

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO NUFOSATE EM TAMBAQUI (*COLOSSOMA MACROPOMUM*) SOB EXPOSIÇÃO CRÔNICA

EVALUATION OF THE GENOTOXICITY OF NUFOSATE IN TAMBAKI (*COLOSSOMA MACROPOMUM*) UNDER CHRONIC EXPOSURE

Sirley Ávila Queiroz¹
Wilson Gómez Manriquez²

RESUMO

Os herbicidas são produtos químicos bastante utilizados; no entanto, podem ocasionar contaminação ao meio ambiente. O objetivo do estudo é avaliar a toxicidade aguda do nufosate e analisar as aberrações cromossômicas em peixes expostos ao herbicida. A avaliação da toxicidade aguda e crônica foi conduzida em *Colossoma macropomum*. Para a toxicidade aguda, utilizou-se o teste de CL50-48h, enquanto a toxicidade crônica foi avaliada durante 30 dias de exposição. Foram observados efeitos genotóxicos, incluindo alterações nucleares em células de peixes. A metodologia incluiu análises laboratoriais e estatísticas para interpretação dos resultados. Os resultados indicaram que a concentração letal do nufosate para o tambaqui foi de 14,32 mg/L. Em diferentes cenários de profundidade de água, o nufosate exibe um risco médio em uma concentração de 0,96 mg/L, correspondendo a 100% da dosagem recomendada do produto, e um risco baixo em faixas de concentração variando de 0,48 a 0,015 mg/L em corpos d'água com profundidade de 0,3 m e de 0,144 a 0,002245 mg/L em corpos d'água com profundidade de 2 m. Após exposição crônica durante trinta dias, na concentração de 4,77 mg/L, o teste de Mann-Whitney observou diferença significativa entre os peixes expostos ao nufosate e o grupo controle, sugerindo potencial dano nuclear causado pelo herbicida. Esta análise usou o teste de micronúcleo para avaliar, de forma cega, as alterações nucleares nos eritrócitos. Este estudo enfatiza a importância do uso responsável do herbicida nufosate, indicando que, embora possa ocasionar alterações nucleares, não gera um padrão específico de mudanças nucleares em peixes.

Palavras-Chave: degeneração genética; ecotoxicologia; herbicida; intoxicação ambiental; micronúcleo; monitoramento.

¹Mestre. Universidade Federal de Rondônia (UNIR). Porto Velho. Rondônia. Brasil. E-mail: sirleyqueiroz@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0472-4247>.

²Doutor. Universidade Federal de Rondônia (UNIR). Rolim de Moura. Rondônia. Brasil. E-mail: wilson.gomez@unir.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3097-3770>.

ABSTRACT

Herbicides are widely used chemical products; however, they can cause environmental contamination. The aim of this study was to assess the acute toxicity of nufosate and to analyze chromosomal aberrations in fish exposed to the herbicide. The assessment of acute and chronic toxicity was carried out on *Colossoma macropomum*. For acute toxicity, the CL50-48h test was used, while chronic toxicity was assessed during 30 days of exposure. Genotoxic effects were observed, including nuclear alterations in fish cells. The methodology included laboratory and statistical analyses to interpret the results. The results indicated that the lethal concentration of nufosate for tambaqui was 14.32 mg/L. In different water depth scenarios, nufosate exhibits a medium risk at a concentration of 0.96 mg/L, corresponding to 100% of the product's recommended dosage, and a low risk in concentration ranges varying from 0.48 to 0.015 mg/L in bodies of water with a depth of 0.3 m and from 0.144 to 0.002245 mg/L in bodies of water with a depth of 2m. After chronic exposure for thirty days at a concentration of 4.77 mg/L, the Mann-Whitney test found a significant difference between the fish exposed to nufosate and the control group, suggesting potential nuclear damage caused by the herbicide. This analysis used the micronucleus test to blindly assess nuclear alterations in erythrocytes. This study emphasizes the importance of responsible use of the herbicide nufosate, indicating that although it can cause nuclear alterations, it does not generate a specific pattern of nuclear changes in fish.

Keywords: genetic degeneration; ecotoxicology; herbicide; environmental poisoning; micronucleus; monitoring.

Artigo recebido em: 02/09/2024

Artigo aprovado em: 12/12/2024

Artigo publicado em: 19/12/2024

Doi: <https://doi.org/10.24302/sma.v.13.5620>

INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com a poluição das águas tem se tornado um tema central nos debates sobre sustentabilidade e gestão ambiental em todo o mundo. Este cenário é exemplificado pelo estudo de caso do rio Oued D'Hous, localizado na Argélia, onde a qualidade da água vem sofrendo deteriorações significativas devido ao descarte indiscriminado de efluentes de origens domésticas, industriais e agrícolas. A análise realizada destaca não apenas o aumento preocupante dos níveis de poluentes, mas também as consequências diretas dessa contaminação para a biodiversidade local, ameaçando a existência de espécies e impondo limitações severas ao uso da água pela população²³.

O uso excessivo de produtos químicos pode ter consequências devastadoras tanto para o solo quanto para os sistemas hídricos, resultando em danos ambientais

significativos e ameaçando a saúde dos ecossistemas³⁰. O uso desenfreado desses produtos não apenas contamina o solo, mas também introduz moléculas nocivas que podem se infiltrar nas águas subterrâneas e superficiais, causando impactos imprevisíveis e prejudiciais¹⁷.

Um estudo realizado investigou os impactos do herbicida Roundup WG® no camarão de água doce *Macrobrachium potiana*, revelando efeitos citotóxicos e desregulação endócrina. A exposição ao herbicida, em concentrações de até 0,28 mg/L por 14 dias, causou alterações histopatológicas no hepatopâncreas, como vacuolização celular e fragmentação de DNA, além de interferir nos níveis hormonais, afetando o crescimento e a reprodução dos camarões. Esses resultados indicam que o Roundup WG® pode atuar como desregulador endócrino e citotóxico, mesmo em concentrações ambientalmente relevantes¹⁶.

Pesquisas recentes indicam que o glifosato, presente em formulações como o Nufosate, pode impactar significativamente uma variedade de organismos aquáticos além dos peixes. Esses efeitos incluem a inibição do crescimento de plantas aquáticas e algas, além de alterações nas populações de invertebrados, como crustáceos, que exibem aumento de mortalidade e comprometimento reprodutivo. Ademais, a persistência do AMPA, principal produto de degradação do glifosato, contribui para a contaminação de longo prazo nos ecossistemas aquáticos, afetando a saúde ecológica e a biodiversidade desses ambientes^{22,1}.

