

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**RESPOSTAS DE CORTISOL E DANOS  
HISTOPATOLÓGICOS EM TILÁPIAS-DO-NILO  
(*Oreochromis niloticus*) EXPOSTAS AO HERBICIDA  
ROUNDUP READY**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Gessi Koakoski**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

**RESPOSTAS DE CORTISOL E DANOS  
HISTOPATOLÓGICOS EM TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis  
niloticus*) EXPOSTAS AO HERBICIDA ROUNDUP READY**

**Gessi Koakoski**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação  
em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**RESPOSTAS DE CORTISOL E DANOS HISTOPATOLÓGICOS EM  
TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) EXPOSTAS AO  
HERBICIDA ROUNDUP READY**

elaborada por  
**Gessi Koakoski**

como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos (UFSM)**  
(Presidente - Orientador)

**Profa. Dra. Berta M. Heinzmann (UFSM)**

**Profa. Dra. Kátia Padilha Barreto (UFSM)**

Santa Maria, 17 de julho de 2012.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus,  
pela saúde, fé, força de vontade e perseverança que tem me dado.  
Ao meu marido Jhonatan, que sempre acreditou em mim e apoiou meus sonhos.  
Aos meus pais e irmãos que me propiciaram uma vida digna onde eu pudesse crescer,  
acreditando que tudo é possível, desde que sejamos honestos, íntegros de caráter e tendo a  
convicção de que desistir nunca seja uma ação contínua em nossas vidas,  
que sonhar e concretizar os sonhos só dependerão de nossa vontade.  
A todos os professores e professoras que muito contribuíram para a minha formação, dos  
quais tenho boas lembranças e ao professor Leonardo José Gil Barcellos, pela sabedoria e  
dedicação com a qual me orientou no mestrado.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu marido Jhonatan, agradeço cada momento que passo com você, por ter conhecido a melhor pessoa do mundo, por amar e sonhar a cada momento que passamos juntos, a cada momento que parecia ser eterno, pois estava contigo, por ser a pessoa mais feliz do mundo, pois tenho VOCÊ ao meu lado... Por isso! Agradeço a você meu amor, que esteve comigo quando eu mais precisei. Te amo e te agradeço por não ter me abandonado. Minha paixão eterna...

Aos Pais, David e Inês a vocês, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que os trilhássemos sem medo e cheios de esperanças, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudéssemos realizar os nossos. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, amo vocês...

A minha irmã Janete, gostaria de lhe dizer que existem pessoas que não acrescentam coisas na vida de outras pessoas e nem mesmo na vida dela própria. Você não é uma dessas pessoas. Você é diferente! Você é muito especial! Você acrescenta e muito em minha vida. Me traz força, alegria e inspiração para minha vida! Obrigado por tudo que faz por mim! Te admiro muito e quero ter você sempre ao meu lado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos, pela oportunidade de fazer parte da sua equipe de pesquisa, pela compreensão, conselhos, apoio e carinho. Juntos realizamos um bom trabalho, muito obrigada pela orientação e principalmente pelos seus ensinamentos, que sempre foram muito enriquecedores.

Agradeço a Profa. Adriana da Motta por toda dedicação e esforço na condução do processamento das amostras e análise histopatológica.

Agradeço a toda equipe do NEPEAM, em especial ao Prof. Dr. Claudinei da Cruz, pela recepção e atenção, confiança e reconhecimento no qual recebi.

Meu muito obrigado, ao Dr. Leonardo Cericato, pelo apoio financeiro e incentivo para continuar minha carreira científica.

A todos os colegas do laboratório, pelo companheirismo e ajuda sempre que me proporcionaram.

Ao Prof. Dr. Bernardo Baldiserotto, pela oportunidade de estar junto ao grupo de pesquisa em seu laboratório, em especial a aluna Jaqueline que acompanhei em seu trabalho de doutorado.

Ao Programa de Pós Graduação em farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria pela concessão da bolsa CAPES.

Enfim a todos que de uma forma ou outra contribuíram para realização deste trabalho, muito obrigado.

# RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

RESPOSTAS DE CORTISOL E DANOS HISTOPATOLÓGICOS EM TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) EXPOSTAS AO HERBICIDA ROUNDUP READY

AUTORA: GESSI KOAKOSKI

ORIENTADOR: LEONARDO JOSÉ GIL BARCELLOS

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 17 de julho de 2012

O estudo investigou danos histopatológicos e a desregulação endócrina causada pelo herbicida roundup ready [combinação de sal de isopropilamina de glifosato, equivalente ácido N-(fosfometil) e glicina] em alevinos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Primeiro, determinou-se a CL50-48h para o herbicida, calculado em 2,94 mg/L (intervalo de confiança de 2,77-3,13 mg/L). Segundo, realizou-se exposição crônica de 14 dias, à concentrações subletais do herbicida (1%, 2%, 10%, e 20% da CL50-48 h). Terceiro, os peixes foram expostos agudamente, à concentrações subletais do herbicida (1%, 2%, 10%, e 20% da CL50-48h) por um período de 48 h combinado à um estímulo estressor. Ao término de cada exposição aguda e crônica, os peixes sobreviventes, foram anestesiados e procedeu-se a retirada dos órgãos para análise histopatológica. Na exposição crônica ocorreu morte dos animais, em todas as concentrações a partir do décimo primeiro dia de exposição. Ao final do teste, observou-se letalidade de 6,25 % (1% CL50-48 h), 31,24 % (2% CL50-48 h), 17,64 % (10% CL50-48 h) e 20 % (20% CL50-48 h). Nas análises histopatológicas, as principais lesões ocasionadas pelo agroquímico tanto na exposição aguda como crônica, foram: nas brânquias (hemorragia, congestão e infiltrado inflamatório), nos fígados (degeneração, necrose e colestase hepatocitária) e nos rins (degeneração e necrose), evidenciando-se lesões renais, seguidas de lesões hepáticas e brônquiais, às quais sugerem intoxicação. A resposta ao estresse de todos os tratamentos foi comparada com os alevinos que não foram expostos (grupo controle) ou foram expostos apenas ao estressor (grupo estressado). Alevinos que foram expostos as maiores concentrações subletais do herbicida, elevaram os níveis de cortisol com valores semelhantes aos encontrados no grupo submetido ao estresse. Em contraste, alevinos expostos a todas as concentrações do herbicida em combinação com um estressor agudo, os níveis de cortisol foram significativamente mais baixos do que os encontrados no grupo controle, sugerindo que o herbicida glifosato atenua a resposta do cortisol. Neste contexto, podemos concluir que para a *Oreochromis niloticus* o herbicida roundup ready é moderadamente tóxico mesmo em concentrações subletais, provocando letalidade, lesões irreversíveis ao organismo e também desencadeando um aumento de cortisol em concentrações de 10% e 20% da CL50-48h. Porém combinados a um estressor em todas as concentrações, inibiu a elevação de cortisol. Os nossos resultados indicam que o cuidado extremo deve ser exercido na utilização destes compostos, para prevenir efeitos deletérios e preservar a homeostase dos peixes.

*Palavras-chaves:* concentração letal, exposição crônica, histopatologia, estresse, agroquímico.

# ABSTRACT

Master Dissertation  
Graduate Program in Pharmacology  
Federal University of Santa Maria

## CORTISOL RESPONSES AND HISTOPATHOLOGICAL DAMAGES IN NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) EXPOSED TO HERBICIDE ROUNDUP READY

AUTHOR: GESSI KOAKOSKI

SUPERVISOR: LEONARDO JOSE GIL BARCELLOS

Date and Location of Defense: Santa Maria, July 17, 2012

The study investigated histopathological damage and the endocrine disruption caused by the herbicide roundup ready [combination of isopropylamine salt of glyphosate, acid equivalent N-(phosphonomethyl) and glycine] in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). First, we determined the LC50-48h for the herbicide calculated in 2.94 mg / L (confidence interval 2.77 to 3.13 mg / L). Second, chronic exposure took place for 14 days, at sublethal concentrations of the herbicide (1%, 2%, 10% and 20% of LC50-48 hr). Third, the fish were acutely exposed to sublethal concentrations of the herbicide (1%, 2%, 10% and 20% of LC50-48h) for a period of 48 h combined with a stressor stimulus. At the end of each acute and chronic exposure, surviving fish were anesthetized and proceeded with the removal of organs for histopathological analysis. In the chronic exposure, the death of all fishes at all concentrations occurred from the eleventh day exposure. At the end of the test, mortality rates of 6.25%, 31.24%, 17.64%, and 20, were observed in the groups exposed to the concentrations of 1%, 2%, 10%, and 20% of LC50-48h respectively. In the histopathological analysis, the main lesions caused by the toxic compound both in acute and chronic exposure, were detected in the gills (hemorrhagic, congestion and inflammatory infiltrate) in the liver (degeneration, hepatocyte necrosis and cholestasis) and kidneys (degeneration and necrosis), attempting to renal lesions, followed by gills and liver lesions, what suggests intoxication. The stress responses of all treatments were compared with those who had not been exposed to treatment (control group) or were exposed only to the estressor (stressed group). Fingerlings were exposed to the highest sublethal concentrations of the herbicide, increased cortisol levels with values similar to those found in the group submitted to stressor. Hower, in contrast, the exposed juveniles to all concentrations of roundup ready in combination with an acute stressor, showed significantly lower cortisol levels than those found in the control group, suggesting that the herbicide attenuates the cortisol response. In this context we may conclude that herbicide rondup ready is moderately toxic to *Oreochromis niloticus* at sublethal concentrations, courses lethality and irreversible damage to the body, also leading to an enchance in cortisol concentrations at 10% and 20% LC50-48h. But when combined with a stressor, all concentrations provoke an inibition of the elevation of cortisol. Our results indicate that extreme ccantion must be adopt, in the use of these compounds, in lend to prevent deleterious effects in fish and preseve its homeostasis.

Keywords: lethal concentration, chronic exposure, hithopathological, stress, agrochemical.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

**Figura 1** - Estrutura do composto glifosato (ácido N-fosfonometilglicina) (adaptado de RODRIGUES & ALMEIDA, 2005).

**Figura 2** - Exemplar de tilápia (*Oreochromis niloticus*). (foto do autor).

### MATERIAIS E MÉTODOS

**Figura 3** - Esquema gráfico da fase preliminar do teste agudo.

**Figura 4** - Esquema gráfico da fase definitiva do teste agudo.

**Figura 5** - Esquema gráfico do teste crônico.

**Figura 6** - Esquema gráfico do teste de resposta ao estresse agudo.

### RESULTADOS

**Figura 7** - Relação da concentração-mortalidade nos testes de toxicidade aguda do glifosato para *O. niloticus*.

**Figura 8** - Fotomicrografia do tecido renal, hepático e branquial de *O. niloticus* após exposição aguda ao glifosato. (A) Rim, 2,0 mg/L. Nefrose, presença de material homogêneo intensamente eosinofílico no citoplasma de células epiteliais tubulares degeneradas e necróticas (setas), além de cilindro hialino (seta curva) no lúmen tubular (HE, 400x). (B) Fígado, 3,5 mg/L. Foco de degeneração hepatocelular (setas) associada à necrose (setas curvas) (HE, 400x). (C) Brânquias, 3,5 mg/L. Infiltrado eosinofílico (HE, 400x).

**Figura 9** – Fotomicrografia do tecido renal e hepático de *O. niloticus* após exposição crônica ao herbicida roundup ready. (A) Rim 20% CL50-48h, nefrose, presença de material homogêneo intensamente eosinofílico no citoplasma de células epiteliais tubulares degeneradas e necróticas (setas), além de cilindro hialino no lúmen tubular (seta curva) (HE, 400x). (B) Rim 10% CL50-48h, nefrose, presença de material homogêneo intensamente eosinofílico no citoplasma de células epiteliais tubulares degeneradas e necróticas (setas), além de calcificação distrófica (seta curva) (HE, 400x). (C) Rim 20% CL50-48h, nefrose, células epiteliais tubulares PAS positivas (setas) (PAS, 400x). (D) Rim 20% CL50-48h, células epiteliais tubulares PAS positivas (setas), além do glomérulo e dos cilindros (seta curva) (PAS, 400x). (E) Rim 10% CL50-48h, nefrose, células epiteliais tubulares intensamente coradas com o Vermelho do Congo, (400x). (F) Fígado 10% CL50-48h, degeneração hepatocelular (setas) difusa moderada a severa associada à necrose (setas curvas) (HE, 400x).

**Figura 10** - Níveis de cortisol do corpo inteiro em *O. niloticus* submetidos ou não ao estresse agudo (E) após exposição aguda (48 h) ao herbicida roundup ready (RR). Os dados foram expressos como média  $\pm$  S.E.M.. Letras maiúsculas diferentes acima do histogramas indica diferença estatística por ANOVA, seguido por vários testes de Tukey. ( $P < 0,0001$ ,  $n = 10$ ).

## ARTIGO

**Figure 1.** Whole-body cortisol levels in *Oreochromis niloticus* submitted or not to acute stress after acute exposure (96 h) to a glyphosate-based herbicide. Data were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Different capital letters above the histograms indicates statistical differences by Anova followed by Tukey's multiple range tests. ( $P < 0.0001$ ,  $n=10$ ).

## LISTA DE TABELAS

### RESULTADOS

**Tabela 1** – Relação da concentração-mortalidade no teste de toxicidade crônica do herbicida roundup ready para *O. niloticus*.

**Tabela 2** - As alterações histológicas encontrada nos rins de *O. niloticus* após a exposição aguda (48h) e crônica (14 dias) para o herbicida roundup ready, danos ao tecido e frequência de ocorrência.

**Tabela 3** - As alterações histopatológicas encontrada nos fígados de *O. niloticus* após a exposição aguda (48h) e crônica (14 dias) para o herbicida roundup ready, danos para o tecido e frequência de ocorrência.

