UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado

Trabalho de Conclusão de Curso

Testando um método para a obtenção da temperatura crítica máxima em peixes, e sua aplicação a avaliação do efeito do herbicida Roundup Transorb® na tolerância térmica de *Phalloceros caudimaculatus* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae)

Luize Real Lansini

Pelotas, 2015

Luize Real Lansini

Testando um método para a obtenção da temperatura crítica máxima em peixes, e sua aplicação a avaliação do efeito do herbicida Roundup Transorb® na tolerância térmica de *Phalloceros caudimaculatus* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Berteaux Robaldo

Co-Orientador: Yuri Dornelles Zebral

Pelotas, 2015

!

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

L295t Lansini, Luize Real
Testando um método para a obtenção da temperatura crítica máxima em peixes, e sua aplicação a avaliação do efeito do herbicida Roundup Transorb® na tolerância térmica de *Phalloceros caudimaculatus* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) / Luize Real Lansini. – 42f. - Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2015. – Orientador Ricardo Berteaux Robaldo ; coorientadores Yuri Dornelles Zebral.

1.Biologia. 2.Biologia termal. 3.Guppy. 4.Ecotoxicidade. 5.Glifosato. 6.Ctmax. 7.Barrigudinho. I.Robaldo, Ricardo Berteaux. II.Zebral, Yuri Dornelles. III.Título.

Luize Real Lansini

Testando um método para a obtenção da temperatura crítica máxima em peixes, e sua aplicação a avaliação do efeito do herbicida Roundup Transorb® na tolerância térmica de *Phalloceros caudimaculatus* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae)

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas no Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 16 de novembro de 2015.

Banca Examinadora:

Dr. Ricardo Berteaux Robaldo. Doutor em Oceanografia Biológica pela Universidade Federal do Rio Grande (Orientador).

Dr. Cristiano Agra Iserhard. Doutor em Biologia Animal pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MSc. Alinca Peres da Fonseca. Mestre em Aquicultura pela Universidade Federal do Rio Grande.

Dr. Marco Silva Gottschalk. Doutor em Biologia Animal pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Valmor e Simone, por todo o apoio, amor, carinho e a disposição pra tantas caronas durante esta jornada. Agradeço também à minha irmã, que aturou os meus surtos nesses cinco anos e que, a partir dessa semana, começará a entendê-los de fato. Muito obrigada a toda família por nunca terem deixado faltar uma boa risada nas reuniões feitas. Amo todos vocês.

Agradeço ao Robaldo pela orientação, a amizade e pelas loucuras compartilhadas construída durante esses anos de laboratório. Ao Yuri, gostaria de ter palavras que expressassem a gratidão que sinto, não só em respeito à orientação e construção deste trabalho, mas também por todo o aprendizado extracientífico que, com certeza, levarei para a vida (e obrigada por ter me permitido a honra em ser a sua primeira – orientada. Eu diria que foi algo... contagiante!).

Agradeço a todos que ajudaram na construção deste trabalho de alguma maneira (passando empolgantes horas anotando temperatura a cada minuto): Bruna Knopp, Ana Beatriz Henzel e Thaísa Paparazzo. Agradeço também a todos que já passaram pelo Laboratório de Fisiologia Aplicada à Aquicultura.

Agradeço às amizades e parcerias, entre colegas e professores, que esses cinco anos de faculdade me proporcionaram. Citar todos seria exaustivo, mas saibam que, de alguma forma, sempre serão lembrados com carinho por mim.

Agradeço em especial à amizade da Agnes, aquela com quem já dividi metade da minha vida e vai ter que me aguentar pelo resto dela também.

Agradeço à banca examinadora por terem aceitado o convite: Robaldo, Alinca, Marco e ao Cristi...end.

Resumo

LANSINI, Luize Real. **Testando um método para a obtenção da temperatura crítica máxima em peixes, e sua aplicação a avaliação do efeito do herbicida Roundup Transorb® na tolerância térmica de *Phalloceros caudimaculatus* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae)**. 2015. 42f. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

As previsões acerca do aquecimento global vêm tornando relevantes os estudos sobre o limite térmico de organismos, bem como fatores endógenos e exógenos podem alterá-lo. Uma das ferramentas para avaliar a tolerância térmica das espécies é a Temperatura Crítica Máxima (CTMax). O cálculo desta depende de um método padronizado para que se tenha clareza na interpretação dos dados. O primeiro objetivo deste estudo foi desenvolver um método padronizado para determinação da CTMax, através de testes de confiabilidade e reprodutibilidade, sob diferentes taxas de aquecimento. Foram realizados ensaios utilizando intensidades de aquecimento de 80, 120 e 180w. Foram testadas diferenças nas taxas de aquecimento (ºC/min) dentre as repetições, bem como a estratificação térmica dentro da unidade experimental (teste de confiabilidade) e a consistência das taxas encontradas entre cada ensaio (testes de reprodutibilidade). Foram obtidas três taxas de aquecimento significativamente diferentes: 0,3±0,08, 0,50±0,09 e 0,74±0,16ºC/min, para ensaios com potenciais totais de 80, 120 e 180w, respectivamente. Não foi observada estratificação térmica em nenhuma unidade experimental. As taxas médias de aquecimento foram constantes durante cada ensaio, de cada potência térmica. A partir do método desenvolvido, como segundo objetivo, foi realizar a avaliação do efeito de diferentes concentrações do herbicida Roundup Transorb® na tolerância térmica de fêmeas de *Phalloceros caudimaculatus.* Os espécimes foram coletados em uma várzea do Canal São Gonçalo (Pelotas/RS) e aclimatados por uma semana à temperatura ambiente (laboratorial). Um total de 28 fêmeas foram individualizadas em unidades experimentais com grupo controle e grupos de exposição por 96h à Roundup Transorb® (1 e 5mg/L). Nas mesmas unidades experimentais posteriormente foram realizadas a obtenção das CTMax. A CTMax média (±EP) obtida pelo grupo controle foi de 36,43±1,26ºC e o grupo de 1mg/L foi 37,26±1,45ºC, sem diferirem estatísticamente. Os dados do grupo de 5mg/L foram desconsiderados devido à alta mortalidade. A despeito da significância probabilística, valor modal em si, da diferença de entre a CTMax dos dois grupos (0,8ºC), sugere que um aumento do esforço amostral deverá confirmar a tendência de aumento na tolerância termal do grupo exposto ao herbicida.

Palavras-chave: biologia termal; ecotoxicidade; glifosato; ctmax; barrigudinho; guppy;

Abstract

LANSINI, Luize Real. **Methodology test to fish critical thermal maximum determination, and their application to Roundup Transorb® effect on thermal tolrance of *Phalloceros caudimaculatus* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae)**. 2015. 42f. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

The predictions concerning global warming have been raised the number of studies about thermal limits of animals, as well as how endogenous and exogenous factors can change it. One of the tools to evaluate the thermal tolerance of the species is the Critical Thermal Maximum (CTMax). The CTmax estimation depends on a standardized method in order to have perspicuity in the data interpretation. The first aim of this study was to develop a standardized method for determining the CTMax, through reliability and reproducibility tests under different heating rates. Assays were performed using aquarium heaters of 80, 120 and 180w. Differences were tested at heating rates (°C/min) between the repetitions, and the thermal stratification within the experimental units (reliability test) and rates between test replicated in time (reproducibility tests). Three significantly different heating rates were obtained: 0.3 ± 0.08, 0.50 ± 0.09 and 0.74 ± 0,16ºC / min, for trials with total capacities of 80, 120 and 180w, respectively. No thermal stratification was observed. The mean heating rates were constant during each test of each heater potency. After method validation, it was proceed the evaluation of the effect of different concentrations of herbicide Roundup Transorb® on thermal tolerance of guppy *Phalloceros caudimaculatus*, as a second aim. The specimens were collected in a floodplain of the Channel San Gonzalo (Pelotas / RS) and acclimated for a week at room temperature (laboratory). A total of 28 females were isolated in experimental units, constituting a control and treatment groups exposed to Roundup Transorb® (1 and 5 mg/L) for 96h. After, in the same experimental units were determined the CTMax value. The mean CTMax (± SE) obtained by the control group was 36.43 ± 1.26ºC, while in the 1 mg/L group reached 37.26 ± 1,45ºC without differ statistically. Data from 5mg/L group were not considered here due to the high mortality. Despite the insufficient probabilistic significance between CTMax of two groups, the modal value difference (=0,8ºC) suggests that an increased sampling effort should confirm the upward trend in the thermal tolerance of the exposed group to the herbicide.