Dados gerados pela fiscalização de agrotóxicos no estado de Rondônia revelam um aumento no consumo desses produtos químicos. Conforme informações da Agência de Defesa Sanitária Agrosilvopastoril do Estado de Rondônia¹², foi registrada a comercialização de cerca de 61,67 milhões de litros/quilos de agrotóxicos ao longo do período de 2017 a 2021. Esses agrotóxicos foram distribuídos por todos os 52 municípios e distritos do estado de Rondônia, demonstrando uma ampla disseminação do uso desses produtos químicos em toda a região.

A relevância do glifosato no contexto dos agrotóxicos em Rondônia é notável. Esse herbicida, sendo o mais vendido no estado nos anos de 2022 e 2023, foi distribuído amplamente por várias cidades. Dados mostram a venda de 9.047.830,00 milhões de litros/quilos de glifosato nesses períodos (Figura 1 e Figura 2)¹², evidenciando a ampla propagação deste pesticida em Rondônia e sua posição dominante no mercado de produtos químicos para agricultura na área.

Figura 1 - Representação gráfica do consumo de glifosato pelos dez maiores municípios de Rondônia (Litros/Quilos)¹²

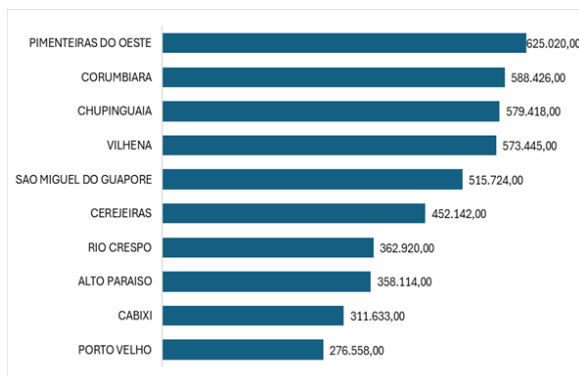
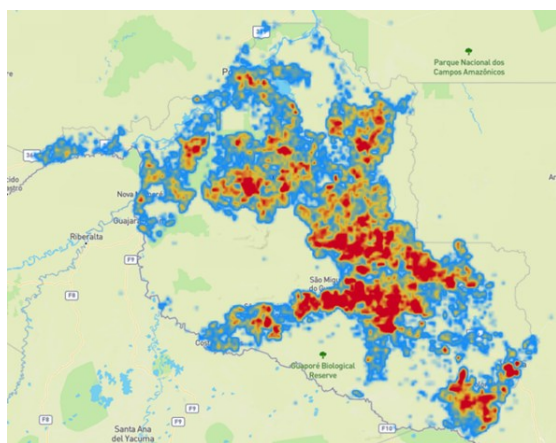


Figura 2 – Mapa de calor com a distribuição de glifosato dentro do estado de Rondônia para os anos de 2022 e 2023¹².



Os defensivos agrícolas podem representar riscos significativos para o ambiente aquático, conforme destacado nas pesquisas. O excesso desses produtos pode resultar em efeitos irreparáveis, enquanto mesmo pequenas quantidades podem desencadear efeitos adversos crônicos. É importante ressaltar que certos compostos à base de organoclorados apresentam uma toxicidade aguda consideravelmente mais elevada do que os compostos organofosforados, chegando a ser letais para os peixes. Em contrapartida, os herbicidas, de modo geral, exibem uma toxicidade moderadamente menor para os peixes, mas todos os agrotóxicos manifestam efeitos fisiológicos subletais, tanto em condições agudas quanto em exposições crônicas^{21, 20, 9}

Os agrotóxicos, em especial o glifosato, têm sido objeto de preocupação devido à sua presença disseminada no ambiente e seus potenciais impactos, conforme apontado em diversas pesquisas. Resíduos de agrotóxicos foram identificados em diferentes fontes de água, incluindo águas superficiais e subterrâneas, bem como em amostras de água tratada¹⁸.

A aquicultura é reconhecida como uma importante fonte de alimentos devido à sua capacidade renovável de produção de proteína animal, atendendo à crescente

demanda global por alimentos. Embora tenha experimentado um notável crescimento, impulsionado por avanços tecnológicos, a intensificação da produção em fazendas aquícolas apresenta desafios para a sustentabilidade ambiental, incluindo o uso excessivo de antibióticos e produtos químicos, além do impacto negativo sobre a qualidade da água e a introdução de espécies exóticas⁴.

O objetivo geral deste estudo é avaliar o potencial genotóxico do herbicida nufosate no peixe *Colossoma macropomum*. Para alcançar este objetivo, uma série de objetivos específicos foram delineados: primeiro, estimar e classificar a toxicidade aguda do nufosate para *Colossoma macropomum*, utilizando o teste CL₅₀-48h; em seguida, classificar o nufosate com base nos valores obtidos, visando compreender seu potencial de toxicidade aguda para o peixe; além disso, classificar o nufosate quanto ao risco de intoxicação ambiental, considerando seus efeitos sobre o ambiente aquático; adicionalmente, avaliar as aberrações cromossômicas no *Colossoma macropomum* causadas pela exposição crônica ao nufosate, utilizando o teste de micronúcleos como método de avaliação; por fim, estimar a concentração ambiental de nufosate na água em cenários simulados de espelho d'água de um hectare, variando em profundidades de 0,3 m e 2,0 m, a fim de compreender melhor a distribuição e potenciais impactos do herbicida no ambiente aquático.

METODOLOGIA

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Federal de Rondônia (CEUA-UNIR 038-2023-A).

A metodologia empregada na avaliação da toxicidade aguda do nufosate para *Colossoma macropomum* adere estritamente aos parâmetros estabelecidos pelo método normatizado pelo IBAMA¹¹. Isso garante a conformidade e a consistência na condução dos testes, bem como a confiabilidade dos resultados obtidos.

Local de realização dos bioensaios

Os experimentos para avaliar a toxicidade aguda foram conduzidos no Laboratório de Sanidade Aquícola e Aviária - LABSAA do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Rondônia - Campus Rolim de Moura. O produto em análise foi o glifosato em sua formulação comercial nufosate (glifosato sal de isopropilamina) 480 g/L (48,0% m/v), ácido de glifosato 360 g/L (36,0% m/v), produzida pela empresa Sumitomo Chemical, e seu registro no Brasil está sob o número 11013²⁷.