**Tabela 4** - As alterações histopatológicas encontrada nas branquias de *O. niloticus* após a exposição aguda (48h) e crônica (14 dias) para o herbicida roundup ready, danos para o tecido e frequência de ocorrência.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

- ABNT** – Associação Brasileira de Normas Técnicas
- ACTH** – Hormônio Adreno Corticotrófico
- AMPA** -  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
- ANOVA** – Análise da Variância
- CL50** – Concentração Letal de 50% da população
- DIC** – Delineamento Inteiramente Casualizado
- ELISA** - Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
- HE** – Hematoxilina-Eosina
- HHI** – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Interrenal
- HHG** – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal
- NBR** – Norma Brasileira
- PAS** – Ácido Periódico de Schiff
- PBS** – Tampão Fosfato
- POEA** – Amina de sebo polietoxilado
- KCL** – Cloreto de Potássio
- UPF** – Universidade de Passo Fundo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 Objetivo geral .....	16
2.2 Objetivos específicos .....	16
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
3.1. Importância da ecotoxicologia aquática .....	17
3.2. Testes de toxicidade .....	18
3.3. Agroquímicos .....	18
3.3.1. Herbicida glifosato .....	19
3.4. Organismo teste .....	20
3.5. Histopatologia .....	21
3.6. Estresse .....	22
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
4.1. Local e período de experimentação .....	24
4.2. Animais e condições de manutenção .....	24
4.3. Substância testada .....	25
4.4. Experimento 1 .....	26
4.4.1. Teste de sensibilidade com Cloreto de Potássio (KCl) .....	26
4.4.2. Testes preliminares .....	26
4.4.3. Testes definitivos .....	27
4.5. Experimento 2 .....	28
4.6. Histopatologia de brânquia, fígado e rim .....	29
4.7. Experimento 3 .....	29
4.7.1. Extração e determinação do cortisol de corpo inteiro .....	30
4.7.2. Estatística.....	31
<b>5. RESULTADOS</b> .....	32
5.1. Experimento 1 .....	32
5.2. Experimento 2 .....	32
5.3. Histopatologia, testes agudo e crônico .....	33
5.4 Experimento 3 .....	36
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	37

<b>7. ARTIGO</b> .....	41
<b>ABSTRACT</b> .....	41
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	42
<b>2. MATERIALS AND METHODS</b> .....	43
<b>2.1. Fish and aquaria</b> .....	43
<b>2.2. Experimental procedures</b> .....	44
2.2.1. Determination of 96h LC50 value of glyphosate based herbicide .....	44
2.2.2. Stress response in fish exposed to sublethal concentrations of glyphosate based .....	44
<b>2.3. Tissue cortisol extraction and determination herbicide</b> .....	45
<b>2.4. Tissue cortisol determination and ELISA validation</b> .....	46
<b>2.5. Statistics</b> .....	46
<b>3. RESULTS</b> .....	47
<b>3.1. Acute 96 hLC50 value of glyphosate-based herbicide in Nile tilapia</b> .....	47
<b>3.2. Stress response in fish exposed to sublethal concentrations of glyphosate based herbicide</b> .....	47
<b>4. DISCUSSION</b> .....	47
<b>5. REFERENCES</b> .....	50
<b>8. CONCLUSÕES</b> .....	53
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFIACAS</b> .....	54

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de herbicidas em lavouras para produção de grãos se dá em grande escala para acompanhar o crescimento e a evolução tecnológica das mesmas, e a aquicultura ainda é considerada uma atividade complementar à agricultura, por isso a localização de açudes geralmente é próxima de lugares onde o solo é cultivado. Os corpos de água naturais ou construídos recebem pequenas concentrações de contaminantes químicos através de lixiviação das áreas agrícolas cultivadas nas proximidades, acidentes durante o transporte do produto e/ou uso direto de substâncias químicas em tanques de peixes, rios ou lagos. O uso indiscriminado de herbicidas, manuseio descuidado, derrames acidentais ou descarga de efluentes não tratados em cursos de água naturais têm efeitos nocivos sobre a população de peixes e outras formas de vida aquática e podem contribuir com efeitos a longo prazo no ambiente (JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2002).

Organismos representativos do ambiente são utilizados como organismos teste, sendo submetidos a diferentes concentrações do agente tóxico, por um determinado período de tempo. A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie de peixe da família *cichlidae* de água doce, pertence à sub-família *Pseudocrenilabrinae*, cultivada em regiões quentes de todo o mundo. Nativa da África chegou ao Brasil em 1952, no momento é a segunda espécie de peixe mais cultivada no planeta e a mais produzida em cativeiro no Brasil. Possui características atraentes para sua produção como resistência a doenças, carne saborosa e por ser uma espécie rústica e precoce, é muito criada em açudes e reservatórios sujeitos ao aporte de agroquímicos utilizados nas atividades das regiões nordeste, sul e sudeste. Utiliza-se esta espécie por possuir importância econômica e fácil manuseio em laboratório (OMITOYIN *et al.*, 2006).

O herbicida roundup ready é uma combinação de sal de isopropilamina de glifosato, equivalente ácido N-(fosfometil) e glicina, um herbicida de ação sistêmica, não seletivo (mata qualquer tipo de planta) desenvolvido para eliminar ervas, principalmente perenes, tendo como principal ingrediente o glifosato. Registrado no Brasil para o controle não seletivo (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005). Utilizado nas culturas de soja resistentes, devido a presença de adjuvantes em sua formulação, um deles é o surfactante que age reduzindo a tensão superficial de um líquido, aumentando a dispersão. Produto de solubilidade alta podendo atingir águas subterrâneas, possui alta adsorção das partículas do solo, demonstrando perigo para as águas superficiais, pelo carreamento das partículas de solo onde sedimentarão.

O potencial tóxico de contaminantes sobre os organismos vivos pode ser avaliado pelos efeitos nas estruturas das células e tecidos, as características histopatológicas de órgãos alvo específicos que podem expressar condições ambientais e representar o tempo de exposição ao qual estão submetidos os organismos (SCHMALZ *et al.*, 2002). O monitoramento pode ser ferramenta importante no gerenciamento de risco e pode também ser planejado e executado em três fases: identificação do problema, análise do risco e caracterização do risco (SPADOTTO *et al.*, 2004).

Além disso, na produção de peixes, as variações ambientais, os intensivos manejos externos, contribuem para a ocorrência de estresse. Os peixes podem encontrar muitas situações que perturbam a sua homeostase, tanto na natureza ou em instalações aquícolas. Esses fatores são geralmente chamadas de "estressores", e a resposta montada pelo peixe para lidar com esses fatores de estresse e restaurar a homeostase é chamado de "resposta de estresse." Essa resposta é coordenada principalmente pelo eixo Hipotálamo-Hipófise-Interrenal (HHI), um mecanismo essencial de adaptação (revisões de BARTON & IWAMA, 1991; WENDELAAR BONGA, 1997; BARTON 2002). Por conseguinte, qualquer efeito adverso sobre o funcionamento do eixo HHI compromete a capacidade do animal em desenvolver uma resposta adequada a fatores estressantes.

Os herbicidas à base de glifosato são amplamente utilizados em campos agrícolas, normalmente aplicados em viveiros de peixes para controlar as algas e crescimento das plantas. O controle destes compostos é feitos através de testes de toxicidade, utilizando como biomarcadores os organismos aquáticos. Neste sentido o estudo destes herbicidas é de extrema importância para o controle do uso indiscriminado nas lavouras, para prevenir efeitos deletérios sobre a homeostase de peixe.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é avaliar o potencial tóxico do herbicida roundup ready, investigando danos histopatológicos e a resposta de estresse sobre o eixo HHI em *O. niloticus*.

### 2.2. Objetivos específicos

- ✓ Estimar a concentração letal média (CL50 - 48h) do herbicida glifosato, para *O. niloticus*.
- ✓ Avaliar as alterações histopatológicas em brânquias, fígado e rins nas diferentes concentrações, após exposição aguda e crônica do herbicida glifosato para *O. niloticus*.
- ✓ Investigar a desregulação endócrina, provocada pelo herbicida glifosato nas concentrações subletais (1%, 2%, 10% e 20% da CL50-48h) em resposta ao estresse agudo em alevinos de *O. niloticus*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os poluentes que afetam o ambiente aquático estão anualmente se multiplicando, devido a formulação de novos compostos, que acompanham a evolução da agricultura, que ao agregar novas tecnologias na maioria das vezes ganha em produtividade. Juntamente com estes avanços desencadeia-se a preocupação ambiental sobre os impactos ecológicos que estes agroquímicos podem causar no sistema aquático quanto pela sua ação tóxica sobre um organismo. A contaminação dos recursos aquáticos em nível de organismo é alvo de preocupação humanas, tendo em vista que o consumo direto e indireto de peixes e água contaminada pode causar sérios danos ao organismo (RAMSDORF, 2007).

#### 3.1. Importância da ecotoxicologia aquática

É a ciência que tem como objeto de estudo o efeito adverso de substâncias químicas sobre os organismos vivos, com a finalidade principal de prevenir o aparecimento deste efeito, ou seja, estabelecer o uso seguro destas substâncias químicas. Estudos relacionados à ecotoxicologia ambiental estão se expandindo rapidamente para a avaliação dos efeitos de compostos tóxicos (AYOOLA, 2008). Existe carência de informações sobre os possíveis impactos que os agrotóxicos podem causar em sistemas aquáticos, mas sabe-se que o risco de transporte desses das lavouras para a rede hidrográfica pode resultar em ação tóxica direta ou indireta sobre organismos não-alvos, pela alteração do hábitat dos organismos ou interferência na cadeia alimentar (NAKAGOME *et al.*, 2007). A ecotoxicologia revela, através de ensaios com matéria viva, efeitos agudos ou crônicos produzidos por substâncias químicas (KNIE & LOPES, 2004).

A contaminação da água por agroquímicos é de difícil avaliação na maioria das vezes. Normalmente associa-se à contaminação com a mortalidade dos peixes, o que se constitui em uma intoxicação aguda com doses do defensivo igual ou acima da sua concentração letal. Entretanto, para a maioria dos defensivos agrícolas, a dose do princípio ativo necessário para o seu efeito desejado é menor do que a dose tóxica para animais terrestres e aquáticos, não impedindo a sobrevivência desses, mas causando alterações na sua fisiologia e bioquímica (KREUTZ *et al.*, 2008). Por não causar a morte imediata dos peixes, na maioria das vezes, este tipo de intoxicação passa despercebida. Segundo Kreutz *et al.* (2008) , uma das

alternativas para o estudo da contaminação de águas com pequenas quantidades (subletais) de agroquímicos, é a determinação de parâmetros orgânicos que poderiam ser utilizados como indicadores de uma agressão; entre os parâmetros avaliados estão diversas avaliações hematológicas, níveis hormonais como os de cortisol e alterações teciduais.

### **3.2. Testes de toxicidade**

Entre os organismos aquáticos, os peixes estão sendo utilizados em testes como bioindicadores (HERRICKS, 2002). Devido às suas múltiplas interações ecológicas nos ambientes aquáticos, foram eleitos como bioindicadores de substâncias tóxicas em diversas normas de estudos desta natureza e em trabalhos científicos (HELFRICH *et al.*, 1996).

Segundo Rand & Petrocelli (1985), a CL50 pode ser definida como a concentração estimada que produz mortalidade de 50% da população exposta ao agente tóxico por determinado período de tempo. Este período apresenta variações de acordo com a espécie-teste utilizada, situa-se geralmente entre 24 e 96 horas em testes agudos. Os testes de toxicidade aguda são frequentemente conduzidos em sistema estático, ou seja, sem renovação de água no decorrer do experimento.

Os testes de toxicidade possibilitam estabelecer limites permissíveis para várias substâncias químicas, além de avaliar o impacto de misturas de poluentes sobre os organismos aquáticos dos corpos hídricos receptores. Segundo Lombardi, (2004) os testes de toxicidade aguda são experimentos de curta duração, que proporcionam rápidas respostas em estudos sobre efeitos tóxicos. Muitas vezes, mesmo em concentrações aquáticas não letais, os agrotóxicos afetam a estrutura e a função das comunidades naturais. No ambiente aquático, os agrotóxicos provocam impactos em múltiplos níveis, incluindo moléculas, tecidos, órgãos, indivíduos, populações e comunidades (GRISOLIA, 2002).

### **3.3. Agroquímicos**

A toxicidade de um composto químico depende da exposição e suscetibilidade do organismo, das características químicas do agente e de fatores ambientais (TOMITA & BEYRUTH, 2002). O efeito esperado varia em função da concentração e do período de tempo em que uma dada concentração é mantida (HERRICKS, 2002). Os agroquímicos também são

classificados de acordo com seu poder tóxico. A maneira mais simples de se expressar a toxicidade é por meio de concentração letal CL50. No Brasil, a classificação toxicológica dos produtos agroquímicos é de responsabilidade do Ministério da Saúde e está definida na Lei 7.802/89.

### 3.3.1 Herbicida roundup ready

O herbicida roundup ready a base de glifosato (Fig. 1) é uma combinação de Sal de Isopropilamina de Glifosato 648 g/L (480 g/L equivalente ácido) água e amina de sebo polietoxilado (POEA). Agentes tensoativos tem seu mecanismo de ação através da inibição da enzima EPSPs (5-enolpiruvilchiquinato-3-fosfato-sintase), é um herbicida não seletivo que tem sido amplamente utilizado nos últimos anos. A POEA é uma substância não-iônica que é utilizada nas formulações de herbicidas para aumentar a eficácia dos ingredientes ativos e promover a penetração do herbicida em plantas (BRAUSCH & SMITH, 2007), que é mais tóxico do que o glifosato em si (GIESY *et al.*, 2000). O glifosato é rapidamente dissipado nas águas de superfície, e submetidos a biodegradação pela microflora do solo para formar  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e CO<sub>2</sub> (GIESY *et al.*, 2000).

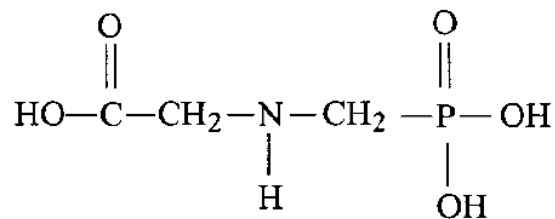


Figura 1 - Estrutura do composto glifosato (ácido N-fosfometilglicina)  
(adaptado de RODRIGUES & ALMEIDA, 2005)

O roundup ready é um herbicida pós-emergente, orgânico e não-seletivo, usado tanto em áreas agrícolas como não-agrícolas em todo o mundo. Embora seja aplicado em várias culturas nas diferentes formulações comerciais, tendo sua principal formulação o roundup da indústria Monsanto. Na agricultura são amplamente utilizados em culturas geneticamente modificadas tolerantes ao glifosato e também em jardins, quintais e outras áreas não agrícolas

(COX, 2004). Com a implementação dos transgênicos, resistentes a herbicidas seu consumo tem aumentado significativamente (CUNHA, 2005).

Este herbicida tem se mostrado com capacidade de interferir e/ou interromper o funcionamento do eixo HHI em várias espécies de peixes, como por exemplo o *Rhamdia quelen* (CERICATO *et al.*, 2008). Além do efeito tóxico, a utilização de herbicidas, no ambiente aquático para o controle de macrófitas, pode provocar efeitos adversos na morfologia dos peixes. Em *O. niloticus*, o herbicida causou proliferação das células das lamelas secundárias, hiperplasia, fusão lamelar e aneurisma na brânquia, vacuolização e picnose nuclear no fígado e dilatação do espaço de Bowman no rim (JIRAUNGKOOSKUL *et al.*, 2002).

### 3.4. Organismo teste

Os peixes são ecologicamente e economicamente importantes. Eles representam o grupo de vertebrados com diversos comportamentos e estratégias reprodutivas, e desempenham papel importante na cadeia alimentar como predadores e presas. Embora, nem sempre sejam considerados os organismos aquáticos mais sensíveis aos estressores químicos, possuem ampla variação de comportamento e habitat, que aumentam seu potencial para a exposição a substâncias químicas.