Keywords: thermal biology; ecotoxicology; glyphosate; ctmax; barrigudinho; guppy

Lista de Figuras

Figura 1 Taxas de aquecimento com aquecedores de diferentes potências. Média ± erro padrão. Letras distintas demonstram diferença significativa entre as médias (ANOVA, Tukey; α = 5%;n=3)..... 23

Figura 2 Temperatura crítica máxima de fêmeas de *Phalloceros caudimaculatus* expostas por 96h ao Roundup Transorb® (Teste t; α = 5%; n=12 ou 11)..... 27

Lista de tabelas

Tabela 1 Análise de confiabilidade em testes de estratificação térmica de unidades experimentais. Os dados são apresentados em forma de média±desvio padrão. Não foram observadas diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis;α = 5%)..... 24

Tabela 2 Análise do teste de reprodutibilidade entre as unidades experimentais. Os dados são apresentados em forma de média±desvio padrão. Não foram observadas diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis; α = 5%)..... 25

Tabela 3 Parâmetros físico-químicas da água durante a exposição de *Phalloceros caudimaculatus* ao Roundup Transorb® por 96h. Os dados são apresentados em forma de média ± desvio padrão..... 25

Tabela 4 Taxa média de aquecimento, CTMax e mortalidade de fêmeas *Phalloceros caudimaculatus* expostas ao Roundup Transorb® por 96h. Os dados são apresentados em forma de média e desvio padrão (Teste t; α = 5%; n=12 ou 11). Os dados do grupo de 5mg/L não foram consideradas nas análises..... 26

Tabela 5 Biometria, taxas de aquecimento média e CTMax de fêmeas de *Phalloceros caudimaculatus* expostas ao Roundup Transorb® por 96h. Comparações foram feitas entre os ensaios do mesmo grupo (ANOVA; α = 5%). Os dados referentes ao grupo de 5mg/L não foram considerados na análise..... 26

Tabela 6 Biometria de fêmeas de *Phalloceros caudimaculatus* expostas ao Roundup Transorb® por 96h. Os dados são apresentados em forma de média±desvio padrão. Teste t; α = 5%;n=12 ou 11. Os dados do grupo de 5mg/L não foram considerados na análise..... 28

Sumário

1Introdução..... 11

1.1 Objetivos..... 13

1.1.1 Objetivo geral..... 13

1.1.2 Objetivos específicos.....,..... 13

2. Revisão de literatura..... 14

2.1 Aquecimento global e biologia termal..... 14

2.2 Temperatura crítica máxima..... 14

2.3 Roundup..... 15

2.4 *Phalloceros caudimaculatus*..... 16

3 Materiais e métodos..... 18

3.1 Desenvolvimento metodológico..... 18

3.1.1 Taxas de aquecimento..... 18

3.1.2 Confiabilidade e reprodutibilidade..... 19

3.2 Efeito do Roundup na tolerância térmica..... 19

3.2.1 Animais experimentais: coleta e aclimatação em laboratório..... 19

3.2.2 Exposições..... 20

3.2.3 Obtenção da CTMax..... 20

3.3 Análise estatística..... 21

4 Resultados..... 23

4.1 Avaliação metodológica..... 23

4.1.1 Taxas de aquecimento..... 23

4.1.2 Confiabilidade e reprodutibilidade..... 24

4.2 Efeito do Roundup na Tolerância térmica..... 25

4.2.1 Parâmetros físico-químicos da água..... 25
4.2.2 Exposições..... 25
4.2.3 Obtenção da CTMax..... 26
4.2.4 Biometria..... 28
5 Discussão..... 29
5.1 Avaliação metodológica..... 29
5.1.1 Taxas de aquecimento..... 29
5.1.2 Confiabilidade..... 30
5.1.3 Reprodutibilidade..... 31
5.2 Efeito do Roundup na CTMax..... 32
6 Conclusão..... 34
Referências..... 35

1 Introdução

A temperatura é um fator de extrema importância para a manutenção dos diversos níveis da vida, influenciando desde reações bioquímicas até a estruturação de comunidades (HILLMAN, 1969; SHEN, 1988; MIRANDA, 2013; CHOUDRI, 2013; BOWDEN, 2014). Frente a isso, a comunidade científica vem demonstrando grande preocupação acerca dos desafios que o processo de aquecimento global irá impor aos sistemas biológicos. As previsões mais recentes realizadas pelo Intergovernamental Panel on Climate Change (IPCC) demonstram que, se o efeito estufa continuar constante, haverá um aumento da temperatura de 0,1-0,2°C por década (MANCIOCCO, 2014). A forma como as populações animais e vegetais irão lidar com esse aquecimento são desconhecidas, mas processos de extinção são esperados (TERBLANCHE, 2011). Dentro deste contexto, existe grande interesse em entender os mecanismos que determinam os limites térmicos das espécies e os fatores que podem alterá-los (REZENDE, 2011).

A tolerância térmica é uma característica plástica que pode ser influenciada por diversos fatores (REZENDE, 2011). Entre as ferramentas existentes para se determinar o limite térmico das espécies, a Temperatura Crítica Máxima (CTMax) é uma das mais utilizados. Este método foi introduzido por Cowles e Bogert em 1944, e que Becker (1979) define como sendo um aumento gradual da temperatura de aclimatação até se atingir uma resposta de desordem física (*endpoint*) que antecede a morte. Dessa forma, determina o limite entre a tolerância e resistência do indivíduo (LUTTERSCHMIDT, 1997). No entanto, o uso errôneo da técnica pode influenciar nos resultados finais (REZENDE, 2011; LUTTERSCHMIDT, 1997). Algumas

variáveis podem ser fatores de confusão na interpretação final do resultado obtido. São exemplos: o tamanho dos indivíduos (CHOW, 2009; RECSETAR, 2012), os indicadores do *endpoint* (LUTTERSCHMIDT, 1997, LIGHTON, 2004) e a intensidade das taxas de aquecimento as quais os animais são expostos (LUTTERSCHMIDT, 1997; MORA, 2006).

O aumento da temperatura do globo pode gerar outras problemáticas além do aquecimento *per se*. Temperaturas elevadas podem atuar potencializando a toxicidade de poluentes ambientais (FICKE, 2007; GORDON, 2002). Dentre os agrotóxicos, o herbicida Roundup é um dos mais utilizados mundialmente. Sua aplicação é feita com o intuito de controlar a presença de plantas indesejáveis (COX, 1998). Este herbicida atua na inibição de uma enzima presente em todos os vegetais (WOODBURN, 2000; HELANDER,2012). Estudos já comprovaram que o Roundup provoca efeitos danosos ao entrar em contato com organismos não alvo. Entre essas ações deletérias podem ser citadas a desregulação endócrina (ROMANO, 2000), aumento do estresse oxidativo (CAVALCANTE, 2008) e efeitos na reprodução (ZEBRAL, 2014). Além do mais, a repercussão deste herbicida pode ser vista até mesmo em nível ecológico, reduzindo a riqueza de espécies (RELYEA, 2005). No que tange a relação entre a exposição a tóxicos e o aumento de temperatura, já foi evidenciado em peixes a diminuição da CTMax (LYDY, 1988).

Os seres ectotérmicos, como peixes, estão entre os principais alvos para se testar limites térmicos, por representarem a ampla maioria de espécies e também por possuírem funções, tanto comportamentais como fisiológicas, termicamente dependentes (RIBEIRO, 2012). *Phalloceros caudimaculatus* (Hensel, 1868) tem a sua distribuição limitada pelo leste, sudeste e sul da costa brasileira, sendo também registrada no Uruguay e Argentina (LUCINDA, 2008). A espécie apresenta reprodução vivípara, o embrião se desenvolve dentro do corpo da mãe, e possui hábito alimentar onívoro (WOLF, 2007).

Tendo em vista as projeções de aquecimento global e as evidências apontando para ações de poluentes sobre a tolerância térmica das espécies, trabalhos que relacionem esses fatores estressantes se fazem necessários. Entretanto, estudos que demonstrem efeitos do Roundup sobre o desempenho térmico de animais são escassos. Frente a isso, o objetivo deste estudo foi averiguar a influência deste herbicida sobre a tolerância térmica de fêmeas de *P.*

caudimaculatus, utilizando como ferramenta a obtenção da CTMax, a partir de um método confiável.

A hipótese levantada é que a tolerância termal dos indivíduos expostos ao Roundup será alterada em relação a dos animais que não serão expostos.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a tolerância térmica de fêmeas de *P. caudimaculatus* após exposição ao glifosato, na formulação Roundup Transorb®, baseado em um método que será desenvolvido e testado para a obtenção da CTMax.

1.1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um método que possibilite expor animais a diferentes taxas constantes de aquecimento;
- Analisar a confiabilidade do método desenvolvido, a partir da avaliação da ausência de estratificação térmica na unidade experimental durante o aquecimento dos animais;
- Testar a reprodutibilidade do método proposto (consistência das taxas médias de aquecimento obtidas);
- Obter a CTMax de fêmeas de *P. caudimaculatus* após exposição ao glifosato, na formulação Roundup Transorb®, baseando-se no método que será desenvolvido de acordo com os objetivos descritos acima.

2 Revisão de literatura

2.1 Aquecimento global e biologia termal

A temperatura é uma das condições essenciais para a conservação de diversos processos biológicos, estando diretamente ligada a reações bioquímicas ou até mesmo na estruturação de populações e comunidades (HILLMAN, 1969; SHEN, 1988; MIRANDA, 2013; CHOUDRI, 2013; BOWDEN, 2014). Manciocco (2014) relata que a partir de previsões realizadas com a continuidade do efeito estufa, são esperados, por década, um aumento de 0,1-0,2ºC na temperatura global.

