

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE ÁGUA DOCE E PESCA  
INTERIOR – PPG BADPI

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO EM CONCENTRAÇÕES  
AMBIENTALMENTE RELEVANTES SOBRE BIOMARCADORES  
MORFOLÓGICOS, NEUROTÓXICOS E DE MUTAGENICIDADE EM FILHOTES  
DE TARTARUGA-DA-AMAZÔNIA

VICTOR HUGO CUNHA MARTINS

MANAUS – AM

2025

VICTOR HUGO CUNHA MARTINS

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO EM CONCENTRAÇÕES  
AMBIENTALMENTE RELEVANTES SOBRE BIOMARCADORES  
MORFOLÓGICOS, NEUROTÓXICOS E DE MUTAGENICIDADE EM FILHOTES  
DE TARTARUGA-DA-AMAZÔNIA

Orientadora: Dra. Fabíola Xochilt Valdez Domingos Moreira

Coorientadora: Dra. Marcela dos Santos Magalhães

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

MANAUS – AM

2025



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA  
E INOVAÇÃO



**ATA DA DEFESA PÚBLICA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA DE ÁGUA DOCE E PESCA INTERIOR)**

No dia 25 de fevereiro de 2025, às 14:00 horas, reuniu-se remotamente a Banca Julgadora da DEFESA PÚBLICA de MESTRADO, composta pelos seguintes Doutores (as), membros titulares: Dra. Flávia Kelly S. de Souza, Dra. Lucélia Gonçalves Vieira e Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez; tendo como membros suplentes: Dra. Maritana Mela Prodocimo e Dra. Sidineia Aparecida Amadio, a fim de proceder a avaliação da DISSERTAÇÃO do (a) discente Vítor Hugo Cunha Martins, intitulada: "EFEITOS DA EXPOSIÇÃO E RECUPERAÇÃO AO GLIFOSATO EM CONCENTRAÇÕES PERMITIDAS PELA LEI SOBRE BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS, NEUROTÓXICOS E DE GENOTOXICIDADE EM FILHOTES DE TARTARUGA-DA-AMAZÔNIA". O estudo foi conduzido sob a orientação da Dra. Fabiola Xochilt Valdez Domingos Moreira e Dra. Marcela dos Santos Magalhães.

Após a exposição da aula, dentro do tempo regulamentar, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Banca Julgadora, tendo recebido o conceito final:

☒ - Aprovada (o) por unanimidade

MENÇÃO: ☐ - Com "Distinção"

☐ - Aprovada (o) por maioria  
Louvor"

☐ - Com "Distinção e

☐ - Reprovada

Foi lavrada a ata e assinada pelos membros presentes da Banca Julgadora.

Documento assinado digitalmente  
gov.br  
FLAVIA KELLY SIQUEIRA DE SOUZA  
Data: 25/02/2025 11:46:53-0300  
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Dra. Flávia Kelly S. de Souza, UFAM/INPA

Documento assinado digitalmente  
gov.br  
LUCÉLIA GONÇALVES VIEIRA  
Data: 25/02/2025 11:57:45-0300  
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Dra. Lucélia Gonçalves Vieira, UFG

Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez, UEL

Dra. Maritana Mela Prodocimo, UFPR

Dra. Sidineia Aparecida Amadio, INPA

Documento assinado digitalmente  
gov.br  
KYARA MARTINS FORMIGA  
Data: 06/03/2025 14:40:02-0300  
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

**Dra. Kyara Martins Formiga**  
Coordenadora do PPG BADPI  
PO. 129/2023 – INPA/MCTI

Esta Ata é um documento de comprovação único e exclusivo da Defesa Pública, não podendo ser usado para outro fim. O ÚNICO documento que comprova a titulação de MESTRE e DOUTOR é o respectivo DIPLOMA. O Regulamento do BADPI estabelece no seu Artigo 71 que, "Ao discente que houver completado todos os requisitos contidos nos Regulamentos Geral dos PPGs do INPA e do BADPI será conferido o título de Mestre ou Doutor,

Catálogo na Publicação (CIP-Brasil)

---

M386e Martins, Victor Hugo Cunha

Efeitos da exposição ao glifosato em concentrações ambientalmente relevantes sobre biomarcadores morfológicos, neurotóxicos e de mutagenicidade em filhotes de tartaruga-da-amazônia. / Victor Hugo Cunha Martins; orientadora Fabíola Xochilt Valdez Domingos Moreira; coorientadora Marcela dos Santos Magalhães. - Manaus : [s.l.], 2025.

1,1 mb

39 p. : il. color.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2025.

1. Podocnemis expansa. 2. Ecotoxicologia. 3. Glifosato. I. Moreira, Fabíola Xochilt Valdez Domingos. II. Magalhães, Marcela dos Santos. III. Título.

CDD 597.92

---

## Agradecimentos

Inicialmente gostaria de agradecer a minha orientadora Dra. Fabíola Xochilt Domingos Moreira e minha coorientadora Dra. Marcela dos Santos Magalhães que foram de grande ajuda me guiando nessa nova jornada que foi o mestrado.

Aos meus colegas e amigos de laboratório que muito me ajudaram durante o experimento e as coletas.

Aos meus pais, Jocifran Ramos Martins, Eleonora Jacaúna Martins e Perla Cunha que sempre foram os grandes alicerces da minha vida, sem eles eu não teria chegado aonde estou hoje.

Aos meus irmãos, Pablo, Paola, Igor, Bia e Kaike que sempre acreditaram em mim.

A minha namorada, Ana Claudia da Silva Brito, que durante essa jornada me ajudou e aguentou a barra nessa jornada difícil.

Aos meus avós maternos que sempre oraram pelo meu sucesso e sempre me deram todo o apoio do mundo.

Aos meus queridos amigos de ensino médio, Júlio Kawakami, Steph Agnes, Pâmela Beatriz e Victória Brito, pessoas nas quais sempre pude contar.

Ao meu querido amigo da graduação Vinicius, pelas conversas divertidas e inspiradoras que me ajudaram a não surtar durante a jornada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM/POSGRAD

Ao PPG-BADPI pela estrutura e a todos os professores por todo o conhecimento repassado durante todos esses 2 anos que fizeram grande diferença em minha vida.

## Resumo

O Brasil é um dos países que mais utiliza agrotóxicos devido a sua extensa variedade de produções agrícolas. No estado do Amazonas, com o aumento populacional e alta demanda de alimentos acabou fazendo com que muitos desses agrotóxicos fossem utilizados na região afim de aumentar a produtividade local para abastecer o comércio. Um dos agrotóxicos mais utilizados na região é o glifosato, um herbicida de amplo espectro utilizado para combater ervas daninhas em plantações. Por muitas vezes os efeitos destes agrotóxicos acabam por atingir espécies não alvo, devido às contaminações nos ambientes aquáticos ocasionados pelo escoamento superficial de plantações. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos, mutagênicos, hepatotóxicos, nefrotóxicos e bioquímicos que o agrotóxico glifosato, em concentrações ambientalmente relevantes de 32µg/L e 65µg/L, exerce sobre filhotes da tartaruga-da-amazônia, *Podocnemis expansa*. A concentração definida como segura pela CONAMA foi capaz de induzir danos histopatológicos no tecido hepático de *P. expansa*, mas não foi suficiente para causar alteração na frequência de mincronúcleos, Anomalias Nucleares Eritrocíticas (ANEs), histopatologia dos rins nem alterar a atividade da acetilcolinesterase. Nossos resultados indicam que o glifosato é capaz de causar prejuízo na histopatologia hepática de filhotes de tartaruga-da-amazônia em concentrações ambientalmente relevantes.

Palavras-chave: *Podocnemis expansa*, ecotoxicologia, glifosato

## Abstract

Brazil is one of the countries that uses the most pesticides due to its wide variety of agricultural production. In the state of Amazonas, with the population growth and high demand for food, many of these pesticides were used in the region in order to increase local productivity to supply the trade. One of the most widely used pesticides in the region is glyphosate, a broad-spectrum herbicide used to combat weeds in plantations. The effects of these pesticides often end up affecting non-target species, due to contamination in aquatic environments caused by surface runoff from plantations. In this sense, this study aimed to evaluate the cytotoxic, mutagenic, hepatotoxic, nephrotoxic and biochemical effects that the pesticide glyphosate, in environmentally relevant concentrations of 32 µg/L and 65 µg/L, exerts on hatchlings of the Amazon turtle, *Podocnemis expansa*. The concentration defined as safe by CONAMA was capable of inducing histopathological damage in the liver tissue of *P. expansa*, but was not sufficient to cause changes in the frequency of mininuclei, Erythrocytic Nuclear Anomalies (ENAs), kidney histopathology or alter acetylcholinesterase activity. Our results indicate that glyphosate is capable of causing damage to the liver histopathology of Amazon turtle hatchlings at environmentally relevant concentrations.

Keywords: *Podocnemis expansa*, ecotoxicology, glyphosate

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Sumário                                                                              |    |
| Lista de figuras .....                                                               | 9  |
| 1 - Introdução .....                                                                 | 10 |
| 2 - Objetivos .....                                                                  | 12 |
| 2.1 - Objetivo Geral.....                                                            | 12 |
| 2.2 - Objetivo Específico.....                                                       | 12 |
| 3 - Material e métodos.....                                                          | 13 |
| 3.1 - Espécie de Estudo .....                                                        | 13 |
| 3.3 - Tratamentos e exposição .....                                                  | 15 |
| 3.4 - Histopatologia hepática e renal .....                                          | 17 |
| 3.5 - Avaliação de micronúcleos e anormalidades nucleares dos eritrócitos .....      | 18 |
| 3.6 - Atividade da Acetilcolinesterase .....                                         | 19 |
| 3.7 - Análise Estatística .....                                                      | 20 |
| 4 - Resultados .....                                                                 | 20 |
| 4.1 – Dados físico-químicos da água do experimento.....                              | 20 |
| 4.2- Biometria dos filhotes de <i>Podocnemis expansa</i> .....                       | 20 |
| 4.3 – Histopatologia do Tecido hepático .....                                        | 21 |
| 4.4 – Histopatologia do tecido renal.....                                            | 23 |
| 4.5 – Micronúcleo e Anomalias Nucleares Eritrocitárias.....                          | 25 |
| 4.6 – Atividade da Acetilcolinesterase .....                                         | 26 |
| 5- Discussão.....                                                                    | 27 |
| 5.1 – Trabalhos com exposição ao glifosato em organismos .....                       | 27 |
| 5.2 – Histopatologia do Fígado .....                                                 | 28 |
| 5.3 - Histopatologia dos rins.....                                                   | 29 |
| 5.4 - Micronúcleos e Anomalias Nucleares Eritrocitárias .....                        | 31 |
| 5.5 - Atividade da Acetilcolinesterase no músculo de <i>Podocnemis expansa</i> ..... | 32 |
| 6- Conclusões .....                                                                  | 33 |
| 7- Considerações Finais.....                                                         | 33 |

