



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**LUIZA FROTA MOREIRA**

**EFEITOS TÓXICOS DA EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO E LIPOPOLISSACARÍDEO  
EM *COLOSSOMA MACROPOMUM* (CHARACIFORME: SERRASALMIDAE)  
COMO MODELO EXPERIMENTAL APLICADO ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**MACAPÁ/AP**

**2022**

**LUIZA FROTA MOREIRA**

**EFEITOS TÓXICOS DA EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO E LIPOPOLISSACARÍDEO  
EM *COLOSSOMA MACROPOMUM* (CHARACIFORME: SERRASALMIDAE)  
COMO MODELO EXPERIMENTAL APLICADO ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ensaios biológicos

Orientador: Prof. Dr. Emerson Augusto Castilho Martins.

**MACAPÁ/AP**

**2022**

Moreira, Luiza Frota.

M838e Efeitos tóxicos da exposição ao glifosato e lipopolissacarídeo em *Colossoma macropomum* (characiforme: serrasalmidae) como modelo experimental aplicado às ciências da saúde / Luiza Frota Moreira. – 2022.

1 recurso eletrônico. 34 folhas.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Marco Zero, Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Macapá, 2022.

Orientador: Professor Doutor Emerson Augusto Castilho Martins

Modo de acesso: World Wide Web.

Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF)

Inclui referências e apêndices.

1. Peixe. 2. Tambaqui (Peixe). 3. Herbicida. 4. Toxidade. 5. Agrotóxico. I. Martins, Emerson Augusto Castilho, orientador. II. Título.

Classificação Decimal de Dewey, 22 edição, 597

---

MOREIRA, Luiza Frota. **Efeitos tóxicos da exposição ao glifosato e lipopolissacarídeo em *Colossoma macropomum* (characiforme: serrasalmidae) como modelo experimental aplicado às ciências da saúde.** Organizador: Emerson Augusto Castilho Martins. 2022. 34 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Marco Zero, Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Macapá, 2022.

**LUIZA FROTA MOREIRA**

**EFEITOS TÓXICOS DA EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO E LIPOPOLISSACARÍDEO  
EM *COLOSSOMA MACROPOMUM* (CHARACIFORME: SERRASALMIDAE)  
COMO MODELO EXPERIMENTAL APLICADO ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde na área de concentração: ensaios biológicos.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Augusto Castilho Martins.

DATA DE APROVAÇÃO: 20/01/2022.



---

Orientador Prof. Dr. Emerson Augusto Castilho Martins  
Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)



---

Examinador Prof. Dr. Rafael Lima Resque  
Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)



---

Examinadora Profa. Dra. Lígia Maria Borges Marques Santana  
Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA)



---

Examinadora Profa. Dra. Claudia Bueno Dos Reis Martinez  
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

**MACAPÁ/AP**

**2022**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e todas as oportunidades e experiências que me levaram até este momento, a realização do meu mestrado.

O meu Orientador, Prof. Dr. Emerson Augusto Castilho Martins, que prestou assistência quando eu mais precisava, agradeço muito todo o empenho e cuidado como orientador, e que também me apresentou a biologia molecular, uma área cativante.

Ao professor Dr. Marcos Tavares Dias, um grande pesquisador da EMBRAPA que compartilhou seus conhecimentos e espaço para que o trabalho fosse possível, agradeço a paciência e dedicação.

Aos colegas de laboratório, Mateus Quintela, Gabriel Neto, Arthur Cunha e a técnica do laboratório, Jemima Malcher, muito obrigada por dedicar o tempo de vocês para me auxiliar.

Aos meus colegas do PPGCS 2019, que fizeram a experiência do mestrado ser bem mais alegre e prazerosa, muito obrigada Ildilane Rodrigues, Maira Uchoa, Emanuelle Tavares, Iuri Sena, Aderaldo Viegas, e os que não somente isso, mas também me ajudaram na realização do meu experimento, agradeço muito a Gabriela Amanajás, Luiz Eduardo, Andressa Viana e Thayana Gonçalves.

Aos meus pais, que sempre me deram apoio aos meus sonhos, cheguei com eles até a conclusão do mestrado, no qual me deram muita força e amparo. Ao meu irmão que também me ajudou no meu experimento, muito obrigada minha família.

Ao meu namorado, Paulo de Tarso, que nunca mediu esforços para que eu pudesse ser a melhor versão de mim mesma, incluindo em meu trabalho.

Ao PPGCS e professores, que me capacitaram como profissional, a minha banca que me forneceu ensinamentos valiosíssimos que levarei adiante no meu trabalho, muito obrigada! Agradeço a CAPES, a bolsa de estudos me permitiu a total dedicação aos meus estudos, e a FAPEAP pelo financiamento ao projeto de pesquisa.

## RESUMO

Herbicidas a base de Glifosato são dos mais utilizados mundialmente, aumentando também estudos sobre toxicidade no decorrer das décadas. Diversos efeitos tóxicos a animais foram associados a crescente utilização do Glifosato, trazendo preocupação sobre a poluição do solo e aos corpos d'água. Para animais aquáticos, foram verificados efeitos tóxicos que incluem a imunossupressão em teleósteos ocasionada pelo herbicida, mas há uma escassez de estudos científicos sobre a atuação do Glifosato a animais desafiados com patógenos, haja vista que com a contaminação por herbicidas a base de glifosato pode ser somada à contaminação por bactérias gram-negativas, que possuem lipopolissacarídeo (LPS) na parede celular que lhe confere a virulência e toxicidade. Com isso, o presente trabalho buscou avaliar os efeitos tóxicos hematológicos relacionados a co-exposição de Glifosato e LPS, consistindo em um bioensaio com 96 juvenis de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) separados em quatro grupos experimentais em triplicata: Grupo CTRL (controle), grupo Glifosato, grupo LPS e grupo Glifosato+LPS. O ensaio foi do tipo semi-estático com coletas realizadas após 24h e 96h de exposição, na qual foi coletado o sangue. Foram realizadas as análises de Explosão respiratória, Eritograma e a Contagem de células brancas indireta total e diferencial. De acordo com os resultados obtidos, foi possível identificar no grupo exposto ao herbicida, decréscimo na hemoglobina e em leucócitos granulares especiais PAS positivo (LG-PAS). Para LPS, foi observado redução às 24h e aumento às 96h em leucócitos totais. Seguido do aumento de monócitos às 24h e de trombócitos às 96h, além da redução da Explosão respiratória, LG-PAS em 24h e 96h, aumento do hematócrito e eritrócitos às 96h. No grupo exposto ao herbicida e LPS foi verificado a redução de Monócitos e LG-PAS em 24h e 96h, além de aumento no volume corpuscular médio (VCM) às 96h, com isso é possível inferir que, o herbicida a base de glifosato é pouco tóxico, mas quando somado a um desafio imunológico, provoca alterações na resposta imunológica da espécie *Colossoma macropomum*.

**Palavras-chave:** Peixe. Imunidade inata. Resposta inflamatória. Toxicologia. Agrotóxico.

## ABSTRACT

Glyphosate-based herbicides are one of the most used worldwide, also increasing studies on toxicity over the decades. Several toxic effects to animals have been associated with the increasing use of glyphosate, bringing concern about soil pollution and water bodies. For aquatic animals, toxic effects were verified, including immunosuppression in teleosts caused by the herbicide, but there is a lack of scientific studies on the performance of glyphosate in animals challenged with pathogens, given that with contamination by glyphosate-based herbicides it can be added to contamination by gram-negative bacteria, which have lipopolysaccharide (LPS) in the cell wall, which gives them virulence and toxicity. Thus, the present work evaluated the hematological toxic effects related to co-exposure of Glyphosate and LPS, consisted of a bioassay with 96 juveniles of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) separated into four experimental groups in triplicate: CTRL group (control), Glyphosate group, LPS group and Glyphosate+LPS group. static with collections performed after 24h and 96h of exposure, in which blood was collected Respiratory Burst, Erythrogram and Total and Differential Indirect White Cell Count were performed. According to the results obtained, it was possible to identify the exposed group to the herbicide, a decrease in hemoglobin and in PAS positive special granular leukocytes (LG-PAS). For LPS, a reduction at 24h and an increase at 96h in total leukocytes was observed. reduction in respiratory burst, LG-PAS at 24h and 96h, increase in hematocrit and erythrocytes at 96h. In the group exposed to the herbicide and LPS, a reduction in Monocytes and LG-PAS at 24h and 96h, in addition to an increase in the mean corpuscular volume (MCV) at 96h, with this it is possible to infer that the glyphosate-based herbicide is not very toxic, but when added to an immunological challenge, it causes changes in the immune response of the species *Colossoma macropomum*.

**Key-words:** Fish. Innate immunity. Inflammatory response. Toxicology. Pesticide.

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                           | <b>8</b>  |
| <b>2 PROBLEMA DE PESQUISA.....</b>                 | <b>12</b> |
| <b>3 HIPÓTESE.....</b>                             | <b>13</b> |
| <b>4 JUSTIFICATIVA.....</b>                        | <b>14</b> |
| <b>5 OBJETIVOS.....</b>                            | <b>15</b> |
| 5.1 OBJETIVO GERAL.....                            | 15        |
| 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                     | 15        |
| <b>6 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                   | <b>16</b> |
| 6.1 PEIXES E ACLIMATAÇÃO.....                      | 16        |
| 6.2 MANIPULAÇÃO DE QUÍMICOS.....                   | 16        |
| 6.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....                 | 16        |
| 6.4 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA ÁGUA.....          | 17        |
| 6.5 COLETA DE TECIDOS.....                         | 17        |
| 6.6 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS.....                    | 17        |
| 6.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....                     | 18        |
| <b>7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>               | <b>19</b> |
| 7.1 EXPLOSÃO RESPIRATÓRIA.....                     | 20        |
| 7.2 PARÂMETROS ERITROCITÁRIOS.....                 | 21        |
| 7.3 PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS.....                  | 23        |
| <b>8 CONCLUSÃO.....</b>                            | <b>27</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                            | <b>28</b> |
| <b>APÊNDICE A – PARÂMETROS ERITROCITÁRIOS.....</b> | <b>34</b> |
| <b>APÊNDICE B – PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS.....</b>  | <b>35</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo do processo evolutivo, a humanidade desenvolveu diversas técnicas de manufatura para adquirir recursos a longo prazo, estabelecendo o estilo de vida atual como conhecemos. Dentre essas técnicas, é importante destacar a agricultura, que não só fornece alimentos e bebidas, mas também matéria prima para construções, vestuário e medicamentos. A necessidade dos seus produtos cresce a cada dia: estimativas sugerem que em 2050, o mundo irá precisar de 25 a 70% a mais de comida do que a produção atual (HUNTER *et al.*, 2017). Porém, esse crescente desenvolvimento também traz muitos desafios, uma vez que é necessário não só aumentar a produtividade, mas também garantir que o nível de produção perdure por longos anos.