Tanto o desempenho individual quanto populações de espécies podem ser afetados por eventos climáticos (TERBLANCHE, 2011). A partir disto, estudos que relacionem a influência de fatores endógenos e exógenos possam ter sobre o limite térmico das espécies vem possuindo destaque no meio científico (MANIOCCO, 2014). Mesmo esses estudos estejam ganhando relevância, Maniocco (2014) ressalta a importância de mais trabalhos que relacionem o impacto de fatores exógenos e a interação com a elevação da temperatura.

2.2 Temperatura crítica máxima (CTMax)

A obtenção da CTMax é uma das ferramentas utilizada para o estudo da tolerância térmica das espécies (LUTTERSCHMIDT, 1997). Cowles e Bogert em 1944 introduziram esta técnica e é definido por Becker (1979) como sendo um

aumento gradual da temperatura de aclimatação até se atingir uma resposta de desordem física (*endpoint*), determinando então o limite entre a tolerância e a resistência do indivíduo (LUTTERSCHMIDT, 1997). Entre os métodos que existem para se estudar a tolerância térmica das espécies, está a Temperatura Crítica Máxima (CTMax), um método que foi introduzido por Cowles e Borget em 1944 (LUTTERSCHMIDT, 1997), e que Becker (1979) define como sendo um aumento gradual da temperatura de aclimatação até se atingir uma resposta de desordem física (*endpoint*). Ou seja, determina o limite entre a tolerância e resistência do indivíduo (LUTTERSCHMIDT, 1997).

No entanto o uso errôneo da técnica pode influenciar nos resultados finais (REZENDE, 2011; LUTTERSCHMIDT, 1997). Algumas variáveis podem gerar confusão na interpretação final da CTMax como o tamanho dos indivíduos (CHOWN, 2009; RECSETAR, 2012), indicadores utilizados como *endpoints* (LUTTERSCHMIDT, 1997; LIGHTON, 2004) e a intensidade das taxas de aquecimento (LUTTERSCHMIDT, 1997; MORA, 2006).

Além de diversos fatores que podem alterar a tolerância térmica do indivíduo como, por exemplo, histórico termal (NYAMUKONDIWA, 2010), aclimatação (KUMLU, 2010) e aclimatização (KIVIVOURI, 1990), Lydy (1988), observou a diminuição da CTMax de duas espécies de peixes expostas à concentrações sub-letais de cobre. Patra (2007) expôs quatro espécies de peixes à três tipos de químicos orgânicos, onde observou a diminuição da CTMax em dois deles. Becker em 1980 demonstrou a partir da CTMax, que a tolerância térmica de peixes expostos a concentrações subletais de níquel era diminuída.

2.3 Roundup

O Roundup é um dos herbicidas mais utilizados mundialmente e é usado para controlar plantas indesejáveis (COX, 1998). Inibe uma enzima comum a todos os vegetais, a partir da sua ação pós-ermegente e não seletiva (WOODBURN, 2000; HELANDER,2012). Em sua formulação possui como principio ativo o glifosato (AMARANTE JUNIOR, 2002) e de acordo com a revisão de Annet (2014) este possui ação danosa em diversos *taxa* e ao meio ambiente. O glifosato já foi comprovado ser um desregulador endócrino, devido a sua ação sobre a esteredoigenese: transporte do colesterol para dentro e fora da mitocôndria e na

atividade enzimática na transformação do colesterol em pregnenolona (ROMANO, 2009; WALSH, 2000). Efeitos teratogênicos também já foram associados ao glifosato (PAGANELLI et al., 2010).

Além do glifosato, o Roundup ainda possui adjuvantes em sua formulação, que já demonstraram acarretar o aumento do estresse oxidativo em modelos biológicos não-alvo (LIOI, 1998; CAVALCANTE, 2008; COSTA, 2008; LUSHCHAK, 2009). O aumento do estresse oxidativo se relaciona com a diminuição de enzimas antioxidantes causadas pelo efeito do Roundup (MODESTO; MARTINEZ, 2010). A diminuição dessas enzimas pode potencializar os danos por espécies reativas de oxigênio tendo repercussões sistêmicas diversas (SABELGO et al., 2010; MODESTO;MARTINEZ, 2010; MENEZES, 2011; KREUTZ, et al, 2011; BRAZ-MOTA, 2015).

De acordo com a legislação brasileira existem duas regulamentações para a concentração máxima de glifosato encontrado em águas para consumo humano e de proteção de comunidades aquáticas: a primeira sendo do Ministério da Saúde, onde o valor máximo permitido é de 0,5mg/L (portaria MS n.º 518/2004, Capítulo IV – do padrão de portabilidade; Art. 14º - Portabilidade da água), e a segunda, a Resolução 357/05, do CONOMA, onde a concentração máxima estabelecida é de 0,065mg/L. Mattos et al. (2002) registrou a presença de concentrações médias de 0,14±2,3mg/L de glifosato em amostras de água coletadas em áreas de orizicultura localizado no sudeste do Rio Grande do Sul. Outros trabalhos também encontraram concentrações de glifosato, maiores que permitida pelo CONAMA, em amostras de água do Arroio Passo do Pilão (RS) e da represa Taquaraçu (SP), onde foram encontradas concentrações de 0,10 e 0,18mg/L, respectivamente (SILVA, PERALBA;MATTOS 2003; GARCIA, ROLLEMBERG, 2007). De acordo com a revisão de Annet et al (2014) países como Canadá, França, África do Sul e Estados Unidos já relataram a presença de glifosato em diversos sistemas aquáticos, em concentrações que variaram de <0,01µg/L à 1,95mg/L.

2.4 *Phalloceros caudimaculatus*

Phalloceros caudimaculatus tem sua localização na costa brasileira em estados como Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia (ARAÚJO, 2009). Na Austrália é considerada uma espécie invasora (ROWLEY, 2005).

Apresenta dimorfismo sexual, onde a fêmea é maior e o macho tem a presença de uma estrutura para transferência de esperma, chamada de gonopódio (BISAZZA, 1997; WOLFF, 2007). São onívoros, porém quando encontrados em alta estocagem ou devido a má alimentação, podem apresentar comportamento de canibalismo (GOMIERO;BRAGA, 2004). Estudos realizados em diferentes localidades encontraram tendências à herbívora (SABINO;CASTRO, 1990) e insetivoria (CASTRO;CASSATI, 1997). *P. caudimaculatus* apresenta atividade diurna e preferência por águas rasas e calmas (SABINO CASTRO, 1990). Como diagnóstico da espécie dentre as espécies semelhantes de Poeciliidae, possui uma mancha elíptica preta na porção mediana da região do flanco (LUCINDA, 2008).

3 Materiais e Métodos

3.1 Desenvolvimento metodológico

3.1.1 Taxas de aquecimento

Para a obtenção das taxas de aquecimento, foram realizados testes utilizando aquecedores com diferentes wattagens (60, 80 e 100w). Diferentes intensidades de aquecimento foram obtidas por combinações distintas de aquecedores. A potência total para cada um dos ensaios foi de 80w (um aquecedor de 80w), 120w (dois aquecedores de 60w) e 180w (um aquecedor de 80w e outro de 100w). Cada teste foi realizado em triplicata (ensaio I, II e III).

Os ensaios foram realizados do seguinte modo: potes de plástico com o volume total de 4L foram repletos com cerca de 3,3L de água. Os sensores de três termômetros digitais foram ajustados, fixados e posicionados em diferentes profundidades da unidade experimental – topo, meio e fundo do pote. Em cada ensaio, os aquecedores foram colocados na posição oposta aos sensores dos termômetros. Um aerador foi posicionado no fundo do pote, entre os sensores e os aquecedores, para homogeneização do calor na água. A temperatura apresentada em cada termômetro era anotada a cada minuto, a fim de obter-se a taxa de aquecimento média por minuto. O ensaio tinha início com a água a 20ºC e era finalizado ao atingir 40ºC.

3.1.2 Confiabilidade e reprodutibilidade

O teste de confiabilidade baseou-se na avaliação da presença de estratificação térmica dentro da unidade experimental em cada ensaio, e foi realizada concomitantemente com a obtenção das taxas de aquecimento (item 3.1.1). Para esta análise, foram comparadas as taxas de aquecimento dos três termômetros ajustados, fixados e dispostos nas profundidades diferentes – topo, meio e fundo do pote. O aerador, além de fornecer oxigênio à água, foi utilizado para auxiliar na circulação e, assim, minimizar as chances de estratificação térmica. A reprodutibilidade consistiu na comparação da consistência das taxas médias de aquecimento por ensaio, dentro de cada potência. Ou seja, neste teste era considerada apenas uma taxa média geral de aquecimento (soma das taxas de aquecimento dos três termômetros). Isto é, o teste de confiabilidade se deu pela comparação das três taxas médias de aquecimento obtidas por cada um dos três termômetros dentro de cada unidade experimental isolada, já o teste de reprodutibilidade se deu pela comparação da média geral da taxa de aquecimento entre os diferentes ensaios, para cada uma das potências de aquecimento utilizadas.