## Lista de tabelas

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Grau de extensão da lesão no órgão                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 18 |
| Tabela 2: Fator de importância da lesão no órgão                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 18 |
| Tabela 3: Média dos parâmetros físico-químicos coletados durante o experimento                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 20 |
| Tabela 4: Média da biometria dos filhotes de <i>Podocnemis expansa</i> antes e após a exposição ao glifosato em concentrações permitidas pela lei. (CMC: Comprimento médio da carapaça; LMC: Largura média da carapaça; CMP: Comprimento médio do plastrão), (Controle R: controle recuperação; E32: exposto a 32µg/L de glifosato; E65: exposto a 65µg/L de glifosato; R32 e R65: recuperação dos animais expostos à 32 e 65 µg/L de glifosato). | 20 |
| Tabela 5: Principais alterações nucleares (%) observadas nos eritrócitos de <i>P. expansa</i> expostos ao glifosato. C: controle; CR: controle recuperação; E32: exposto a 32µg/L de glifosato; E65: exposto a 65µg/L de glifosato; R32 e R65: recuperação dos animais expostos à 32 e 65 µg/L de glifosato (M = média, Md = mediana, máx = máxima)                                                                                               | 25 |
| Tabela 6: Levantamento dos trabalhos com experimento com exposição ao glifosato                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 27 |

## Lista de figuras

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Filhotes de <i>Podocnemis expansa</i> em tanques no primeiro mês de aclimação .....                                                                                                                                                                                                                                                           | 14 |
| Figura 2: Filhotes de <i>Podocnemis expansa</i> em aquários no segundo mês de aclimação. ....                                                                                                                                                                                                                                                           | 14 |
| Figura 3: Representação do desenho experimental (exposição).....                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 15 |
| Figura 4: Representação do desenho experimental (recuperação) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 16 |
| Figura 5: Linha do tempo do experimento .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 16 |
| Figura 6: Processo de abertura do plastrão de filhote de <i>Podocnemis expansa</i> utilizando a micro-retífica .....                                                                                                                                                                                                                                    | 17 |
| Figura 7: (A) Rins e (B) fígado de filhote de <i>Podocnemis expansa</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                          | 18 |
| Figura 8: Coleta de sangue dos indivíduos de <i>Podocnemis expansa</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                           | 19 |
| Figura 9: Histopatologia de fígado de filhotes de <i>Podocnemis expansa</i> . A: tecido hepático normal. B: Tecido hepático com hepatócitos vacuolizados (estrela). C: núcleo vacuolizado (seta). D: infiltração leucocitária (seta). E: pontos de necrose (seta). ....                                                                                 | 22 |
| Figura 10: Índice de Lesão do Fígado em filhotes de <i>Podocnemis expansa</i> expostos ao glifosato (n=3, p=0,05). C: controle; E32: exposto a 32µg/L de glifosato; E65: exposto a 65µg/L de glifosato. ....                                                                                                                                            | 23 |
| Figura 11: Histopatologia de rim de filhotes de <i>Podocnemis expansa</i> . A: Tecido saudável, mostrando o glomérulo (seta) e cápsula de Bowman, túbulo renal (cabeça de seta). B: Tecido renal com infiltração leucocitária (seta) C: Núcleos vacuolizados (seta). D: Necrose .....                                                                   | 24 |
| Figura 12: Índice de Lesão dos rins de filhotes de <i>Podocnemis expansa</i> (n=4, p= 0,10). C: controle; E32: exposto a 32µg/L de glifosato; E65: exposto a 65µg/L de glifosato. ....                                                                                                                                                                  | 24 |
| Figura 13: Alterações nucleares eritrocíticas em filhotes de <i>Podocnemis expansa</i> expostos ao glifosato. A: Núcleo normal; B: micronúcleo; C: Núcleo lobado; D: Núcleo deslocado; E: Núcleo reniforme; F: Núcleo bicudo; G: Constrição assimétrica .....                                                                                           | 25 |
| Figura 14: Frequência de alterações nucleares eritrocíticas (%) observadas em filhotes de <i>P. expansa</i> após exposição ao glifosato e recuperação (n=5). C: controle; CR: controle recuperação; E32: exposto a 32µg/L de glifosato; E65: exposto a 65µg/L de glifosato; R32 e 65: recuperação dos animais expostos à 32 e 65µg/L de glifosato. .... | 26 |
| Figura 15: Atividade da acetilcolinesterase no músculo de filhotes de <i>Podocnemis expansa</i> . R: Recuperação, E: Exposição (p=0,64). C: controle; CR: controle recuperação; E32: exposto a 32µg/L de glifosato; E65: exposto a 65µg/L de glifosato; R32 e R65: recuperação dos animais expostos à 32 e 65µg/L de glifosato. ....                    | 27 |

## 1 - Introdução

A utilização dos agrotóxicos no mundo surgiu da urgência do aumento da produção de alimentos após a segunda guerra mundial, junto com a necessidade de combate as pragas que assolavam as plantações para que houvesse uma melhor produção (Bernardes et al., 2015). O Brasil é um dos países que mais utilizam agrotóxicos em suas lavouras, junto da China, Estados Unidos e União Europeia, pois a produção agrícola do país depende da utilização destes produtos (Faber, 2020; Gaboardi et al., 2023; Zhang, 2018). Muitos destes compostos apresentam funções de inseticida, fungicida, herbicida, raticida, moluscicida, entre outros (Zhang, 2018). Os agrotóxicos no Brasil são classificados de categoria 1 a 5, sendo a categoria 1 mais tóxico e categoria 5 com nenhum risco de contaminação (ANVISA, 2019).

Na Amazônia, o crescimento da população urbana aumentou a demanda por alimentos, impulsionando as atividades agrícolas de pequena escala em torno das grandes áreas metropolitanas (Parry et al., 2010; Römbke et al., 2008). O cultivo de frutas e vegetais não nativos para atender os mercados urbanos locais aumentou o uso de pesticidas para combater pragas de insetos e fungos e evitar a competição com outras plantas (Schiesari et al., 2013; Waichman et al., 2002). Um estudo realizado por Rico et al. (2022), encontrou resíduos de diversos agrotóxicos nas águas dos rios Negro, Amazonas e Tocantins, dentre eles, inseticidas como Malathion, clorpirifos, clorpirifos-metil e fipronil, herbicidas como atrazina, terbutilazina e tebuthiuron e fungicida como o carbendazin.

A utilização de agrotóxicos vem afetando de maneira negativa vários organismos, como os invertebrados aracnídeos e chilopodas (Lindsay & French, 2004), dípteras e hemípteras (Pisa et al., 2014) vertebrados como peixes (Wacksman et al., 2006), anfíbios (Clique ou toque aqui para inserir o texto. (Gill et al., 2018; Paganelli et al., 2010), répteis (Carneiro et al., 2021; Hirano et al., 2019; Malafaia et al., 2020; Mendonça et al., 2016; Poletta et al., 2008)

O glifosato é um dos agrotóxicos mais utilizados por apresentar um amplo espectro de ação e uma alta eficácia contra ervas daninhas (ZHANG, 2018). Na classificação da ANVISA é enquadrado na categoria 4 (pouco perigoso). Uma de suas formulações comerciais, o Roundup Original® é diluído para 44,5% antes do uso, e

possui uma aplicação recomendada de 5L/ha (MONSANTO, 2010). Em contato com o solo, ele interage com metais e ácido húmico, aderindo ao solo e permanecendo nele durante um período médio de 4 a 845 dias (Bento et al., 2016; Bergström et al., 2011; Singh et al., 2019; C. Zhang et al., 2015)

Pelo fato do glifosato apresentar um longo período de permanência no solo, acaba tornando-se um potencial fonte de contaminação dos ambientes aquáticos devido ao processo de escoamento superficial da água (Queiroz et al., 2011). Nas águas superficiais, a degradação por microrganismos e a adsorção por sedimentos contribuem para que o glifosato se disperse de forma mais acelerada do que nos solos, podendo ser dispersado em média de 7 a 14 dias (Giesy et al., 2000). Por apresentar grande solubilidade em água, há maior facilidade do glifosato em ser transportado pelo ambiente (Solomon & Thompson, 2003). Segundo a resolução de número 357/11 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), a concentração segura de glifosato em águas superficiais é de 65µg/L, no entanto o trabalho de Brovini et al. (2021), apresentou que em algumas regiões do país essa concentração foi significativamente excedida, com valores entre 2.777µg/L e 5.200µg/L.

O glifosato pode exercer efeitos como alterações histopatológicas e estresse oxidativo em peixes (Langiano & Martinez, 2008; Nwani et al., 2013; Uchenna et al., 2022), má formação em girinos e alta mortalidade com baixas concentrações em algumas espécies de sapos (Babalola et al., 2019; Daam et al., 2019; Paganelli et al., 2010), alta toxicidade em baixas concentrações para mamíferos (McComb et al., 2008; Wunnapuk et al., 2014). Pala (2019) relatou inibição significativa de até 53% na enzima acetilcolinesterase em um período de 24 a 96 horas no microcrustáceo *Gammarus pulex* exposto às concentrações de 10 µg/L, 20 µg/L e 30 µg/L de glifosato. Até o momento sabe-se que o glifosato é capaz de causar alterações histopatológicas, genotóxicas e ósseas em organismos aquáticos da amazônia (Malafaia et al., 2020; Mendonça et al., 2016; Shiogiri et al., 2012).

Mingo et al. (2016) destacam a importância de se entender como as espécies de répteis reagem a exposição a agrotóxicos para identificar espécies vulneráveis a estes compostos e fornecer informações que auxiliem na conservação das espécies. Uma das espécies de répteis mais ameaçadas da região amazônica é a *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812), popularmente conhecida como tartaruga-da-Amazônia. *P. expansa* é muito utilizada na região como fonte de alimento, e devido a sua carne e ovos serem

muito apreciadas, acabou levando a espécie a risco de extinção (Diniz e Santos, 1997). O aumento da produção agrícola em regiões ribeirinhas, ocasiona o aumento da utilização de agrotóxicos nessas localidades (Waichman et al., 2002). Após a aplicação nas plantações, essas substâncias podem alcançar o ambiente aquático através do processo de escoamento superficial (Queiroz et al., 2011), elevando assim o risco de exposição de organismos aquáticos aos agrotóxicos.

Alguns estudos como o de Mendonça et al. (2016) e Hirano et al. (2019) realizados com ovos e embriões de *P. expansa* expostos ao glifosato em concentrações de 65 µg/L e 6500µg/L provocaram má formação óssea nos embriões. Segundo Malafaia et al. (2020), foi observada a presença de micronúcleos e alterações nucleares eritrocitárias em embriões de *P. expansa* expostos a 65µg/L de glifosato. Foi observado também alterações histopatológicas nos tecidos de fígado e rins de embriões de *Podocnemis expansa* expostos a 65µg/L da formulação comercial do glifosato Roundup®, durante o desenvolvimento embrionário (Silva, 2022). Como a maioria dos trabalhos com essa espécie foram realizados com embriões, se faz necessário ampliar o entendimento acerca da ação desse composto sobre filhotes.

Diante disto, as hipóteses e predições deste presente trabalho são:

H1: A maior concentração de glifosato causará uma maior incidência de micronúcleos e ANEs nos filhotes de *Podocnemis expansa*.

H2: A maior concentração de glifosato causará maiores índices de lesões nos órgãos hepáticos e renais de filhotes de *Podocnemis expansa*.

H3: A maior concentração de glifosato causará maior inibição na atividade da enzima acetilcolinesterase em filhotes de *Podocnemis expansa*.

## 2 - Objetivos

### 2.1 - Objetivo Geral

Analisar o efeito da exposição ao glifosato em concentrações ambientalmente relevantes sobre biomarcadores morfológicos, neurotóxicos e de genotoxicidade em filhotes de tartaruga-da-amazônia, *Podocnemis expansa*.