A *O. niloticus* (Fig. 2) é uma espécie de ciclídeo bem conhecida cultivada em várias regiões quentes em todo o mundo. Além disso, existe extensa literatura sobre seu comportamento e fisiologia, que os tornam relevantes como grupo de organismos testes para avaliar os efeitos biológicos de substâncias químicas tóxicas (RAND, 2008). A *O. niloticus* é o peixe com maior produção em águas doce no país, principalmente, devido à suas características de rusticidade, resistência, produtividade e boas propriedades sensoriais da carne (MAREGONI, 2006).



Figura 2 - Exemplar de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). (Foto do autor)

### 3.5. Histopatologia

Poleksic & Karan (1999) expõem a importância de estudos histopatológicos, em conjunto a outros estudos, na medida de efeitos não letais de pesticidas em peixes.

Nos peixes, as brânquias são os órgãos-alvo dos tóxicos, devido à sua grande área de interface entre o ambiente externo e interno dos peixes. Executando a troca gasosa vital função de osmorregulação íons e excreção de nitrogênio, as brânquias são particularmente sensíveis às condições ambientais adversas, e mudanças no epitélio branquial têm sido considerados bons indicadores dos efeitos dos tóxicos em peixes (JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2003).

O fígado dos teleósteos é um órgão multifuncional responsável pela conversão do alimento, produção da vitelogenina durante o crescimento gonadal e desintoxicação de compostos adversos (STEGEMAN & LECH, 1991). É considerado como o órgão central do metabolismo de tóxicos em peixes. Danos estruturais a partir dos efeitos dos poluentes sobre o metabolismo do fígado têm sido utilizados para monitorização das alterações toxicológicas específicas como um indicador biológico de lesões teciduais causadas por produtos químicos poluentes (GINGERICH, 1982). Alterações como vacuolização dos hepatócitos, depleção de glicogênio, inflamação e alteração no formato dos vasos sinusóides podem ser interpretados como respostas ao estresse ambiental, sendo, desta forma, considerados como indicadores histopatológicos da qualidade do ambiente (THOMAS, 1990; TEH *et al.*, 1997). Os hepatócitos podem ser considerados alvos primários de agentes tóxicos, o que lhes confere adequação como biomarcadores de poluição ambiental (BRAUNBECK, 1998).

Segundo Jiraungkoorskul (2003), o rim dos peixes possui por três sistemas distintos: endócrino, hematopoético e excretor. As lesões que se desenvolvem no rim podem afetar os três sistemas. Assim, são essenciais para estudar as mudanças que podem ocorrer em diferentes tipos de células. O conhecimento dos efeitos subletais de compostos agroquímicos é de suma importância para delinear o estado de saúde dos peixes e para entendimento do impacto ecológico futuro.

### 3.6. Estresse

A ocorrência de estresse na produção de peixes é inevitável, uma vez que os peixes são submetidos a inúmeros manejos e a condições ambientais muitas vezes adversas. A resposta ao estresse é uma reação do organismo a uma variedade de fatores adversos, chamados estressores, que levam a uma série de processos fisiológicos, desencadeando uma resposta integrada ao organismo que desempenha papel crucial nos processos homeostáticos. Coordenado pelo eixo HHI, o cortisol é o principal produto final, em peixes teleósteos, exercendo uma variada gama de ações fisiológicas (BARTON & IWAMA, 1991; WENDELAAR BONGA, 1997). Por esta razão sua concentração tem sido determinada no sangue de diversos peixes como fator avaliador de resposta ao estresse frente a diversos estímulos.

Esta resposta pode ser bloqueada ou diminuída por ação de tóxicos que diminuem a capacidade do tecido interrenal de produzir cortisol, ou afetam outros pontos do eixo HHI deixando o tecido interrenal sem o estímulo necessário para a síntese deste hormônio (ALURU & VIJAYAN, 2006). Uma vez que os corticosteróides possuem importante papel nos processos homeostáticos, atuando entre eles no crescimento, metabolismo, balanço hidromineral, reprodução e função imune, qualquer impacto no seu eixo neuroendócrino de controle pode potencialmente afetar o desempenho do animal (ALURU *et al.*, 2005). Devido a grande relevância fisiológica em conjunto com as alterações já encontrados no eixo HHI, esta espécie é considerada um importante biomarcador de poluição ambiental (PACHECO & SANTOS, 2001).

Este efeito deletério dos agroquímicos sobre a resposta ao estresse pode ser classificado como interrupção endócrina. Um peixe com sua resposta ao estresse prejudicada, têm sua capacidade de elevar o cortisol plasmático significativamente reduzida e assim fica fisiologicamente comprometido, não respondendo adequadamente aos estressores comuns

(HONTELA, 1998). Esta incapacidade de responder aos estressores torna o animal muito mais susceptível (PACHECO & SANTOS, 2001), o que, em nível populacional, pode diminuir a taxa de sobrevivência (HONTELA, 1998).

Um peixe com um eixo HHI comprometido é incapaz desenvolver uma resposta ao estresse adequada e elevar os seus níveis de cortisol, perdendo assim a sua capacidade de restaurar a homeostase (HONTELA, 1998). A fisiologia da sua resposta ao estresse em *O. niloticus*, tem sido bem documentada (BARCELLOS *et al.*, 1999a, 1999b; VOLPATO & BARRETO, 2001; VOLPATO *et al.*, 2004), mas poucos estudos avaliaram a desregulação endócrina do seu eixo HHI em resposta à exposição a concentrações subletais de produtos químicos.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os resultados descritos na presente dissertação foram obtidos em três experimentos distintos, Experimento 1 (teste agudo), Experimento 2 (teste crônico) e Experimento 3 (resposta de cortisol ao estresse agudo).

Todos os procedimentos experimentais realizados para os testes agudos e crônicos estão de acordo com a Norma Brasileira (NBR) da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) de 2004: ecotoxicologia aquática – toxicologia aguda – métodos de ensaio com peixes e ecotoxicologia aquática – toxicologia crônica – métodos de ensaio com peixes.

Parecer aprovado pela comissão de ética da Universidade de Passo Fundo (UPF) sob o número de 013/2012.

### 4.1. Local e período de experimentação

Os Exp. 1 e 2, foram conduzidos no Laboratório de Impacto Ambiental do Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia, do Departamento de Fitossanidade, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal. O período de realização foi de janeiro a maio de 2011.

Já o Exp. 3, foi conduzido no Laboratório de Fisiologia de peixes, nas instalações da Universidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil, durante o período de setembro a dezembro de 2011.

O processamento do material para obtenção dos preparados histológicos foi realizado no Laboratório de Patologia Animal da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo.

### 4.2. Animais e condições de manutenção

Para os Exp.1 e 2, foram obtidos alevinos de *O. niloticus*, provenientes do Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista. Foram estocados 200 animais com aproximadamente dois meses de idade ( $2,4 \pm 0,65$  g), na densidade aproximada de um

exemplar para cada dois litros de água, em reservatórios, mantidos sob fotoperíodo natural e aeração constante em tanques de amianto com capacidade de 250 L, abastecidos com água de poço artesiano. Os animais receberam alimentação à vontade com ração comercial extrusada (42% de proteína bruta, 3400 kcal/Kg).

Após período de observação os animais foram mantidos em aclimatação em uma sala de bioensaio com temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e foto período de 12 horas de luz, com aeração constante, durante 10 dias. Os peixes foram alimentados duas vezes por dia (10:00 e 16:00 h) com a mesma ração utilizada na estocagem a 5% do peso corporal. A alimentação foi suspensa 24 horas antes do início dos testes. Os restos de alimentos e fezes foram removidos diariamente por sifonagem e o volume de água sifonado foi repostado em seguida.

Para o Exp. 3 foram adquiridos alevinos de *O. niloticus*, provenientes da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Fazenda Peixe. Foram estocados 300 animais com aproximadamente dois meses de idade ( $1,45 \pm 0,15$  g), na densidade aproximada de um exemplar para cada dois litros de água, em reservatórios, mantidos sob fotoperíodo natural e aeração constante em tanques de plástico com capacidade de 6000 / L, abastecidos com água de poço artesiano. Os peixes receberam alimentação à vontade com ração comercial extrusada (42% de proteína bruta, 3400 kcal/Kg).

Após período de observação os animais foram mantidos em aclimatação em uma caixa de 1000/L com temperatura entre 22-23 °C, foto período de 12 horas de luz, com aeração constante, durante 10 dias. Os peixes foram alimentados duas vezes por dia (10:00 e 16:00 h) com a mesma ração utilizada na estocagem a 5% do peso corporal. A alimentação foi suspensa 24 horas antes do início dos testes. Os restos de alimentos e fezes foram removidos diariamente por sifonagem e o volume de água sifonado foi repostado em seguida.

### **4.3. Substância testada**

A substância testada foi o herbicida roundup ready, uma combinação de sal de isopropilamina de glifosato 648 g/L, equivalente ácido N-(fosfometil) glicina (Glifosato) 480 g/L e ingredientes inertes 594 g/L, desenvolvido para uso exclusivo em pós-emergência de variedades de soja geneticamente modificadas tolerantes ao glifosato (MONSANTO, 2003).

#### 4.4. Experimento 1

##### 4.4.1. Teste de sensibilidade com Cloreto de Potássio (KCl)

Foi realizado teste de toxicidade aguda com a substância referência KCl. Para avaliar a sanidade e a sensibilidade do lote de organismos teste. A CL50 estimada de KCl para *O. niloticus*, foi de 1,53 g/L, (limite inferior de 1,37 g/L e superior de 1,77 g/L). O valor da CL50 encontrado estava dentro do intervalo dos valores médios anteriormente obtidos para a mesma espécie, correspondente a carta controle.

Os parâmetros físico-químicos da água foram: pH - 7,0 e 8,0; oxigênio dissolvido - 6,0 e 7,0 mg/L; condutividade elétrica - 0,180 e 5,000 mS/cm; temperatura - 25 e 26 °C.

##### 4.4.2. Testes preliminares

Após a realização dos testes de sensibilidade com KCl, foram realizados testes preliminares com o glifosato para determinar o intervalo de concentração que a substância causa zero e 100% de mortalidade. Os testes foram realizados com a utilização de seis concentrações do herbicida (0,5 e 10 mg/L) e um tratamento controle, com três repetições em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Utilizou-se três peixes em cada repetição, na densidade máxima de 1 g/L de água, com volume total de três litros (Fig. 3). Os testes foram conduzidos por 48 horas em sistema estático, sem substituição, sifonagem de água e alimentação dos animais. A avaliação da mortalidade foi diária, com a retirada dos peixes mortos dos recipientes.

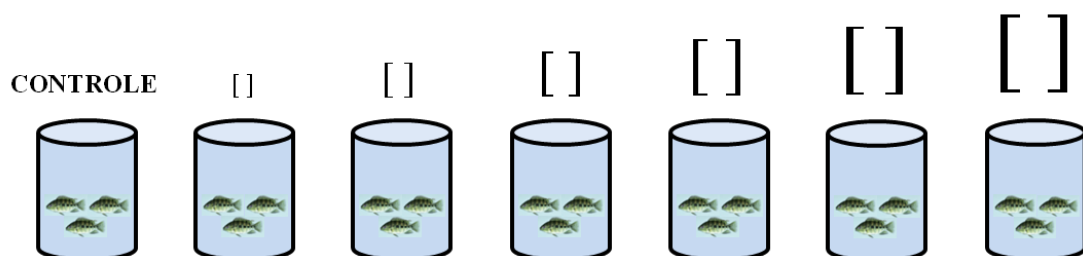


Figura 3 - Esquema gráfico da fase preliminar do teste agudo

Os parâmetros físico-químicos da água permaneceram entre: pH - 7,0 e 8,0; oxigênio dissolvido - 6,0 e 7,0 mg/L; condutividade elétrica - 0,180 e 0,190 mS/cm; temperatura - 25 e 26 °C.

#### 4.4.3. Testes definitivos

A partir dos resultados obtidos nos testes preliminares foram realizados dois testes definitivos. As concentrações utilizadas foram 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 mg/L e um controle (testemunha), com três repetições de cada concentração (Fig. 4). Ao final de 48 horas de exposição, com os dados de mortalidade, foi calculada a CL50 para 48h com o programa Trimmed Spearman Karber (HAMILTON *et al.*,1977).

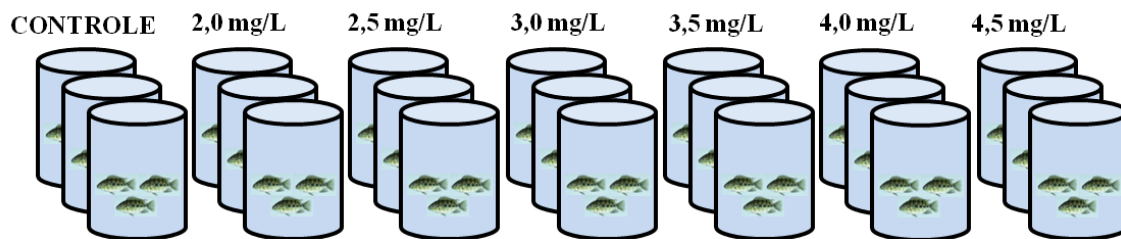


Figura 4 - Esquema gráfico da fase definitiva do teste agudo

Os procedimentos utilizados na condução no teste definitivo foram os mesmos empregados nos testes preliminares. As condições ambientais iniciais foram: pH entre 7,0 e 8,0; oxigênio dissolvido entre 4,0 e 5,0 mg/L; condutividade elétrica entre 0,180 e 0,190 mS/cm; dureza entre 40,0 a 60,0 mg/L CO<sub>3</sub>; alcalinidade entre 180,0 e 200,0 mg/L CaCO<sub>3</sub>; temperatura da sala de bioensaio entre 25 e 28 °C; e a temperatura das unidades experimentais entre 24 e 26 °C.

Para a realização da avaliação histopatológica, três animais sobreviventes de cada concentração testada agudamente, foram eutanasiados em banho de imersão com benzocaína (0,2 g/L de água). Os fragmentos de tecidos de brânquia, fígado e rim foram coletados e imersos em solução fixadora de formoldeído (10%) por 24 horas.

#### 4.5. Experimento 2

Com os resultados obtidos da CL50-48h para o glifosato, realizou-se três testes crônicos com duração de 14 dias (NESKOVIC, *et al.*, 1996), utilizando concentrações subletais, de 1%, 2%, 10%, e 20% do herbicida glifosato referente a CL50-48h e um controle (testemunha), com três repetições para cada concentração, contendo um peixe em cada recipiente (Fig. 5), como recomendado por Lombardi (2004).

Realizou-se aferições diárias quanto aos parâmetros de qualidade de água, retirada dos animais mortos. Os peixes receberam a mesma ração utilizada na estocagem e a porção utilizada na aclimação a cada dois dias. As condições ambientais iniciais foram: pH entre 7,0 e 8,0; oxigênio dissolvido entre 5,0 e 7,0 mg/L; condutividade elétrica entre 0,180 e 0,200 mS/cm; temperatura da sala de bioensaio entre 25 e 28 °C; e a temperatura das unidades experimentais entre 24 e 26 °C.