As estratégias do agronegócio têm se baseado em agrotóxicos para o controle de pestes, que por consequência fez necessário o desenvolvimento da transgenia de plantas. Neste cenário, o Brasil atualmente possui cerca de 97,5% de sua área cultivada de soja composta por plantas transgênicas, levando em paralelo ao aumento do uso de pesticidas (TAUHATA *et al.*, 2020). Este sistema contém muitas falhas, tendo em vista que é preciso modificar de forma contínua o código genético para desenvolver plantas cada vez mais resistentes, bem como as formulações de defensores agrícolas mais potentes. Além disso há a falta de controle de resíduos de agrotóxicos e mitigação da área impactada, pois atualmente o uso de agrotóxicos representa uma das atividades antrópicas de grande potencial de contaminação de solo e corpos d'água (FILIZOLA *et al.*, 2002; MARCHESAN *et al.*, 2007; VIEIRA *et al.*, 2009).

O glifosato (N-(fosfometil)glicina) se destaca dos demais compostos por ser não-seletivo e sistêmico, sendo assim eficaz contra diversas espécies de ervas daninhas. Ele atua na inibição da produção de aminoácidos aromáticos, que são produzidos pela rota metabólica do ácido-chiquímico, uma via exclusiva de plantas e outros microrganismos, reduzindo a intoxicação ocasional de animais não-alvo (ANNETT; HABIBI; HONTELA, 2014). Por essas qualidades, esse herbicida se tornou rapidamente popular desde sua entrada no mercado, na década de 70, sendo até hoje um dos mais utilizados mundialmente (BENBROOK, 2016; ANTIER *et al.*, 2020).

Entre os principais argumentos utilizados a favor do uso do glifosato, está o baixo risco tóxico e a baixa persistência no ambiente. Porém, estudos demonstram que este herbicida pode ser tóxico para animais, causando danos epigenéticos (KUBSAD *et al.*, 2019) e mutagênicos (FERRANTE; FEARNSIDE, 2020); no homem, suspeita-se que o glifosato pode ser

carcinogênico (GILLEZEAU *et al.*, 2019). Mesmo que o glifosato tenha persistência limitada no ambiente, seu derivado, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), apresenta alta persistência, fator este que, somado à crescente demanda de uso do herbicida ao redor do globo, demonstra que deve-se dar maior atenção ao seu potencial de ecotoxicidade (MAGGI *et al.*, 2020).

O uso do defensivo em larga escala na agricultura desperta preocupação quanto a poluição do solo e, principalmente, ao meio aquático, pois causa intoxicação de animais aquáticos, bem como a anfíbios e outros animais dependentes de alimentos desse meio ambiente, além da contaminação de água potável (ANNETT; HABIBI; HONTELA, 2014; HÉBERT; FUGÈRE; GONZALEZ, 2019). Produtos à base de glifosato também estão presentes no ambiente doméstico para manutenção de hortas e jardins, o que desperta a preocupação quanto ao manejo correto do produto, como a utilização dos equipamentos de proteção individual necessários, pois esses cuidados são comumente deixados de lado pelos usuários, aumentando o risco da contaminação direta pelo produto agrícola (ARAÚJO; OLIVEIRA, 2016).

O glifosato é um irritante dérmico e ocular, pode causar danos hepáticos e renais quando ingerido. No homem, a ingestão em doses elevadas resulta em uma síndrome tóxica que pode envolver: epigastralgia, ulceração ou lesão de mucosa gástrica, hipertermia, anúria, oligúria, hipotensão, conjuntivite, edema orbital, choque cardiogênico, arritmias cardíacas, edema pulmonar não-carcinogênico, pneumonite, necrose tubular aguda, elevação de enzimas hepáticas, aumento da quantidade de leucócitos, acidose metabólica e hipercalemia. (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002).

A contaminação de um organismo, seja por exposição aguda ou crônica, exige um processo energético do corpo para a excreção da substância tóxica. Essa condição pode limitar o metabolismo e, conseqüentemente, reduzir os mecanismos de defesa contra outros estressores. Assim, deve-se salientar que qualquer ser vivo em seu habitat natural pode estar sujeito à exposição simultânea a diferentes tipos de estressores (múltiplos estressores), incluindo contaminantes químicos e biológicos (TELES *et al.*, 2011).

Os estudos com múltiplos estressores demonstram que organismos contaminados têm respostas inflamatórias alteradas, e efeitos oxidativos e imunotóxicos atenuados quando desafiados a uma infecção bacteriana (TELES *et al.*, 2011; JOLLY *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2015).

Nos seres vivos, as infecções bacterianas são muito comuns, pois em qualquer ambiente estes microrganismos estão presentes, principalmente no ambiente aquático (BIANCHI *et al.*, 2019; SAINGAM; LI; YAN, 2020). Nesse ambiente têm se observado uma

maior porcentagem da presença de bactérias Gram-negativas em relação as Gram-positivas (ANDUEZA *et al.*, 2020). As bactérias Gram-negativas são caracterizadas pela sua maior complexidade, apresentando uma parede celular que lhe confere uma proteção extra. Essa membrana possui um componente principal que contribui com a resistência e integridade estrutural da bactéria, conseqüentemente, conferindo uma maior patogenicidade e virulência, chamado de lipopolissacarídeo (LPS), que é uma molécula de grandes dimensões constituída de um lipídio e um polissacarídeo ligados por uma ligação covalente. Este padrão molecular associado ao patógeno (PAMP) é reconhecido pelo sistema imune inato, que realiza respostas inflamatórias contra a bactéria, através de vias de sinalização intracelular por meio de ligação a receptores próprios (CRUZ-MACHADO, 2012).

Em mamíferos, após a ligação em receptor próprio, a resposta inflamatória inata é iniciada através de sinais em cascata, como os mediados pelos sinais inflamatórios causados por Interleucina 1 Beta (IL-1 $\beta$ ) e Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ). Em teleósteos, especula-se que a resposta imune anti-LPS ocorra por meio de receptores toll-like (TLR25, TLR5), que medeia sinais inflamatórios que regulam, subseqüentemente, o sistema complemento modulado pela expressão das proteínas PTX3 e C1q. Enquanto isso, também ocorre a regulação de vias de sinalização entre o TLR e o Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) por meio de citocinas: IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-12 (PEREIRO; FIGUERAS; NOVOA, 2019; LI *et al.*, 2020; GALLANI *et al.*, 2021).

Essa cascata de sinalizações é responsável pela resposta inflamatória, que inclui aumento da temperatura, produção e migração de leucócitos. Estas células são responsáveis por neutralizar, capturar e apresentar o antígeno a outras células a fim de especializar-se contra o patógeno, bem como também regulam a resposta inflamatória por meio de sinalizações. Alterações nos níveis de leucócitos, ou na sua efetividade podem prejudicar a defesa do organismo contra uma infecção.

A resposta imune pode ser suprimida ou amplificada quando um organismo está contaminado por um defensivo agrícola (MA *et al.*, 2019). Além disso, estudos identificaram que os pesticidas organofosforados apresentam um potencial agravante frente a infecções bacterianas (TURRA PIMPÃO *et al.*, 2005). O glifosato também apresenta risco para a hemóstase, onde é associado à ocorrência de hipóxia por hemólise de eritrócitos (RODRIGUES *et al.*, 2009)

Sabe-se que os agrotóxicos, incluindo o glifosato, estão presentes em diversos ecossistemas aquáticos, e representam um risco crescente de toxicidade nesses ecossistemas (MAJEWSKI *et al.*, 2014). Os efeitos tóxicos associados ao glifosato na fauna aquática são

bem demonstrados em diversos trabalhos (MODESTO; MARTINEZ, 2010; MORENO; SOFIA; MARTINEZ, 2014; DE MOURA *et al.*, 2017; MA *et al.*, 2019); também é comum o uso de peixes teleósteos como modelo experimental, visto que esses são considerados como modelo experimental primário para ensaios biológicos de exposição a estressores ambientais, os quais também podem afetar os seres humanos e causar agravos à saúde (REBL; GOLDAMMER, 2018).

Nativo do rio Amazonas, Orinoco e seus afluentes, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) conhecido popularmente como Tambaqui, é pertencente a classe Actinopterygii, da ordem Characiformes e família Serrasalminidae, este peixe possui grande importância biológica e econômica, pois devido a sua sobrepesca em algumas regiões da Amazônia, ocorreu uma redução da população, favorecendo o seu cultivo para atender a alta demanda e, conseqüentemente, essa espécie vem sendo muito estudada a respeito de melhorias na produção em cativeiro e da sua preservação na natureza. Se destaca por ser um peixe de grande porte, em cativeiro, apresenta um crescimento rápido e ótima produtividade, se adaptando facilmente a sistemas de cultivo tradicionais (MORAIS; O'SULLIVAN, 2017).