### 2.2 - Objetivo Específico

- Avaliar se duas concentrações ambientalmente relevantes de glifosato causarão aumento na incidência de micronúcleos e ANEs em eritrócitos de *P. expansa*;

- Avaliar se duas concentrações ambientalmente relevantes de glifosato causarão aumento nos índices de lesão hepática e renal em filhotes de *P. expansa*;
- Averiguar se duas concentrações ambientalmente relevantes de glifosato ocasionarão inibição na atividade da enzima acetilcolinesterase no músculo e no cérebro de filhotes de *P. expansa*;

### 3 - Material e métodos

#### 3.1 - Espécie de Estudo

A espécie *Podocnemis expansa* Schweiger (1812), comumente conhecida como tartaruga-da-amazônia, ou tartaruga gigante da Amazônia, é o maior quelônio de água doce da América do Sul, podendo chegar a medir de 75 a 107 cm de comprimento, pesando cerca de 60 kg. Esta espécie apresenta uma ampla distribuição na região amazônica, se estendendo desde a desembocadura do rio Amazonas, até os rios Morona e Marañón, no Peru, sendo encontrada também nos rios Orinoco e Essequibo, por quais esses realizam a atividade de migração durante o ano (Vogt, 2008). No ambiente aquático elas desempenham o papel fundamental de ciclagem de nutrientes e contribuem para o ciclo energético no ambiente (Lovich et al., 2018). A espécie sofre principalmente com o comércio clandestino de carne e ovos, que vem causando sérios impactos em sua população (Vogt et al., 2023)

#### 3.2 - Procedência e aclimação dos animais

Os animais utilizados neste estudo foram filhotes de *P. expansa* de 4 meses obtidos através de doação do Centro de Estudos de Quelônios Amazônicos (CEQUA). No total foram utilizados 30 indivíduos de oito meses de idade para o experimento autorizado pela CEUA – INPA 144/2024. Eles foram aclimatados durante dois meses, no primeiro mês foram mantidos em dois tanques, um de 500 litros e outro de 250 litros, com 100 litros de água de poço artesiano do INPA em cada, sendo alimentados durante 5 dias da semana com ração Nutripiscis® com 45% de proteína correspondendo à 5% do peso corporal dos animais. Já no segundo mês as tartarugas foram individualmente transferidas para aquários de 30 litros de capacidade, contendo 24,5 L de água em cada aquário, sendo alimentadas duas vezes durante a semana. O fotoperíodo foi de 12h claro:12h escuro, com

banhos periódicos de luz UV, a temperatura do ambiente foi mantida entre 25°C e 28°C e foi realizado o monitoramento do pH e amônia tóxica periodicamente.



Figura 1: Filhotes de *Podocnemis expansa* em tanques no primeiro mês de aclimação



Figura 2: Filhotes de *Podocnemis expansa* em aquários no segundo mês de aclimação.

Durante o experimento os animais foram alimentados no dia 7 (todos os animais), dia 14 (animais da recuperação) e dia 21, com 15 pellets de ração para cada animal ( $\pm 3g$  para cada animal). Esse procedimento foi realizado no mesmo dia da troca de 100% da água dos aquários para evitar a elevação rápida da amônia na água durante o experimento. As trocas de água foram realizadas durante os dias 7, 14 e 21(Figura 4). A biometria dos animais foi realizada antes e depois da realização do experimento.

### 3.3 - Tratamentos e exposição

As concentrações de glifosato utilizadas neste estudo foram determinadas com base nos limites máximos aceitos para contaminação de águas superficiais no Brasil, de acordo com o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) Resolução 357/2005. O glifosato utilizado foi o princípio ativo com 98% de pureza da SIGMA®, CAS nº 1185107-63-4. Para a diluição para as concentrações desejadas, foi fabricada uma solução mãe de glifosato de 1mg/ml. Foram avaliados dois tratamentos, o primeiro com a concentração de 65 µg/L, correspondente ao limite máximo para a presença de glifosato em águas superficiais do tipo 1 e 2 segundo a CONAMA, e o segundo tratamento utilizando 32 µg/L, sendo a metade da concentração máxima permitida pelo CONAMA.

O experimento foi realizado com 1 indivíduo de *P. expansa* por aquário, totalizando 5 indivíduos por tratamento. Grupo exposição: animais controle (C), expostos à concentração de 32 µg/L (E32), expostos à concentração de 65 µg/L (E65) (Figura 3). Grupo recuperação: animais controle da recuperação (CR), expostos e recuperados à concentração de 32 µg/L (R32) e expostos e recuperados à concentração de 65 µg/L (R65) (Figura 4). O n amostral do trabalho se baseia nos trabalhos de Hérítier et al. (2017) e Malafaia et al. (2020), em que ambos utilizaram cinco indivíduos por grupo para avaliar os efeitos de agrotóxicos em tartarugas.



Figura 3: Representação do desenho experimental (exposição)



Figura 4: Representação do desenho experimental (recuperação)

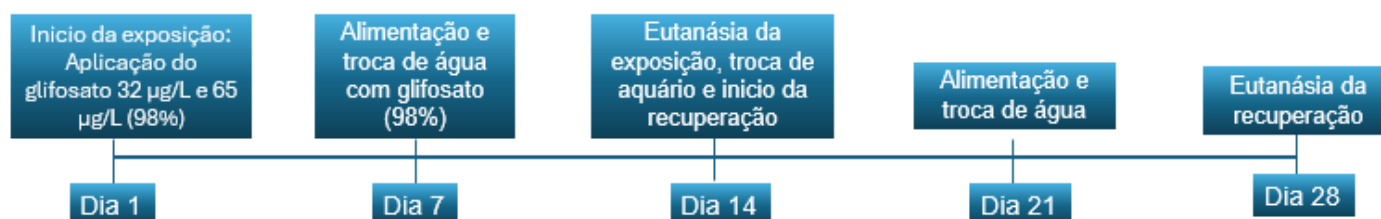


Figura 5: Linha do tempo do experimento

A aplicação do glifosato foi feita diretamente na água no dia 1 e no dia 7 após a troca total da água (Figura 5). No dia 14, o grupo de exposição foi eutanasiado para coleta de amostras para avaliar os efeitos da exposição ao glifosato. O período de exposição foi determinado considerando o tempo de vida médio do glifosato no ambiente aquático de 7 a 14 dias (Giesy et al., 2000). O grupo de recuperação foi realocado para aquários com água limpa no dia 14, onde foram mantidos por mais 14 dias, completando os 28 dias de experimento. Ao final dos 28 dias de experimento foi realizada a coleta das amostras com o intuito de observar possíveis indícios de recuperação dos efeitos da exposição do glifosato nos filhotes de *P. expansa*. A temperatura da água, pH, e amônia tóxica foram monitorados durante o experimento. A biometria dos animais foi coletada antes e após a exposição, sendo medido o peso corporal, comprimento médio da carapaça,

comprimento médio do plastrão, largura média da carapaça e altura média da carapaça. A eutanásia dos animais foi realizada no laboratório de Ecotoxicologia Aquática da Amazônia – INPA, e ocorreu com a aplicação de dose letal da mistura de xilazina e cetamina diretamente na base do crânio dos indivíduos, a fim de garantir uma overdose rápida pela anestesia, causando uma rápida perda de consciência, seguida de morte por parada respiratória. A abertura do plastrão ocorreu com a utilização de uma microrretífica com serra circular diamantada.



Figura 6: Processo de abertura do plastrão de filhote de *Podocnemis expansa* utilizando a micro-retífica

### 3.4 - Histopatologia hepática e renal

Os rins e o fígado (figura 7) foram dissecados com o auxílio de bisturi e pinça. Fragmentos do fígado e rins foram colocados em cassetes histológicos e imediatamente fixados em formalina 10% por uma semana, e após isso, transferidas para recipientes com álcool 70%, até o processo de desidratação e diafanização. As amostras foram desidratadas, utilizando-se álcool etílico em concentrações crescentes (80%, 90% e 100%), diafanizadas em xilol, infiltradas no histotécnico (Leica TP1020) e emblocadas em Paraplast Plus na estação de inclusão (Leica EG 1150H). Foram obtidos cortes histológicos com espessura de 5µm (micrótomo LEICA RM 2255). As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina, e montadas com Entellan. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico (LEICA DM 2700 P ) no Laboratório de Microscopia e Nanotecnologia do INPA.

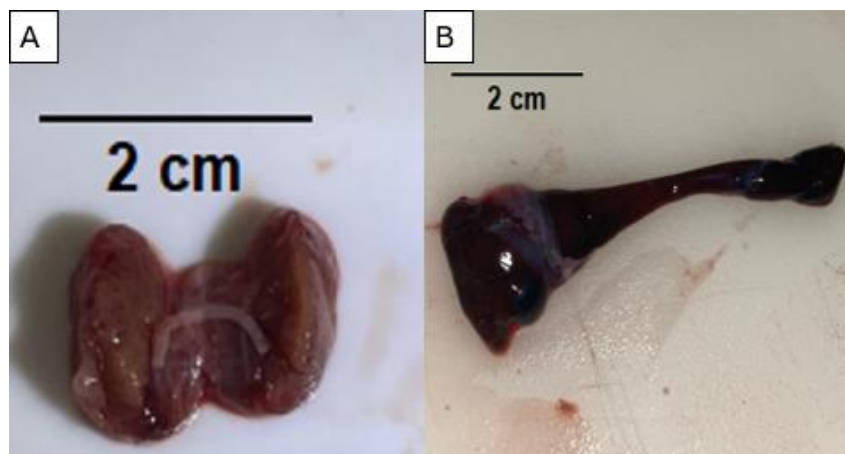


Figura 7: (A) Rins e (B)fígado de filhote de *Podocnemis expansa*.

Os Índices de Lesão do Órgão (ILO) foram determinados a partir da fórmula: Índice de Lesão =  $\sum (S \times IF)$ , onde S é pontuação atribuída de acordo com a extensão de cada lesão observada (Bernet et al., 1999) considerando o grau de extensão da lesão (Tabela 1) e o fator de importância (tabela 2):

Tabela 1: Grau de extensão da lesão no órgão

| Grau de extensão da lesão (S) (Da Silva, 2021) |                                         |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 0                                              | ausente: 0 a 10% do tecido              |
| 2                                              | ocorrência leve: 11 a 30% do tecido     |
| 4                                              | ocorrência moderada: 31 a 70% do tecido |
| 6                                              | ocorrência extensa: 71 a 100% do tecido |

Tabela 2: Fator de importância da lesão no órgão

| Fator de Importância (IF) (Bernet et al., 1999) |                                                                                                                                |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                                               | Mínima importância patológica sendo elas lesões facilmente reversíveis se a exposição ao contaminante for cessada              |
| 2                                               | Importância patológica moderada que são lesões reversíveis em sua maioria                                                      |
| 3                                               | Importância patológica acentuada que são lesões geralmente irreversíveis, com perda parcial ou total do funcionamento do órgão |

### 3.5 - Avaliação de micronúcleos e anormalidades nucleares dos eritrócitos

Para a análise de anormalidades nucleares e micronúcleos, foi realizada a coleta de sangue dos animais por meio da região cervical com agulha e seringa estéril (Figura

8). Os esfregaços de sangue foram preparados em lâminas previamente limpas, fixados em etanol 100% e corados com solução de panóptico. A análise das lâminas foi feita em microscópio óptico, no Laboratório de Microscopia e Nanotecnologia do INPA, com aumento de 1000x. Foram observados 2000 eritrócitos de cada indivíduo (Carrasco et al., 1990) e os resultados foram expressos em %.