3.2 Efeito do Roundup na tolerância térmica

3.2.1 Animais experimentais: coleta e aclimatação em laboratório

Os indivíduos de *P. caudimaculatus* utilizados no experimento são provenientes de uma área úmida da várzea do canal São Gonçalo (31°46'04.8"S 52°18'43.3"W) no município de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

A coleta foi feita por rede de arrasto e puçá (60x60cm - 5mm entre nós). Os animais coletados eram acondicionados em um balde para transferência até o Laboratório de Fisiologia Aplicada a Aquicultura da Universidade Federal de Pelotas. Os indivíduos foram mantidos no balde de transferência com aeração até que a temperatura da água alcançasse a mesma registrada no aquário, com o intuito de evitar choque térmico prévio. A aclimatação foi de aproximadamente uma semana.

Os indivíduos permaneceram em aquário com 26L, fotoperíodo 14L:10E e à temperatura ambiente (laboratorial). Variáveis como o pH e amônia foram mensuradas diariamente. A qualidade da água foi mantida através de renovações semanais de 50% do meio. Os indivíduos foram alimentados diariamente com ração comercial para peixes (Ovo.vit® Tropical) e/ou zooplâncton nativo.

3.2.2 Exposições

Foram utilizados três grupos, sendo que dois deles foram expostos ao Roundup Transorb®. As exposições ao herbicida foram feitas a duas concentrações nominais: 1mg/L e 5mg/L (em referência ao equivalente ácido de glifosato na formulação Roundup Transorb®). O terceiro grupo foi o controle, que não passou por exposição. Para o experimento foram utilizadas somente fêmeas de *P. caudimaculatus*, prenhas ou não, que foram divididas entre os três grupos. Cada grupo recebeu um n=12 fêmeas, com exceção do grupo de 5mg/L, que recebeu n=6, contabilizando 30 fêmeas no total.

Os indivíduos foram expostos em unidades experimentais com volume de 6L preenchidos com 4,5L de água (contaminada com o herbicida ou não) com presença de aeração. Cada pote recebeu um indivíduo. A exposição durou 96h e, logo após, foi realizada a obtenção da CTMax de cada fêmea. Variáveis como a temperatura, amônia e pH da água de cada unidade experimental foram mensurados diariamente durante o experimento. Não ouve renovação do meio, nem as fêmeas foram alimentadas durante o experimento. Ainda, a mortalidade também foi avaliada durante o período de exposição.

3.2.3 Obtenção da CTMax

A obtenção da CTMax se deu de forma semelhante ao método utilizado nos ensaios descrito no item 3.1.1, com alteração no volume total da unidade experimental, na quantidade de água contida nela e no número de sensores por fins de praticidade de exposição dos animais. A potência utilizada nestes ensaios foi escolhida a partir dos resultados do teste realizado também no item 3.1.1. Os experimentos foram replicados no tempo, ou seja, todo o desenho experimental foi refeito três vezes em dias distintos, espaçados em geral por uma semana. Para os

dois primeiros experimentos, cada grupo foi feito em triplicada (n=3 peixes, n total=9), já o último experimento foi feito apenas com dois grupos (controle e 1mg/L) e foi realizado com seis réplicas (n=6 peixes, n total=12).

Passadas 96h de exposição, aquecedores foram posicionados dentro de cada unidade experimental, juntamente com o sensor de um termômetro digital, previamente ajustado. A temperatura apresentada pelo termômetro era anotada a cada 1min, até que fosse obtida a CTMax, individualmente. Os indivíduos foram observados até apresentarem o *endpoint* determinado. O *endpoint* utilizado foi a perda total do equilíbrio. Ao sinal do observador – o mesmo durante todos os experimentos realizados – a temperatura que estava marcada no termômetro era anotada e determinada como a CTMax. Imediatamente após apresentar a desordem física, o animal era colocado individualmente em um pote contendo água a temperatura ambiente para a sua recuperação. Após apresentada uma melhora no estado de cada indivíduo, foi realizada biometria, onde foram mensurados o comprimento total (cm) e o peso (g). A CTMax de cada indivíduo só foi validada após 72h de recuperação, sem distúrbios aparentes nem mortalidade.

No caso de fêmeas que foram expostas grávidas e pariram durante a exposição, foi realizada a retirada dos juvenis da unidade experimental, e seguiu-se o ensaio. Após o intervalo de 72h, os indivíduos utilizados em cada experimento eram eutanasiados, ou seja, os animais não foram utilizados mais de uma vez.

3.3 Análise estatística

Todos os resultados serão expressos como média±desvio padrão. As comparações entre três ou mais médias foram feitas com ANOVA de uma via, já as comparações feitas com duas médias foram feitas com Teste T. Por serem análises lineares, exigem que certos pressupostos sejam atendidos, são eles: distribuição normal dos resíduos, homogeneidade das variâncias e independência das observações. Tais pressupostos foram avaliados com os seguintes testes, respectivamente: Kolmogorov-Smirnov, Cochran e Durbin-Watson. Para os testes de ANOVA, quando necessário, foram feitos testes *post-hoc* de Tukey. Os dados que não atendiam aos pressupostos apresentados eram submetidos a transformação matemática por extração de seu logaritmo neperiano ou arcoseno de sua raiz quadrada. Quando, mesmo a partir de transformação matemática, os dados não

atendiam ao pressuposto de homogeneidade da variância, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Em todos os casos, as diferenças entre níveis foram consideradas significativas quando $p<0,05$.

4 Resultados

4.1 Avaliação metodológica

4.1.1 Taxas de aquecimento

O primeiro dos objetivos era a obtenção de distintas taxas de aquecimento, a partir de aquecedores com diferentes potências. Com base nos ensaios realizados, foram obtidas três taxas médias de aquecimento: 0,30±0,08, 0,50±0,09 e 0,74±0,16ºC/min para o ensaio com potência total de 80, 120 e 180w, respectivamente (Figura 1).

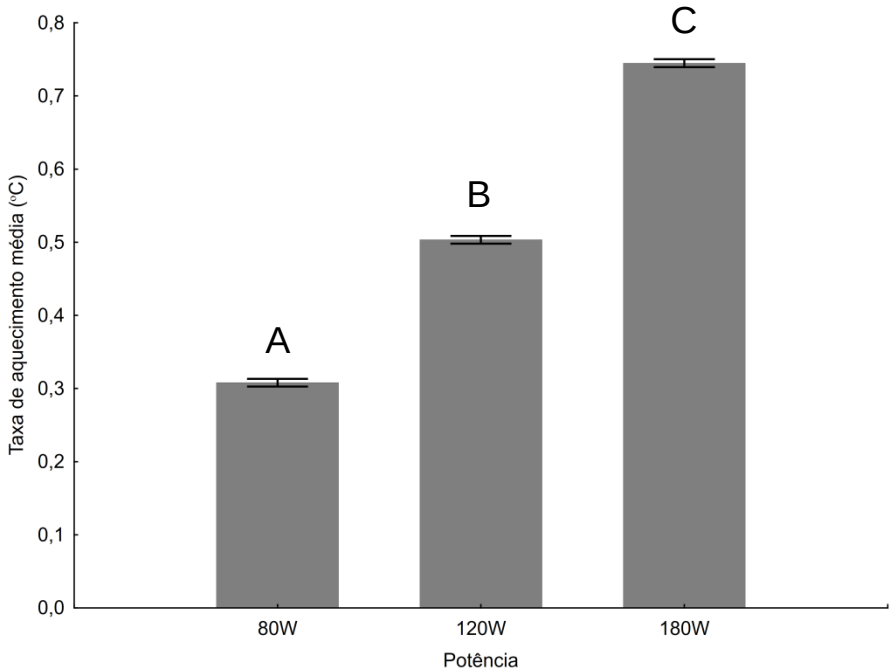

Figura 1 - Taxas de aquecimento com aquecedores de diferentes potências. Média ± erro padrão. Letras distintas demonstram diferença significativa entre as médias (ANOVA, Tukey; α = 5%;n=3).

4.1.2 Confiabilidade e reprodutibilidade

Os testes de confiabilidade e reprodutibilidade foram analisados com os mesmos dados adquiridos no teste anterior. Os dados referentes à análise de confiabilidade são apresentados na tabela 1. Não foram observadas diferenças significativas nas temperaturas entre os termômetros.

Tabela 1 - Análise de confiabilidade em testes de estratificação térmica de unidades experimentais. Os dados são apresentados em forma de média±desvio padrão. Não foram observadas diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis; α = 5%).