Estudos toxicológicos de glifosato com Tambaquis demonstraram que o glifosato é potencialmente tóxico a esta espécie, bem como é esperado para outras espécies de peixes tropicais (BRAZ-MOTA *et al.*, 2015a; SILVA *et al.*, 2019). Assim como há uma crescente de estudos desta espécie relacionados a infecções e tratamentos voltados ao cultivo da espécie (TAVARES-DIAS; SANDRIM; CAMPOS-FILHO, 2010; DE ANDRADE *et al.*, 2018; GALLANI *et al.*, 2021).

Devido aos fatos supracitados, o tambaqui, se destaca como modelo para o bioensaio toxicológico de exposição aguda ao glifosato e LPS de forma a evidenciar os efeitos tóxicos relacionados a estes estressores, em condições físico-químicas típicas da região Norte do Brasil.

## 2 PROBLEMA DE PESQUISA

Com a crescente do agronegócio no país, há também o aumento da transgenia e agrotóxicos, conseqüentemente, os impactos socioambientais são mais frequentes (ARAÚJO; OLIVEIRA, 2016). O Glifosato é muito estudado, muitos trabalhos demonstraram que se trata de um agrotóxico de baixa toxicidade ao meio ambiente e animais, embora também se encontre artigos que destacam o potencial tóxico do glifosato como prejudicial para o ambiente e a saúde humana (GILLEZEAU *et al.*, 2019; KUBSAD *et al.*, 2019; FERRANTE; FEARNSSIDE, 2020). Em meio às contradições da ciência sobre o herbicida, torna-se difícil e preocupante o posicionamento dos órgãos responsáveis pela permissão e controle de agrotóxicos como o glifosato (TAUHATA *et al.*, 2020).

No Brasil, houve a reclassificação dos agrotóxicos em 1 de agosto de 2019, no qual cerca de 93 produtos formulados à base de glifosato tiveram a classificação toxicológica reduzida, incluindo 24 produtos antes classificados como “Extremamente tóxico” agora reclassificados como “Improvável de causar dano agudo”. Essa reclassificação segue em posição contrária perante os crescentes estudos toxicológicos e às ações judiciais que a Empresa Bayer responde por danos à saúde, incluindo desenvolvimento de câncer, causados por glifosato.

### **3 HIPÓTESE**

- A exposição simultânea ao glifosato e LPS provocará respostas fisiológicas de toxicidade contrárias quando comparado a exposição isolada para os biomarcadores testados, haja vista que o glifosato deprime a resposta inflamatória, enquanto o LPS estimula a inflamação.

#### 4 JUSTIFICATIVA

Dentre os ecossistemas afetados pelas ações antrópicas, o aquático é um dos mais prejudicados, pois pela água o contaminante pode atingir o ambiente em larga escala, sendo carregado a outros locais e causando danos graves ao ecossistema. Herbicidas a base glifosato podem contaminar o ambiente aquático não só acidentalmente, como também pelo uso de forma inadequada diretamente na água para o controle de plantas aquáticas (ANNETT; HABIBI; HONTELA, 2014). Os peixes são os mais afetados nesse ambiente, como apontam estudos sobre os efeitos tóxicos ocasionados pelo glifosato e surfactantes (MODESTO; MARTINEZ, 2010; DE MOURA *et al.*, 2017; MA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019). Assim, cresce a preocupação sobre os potenciais efeitos tóxicos em peixes, os quais não estão sujeitos a apenas essa contaminação, mas também ao processo energético para desintoxicação do organismo, que pode propiciar o surgimento de doenças causadas por estressores biológicos, como vírus, protozoários, parasitas e bactérias (PROSSER; UNGER; VOGELBEIN, 2011). Todavia, embora se conheça alguns estudos demonstrando o efeito tóxico do glifosato ou de seu subproduto AMPA diretamente aos organismos aquáticos, pouco se sabe sobre a relação do glifosato somada a outros tipos de estressores ambientais, especialmente o LPS, pois até o presente momento há apenas um trabalho realizado em camundongos, que concluiu que a exposição ao glifosato modifica a resposta imunológica induzida por LPS nestes mamíferos, destacando a necessidade de mais estudos toxicológicos para compreender essa interação de estressores, bem como em diferentes modelos biológicos.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos da exposição aguda ao herbicida a base de glifosato somado ao desafio imunológico resultante da inoculação de LPS em *Colossoma macropomum*.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar as alterações nos parâmetros hematológicos relacionados à exposição ao Glifosato e a inoculação de LPS em *Colossoma macropomum*;
- Estudar a interação dos efeitos tóxicos entre os estressores da exposição aguda em *Colossoma macropomum*.

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 PEIXES E ACLIMATAÇÃO

Noventa e seis juvenis de *C. macropomum* (comprimento padrão de  $10,28 \pm 0,33$  cm e peso  $36,47 \pm 2,98$  g) foram obtidos em uma piscicultura de Ferreira Gomes (AP) e mantidos em tanque de 500L na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-Amapá) com água em aeração constante, em temperatura ambiente, com fotoperíodo de 12h de claro e escuro e alimentação diária com ração com 36% de proteína bruta. Os animais foram pesados e selecionados a partir da padronização do peso e aspecto saudável, sendo separados em 8 animais em cada tanque, para 12 tanques de polietileno com capacidade de 80L para aclimatação durante 10 dias, em seguida, o experimento.

### 6.2 MANIPULAÇÃO DE QUÍMICOS

Os animais foram anestesiados com  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de benzocaína e administrada a dose de 6 mg/kg de LPS de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, O127:B8) com o veículo solução tampão salina (PBS) (CHAZOTTE, 2012) por meio de injeção intraperitoneal nos espécimes ao início do experimento.

Foi utilizado o herbicida com 48% m/v de glifosato, Trop (ADAMA), diluído na água dos peixes em concentração de 10mg/L, o que corresponde a 50% da CL50 de Tambaquis a Glifosato (MIYAZAKI; NETO; CASTAGNOLLI, 2004) ao início do experimento e a cada renovação de água.

### 6.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento teve duração de 96h em ensaio do tipo semi-estático, sendo que cada tanque teve 80% a 90% do volume de água renovado a cada 24 h, tendo como embasamento a norma técnica ABNT-15088:2016, a alimentação dos animais foi suspensa durante o experimento.

Os exemplares foram divididos em quatro grupos em triplicata: 1 - Grupo Controle (CTRL), sem exposição ao Glifosato e com injeção intraperitoneal com solução Tampão Fosfato Salino (PBS); 2 - Grupo Glifosato (G), exposto ao herbicida a base de glifosato e com injeção intraperitoneal com solução salina; 3 - Grupo LPS (LPS), sem exposição ao herbicida

e com injeção intraperitoneal contendo solução de LPS em PBS (veículo), e 4 - Grupo Glifosato e LPS (G+LPS), no qual foi adicionado o herbicida durante o experimento além da injeção intraperitoneal de LPS assim como no grupo LPS.

#### 6.4 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA ÁGUA

Foram analisados a Temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade elétrica, verificados início do ensaio, antes e depois de cada renovação de água dos tanques, e ao final do experimento, com o uso de sonda multiparamétrica (Horiba Mod. U52, Japan).

#### 6.5 COLETA DE TECIDOS

Foram realizadas duas coletas em períodos diferentes durante o ensaio, a primeira ao completar 24h do experimento, com 4 exemplares de cada tanque selecionados aleatoriamente com puçá, e segunda ao final do experimento com os 4 animais restantes dos tanques, totalizando 12 animais por tratamento.

Para a coleta de tecidos, os animais foram remanejados para tanques com capacidade de 10L a fim de serem anestesiados com 10 mg.L<sup>-1</sup> de benzocaína. A anestesia foi caracterizada pela letargia dos movimentos operculares, e os animais anestesiados foram então dispostos em uma placa de dissecação com um pano úmido sobre os olhos. A punção sanguínea foi realizada nos vasos dorso-caudais com seringas de 3 mL, com agulhas 20x0,55 (24G), utilizando como anticoagulante o EDTA de sódio (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>2</sub>) a 10 mM (Tavares-Dias *et al.*, 2010).

Todos os procedimentos citados acima estão de acordo com as normas éticas, sendo aprovado no comitê de ética com o uso de animais da EMBRAPA Amapá, sob o protocolo 013-CEUA/CPAFAP.

#### 6.6 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS

O índice de hematócrito (Ht) nos peixes foi obtido por meio da técnica de microhematócrito (GOLDENFARB *et al.*, 1971), na qual 20 µL de sangue total de cada amostra de sangue foi retirada através de microcapilares de vidro, selados em uma das extremidades e centrifugados em 7500 x g por 5 min. A leitura foi realizada em uma cartela de aferição de hematócrito.

A determinação de hemoglobina (Hb) foi realizada utilizando a solução Drabkin e efetuada a leitura em espectrofotômetro a 540nm (COLLIER, 1944).

A contagem de eritrócitos (RBC) foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando a solução de formol citrato (OLIVEIRA, 2007)

Os índices hematimétricos Volume corpuscular médio (VCM) e Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), foram obtidos através dos resultados das análises anteriores seguindo os cálculos:

$$\text{VCM (fL)} = \text{Ht} \times 10 / \text{RBC}$$

$$\text{CHCM} = \text{Hb} \times 100 / \text{Ht}$$

Extensões sanguíneas foram confeccionadas e coradas com May-Grunwald-Giemsa-Wright (Tavares-Dias & Moraes, 2003), para a contagem de leucócitos total e diferencial.