Seleção da espécie

Foram utilizados 77 exemplares juvenis de *Colossoma macropomum* de um mesmo lote provenientes de uma piscigranja da região. Esses peixes foram transportados para a Universidade Federal de Rondônia - Campus Rolim de Moura, onde passaram por um período de aclimação de sete dias em uma caixa d'água de 1000 litros. Durante esse período, manteve-se aeração constante com temperatura ambiente de $29 \pm 2^\circ\text{C}$. Posteriormente, os peixes foram distribuídos aleatoriamente em caixas plásticas de 60 litros, com uma das caixas servindo como grupo de controle.

A água empregada no abastecimento originava-se de um poço artesiano, caracterizando-se por uma renovação constante e aeração controlada. A temperatura era mantida em aproximadamente $23 \pm 1^\circ\text{C}$, em conformidade com os padrões estipulados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis¹¹. O monitoramento dessas condições era rigorosamente realizado com o auxílio de um termostato. No que concerne à alimentação dos peixes, estes recebiam ração comercial contendo 28% de proteína bruta (pb). A ração era administrada em quantidades correspondentes a 3% do peso vivo dos peixes, fornecida diariamente, duas vezes ao dia. Tais práticas garantiram a manutenção de um ambiente adequado e o cuidado necessário para a condução dos experimentos de maneira controlada e precisa.

Para avaliar a concentração letal 50 (CL₅₀-48h) aguda do nufosate, foram utilizados 49 peixes, com um peso médio de 110 gramas cada. Em cada caixa d'água de 60 litros foram colocados 7 exemplares de tambaqui e posteriormente foram distribuídas as concentrações do nufosate nos recipientes da seguinte forma: 2,5 mg/L na Caixa 1, 5 mg/L na Caixa 2, 10 mg/L na Caixa 3, 20 mg/L na Caixa 4, 40 mg/L na Caixa 5 e 80 mg/L na Caixa 6. Após 48 horas de exposição foram contabilizados os mortos em cada caixa estimada a CL₅₀-48h mediante o software Trimmed Spearman-Kärber⁸. Esse valor representa a concentração do produto químico que causa a morte de 50% de uma determinada população quando expostos durante determinado tempo.

Conforme discutido por Hamilton et al.⁸, vários métodos são utilizados para o tratamento de dados de testes de toxicidade a fim de determinar a concentração letal mediana (CL₅₀). Os autores apontam que os modelos probit e logit, amplamente usados para esse tipo de cálculo, apresentam certas deficiências. Para resolver essas limitações, eles propuseram o método de Spearman-Kärber, que se mostrou menos sensível aos problemas dos métodos tradicionais. O método, além de suas boas propriedades estatísticas, é de fácil aplicação e recomendado para o cálculo preciso de CL₅₀ e seus intervalos de confiança de 95%.

Para avaliar a exposição crônica do nufosate em tambaqui, foram selecionados 21 peixes como amostra experimental. Durante um período de 30 dias, esses peixes foram expostos ao produto na concentração 4,77 mg/L, correspondente a um terço da concentração letal para 50% dos organismos (CL₅₀), conhecida como CL₅₀-48h.

O experimento foi conduzido em um sistema semiestático, com uma renovação de água e produto de 50% a cada três dias. Essa abordagem foi adotada para replicar as condições encontradas no ambiente natural, garantindo uma exposição contínua

ao produto. Além disso, a concentração de nufosate na água foi monitorada e reabastecida periodicamente para manter a concentração desejada, assegurando a consistência e precisão dos resultados.

Essa metodologia foi escolhida para avaliar os efeitos da exposição crônica ao nufosate, imitando as condições que os peixes enfrentariam em seu habitat natural. A seleção da concentração específica do herbicida, juntamente com a frequência de troca de água e a reposição do produto, baseou-se em estudos anteriores e considerações sobre a toxicidade do composto e sua potencial influência sobre os organismos aquáticos.

Avaliação através de Micronúcleos em Eritrócitos

No presente estudo, investigou-se a frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos, analisando 1000 células de 28 peixes.

O sangue foi obtido conforme protocolo estabelecido pelo LABSAA sendo o volume de 1 mL. Para este experimento, a concentração de exposição crônica foi considerado 4,77 mg/L, no período de 30 dias.

Para assegurar a consistência dos bioensaios, todas as amostras foram submetidas a um conjunto padronizado para evitar o mínimo de estresse, conforme descrito por Manrique et al.¹⁵. Brevemente, a anestesia dos peixes, para a coleta de sangue, foi efetuada com uma solução alcoólica de benzocaína na concentração de 0,1 g/mL, numa proporção de 1:1.0000 com água até observação de sinais de anestesia, seguido da extração de 1 mL de sangue periférico efetuada com agulha 27x8 e seringas de 3 mL heparinizadas, mediante punção do vaso caudal.

A metodologia para análise de micronúcleos em eritrócitos periféricos baseou-se nos procedimentos estabelecidos por Heddle¹⁰ e Schmid²⁵. Este processo incluiu a limpeza e identificação das lâminas, a aplicação de 4,5 µl de sangue fresco após cada coleta, a preparação de uma lâmina por espécime, a extensão do sangue para formar um esfregaço, a secagem ao ar e a fixação em metanol absoluto por 5 minutos. As lâminas foram posteriormente coradas com Giemsa 10%, diluída em tampão fosfato (pH 6,8) (1 gota/ mL), seguidas de lavagem com água destilada e secagem ao ar.

A avaliação das lâminas foi realizada com o auxílio de um microscópio óptico Opticam 0600R e as imagens capturas com a câmera LOPT 12003 com software Opticam Microscopia OPTHD. Foram consideradas apenas as hemácias nucleadas com membranas citoplasmática e nuclear intactas. Importante destacar que a análise foi efetuada por um único observador, em um contexto de teste cego, para assegurar a consistência e objetividade dos resultados, conforme documentado por Heddle¹⁰ e Schmid²⁵.