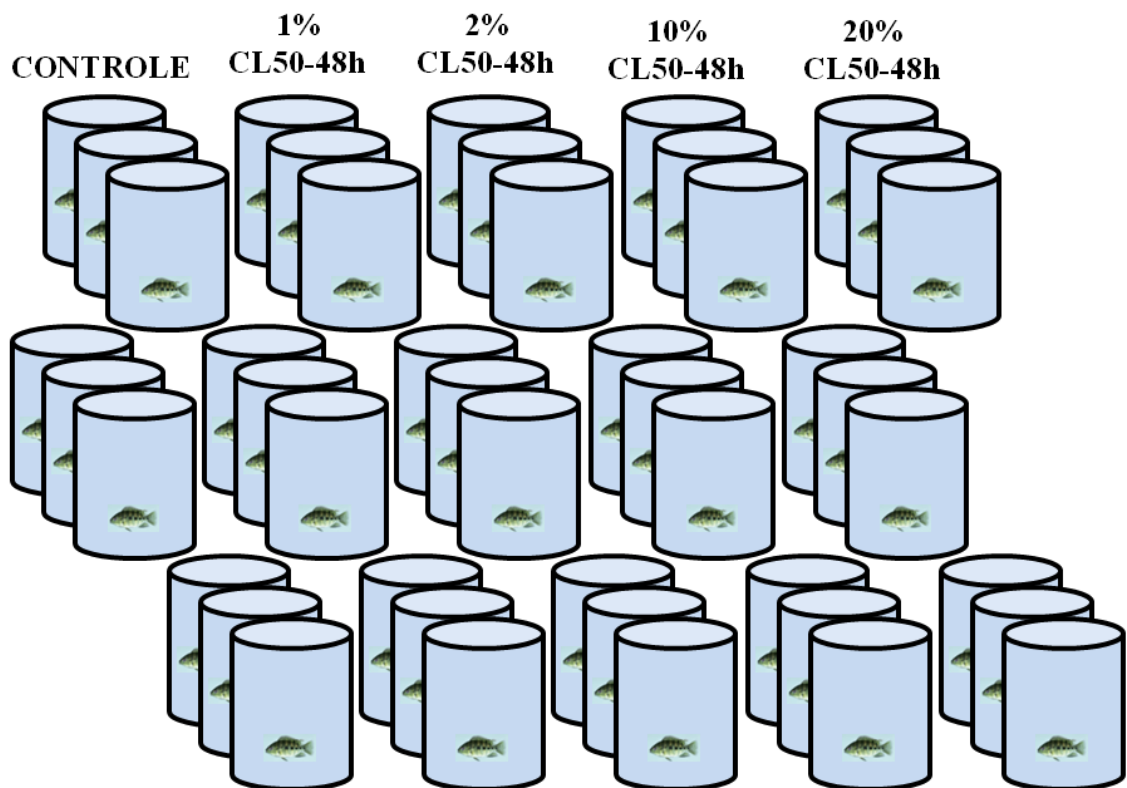


Figura 5 - Esquema gráfico do teste crônico

Recolheu-se material de três animais sobreviventes para a realização da avaliação histopatológica, procedeu-se com eutanásia em banho de imersão com benzocaína (0,2 g/L de água). Os fragmentos de tecidos de brânquia, fígado e rim foram coletados e imersos em solução fixadora de formoldeído (10%) por 24 horas.

#### **4.6. Histopatologia de brânquia, fígado e rim**

Após a fixação, os fragmentos foram submetidos à desidratação, diafanização e inclusão em parafina para a obtenção dos cortes em micrótomo com 5 µm de espessura. A seguir, foi realizada a coloração com hematoxilina-eosina (HE). Fragmentos de rim foram corados também com o Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Vermelho Congo (BEHMER *et al.*, 1976). Mudanças nos tecidos induzidas pelo herbicida glifosato, foram avaliadas e classificadas, nota: 0 = ausente; + = pouco frequente (leve); ++ = frequente (moderado); +++ = muito frequente (acentuado).

#### **4.7. Experimento 3**

Testamos o efeito de concentrações subletais, de 1%, 2%, 10% e 20% da CL50-48h do herbicida roundup ready, utilizando 10 alevinos por tanque experimental, contendo 95/L de água livre de cloro, tendo 3 repetições por tratamento (Fig. 6). A densidade foi de 0,15 g/L, realizado em sistema estático, com monitoramento diário da qualidade da água.

Foram realizados 10 tratamentos, a saber: controle (alevinos mantidos em água limpa, sem herbicidas e sem estressor), estressado (alevinos mantidos em água limpa, sem glifosato, mas foram submetidos a um tratamento de estresse agudo após 47 h, perseguição com puçá durante 1 min) (BARCELLOS *et al.*, 1999a), herbicida roundup ready (alevinos mantidos em água contendo concentrações subletais do herbicida, correspondente a 1%, 2%, 10%, e 20% da CL50-48h, conforme determinado no teste anterior, mas sem aplicação de um estressor), herbicida roundup ready + estresse (alevinos foram mantidos em água contendo as mesmas concentrações subletais de roundup ready e também foram submetidas a estressor agudo após 48 h de exposição).

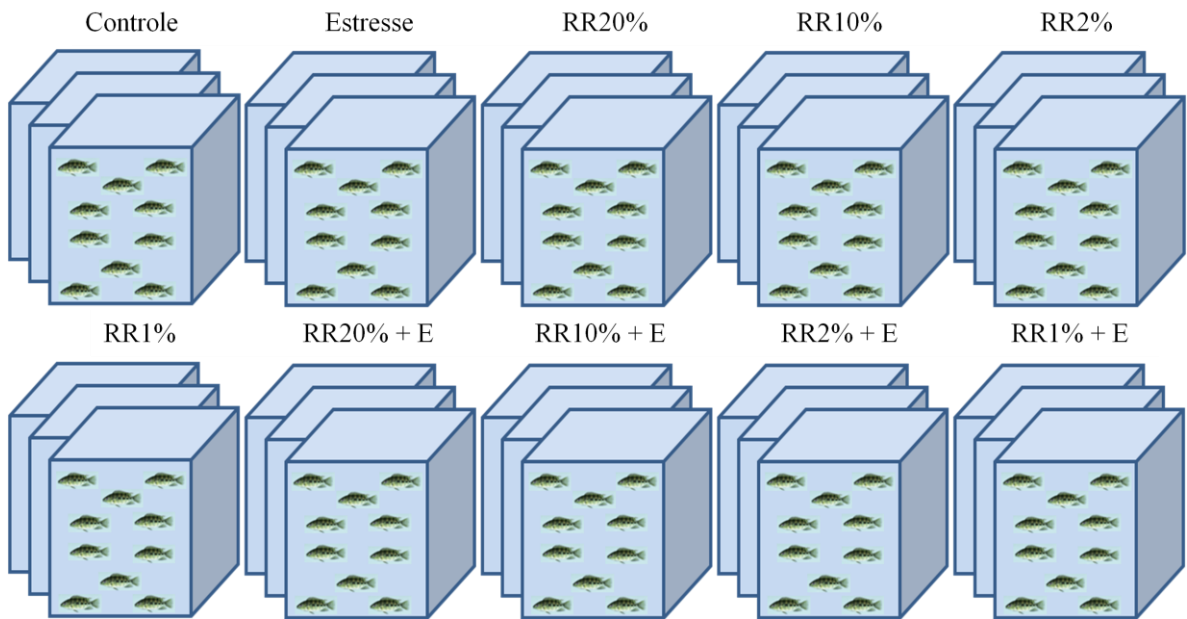


Figura 6 - Esquema gráfico do teste de resposta ao estresse agudo

Todos os peixes foram amostrados 1 h após a aplicação de estresse, como os estudos anteriores indicaram que o pico dos níveis de cortisol acontece neste momento para tilápia do nilo (BARCELLOS *et al.*, 1999a).

#### 4.7.1. Extração e determinação do cortisol de corpo inteiro

Para extração do cortisol de corpo inteiro, os peixes foram capturados e imediatamente abatidos por choque térmico, em seguida congelados em nitrogênio líquido durante 10-30s, após foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até extração do cortisol. O período de tempo entre a captura e insensibilização foi mantida em média de 30s, impedindo uma possível resposta de estresse de manipulação.

O cortisol foi extraído do corpo inteiro como descrito por Sink *et al.* (2007). Cada peixe foi pesado, triturado, colocado dentro de um tubo com 2 mL de tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4) durante 6 min. Este conteúdo foi transferido para um tubo de ensaio de 10 ml com rosca, acrescentando 5 mL de éter etílico. Este tubo foi agitado em vórtex, durante 1 min e após centrifugação durante 10 min a 3000 rpm foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido. A porção descongelada (contendo cortisol e éter etílico) foi decantada e transferida

para um novo tubo, onde foi completamente evaporado, obtendo-se um extrato contendo o cortisol, que foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

O extrato foi re-suspenso em 1 ml de PBS. E o cortisol foi determinado em duplicata, utilizando um teste disponível comercialmente Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit (EIAgen teste CORTISOL™, Biochem ImmunoSystems). Este kit foi totalmente validado para extratos de tecidos de tilápia do Nilo, utilizando uma metodologia proposta por Sink et al. (2008). Para testar a linearidade e paralelismo, diluições em série de extratos de tecido foram realizadas no tampão fornecido pelo kit. As diluições foram realizadas nas mesmas proporções dos diferentes padrões do kit e o paralelismo entre essas duas curvas foi avaliado, demonstrando uma forte correlação positiva entre as curvas ( $R^2 = 0,8918$ ).

#### **4.7.2. Estatística**

A média  $\pm$  S.E.M. ( $n = 6-10$ ) concentração de cortisol foi calculada para cada grupo de tratamento. A análise de variância (ANOVA) foi usado para comparar os níveis de cortisol de peixes nos grupos de tratamento diferentes, e teste de Tukey foi utilizado para testar as diferenças significativas ao nível de significância de 0,05. Para determinar se os dados atenderam aos pressupostos desses testes paramétricos, teste de Hartley foi realizado para verificar a homogeneidade das variâncias, e teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a normalidade dos dados. Os dados foram transformados em log, quando necessário. Todas as análises de dados foram realizados utilizando Graph Pad InStat 3,00 pacote estatístico (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Experimento 1

Nos testes de toxicidade aguda (CL 50-48h) não ocorreu mortalidade no grupo controle. *O. niloticus* expostas ao herbicida roundup ready, nas concentrações mais elevadas (4,0 e 4,5 mg/L) apresentaram 100% de mortalidade durante o período de exposição, enquanto peixes expostos as menores concentrações (2 e 2,5 mg/L) permaneceram com 0% mortalidade. A CL50-48h do herbicida na formulação roundup ready foi de 2,94 (2,77 mg/L e 3,13 mg/L), sendo considerado moderadamente tóxico (ZUCKER, 1985), com letalidade maior que 10% na concentração de 3 mg/L. Na figura 7 encontra-se a representação gráfica da mortalidade dos organismos nas diferentes concentrações de glifosato.

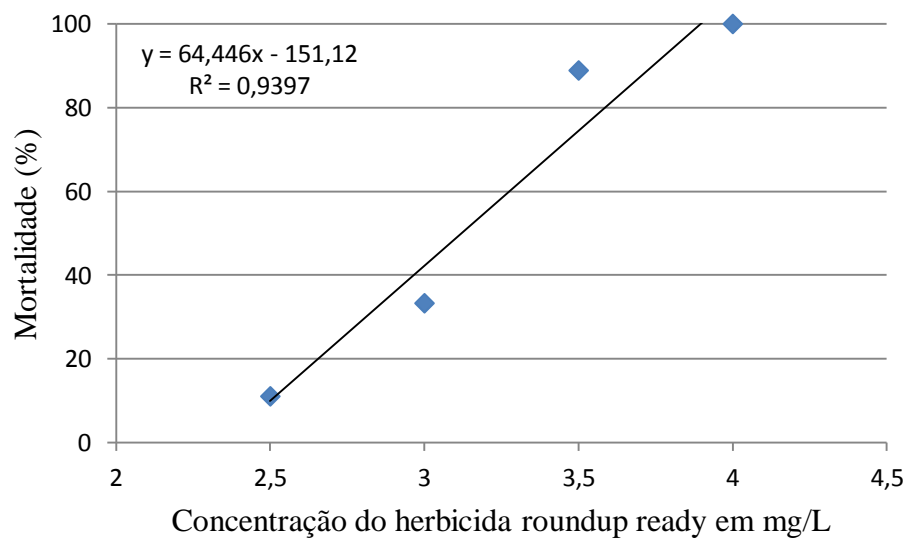


Figura 7 - Relação da concentração-mortalidade nos testes de toxicidade aguda do glifosato para *O. niloticus*.

### 5.2. Experimento 2

Não ocorreu mortalidade no grupo controle, e aparentemente os animais não demonstraram alteração no comportamento. Os peixes expostos as diferentes concentrações

subletais de glifosato, eram menos ativos, e alguns permaneceram inertes junto ao fundo dos aquários. Houve mortalidade (Tab. 1), em todas as concentrações ao final dos 14 dias.

Tabela 1 – Relação da concentração-mortalidade no teste de toxicidade crônica do herbicida roundup ready para *O. niloticus*.

	0 dia	03 dias	06 dias	09 dias	11 dias	14 dias	TOTAL
CONTROLE	-	-	-	-	-	-	0
1% CL50-48h	-	-	-	-	-	6,25%	6,25%
2% CL50-48h	-	-	-	-	10,41%	20,84%	31,25%
10% CL50-48h	-	-	-	-	-	17,64%	17,64%
20% CL50-48h	-	-	-	-	10%	10%	20%

### 5.3. Histopatologia, testes agudo e crônico

Nas análises histopatológicas, as lesões ocasionadas pelo herbicida tanto na exposição aguda (Fig. 8) como crônica (Fig. 09), foram encontradas nos rins (Tab. 2), nos fígados (Tab. 3) e nas brânquias (Tab. 4), sequencialmente primeiro apareceram lesões renais, seguidas de lesões hepáticas e nas brânquias, as quais sugerem intoxicação. No grupo controle não foram observadas alterações histológicas.

