PAULI, B. D., HELBING, C. C., WERRY, K., VELDHOEN, N. (2004). Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 23(8), p. 1928–1938.
- HUED, A. C., OBERHOFER, S., DE LOS ÁNGELES BISTONI, M. (2012). Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup®) alters normal gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 62(1), p. 107–117.

- HUGHES, G. M., PERRY, S. F., (1976). Morphometric study of trout gills: a light-microscope method suitable for the evaluation of pollutant action. **Journal of Experimental Biology**, 64, p. 447–460.
- IARC/WHO, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization (2015). Evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. 112. Disponível em: <http://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/pdf/MonographVolume112.pdf>. (Acesso em 26/05/21).
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2015). Indicadores de desenvolvimento sustentável - Brasil. Estudos e Pesquisas. **Informação Geográfica**, 10, p. 348.
- KIER, L. D., KIRKLAND, D. J. (2013). Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations. **Critical Reviews in Toxicology**, 43(4), p. 283–315.
- LIU, Z. (2004). Effects of surfactants on foliar uptake of herbicides - A complex scenario, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 35(3–4), p. 149–153.
- LOPES, C. V. A., DE ALBUQUERQUE, G. S. C. (2018). Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde Em Debate**, 42(117), p. 518–534.
- LUPI, C., NHACARINI, N. I., MAZON, A. F., RIGOLINSÁ, O. (2007). Avaliação da poluição ambiental através das alterações morfológicas nas brânquias de *Oreochromis niloticus* (Tilapia) nos córregos Retiro consulta e Bebedouro, município de Bebedouro-sp. **Hispeci & Lema**, 3, p. 1–6.
- MA, J., ZHU, J., WANG, W., RUAN, P., RAJESHKUMR, S., Li, X. (2019). Biochemical and molecular impacts of glyphosate-based herbicide on the gills of common carp, **Environmental Pollution**, 252, p. 1288-1300.
- MAEDA, H., DUDAREVA, N. (2012). The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Biology**, 63(1), p. 73–105.
- MANN, R. M., BIDWELL, J. R. (1999). The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 36, p. 193–199.
- MENKE, A. L., SPITSBERGEN, J. M., WOLTERBEEK, A. P. M., WOUTERSEN, R. A. (2011). Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. **Toxicologic Pathology**, 39(5), p. 759–775.
- MESNAGE, R., CLAIR, E., GRESS, S., THEN, C., SZÉKÁCS, A., SÉRALINI, G. E. (2013). Cytotoxicity on human cells of Cry1Ab and Cry1Ac Bt insecticidal toxins alone or with a glyphosate-based herbicide. **Journal of Applied Toxicology**, 33, p. 695-699.
- MESNAGE, R., DEFARGE, N., SPIROUX DE VENDÔMOIS, J., SÉRALINI, G. E. (2015). Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. **Food and Chemical Toxicology**, 84, p. 133–153.

- MESNAGE, R., BENBROOK, C. e ANTONIOU, M. N. (2019). Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides, **Food and Chemical Toxicology**, 128(March), p. 137–145.
- MITCHELL, D. G., CHAPMAN, P. M., LONG, T. J. (1987). Acute toxicity of Roundup® and Rodeo® herbicides to rainbow trout, chinook, and coho salmon. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 39, p. 1028–1035.
- MODESTO, K. A., MARTINEZ, C. B. R. (2010). Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, 78(3), p. 294–299.
- MONTEIRO, S. M., ROCHA, E., FONTAÍNHAS-FERNANDES, A., SOUSA, M. (2008). Quantitative histopathology of *Oreochromis niloticus* gills after copper exposure, **Journal of Fish Biology**, 73(6), p. 1376–1392.
- MOTTA, E. V. S., RAYMANN, K., MORAN, N. A. (2018). Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 115(41), p. 10305–10310.
- NEŠKOVIĆ, N. K., POLEKSIC, V., ELEZOVIC, I., KARAN, V., BUDIMIR, M. (1996). Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L., **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 56(2), p. 295–302.
- NICOLOPOULOU-STAMATI, P., MAIPAS, S., KOTAMPASI, C., STAMATIS, P., HENS, L. (2016). Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. **Frontiers in Public Health**, 4, p. 148.
- NOGUEIRA, D. J., DE CASTRO, S. C., DE SÁ, O. R. (2009). Utilização das brânquias de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) (Teleostei, Characidae) como biomarcador de poluição ambiental no reservatório UHE Furnas—MG. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 11, p. 227–232.
- NUNES, A., SCHMITZ, C., MOURA, S., MARASCHIN, M. (2021). The use of pesticides in Brazil and the risks linked to human health. **Brazilian Journal of Development**, 7(4), p. 37885–37904.
- PAGANELLI, A., GNAZZO, V., ACOSTA, H., LÓPEZ, S. L., CARRASCO, A. E. (2010). Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. **Chemical Research in Toxicology**, 23(10), p. 1586–1595.
- PEREIRA, A. G., JARAMILLO, M. L., REMOR, A. P., LATINI, A., DAVICO, C. E., DA SILVA, M. L., MÜLLER, Y. M. R., AMMAR, D., NAZARI, E. M. (2018). Low-concentration exposure to glyphosate-based herbicide modulates the complexes of the mitochondrial respiratory chain and induces mitochondrial hyperpolarization in the *Danio rerio* brain. **Chemosphere**, 209, p. 353–362.