A análise da atividade respiratória de leucócitos (Explosão respiratória), baseado na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela atividade respiratória de macrófagos. O método é realizado com 50µl de sangue coletado ao se adicionar 50µl do corante “nitroblue tetrazolium” (NBT), sendo essa mistura homogeneizada e incubada por 30min a 25°C, provocando a redução do corante, formando precipitados de material insolúveis de coloração azul-escuro no interior dos fagócitos, chamados de grânulos de formazan, posteriormente 50µl da suspensão obtida foi realocada para um tubo de ensaio com 1mL do corante Dimetil formamida (DMF), sendo centrifugada a 3000 x g por 5min, ocorrendo uma lise da parede celular dos leucócitos e solubilização dos grânulos de formazan, sendo possível a leitura da densidade óptica determinada em espectrofotômetro com 540nm (ANDERSON; SIWICKI, 1995; BILLER-TAKAHASHI *et al.*, 2013).

## 6.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os testes estatísticos foram realizados no programa estatístico SigmaStat (versão 3.5), todos os resultados apresentados passaram nos testes de normalidade e teste de equidade de variância. Foram aplicados a Análise de Variância (One Way ANOVA) seguida de Tukey para as comparações das análises físico-químicas e parâmetros morfométricos, e Análise de Variância (Two Way ANOVA) seguida do teste Tukey nas comparações hematológicas a fim de verificar as diferenças entre tempo e tratamento. Os resultados são apresentados em média ± desvio padrão, e o nível de significância adotado foi de 5%.

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve mortalidade de animais durante o ensaio, bem como as análises físico-químicas realizadas não demonstraram diferença significativa, exceto pela condutividade elétrica, entre o grupo G+LPS e LPS ( $p=0,048$ ), provavelmente relacionado a degradação do glifosato por microorganismos, no qual seus metabólitos, como AMPA, resultam em dióxido de carbono e radical amino (ANNETT; HABIBI; HONTELA, 2014), sendo os íons os responsáveis por aumentar a condutividade elétrica nos grupos tratados com glifosato (Tabela 2), apesar da diferença estatística, esta alteração é insignificante para o parâmetro, não sendo possível a interferência nos resultados durante o experimento.

**Tabela 1** – Parâmetros físico-químicos dos grupos tratados.

|              | <b>pH</b>    | <b>O D. (mg/L)</b> | <b>Temperatura (C°)</b> | <b>Cond. Elétrica (µS/cm)</b> |
|--------------|--------------|--------------------|-------------------------|-------------------------------|
| <b>CTRL</b>  | 6,201 ± 0,76 | 5,032 ± 0,72       | 28,175 ± 0,83           | 34,867 ± 4,45 <b>ab</b>       |
| <b>G</b>     | 5,758 ± 0,70 | 4,975 ± 0,60       | 28,108 ± 0,94           | 36,311 ± 4,78 <b>ab</b>       |
| <b>LPS</b>   | 6,093 ± 0,73 | 5,153 ± 0,70       | 28,104 ± 0,96           | 32,378 ± 4,64 <b>a</b>        |
| <b>G+LPS</b> | 5,662 ± 0,70 | 4,996 ± 0,53       | 28,133 ± 0,93           | 36,467 ± 4,61 <b>b</b>        |

**Fonte:** Coleta de dados do próprio autor.

**Nota:** Apresentando pH, Oxigênio dissolvido (O.D), Temperatura e Condutividade elétrica. Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos tratados.

Os resultados morfométricos dos animais utilizados no experimento não tiveram diferença significativa quando comparados a antes e após o experimento (Tabela 3).

**Tabela 2** – Parâmetros morfométricos dos grupos testados.

|              | <b>Peso Inicial (g)</b> | <b>Peso Final (g)</b> |
|--------------|-------------------------|-----------------------|
| <b>CTRL</b>  | 36,9 ± 9,6              | 41,0 ± 8,0            |
| <b>G</b>     | 40,2 ± 8,4              | 45,6 ± 11,0           |
| <b>LPS</b>   | 35,9 ± 7,7              | 40,1 ± 10,5           |
| <b>G+LPS</b> | 36,3 ± 7,2              | 40,0 ± 5,7            |

**Fonte:** Coleta de dados do próprio autor.

**Nota:** Apresentando o peso em gramas realizadas no início (0h) e no fim do ensaio (96h), apresentado por média ± desvio padrão. N=96.

A realidade da contaminação na fauna aquática é evidenciada por muitos estudos; estes abordam os efeitos tóxicos causados por produtos à base de glifosato em diferentes espécies de peixes (JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2002; HUED; OBERHOFER; DE LOS ÁNGELES BISTONI, 2012; MORENO; SOFIA; MARTINEZ, 2014; LORO *et al.*, 2015; SAMANTA *et al.*, 2016) e, contribuem para a compreensão dos danos que o uso deste agrotóxico pode causar na fauna de corpos d'água próximos às plantações.

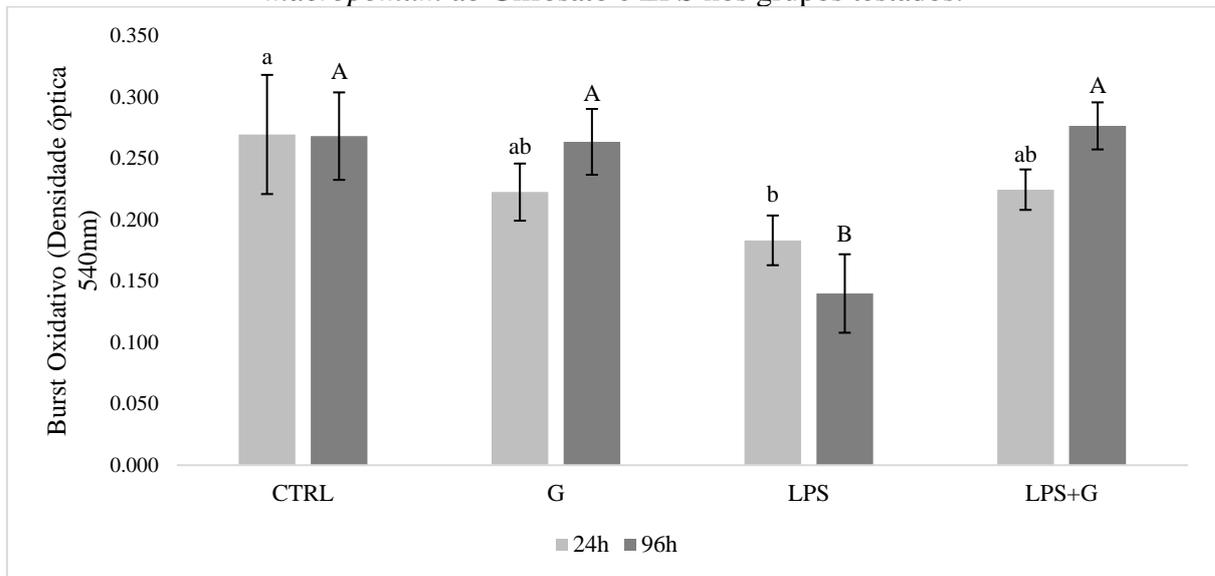
Dentre as espécies estudadas, destaca-se o tambaqui, com uma crescente de estudos que demonstram os efeitos tóxicos de pesticidas em *C. macropomum* (SALAZAR-LUGO *et al.*, 2009; RAFAELA LEÃO SOARES *et al.*, 2016) bem como para o glifosato (BRAZ-MOTA *et al.*, 2015b; SILVA *et al.*, 2019), elucidando efeitos tóxicos como histopatologias, genotoxicidade, estresse oxidativo e alterações hematológicas. Porém, não é encontrado estudo que relacione os efeitos de exposição ao glifosato somados aos efeitos imunotóxicos, principalmente frente a um desafio imunológico, para nenhum peixe até o momento.

O processo inflamatório agudo, independente da natureza do estímulo, obedece a um padrão semelhante de desenvolvimento. Em peixes, ocorre o acúmulo de células no foco lesado, fagocitose por células competentes, formação de peptídeos, sistema complemento, atividade da lisozima e outras proteínas sanguíneas (MARCUSO *et al.*, 2013). A fagocitose é um dos principais mecanismos deste processo, no qual às células fagocíticas englobam partículas grandes, contribuindo para a remoção de patógenos. Se este mecanismo for prejudicado ou interrompido por efeito de um contaminante, a resposta imune terá sido comprometida, caracterizando um efeito imunotóxico.

## 7.1 EXPLOSÃO RESPIRATÓRIA

A análise do Explosão respiratória permite mensurar a atividade respiratória dos macrófagos, através da formação de espécies reativas de oxigênio, sendo possível observar se a atividade fagocítica está exacerbada ou suprimida. Neste experimento, foi possível verificar os efeitos oriundos do Explosão respiratória no grupo LPS =  $0,183 \pm 0,020$ , que divergiu do grupo CTRL =  $0,270 \pm 0,049$  às 24h ( $p=0,017$ ) e às 96 horas, quando essa diferença passa a ser acentuada pela média do grupo LPS =  $0,140 \pm 0,032$  comparado ao CTRL =  $0,268 \pm 0,036$  ( $p=<0,001$ ). Este resultado sugere uma menor proteção frente ao desafio bacteriano, corroborando com o estudo de Tambaquis expostos a *A. hydrophila* e suplementados com  $\beta$ -glucano (CHAGAS, 2010), na qual a redução da atividade respiratória de leucócitos em Tambaquis após o desafio bacteriano possa estar associado ao limite de tempo de avaliação deste biomarcador, onde não foi possível visualizar o pico máximo de atividade, na qual indica que uma vez que houve o ápice da atividade fagocítica, e esta foi analisada no encerramento das atividades destas células, conferindo o valor abaixo da média. Sugere-se a análise da explosão respiratória após 6h ou 12h após a exposição (Gráfico 1).

**Gráfico 1** - Análise de Explosão respiratória em 24h e 96h do bioensaio de exposição de *C. macropomum* ao Glifosato e LPS nos grupos testados.