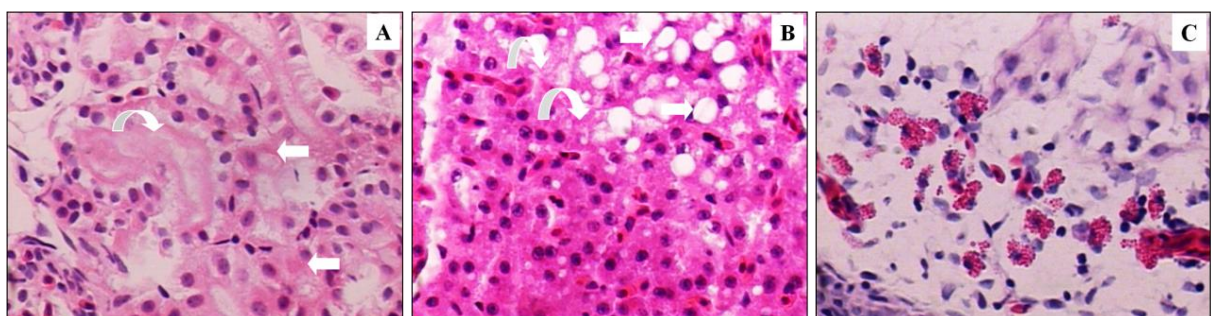


Figura 8 - Fotomicrografia do tecido renal, hepático e branquial de *O. niloticus* após exposição aguda ao glifosato. (A) Rim, 2,0 mg/L. Nefrose, presença de material homogêneo intensamente eosinofílico no citoplasma de células epiteliais tubulares degeneradas e necróticas (setas), além de cilindro hialino (seta curva) no lúmen tubular (HE, 400x). (B) Fígado, 3,5 mg/L. Foco de degeneração hepatocelular (setas) associada à necrose (setas curvas) (HE, 400x). (C) Brânquias, 3,5 mg/L. Infiltrado eosinofílico (HE, 400x).

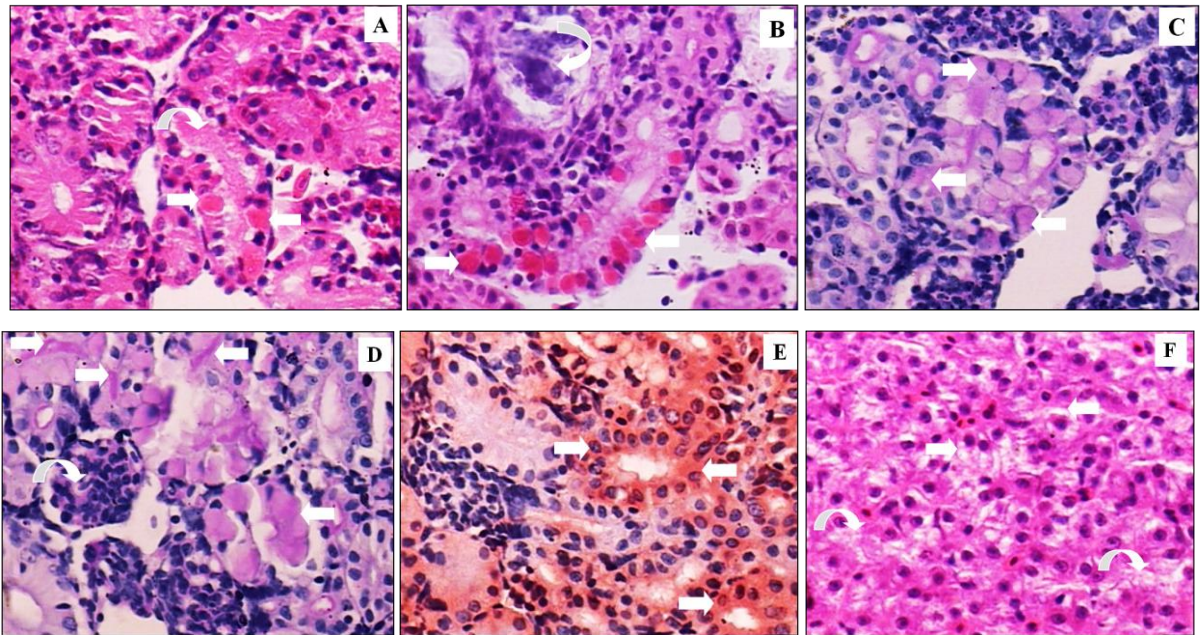


Figura 9 - Fotomicrografia do tecido renal e hepático de *O. niloticus* após exposição crônica ao herbicida roundup ready. (A) Rim 20% CL50-48h, nefrose, presença de material homogêneo intensamente eosinofílico no citoplasma de células epiteliais tubulares degeneradas e necróticas (setas), além de cilindro hialino no lúmen tubular (seta curva) (HE, 400x). (B) Rim 10% CL50-48h, nefrose, presença de material homogêneo intensamente eosinofílico no citoplasma de células epiteliais tubulares degeneradas e necróticas (setas), além de calcificação distrófica (seta curva) (HE, 400x). (C) Rim 20% CL50-48h, nefrose, células epiteliais tubulares PAS positivas (setas) (PAS, 400x). (D) Rim 20% CL50-48h, células epiteliais tubulares PAS positivas (setas), além do glomérulo e dos cilindros (seta curva) (PAS, 400x). (E) Rim 10% CL50-48h, nefrose, células epiteliais tubulares intensamente coradas com o Vermelho do Congo, (400x). (F) Fígado 10% CL50-48h, degeneração hepatocelular (setas) difusa moderada a severa associada à necrose (setas curvas) (HE, 400x).

Tabela 2 - As alterações histológicas encontrada nos rins de *O. niloticus* após a exposição aguda (48h) e crônica (14 dias) para o herbicida roundup ready, danos ao tecido e frequência de ocorrência.

Alterações	Exposição Aguda				Exposição crônica			
	2,0 mg/L	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	1 % (CL 50-48h)	2 % (CL 50-48h)	10 % (CL 50-48h)	20 % (CL 50-48h)
<b>Degeneração</b>	++	+	+	+	+	++	+++	++
<b>Necrose</b>	++	+	+	+	+	++	+++	++
<b>Calcificação distrófica</b>	0	0	0	0	0	0	++	0
<b>Gotículas hialinas citoplasmáticas</b>	+	0	0	+	0	+	0	0
<b>Nefrite supurativa</b>	0	0	0	0	0	0	+	0

Nota: 0 = ausente; + = pouco frequente (leve); ++ = frequente (moderado); +++ = muito frequenete (acentuado).

Tabela 3 - As alterações histológicas encontrada nos fígados de *O. niloticus* após a exposição aguda (48h) e crônica (14 dias) para o herbicida roundup ready, danos ao tecido e frequência de ocorrência.

Alterações	Exposição Aguda				Exposição crônica			
	2,0 mg/L	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	1 % (CL50-48h)	2 % (CL50-48h)	10 % (CL50-48h)	20 % (CL50-48h)
<b>Congestão</b>	0	0	0	++	0	0	0	0
<b>Hemorragia</b>	0	0	0	+	0	0	0	0
<b>Degeneração</b>	++	+++	++	++	+	++	+++	+++
<b>Necrose</b>	+	+	+++	+	0	+	+	+
<b>Colestase</b>	0	0	0	0	0	0	+	++

Nota: 0 = ausente; + = pouco frequente (leve); ++ = frequente (moderado); +++ = muito frequenete (acentuado).

Tabela 4 - As alterações histológicas encontrada nas branquias de *O. niloticus* após a exposição aguda (48h) e crônica (14 dias) para o herbicida roundup ready, danos ao tecido e frequência de ocorrência.

Alterações	Exposição Aguda				Exposição crônica			
	2,0 mg/L	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	1 % (CL50-48h)	2 % (CL50-48h)	10 % (CL50-48h)	20 % (CL50-48h)
<b>Congestão</b>	0	++	+++	+++	++	+++	+++	+++
<b>Hemorragia</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Infiltrado eosinofílico</b>	+	+	+	++	+	++	+	++
<b>Infiltrado monuclear</b>	0	++	0	0	0	0	0	0
<b>Infiltrado neutrocitário</b>	0	+	0	0	0	0	0	0
<b>Inflamação supurativa</b>	0	0	0	+	0	0	0	0
<b>Presença de mastócitos</b>	0	0	0	+	0	0	0	0

Nota: 0 = ausente; + = pouco frequente (leve); ++ = frequente (moderado); +++ = muito frequenete (acentuado).

### 5.3. Experimento 3

Através dos níveis de cortisol do corpo inteiro, os peixes expostos a concentrações subletais do herbicida glifosato e submetidos a um estressor, foram (Fig. 10) de  $32,09 \pm 2,99$  ng/ml no grupo controle e  $60,57 \pm 8,52$  ng/ml no grupo estresse.

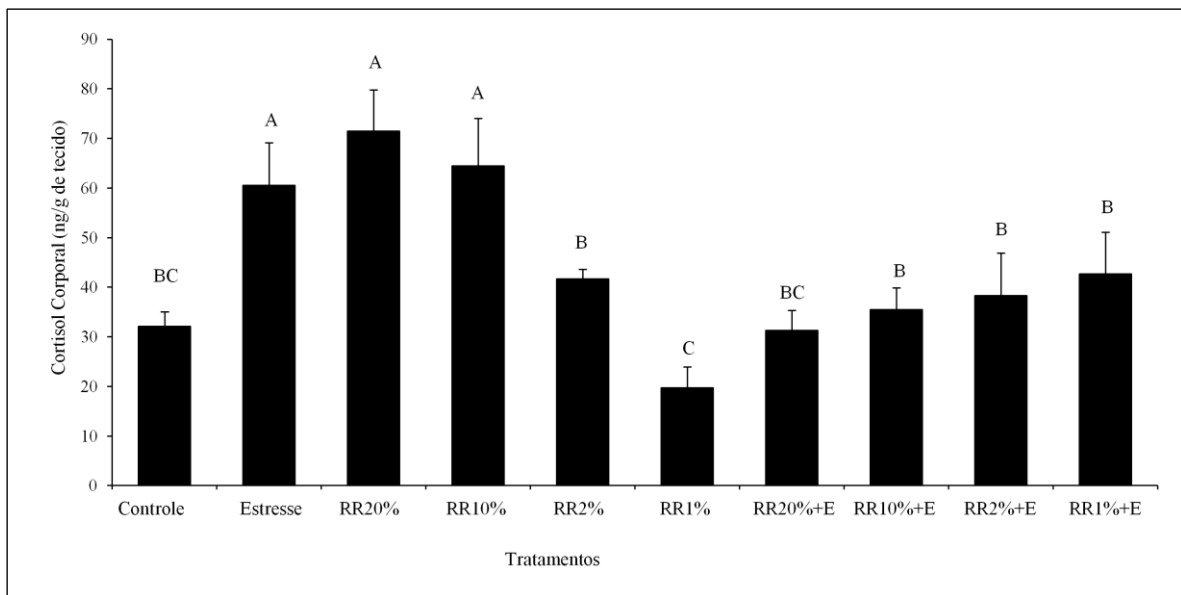


Figura 10 - Níveis de cortisol do corpo inteiro em *O. niloticus* submetidos ou não ao estresse agudo (E) após exposição aguda (48 h) ao herbicida roundup ready (RR). Os dados foram expressos como média  $\pm$  S.E.M.. Letras maiúsculas diferentes acima do histogramas indica diferença estatística por ANOVA, seguido por vários testes de Tukey. ( $P < 0,0001$ ,  $n = 10$ ).

As maiores concentrações subletais de glifosato (10% e 20% de CL50-48h), resultaram em um aumento significativo nos níveis de cortisol, com concentrações semelhantes as observadas no grupo estressado. Quando um estressor adicional agudo foi aplicado após exposição ao herbicida nas concentrações de 1%, 2%, 10% e 20% da CL50-48h, os peixe apresentaram níveis de cortisol significativamente inferiores aos dos peixes somente expostos a estresse, mostrando que o glifosato atenua a resposta do cortisol.

## 6. DISCUSSÃO

A CL50-48h (2,94 mg/L) do herbicida roundup ready a base de glifosato, calculada neste estudo é muito menor do que foi anteriormente relatado. Destacando o trabalho de Ayoola (2008), que utilizou tilápia-do-nilo com peso médio de 15 g, e encontrou uma concentração de CL50/96h menor (1,05 mg/L) do que a encontrada no presente estudo. Por exemplo, Jiraungkoorskul *et al.* (2002), utilizou a mesma espécie e obteve uma CL50-48h de 17,1 mg/L para alevinos de tilápia, sendo que o peso dos peixes utilizado por este autor (1,69 + 0,31 g) foi muito próximo ao utilizado no presente estudo (1,45 ± 0,15 g) e portanto a hipótese é que esta diferença pode ser devido as diferentes formulações utilizadas de herbicidas a base de glifosato.

A CL50 é um dado muito importante para a avaliação de toxicidade de uma substância, porém, nem todos os pesticidas provocam morte imediata dos peixes e doses subletais podem causar outros distúrbios à saúde desses animais. Portanto as alterações histológicas em tecidos de peixes constituem ferramenta sensível para detectar os efeitos tóxicos diretos de compostos químicos em órgãos-alvo, sendo indicadores potentes da exposição prévia a estressores ambientais (HINTON *et al.*, 1992; SCHWAIGER, *et al.*, 1997). A morte dos peixes pode ter ocorrido, por envenenamento direto ou indireto, devido ao efeito tóxico do glifosato sobre as brânquias ou mesmo por ambos (AYOOLA, 2008).

Na exposição crônica, a morte dos organismos, iniciou aos onze dias de exposição, com maior letalidade nas maiores concentrações e ao final dos quatorze dias, a letalidade foi de 6,25 % (1% CL50-48h), 31,24 % (2% CL50-48h), 17,64 % (10% CL50-48h) e 20 % (20% CL50-48h) sendo que alguns animais ficavam inertes no fundo dos aquários. Jiraungkoorskul, *et al.* (2003), utilizando uma concentrações bem maiores de 5 e 15 ppm, durante 3 meses não documentou mortalidade.

Os peixes expostos a concentrações agudas de 2,0, 2,5, 3,0, 3,5 mg/L e crônicas em concentrações subletais de 0,029 mg/L (1% CL50-48h), 0,058 mg/L (2% CL50-48h), 0,294 mg/L (10% CL50-48h), 0,588 mg/L (20% CL50-48), apresentaram alterações histopatológicas nas brânquias nos fígados e nos rins.

Nas brânquias após exposição crônica observamos congestão, hemorragia e infiltrado eosinofílico. Além destes na exposição aguda foi detectado infiltrado mononuclear, infiltrado neutrocitário, inflamação supurativa e presença de mastócitos. Todas essas lesões podem comprometer a função do sistema respiratório (JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2002).

Neskovic *et al.* (1996) também realizaram testes com herbicidas a base de glifosato, utilizando carpas (*Cyprinus carpio*) expostas a 10 mg/L de glifosato por 14 dias, encontraram nas brânquias, hiperplasia epitelial e edema subepitelial. Jiraungkoorskul, *et al.* (2003), recolheram dados durante todo o período de exposição para avaliar a evolução das lesões, tendo basicamente as mesmas lesões durante todo período somente com progressão da extensão das lesões, espessamento do epitélio lamelar primário, acúmulo de eritrócitos, áreas de edema e perdas das pontas nas lamelas secundárias.