Figura 8: Coleta de sangue dos indivíduos de *Podocnemis expansa*

### 3.6 - Atividade da Acetilcolinesterase

A homogeneização e preparo de amostras foi realizado no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática na Amazônia e a leitura da atividade da acetilcolinesterase foi realizada no Laboratório de Aquicultura da Amazônia – INPA. Após a eutanásia e abertura do plastrão, o tecido muscular foi coletado da região peitoral. Para a realização da análise da atividade da acetilcolinesterase (AChE), foi utilizado o método de (Ellman et al., 1961). Foram utilizados 0,3g de cada amostra para homogeneização em 0,5ml de tampão fosfato de potássio a 0,1 M, pH 7,5. Após isso, foi completado com 1,5ml de tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,5, centrifugadas a 12000g a 4°C durante 20 minutos, após isso foi coletado o sobrenadante e armazenado em -80°C. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em 412 nm. As soluções e a análise em espectrofotômetro foram realizadas a 28°C, temperatura média da água em que os indivíduos foram mantidos durante o experimento. A atividade da acetilcolinesterase foi calculada através da equação abaixo. O resultado foi expresso em nmol/mg de proteína.

$$\frac{Abs \times diluição}{caminho\ optico \times \varepsilon \times proteina}$$

Abs = Absorbância da amostra – branco

$\varepsilon$  = coeficiente de extinção ( $13,6 \times 10^3 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ )

Caminho óptico da microplaca = 0,6

### 3.7 - Análise Estatística

Os resultados foram analisados por meio do teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguindo a recomendação do uso de teste não-paramétrico em estudos que tenham n amostral menor que 8 (Weissgerber et al., 2015). Foi utilizado o programa R Studio para comparar os resultados das análises do Índice de Lesão do Órgão do fígado e rins, porcentagem das Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANEs), e inibição da atividade da acetilcolinesterase do grupo controle com os grupos de exposição e recuperação. Foi considerando 5% de significância, sendo utilizado o pós teste de Dunn quando necessário.

## 4 - Resultados

### 4.1 – Dados físico-químicos da água do experimento

A temperatura da água durante o experimento esteve na faixa de 28°C, com o pH estabilizado dentro da faixa de 6,3 e a amônia tóxica esteve entre 1 e 1,4 (tabela 3).

Tabela 3: Média do parâmetros físico-químicos coletados durante o experimento

| Grupo      | Temp. °C | pH   | Amônia tóxica |
|------------|----------|------|---------------|
| Controle   | 28,2     | 6,3  | 1,33          |
| E1         | 28,2     | 6,3  | 1,33          |
| E2         | 28,2     | 6,3  | 1,33          |
| Controle R | 28,16    | 6,38 | 1             |
| R1         | 28,16    | 6,36 | 1,4           |
| R2         | 28,16    | 6,36 | 1             |

### 4.2- Biometria dos filhotes de *Podocnemis expansa*

O tamanho das tartarugas utilizadas no experimento foi similar entre os grupos (tabela 4).

Tabela 4: Média da biometria dos filhotes de *Podocnemis expansa* antes e após a exposição ao glifosato em concentrações permitidas pela lei. (CMC: Comprimento médio da carapaça; LMC: Largura média da

carapaça; CMP: Comprimento médio do plastrão), (Controle R: controle recuperação; E32: exposto a 32µg/L de glifosato; E65: exposto a 65µg/L de glifosato; R32 e R65: recuperação dos animais expostos à 32 e 65 µg/L de glifosato).

| Antes da Exposição |                |              |             |              |                      |
|--------------------|----------------|--------------|-------------|--------------|----------------------|
| Grupo              | PESO (g)       | CMC (cm)     | LMC (cm)    | CMP (cm)     | ALTURA CARAPAÇA (cm) |
| Controle           | 142,79 ± 19,04 | 10,22 ± 0,49 | 8,28 ± 0,46 | 8,6 ± 0,44   | 4,08 ± 0,21          |
| E1                 | 145,18 ± 18,61 | 10,24 ± 0,50 | 8,4 ± 0,50  | 8,72 ± 0,42  | 4,18 ± 0,15          |
| E2                 | 149,39 ± 66,31 | 10,46 ± 1,62 | 8,62 ± 1,12 | 28,24 ± 1,31 | 4,04 ± 0,53          |
| Controle R         | 126,26 ± 26,07 | 9,64 ± 0,55  | 8,02 ± 0,39 | 8,06 ± 0,57  | 4,02 ± 0,38          |
| R1                 | 139,26 ± 68,15 | 9,88 ± 1,67  | 8,28 ± 1,21 | 8,32 ± 1,38  | 3,94 ± 0,58          |
| R2                 | 137,15 ± 31,90 | 10,1 ± 0,87  | 8,38 ± 0,70 | 8,44 ± 0,76  | 4,04 ± 0,35          |
| Após a Exposição   |                |              |             |              |                      |
| Grupo              | PESO (g)       | CMC (cm)     | LMC (cm)    | CMP (cm)     | ALTURA CARAPAÇA (cm) |
| Controle           | 141,77 ± 41,30 | 10,2 ± 1,14  | 8,16 ± 0,70 | 8,6 ± 1,02   | 3,72 ± 0,62          |
| E1                 | 146,25 ± 17,95 | 10,32 ± 0,51 | 8,48 ± 0,43 | 8,8 ± 0,41   | 4,2 ± 0,19           |
| E2                 | 148,52 ± 65,58 | 10,4 ± 1,54  | 8,6 ± 1,10  | 8,66 ± 1,31  | 4,12 ± 0,62          |
| Controle R         | 126,79 ± 26,73 | 9,8 ± 0,78   | 8,1 ± 0,67  | 8,16 ± 0,69  | 3,98 ± 0,28          |
| R1                 | 137,87 ± 63,14 | 9,9 ± 1,66   | 8,14 ± 1,21 | 8,22 ± 1,20  | 3,96 ± 0,49          |
| R2                 | 139,39 ± 30,30 | 10,04 ± 0,90 | 8,28 ± 0,58 | 8,48 ± 0,70  | 4 ± 0,24             |

#### 4.3 – Histopatologia do Tecido hepático

Os animais do grupo controle, apresentaram estrutura histológica característica, sendo possível observar uma organização regular dos hepatócitos com o citoplasma das células preservado e com o núcleo com dimensões normais presente no meio das células (Figura 8). A alteração mais severa observada nos indivíduos foi a necrose do tecido hepático, estando presente majoritariamente nos indivíduos expostos às concentrações de 32µg/L e 65µg/L, seguido de infiltração leucocitária, vacuolização dos hepatócitos e vacuolização do núcleo. Devido a problemas técnicos, não foi possível realizar a análise das amostras dos grupos de recuperação.

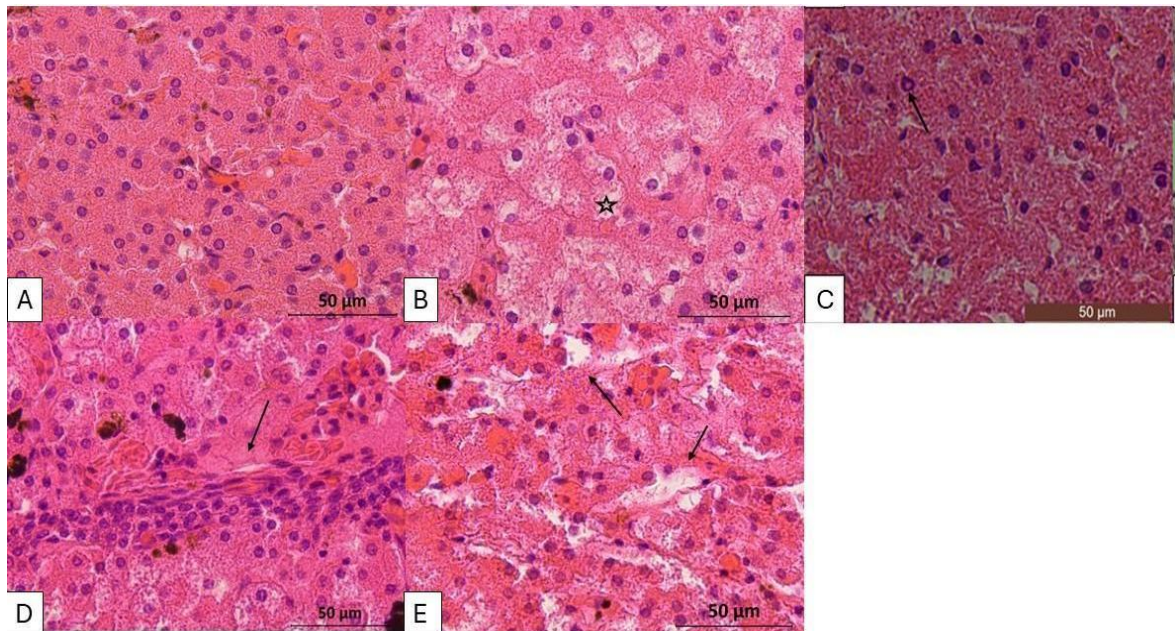


Figura 9: Histopatologia de fígado de filhotes de *Podocnemis expansa*. A: tecido hepático normal. B: Tecido hepático com hepatócitos vacuolizados (estrela). C: núcleo vacuolizado (seta). D: infiltração leucocitária (seta). E: pontos de necrose (seta).

O Índice de Lesão do Órgão (ILO) no fígado de filhotes de *Podocnemis expansa* foi significativamente mais elevado nos grupos expostos à 32µg/L e 65µg/L, sendo 3 vezes maior em relação ao grupo controle ( $p= 0,04$ , Figura 9). O grupo controle não apresentou alteração na morfologia do tecido hepático, enquanto os animais expostos às concentrações de 32µg/L e 65µg/L apresentaram alterações leves na morfologia do tecido hepático.

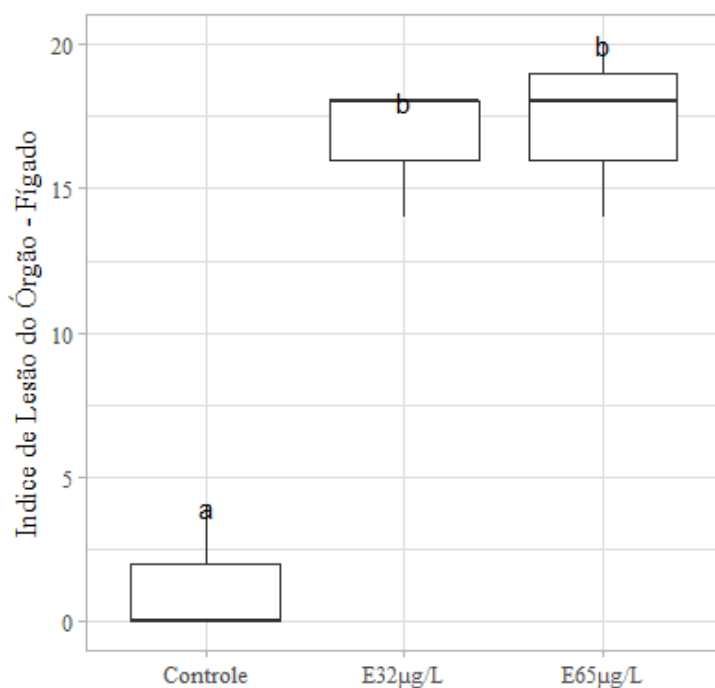


Figura 10: Índice de Lesão do Fígado em filhotes de *Podocnemis expansa* expostos ao glifosato (n=3, p=0,05). C: controle; E32: exposto a 32µg/L de glifosato; E65: exposto a 65µg/L de glifosato.