**Fonte:** Coleta de dados do próprio autor.

**Nota:** Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos. Letras minúsculas para a coleta de 24h, maiúsculas para 96h, apresentado por média  $\pm$  desvio padrão. N=96.

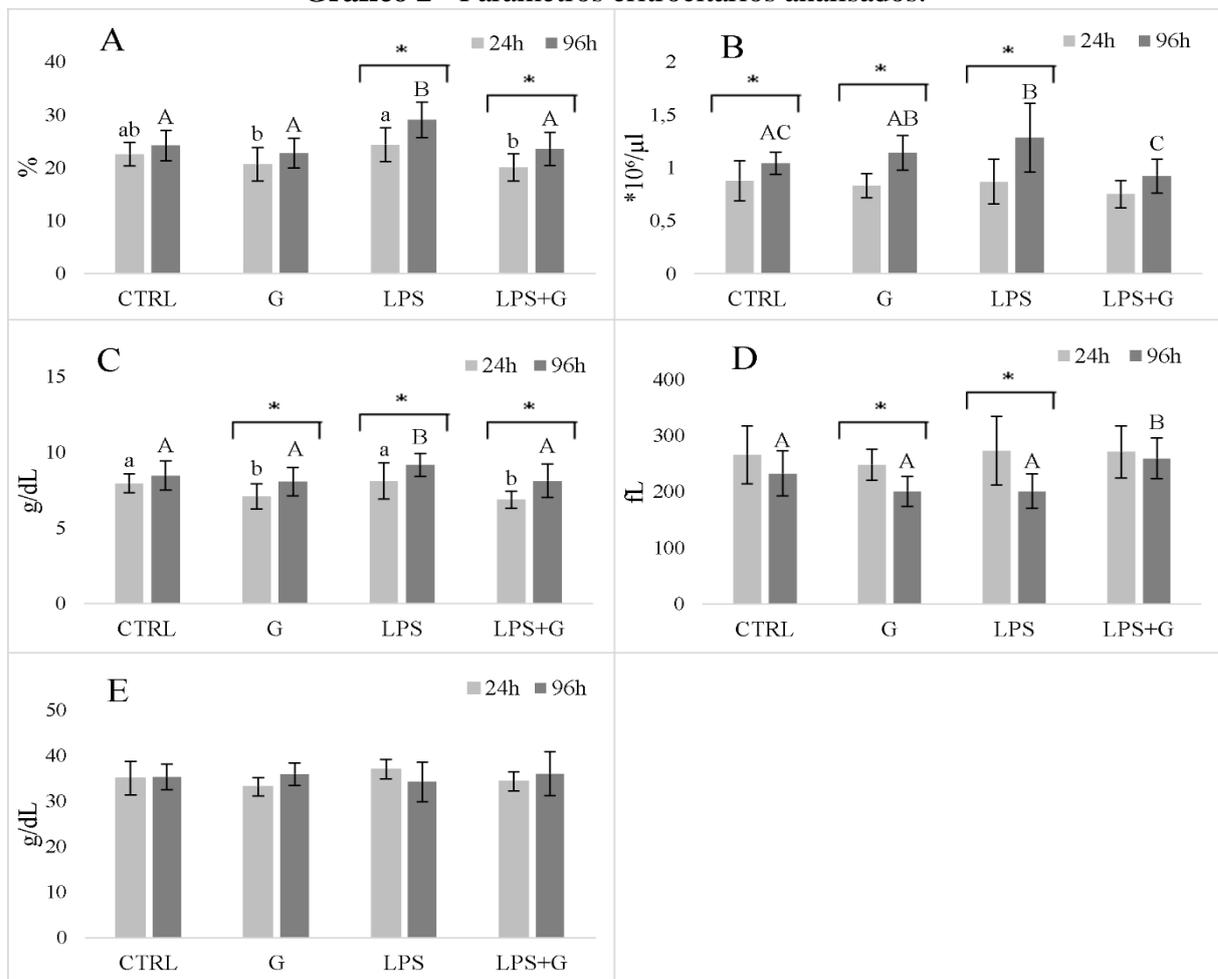
Em 96h o grupo LPS também divergiu dos grupos  $G = 0,264 \pm 0,027$  ( $p=0,011$ ) e  $G+LPS = 0,277 \pm 0,019$  ( $p=0,020$ ). A partir do ocorrido, é possível inferir que a resposta da atividade respiratória dos macrófagos não ocorre da mesma forma na presença de glifosato. Semelhante ao realizado, na literatura é descrita a interação de alumínio e LPS em *R. rutilus* na atividade respiratória de células fagocíticas, resultando em estresse oxidativo na presença de alumínio, sendo este efeito exacerbado quando co-exposto ao alumínio e LPS (JOLLY *et al.*, 2014). Diferentemente do presente trabalho, onde o glifosato não apresentou efeitos tóxicos para esta análise.

## 7.2 PARÂMETROS ERITROCITÁRIOS

Referente aos eritrócitos, foi observado que os agrotóxicos alteram a hemostasia, assim como o sistema imune da espécie *C. macropomum* (SALAZAR-LUGO *et al.*, 2009), é demonstrado que o glifosato provoca, de uma maneira geral, decréscimo nos parâmetros hematológicos de peixes (GOLOVANOVA; AMINOV, 2019); Neste trabalho foi possível observar a mesma tendência aos parâmetros hematológicos avaliados, na qual a determinação de hemoglobina foi deprimida pelo glifosato tanto de forma isolada no grupo G ( $p= 0,046$ ) quanto de forma conjunta no grupo G+LPS ( $p= 0,008$ ), caracterizando uma anemia hipocrômica. Esta observação corrobora os resultados obtidos em estudos de exposição do

herbicida ao *Leiarius marmoratus* × *Pseudoplatystoma reticulatum* (DE MOURA *et al.*, 2017) e difere da exposição realizada em *Prochilodus lineatus* (MODESTO; MARTINEZ, 2010). Curiosamente, o resultado de contaminação observado logo nas primeiras 24h do presente trabalho difere de BRAZ-MOTA *et al.* (2015), no qual só foi possível observar efeitos em alterações de hemoglobina pela contaminação relacionada ao glifosato após as 96 horas do ensaio com 75% da CL50 para tambaqui (Gráfico 2).

**Gráfico 2 - Parâmetros eritrocitários analisados.**



**Fonte:** Coleta de dados do próprio autor.

**Nota:** Hematócrito (A), Eritrócitos (B), Hemoglobina (C), VCM (D) e CHCM (E), dos grupos controle (CTRL), glifosato (G), Lipopolissacarídeo (LPS) e glifosato somado ao lipopolissacarídeo (G+LPS). Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos. \* significa diferença entre os períodos de coleta dentro de cada tratamento, apresentado por média ± desvio padrão. N=96.

Diferente dos efeitos tóxicos associados ao glifosato, houve um aumento no hematócrito e na contagem de eritrócitos às 96h ( $p=0,033$ ) no grupo exposto ao LPS, caracterizando uma eritrocitose, resultados estes que corroboram o trabalho com Tambaquis expostos a *Aeromonas hydrophila* e *Anacanthorus spathulatus* (DE ANDRADE *et al.*, 2018). O hematócrito do grupo LPS divergiu dos grupos G ( $p=0,019$ ) e LPS+G ( $p=0,005$ ) nas

primeiras 24h, embora nenhum dos tratamentos tenha sido significativamente diferente do grupo controle neste período. Quando se avalia o tratamento em 96h, aparece diferença significativa do grupo LPS com os grupos G ( $p < 0,001$ ) e LPS+G ( $p < 0,001$ ) e CTRL ( $p = 0,008$ ), demonstrando que com 96h do tratamento com LPS leva a um aumento do hematócrito, mas esse efeito é revertido pela presença do glifosato, novamente evidenciando a capacidade do glifosato de reverter respostas fisiológicas ao desafio com LPS. Essa divergência também é evidenciada quando se avalia a contagem de eritrócitos, onde se pode observar um aumento significativo na presença de LPS em relação ao CTRL ( $p = 0,033$ ), que é completamente revertido na presença simultânea do glifosato ( $p < 0,001$ ), corroborando com os resultados de hematócrito e observações da literatura.

Estes resultados apontam uma possível diferença entre os efeitos dos estressores para esse marcador, na qual o LPS aumenta o índice de hematócrito, bem como o número de eritrócitos no sangue, e o glifosato diminui e/ou mantém estes biomarcadores, pois já foi demonstrado na literatura que o glifosato pode reduzir o hematócrito e o número de eritrócitos (DE MOURA *et al.*, 2017).

Em relação aos índices hematimétricos, o volume corpuscular médio (VCM) apresentou valores divergentes entre os grupos G+LPS e os de LPS ( $p < 0,001$ ) e G ( $p = 0,008$ ), demonstrando que estes estressores quando expostos de forma conjunta, aumentam o volume das hemácias.

A Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), que representa a concentração de hemoglobina na hemácia, neste trabalho não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, o que diverge de outros trabalhos onde houve alteração causado por glifosato (BRAZ-MOTA *et al.*, 2015b) e por desafio infeccioso (DE ANDRADE *et al.*, 2018).