Nos fígados as alterações histológicas manifestaram-se de forma mais agressiva, com lesões degenerativas e necrose após exposição aguda e além destas colestase na exposição crônica. A congestão de sinusóides, além do início de fibrose, foi uma alteração relatada por Neskovic *et al.* (1996). A degeneração representa uma das lesões mais graves, que embora reversível, pode impedir as funções desempenhadas pelo fígado, uma vez que a área de tecido metabolicamente ativa vai ser menor (LANGIANO & MARTINEZ, 2008). Em casos de intoxicação tem sido relatadas, degenerações e necroses, que levam a um desequilíbrio entre a taxa de síntese de uma substância nas células e a sua liberação na circulação sistêmica (GINGERICH, 1982).

Nos rins encontramos degeneração, necrose e gotículas hialinas citoplasmáticas. Em seu estudo, Jiraungkoorskul, *et al.* (2002), também encontraram acúmulo de gotículas hialinas nas células tubulares e dilatação do espaço de Bowman. As gotículas hialinas sugerem ser um indicador de toxicidade renal, pois sua deposição representa reabsorção de proteína do filtrado glomerular (CHAUDHURI *et al.*, 1999).

As avaliações histopatológicas realizadas tanto após exposição aguda como crônica, indicam que os fígados e os rins foram os órgãos mais afetados pelo tóxico, com menor relevância nas brânquias, mas sabido que houve comprometimento da eficiência nas trocas gasosas, pela morte ocasionada pela exposição ao tóxico, também descrito por Ayoola (2008).

O herbicida roundup ready provocou um aumento nos níveis de cortisol quando aplicado em concentrações de 10% e 20% da CL50-48h. É interessante considerar que a exposição a este herbicida provocou um aumento nos níveis de cortisol mesmo na ausência de um estressor padrão, indicando ser estressante nestas concentrações. A toxicidade do glifosato é considerada baixa, tais como roundup ready são mais tóxicos, que o glifosato isolado devido à presença de agentes tensesoativos como POEA (GIESY *et al.*, 2000). Estudos anteriores demonstraram que roundup produto a base de glifosato, induz estresse em *Rhamdia quelen* (SOSO *et al.*, 2007; CERICATO *et al.*, 2008), e também danos oxidativos em tecidos de

algumas espécies de peixes, incluindo *Prochilodus lineatus* (LANGIANO & MARTINEZ, 2008) e *Rhamdia quelen* (FERREIRA *et al.*, 2010).

Em todas as concentrações houve inibição da elevação do cortisol em resposta ao estresse. Pesquisas anteriores mostram que os herbicidas à base de glifosato são realmente desreguladores de eixos endócrinos, tanto o eixo HHI (CERICATO *et al.*, 2008; 2009) como o eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal (HHG) (SOSO *et al.*, 2007). Entretanto em *Rhamdia quelen*, apenas as concentrações superiores a 33,3% da CL50 resultaram na interrupção HHI (CERICATO *et al.*, 2008). Vários fatores podem influenciar na toxicidade do herbicida, entre eles a susceptibilidade dos eixos neuroendócrinos, os produtos químicos, a espécie de peixe, idade, estado fisiológico e as condições ambientais (NORRIS, 2000).

Um dos possíveis mecanismos de ação na desregulação do eixo HHI, pode ser ação direta sobre o tecido interrenal. Jiraungkoorskul *et al.* (2002, 2003) encontraram várias lesões disseminadas por todo o rim em tilápias expostas a herbicida à base de glifosato, e por conseguinte, é razoável assumir que o tecido interrenal, que está localizado no rim, também pode ser lesado, o que pode resultar em perda da sua capacidade de sintetizar e secretar o cortisol. No entanto, Jiraungkoorskul *et al.* (2002, 2003) usaram concentrações muito mais altas de glifosato em tempo de exposição muito maiores (3 meses) do que as aplicadas no presente estudo. Também não podemos descartar a possibilidade de que esse efeito possa ocorrer, desregulando o eixo HHI em pontos superiores, como foi visto em *Rhamdia quelen*, quando desafiados com hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (CERICATO *et al.*, 2009).

Tendo uma elevação de cortisol dos peixes expostos a concentrações subletais, demonstrar uma possível perda do eixo HHI quando submetidos a estresse agudo. Esta perda de resposta do eixo HHI após um período de exposição crônica foi verificada em várias espécies de peixes (BARTON, 2002), incluindo a *O. niloticus* (BARCELLOS *et al.*, 1999a). No entanto, uma vez que foram medidos valores de cortisol após 48h de exposição, esta hipótese supõe que os valores de cortisol aumentaram durante todo o período de quatro dias. Além disso, o período de 48h parece ser muito curto para resultar em uma resposta "crônica".

Independentemente do mecanismo pelo qual o glifosato afetou a resposta de cortisol, os peixes perderam a sua capacidade de elaborar uma resposta adequada para responder ao estressor padrão e restaurar a homeostase. Esta inibição pode reduzir a capacidade do organismo em promover ajustes metabólicos e iônicos necessárias para a resposta de estresse. Conforme descrito por Brodeur *et al.* (1997), tanto no aquário quanto na natureza os peixes submetidos aos herbicidas à base de glifosato são incapazes de montar uma resposta normal



de cortisol, apresentam capacidade reduzida de responder aos constantes desafios impostos aos seus sistemas homeostáticos, por práticas de aquicultura ou por mudanças ambientais.

Herbicidas como o glifosato são geralmente utilizados diretamente em viveiros de peixes e em corpos d'água naturais para controlar ervas daninhas. Concentrações de 100 mg/L são utilizadas para pulverizações de lavouras (MONSANTO, 2003), sendo muito maiores do que a concentração que corresponde a 1% da CL50-48h. Mesmo quando o herbicida glifosato não é usado diretamente nos tanques, ele pode facilmente entrar em corpos de água em pequenas concentrações (como 0,0294 mg/L, que corresponde a 1% da CL50-48h) através de lixiviação ou acidentalmente (SOUMIS *et al.*, 2003).

Portanto, uma vez que a *O. niloticus* teve sua resposta de estresse inibida ao herbicida roundup ready em concentrações tão baixas como 1% da CL50-48h, cuidados devem ser tomados para impedir que estes produtos químicos entrem em contato com os peixes, evitando a sua utilização direta nos tanques para o controle de plantas e algas, construindo barreiras para evitar que a água seja lixiviada dos campos de cultura que usam estes herbicidas, prevenindo acidentes e evitando que as embalagens destes produtos sejam lavados perto das lagoas.

## 7. ARTIGO

### **Cortisol response in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) acutely exposed to a glyphosate-based herbicide**

Gessi Koakoski<sup>1</sup>, Claudinei da Cruz<sup>2</sup>, Daniela Rodrigues Silva<sup>2</sup>, Silvia Patrícia Carraschi<sup>2</sup>, Murilo Sander de Abreu<sup>3</sup>, Luiz Carlos Kreutz<sup>3</sup>, Leonardo José Gil Barcellos<sup>3\*</sup>

- <sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil;
- <sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Aquicultura de Águas Continentais, Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, CAUNESP, Jaboticabal, Brazil;
- <sup>3</sup> Universidade de Passo Fundo (UPF), Curso de Medicina Veterinária. Campus I, Bairro São José, Caixa Postal 611, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS, Brazil;

\* Corresponding author: Dr. L.J.G Barcellos

Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária Campus I, Cx Postal 611, Bairro São José

CEP 99001-970 – Passo Fundo – RS – Brasil

Tel: +55 54-316-8100

Fax: +55 54-316-8487

E-mail: [lbarcellos@upf.br](mailto:lbarcellos@upf.br)

CNPq fellowship (302073/2011-6).

#### **Abstract**

We investigated the endocrine disrupting effects of a glyphosate-based herbicide. Initially, the 96 h LC<sub>50</sub> values of the tested herbicide in fingerlings of *Oreochromis niloticus* were determined to be 2.94 mg L<sup>-1</sup> (confidence interval 2.77 – 3.13 mg L<sup>-1</sup>). In the 2<sup>nd</sup> experiment, fish were acutely exposed to four sub-lethal concentrations of the glyphosate-based herbicide (1, 2, 10 and 20% of the calculated LC50) and to these concentrations plus an acute stressor

applied in the hour 96h. Control and only stressed groups were also performed. Whole-body cortisol levels found in the control fingerlings was  $32.09 \pm 2.99 \text{ ng mL}^{-1}$  and in the stress group was  $60.57 \pm 8.52 \text{ ng mL}^{-1}$ . The presence of the highest sub-lethal concentrations of glyphosate (10 and 20% of LC50) provoked an increase in the cortisol level ( $P < 0.0001$ ) in fingerlings exposed to it, which was similar to the value verified in the stressed fishes, but higher than that of the control ones. The concentrations of 20%, 10% and 1% of LC50) of the agrichemical attenuated the cortisol response to an acute additional stressor, with the cortisol values lower than those found in the stressed fish in clear water ( $P < 0.0001$ ). We concluded that the tested glyphosate-based herbicide triggers a cortisol elevation at concentrations of 10 and 20% of the LC50 in Nile tilapia fingerlings. Also, that the concentrations of 1, 10 and 20% of the LC50 provoke an impairment of cortisol elevation when combined with an acute stressor. Since glyphosate-based herbicides are widely used in agricultural fields and commonly applied in fish ponds to control algae and plant growth, our results points to necessity of extreme care in use of these compounds in order to prevent deleterious effects in fish homeostasis.

*Key words:* endocrine disruption, glyphosate, HPI axis, Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, stress response

## 1.Introduction

Both in the nature and in aquacultural conditions, fish may be confronted with situations that broken the homeostasis of its organism. The factors that provoke these situations are generally termed as stressors and the response mounted by the organism to cope with these stressors and restore the homeostasis is named as stress response. Thus, this response, coordinated mainly by the hypothalamus-pituitary-interrenal axis (HPI), is a key adaptative mechanism to maintain and restore homeostasis (as reviewed by Barton and Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997 and Barton, 2002).

In addition, is relatively common that natural or constructed water bodies receive small concentrations of chemical contaminants trough lixiviation from agriculture fields cultivated near to these water bodies, trough accidents during product transportation and/or trough its use directly in fish ponds, rivers or lakes, as its the case of glyphosate-based herbicides used to control the massive growth of weeds, plants and algae.

These chemicals, as the glyphosate-based herbicides might interfere and disrupts the functioning of HPI axis, as showed in several fish species, as *R. quelen* (Cericato et al., 2008). A fish with a compromised HPI axis is incapable to mount an adequate stress response and elevates cortisol and consequently losses its capacity to restore its homeostasis (Hontela, 1998).

The Nile tilapia is a well known cichlidae species, cultured around the world in warm and hot regions. Its stress response is well documented (Barcellos et al., 1999a; 1999b; Volpato and Barreto, 2001; Volpato et al., 2004), despite the great amount of scientific information about the physiology and production aspects, few studies are conducted aiming to evaluate the endocrine disruption of its HPI axis in situations of sub-lethal contaminations of chemicals (Ilan and Yaron, 1983; Correia et al., 2010).

A glyphosate-based herbicide was choosing to challenge Nile tilapia due to its extensive use in agriculture and in fish culture ponds as well in large creeks to control weeds, plants and algae. The compound used was a combination of isopropylamine (IPA) salt of glyphosate 480 g L<sup>-1</sup>, water and polyethoxylated tallow amine surfactant, POEA. The surfactant POEA is a non-ionic substance used in herbicide formulations to increase the efficacy of active ingredients and promotes penetration of herbicide into plant cuticles (Brausch and Smith, 2007), but is more acutely toxic than the glyphosate itself (Giesy et al., 2000). This herbicide is non-selective and has been widely used in recent years. The glyphosate formulations are rapidly dissipated from the surface waters, and undergo biodegradation by the soil microflora to form  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) and CO<sub>2</sub> (Giesy et al., 2000).

In this work we determine the lethal concentration of the tested glyphosate-based herbicide and the effect of an acute exposure (96h) to sublethal concentrations of 1, 2, 10 and 20% of this LC<sub>50</sub> in the acute stress response of Nile tilapia fingerlings.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Fish and aquaria**

Two experiments were conducted in November and December 2011, at the facilities of the Universidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil. A total number of (400)

apparently healthy Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (monosex type of body weight  $1.45 \pm 0.15$  g) were obtained from the Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões Fish Farm. The fish were kept in a 6200-L plastic tank prior to transferring into experimental tanks under natural photoperiod, and were fed twice a day (10:00 and 16:00 h) with commercial extruded food at 5% of body weight (42% crude protein, 3400 kcal kg<sup>-1</sup> DE). The continuous aeration was maintained in each aquarium using an electric air pump. Water temperature ( $26 \pm 1$  °C) and dissolved oxygen concentrations (5.6–7.5 mg L<sup>-1</sup>) were measured with a YSI model 550A oxygen meter (YellowSpring Instruments, USA). The pH values (6.6–7.0) (Bernauer pH meter), total ammonia-N (0.5 mg L<sup>-1</sup>) (colorimetric test), total alkalinity (60 mg L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>), and hardness (65 mg L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>) were also measured (colorimetric tests).

## **2.2. Experimental procedures**

### **2.2.1. Determination of 96h LC50 value of glyphosate based herbicide**

Four-day static acute toxicity test was performed in which six different concentrations (4.5, 4.0, 3.5, 3.0, 2.5 and 0 mg L<sup>-1</sup>) were used in the 3 test series (60 fish for each). A control group (30-fish) was maintained in glyphosate free aquarium throughout the entire experimental period. At 24, 48, 72 and 96 h, mortality was assessed and counted in the different glyphosate concentrations along with the control group to determine the 96 h median lethal concentration (LC50) value by the use of Trimmed Spearman-Kärber method (Version 1.5) available from the Environmental Protection Agency (USA). The dead fish were removed immediately. Behavioral changes, clinical toxic signs and postmortem lesions of tested fish were closely followed up and recorded daily.

### **2.2.2. Stress response in fish exposed to sublethal concentrations of glyphosate based herbicide**

The experiment was conducted testing four sub-lethal concentrations of glyphosate (Roundup Ready™). Thus, the experiment consisted of 10 treatments with 3 replicates (total

30 tanks), each containing 95-L chlorine free, well-aerated tap water and 10 fingerlings. Treatment #1 comprised the control (C) group, in which the fingerlings were kept in water without the agrichemical and no stress was applied; in treatment #2, considered as the stressed (S) group, the fingerlings were kept in water without glyphosate, but were subjected to an acute stress handling stimulus after 96 h. In treatments #3, #4, #5 and #6 the fingerlings were kept in water containing four sub-lethal concentrations of the agrichemical, corresponding to 20%, 10%, 2% and 1% of the lethal concentration for acute exposure (LC<sub>50-96 h</sub>) determined in the experiment #1, but without any application of stress, while in treatments #7, #8, #9 and #10 the fingerlings were kept in water contaminated with the same sub-lethal concentrations for 96 h and subjected to an acute stress-handling stimulus (chasing them with a pen net for 60 s, Barcellos et al., 1999a).