Potência (w)	Ensaio	Termômetro	Taxa média de aquecimento (ºC/min)
80	Ensaio I	Topo	0,30±0,08
		Meio	0,31±0,09
		Fundo	0,30±0,08
	Ensaio II	Topo	0,30±0,08
		Meio	0,31±0,09
		Fundo	0,30±0,08
	Ensaio III	Topo	0,28±0,06
		Meio	0,28±0,07
		Fundo	0,28±0,06
120	Ensaio I	Topo	0,49±0,10
		Meio	0,50±0,11
		Fundo	0,50±0,10
	Ensaio II	Topo	0,49±0,09
		Meio	0,49±0,05
		Fundo	0,49±0,06
	Ensaio III	Topo	0,48±0,05
		Meio	0,50±0,11
		Fundo	0,48±0,08
180	Ensaio I	Topo	0,72±0,16
		Meio	0,73±0,16
		Fundo	0,74±0,14
	Ensaio II	Topo	0,75±0,16
		Meio	0,74±0,20
		Fundo	0,76±0,14
	Ensaio III	Topo	0,71±0,21
		Meio	0,75±0,21
		Fundo	0,74±0,14

O teste de reprodutibilidade foi feito pela comparação das taxas médias de aquecimento dos ensaios. Na tabela 2, são apresentados os dados referentes a esta análise. A consistência das taxas médias de aquecimento entre cada ensaio não apresentou diferença significativa para nenhuma potência testada.

Tabela 2 – Análise do teste de reprodutibilidade entre as unidades experimentais. Os dados são apresentados em forma de média±desvio padrão. Não foram observadas diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis; α = 5%).

Potência (w)	Ensaio	Taxa média de aquecimento (ºC/min)
80	Ensaio I	0,30±0,09
	Ensaio II	0,30±0,09
	Ensaio III	0,28±0,06
120	Ensaio I	0,49±0,10
	Ensaio II	0,50±0,09
	Ensaio III	0,50±0,11
180	Ensaio I	0,73±0,15
	Ensaio II	0,75±0,17
	Ensaio III	0,73±0,19

4.2 Efeito do Roundup na tolerância térmica

4.2.1 Parâmetros físico-químicos da água

A Tabela 3 apresenta os parâmetros de qualidade da água, em forma de média e desvio padrão, não tendo sido observada diferença estatística entre os grupos de teste (Teste t; α = 5%).

Tabela 3 - Parâmetros físico-químicas da água durante a exposição de *Phalloceros caudimaculatus* ao Roundup Transorb® por 96h. Os dados são apresentados em forma de média ± desvio padrão.

Grupo	Temperatura (ºC)	Amônia (ppm)	pH
Controle	19,5±1,7	0±0	7,5±0,0
1mg/L	19,5±1,7	0±0	7,5±0,0
5mg/L	19,5±1,4	0±0	7,5±0,0

4.2.2 Exposições

Durante o período de exposição também foi avaliada a mortalidade dos animais. O grupo controle e o de 1mg/L não apresentaram mortalidade ao decorrer da exposição. Já os animais expostos ao tratamento de 5mg/L, nos dois primeiros ensaios, apresentaram mortalidade de 50% (Tabela 4). Frente a alta mortalidade observada, foi decido eliminar este grupo do ensaio subsequente. Motivo este também pelo qual as taxas de aquecimento e a CTMax desses indivíduos não foram consideradas nas análises.

4.2.3 Obtenção da CTMax

Após o desenvolvimento e padronização da metodologia proposta, o próximo passo do estudo foi testar o efeito do Roundup na tolerância térmica de *P. caudimaculatus*.

A potência total de aquecimento escolhida para a realização destes ensaios foi de 180w, visto que apresentou taxas de aquecimento que proporcionaram a menor duração dos experimentos, isso envolve menor estresse dos animais devido menor manipulação e permite a realização de mais avaliações de CTMax por dia. Como foi apresentado no item 3.2.3, houveram pequenas modificações nos materiais utilizados em relação aos ensaios feitos para a padronização do método. Desta forma, as taxas médias de aquecimento as quais os animais foram expostos foram de 0,51±0,14ºC/min para o grupo controle e 0,51±0,22ºC/min para o grupo de exposição (Tabela 4). As taxas de aquecimento foram comparadas dentro (Tabela 5) e entre (Tabela 4) cada um dos grupos e não apresentaram diferença significativa (ANOVA e Teste t, respectivamente).

Tabela 4 - Taxa média de aquecimento, CTMax e mortalidade de fêmeas *Phalloceros caudimaculatus* expostas ao Roundup Transorb® por 96h. Os dados são apresentados em forma de média ± desvio padrão (Teste t; α = 5%;n=12 ou 11). Os dados do grupo de 5mg/L não foram consideradas nas análises.

Grupo	Taxa média de aquecimento (ºC/min)	CTMax (ºC)	Mortalidade em 96h (%)
Controle	0,51±0,14	36,43±1,26	0
1mg/L	0,51±0,22	37,26±1,45	0
5mg/L	-	-	50

Tabela 5 - Biometria, taxas de aquecimento média e CTMax de fêmeas de *Phalloceros caudimaculatus* expostas ao Roundup Transorb® por 96h. Comparações foram feitas entre os ensaios do mesmo grupo (ANOVA de uma via; α = 5%). Os dados referentes ao grupo de 5mg/L não foram considerados na análise.

Grupo	Ensaio	Peso (g)	Comprimento (cm)	Taxa de aquecimento±DP (ºC/min)	CTMax (ºC)
Controle	Ensaio I	0,47	3,4	0,53±0,12	35,5
		0,62	3,8	0,53±0,13	36,0
		0,21	2,9	0,54±0,11	35,1
	Ensaio II	0,64	4,0	0,53±0,11	35,2
		0,23	3,0	0,49±0,17	37,7
		0,33	3,5	0,51±0,14	36,5
	Ensaio III	0,34	3,3	0,50±0,12	35,4
		0,19	2,9	0,50±0,18	39,2
		0,13	2,5	0,52±0,13	37,1

		0,17	2,5	0,52±0,10	37,8
		0,39	3,2	0,51±0,13	35,7
		0,51	3,3	0,51±0,15	36,0
1mg/L	Ensaio I	0,39	3,6	0,51±0,28	40,2
		0,48	2,9	0,52±0,17	38,5
		0,55	3,3	0,51±0,14	36,1
	Ensaio II	0,36	3,0	0,50±0,15	38,4
		0,19	2,7	0,52±0,21	37,2
		0,33	3,5	0,47±0,22	35,5
	Ensaio III	0,27	3,2	0,49±0,15	36,6
		0,38	3,4	0,53±0,11	37,7
		0,29	3,3	0,52±0,11	36,8
		0,12	2,5	0,50±0,50	37,7
		0,41	3,8	0,52±0,12	35,2
5mg/L	Ensaio I	0,40	3,7	-	-
		0,43	3,0	-	-
	Ensaio II	0,36	3,1	-	-

A exposição ao Roundup demonstrou uma tendência de aumento da CTMax dos animais, porém a diferença observada não foi probabilisticamente significativa (Figura 2). Com exceção de um animal no grupo de 1mg/L, todos os outros sobreviveram ao intervalo de 72h após o processo de obtenção da CTMax.

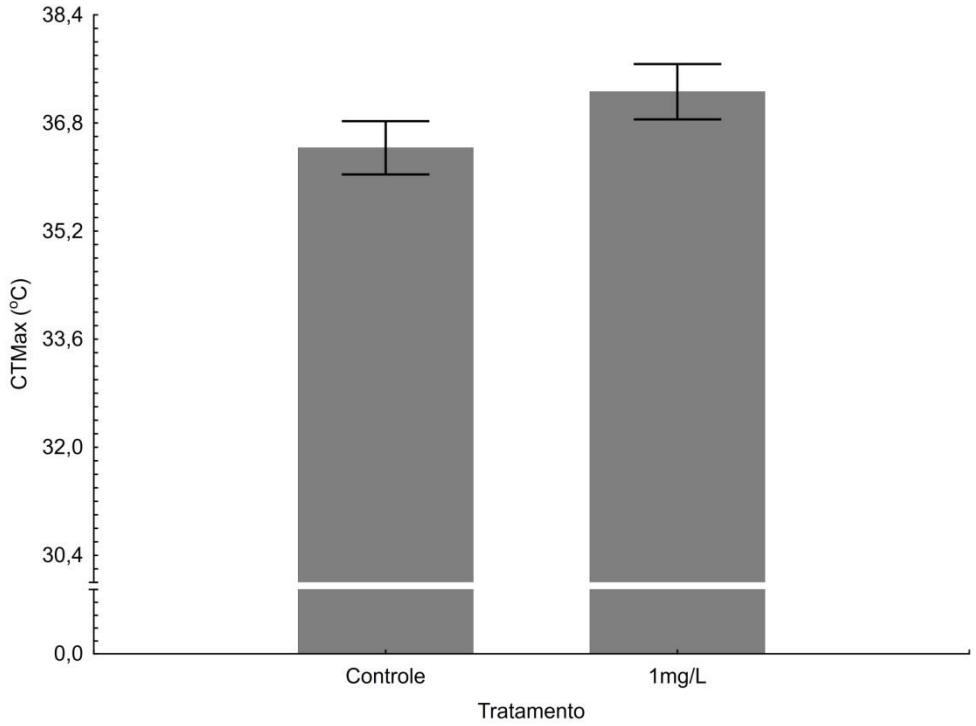

Figura 2 – Temperatura crítica máxima de fêmeas de *Phalloceros caudimaculatus* expostas por 96h ao Roundup Transorb® (Teste t; α = 5%;, n=12 ou 11).