Análise Estatística de Biomarcadores Genéticos em Peixes

Na análise estatística empregada para comparar os peixes expostos com o grupo controle, utilizando o biomarcador de morfologia nuclear conhecido como teste de micronúcleo, iniciou-se com a aplicação do teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos dados. Este procedimento estatístico determina se as frequências dos micronúcleos observadas nas células seguem uma distribuição normal. Em situações onde a normalidade dos dados não foi confirmada, indicando a não aderência à distribuição normal, recorreu-se ao teste não paramétrico de Mann-Whitney. Posteriormente, para avaliar os danos celulares relacionados aos parâmetros de *notched*, micronúcleo, binúcleo, *vacuolated* e *bebbled*, foi novamente conduzido o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Diante de resultados negativos para normalidade, indicando uma distribuição não normal dos valores, empregou-se o teste de Kruskal-Wallis, uma análise estatística não paramétrica. Este teste foi seguido pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls, estabelecendo um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Essa abordagem estatística robusta permitiu uma avaliação abrangente dos danos celulares entre os grupos analisados, considerando a não normalidade dos dados.

Assim, a combinação dessas técnicas estatísticas, incluindo testes de normalidade e análises não paramétricas, proporcionou a interpretação estatística dos resultados obtidos no estudo de biomarcadores de morfologia nuclear, garantindo a confiabilidade e a robustez das conclusões.

Classificação do nufosate pela toxicidade aguda e pelo risco ambiental

Os dados da CL_{50-48h} , adquiridos para a espécie em análise, foram empregados na categorização do potencial tóxico do nufosate específico para essa espécie. Essa classificação segue as categorias toxicológicas descritas na Tabela 1, conforme mencionado por Zucker³³. A CL_{50} , ou concentração letal 50%, refere-se à concentração da substância que é fatal para 50% da população de um determinado organismo, observado em um período específico. O procedimento para determinar a CL_{50} envolve a exposição de grupos de organismos a diferentes concentrações da substância testada e a subsequente observação da mortalidade e outros efeitos adversos.

Tabela 1 - Classes de toxicidade aguda para organismos aquáticos (Zucker³³)

Classe de toxicidade	CL_{50} ou CE_{50} (mg/L)
Extremamente tóxico	< 0,1
Altamente tóxico	0,1 a 1,0
Moderadamente tóxico	> 1,0 a < 10
Ligeiramente tóxico	> 10 a < 100
Praticamente não-tóxico	> 100

Para o cálculo do Coeficientes de Ação Ambiental (CAE), foram contemplados diferentes cenários, nos quais o herbicida encontra-se homogeneamente distribuído na extensão de água de um reservatório com área de um hectare (10000 m²) e profundidades de 0,3 m³ e 2,0 m²⁶.

A análise considerou a diluição do nufosate na água em proporções de 100,0%, 50,0%, 25,0%, 12,5%, 6,25% e 3,12% da dosagem máxima recomendada para uso agrícola (2880g i.a/ha)²⁷, visando calcular o CAE nos dois cenários.

A classificação do nufosate em relação ao risco de intoxicação ambiental foi efetuada conforme as categorias estabelecidas pela Usepa²⁹. Essas categorias são determinadas a partir da divisão da CAE pela CL₅₀-48h do nufosate, obtida nos testes de toxicidade aguda. O resultado dessa divisão, é denominado Quociente de Risco (RQ = CAE/CL₅₀).

Para a categorização do risco de intoxicação ambiental, com base nos valores de RQ calculados para as diferentes diluições do nufosate na água, foram adotadas as classes propostas pela Usepa²⁹, as quais estão detalhadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Classes de risco de intoxicação ambiental (USEPA²⁹)

Classificação	Descrição	RQ (mg/L)
Alto Risco	É recomendada cautela no uso do produto	> 0,5
Médio Risco	Produto com uso restrito	0,05 > < 0,5
Baixo Risco	É recomendada cautela no uso do produto	< 0,05

RESULTADOS

Toxicidade aguda para *Collossoma macropomum*

O valor da CL₅₀-48h do nufosate estimado para o tambaqui nas condições aqui descritas foi de 14,32 mg/L.

Nos experimentos a mortalidade média do grupo controle esteve de acordo com a norma do Ibama¹¹. Portanto, os experimentos são considerados válidos.

A avaliação da toxicidade aguda de substâncias através da determinação da CL₅₀ em diferentes organismos tem sido um tema de interesse em diversos estudos. Um estudo conduzido por Bastos² obteve uma CL₅₀-48h de 0,032 mg/L ao avaliar a toxicidade aguda do Roundup® para *Daphnia magna*. O estudo foi realizado sob condições controladas em laboratório, onde foram adotadas medidas rigorosas para evitar interferências externas nos resultados dos testes de toxicidade. A temperatura foi mantida em torno de 25°C, com um fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão, garantindo um regime circadiano adequado para os animais de teste. Além disso, a água utilizada nos experimentos foi cuidadosamente preparada, proveniente de uma fonte livre de contaminantes e com o pH equilibrado.

Os resultados obtidos apresentam uma significativa disparidade em relação a outro experimento conduzido com a mesma espécie por Gustinasari et al.⁷, os quais estabeleceram a CL₅₀-48h em 21,34 mg/L. Nesse estudo, as condições foram meticulosamente controladas com o intuito de avaliar os efeitos dos herbicidas à base de glifosato nessas espécies aquáticas. Foram consideradas as medições dos parâmetros ambientais da água, tais como pH, temperatura, condutividade, sólidos totais dissolvidos e oxigênio dissolvido, visando compreender o impacto do herbicida na qualidade da água ao longo do experimento. Tais constatações evidenciam a variabilidade nas respostas dos organismos a essa substância.

O presente estudo se alinha a essas investigações, focalizando na avaliação da toxicidade do produto formulado nufosate. Os resultados obtidos nesta pesquisa se inserem no cenário de variabilidade observado em estudos anteriores, reforçando a importância de considerar não apenas a substância em si, mas também a formulação específica utilizada nos experimentos^{5, 7, 2}.

No estudo realizado por Ramírez-Duarte et al.¹⁹ investigou a toxicidade aguda e as alterações histopatológicas induzidas pelo herbicida Roundup® na cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Os resultados indicaram que o herbicida é altamente tóxico para os peixes, com uma concentração letal média (CL₅₀) de 97,47 mg/L para um período de exposição de 96 horas. As análises histopatológicas revelaram danos em órgãos vitais, como brânquias, fígado, pele e cérebro.