In all treatments, the stocking density was 0.15 g L<sup>-1</sup> and the experiment was carried out in a static-test design. Usually, in such experiments, fishes are not fed; however, since cortisol is a glucocorticoid that might be affected by starvation, the fishes in this study were fed thrice during the 96 h of exposure (24, 48, and 72 h after the beginning of exposure) at a rate of 0.75% of their biomass. Food residues and feces were not removed, to prevent stress owing to the introduction of cleaning equipment. The water quality was monitored daily. Acute stress-handling stimulus was applied after 96 h of the experiment. One hour after the stress application, all the fishes were sampled, since earlier results indicated that cortisol peaks in *O. niloticus* occur after 1 h following the stress application (Barcellos et al., 1999a).

### **2.3. Tissue cortisol extraction and determination**

To evaluate the tissue cortisol levels as a stress-response indicator, fish were captured and immediately frozen in liquid nitrogen for 10–30 s, and stored at –20 °C until cortisol extraction. Whole-body cortisol was extracted using a method described by Sink et al. (2007). Each Nile tilapia was weighed, minced, and placed into a disposable stomacher bag with 2 ml of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) for 6 min. The contents were transferred to a 10-ml screw top disposable test tube and 5 ml of laboratory grade ethyl ether was added. The tube was vortexed for 1 min and centrifuged for 10 min at 3000 rpm. The tube was then immediately frozen in liquid nitrogen and the unfrozen portion (ethyl ether containing cortisol) was decanted. The ethyl ether was transferred to a new tube and completely evaporated under a gentle stream of nitrogen for 2 h, yielding a lipid extract containing the

cortisol. The extract was stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  and suspended with 1 ml of phosphate buffered saline (PBS) at the time the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was conducted for cortisol measurements. To prevent a possible stress response induced by management, the time elapsed between capture and killing was less than 30 s. All experimental procedures were approved by the Institutional Ethics Committee at the University of Passo Fundo.

#### **2.4. Tissue cortisol determination and ELISA validation**

Whole-body cortisol was measured in duplicate samples of tissue extract with a commercially available ELISA kit, EIAgen™CORTISOL test (BioChem ImmunoSystems). This kit was fully validated for *O. niloticus* tissue extracts, using a methodology proposed by Sink et al. (2008). Accuracy was tested by calculation of recoveries from samples spiked with known amounts of cortisol. Precision was tested by repeated assays of seven randomly chosen samples (12× each) on the same plate and calculation of the intra-assay coefficient of variation (%CV). Reproducibility was tested by assaying the same samples in different plates and calculation of interassay coefficient of variation (%CV). Linearity and parallelism were tested using serial dilutions of tissue extracts in the buffer provided by the kit. Using linear regression, we found a highly positive correlation ( $R^2 = 0.8918$ ) between the curves, yielding inter- and intra-assay coefficients of variation of 7–10% and 5–9%, respectively.

#### **2.5. Statistics**

The mean  $\pm$  S.E.M. (n=4) of each group was calculated and analyzed with Graph Pad InStat 3.00 statistical package (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Cortisol levels of all the fishes were compared by ANOVA and the significant differences were tested using Tukey's test, with a significance level of 0.05. A Hartley test was carried out to verify the homogeneity of variance, and normality was tested using Kolmogorov–Smirnov test. Log-transformation was performed when necessary, while non-transformed data are shown in the figure.

### 3. Results

#### 3.1. Acute 96 hLC50 value of glyphosate-based herbicide in Nile tilapia

The number of dead tilapia in relation to the glyphosate-based herbicide doses 4, 3.5, 3.0, 2.5, 2.0 and 0 mg L<sup>-1</sup> were assessed and counted during the exposure time at 24, 48, 72, and 96 h then they were removed immediately. The highest glyphosate concentrations (4.0 and 4.5 mg L<sup>-1</sup>) caused all fish mortality, and the lowest concentration (2.5 mg L<sup>-1</sup>) caused no fish mortality within 96 h exposure time. The determined 96 hLC50 value of the glyphosate-based herbicide for Nile tilapia was found as 2.94 mg L<sup>-1</sup> (confidence interval 2.77 – 3.13 mg L<sup>-1</sup>).

#### 3.2. Stress response in fish exposed to sublethal concentrations of glyphosate based herbicide

Whole-body cortisol levels found in the control fingerlings was  $32.09 \pm 2.99$  ng mL<sup>-1</sup> and in the stress group was  $60.57 \pm 8.52$  ng mL<sup>-1</sup>. The presence of the highest sub-lethal concentrations of glyphosate (10 and 20% of LC50) provoked an increase in the cortisol level ( $P < 0.0001$ ) in fingerlings exposed to it, which was similar to the value verified in the stressed fishes, but higher than that of the control ones. The concentrations of 20%, 10% and 1% of LC50–96 h) of the agrichemical attenuated the cortisol response to an acute additional stressor, with the cortisol values lower than those found in the stressed fish in clear water ( $P < 0.0001$ ).

### 4. Discussion

Here we demonstrate that the glyphosate-based herbicide at the concentrations of 1, 10 and 20% of the LC50 provoke an impairment of cortisol elevation when combined with an acute stressor. Also, that a concentrations of 10 and 20% of the LC50 triggers a cortisol elevation in Nile tilapia fingerlings. These results points to necessity of extreme care in use of these compounds in order to prevent deleterious effects in fish homeostasis, mainly in the



actual scenario when the glyphosate-based herbicides are extensively used in agriculture fields and commonly applied in fish ponds to control algae and plant growth .

Regarding the acute toxicity of this specific glyphosate-based herbicide, the calculated LC50 for 96h ( $2.94 \text{ mg L}^{-1}$ ) is very low than previous found by other authors as Jiraungkoorskul et al. (2002) who founded the LC50 96h of  $16.8 \text{ mg L}^{-1}$  for young Nile tilapia. The fish weight used by these authors ( $1.69 + 0.31 \text{ g}$ ) is very close with the fish used in the present work ( $1.45 \pm 0.15 \text{ g}$ ), thus, we hypothesized that this difference might be occurred due to the different formulations of the glyphosate-based herbicide.

A question is why/how the exposure to glyphosate-based herbicide, without a standard stressor, provoked increased cortisol values? The toxicity of glyphosate is considered to be low, but the commercial glyphosate formulations, such as the Roundup Ready™, are more acutely toxic than glyphosate salt isolated, owing to the presence of surfactants like polyoxyethyleneamine (POEA), which is more toxic to fishes than glyphosate (Giesy et al., 2000). The stress-inducing potential of Roundup Ready™ was also verified in the *R. quelen* (Soso et al., 2007; Cericato et al., 2008). A glyphosate-based herbicide also induced oxidative damage in some tissues of some fish species as the *Prochilodus lineatus* (Langiano and Martinez, 2008) and *Rhamdia quelen* (Ferreira et al., 2010).

Interestingly, despite the fact that the tested glyphosate-based herbicide causes cortisol elevation, the exposure of *O. niloticus* fingerlings to extremely lower concentration as 1% of LC50–96 h of this herbicide for 96 h caused attenuation of the cortisol response to the additional acute stressor. Previous results also showed the potential of the glyphosate-based herbicides as endocrine disrupters both on the HPI axis (Cericato et al., 2008; Cericato et al., 2009) and on hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis (Soso et al., 2007). Different of Nile tilapia, in *R. quelen* only concentrations higher than 33.3% of LC50 produce this HPI disruption (Cericato et al., 2008). In fact, several factors, as fish species, age, physiological status and environmental condition may influence the toxicity of the agrichemicals and the susceptibility of the neuroendocrine axes (Norris, 2000).

The HPI axis disruption was verified for Nile tilapia exposed to different concentrations of aluminum (Al) (Correia et al., 2010).

Regarding the possible mechanisms that cause this impairment of the HPI axis verified in *O. niloticus* exposed to glyphosate, one of the possibilities is that this effect was exerted directly in the interrenal tissue, based in the information given by Jiraungkoorskul et al. (2002 and 2003) who verified several lesions in the entire kidney. Since these lesions are diffused in the kidney tissue, it is reasonable to think that the interrenal tissue, located in the head kidney,

was also affected and lost, at least in part, its function in synthesise and deliver cortisol. However, in Jiraungkoorskul's works, or the concentrations are much higher than the ones used in present work (Jiraungkoorskul et al., 2002) or the time of exposure was much longer from 1 to 3 months (Jiraungkoorskul et al., 2003). Thus, we cannot discard that this disrupting effect may occur in higher points within HPI axis as in *R. quelen*, since, in this species, the interrenal tissue was fully responsive in the challenge test with the adrenocorticotrophic hormone (ACTH) (Cericato et al., 2009). However, in *R. quelen*, the glyphosate-based herbicide was not related to oxidative lesions in the liver (Ferreira et al., 2010).

Another hypothesis to explain the reduced cortisol response in fish exposed to sublethal concentrations of glyphosate-based herbicide is the attenuation of the HPI axis since in fish not artificially stressed the cortisol values are high. In fact, HPI attenuation after a period of chronic elevated cortisol was verified in several species (Barton, 2002) including in *O. niloticus* (Barcellos et al., 1999a). However, since we measured the cortisol values only in 96th hour, this hypothesis is based in the assumption that the cortisol values were increased during all four day period. Also, the 96h period seems to be very short to be considered as a "chronic" response.

Despite the exact mechanism involved in the cortisol-response attenuation caused by glyphosate, biologically, the fishes lost their capacity to mount an adequate response to cope with a standard stressor and maintain homeostasis. This attenuation may reduce the adaptive response and the ability of the organism to promote metabolic and ionic adjustments necessary in the stress response. As reviewed by Brodeur et al. (1997), fishes incapable of mounting a normal cortisol response are likely to have a reduced ability to respond to the continuous challenges imposed on their homeostatic systems, either by aquaculture practices or by the environmental changes.

A last comment is about the protection of tilapia ponds. The fact that Nile tilapia fingerlings shows inhibited cortisol response to stress when exposed to concentrations of a glyphosate-based herbicide as lower as 1, 10 and 20% of LC50, points out to necessity of a extreme care in Nile tilapia culture as the construction of structures to barrier the water lixiviated from cultivated fields that use these herbicides, to prevent accidents and to avoid washing bottles of these products near to the fish ponds as well the care of did not use glyphosate-based herbicides to control weeds, plants and algae in Nile tilapia cultivation ponds. This necessity is reinforced by the observation that the concentration of glyphosate-based herbicides generally used directly in fish ponds and creeks to weeds control is about  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (Monsanto, 2003), much higher than the concentration that correspond to 1% of

LC50. Even when glyphosate-based herbicide is not used directly in water, they can easily enter water bodies in small concentrations of 0.0294 mg L<sup>-1</sup> when leached through rains or accidentally, as postulated by Soumis et al. (2003).

Finally, we concluded that the tested glyphosate-based herbicide triggers a cortisol elevation at concentrations of 10 and 20% of the LC50 in Nile tilapia fingerlings. Also, that the concentrations of 1, 10 and 20% of the LC50 provoke an impairment of cortisol elevation when combined with an acute stressor. Since glyphosate-based herbicides are widely used in agricultural fields and commonly applied in fish ponds to control algae and plant growth, our results points to necessity of extreme care in use of these compounds in order to prevent deleterious effects in Nile tilapia homeostasis.

## 5. References

- Barcellos, L.J.G., Nicolaiewsky, S., Souza, S.M.G., Lulhier, F., 1999<sup>a</sup>. Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. *Aquaculture Research* 30, 437-444.
- Barcellos, L.J.G., Nicolaiewsky, S., Souza, S.M.G., Lulhier, F., 1999<sup>b</sup>. The effects of stocking density and social interaction on acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. *Aquaculture Research* 30, 887-892.
- Barton, B.A., 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42, 517–525.
- Barton, B. A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Reviews of Fish Diseases* 1, 3–26.
- Brausch, M.J., Smith, N.P., 2007. Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52, 217–221.
- Brodeur, J.C., Sherwood, G., Rasmussen, J.B., Hontela, A., 1997. Impaired cortisol secretion in yellow perch (*Perca flavescens*) from lakes contaminated by heavy metals: in vivo and in vitro assessment. *Canadian Journal of Aquatic Sciences* 54, 2752–2758.
- Cericato, L., Neto, J.G.M., Fagundes, M., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Finco, J., Rosa, J.G.S., Koakoski, G., Centenaro, L., Pottker, E.S., Anziliero, D., Barcellos, L.J.G., 2008. Cortisol response to acute stress in jundiá (*Rhamdia quelen*) acutely exposed to sublethal concentrations of agrichemicals. *Comparative Biochemistry and Physiology* 148, 281–286.

- Cericato L, Neto JGM, Kreutz LC, Quevedo RM, Rosa JGS, Koakoski G, Centenaro, L., Pottker, E., Marqueze, A., Barcellos, L.J.G., 2009. Responsiveness of the interrenal tissue of Jundiá (*Rhamdia quelen*) to an in vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals. *Comparative Biochemistry and Physiology* 149, 363–367.
- Correia, T.G., Narcizo, A.M., Bianchini, A., Moreira, R.G., 2010. Aluminum as an endocrine disruptor in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 151, 461–466.
- Ferreira, D., Motta, A.C., Kreutz, L.C., Toni, C., Loro, V.L., Barcellos, L.J.G., 2010. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chemosphere* 79, 914–921.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Reviews in Environmental Contamination and Toxicology* 167, 35–120.
- Gluszczak, 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*). *Comparative Biochemistry and Physiology part C* 146, 519–524.
- Hontela, A., 1998. Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: in vivo and in vitro assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 44–48.
- Ilan, Z., Yaron, Z., 1983. Interference of o,p'DDD with interrenal function and cortisol metabolism in *Sarotherodon aureus* (Steindachner). *Journal of Fish Biology* 22, 657–669.
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S., Pokethitiyook, P., 2002. Histopathological Effects of Roundup, a Glyphosate Herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Science Asia* 28, 121–127.
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S., Pokethitiyook, P., 2003. Biochemical and Histopathological Effects of Glyphosate Herbicide on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology* 18, 260–267.
- Langiano, V.C., Martinez, C.B.R., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 147, 222–231.
- Monsanto, 2003. Background: Aquatic Use of Glyphosate Herbicides in Australia. <[http://www.monsanto.com/monsanto/content/products/productivity/roundup/gly\\_austfrog\\_bkg.pdf](http://www.monsanto.com/monsanto/content/products/productivity/roundup/gly_austfrog_bkg.pdf)> (downloaded 22.10.09).
- Norris, D.O., 2000. Endocrine Disruptors of the Stress Axis in Natural Populations: How Can We Tell? *American Zoology* 40, 393–401.
- Sink, T.D., Kumaran, S., Lochmann, R.T., 2007. Development of a whole-body cortisol extraction procedure for determination of stress in golden shiners, *Notemigonus crysoleucas*. *Fish Physiology and Biochemistry* 33, 183–193.

Sink, T.D., Lochmann, R.T., Fecteau, K.A., 2008. Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu and golden shiners. *Fish Physiology and Biochemistry* 34, 95-101.