4.2.4 Biometria

Após obtenção da CTMax, os indivíduos foram pesados e medidos (Tabela 5). Foram feitas análises comparando parâmetros dentro (Tabela 5) e entre (Tabela 6) cada um dos ensaios. Nenhuma das comparações evidenciou diferença estatística.

Tabela 6 - Biometria de fêmeas de *Phalloceros caudimaculatus* expostas ao Roundup Transorb® por 96h. Os dados são apresentados em forma de média±desvio padrão. Teste t; α = 5%; n=12 ou 11. Os dados do grupo de 5mg/L não foram considerados na análise.

Tratamento	Peso (g)	Comprimento (cm)
Controle	0,35±0,17	3,21±0,47
1mg/L	0,34±0,12	3,20±0,39
5mg/L	0,39±0,03	3,26±0,37

5 Discussão

5.1 Avaliação metodológica

Conforme Lutterschmidt (1997) demonstrou em sua revisão, existe uma grande variedade de métodos para se obter a CTMax, e Ribeiro (2012) salienta a importância da validação metodológica para a interpretação dos resultados finais.

Com base nas padronizações metodológicas realizadas neste trabalho, são abertas diversas possibilidades de estudos com organismos aquáticos utilizando esta ferramenta, como avaliar a influência de diferentes taxas de aquecimento, a atuação do fotoperíodo, do tempo de aclimatação, a realização da padronização de diferentes *endpoints* como indicado por Lutterschmidt (1997), além da ação de poluentes sobre a CTMax. Além disso, será possível a comparação da CTMax entre espécies.

Sendo assim, a alteração na tolerância térmica provocada por fatores endógenos e exógenos podem ser averiguadas com maior clareza.

5.1.1 Taxas de aquecimento

A taxa de aquecimento é uma variável importante para a obtenção da CTMax (LUTTERSCHMIDT, 1997; RIBEIRO, 2012). Na literatura existem duas indicações acerca das taxas de aquecimento a serem usadas para se avaliar a CTMax em peixes, a utilização de taxas mais baixas e a utilização de taxas mais altas. Becker e Genoway (1979) indicam uma taxa de 0,3ºC/min enquanto Lutterschmidt (1997) indica um aquecimento de 1ºC/min. Os autores que indicam taxas de aquecimento

mais baixas (JOHNSNO, 1976; BECKER, 1980; BEITINGER et al, 2000; PATRA, 2007; PECK et al, 2009; RIBEIRO, 2012; ZHANG;KIEFFER, 2014), possuem o objetivo de expor os animais a um estresse térmico semelhante ao observado no meio ambiente, resultando em experimentos ecologicamente relevantes. Já os autores que indicam taxas de aquecimento mais elevadas (LUTTERSCHMIDT, 1997; RIBEIRO, 2012) argumentam que taxas mais baixas estão relacionadas a experimentos de maior duração e, portanto, há uma diminuição na saúde dos animais devido a alta manipulação experimental, gerando maior estresse. Sendo assim, a decisão por utilizar uma taxa de aquecimento mais alta resultará em menos estresse para o animal. Este fato possui relevância para trabalhos que buscam entender o efeito isolado de poluentes sobre a tolerância térmica, visto que proporciona uma diminuição no efeito combinado com o estresse da manipulação experimental.

Sendo assim, as duas indicações de taxas de aquecimento que são citadas na literatura foram obtidas e padronizadas neste trabalho (0,3 0,5 e 0,7ºC/min), possibilitando estudos que envolvem os dois conceitos de experimentação, o de ponto de vista ecológico e o que visa menor estresse ao organismo. Além do mais, será possível a avaliação de diferentes taxas de aquecimento sobre a CTMax.

5.1.2 Confiabilidade

Os peixes são animais ectotérmicos e, portanto, não possuem a capacidade de manter temperaturas corporais diferentes daquela presente no ambiente (com raras exceções). Apesar disso, podem escolher microhabitats em condições térmicas mais agradáveis, processo chamado de termorregulação comportamental (PRODASBSKY, 2013). Sendo assim, quando peixes são expostos a um gradiente de temperatura, possuem a capacidade de localizar regiões mais termicamente favoráveis e nelas ficar (MAGNUSON et al,1979). Então, havendo estratificação térmica dentro da unidade experimental, a interpretação dos dados finais pode ser equivocada. Com isso, a homogeneidade na taxa de aquecimento da água se faz importante em métodos para obtenção da tolerância termal de organismos aquáticos para se ter dados confiáveis (RIBEIRO, 2012).

Vários trabalhos que procuram o limite térmico de animais não especificam se houve algum tipo de averiguação acerca da estratificação térmica na unidade

experimental (PALADINO, 1978; BECKER, 1979; TAKLE, 1983; CARVETCH et al., 2006; MARTINES-PORCHAS;HERNANDEZ-RODRIGUEZ, 2010; ZHANG E KIEFFER, 2014). Watenpaugh (1985) utilizou a CTMax para avaliar a influência do nitrito na tolerância térmica de peixes, na parte metodológica, apesar de ter utilizado bombas de ar na sua unidade experimental para a circulação da água, não realizou teste para comprovar que houve homogeneidade da temperatura da água na unidade experimental. Johnson (1976), apesar de ter disposto sensores de temperatura em diferentes profundidades, não apresentou este resultado no trabalho.

A negligência na homogeneidade da temperatura na unidade experimental é evidente entre os autores, havendo uma despreocupação pelos mesmos de demonstrar isto em seus trabalhos, mesmo já sendo levantado ser importante (RIBEIRO, 2012). A partir da ausência de estratificação térmica (Tabela 1), pode se ter a confiança de que o organismo está sendo exposto as taxas de aquecimento esperadas, sendo assim, mais um fator de segurança para compreensão dos dados finais.

5.1.3 Reprodutibilidade

Uma das atuais preocupações da ciência está relacionada à transparência experimental, no que diz respeito à reprodutibilidade de experimentos e o entendimento que se tem por reprodutível (DRUMMOND, 2009; CASAVEDALL, 2010). De acordo com CASAVEDALL (2010) a diferença entre reprodutibilidade e replicabilidade depende se as condições experimentais estão sujeitas a variações. Drummnd (2009) diz que enquanto a reprodutibilidade requer alterações experimentais, a replicabilidade as evita. Assim, considerando como resultado esperado do experimento a consistência das taxas médias de aquecimento, pode-se afirmar que o presente trabalho apresentou tanto a replicabilidade quanto a reprodutibilidade dos resultados.

Ao se ter obtido uma taxa de aquecimento, por exemplo, 0,3ºC/min, o resultado da consistência da média das taxas de aquecimento foi comprovado através da replicabilidade, onde cada ensaio foi realizado exatamente da mesma forma (mesmo pote, volume de água, aquecedor utilizado). Também pode-se dizer que o experimento das taxas de aquecimento foi reproduzível para a obtenção da

CTMax após exposição ao Roundup. Isto é, a taxa média de aquecimento de 0,5ºC/min foi inicialmente obtida a partir de um pote com volume total de 4L, com cerca de 3,3L no volume de água com a potência total de 120w. Já para a obtenção da CTMax, a taxa média de aquecimento de 0,5ºC foi reproduzida utilizando potes de plástico com o volume total de 6L contendo 4,5L de água com potência total de 180w. Logo, o experimento foi reprodutível.

5.2 Efeito do Roundup na CTMax

Depois da comparação da CTMax das fêmeas de *P. caudimaculatus* expostas por 96h ao herbicida Roundup Transorb®, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as CTMax médias do grupo controle (36,43±1,26ºC) e do grupo de exposição a 1mg/L (37,26±1,45ºC). Apesar de não ter sido evidenciada diferença estatística, é notada uma tendência de aumento na CTMax das fêmeas expostas ao Roundup de 0,8ºC em média. O erro padrão elevado pode estar associado ao tamanho amostral, o que estaria mascarando a evidência das diferenças significativas entre as CTMax dos grupos.

A tendência de aumento observada na CTMax pode estar relacionada às respostas celulares desencadeadas pela exposição, visto que são muito semelhantes àquelas causadas pelo estresse térmico. Ambas estão estritamente relacionadas ao processo de estresse oxidativo.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) se formam a partir da oxidação ou redução de moléculas de O_2, resultadas do metabolismo do oxigênio (FERREIRA, 1997). Normalmente, é na mitocôndria que se encontram a maior formação de EROs (BARBOSA, 2010). Encontradas nos diversos sistemas biológicos, as EROs podem acarretar danos ao DNA, lipídios, proteínas e carboidratos, afetando o funcionamento celular (RIBEIRO, 2005).

Um dos fatores exógenos que podem desencadear a elevada produção de EROs é o aumento da temperatura (APEL, 2004). Dentre as respostas celulares de peixes frente a fatores de estresse térmico, podem ser citados dois: aumento na produção de antioxidantes e de *heat-shock-proteins*. Os antioxidantes, que podem ser tanto de origem enzimática como não enzimática, combatem a elevada quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) gerados pelo estresse térmico (MARTINEZ-ALVAREZ, 2005). As *heat-shock-proteins*, como a HSP70, têm sua

síntese aumentada e atuam reparando os danos acarretados pelas EROs a nível celular (MISRA, 1989).