Ao comparar os resultados dos estudos de Santos et al.²⁴ com os achados do presente trabalho, surge uma discrepância marcante nos efeitos observados do glifosato em diversas espécies de peixes, o que evidencia a complexidade das respostas biológicas a esse pesticida. Enquanto Santos et al.²⁴ reportam uma alta taxa de mortalidade e impactos negativos significativos na sobrevivência dos peixes expostos ao glifosato, especialmente em concentrações subletais, os resultados do estudo com tambaqui sugerem uma toxicidade relativamente baixa nas condições testadas. Isso ressalta a necessidade premente de uma compreensão mais abrangente dos efeitos do glifosato em diferentes espécies e ambientes aquáticos.

Classificação do nufosate quanto à toxicidade aguda e ao risco ambiental

A avaliação da Concentração Ambiental Estimada (CAE) e do Índice de Risco (RQ) é essencial para compreender os potenciais impactos do nufosate, especificamente em relação à sua toxicidade para o tambaqui. Segundo Zucker³³, nas condições do presente estudo, o produto se classifica como ligeiramente tóxico para o tambaqui, apresentando valores de CL₅₀-48h entre 10 e 100 mg/L (Tabela 2).

Em ambientes aquáticos com uma profundidade de 0,30 m (Quadro 1), os ensaios de toxicidade aguda realizados com o tambaqui indicam que o nufosate apresenta um nível de risco ambiental classificado como médio, quando presente numa concentração de 0,96 mg/L, resultante da aplicação da dose agrícola recomendada mais elevada (2880 g i.a/ha). Nesse contexto, o índice de quociente de risco (RQ) excede 0,05 mg/L, o que sugere uma restrição no uso deste produto (Tabela 2).

Em concentrações de 0,48 e 0,015 mg/L, o nufosate é classificado como apresentando um baixo risco, onde o valor do RQ é inferior a 0,05 mg/L, indicando uma recomendação de uso com cautela (Tabela 2).

Em corpos hídricos com uma profundidade de 2,0 m, o nufosate é categorizado como apresentando um baixo risco, quando suas concentrações variam entre 0,144 e 0,002245 mg/L. No entanto, o Índice de Quociente de Risco (RQ) nesse contexto oscila entre 0,0101 e 0,0002 mg/L, sinalizando a importância de adotar cautela no uso do produto, mesmo em situações de risco considerado baixo (Quadro 1).

Estes resultados ressaltam a importância de uma avaliação abrangente que leve em consideração não apenas a toxicidade intrínseca do nufosate, mas também as características específicas do ambiente aquático, como a profundidade do corpo d'água. A aplicação do RQ proporciona uma ferramenta valiosa na avaliação de riscos ambientais, destacando a necessidade de precaução e regulamentação rigorosa no uso desses herbicidas em ambientes aquáticos³¹.

Quadro 1 - Concentração ambiental estimada (CAE) para *Colossoma macropomum* nas diferentes colunas de água em função da contaminação.

Coluna de água de 0,30 m de profundidade				Coluna de água de 2 m de profundidade			
Dosagem (%)	CAE (mg/L)	RQ (mg/L)	Risco	Dosagem (%)	CAE (mg/L)	RQ (mg/L)	Risco
100%	0,96	0,0670	Médio	100%	0,144	0,0101	Baixo
50%	0,48	0,0335	Baixo	50%	0,072	0,0050	Baixo
25%	0,24	0,0168	Baixo	25%	0,036	0,0025	Baixo
12,50%	0,12	0,0084	Baixo	12,50%	0,018	0,0013	Baixo
6,25%	0,06	0,0042	Baixo	6,25%	0,009	0,0006	Baixo
3,12%	0,030	0,0021	Baixo	3,12%	0,00449	0,0003	Baixo
1,56%	0,015	0,0010	Baixo	1,56%	0,002245	0,0002	Baixo

Biomarcadores Genéticos em Peixes

Na análise de eritrócitos (Figura 3) o estudo investigou os efeitos tóxicos potenciais do nufosate em peixes, empregando um biomarcador genético reconhecido, o teste de micronúcleo em peixes. Esta técnica é amplamente utilizada para detectar danos cromossômicos e mutações genéticas. A análise estatística, uma componente crucial do estudo, iniciou-se com a implementação do teste de Shapiro-Wilk, com o intuito de avaliar a normalidade das distribuições de frequências dos micronúcleos.

No teste de Shapiro-Wilk indicou uma estatística de teste de 0,648 e um valor-p aproximado de 0,00000662, sugerindo que os dados para célula normal não aderem a uma distribuição normal. Por outro lado, o controle, o teste revelou uma estatística de teste de 1,0 e um valor-p de 1,0. Embora isso sugira uma distribuição normal para

o grupo controle, a interpretação destes resultados requer cautela, devido à possível baixa variabilidade nos dados de controle.

Em face da não normalidade dos dados de célula normal, recorreu-se ao teste de Mann-Whitney, uma abordagem não paramétrica adequada para a comparação de dois grupos independentes, especialmente quando os dados não satisfazem o pressuposto de normalidade. Este teste foi utilizado para comparar as células normais entre os 21 peixes expostos ao nufosate e o grupo controle, abrangendo a análise de 1000 células por peixe.

O teste de Mann-Whitney resultou em uma estatística de teste de 42,0 e um valor-p de aproximadamente 0,000000438. Estes resultados estatisticamente significativos indicam uma diferença marcante entre os grupos, com uma redução na frequência de células normais associada à exposição ao nufosate. Esta evidência sugere que o nufosate pode causar danos genéticos nos peixes, manifestados por alterações na normalidade celular.