Soso, A.B., Barcellos, L.J.G., Ranzani-Paiva, M.J., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Anziliero, D., Lima, M., Silva, L.B., Ritter, F., Bedin, A.C., Finco, J.A., 2007. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23, 308–313.

Soumis, N., Lucotte, M., Sampaio, D., Almeida, D.C., Giroux, D., Morais, S., Pichet, P., 2003. Presence of organophosphate insecticides in fish of the Amazon river. *Acta Amazonica* 33, 325–338.

Volpato, G.L., Duarte, C.R.A., Luchiari, A.C., 2004. Environmental colour affects Nile tilapia reproduction. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37, 479-483.

Volpato, G.L., Barreto, R.E., 2001. Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34, 1041-1045.

Weendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77, 591–625.

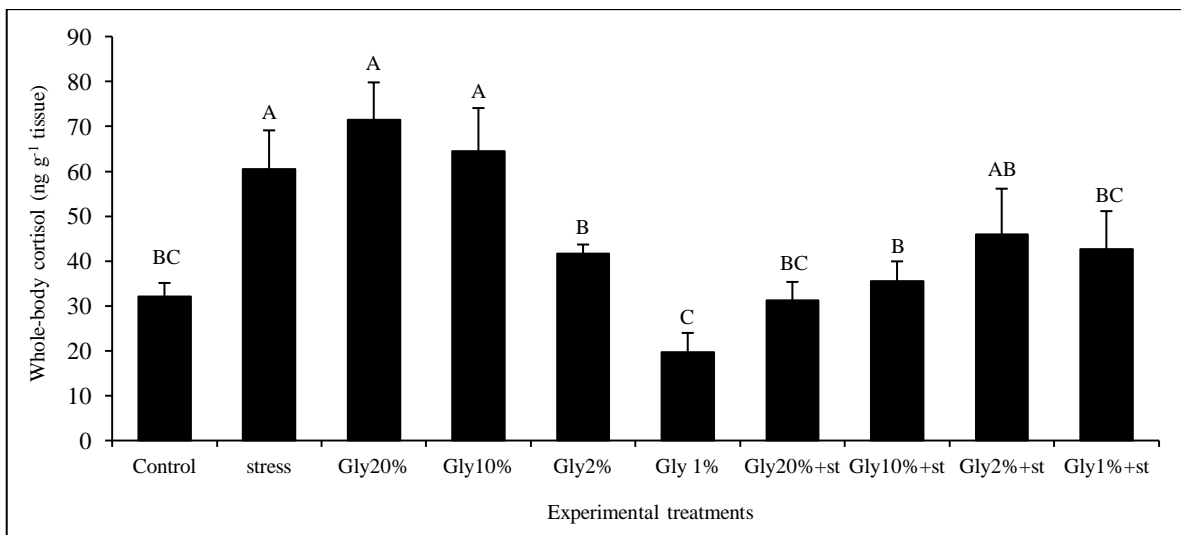


Figure 1. Whole-body cortisol levels in *Oreochromis niloticus* submitted or not to acute stress after acute exposure (96 h) to a glyphosate-based herbicide. Data were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Different capital letters above the histograms indicates statistical differences by Anova followed by Tukey's multiple range tests. ( $P < 0.0001$ ,  $n = 10$ ).

## 8. CONCLUSÕES

A CL50-48h do herbicida roundup ready a base de glifosato para tilápia-do-Nilo (*Oreochromus niloticus*) é de 2,94 mg/L. Provocou letalidade em exposição crônica a concentrações subletais. As principais alterações histopatológicas após exposição aguda e crônica foram degeneração e necrose nos rins e fígados, nas brânquias congestão, hemorragia e infiltrado eusínfilico. Induziu a elevação de cortisol em concentrações de 10% e 20% da CL50-48h, mas prejudica a elevação de cortisol em concentrações de 1%, 2%, 10%, e 20% da CL50-48h, quando combinado com um estressor agudo. Cuidado extremo deve ser exercido em seu uso, perto de lagos ou áreas próximas ao ambiente aquático.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALURU, N.; RENAUD, R.; LEATHERLAND, J.F.; VIJAYAN, M.M. **Ah receptor-media ted impairment of interrenal steroidogenesis involves StAR protein and P450scc gene attenuation in rainbow trout.** *Toxicol. Sci.*, v. 84, p. 260-269, 2005.
- ALURU, N.; VIJAYAN, M.M. **Aryl hydrocarbon receptor activation impairs cortisol response to stress in rainbow trout by disrupting the rate-limited steps in steroidogenesis.** *Endocrinology*, v. 147, p. 1895-1903, 2006.
- AYOOLA, S.O. **Toxicity glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile.** *African Journal of agricultural Research*, v. 3, p. 825-834, 2008.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, (ABNT) NBR 15499. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Métodos de ensaios com peixes.** São Paulo, p. 21, 2007.
- BARCELLOS, L.J.G.; NICOLAIEWSKY, S.; SOUZA, S.M.G.; LULHIER, F. **Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress.** *Aquaculture Research*, v. 30, p. 437-444, 1999a.
- BARCELLOS, L.J.G.; NICOLAIEWSKY, S.; SOUZA, S.M.G.; LULHIER, F. **The effects of stocking density and social interaction on acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings.** *Aquaculture Research*, v. 30, p. 887-892, 1999b.
- BARTON, B.A. **Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids.** *Integrative and Comparative Biology*, v. 42, p. 517-525, 2002.
- BARTON, B. A. & IWAMA, G.K. **Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids.** *Annual Reviews of Fish Diseases*, v. 1, p. 3-26, 1991.
- BEHMER, A.O.; TOLOSA, E.M.C.; FERITAS-NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.** p. 239, 1976.
- BRAUSCH, M.J. & SMITH, N.P. **Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrimp, *Thamnocephalus platyurus*.** *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 52, p. 217-221, 2007.

BRAUNBECK, T. **Cytological alterations in fish hepatocytes following in vivo and in vitro sublethal exposure to xenobiotics-estrutural biomarkes of environmental contamination.** Fish Ecotoxicology, p. 61-140, 1998.

BRODEUR, J.C.; SHERWOOD, G.; RASMUSSEN, J.B.; HONTELA, A. **Impaired cortisol secretion in yellow perch (*Perca flavescens*) from lakes contaminated by heavy metals: in vivo and in vitro assessment.** Canadian Journal of Aquatic Sciences, v. 54, p. 2752-2758, 1997.

CERICATO, L.; NETO, J.G.M.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; ROSA, J.G.S.; KOAKOSKI, G.; CENTENARO, L.; POTTKER, E.; MARQUEZE, A.; BARCELLOS, L.J.G. **Responsiveness of the interrenal tissue of Jundiá (*Rhamdia quelen*) to an in vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals.** Comparative and Biochemistry and Physiology, v. 149, p. 363-367, 2009.

CERICATO, L.; NETO, J.G.M.; FAGUNDES, M.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; FINCO, J.; ROSA, J.G.S.; KOAKOSKI, G.; CENTENARO, L.; POTTKER, E.S.; ANZILIERO, D.; BARCELLOS, L.J.G. **Cortisol response to acute stress in jundiá (*Rhamdia quelen*) acutely exposed to sublethal concentrations of agrichemicals.** Comparative Biochemistry and Physiology, v. 148, p. 281-286, 2008.

CHAUDHURI, B.N.; KLEYWEGT, G.J.; BJORKMAN, J.; LEHMAN-MCKEEMAN, L.D.; OLIVER, J.D.; JONES, T.A. **The structures of  $\alpha 2u$ -globuline and its complex with a hyaline droplet inducer.** Acta Cryst Section, v. 55, p. 753-762, 1999.

COX, C. **Glyphosate.** Journal of Pesticide Reform, v.24, p.10-15, 2004.

CUNHA, L.F. **Transgênicos: enfim, aprovados.** Globo Rural, v. 234, p. 38-44, 2005.

FERREIRA, D.; MOTTA, A.C.; KREUTZ, L.C.; TONI, C.; LORO, V.L.; BARCELLOS, L.J.G. **Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals.** Chemosphere, v. 79, p. 914-921, 2010.

GINGERICH, W.H. **Hepatic toxicology of fishes.** Aquatic Toxicology, p. 55-105, 1982.

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



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

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURFTON, R. B. **Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays.** *Environmental Science & Technology*, v. 11, p. 714-719, 1977.

HELFRICH, M. H.; NESBITT, S. A.; LAKKAKORPI, P. T.; BARNES, M. J.; BODARY, S. C.; SHANKAR, G.; MASON, W. T.; MENDRICK, D. I.; VÄÄNÄNEN, H. K.; HORTON, M. A.  **$\beta 1$  integrins and osteoclast function: Involvement in collagen recognition and bone resorption.** *Bone*, v. 19, p. 317-328, 1996.

HERRICKS, E. **Princípios gerais de toxicologia. Gerenciamento de substâncias tóxicas em lagos e reservatórios.** São Carlos, v. 4, p. 9-30, 2002.

HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D; MURCHELANO, R.A.; OKIRINO, M.S. **Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of antropogenic stress.** *Histopathology biomarkers*, p. 155-209, 1992.

HONTELA, A. **Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: in vivo and in vitro assessment.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 17, p. 44-48, 1998.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E.S.; KRUATRACHUE, M.; SAHAPHONG, S.; VICHASRI-GRAMS, S.; POKETHITIYOOK, P. **Biochemical and Histopathological Effects of Glyphosate Herbicide on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Environmental Toxicology*, v. 18, p. 260-267, 2003.

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

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*, v. 147, p. 222-231, 2008.

LOMBARDI, J.V. **Fundamentos de toxicologia aquática. In: Sanidade de organismos aquáticos.** Livraria Varela, São Paulo, p. 263-272, 2004.

MAREGONI, N. G. **Produção de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (linhagem chitralada), cultivada em tanques-rede, sob diferentes densidades de estocagem.** Archivos de Zootecnia, Córdoba, v. 55, p. 127-138, 2006.

MONSANTO. **Backgrounder: Aquatic Use of Glyphosate Herbicides in Australia.** <[http://www.monsanto.com/monsanto/content/products/productivity/roundup/gly\\_austfrog\\_bkg.pdf](http://www.monsanto.com/monsanto/content/products/productivity/roundup/gly_austfrog_bkg.pdf)> (downloaded 22.10.09), 2003.

NAKAGOME, K.F.; NOLDIN, A.J.; RASGALLA, C. **Toxicidade aguda e análise de risco de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura de arroz irrigado sobre o cladocero *Daphia magna*.** Ecotoxicologia e meio ambiente, v. 16, p. 93-100, 2006.

NESKOVIC, N.K.; POLEKSIC, V.; ELEZOVIC, I.; KARAN, V.; BUDIMIR, M. **Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carpa (*Cyprinus carpio*).** Environ. Contam. Toxicol., v. 56, p. 295-302, 1996.

NORRIS, D.O. **Endocrine Disruptors of the Stress Axis in Natural Populations: How Can We Tell?** American Zoology, v. 40, p. 393-401, 2000.

OMITOYIN B. O.; OGUNSANMI A. O.; ADESINA B. Y. **Studies on acute toxicity of pesticidal plant extracts (*Tetrapleura tetraptera*) on Tilapia (*Sarotherodon galilaeus*) fingerlings.** Trop. J. Anim. Sci., v. 2, p. 191-197, 1999.

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. **Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters.** Ecotox. Environ. Saf., v. 49, p. 64-75, 2001.

POLEKSIC, V.; KARAN, V. **Effects of trifluralin on carp: Biochemical and Histological Evaluation.** Ecotox. Environ. Safe San Diego, v. 43, p. 213-221, 1999.

KNIE, J.L.W.; LOPES, E.W.B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações.** Florianópolis: FATMA / GTZ, p. 289, 2004.

KREUTZ, C.L.; BARCELLOS, G.J.L.; SILVA, O.T.; ANZILIERO, D.; MARTINS, D.; LORENSON, M.; MARTENINGHE, A.; SILVA, B.L. **Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings.** Ciência Rural, v. 38, p. 1050-1055, 2008.

RAMSDORF, W. **Utilização de duas espécies de Astyanax (Astyanax Sp B e A. Altiparanae) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (fazenda Cangüiri – UFPR)**. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. p. 127, 2007.

RAND, G.M. **Fish toxicity studies**. The Toxicology of Fishes, p. 659-682, 2008.

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

RODRIGUES, B. N. & ALMEIDA F. S. **Guia de Herb, 5<sup>a</sup> ed**. Londrina: IAPAR, p. 648, 2005.

SCHMALZ, W.F.; HERNANDEZ, A.D.; WEIS, P. **Hepatic histopathology in two populations of the mummichog *Fundulus heteroclitus***. Mar. Res, v. 54, p. 539-542, 2002.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. **The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish**. J. Aquat. Ecosyst Stress Recov, v. 6, p. 75-86, 1997.

SINK, T.D.; KUMARAN, S.; LOCHMANN, R.T. **Development of a whole-body cortisol extraction procedure for determination of stress in golden shiners, *Notemigonus crysoleucas***. Fish Physiology and Biochemistry, v. 33, p. 183-193, 2007.

SINK, T.D.; LOCHMANN, R.T.; FECTEAU, K.A. **Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu and golden shiners**. Fish Physiology and Biochemistry, v. 34, p. 95-101, 2008.

SOSO, A.B.; BARCELLOS, L.J.G.; RANZANI-PAIVA, M.J.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; ANZILIERO, D.; LIMA, M.; SILVA, L.B.; RITTER, F.; BEDIN, A.C.; FINCO, J.A. **Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*)**. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 23, p. 308-313, 2007.

SOUMIS, N.; LUCOTTE, M.; SAMPAIO, D.; ALMEIDA, D.C.; GIROUX, D.; MORAIS, S.; PICHET, P. **Presence of organophosphate insecticides in fish of the Amazon river**. Acta Amazonica, v. 33, p. 325-338, 2003.

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

STEGEMAN, J.J.; LECH, J.J. **Cytocrome p-450 monooxygenase systemas in aquatic species: Carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen pollutant exposure.** Environ Helth Perspective, v. 90, p. 101-110, 1991.

TEH, S.J.; ADAMS, S.M.; HINTON, D. E. **Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress.** Aquatic Toxicol, v. 37, p. 51-70, 1997.

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

THOMAS, P. **Molecular and Biochemical Responses of Fish to Stressors and Their Potential Use in Environmental Monitoring.** Amer Fish Soc Symp, v. 8, p. 9-28, 1990.

VOLPATO, G.L.; BARRETO, R.E. **Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 34, p. 1041-1045, 2001.

VOLPATO, G.L., DUARTE, C.R.A., LUCHIARI, A.C. **Environmental colour affects Nile tilapia reproduction.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 37, p. 479-483, 2004.

ZUCKER, E. **Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure - Acute Toxicity Test for Freshwater Fish.** USEPA Publication, Washington, v. 540, p. 85-86, 1985.

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