### 7.3 PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS

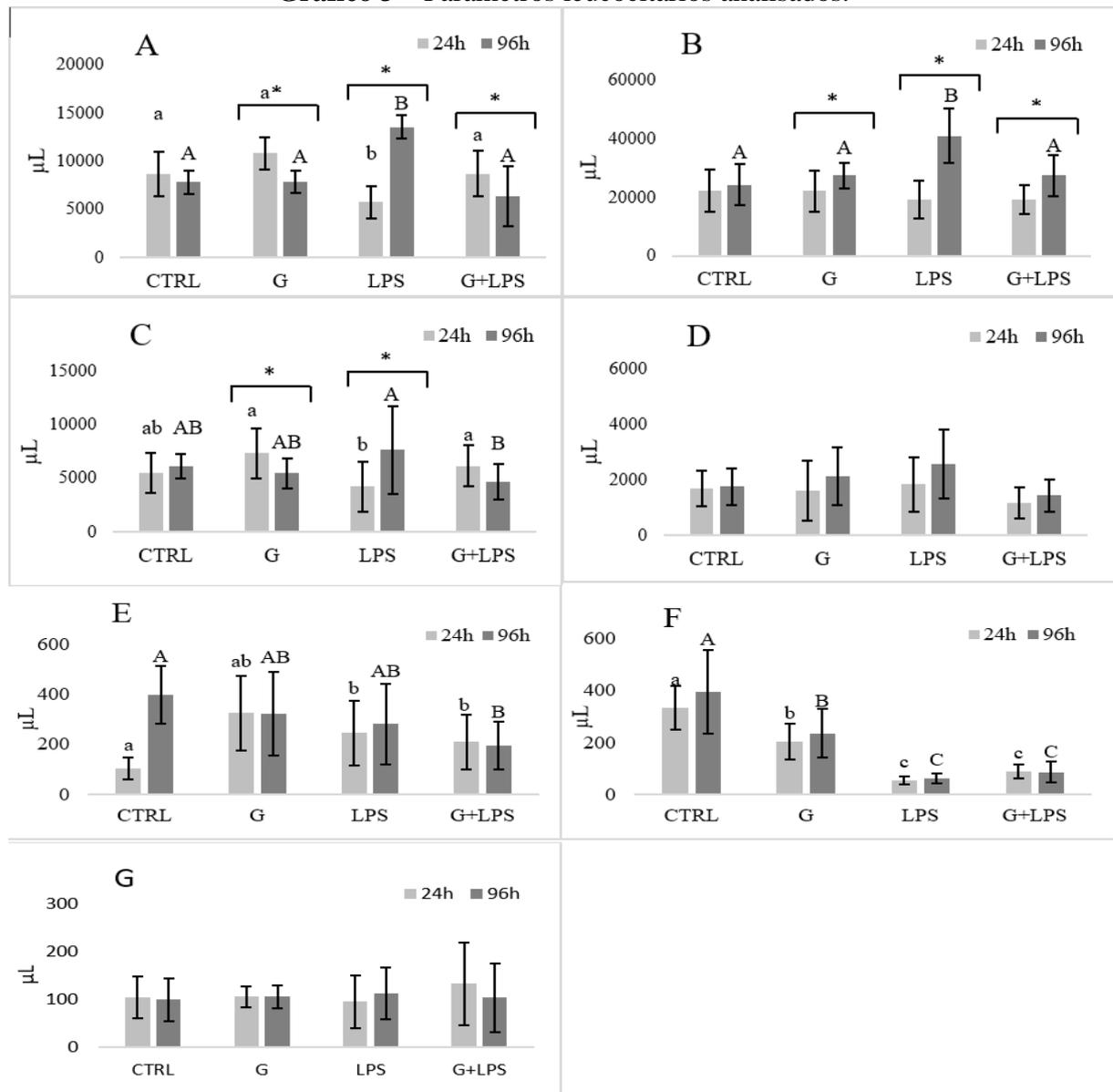
O estudo do sistema imunológico dos peixes na imunologia comparativa pode prover conhecimentos básicos sobre os mecanismos de defesa de animais contra patógenos, bem como no desenvolvimento de medidas de proteção contra novas doenças (RAUTA; NAYAK; DAS, 2012). A relação entre a resposta imune e o estresse envolve os sistemas nervoso e endócrino, que regulam o sistema imune, no qual se observa a ativação imunológica em caso de estresse agudo ocorre e a supressão imunológica em caso de estresse crônico (TORT, 2011).

Assim como há estudos sobre os efeitos tóxicos do glifosato em Tambaqui, há avanços científicos com o objetivo de entender os padrões da resposta imune da espécie (GALLANI *et*

*al.*, 2021) e, com isso, assumir estratégias de uso de estimulantes do sistema imune na dieta de espécimes cultivados (CHAGAS *et al.*, 2013; PAZ *et al.*, 2019) e a compreensão dos efeitos por desafio infeccioso (PESSOA *et al.*, 2020).

Para Tambaqui, foi possível observar uma redução na quantidade de LG-PAS no grupo G, tanto após 24h do início do tratamento ( $p=0,003$ ), quanto após 96h ( $p=0,019$ ). De maneira interessante, este resultado ocorreu em todos os tratamentos quando comparados ao controle para este parâmetro. Nos demais parâmetros os valores permaneceram muito próximos do grupo controle, indicando que o glifosato, na concentração estudada, é pouco tóxico aos parâmetros leucocitários (Gráfico 3).

**Gráfico 3** – Parâmetros leucocitários analisados.



**Fonte:** Coleta de dados do próprio autor.

**Nota:** Leucócitos totais (A), Trombócitos (B), Linfócitos (C), Neutrófilos (D), Monócitos (E), LG-PAS (F) e Eosinófilos (G), dos grupos controle (CTRL), glifosato (G), Lipopolissacarídeo (LPS) e glifosato somado ao

lipopolissacarídeo (G+LPS). Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos tratados. \* significa diferença entre os períodos de coleta dentro de cada tratamento, apresentado por média  $\pm$  desvio padrão. N=96

Frente ao desafio infeccioso, foi visto uma redução da quantidade de leucócitos totais às 24h para o grupo LPS, caracterizando uma leucopenia, bem como a redução dos linfócitos ( $p=0,002$ ) e de LG-PAS( $p=<0,001$ ), contudo, houve aumento dos monócitos ( $p=0,008$ ). Visto que o sistema imune inato começa a agir logo nas primeiras horas de infecção, é possível que às 24h após a inoculação de LPS, grande parte das células brancas migraram para o tecido alvo, bem como o aumento de monócitos sugere que a resposta inflamatória está avançada, pois estas células são às últimas a migrarem ao foco infeccioso. Às 96h, a quantidade de leucócitos totais aumentou no grupo LPS( $p=<0,001$ ), bem como o número de trombócitos ( $p=<0,001$ ), indicando uma preparação do corpo pós- infecção.

Em relação à interação de ambos os contaminantes, às 24h o grupo G+LPS apresentou um aumento na quantidade de monócitos ( $p=0,001$ ), bem como a redução da quantidade de LG-PAS ( $p=<0,001$ ), resultados estes que perduraram até as 96h para LG-PAS ( $p=<0,001$ ) embora o resultado se reverta para monócitos ( $p=0,004$ ). Esses resultados são semelhantes ao ocorrido no grupo LPS, porém de forma branda, sugerindo que na presença de glifosato a resposta inflamatória pode ser comprometida. Bem como é possível observar as diferenças entre os grupos supracitados em relação a quantidade de linfócitos no sangue às 24h, onde o valor do grupo G+LPS foi mais alto que do grupo LPS ( $p=0,046$ ), já às 96h, o grupo LPS é o que obteve o valor mais alto em relação ao grupo G+LPS ( $p=0,017$ ), demonstrando então, como a presença do glifosato altera os parâmetros estudados.

Dito isso, a compreensão dos efeitos tóxicos relacionados ao sistema imune causados pelo glifosato, somados ao desafio bacteriano estimulado pelo LPS, resultou na observação de que o glifosato afetou a resposta inflamatória causada pelo LPS, sendo esta interação divergente do apresentado no trabalho sobre contaminação conjunta de LPS a um organofosforado, a Deltametrina, que teve como resultado a resposta inflamatória aumentada em ambos os contaminantes, concluindo que estes em conjunto podem potencializar o efeito um do outro (TURRA PIMPÃO *et al.*, 2005).

O glifosato também é um agrotóxico organofosforado e, assim como é descrito na literatura, é esperado que os efeitos nos leucócitos sejam elevados, causando leucocitose e linfopenia, porém, assim como foi demonstrado em estudos com Carpas expostas a Glifosato na qual resultou na imunossupressão ou a ativação exacerbada da resposta inflamatória (MA; LI, 2015; MA *et al.*, 2019), é uma realidade que o herbicida pode provocar diferentes efeitos entre as espécies; para *C. macropomum*, foi visto que o herbicida a base de glifosato apresentou

baixa toxicidade. Por outro lado, o LPS provocou efeitos relacionados a estimulação inflamatória, sendo estes efeitos não vistos no grupo inoculado com LPS e exposto ao herbicida, sugerindo que de alguma forma o herbicida altera este estímulo, prejudicando a execução da resposta inflamatória.

## 8 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho demonstram que potencial tóxico do herbicida a base de glifosato em exposição aguda na concentração estudada é baixo, apresentando poucos efeitos pela contaminação, porém foi verificado que quando o herbicida estava presente, a resposta inflamatória não ocorria de forma igual ao grupo exposto ao LPS, sugerindo que o herbicida a base de glifosato pode alterar a resposta inflamatória, quando a mesma é necessária para a proteção contra patógenos ao animal. Até o momento, este é o primeiro trabalho realizado apresentando os efeitos tóxicos relacionados a exposição de um herbicida a base de glifosato e LPS em peixes, portanto, mais estudos devem ser desenvolvidos, com outras análises a fim de verificar essa interação de estressores, a explosão respiratória deve ser analisada em mais de uma coleta, sendo antes ou igual a 12h após a exposição. Sugere-se o estudo dos órgãos envolvidos na imunidade, como o fígado, rim cefálico e o baço.