#### 4.4 – Histopatologia do tecido renal

Nos animais do grupo controle foi possível observar tecido renal com a presença os túbulos distais e proximais com as paredes consistentes, com o citoplasma das células intactos mantendo uma estrutura íntegra e as cápsulas de Bowman vascularizadas envolvendo os glomérulos (Figura 10). A alteração mais prejudicial para os indivíduos foi a necrose da parede dos túbulos distais e proximais, seguido de infiltração leucocitária, hipertrofia dos glomérulos e núcleo vacuolizado nas células dos túbulos. Não foi possível realizar a análise dos grupos da recuperação, sendo analisado somente dos grupos de exposição.

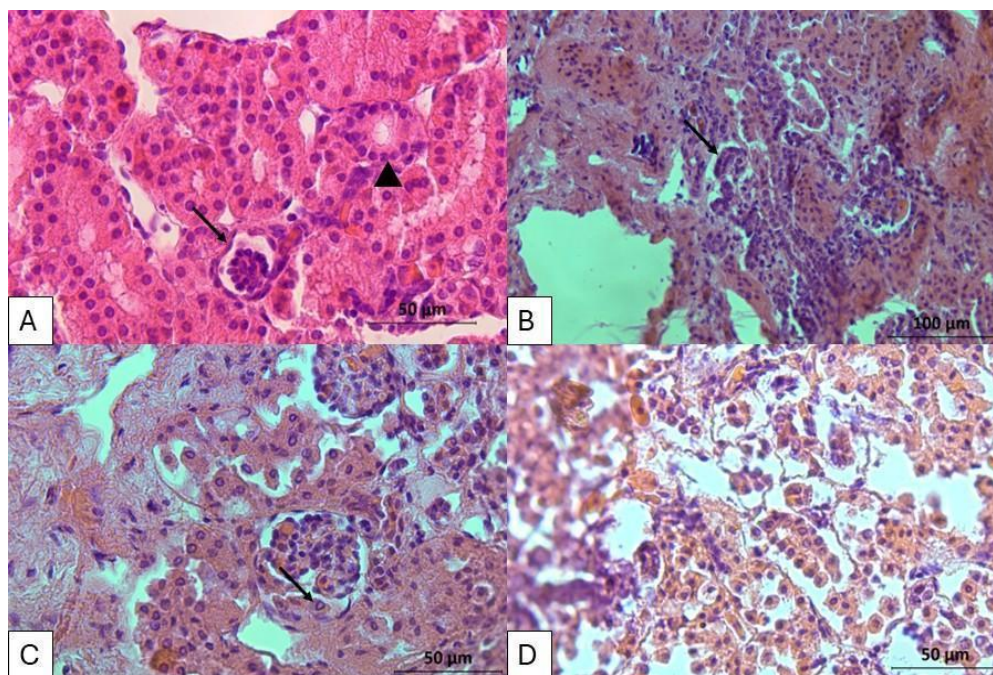


Figura 11: Histopatologia de rim de filhotes de *Podocnemis expansa*. A: Tecido saudável, mostrando o glomérulo (seta) e cápsula de Bowman, túbulo renal (cabeça de seta). B: Tecido renal com infiltração leucocitária (seta) C: Núcleos vacuolizados (seta). D: Necrose

O Índice de Lesão do Órgão (ILO) nos rins de filhotes de *Podocnemis expansa* foi similar entre o grupo controle e os contaminados com glifosato ( $p = 0,10$ , Figura 11).

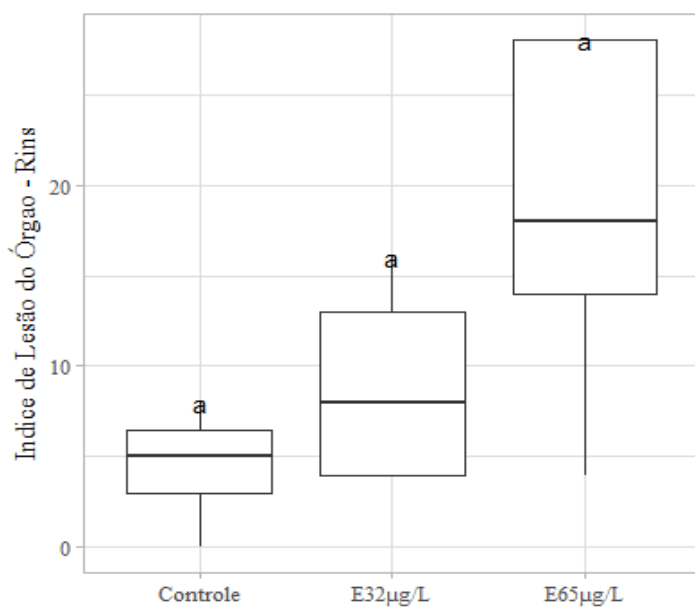


Figura 12: Índice de Lesão dos rins de filhotes de *Podocnemis expansa* ( $n=4$ ,  $p = 0,10$ ). C: controle; E32: exposto a 32µg/L de glifosato; E65: exposto a 65µg/L de glifosato.

#### 4.5 – Micronúcleo e Anomalias Nucleares Eritrocitárias

Foi identificada uma maior presença de núcleos lobados, núcleos deslocados e núcleos pontudos nos eritrócitos de filhotes de *Podocnemis expansa*, seguido por uma menor frequência de núcleos reniformes, núcleo com constrição assimétrica e micronúcleo (figura 13, tabela 5). Foi identificado somente 1 micronúcleo, 1 núcleo com constrição assimétrica e 2 núcleos reniformes.

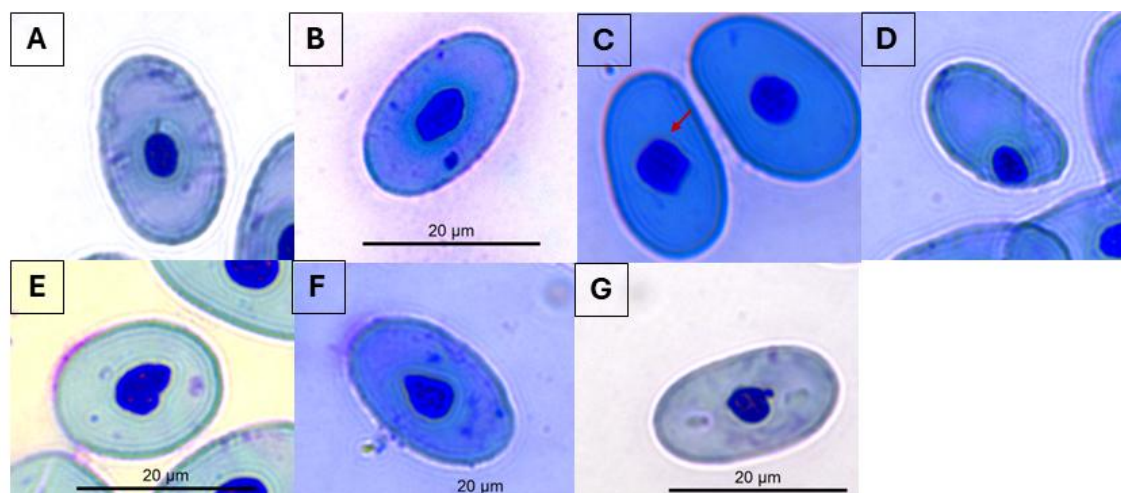


Figura 13: Alterações nucleares eritrocíticas em filhotes de *Podocnemis expansa* expostos ao glifosato. A: Núcleo normal; B: micronúcleo; C: Núcleo lobado; D: Núcleo deslocado; E: Núcleo reniforme; F: Núcleo bicudo; G: Constrição assimétrica

Tabela 5: Principais alterações nucleares (%) observadas nos eritrócitos de *P. expansa* expostos ao glifosato. C: controle; CR: controle recuperação; E32: exposto a 32µg/L de glifosato; E65: exposto a 65µg/L de glifosato; R32 e R65: recuperação dos animais expostos à 32 e 65 µg/L de glifosato (M = média, Md = mediana, máx = máxima)

|     | Lobado |                |      |      | Deslocado |                |      |      | Pontudo |                |      |     |
|-----|--------|----------------|------|------|-----------|----------------|------|------|---------|----------------|------|-----|
|     | M      | M <sub>d</sub> | máx  | mín  | M         | M <sub>d</sub> | máx  | mín  | M       | M <sub>d</sub> | máx  | mín |
| C   | 0,39   | 0,35           | 0,70 | 0,20 | 0,16      | 0,25           | 0,30 | 0    | 0,01    | 0              | 0,05 | 0   |
| E32 | 0,17   | 0,05           | 0,65 | 0    | 0,17      | 0,15           | 0,30 | 0    | 0,03    | 0              | 0,10 | 0   |
| E65 | 0,40   | 0,20           | 0,12 | 0    | 0,33      | 0,50           | 0,50 | 0    | 0       | 0              | 0    | 0   |
| CR  | 0,18   | 0,20           | 0,35 | 0,05 | 0,21      | 0,20           | 0,40 | 0,10 | 0       | 0              | 0    | 0   |
| R32 | 0,12   | 0,10           | 0,25 | 0,05 | 0,16      | 0              | 0,55 | 0    | 0       | 0              | 0    | 0   |
| R65 | 0,37   | 0,40           | 0,60 | 0,15 | 0,39      | 0,45           | 0,55 | 0,15 | 0       | 0              | 0    | 0   |

As frequências de ANEs nos grupos expostos ao glifosato foram similares ao grupo controle, tanto no período de exposição, quanto de recuperação ( $p=0,1068$ ) (Figura 13).

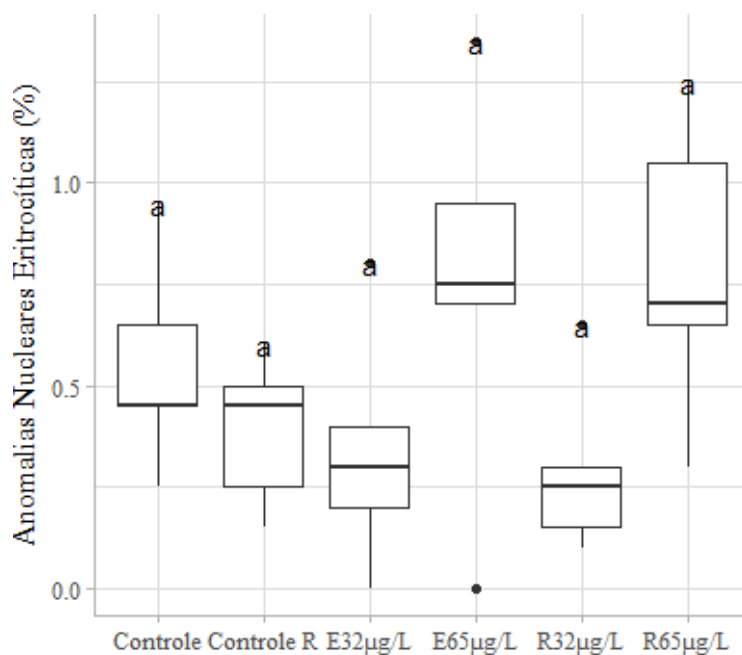


Figura 14: Frequência de alterações nucleares eritrocíticas (%) observadas em filhotes de *P. expansa* após exposição ao glifosato e recuperação ( $n=5$ ). C: controle; CR: controle recuperação; E32: exposto a 32µg/L de glifosato; E65: exposto a 65µg/L de glifosato; R32 e 65: recuperação dos animais expostos à 32 e 65µg/L de glifosato.

#### 4.6 – Atividade da Acetilcolinesterase

A atividade da acetilcolinesterase no músculo dos indivíduos de *P. expansa* se manteve similar entre o grupo controle e os grupos expostos ao glifosato, tanto durante a exposição quanto a recuperação (Figura 15).