Já foi demonstrado que exposições ao Roundup podem causar estresse oxidativo em peixes (MENEZES, 2011). Sinhorin (2014) observou que depois da exposição de Roundup, o peixe surubim apresentou um aumento na concentração de ácido ascórbico, um antioxidante não enzimático. Após expor tambaqui ao herbicida, Braz-Mota (2015), observou a estimulação de antioxidantes nos peixes expostos à 15mg/L. Rocha (2015) encontrou uma ativação na resposta de estresse, no aumento da expressão da HSP40, que funciona na regulação da HSP70, nas brânquias de fêmeas de *Poecilia reticulata* expostos ao Roundup (1,8mg/L). Madeira (2012) comprovou a partir da utilização da CTMax, que a elevação de temperatura aumenta a produção de HSP70 em duas espécies de peixes.

O aumento observado na CTMax pode estar relacionado com estas duas respostas. A exposição ao Roundup pode ter gerado uma resposta celular antioxidante e de HSP70 nas fêmeas de *P. caudimaculatus*. Esta resposta celular pode estar beneficiando a resposta ao estresse térmico, desencadeando no aumento da CTMax.

Rocha (2011) determinou a $LC_{50\ 96h}$ para espécie *Poecilia reticulata*, mesma família de *P. caudimaculatus*, como sendo 3,4mg/L de Roundup, encontrando uma mortalidade de quase 80% à concentrações de 5,2mg/L. Assim sendo, a alta mortalidade no grupo de 5mg/L pode ser devido a alta concentração utilizada, devendo-se, futuramente, analisar a $LC_{50\ 96h}$ de *P. caudimaculatus* quando exposto ao Roundup.

Apesar de ser tentador dizer que o Roundup teve efeito positivo na tolerância térmica das fêmeas de *P. caudimaculatus*, é necessária uma averiguação mais profunda. Visto isso, é necessário comprovar a tendência no aumento da CTMax com o aumento do tamanho amostral. Confirmada a diferença estatística, é preciso testar se o aumento da CTMax, de fato, é devido ao processo hipotetizado.

6 Conclusão

O trabalho realizado conseguiu atingir o objetivo de desenvolver um método padronizado, confiável e reprodutível, o que possibilitou a realização do experimento com o herbicida Roundup Transorb® na tolerância termal de fêmeas de *Phalloceros caudimaculatus*.

A exposição ao Roundup demonstrou uma tendência ao aumento da CTMax. Experimentos futuros com maior esforço amostral devem ser realizados para se ter a confirmação desta tendência.

Referências

AMARANTE JUNIOR, O. P. et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química nova**, v.25, n.4, p.589-593, 2002.

ANNETT, R.; HABIBI, H. R.; HONTELA, A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, p.458-479, 2014.

APEL, K.; HIRT, Heribert. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**. v.55, p.373-399, 2004.

ARAUJO, F.G.; PEIXOTO, M.G.; PINTO, B.C.T. and TEIXEIRA, T.P. Distribution of guppies *Poecilia reticulata* (Peters, 1860) and *Phalloceros caudimaculatus* (Hensel, 1868) along a polluted stretch of the Paraíba do Sul River, Brazil. **Brazilian Journal of Biology,** v. 69, n. 1, 41-48, 2009

BARBOSA, K.B.F; COSTA, N.M.B; ALFENAS, R.C.G. et al. Estresse oxidative: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, n.4. p.629-643, 2010.

BEASLEY, A.; ELROD-ERICKSON, M.; OTTER, R. R. Consistency of morphologycal endpoints used to asses developmental timing in zebrafish (*Danio rerio*) across a temperature gradiente. **Reproductive Toxicology**, v.34, p.561-567, 2012.

BECKER, C. D.; GENOWAY, R. G. Evaluation of the critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish. **Environmental Biology of Fishes**, v.4, n.3, p.245-256, 1979.

BECKER, C.D.; WALFORD, M.G. Thermal resistance of juvenile salmonids sublethally exposed to nickel, determined by the critical thermal maximum method. **Environmental Pollution**, v.21, p.181-189, 1980.

BEITINGER, T.L.; BENNET, W.A.; MCCAULEY, R.W. Temperature tolerances of north American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. **Environmental Biology of Fishes**, v.58, p.237-275, 2000.

BISAZZA, A.; PILASTRO, A. Small male mating advantage and reversed size dimorphism in poeciliid fishes. **Journal of Fish Biology**. v.50, p.397-406, 1997.

BOWDEN, A. J. Et al. Alterations in gill structure in tropical reef fishes as a result of elevated temperatures. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v.175, p. 64-71, 2014.

BRAZ-MOTA, S.; SADAUSKA-HENRIQUE, H.; DUARTE, R.M. 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, 2015.

CASAVEDALL, A.; FANG, F.C. Reproducible science. **Infection and Immunity**, v.78, n.12, p.4972-4975, 2010.

CASTILLO, K.D.; RIES, J.B. et al. The reef-building coral *Siderastrea sidereal* exhibits parabolic reponses to ocean acidification and warming. **Proceedings of the Royal Society**, v. 281, 2014.

CASTRO, A.C.; CASSATI, L. The fish fauna from a small Forest stream of the upper paraná river basin, southeastern Brazil. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v.7, n.4, p.337-352, 1997.

CAVALCANTE, D.G.S.M., MARTINEZ, C.B.R., SOFIA,S.H. Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 655, p. 41-46, 2008.

CHOUDRI, B. S.; BAAWAIN, M. Thermal Effects. **Water Environment Research**, v.85, n.10, p.1934-1953, 2013.

CHOWN, S.L.; JUMBAM, K.R.; SORENSE, J.G.; TERBLANCHE, J.S. Phenotypic variance, plasticity and heritability estimates of critical thermal limits depend on methodological context. **Functional Ecology**, v.23, p.133–140, 2009.

CORTEMEGLIA, C.; BEITINGER, T. L. Temperature tolerances of wild-type and red transgenic zebra danios. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.136, n.6, p.1431-1437, 2011.

COSTA, M.J.; MONTEIRO, D.A.; OLIVEIRA-NETO, A.L. et al. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. **Ecotoxicology**, v.17, p.153-163, 2008.

COWLES, R.B.; BOGERT, C.M. A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v.83, p.261-296, 1944.

COX, Caroline. Glyphosate (Round up). **Journal of Pesticides Reform**, v.18, n.3, p.1-14, 1998.

DRUMMOND, Chris. Replicability is not reproducibility: nor is it good science. **Proc. Evaluation Methods for Machine. Learning Workshop at the 26th ICML**, 2009.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Revista da **Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997

FICKE, A. D.; MYRIC, C. A. Potencial impacts of global climate change on freshwater fisheries. **Fish Biology and Fisheries**, v.17, p.581-613, 2007.

GARCIA, A. F.; ROLLEMBERG, M. C. Determinação voltamétrica do herbicida glifosato em águas naturais utilizando eletrodo de cobre. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1592-1596, 2007.

GOMIERO, L.M.; BRAGA, F.M.S. Cannibalism as a main feeding behavior of tucunares introduced in southeast of Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.64, n.4, p.787-795, 2004.

HELANDER, M.; SALONIEMI, I.; SAIKKONEN, K. Glyphosate in northern ecosystems. **Trends in plant science**, v. 17, n. 10, p. 569–574, 2012.

HILLMAN, P. E. Habitat specificity in three sympatric species of Ameiva (Reptilia: Teiidae). **Ecology**, v.50 p.476-481, 1969.

IPCC (Intergovernamental Panel on Climate Change), 2007. **Climate change 2007: synthesis report**. Contribution of working groups I, II and III to the fourth assessment report of the intergovernamental panel on climate change. IPCC, Geneva, Suíça.

JOHNSON, Clifford Ray. Herbicide toxicities in some Australian anurans and the effect of subacute dosages on temperature tolerance. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.59, p.73-83, 1976.

KIVIVUORI, L.; LAGERSPETZ, K.Y.H. Thermal-resistance and behavior of the isopod saduria-entomon (l). **Annales Zoologici Fennici**, v.27, p.287–290, 1990.

KREUTZ, L. C.; BARCELOS, L. J. G.; MARTENINGHE, A.; SANTOS, E. D.; ZANATTA, R. Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazi-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, n. 4, p. 694-697, 2010.

KUMLU, M.; TURKMEN, S. Thermal tolerance of litopenaeus vannamei (crustacea: Penaeidae) acclimated to four temperatures. **Journal of Thermal Biology**, v.35, p.305–308, 2010.

LEAL, M.; GUNDERSON, A;R; Rapid change in the thermal tolerance of a tropical lizard. **American Naturalist**, v.180, p.815-822, 2012.

LIGHTON, J.R.B.; TURNER, R.J. Thermolimit respirometry: an objective assessment of critical thermal maxima in two sympatric desert harvester ants, *Pogonomyrmex rugosus* and *P. Californicus*. **The Journal of Experimental Biology**, v.207 p.1903–1913, 2004.