## REFERÊNCIAS

- AMARANTE JUNIOR, O. P. de *et al.* Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589–593, 2002.
- ANDERSON, D. P.; SIWICKI, A. K. **Basic hematology and serology for fish health programs**. Manila, Phillipines: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, 1995.
- ANDUEZA, F. *et al.* Microbial Quality of the Thermal Waters of the Spa “ El Tingo ”. Pichincha . Ecuador. **Ars Pharmaceutica**, v. 61, n. 1, p. 15–23, 2020.
- ANNETT, R.; HABIBI, H. R.; HONTELA, A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 5, p. 458–479, 2014.
- ANTIER, C. *et al.* Glyphosate use in the European agricultural sector and a framework for its further monitoring. **Sustainability (Switzerland)**, v. 12, n. 14, p. 1–22, 2020.
- ARAÚJO, I. M. M. de; OLIVEIRA, Â. G. R. da C. Agronegócio E Agrotóxicos: Impactos À Saúde Dos Trabalhadores Agrícolas No Nordeste Brasileiro. **Trabalho, Educação e Saúde**, v. 15, n. 1, p. 117–129, 2016.
- BENBROOK, C. M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences Europe**, v. 28, n. 1, p. 1–15, 2016.
- BIANCHI, E. *et al.* Water quality monitoring of the Sinos River Basin, Southern Brazil, using physicochemical and microbiological analysis and biomarkers in laboratory-exposed fish. **Ecohydrology and Hydrobiology**, v. 19, n. 3, p. 328–338, 2019.
- BILLER-TAKAHASHI, J. *et al.* Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 73, n. 2, p. 425–429, 2013.
- BRAZ-MOTA, S. *et al.* Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. **Chemosphere**, v. 135, p. 53–60, 2015a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.042>. Acesso em: dez. 2021.
- BRAZ-MOTA, S. *et al.* Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. **Chemosphere**, v. 135, p. 53–60, 2015b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.042>. Acesso em: dez. 2021.
- CHAGAS, E. C. **'beta'-glucano e nucleotídeos para tambaquis (*Colossoma macropomum*) vacinados e desafiados com *Aeromonas hydrophila***: desempenho produtivo e respostas fisiopatológicas. 2010. 141 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Centro de Aquicultura de Jaboticabal, 2010. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/100188>. Acesso em: dez. 2021.
- CHAGAS, E. C. *et al.* Desempenho produtivo e respostas fisiopatológicas de tambaquis

- alimentados com ração suplementada com  $\beta$ -glucano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 899–905, 2013.
- CHAZOTTE, B. Labeling Golgi with Fluorescent Ceramides. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2012, n. 8, p. pdb.prot070599, ago. 2012. Disponível em: <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.prot070599>. Acesso em: dez. 2021.
- COLLIER, H. B. Standardization of Blood Haemoglobin Determinations. **Canadian Medical Association journal**, v. 50, n. 6, p. 550–2, 1944. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20323122> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1581573>. Acesso em: dez. 2021.
- CRUZ-MACHADO, S. da S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NF $\kappa$ B. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 40–43, 2012.
- DE ANDRADE, J. I. A. *et al.* Hematology and biochemistry of *Collossoma macropomum* co-infected with *Aeromonas hydrophila* and monogenean *Anacanthorus spathulatus* after treatment with seed extract of *Bixa orellana*. **Aquaculture**, v. 495, n. June, p. 452–457, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.026>. Acesso em: dez. 2021.
- DE MOURA, F. R. *et al.* Effects of glyphosate-based herbicide on pintado da Amazônia: Hematology, histological aspects, metabolic parameters and genotoxic potential. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 56, n. September, p. 241–248, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2017.09.019>. Acesso em: dez. 2021.
- FERRANTE, L.; FEARNSIDE, P. M. Evidence of mutagenic and lethal effects of herbicides on amazonian frogs. **Acta Amazonica**, v. 50, n. 4, p. 363–366, 2020.
- FILIZOLA, H. F. *et al.* Monitoramento e avaliação do risco de contaminação por pesticidas em água superficial e subterrânea na região de Guaiara. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 659–667, 2002.
- GALLANI, S. U. *et al.* Patterns of the innate immune response in tambaqui *Collossoma macropomum*: Modulation of gene expression in haemorrhagic septicaemia caused by *Aeromonas hydrophila*. **Microbial Pathogenesis**, v. 150, p. 104638, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104638>. Acesso em: dez. 2021.
- GILLEZEAU, C. *et al.* The evidence of human exposure to glyphosate: A review. **Environmental Health: A Global Access Science Source**, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2019.
- GOLDENFARB, P. B. *et al.* Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American journal of clinical pathology**, v. 56, n. 1, p. 35–39, 1971.
- GOLOVANOVA, I. L.; AMINOV, A. I. Physiological–Biochemical Status of Fish under the Effect of Glyphosate-Containing Herbicides (Review). **Inland Water Biology**, v. 12, n. 2, p. 84–94, 2019.
- HAN, S. J. *et al.* Impact of cadmium exposure on the association between lipopolysaccharide and metabolic syndrome. **International Journal of Environmental Research and Public**

**Health**, v. 12, n. 9, p. 11396–11409, 2015.

HÉBERT, M. P.; FUGÈRE, V.; GONZALEZ, A. The overlooked impact of rising glyphosate use on phosphorus loading in agricultural watersheds. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 17, n. 1, p. 48–56, 2019.

HUED, A. C.; OBERHOFER, S.; DE LOS ÁNGELES BISTONI, M. Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup®) alters normal gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, cyprinodontiformes). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 62, n. 1, p. 107–117, 2012.

HUNTER, M. C. *et al.* Agriculture in 2050: Recalibrating targets for sustainable intensification. **BioScience**, v. 67, n. 4, p. 386–391, 2017.

JIRAUNGKOORSKUL, W. *et al.* Histopathological Effects of Roundup, a Glyphosate Herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **ScienceAsia**, v. 28, n. 2, p. 121, 2002.

JOLLY, S. *et al.* Effects of aluminium and bacterial lipopolysaccharide on oxidative stress and immune parameters in roach, *Rutilus rutilus* L. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 22, p. 13103–13117, 6 nov. 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-014-3227-7>. Acesso em: dez. 2021.

KUBSAD, D. *et al.* Assessment of Glyphosate Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Pathologies and Sperm Epimutations: Generational Toxicology. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–17, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-42860-0>. Acesso em: dez. 2021.

LI, Y. *et al.* The potential sensing molecules and signal cascades for protecting teleost fishes against lipopolysaccharide. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 97, n. December 2019, p. 235–247, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.050>. Acesso em: dez. 2021.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LORO, V. L. *et al.* Glyphosate-based herbicide affects biochemical parameters in *Rhamdia Quelen* (Quoy & Gaimard, 1824 and) *Leporinus obtusidens* (valenciennes, 1837). **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 1, p. 229–236, 2015.

MA, J. *et al.* Biochemical and molecular impacts of glyphosate-based herbicide on the gills of common carp. **Environmental Pollution**, v. 252, p. 1288–1300, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.040>. Acesso em: dez. 2021.

MA, J.; LI, X. Alteration in the cytokine levels and histopathological damage in common carp induced by glyphosate. **Chemosphere**, v. 128, p. 293–298, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.017>. Acesso em: dez. 2021.

MAGGI, F. *et al.* The global environmental hazard of glyphosate use. **Science of the Total Environment**, v. 717, p. 137167, 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137167>. Acesso em: dez. 2021.

MAJEWSKI, M. S. *et al.* Pesticides in mississippi air and rain: A comparison between 1995 and 2007. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 1283–1293, 2014.

MARCHESAN, E. *et al.* Rice herbicide monitoring in two Brazilian rivers during the rice growing season. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 2, p. 131–137, 2007.

MARCUSSO, P. F. *et al.* Imunologia Das Vacinas Bacterianas Em Teleósteos: Revisão. **Revista BIOTERRA-ISSN 1519-5228**, v. 13, n. 2, 2013.

MIYAZAKI, D. M. Y.; NETO, J. G. M.; CASTAGNOLLI, N. Toxicidade aguda de triclofon, partion metílico e glifosato para alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e tambacu (*C. macropomum* X *Piaractus mesopotamicus*). *In*: Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos (ENBRAPOA), Laguna. **Anais**. Maringá: Biblioteca Setorial da UEM, v. 8, p. 203, 2004.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**, v. 81, n. 6, p. 781–787, 2010.

MORAIS, I. da S. de; O’SULLIVAN, F. L. de A. Biologia , habitat e cultivo do tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER). **Scientia Amazonia**, v. 6, n. 1, p. 81–93, 2017.

MORENO, N. C.; SOFIA, S. H.; MARTINEZ, C. B. R. Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb® and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 448–454, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2013.12.012>. Acesso em: dez. 2021.

NASCIMENTO, A. R. *et al.* SHORT-COMMUNICATION Validation of reference genes for real-time quantitative PCR in tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, p. 1–7, 2016. Disponível em: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2016/vol15-4/pdf/gmr-15-04-gmr.15049228.pdf>. Acesso em: dez. 2021.

OLIVEIRA, R. A. G. **Hemograma**: como fazer e interpretar, 1º edição. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora LTDA, 2007.

PAZ, A. de L. *et al.* Protective effects of the fructooligosaccharide on the growth performance, hematology, immunology indicators and survival of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Serrasalminidae) infected by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Reports**, v. 15, n. September, p. 100222, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100222>. Acesso em: dez. 2021.

PEREIRO, P.; FIGUERAS, A.; NOVOA, B. Insights into teleost interferon-gamma biology: An update. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 90, n. April, p. 150–164, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.002>. Acesso em: dez. 2021.