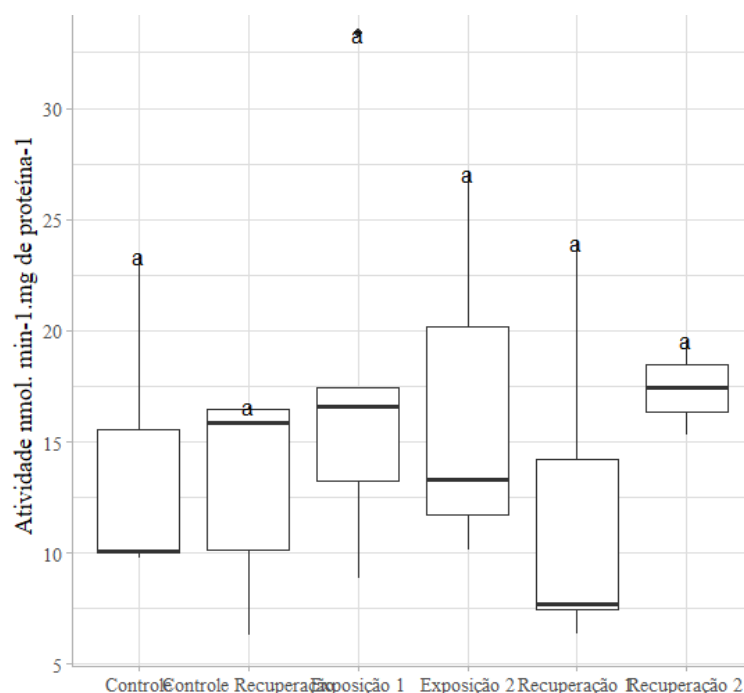


Figura 15: Atividade da acetilcolinesterase no músculo de filhotes de *Podocnemis expansa*. R: Recuperação, E: Exposição ( $p=0,64$ ). C: controle; CR: controle recuperação; E32: exposto a  $32\mu\text{g/L}$  de glifosato; E65: exposto a  $65\mu\text{g/L}$  de glifosato; R32 e R65: recuperação dos animais expostos à 32 e  $65\mu\text{g/L}$  de glifosato

## 5- Discussão

### 5.1 – Trabalhos com exposição ao glifosato em organismos

A maioria dos estudos que avaliaram os efeitos histopatológicos, mutagênicos e neurotóxicos após a exposição ao glifosato foi realizada em peixes como a principal espécie modelo e utilizou a formulação comercial Roundup®, chegando a utilizar concentrações até 14.000 vezes maior do que a considerada máxima pela CONAMA (Tabela 6).

Tabela 6: Levantamento dos trabalhos com experimento com exposição ao glifosato

| Formulação    | Organismo | Espécie                                                                                      | Concentração                                                             | Tempo de exposição | Referência                  |
|---------------|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------|-----------------------------|
| Glifosato 99% | Anfíbio   | <i>Leptodactylus latinasus</i>                                                               | $100\mu\text{g/L}$ , $1000\mu\text{g/L}$ e $10000\mu\text{g/L}$          | 48 horas           | Pérez-Iglesias et al., 2016 |
| Roundup®      | Mamífero  | <i>Mus musculus</i>                                                                          | 25000, 50000, 120000 e $250000\mu\text{g/ml}$                            | 8, 24 e 48 horas   | Wunnepuk et al., 2014       |
| Roundup®      |           | <i>Danio rerio</i> ,<br><i>Hyphessobrycon eques</i> ,<br><i>Phalloceros caudimaculatus</i> e | $900.000\mu\text{g/L}$ ; $925.000\mu\text{g/L}$ e $950.000\mu\text{g/L}$ | 96 horas           | Cruz et al., 2016           |

|                                        |        |                                  |                                      |                        |                             |
|----------------------------------------|--------|----------------------------------|--------------------------------------|------------------------|-----------------------------|
|                                        | Peixe  | <i>Piaractus mesopotamicus</i>   |                                      |                        |                             |
| Roundup®                               |        | <i>Gymnotus inaequilabiatus</i>  | 65 µg/L, 1000 µg/L, 5000 µg/L        | 48, 98, 144, 192 horas | Silva et al., 2021          |
| (N-phosphono-methyl glycine, 360 mg/L) |        | <i>Oncorhynchus mykiss</i>       | 2500 µg/L; 5000 µg/L e 10000 µg/L    | 21 dias                | Topal et al., 2015          |
| Roundup®                               |        | <i>Oreochromis niloticus</i>     | 2000, 9000, 30000, 79000, 310000µg/l | 96 horas               | Ayoola, 2008                |
| Roundup®                               |        | <i>Piaractus mesopotamicus</i>   | 3000 µg/L e 4500 µg/L                |                        | Shiogiri et al., 2012       |
| Roundup®                               |        | <i>Prochilodus lineatus</i>      | 10000µg/L                            | 96 horas               | Langiano e Martinez, 2010   |
| Roundup®                               | Réptil | <i>Caiman latirostris</i>        | 11000 µg/L e 22000 µg/L              | 2 meses                | López González et al., 2013 |
| Atar 48®                               |        | <i>Podocnemis expansa</i>        | 65 µg/L e 6500 µg/L                  | 59 dias                | De Oliveira et al., 2020    |
| Roundup®                               |        | <i>Podocnemis expansa</i>        | 1300 µg/L                            | 40 a 74 dias           | Silva, 2022                 |
| Roundup®                               |        | <i>Podocnemis unifilis</i>       | 65 µg/L e 6500 µg/L                  | 74 dias                | Araujo, 2019                |
| Roundup®                               |        | <i>Trachemis scripta elegans</i> | 30000µg/L                            | 96 horas               | Héritier et al., 2017       |

## 5.2 – Histopatologia do Fígado

O fígado desempenha diversas funções importantes, como regulação metabólica, processos de excreção, desintoxicação do organismo e resposta imunológica (Hinton et al., 2008). Por isso, quando o animal é exposto a algum xenobiótico que possa causar algum dano ao organismo, o fígado é um dos principais órgãos que podem ser afetados, pois atua no processo de metabolização desse contaminante, a fim de evitar que ele cause danos em demais órgãos. Filhotes de *P. expansa* expostos a concentrações de glifosato permitidas pela legislação brasileira (32µg/L e 65µg/L) tiveram alterações significativas em sua estrutura hepática, como a infiltração leucocitária que é a penetração dos leucócitos nos tecidos através dos vasos sanguíneos ocasionando em processo inflamatório no tecido, vacuolização dos hepatócitos, ocasionado pelo aumento da célula pelo surgimento de vacúolos no citoplasma, núcleo vacuolizado que é uma alteração na estrutura nuclear, e necrose que um processo de morte celular acidental que leva à perda

da funcionalidade do tecido. No entanto, se a contaminação for encerrada, a maioria das alterações descritas acima, exceto a necrose do tecido, podem ser reversíveis (Bernet et al., 1999). A mediana do índice de lesão dos grupos expostos a 32µg/L e 65µg/L estavam próximos a 20, valores até 10 indicam estrutura normal do tecido, enquanto valores entre 11 e 20 representam alterações leves no tecido (Zimmerli et al. 2007), mostrando que os grupos expostos apresentaram modificações leves na morfologia do tecido hepático nas concentrações testadas. Indivíduos em ovos de *P. expansa* foram expostos a concentração de 1300 µg/L da formulação comercial de glifosato Roundup, ocasionando em alterações como a necrose, núcleo vacuolizado e infiltração no tecido hepático (Silva, 2022)

Alterações no fígado também foram descritas para outros animais expostos ao glifosato. 3 espécies de peixes tropicais, *Piaractus mesopotamicus*, *Hyphessobrycon eques*, *Danio rerio* e *Phalloceros caudimaculatus*, foram expostos a concentrações de 900.000µg/L; 925.000 µg/L e 950.000 µg/L de glifosato durante 96 horas, e foi observado alterações como hipertrofia dos hepatócitos, desarranjo na estrutura dos hepatócitos e necrose do tecido (Cruz et al., 2016). Juvenis de trutas arco-íris foram expostos às concentrações de 2500 µg/L; 5000 µg/L e 10000 µg/L durante 21 dias, foi observado alterações no tecido hepático, como infiltração, vacuolização dos hepatócitos, núcleo picnótico e necrose (Topal et al., 2015). Peixes da espécie *Piaractus mesopotamicus* expostos a concentrações 3000 µg/L a 4500 µg/L de glifosato apresentaram alterações significativas no tecido hepático (Shiogiri et al., 2012). As principais alterações encontradas foram a vacuolização dos hepatócitos, núcleos picnótico, núcleos vacuolizados e necrose. Além de terem utilizado concentrações bem mais elevadas é importante considerar que a formulação comercial do glifosato, utilizada na maioria dos estudos, tende a exercer maior toxicidade que o princípio ativo, pois as formulações comerciais possuem surfactantes que facilitam a entrada do glifosato nas células (Mesnage et al., 2019). O tempo de exposição variou entre 96 horas até 74 dias nos trabalhos citados, enquanto neste presente trabalho o tempo de exposição ao glifosato foi de 14 dias. Os resultados apresentados evidenciam de forma inédita que a exposição ao glifosato, mesmo em baixas concentrações permitidas pela legislação brasileira, foi suficiente para induzir alterações hepáticas em filhotes de *P. expansa*.

### 5.3 - Histopatologia dos rins

Os rins têm como função no organismo o processo de homeostase e filtração do sangue de compostos que possam ser prejudiciais para o organismo. Neste trabalho, foram encontradas alterações histopatológicas, como infiltração leucocitária que é a penetração dos leucócitos nos tecidos através dos vasos sanguíneos ocasionado um processo inflamatório no tecido, núcleo vacuolado que é uma alteração na estrutura nuclear, e necrose que é a morte celular desordenada e perda da funcionalidade do tecido. A mediana do grupo controle e do grupo exposto a 32µg/L tiveram valor menor que 10, enquanto os animais expostos à concentração de 65µg/L apresentaram mediana entre 11 e 20. Valores até 10 indicam estrutura normal do tecido, enquanto valores entre 11 e 20 representam alterações leves no tecido (Zimmerli et al. 2007). A maioria das alterações encontradas apresenta reversibilidade caso a exposição ao contaminante seja encerrada. A alteração que demonstra mais risco para o animal é a necrose tecidual, que é irreversível e dependendo da extensão, inviabiliza o funcionamento do órgão podendo levar o animal ao óbito.

Ratos expostos a altas concentrações de glifosato via gastrointestinal apresentaram grande incidência de necrose no tecido renal dos indivíduos (Wunnepuk et al., 2014). Peixes tropicais das espécies *Piaractus mesopotamicus*, *Hyphessobrycon eques*, *Danio rerio* e *Phallocceros caudimaculatus* foram expostos a concentrações de 900.000µg/L; 925.000 µg/L e 950.000 µg/L de glifosato durante 96 horas e apresentaram alterações no tecido renal como o desarranjo dos túbulos proximais e distais e diminuição do espaço da cápsula de Bowman (Cruz et al., 2016). Indivíduos de *Oreochromis niloticus* expostos às concentrações de 2000 µg/L a 310000 µg/L apresentaram alterações significativas como infiltração leucocitária e necrose no tecido renal (Ayoola, 2008). Ovos de *P. expansa* que foram expostos a 1300 µg/L de Roundup durante o desenvolvimento embrionário apresentaram o aumento da presença de infiltração leucocitária, congestão corpuscular e congestão dos vasos no tecido renal em comparação ao grupo controle (Silva, 2022). O único estudo que utilizou uma baixa concentração de glifosato de 65µg/L expôs ovos de *P. unifilis* durante a fase de desenvolvimento embrionário, e observou a presença de alteração na área glomerular dos indivíduos. A maioria dos estudos reportados acima utilizaram concentrações bem mais elevadas que nesta dissertação. Também é importante ressaltar no presente trabalho foram observadas alterações similares no tecido renal, mas devido a dispersão dos dados não foi possível observar diferença significativa entre o grupo exposto a 65µg/L e o controle.