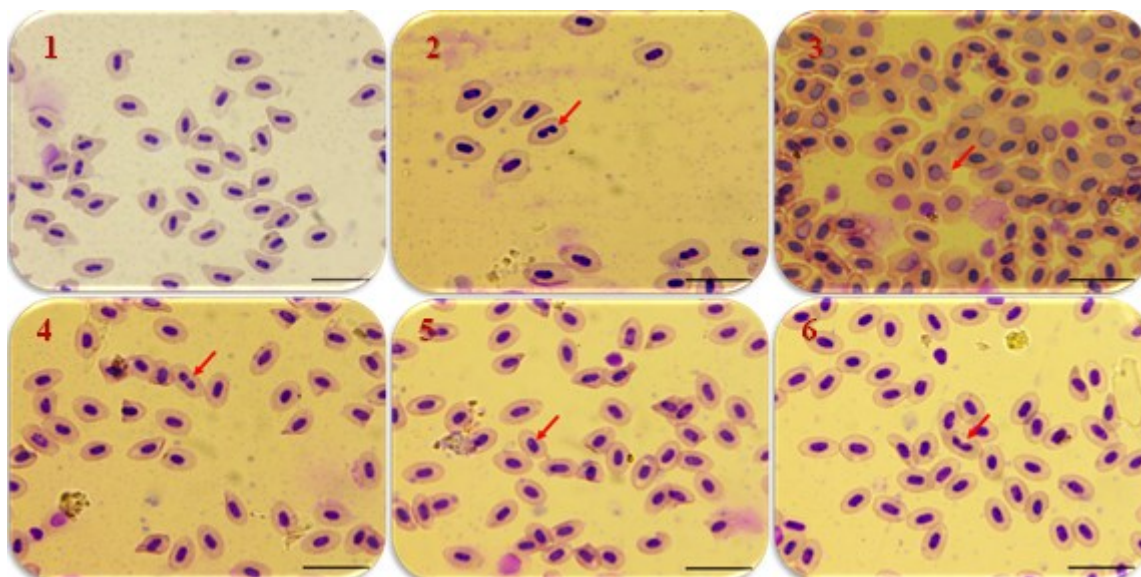
Consequentemente, o estudo fornece dados relevantes sobre o impacto do nufosate em organismos aquáticos, destacando a importância de uma análise ambiental rigorosa e do uso responsável de herbicidas para a conservação da vida aquática.

Posteriormente, foi avaliado os danos celulares relacionados aos parâmetros de *notched*, micronúcleo, binúcleo, *vacuolated* e *bebbled*.

Os resultados indicaram que todas as categorias de alterações *notched*, micronúcleo, binúcleo, *vacuolated* e *blebbed* (Figura 3) apresentaram distribuições não normais, justificando o uso de testes não paramétricos para análises subsequentes.

Diante disso, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis para comparar as medianas das diferentes categorias de alterações celulares. O teste de Kruskal-Wallis resultou em uma estatística de teste de 4,503 e o valor de p de 0,342.

Figura 3 - Foto de microscopia de eritrócito de peixe da espécie *Colossoma macropomum* mostrando uma célula: 1 – norma, 2 – *notched*, 3 – micronúcleo, 4 – binúcleo, 5 – *vacuolated* e 6 - *blebbed*. Coloração Giemsa. Barra 20 µm.



DISCUSSÃO

A toxicidade do glifosato tem sido objeto de investigação em estudos ecotoxicológicos. A Organização Mundial da Saúde³² relata que o valor da CL_{50-96h} para o glifosato varia consideravelmente, situando-se entre 2 a 55 mg/L, sendo esta variabilidade atribuída às diferentes espécies de peixes e às condições dos testes. Além disso, estudos conduzidos por Glusczak⁶ destacam que formulações comerciais de glifosato podem apresentar variações na CL_{50-96h} mesmo dentro de uma mesma espécie, sugerindo que os ingredientes adicionados nas formulações de cada produto podem contribuir para a potencialização de sua ação tóxica.

Destaca-se que os surfactantes, compostos químicos frequentemente adicionados às formulações de glifosato para auxiliar na aderência e penetração nas folhas das plantas, podem apresentar toxicidade aguda superior à do próprio glifosato, como observado em conduzidos por Tsui e Chu²⁸.

Ventura et al.³¹ determinaram a CL_{50-96h} do herbicida Roundup® para o peixe *Prochilodus lineatus*, com um valor de 13,69 mg/L. No presente estudo, a CL_{50-48h} do Nufosate para *Colossoma macropomum* foi estimada em 14,32 mg/L. A similaridade entre esses valores sugere que, apesar de envolverem espécies distintas, ambos os herbicidas à base de glifosato apresentam toxicidade aguda nesses organismos. Esses resultados enfatizam a importância de monitorar o uso de herbicidas em diferentes ecossistemas aquáticos, considerando suas possíveis variações de toxicidade conforme as espécies e as condições ambientais.

Por outro lado, pesquisa indica que o glifosato, amplamente utilizado em herbicidas, tem demonstrado potencial genotóxico significativo em organismos aquáticos. Estudos realizados com várias espécies de peixes, como o *Danio rerio*,

mostram que a exposição ao glifosato resulta em uma elevação dose-dependente de anomalias celulares, incluindo a formação de micronúcleos e alterações nucleares em células sanguíneas. Essas alterações são particularmente evidentes em exposições prolongadas, com efeitos genotóxicos detectados em concentrações que variam de níveis ambientalmente relevantes a concentrações mais elevadas. Essas descobertas ressaltam a necessidade de um controle rigoroso do uso de glifosato em áreas próximas a corpos d'água, uma vez que o herbicida pode afetar a estabilidade genética dos organismos aquáticos, comprometendo o equilíbrio ecológico desses ambientes.¹⁴

De maneira semelhante, o presente estudo demonstrou que o herbicida Nufosate induziu uma elevada frequência de micronúcleos e anomalias celulares no tambaqui, principalmente na maior concentração e após exposições prolongadas

O estudo conduzido por Klátyik (2024)¹³ sobre a toxicidade do glifosato e suas formulações comerciais em organismos aquáticos indica uma variabilidade significativa nos valores de CL₅₀, que podem variar de 1,8 mg/L a 55 mg/L, dependendo da espécie e das condições ambientais. Essa variação pode ser explicada pelos diferentes coadjuvantes presentes nas formulações comerciais, que frequentemente aumentam a toxicidade em comparação ao glifosato puro. No caso do Nufosate, especificamente testado no tambaqui, determinou uma CL_{50-48h} de 14,32 mg/L, evidenciando uma toxicidade aguda relativamente baixa. No entanto, o estudo também apontou efeitos genotóxicos em exposições crônicas, com danos nucleares significativos observados nos peixes, reforçando o potencial do Nufosate para causar danos genéticos em organismos aquáticos.

O contraste entre os resultados do estudo de Ramírez-Duarte et al.¹⁹ sobre a toxicidade aguda do Roundup® na cachama blanca e os achados do presente estudo sobre a genotoxicidade do nufosate para o tambaqui revela uma complexa interação entre diferentes herbicidas e espécies de peixes. Enquanto o Roundup® demonstrou danos histopatológicos significativos em órgãos vitais dos peixes, o nufosate exibiu uma toxicidade relativamente baixa nas condições testadas. No entanto, mesmo com essa baixa toxicidade aguda, o nufosate ainda apresentou potenciais danos genéticos, conforme evidenciado pelo teste de micronúcleo realizado.