PESSOA, R. B. G. *et al.* Molecular characterization and evaluation of virulence traits of *Aeromonas* spp. isolated from the tambaqui fish (*Colossoma macropomum*). **Microbial**

- Pathogenesis**, v. 147, n. May, p. 104273, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104273>. Acesso em: dez. 2021.
- PROSSER, C. M.; UNGER, M. A.; VOGELBEIN, W. K. Multistressor interactions in the zebrafish (*Danio rerio*): Concurrent phenanthrene exposure and *Mycobacterium marinum* infection. **Aquatic Toxicology**, v. 102, n. 3–4, p. 177–185, abr. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.01.011>. Acesso em: dez. 2021.
- RAFAELA LEÃO SOARES, P. et al. Acute and chronic toxicity of the benzoylurea pesticide, lufenuron, in the fish, *Colossoma macropomum*. **Chemosphere**, v. 161, p. 412–421, 2016.
- RAUTA, P. R.; NAYAK, B.; DAS, S. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. **Immunology Letters**, v. 148, n. 1, p. 23–33, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2012.08.003>. Acesso em: dez. 2021.
- REBL, A.; GOLDAMMER, T. Under control: The innate immunity of fish from the inhibitors' perspective. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 77, n. April, p. 328–349, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.016>. Acesso em: dez. 2021.
- RODRIGUES, H. G. *et al.* Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos – Uma breve revisão. **Biotemas**, v. 22, n. 1, p. 7, 2009.
- SAINGAM, P.; LI, B.; YAN, T. Fecal indicator bacteria, direct pathogen detection, and microbial community analysis provide different microbiological water quality assessment of a tropical urban marine estuary. **Water Research**, v. 185, 2020.
- SALAZAR-LUGO, R. *et al.* Paraquat and temperature affect nonspecific immune response of *Colossoma macropomum*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, n. 3, p. 321–326, 2009.
- SAMANTA, P. *et al.* Toxic effects of glyphosate-based herbicide, Excel Mera 71 on gill, liver, and kidney of *Heteropneustes fossilis* under laboratory and field conditions. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 4, n. 3, p. 147, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmau.2016.01.002>. Acesso em: dez. 2021.
- SILVA, G. S. da. *et al.* Gene expression, genotoxicity, and physiological responses in an Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (CUVIER 1818), exposed to Roundup® and subsequent acute hypoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 222, n. February, p. 49–58, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.04.010>. Acesso em: dez. 2021.
- TAUHATA, S. B. F. *et al.* The glyphosate controversy: an update. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 87, p. 1–8, 2020.
- TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E. F. S.; CAMPOS-FILHO, E. de. Características hematológicas do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (Osteichthyes, Characidae) em sistema de monocultivo intensivo: II. Leucócitos. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 1, p. 175–184, 2010.

TELES, M. *et al.* Gene expression and TNF-alpha secretion profile in rainbow trout macrophages following exposures to copper and bacterial lipopolysaccharide. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 30, n. 1, p. 340–346, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.11.006>. Acesso em: dez. 2021.

TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1366–1375, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002>. Acesso em: dez. 2021.

TURRA PIMPÃO, C. *et al.* Avaliação da estimulação de LPS na migração celular em *Rhamdia quelen* expostos à deltametrina. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 3, n. 4, p. 11, 15 out. 2005. Disponível em: <https://periodicos.pucpr.br/index.php/cienciaanimal/article/view/9189>. Acesso em: dez. 2021.

VIEIRA, E. de O. *et al.* Avaliação da contaminação do carbofuran nos solos do Distrito de Irrigação do Gorutuba. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 3, p. 250–256, 2009.

## APÊNDICE A – PARÂMETROS ERITROCITÁRIOS

Tabela de Parâmetros eritrocitários dos grupos testados.

|                   | Hematócrito (%)        | Eritrócitos (*10 <sup>6</sup> /μl) | Hemoglobina (g/dL)    | VCM (fL)                 | CHCM (g/dL)  |
|-------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------|
| <b>24h</b>        |                        |                                    |                       |                          |              |
| <b>Tratamento</b> |                        |                                    |                       |                          |              |
| CTRL              | 22,58 ± 2,24 <b>ab</b> | 0,879 ± 0,191                      | 7,95 ± 0,63 <b>a</b>  | 265,93 ± 51,76           | 34,94 ± 3,67 |
| G                 | 20,65 ± 3,14 <b>b</b>  | 0,833 ± 0,113                      | 7,10 ± 0,83 <b>b</b>  | 248,36 ± 27,43           | 33,12 ± 2,03 |
| LPS               | 24,35 ± 3,18 <b>a</b>  | 0,869 ± 0,212                      | 8,10 ± 1,19 <b>a</b>  | 273,10 ± 61,06           | 36,99 ± 2,13 |
| G+LPS             | 20,04 ± 2,57 <b>b</b>  | 0,754 ± 0,128                      | 6,88 ± 0,57 <b>b</b>  | 271,03 ± 46,30           | 34,30 ± 2,05 |
| <b>96h</b>        |                        |                                    |                       |                          |              |
| CTRL              | 24,22 ± 2,88 <b>a</b>  | 1,044 ± 0,105 <b>ac*</b>           | 8,47 ± 0,96 <b>ab</b> | 232,62 ± 40,07 <b>ab</b> | 35,31 ± 2,79 |
| G                 | 22,75 ± 2,82 <b>a</b>  | 1,143 ± 0,164 <b>ab*</b>           | 8,07 ± 0,93 <b>a*</b> | 200,9 ± 26,58 <b>a*</b>  | 35,85 ± 2,47 |
| LPS               | 29,07 ± 3,37 <b>b*</b> | 1,286 ± 0,325 <b>b*</b>            | 9,17 ± 0,76 <b>b*</b> | 201,06 ± 30,58 <b>a*</b> | 34,19 ± 4,34 |
| G+LPS             | 23,56 ± 3,12 <b>a*</b> | 0,923 ± 0,162 <b>c*</b>            | 8,12 ± 1,11 <b>a*</b> | 259,60 ± 36,28 <b>b</b>  | 36,01 ± 4,85 |

**Fonte:** Coleta de dados do próprio autor.

**Nota:** Grupos controle (CTRL), glifosato (G), lipopolissacarídeo (LPS), glifosato e lipopolissacarídeo (G+LPS). Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos. \* significa diferença entre os períodos de coleta.

## APÊNDICE B – PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS

Tabela de Parâmetros leucocitários dos grupos testados.

| Tratamento | Leucócitos                  |                                  |                                 |                                  |                                |                                  |                             |
|------------|-----------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
|            | Totais<br>( $\mu\text{L}$ ) | Trombócitos<br>( $\mu\text{L}$ ) | Linfócitos<br>( $\mu\text{L}$ ) | Neutrófilos<br>( $\mu\text{L}$ ) | Monócitos<br>( $\mu\text{L}$ ) | Eosinófilos<br>( $\mu\text{L}$ ) | LG-PAS<br>( $\mu\text{L}$ ) |
| <b>24h</b> |                             |                                  |                                 |                                  |                                |                                  |                             |
| CTRL       | 8636,45 $\pm$<br>2292,33a   | 22211,25 $\pm$<br>7326,95        | 5476,91 $\pm$<br>1852,98ab      | 1691,86 $\pm$<br>647,92          | 102,79 $\pm$<br>43,47a         | 102,79 $\pm$<br>43,47            | 333,98 $\pm$<br>83,9a       |
| G          | 10794,37 $\pm$<br>1648,55a  | 22022,5 $\pm$<br>6838,11         | 7334,37 $\pm$<br>2340,76a       | 1623,67 $\pm$<br>1072,77         | 325,88 $\pm$<br>149,15ab       | 104,63 $\pm$<br>22,58            | 202,15 $\pm$<br>69,11b      |
| LPS        | 5727,77 $\pm$<br>1637,77b   | 19048,18 $\pm$<br>6492,78        | 4192,94 $\pm$<br>2322,66b       | 1839,86 $\pm$<br>977,88          | 245,51 $\pm$<br>129,87b        | 94,61 $\pm$<br>55,09             | 53,62 $\pm$<br>16,76c       |
| G+LPS      | 8664,06 $\pm$<br>2354,96a   | 19281,04 $\pm$<br>4959,06        | 6130,34 $\pm$<br>1925,32a       | 1176,74 $\pm$<br>543,61          | 210,18 $\pm$<br>110,11b        | 132,26 $\pm$<br>86,16            | 89,11 $\pm$<br>27,53c       |
| <b>96h</b> |                             |                                  |                                 |                                  |                                |                                  |                             |
| CTRL       | 7787,22 $\pm$<br>1212,32a   | 24250,68 $\pm$<br>7132,81a       | 6113,17 $\pm$<br>1145,23ab      | 1758 $\pm$<br>659,38             | 397,59 $\pm$<br>114,34a        | 98,54 $\pm$<br>44,43             | 395,58 $\pm$<br>162,61a     |
| G          | 7894,25 $\pm$<br>1158,56a*  | 27340,45 $\pm$<br>4456,85a       | 5442,42 $\pm$<br>1400,27ab*     | 2124,22 $\pm$<br>1040,62         | 321,71 $\pm$<br>166,08ab       | 105,5 $\pm$<br>23,96             | 236,316<br>$\pm$ 93,58b     |
| LPS        | 13503,75 $\pm$<br>1197,40b* | 40920,93 $\pm$<br>9200,69b*      | 7621,79 $\pm$<br>4096,84a*      | 2576,7 $\pm$<br>1257,31          | 281,9 $\pm$<br>161,19ab        | 111,63 $\pm$<br>53,45            | 62,98 $\pm$<br>19,14c       |
| G+LPS      | 6357,32 $\pm$<br>3098,43a*  | 27422,81 $\pm$<br>7093,19a*      | 4642,29 $\pm$<br>1672,79b       | 1434,21 $\pm$<br>582,95          | 194,34 $\pm$<br>96,03b         | 102,72 $\pm$<br>71,22            | 86,45 $\pm$<br>41,42c       |

**Fonte:** Coleta de dados do próprio autor.

**Nota:** Grupos controle (CTRL), glifosato (G), lipopolissacarídeo (LPS) e glifosato e lipopolissacarídeo (G+LPS). Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos tratados. \* significa diferença entre os períodos de coleta.