#### 5.4 - Micronúcleos e Anomalias Nucleares Eritrocitárias

Em ambientes livres de contaminantes, é comum que as alterações nucleares eritrocitárias ocorram naturalmente nos indivíduos em níveis basais, mas o aumento da sua frequência é indicativo de dano no material genético ocasionado pela exposição a agentes mutagênicos (Al-Sabti & Metcalfe, 1995). Essas alterações no núcleo dos eritrócitos causam a inibição da replicação do DNA, desencadeando o processo de apoptose (Gomes et al., 2015).

Répteis e peixes apresentam alteração na frequência de micronúcleos e anormalidades eritrocíticas nucleares quando expostos ao glifosato. Ovos de *P. expansa* expostos a concentração de 65µg/L de glifosato Glyphosate Atar 48® apresentaram uma maior frequência de micronúcleos, núcleo lobado, constrição simétrica e assimétrica, eritrócito binucleado, núcleo reniforme, núcleo multilobado e núcleo deslocado no grupo exposto em comparação ao grupo controle (Malafaia et al., 2020). Em comparação ao presente estudo, a diferença na frequência das ANEs e micronúcleos pode estar relacionada ao estágio no qual os animais do trabalho citado foram expostos que foi durante o processo de desenvolvimento embrionário, no qual os indivíduos são mais sensíveis do que os filhotes que foram utilizados no presente estudo.

No trabalho de Silva et al., (2021) foi observado um aumento na frequência de Alterações Nucleares Eritrocíticas (ANEs) no peixe *Gymnotus inaequilabiatus* expostos à 65µg/L da formulação comercial de glifosato Roundup® após 192 horas de exposição, sendo elas micronúcleo, núcleo reniforme e núcleo segmentado. Neste estudo utilizou-se a mesma concentração de glifosato, 65µg/L, e o meio de exposição também foi pela água, mas a forma de absorção do contaminante pelo animal foi diferente, levando-se em consideração que no trabalho citado, a absorção ocorreu por via branquial, sendo muito mais efetiva e prejudicial do que pela absorção por via cutânea (Erickson et al., 2008).

López González et al. (2013), expôs filhotes de jacaré do papo amarelo *Caiman latirostris* de 20 dias de idade às concentrações de 11000 µg/L e 22000 µg/L da formulação comercial do glifosato Roundup durante 2 meses com reaplicação a cada 3 dias. Os autores observaram diferença significativa na frequência de micronúcleos entre o grupo controle e os grupos tratados. Esse estudo utilizou concentrações recomendadas para aplicação em lavouras que foram muito mais elevadas que as concentrações avaliadas nesta dissertação. Além disso os autores utilizaram um período de exposição

maior e reaplicações mais frequentes, aumentando a contaminação dos indivíduos. Isso mostra que para répteis já eclodidos as concentrações e o tempo de exposição são fatores decisivos para que haja efeito tóxico nesses animais.

As concentrações avaliadas neste estudo não foram suficientes para induzir ANEs nos filhotes de *P. expansa* no tempo de 14 dias de exposição ao glifosato. É importante considerar que a via de exposição ocorreu pela água, desta forma o contaminante poderia ser absorvido pela pele e pela ingestão de água. Como esses animais possuem uma pele estratificada e queratinizada para evitar a perda de água e não dependem dela para a realização da troca gasosa, os torna menos suscetíveis a se contaminar com o glifosato por meio da água que está em contato com a pele. Nossos resultados indicam que a ingestão de água contaminada não foi suficiente para induzir ANEs nos filhotes de *P. expansa* nas concentrações e no tempo de exposição que foi avaliado nesta dissertação.

#### 5.5 - Atividade da Acetilcolinesterase no músculo de *Podocnemis expansa*

A acetilcolinesterase é uma enzima que está ligada diretamente à atividade neurológica da maioria dos seres vivos como regulador da atividade sináptica, inativando a acetilcolina, hidrolisando em acetato e colina, cessando a atividade sináptica (Augustinsson, 1948).

Héritier et al. (2017) observaram inibição na atividade da acetilcolinesterase em tartarugas de água doce da espécie *Trachemis scripta elegans* expostas à concentração de 36000 µg/L da formulação comercial Roundup® por 96 horas. Em comparação ao meu trabalho, o período de contaminação foi mais longo e as concentrações utilizadas foram menores, possivelmente fazendo com que a atividade antioxidante atuasse sobre as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), os neutralizando e evitando com que houvesse alteração na atividade enzimática do animal.

Modesto & Martinez (2010) avaliou a atividade da acetilcolinesterase em peixes da espécie *Prochilodus lineatus* após exposição a formulação comercial do glifosato Roundup®, na concentração de 10000 µg/L por 96 horas, sendo observado um decaimento na atividade da enzima durante esse período. Ambos os estudos utilizaram formulações comerciais que possuem surfactante em sua composição, uma substância que pode agravar a toxicidade do herbicida para organismos aquáticos (Mesnage et al., 2019). A inibição da enzima está associada às concentrações das formulações comerciais

utilizadas foram muito mais elevadas que as concentrações de glifosato utilizadas no presente estudo. Nossos resultados mostram que a absorção por meio da pele e ingestão de água não foi suficiente para afetar a atividade da acetilcolinesterase em filhotes de *P. expansa*.

## 6- Conclusões

O glifosato foi capaz de causar alterações significativas no fígado dos filhotes de *Podocnemis expansa*, demonstrando que tanto a concentração preconizada pela CONAMA bem como a concentração inferior foi associada à indução de lesões hepáticas nesses indivíduos.

As concentrações de glifosato testadas não foram capazes de causar alterações significativas na morfologia renal, genotoxicidade e atividade da acetilcolinesterase.

O uso de diferentes biomarcadores e órgãos alvo é fundamental para a investigação do efeito de concentrações de glifosato permitidas pela legislação brasileira.

## 7- Considerações Finais

Problemas de processamento impossibilitaram as análises das amostras dos grupos de recuperação, por isso não foi possível verificar se estes animais possuem a capacidade de se recuperarem dos danos hepáticos. Portanto, recomendamos a realização de estudos futuros para verificar a capacidade de recuperação desta espécie à contaminação por glifosato. Na histopatologia dos rins, foram encontradas alterações, mas não apresentaram diferença entre o grupo controle devido à alta dispersão dos dados e a problemas de processamento que dificultaram as análises. Para entender melhor como esse órgão reage à contaminação do glifosato é necessário aumentar o número amostral em estudos futuros.

## 8 – Referências Bibliográficas

- Almeida, J. C. N. (2019). Análise Histopatológica renal de neonatos de *Podocnemis unifilis* (testudines, podocnemididae) expostos ao fipronil e ao glifosato durante a incubação dos ovos.
- Al-Sabti, K., & Metcalfe, C. D. (1995). Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 343(2–3), 121–135. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(95\)90078-0](https://doi.org/10.1016/0165-1218(95)90078-0)
- Araújo, C. R. M., Santos, V. L. A., & Gonsalves, A. A. (2016). Acetylcholinesterase - AChE: A pharmacological interesting enzyme. *Revista Virtual de Química*, 8(6), 1818–1834. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160122>
- Augustinsson, K.B. (1948). "Cholinesterases: A Study in Comparative Enzymology" – *Acta Physiologica Scandinavica*, 15(Suppl. 52), 1-182.
- Ayoola, S. O. (2008, dezembro). Toxicity of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. *African Journal of Agricultural Research*, 3(12), 825–834. <http://www.academicjournals.org/AJAR>
- Babalola, O. O., Truter, J. C., & van Wyk, J. H. (2019). Mortality, teratogenicity and growth inhibition of three glyphosate formulations using Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus. *Journal of Applied Toxicology*, 39(9), 1257–1266. <https://doi.org/10.1002/jat.3811>
- Bento, C. P. M., Yang, X., Gort, G., Xue, S., van Dam, R., Zomer, P., Mol, H. G. J., Ritsema, C. J., & Geissen, V. (2016). Persistence of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in loess soil under different combinations of temperature, soil moisture and light/darkness. *Science of the Total Environment*, 572, 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.215>
- Bergström, L., Börjesson, E., & Stenström, J. (2011). Laboratory and Lysimeter Studies of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid in a Sand and a Clay Soil. *Journal of Environmental Quality*, 40(1), 98–108. <https://doi.org/10.2134/jeq2010.0179>
- Bernardes, M. F. F., Pazin, M., Pereira, L. C., & Dorta, D. J. (2015). Impact of Pesticides on Environmental and Human Health. Em *Toxicology Studies - Cells, Drugs and Environment*. InTech. <https://doi.org/10.5772/59710>
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., & Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, 22, 25–34.
- Brovini, E. M., Cardoso, S. J., Quadra, G. R., Vilas-Boas, J. A., Paranaíba, J. R., Pereira, R. de O., & Mendonça, R. F. (2021). Glyphosate concentrations in global freshwaters: are aquatic organisms at risk? *Environmental Science and Pollution Research*, 28(43), 60635–60648. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14609-8>

- Carneiro, I. V., Gonçalves Vieira, L., dos Santos Mendonça, J., Queiroz Luz Hirano, L., Chavauty Valdes, S. A., Tannús Menezes-Reis, L., & Quagliatto Santos, A. L. (2021). Development of scleral ossicles in *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae) embryos exposed to atrazine. *Drug and Chemical Toxicology*, 44(4), 353–358. <https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1598427>
- Carrasco, K. R., Tilbury, K. L., & Myers, M. S. (1990). Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47(11), 2123–2136. <https://doi.org/10.1139/f90-237>
- Cruz, C. da, Carraschi, S. P., Shirogiri, N. S., Silva, A. F., Pitelli, R. A., & Machado, M. R. F. (2016). Sensitivity, ecotoxicity and histopathological effects on neotropical fish exposed to glyphosate alone and associated to surfactant. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 8(3), 25–33. <https://doi.org/10.5897/JECE2015.0362>
- Daam, M. A., Moutinho, M. F., Espíndola, E. L. G., & Schiesari, L. (2019). Lethal toxicity of the herbicides acetochlor, ametryn, glyphosate and metribuzin to tropical frog larvae. *Ecotoxicology*, 28(6), 707–715. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02067-5>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95.
- Faber, D. (2020). Poisoning the World for Profit: Petro-Chemical Capital and the Global Pesticide Crisis. Em *Capitalism, Nature, Socialism* (Vol. 31, Número 4, p. 1–17). Routledge. <https://doi.org/10.1080/10455752.2020.1829794>
- Gaboardi, S. C., Candioto, L. Z. P., & Panis, C. (2023). Agribusiness in Brazil and its dependence on the use of pesticides. *Hygiene and Environmental Health Advances*, 8, 100080. <https://doi.org/10.1016/j.heha.2023.100080>
- Giesy, J. P., Dobson, S., & Solomon, K. R. (2000). Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup ® Herbicide. Em *Environmental Contaminant Toxicology* (p. 35–120).
- Gill, J. P. K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S., & Girdhar, M. (2018). Glyphosate toxicity for animals. *Environmental Chemistry Letters*, 16(2), 401–426. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0689-0>
- Gomes, J. M. M., Ribeiro, H. J., Procópio, M. S., Alvarenga, B. M., Castro, A. C. S., Dutra, W. O., da Silva, J. B. B., & Corrêa Junior, J. D. (2015). What the Erythrocytic Nuclear Alteration Frequencies Could Tell Us about Genotoxicity and Macrophage Iron Storage? *PLOS ONE*, 10(11), e0143029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143029>
- Héritier, L., Duval, D., Galinier, R., Meistertzheim, A. L., & Verneau, O. (2017). Oxidative stress induced by glyphosate-based herbicide on freshwater turtles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(12), 3343–3350. <https://doi.org/10.1002/etc.3916>
- Hinton, D. E., Segner, H., Au, D. W. T., Kullman, S. W., & Hardman, R. C. (2008). Liver Toxicity. Em R. T. Di Giulio & D. E. Hinton (Orgs.), *The Toxicology of Fishes* (p. 328–379). CRC Press.