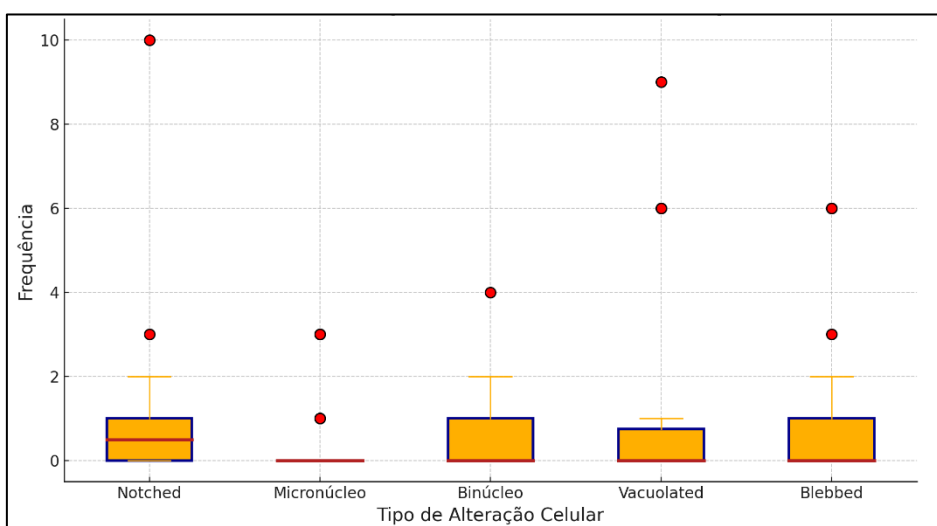
Santos et al.²⁴ evidenciaram que os impactos da contaminação por glifosato em peixes da espécie *P. reticulata* incluíram uma redução significativa na sobrevivência dos animais expostos ao pesticida, com uma taxa de mortalidade de 90% após 14 dias de exposição, na concentração de 7 mg/L de glifosato, considerada subletal, mostrando-se mais tóxica do que o previsto.

Com base no p-valor obtido 0,342, que é maior do que o limiar de significância estatística de 0,05, concluímos que não há diferenças estatisticamente significativas entre as medianas das diferentes categorias de alterações celulares causadas pelo nufosate em peixes (Figura 4).

Portanto, dentro do escopo deste estudo, o nufosate não demonstrou induzir um padrão específico de alterações celulares em peixes.

Os resultados do estudo sobre a genotoxicidade do Nufosate em tambaqui, indicam que embora o herbicida apresente baixa toxicidade aguda (CL_{50-48h} de 14,32 mg/L), a exposição crônica pode causar danos nucleares significativos, sugerindo riscos genotóxicos mesmo em concentrações subletais. Essas descobertas reforçam a necessidade de regulamentar mais rigorosamente o uso do Nufosate em corpos d'água, especialmente em áreas de aquicultura, onde espécies economicamente importantes podem ser afetadas. A variação dos riscos em diferentes profundidades de água e a possibilidade de impacto cumulativo destacam a importância de adaptar as políticas de uso de herbicidas com base em avaliações ambientais abrangentes e no monitoramento contínuo dos ecossistemas.

Figura 4 – Compara as diferentes alterações celulares (Notched, Micronúcleo, Binúcleo, Vacuolated e Blebbed) em peixes expostos ao nufosate.



Embora visualmente possamos observar algumas variações nas distribuições, estatisticamente, conforme indicado pelo teste de Kruskal-Wallis, não há evidências de diferenças significativas nas medianas das diferentes alterações celulares causadas pelo nufosate.

A figura apoia a conclusão de que não há uma diferença significativa nas medianas das alterações celulares em peixes expostos ao nufosate. Contudo, vale ressaltar que a variação e os outliers observados sugerem que há uma diversidade nas respostas individuais dos peixes ao nufosate, o que pode ser um ponto de interesse para estudos futuros.

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o Nufosate tem toxicidade aguda relativamente baixa para *Colossoma macropomum* (CL_{50-48h} de 14,32 mg/L). No entanto, observou-

se um risco ambiental moderado em concentrações de 0,96 mg/L, especialmente em corpos d'água rasos, com 0,30 m de profundidade. Embora os resultados do teste de micronúcleo revelem danos genotóxicos significativos, as alterações celulares não seguem um padrão definido.

Esses achados destacam a importância de uso criterioso do Nufosate, especialmente em áreas aquáticas vulneráveis. Recomenda-se a realização de estudos futuros para avaliar os efeitos genotóxicos em maior tempo de exposição, investigar a bioacumulação do herbicida e ampliar a análise para outras espécies aquáticas. Essas pesquisas serão importantes para fortalecer as práticas de manejo ambiental e proteger a biodiversidade.

REFERÊNCIAS

1. Annett R, Habibi HR, Hontela A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J Appl Toxicol*. 2014 May;34(5):458-79. doi: 10.1002/jat.2997.
2. Bastos DN. Toxicidade do herbicida Glifosato em *Daphnia magna* e pós-larvas de *Rhamdia quelen*. [Tese de Doutorado]. 2013. Disponível em: https://tede.unioeste.br/bitstream/tede/1923/1/Denise_Nascimento_Bastos_2013.pdf.
3. Boock MV, Machado-Neto JG. Estudos toxicológicos do oxiclreto de cobre para tilápia vermelha (*Oreochromis* sp.). *Arquivos do Instituto Biológico*. 2000; 67(2): 215-221. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/rdLL7mFYRqdcyGtDtdkKrN/?format=pdf&lang=pt>
4. FAO. Report of the Intersessional Meeting of the Aquaculture and Fishery Subject Groups of the Coordinating Working Party on Fishery Statistics, London: FAO Fisheries and Aquaculture Report; 2023. Disponível em: <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/6624e792-4866-4414-b52d-d565b93aa3ca/content>.
5. Gámez Rojas CM, Ramírez Riveros EJ. Determinación de la concentración letal media (CL50-48) del glifosato sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con *Daphnia magna*; 2008.
6. Gluszczak L. Parâmetros toxicológicos em piavas (*Leporinus obtusidens*) e jundiás (*Rhamdia quelen*) após exposição a uma formulação comercial de glyphosate. 2008. [Tese Doutorado em Bioquímica Toxicológica] - Universidade Federal de Santa Maria. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/4393/LISSANDRA%20GLUSCZAK.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
7. Gustinasari, K. et al. Acute toxicity and morphology alterations of glyphosate-based herbicides to *Daphnia magna* and *Cyclops vicinus*. *Toxicological Research*. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33868977/>

8. Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. *Environmental Science & Technology*. 1977;11:714-719. <http://dx.doi.org/10.1021/es60130a004>.
9. Heath AG. *Water pollution and fish physiology*. (2^a ed.). Boca Raton: Lewis Publishers; 1995. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/9780203718896/water-pollution-fish-physiology-alan-heath>.
10. Heddle JA. A rapid in vivo test for chromosome damage. *Mutation Research*. 1973;18:187-192. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0027510773900353?via%3Dihub>
11. IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Brasil, Ministério do Meio Ambiente. Avaliação da toxicidade aguda para peixes. In: Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos. Brasília; 1987, p. 20-32.
12. IDARON/SIAFRO, Agência de Defesa Sanitária Agrosilvopastoril do Estado de Rondônia. Sistema de Fiscalização do Comércio de Agrotóxicos do Estado de Rondônia. (versão 2.0) SIAFRO 2.0a Rondônia: IDARON; 2023. <http://www.idaron.ro.gov.br/index.php/gerencia-vegetal/comercio-de-agrotoxicos/>.
13. Klátyik S, Simon G, Oláh M, Takács E, Mesnage R, Antoniou M N, Zaller JG, Székács A. Aquatic ecotoxicity of glyphosate, its formulations, and co-formulants: evidence from 2010 to 2023. *Environmental Sciences Europe*. 2024;36(22). Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12302-024-00849-1>. Acesso em: 18 out. 2024.
14. Lacroix R, Kurrasch DM. **Glyphosate toxicity: In vivo, in vitro, and epidemiological evidence**. *Toxicological Sciences*. 2023; 192(2), 131–140. Disponível em: <https://encurtador.com.br/RccXU>.
15. Manrique WG, Silva C G, Castro MP, Petrillo TR, Figueiredo MAP, Belo MA A et al. **Expression of Cellular Components in Granulomatous Inflammatory Response in *Piaractus mesopotamicus*** Model. 2015; 10(3): e0121625. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121625>.
16. Melo M S. Toxicidade do herbicida à base de glifosato (Roundup WG®) no hepatopâncreas e sistema endócrino do camarão de água doce *Macrobrachium potiana*. 2020. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/215808/PBCD0115-T.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>.
17. Moraes L. Desenvolvimento e Validação de Métodos para a Determinação de Agrotóxicos em Água e Solo das Áreas de recarga do Aquífero Guarani, na Região das Nascentes do Rio Araguaia, MT/GO. 2009. 157 f. [Tese de

- Doutorado em Ciências] - UNICAMP, 2009. Disponível em:
<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/941040/1/2009OT10.pdf>.
18. Neto M L F, Sarcinelli PN. Agrotóxicos em água para consumo humano: uma abordagem de avaliação de risco e contribuição o processo de atualização da legislação brasileira. *Engenharia Sanitária Ambiental*. 2009; 14(1): 69-78. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/esa/a/YxJ97Sgv3VZNYNLx7nRb6dw/?format=pdf&lang=pt>
 19. Ramírez-Duarte WF, Rondón-Barragán IS, Eslava-Mocha PR. Acute toxicity and histopathological alterations of Roundup® herbicide on "cachama blanca" (*Piaractus brachypomus*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2008; 28(11), 547–554. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2008001100002>.
 20. Rand, G. M. (Ed.). *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate and Risk Assessment* (2nd ed). Washington, DC: Francis and Taylor; 1995. p. 1125. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/books/edit/10.1201/9781003075363/fundamentals-aquatic-toxicology-gary-rand>.
 21. Rand GM, Petrocelli SR. *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and Relationship between the price of fish and its quality attributes: a study within a community at the University of São Paulo, Brazil*. Maciel, LK Savay-da-Silva, JS Vasconcelos, JG Sonati, JA Galvão, LKFD Lima (Ed.). *Food Sci Technol*. 2013; 33: 451-456.
 22. Royal Society of Chemistry. *Glyphosate: a review on its widespread prevalence and occurrence across various systems*. *Environmental Science: Advances*; 2024. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2024/va/d4va00085d>. Acesso em: 21 out. 2024.
 23. Samai I, Saloua N, Ouafia A, Hanene R, Zoubeida M. Water pollution of the Oued D'Hous River (Algeria) and its potential impact on fauna and flora. *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology*. 2023; 11(1), e2023006. <https://doi.org/10.31893/jabb.23006>.
 24. Santos ACB et al. Efeitos da contaminação por glifosato em duas gerações do peixe *Poecilia reticulata* (PETER, 1859): Sistema de defesa antioxidante, biotransformação de xenobióticos, colinesterase e metabolismo de aminoácidos. *Jornada de iniciação científica e tecnológica*. 2021;1(11). Disponível em: <https://portaleventos.uffs.edu.br/index.php/JORNADA/article/view/15866/10145>.
 25. Schmid W. The micronucleus test. *Mutation Research*. 1975;31:9-15, 1975. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0165116175900588>.
 26. Solomon KR. *Avaliação de riscos ecotoxicológicos dos produtos fitossanitários. Relatório técnico*. Centro de Toxicologia. Universidade de Guelph, Canadá; 1996.

27. Sumitomo Chemical. Bula Nufosate. In: Bula do Nufosate, 26 maio. 2023. Disponível em: <https://www.sumitomochemical.com.br/wp-content/uploads/products/files/herbicidas-nufosate-bula.pdf>. Acesso em: 27 fev. 2024.
28. Tsui MTK; Chu LM. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulation: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*. 2003; 52:1189 -1197. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653503003060>.
29. USEPA. Environmental Protection Agency. New Pesticide Fact Sheet. PB96-181516.EPA737-F-96-005. U.S. EPA Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances; 1996.
30. Veiga, M M et al. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. *Cadernos de Saúde Pública* [online]. 2006; 22(11): 2391-2399. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2006001100013>.
31. Ventura, B.C., Angelis, D.F., Marin-Morales, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the herbicide Roundup® in the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2008; 655(1-2), 41-46.
32. World Health Organization (WHO). Glyphosate. *Environmental Health Criteria*. Geneva, Switzerland; 1994.
33. Zucker, E. Standard evaluation procedure: acute toxicity test for freshwater fish. Washington: USEPA; 1985. Disponível em: <https://encurta.ae/IJoXT>