LIOI, M.B.; SCARFI, M.R.; SANTORO, A. et al. Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures in vitro. **Mutation Research**, v.403, p.13-20, 1998.

LUCINDA, Paulo Henrique Franco. Systematics and biogeography of the genus *Phalloceros* Eignmann, 1907 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae), with the description of twenty-one new species. **Neotropical Ichthyology**,v.6, n.2, 2008.

LUSHCHAK, O.V.; KUBRAK, O.I.; STOREY, J.M. et al. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissue. **Chemosphere**, v.79, p.932-937, 2009.

LUTTERSCHIMIDT, W.I.; HUTCHINSON, V.H. The critical thermal maximum: data to support the onset of spasms as the definitive end point. **Canadian Journal of Zoology**, v.75, p.1553–1560, 1997.

LYDY, M. J.; WISSING, T. E. Effect of sublethal concentrations of copper on the critical thermal maxima (ctmax) of the fantail (*Etheostoma flabellare*) and johnny (*E. Nigrum*) darters. **Aquatic Toxicology**, v.12, p.311-322, 1987.

MADEIRA, D.; NARCISO, L.; CABRAL, H.N. et al. HSP70 production patterns in coastal and estaurine organisms facing increasing temperature. **Journal of Sea Research**, v.73, p.137-147, 2012.

MAGNUSON, J.J.; CROWDER, L.B.; MEDVICK, P.A. Temperature as an ecological resource. **American Zoologist**, v.19, p.331-343, 1979.

MANCIOCCO, A.; CALAMANDREI, G.; ALLEVA, E. Global warming and environmental contaminants in aquatic organisms: the need of the etho-toxicology approach. **Chemosphere**, v.100, p.1-7, 2014.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.M.; MORALES, A.E.; SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.15, p.75-88, 2005.

MARTINEZ-PORCHAS, M; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ,M. Critical thermal maxima and minima of *Sardinops sagax caeruleus* Girard 1854 and the analyses of behavioral responses to establish adequate endpoints. **Tropical Zoology**, v.23, p.139-146, 2010.

MATTOS, M. L. T.; PERALBA, M. C. R.; DIAS, S. L. P.; PRATA, F.; CAMARGO, L. Monitoramento ambiental do glifosato e do seu metabólito ácido aminometilfosfônico na água de lavoura de arroz irrigado. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, n. 0, p. 145-154, 2002.

MENEZES, C.C.; FONSECA, M.B.; LORO, V.L. et al. Rounduo effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of Rhamdia quelen. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.60, p.665-671, 2011.

MIRANDA, L. A. Et al. Effects of global warming on fish reroductive endocrine axis, with special emphasis in pejerry *Odontesthes bonariensis*. **General and Comparative Endocrinology**, v.192, p.45-54, 2013.

MISRA, S.; ZAFARULLAH, M.; PRICE-HAUGHEY, J. et al. Analysis of stress-induced gene expression in fish cell lines exposed to heavy metals and heat shock. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1007, p.325-333, 1989.

MODESTO, K.A.; MARTINEZ, C.B.R. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v.78, p.294-299, 2010.

MORA, C.; MAYA, M. F. Effectt of the rate of temperature increase of the dynamic method on the heat tolerance of fishes. **Journal of Thermal Biology**, v.31, p.337-341, 2006.

NYAMUKONDIWA, C.; TERBLANCHE, J.S.; Within-generation variation of critical thermal limits in adult mediterranean and natal fruit flies ceratitis capitata and ceratitis rosa: Thermal history affects short-term responses to temperature. **Physiological Entomology**, v.35, p.255–264, 2010.

PAGANELLI A.; S. L.; CARRASCO, A. E. Glyphosate-Based Herbicides Produce Teratogenic Effects on Vertebrates by Impairing Retinoic Acid Signaling. **Chemical research in toxicology**, v. 23, n. 10, p. 1586–1595, 2010.

PALADINO, F.V.; SPOTILA, J.R. The effect of arsenic on the thermal tolerance of newly hatched muskellunge fry (*Esox masquinongy*).**Journal of Thermal Biology**, v.3, p.223-227, 1978.

PATRA, R.W.; CHAPMAN, J.C.; LIM, R.P. et al. The effects of three organic chemicals on the upper thermal tolerances of four freshwater fishes. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.26, n.7, p.1465-1459, 2007.

PECK, L.S.; MELODY, S.C.; MORLEY, S.A. et al. Animal temperature limits and ecological relevance: effects of size, activity and rates of change. **Functional Ecology**, v.23, p-248-256, 2009.

RECSETAR, M. S. et al. Relationship between fish size and upper thermal tolerance. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.141, n.6, p.1433-1438, 2012.
RELYEA, Rick A. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communites. **Ecological Applications**, v.15, n.2, p.618-627, 2005.
41

REZENDE, E.L.; TEJEDO, M.; SANTOS, M. Estimating the adaptive potential of critical thermal limits: Methodological problems and evolutionary implications. **Functional Ecolology,** v.25, n.1, p.111–121, 2011.

RIBEIRO, P.L.; CAMACHO, A.; NAVAS, C.A. Considerations for Assessing Maximum Critical Temperatures in Small Ectothermic Animals: Insights from Leaf-Cutting Ants. **PLoS ONE** 7(2), e32083, 2012.

RIBEIRO, S.M.R; QUEIROZ, J.H.; PELÚZO, M.C.G. et al. The formation and the effects of the reactive oxygen species in biological media. **Bioscience Journal**, v.21, n.3, p.133-149, 2005.

ROCHA, T.L.; SANTOS, A.P.R.; YAMADA, A.T. et al. Proteomic and histopathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.40, p.175-186, 2015.

ROMANO, R. M.; ROMANO, M. A.; OLIVEIRA, C.A.. Glifosato como desregulador endócrino químico. **Ambiência (UNICENTRO)**, v. 5, p. 359-372, 2009.

ROWLEY, J.J.L.; RAYNER, T.S.; PYKE, G.H. New records and invasive potential of the poeciliid fish *Phalloceros caudimaculatus*. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v.39, p.1013-1022, 2005.

SABINO, J.; CASTRO, R.M.C. Alimentação, período de atividade e distribuição espacial dos peixes de um riacho da floresta atlântica (sudeste do Brasil). **Revista Brasileira de Biologia,** v.50, n.1, p.23-36, 1990.

SALBEGO, J., PRETTO, A., GIODA, C. R., DE MENEZES, C. C., LAZZARI, R., RADÜNZ NETO, J., BALDISSEROTTO, B. Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava *(Leporinus obtusidens*). **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 58, n. 3, p. 740–745, 2010.

SCHIEDEK, D. Et al. Interactions between climate change and contaminants. **Marine Pollution Bulletin**, v.54, p.1845-1856, 2007.

SHEN, K.; SCHWARTZKROIN, P. A. Effects of temperature alterations on population and cellular activities in hippocampal slices from mature and immature rabbit. **B Research**, v.475, p.305-316, 1988.

42

SILVA, M. D.; PERALBA, M. C. R.; MATTOS, M. L. T. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do Arroio Passo do Pilão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.13, n. 6, p. 19-28, 2003.

SINHORIN, V.D.G.; SINHORIN, A.D.; TEIXEIRA, J.M.S.T. et al. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma sp*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.106, p.181-187, 2015.

TAKLE, J.C.C.; BEITINGER, T.L.; DICKSON, K.L. Effect of the aquatic herbicide endothal on the critical thermal maximum of red shiner, *Notropis lutrensis*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.31, p.512-517, 1983.

TERBLANCHE, J.S. et al. Ecologically relevant measures of tolerance to potentially lethal temperatures. **The Journal of Experimental Biology**, v.214, p.3713–3725, 2011.

WALSH, L. P.; MCCORMICK, C.; MARTIN C.; STOCCO D. M. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environmental health perspectives**, v. 108, n. 8, p. 769–776, 2000.

WATENPAUGH, D.E.; BEITINGER, T.L.; HUEY, D.W. Temperature tolerance of nitrite-exposed channel catfish. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.114, p.274-278, 1985.

WOLFF, L.Z.; HRECIUK, E.R.; VIANA, D. et al. Population structure of *Phalloceros caudimaculatus* (Hensel, 1868) (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) collected in a brook in Guarapauva, PR. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, n.3, p.417-423, 2007.

WOODBURN, Allan T. Glyphosate: production, pricing and use worldwide. **Pest Management Science**, v. 56, n. 4, p. 309–312, 2000.

ZEBRAL, Yuri Dornelles. **Ações do herbicida Roundup® sobre resistência térmica, reprodução, resposta de estresse e desenvolvimento embrionário de peixes nativos do Rio Grande do Sul, Brasil.** 2013. 83f. Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

ZHANG, Y.; KIEFFER, J.D. Critical thermal maximu (CT_{max}) and hematology of shortnose sturgeons (Acipenser brevirostrum) acclimated to three temperatures. **Canadian Journal of Zoology**, v.92, p.215-221, 2014.