- Hirano, L. Q. L., Alves, L. da S., Menezes-Reis, L. T., Mendonça, J. dos S., Simões, K., Santos, A. L. Q., & Vieira, L. G. (2019). Effects of egg exposure to atrazine and/or glyphosate on bone development in *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182, 109400. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109400>
- Langiano, V. do 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 Toxicology and Pharmacology*, 147(2), 222–231. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.09.009>
- Lindsay, E. A., & French, K. (2004). The impact of the herbicide glyphosate on leaf litter invertebrates within Bitou bush, *Chrysanthemoides monilifera* ssp *rotundata*, infestations. *Pest Management Science*, 60(12), 1205–1212. <https://doi.org/10.1002/ps.944>
- López González, E. C., Latorre, M. A., Larriera, A., Siroski, P. A., & Poletta, G. L. (2013). Induction of micronuclei in broad snouted caiman (*Caiman latirostris*) hatchlings exposed in vivo to Roundup® (glyphosate) concentrations used in agriculture. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105(2), 131–134. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.12.009>
- Lovich, J. E., Ennen, J. R., Agha, M., & Gibbons, J. W. (2018). Where Have All the Turtles Gone, and Why Does It Matter? *BioScience*, 68(10), 771–781. <https://doi.org/10.1093/biosci/biy095>
- Malafaia, G., Vieira, L. G., Carvalho, W. F., de Souza, M. B., de Lima Rodrigues, A. S., Simões, K., de Melo De Silva, D., dos Santos Mendonça, J., Hirano, L. Q. L., Santos, A. L. Q., & de Oliveira, J. S. P. (2020). Mutagenic, genotoxic and morphotoxic potential of different pesticides in the erythrocytes of *Podocnemis expansa* neonates. *Science of The Total Environment*, 737, 140304. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140304>
- McComb, B. C., Curtis, L., Chambers, C. L., Newton, M., & Bentson, K. (2008). Acute toxic hazard evaluations of glyphosate herbicide on terrestrial vertebrates of the oregon coast range. *Environmental Science and Pollution Research*, 15(3), 266–272. <https://doi.org/10.1065/espr2007.07.437>
- Mendonça, J. dos S., Vieira, L. G., Valdes, S. A. C., Vilca, F. Z., Tornisielo, V. L., & Santos, A. L. Q. (2016). Effects of the exposure to atrazine on bone development of *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae). *Ecotoxicology*, 25(3), 594–600. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1618-x>
- Mesnage, R., Benbrook, C., & Antoniou, M. N. (2019, junho 1). Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. *Food and Chemical Toxicology*, 128, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.053>
- Mingo, V., Lötters, S., & Wagner, N. (2016). Risk of pesticide exposure for reptile species in the European Union. *Environmental Pollution*, 215, 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.011>

- Modesto, K. A., & Martinez, C. B. R. (2010). Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 78(3), 294–299. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.047>
- Nwani, C. D., Nagpure, N. S., Kumar, R., Kushwaha, B., & Lakra, W. S. (2013). DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(2), 539–547. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.06.001>
- Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., López, S. L., & Carrasco, A. E. (2010). Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chemical Research in Toxicology*, 23(10), 1586–1595. <https://doi.org/10.1021/tx1001749>
- Pala, A. (2019). The effect of a glyphosate-based herbicide on acetylcholinesterase (AChE) activity, oxidative stress, and antioxidant status in freshwater amphipod: *Gammarus pulex* (Crustacean). *Environmental Science and Pollution Research*, 26(36), 36869–36877. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06804-5>
- Parry, L., Peres, C. A., Day, B., & Amaral, S. (2010). Rural–urban migration brings conservation threats and opportunities to Amazonian watersheds. *Conservation Letters*, 3(4), 251–259. <https://doi.org/10.1111/j.1755-263X.2010.00106.x>
- Pérez-Iglesias, J. M., Franco-Belussi, L., Moreno, L., Tripole, S., de Oliveira, C., & Natale, G. S. (2016). Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(10), 9852–9861. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6153-z>
- Pisa, L. W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Downs, C. A., Goulson, D., Kreutzweiser, D. P., Krupke, C., Liess, M., Mcfield, M., Morrissey, C. A., Noome, D. A., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J. D., Van Der Sluijs, J. P., Van Dyck, H., & Wiemers, M. (2014). Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 68–102. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3471-x>
- Poletta, G. L., Larriera, A., Kleinsorge, E., & Mudry, M. D. (2008). *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: Basal values determination of micronucleus and comet assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 650(2), 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.12.001>
- Pompeo Queiroz, G. M., Rivail Da Silva, M., Joaquim, R., Bianco, F., Pinheiro, A., & Kaufmann, V. (2011). Transporte de glifosato pelo escoamento superficial e por lixiviação em um solo agrícola. Em *Quim. Nova* (Vol. 34, Número 2).
- Queiroz, G. M. P., Da Silva, M. R., Joaquim, R., Bianco, F., Pinheiro, A., & Kaufmann, V. (2011). Transporte de glifosato pelo escoamento superficial e por lixiviação em um solo agrícola. *Quim. Nova*, 34(2), 190–195.

- Rico, A., de Oliveira, R., Silva de Souza Nunes, G., Rizzi, C., Villa, S., De Caroli Vizioli, B., Montagner, C. C., & Waichman, A. V. (2022). Ecological risk assessment of pesticides in urban streams of the Brazilian Amazon. *Chemosphere*, 291. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132821>
- Römbke, J., Waichman, A. V., & Garcia, M. V. (2008). Risk assessment of pesticides for soils of the central amazon, Brazil: Comparing outcomes with temperate and tropical data. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 4(1), 94–104. [https://doi.org/10.1897/IEAM\\_2007-052.1](https://doi.org/10.1897/IEAM_2007-052.1)
- Schiesari, L., Waichman, A., Brock, T., Adams, C., & Grillitsch, B. (2013). Pesticide use and biodiversity conservation in the Amazonian agricultural frontier. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1619), 20120378. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0378>
- Shiogiri, N. S., Paulino, M. G., Carraschi, S. P., Baraldi, F. G., da Cruz, C., & Fernandes, M. N. (2012, março 31). Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(2), 388–396. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.05.007>
- Silva, B. R. (2022). Efeitos da exposição ao Roundup® no desenvolvimento embrionário de *Podocnemis expansa* (TESTUDINES: PODOCNEMIDIDAE) [Dissertação]. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.
- Silva, L. L. da, Santana, G. P., Souza, W. B. De, & Júnior, E. S. F. P. (2016, maio 1). O glifosato no cultivo de mandioca (Uarini-Amazonas). *Scientia Amazonia*, v. 5, n. 1, 55–62. <http://www.scientia-amazonia.org>
- Silva, L. N. L., Muniz, C. C., Junior, E. O. S., & Ignácio, Á. R. A. (2021). Potential mutagenic effects of the glyphosate herbicide on *Gymnotus inaequilabiatus* (Valenciennes, 1839). *Revista Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 16(5), 1–12. <https://doi.org/10.4136/1980-993X>
- Singh, S., Kumar, V., & Singh, J. (2019). Kinetic study of the biodegradation of glyphosate by indigenous soil bacterial isolates in presence of humic acid, Fe(III) and Cu(II) ions. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(3). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103098>
- Solomon, K. R., & Thompson, D. G. (2003). Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. Em *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews* (Vol. 6, Número 3, p. 289–324). <https://doi.org/10.1080/10937400306468>
- Topal, A., Atamanalp, M., Uçar, A., Oruç, E., Kocaman, E. M., Sulukan, E., Akdemir, F., Beydemir, Ş., Kılınç, N., Erdoğan, O., & Ceyhun, S. B. (2015). Effects of glyphosate on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Transcriptional and enzymatic analyses of antioxidant defence system, histopathological liver damage and swimming performance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111, 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.027>

- Uchenna, U. B., Uka, A., & Obiahu, O. H. (2022). The impact of sub-lethal concentrations of glyphosate on growth and haematology of African catfish under aquatic ecological micro-climate. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 4, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.enceco.2022.06.001>
- Vogt, R., Bataus, Y. S. L., Rodrigues, J., Uhlig, V. M., Balestra, R. A. M., Barreto, L. N., Bressan, R. F., Brito, E. S., Carvalho, V. T., Falcon, G. B., Ferrara, C. F., Marques, T. S., Matias, F., Souza, F. L., Tinôco, M. S., & Valadão, R. M. . (2023). Ficha de *Podocnemis expansa*. Em *Datasets - Sistema SALVE - ICMBio*. Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade - SALVE. <https://doi.org/10.37002/salve.ficha.20838>
- Vogt, R. C. (2008). *Tartarugas da Amazônia*. (R. C. Vogt, Org.; 1º ed, Vol. 1). Gráfica Biblos.
- Wacksman, M. N., Maul, J. D., & Lydy, M. J. (2006). Impact of atrazine on chlorpyrifos toxicity in four aquatic vertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(4), 681–689. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-0264-8>
- Waichman, A. V., Römbke, J., Ribeiro, M. O. A., & Nina, N. C. S. (2002). Use and fate of pesticides in the Amazon State, Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, 9(6), 423–428. <https://doi.org/10.1007/BF02987596>
- Weissgerber, T. L., Milic, N. M., Winham, S. J., & Garovic, V. D. (2015). Beyond Bar and Line Graphs: Time for a New Data Presentation Paradigm. *PLoS Biology*, 13(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002128>
- Wunnapuk, K., Gobe, G., Endre, Z., Peake, P., Grice, J. E., Roberts, M. S., Buckley, N. A., & Liu, X. (2014). Use of a glyphosate-based herbicide-induced nephrotoxicity model to investigate a panel of kidney injury biomarkers. *Toxicology Letters*, 225(1), 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.12.009>
- Zhang, C., Hu, X., Luo, J., Wu, Z., Wang, L., Li, B., Wang, Y., & Sun, G. (2015). Degradation dynamics of glyphosate in different types of citrus orchard soils in China. *Molecules*, 20(1), 1161–1175. <https://doi.org/10.3390/molecules20011161>
- Zhang, W. (2018). Global pesticide use: Profile, trend, cost / benefit and more. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 8(1), 1–27. [www.iaees.org](http://www.iaees.org)
- Zimmerli, S., Bernet, D., Burkhardt-Holm, P., Schmidt-Posthaus, H., Vonlanthen, P., Wahli, T., & Segner, H. (2007). Assessment of fish health status in four Swiss rivers showing a decline of brown trout catches. *Aquatic Sciences*, 69(1), 11–25. <https://doi.org/10.1007/s00027-006-0844-3>