- PEREIRA NAVARRO LINS, J. A., GABERZ KIRSCHNIK, P., DA SILVA QUEIROZ, V., MARIS CIRIO, S. (2017). Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, 8(4), p. 469-484.
- PERES, F., MOREIRA, J. C., DUBOIS, G. S. (2003). Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F. (org). *É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente*. Rio de Janeiro: **Fiocruz**, p. 21-41.
- PIGNATI, W. A., LIMA, F. A. N. de S., LARA, S. S. de, CORREA, M. L. M., BARBOSA, J. R., LEÃO, L. H. DA C., PIGNATTI, M. G. (2017). Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a vigilância em saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, 22(10), p. 3281–3293.
- QIAN, Y., LYNCH, J. H., GUO, L., RHODES, D., MORGAN, J. A., DUDAREVA, N. (2019). Completion of the cytosolic post-chorismate phenylalanine biosynthetic pathway in plants. **Nature Communications**, 10(1), p. 15.
- RANKIN, J. C., ATAGG, R. M., BOLIS, L. (1982). Effects of pollutants on gills. In-Gills, eds. D. F. Houlihan, J. C. Rankin, T. J., Shuttleworth. **Cambridge University Press**, New York, p. 207-220.
- RASBAND, W. S. (1997). ImageJ, U. S. **National Institutes of Health**, Bethesda, Maryland, USA.
- ROMANO, R. M., DE OLIVEIRA, J. M., DE OLIVEIRA, V. M., DE OLIVEIRA, I. M., TORRES, Y. R., BARGI-SOUZA, P., ANDRADE, A. J. M., ROMANO, M. A. (2021). Could glyphosate and glyphosate-based herbicides be associated with increased thyroid diseases worldwide?. **Frontiers in Endocrinology**, 12(March), p. 1–14.
- RUBIO F, GUO E, KAMP L. (2014). Survey of glyphosate residue in honey, corn, and soy products. **Journal of Environmental and Analytical Toxicology**, 5, p. 249.
- SABARWAL, A., KUMAR, K., SINGH, R. P. (2018). Hazardous effects of chemical pesticides on human health—Cancer and other associated disorders, **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 63, p. 103–114.
- SANTOS, D. M. S., MELO, M. R. S., MENDES, D. C. S., ROCHA, I. K. B. S., SILVA, J. P. L., CANTANHÊDE, S. M., MELETTI, P. C. (2014). Histological changes in gills of two fish species as indicators of water Quality in Jansen Lagoon (São Luís, Maranhão State, Brazil), **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 11(12), p. 12927–12937.
- SHIOGIRI, N. S., PAULINO, M. G., CARRASCHI, S. P., BARALDI, F. G., DA CRUZ, C., FERNANDES, M. N. (2012). Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*, **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 34(2), p. 388–396.

- STRASSEMAYER, J., DAEHMLow, D., DOMINIC, A., LORENZ, S., GOLLA, B. (2017). SYNOPSIS-WEB, an online tool for environmental risk assessment to evaluate pesticide strategies on field level. **Crop Protection**, 97, p. 28–44.
- SOLOMON, K. R., THOMPSON, D. G., PEST, F., MARIE, S. S. (2003). Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of Glyphosate. **Journal of Toxicology and Environmental Health B**, 6(3), p. 289–324.
- SULUKAN, E., KÖKTÜRK, M., CEYLAN, H., BEYDEMİR, S., ISIK, M., ATAMANALP, M., CEYHUN, S. B. (2017). An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, 180, p. 77–85.
- TAVARES CARVALHO, J. C. (2016). Obtainment and study of the toxicity of perillyl alcohol nanoemulsion on zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Nanomedicine Research**, 4(4).
- TSUI, M. T. K., CHU, L. M., (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**, 52, p. 1189-1197.
- TUDI, M. RUAN, H. D., WANG, L., LYU, J., SADLER, R., CONNELL, D., CHU, C., PHUNG, D. T. (2021). Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 18(3), p. 1–24.
- UREN WEBSTER, T. M., LAING, L. V., FLORANCE, H., SANTOS, E. M. (2014). Effects of glyphosate and its formulation, roundup, on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science and Technology**, 48(2), p. 1271–1279.
- VANDENBERG, L. N., BLUMBERG, B., ANTONIOU, M. N., BENBROOK, C. M., CARROLL, L., COLBORN, T., EVERETT, L. G., HANSEN, M., LANDRIGAN, P. J., LANPHEAR, B. P., MESNAGE, R. VOM SAAL, F. S., WELSHONS, W. V., MYERS, J. P. (2017). Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides?. **Journal of Epidemiology and Community Health**, 71(6), p. 613–618.
- WARDLE, D. A., PARKINSON, D. (1992). Influence of the herbicides 2,4-D and glyphosate on soil microbial biomass and activity: a field experiment. **Soil Biology and Biochemistry**, 24, p. 185–186.
- WILLIAMS, G. M., KROES, R., MUNRO, I. C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 31(2I), p. 117–165.
- WONG, C. K., WONG, M. H. (2000). Morphological and biochemical changes in the gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. **Aquatic Toxicology**, 48, p. 517-527.
- WHO, World Health Organization & International Programme on Chemical Safety. (2004). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to

classification. **World Health Organization.** Disponível em: https://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_rev_3.pdf. (Acesso em 26/05/21).

WHO, World Health Organization (2005). Glyphosate and AMPA in drinking-water. **WHO Guidelines for Drinking-Water Quality, 3rd Edition**, 3(June), p. 1–19.

WHO, World Health Organization & International Programme on Chemical Safety. (2010). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009. **World Health Organization.**

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