



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA – REDE BIONORTE



**VIABILIDADE DO USO DE SÊMEN CRIOPRESERVADO DE
TAMBAQUI *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816)
(CHARACIFORMES: SERRASALMIDAE) EM ENSAIOS
ECOTOXICOLÓGICOS**

JADSON PINHEIRO SANTOS

São Luís – MA

2023

JADSON PINHEIRO SANTOS

**VIABILIDADE DO USO DE SÊMEN CRIOPRESERVADO DE
TAMBAQUI *Collossoma macropomum* (Cuvier, 1816)
(CHARACIFORMES: SERRASALMIDAE) EM ENSAIOS
ECOTOXICOLÓGICOS**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Estadual do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Raimunda Nonata Fortes
Carvalho Neta

São Luís – MA

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação da Publicação

Santos, Jadson Pinheiro.

Viabilidade do uso de sêmen criopreservado de Tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) (*Characiformes: Serrasalminidae*) em ensaios ecotoxicológicos./ Jadson Pinheiro Santos. – São Luís, 2023.
83f.

Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2023.

Orientadora: Profa. Dra. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta.

1. Agrotóxicos. 2. Biomonitoramento. 3. Ecotoxicologia. 4. Peixe amazônico. 5. Qualidade espermática. I. Título.

CDU: 613.281

Elaborado por Luciana de Araújo - CRB 13/445

JADSON PINHEIRO SANTOS

**VIABILIDADE DO USO DE SÊMEN CRIOPRESERVADO DE
TAMBAQUI *Collossoma macropomum* (Cuvier, 1816)
(CHARACIFORMES: SERRASALMIDAE) EM ENSAIOS
ECOTOXICOLÓGICOS**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de
Doutorado do Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE,
na Universidade Estadual do Maranhão, como
requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor
em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em 06/06/2023

Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
 RAIMUNDA NONATA FORTES CARVALHO N
Data: 04/08/2023 13:40:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta (Orientadora)
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

Documento assinado digitalmente
 LAERCIO DOS ANJOS BENJAMIN
Data: 09/08/2023 08:08:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Laércio dos Anjos Benjamim
Universidade Federal de Viçosa (UFV)

Documento assinado digitalmente
 ALANA LISLEA DE SOUSA
Data: 10/08/2023 18:23:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Alana Lislea de Sousa
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

Documento assinado digitalmente
 RICARDO LUVIZOTTO SANTOS
Data: 11/08/2023 08:14:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Ricardo Luvizotto Santos
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Documento assinado digitalmente
 LIGIA TCHAICKA
Data: 11/08/2023 10:28:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Lígia Tchaicka
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

**DEDICATÓRIA - “Dedico ao meu avô pescador
Manoel Pereira (*in memoriam*), aos meus pais e irmãos
pelo apoio e incentivo incondicionais.”**

AGRADECIMENTOS

Nosso querido e bom Deus estará sempre a frente de todas as nossas conquistas. Agradecerei sempre todo o amor que foi demonstrado por todos nós.

À professora e orientadora Dra. Raimunda Fortes, por ter aceitado me orientar e pelo desafio em desenvolver a pesquisa.

À professora e colega de trabalho Dra. Erivânia Gomes Teixeira, pelo apoio na realização dos experimentos.

À minha esposa Mirelly Brito Pinheiro, que tem me acompanhado e dado forças para continuar a luta no desenvolvimento dos meus trabalhos, com muito amor, carinho e paciência.

Aos senhores Dilson Noleto e Dilson Noleto Júnior, por disponibilizarem a estrutura da piscicultura AQUAPESC, que possibilitou a realização dos experimentos.

Aos colegas de turma, em especial a Cristian Lima, Erick Guimarães, Isa Rosete, Keyton Kylson e Luiz Jorge, pelos inúmeros debates e conversas que tanto incentivaram as publicações de trabalhos técnico-científicos ao longo do doutoramento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão pelos recursos disponibilizados no projeto aprovado no edital UNIVERSAL nº16/2019.

À Universidade Estadual do Maranhão pelo incentivo a partir do programa de qualificação docente, para que pudesse aprimorar ainda mais os conhecimentos com vistas a excelência na docência, e pela disponibilização de bolsas acadêmicas no Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Universidade Federal do Maranhão, vinculado à Rede BIONORTE, pela formação proporcionada ao longo do doutoramento.

**EPÍGRAFE - "E quando você pensar em desistir,
lembre-se dos motivos que te fizeram aguentar
até agora. - *Sharpie Thoughts*"**

SANTOS, Jadson Pinheiro. **Viabilidade do uso de sêmen criopreservado de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) (CHARACIFORMES: SERRASALMIDAE) em ensaios ecotoxicológicos**. 2023. 81 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia). Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023.

RESUMO

Os peixes constituem o grupo de vertebrados predominante em ambientes aquáticos e são afetados diretamente pela presença de contaminantes nos corpos hídricos. Ensaios ecotoxicológicos já foram descritos para refletir efeitos nocivos da contaminação de ambientes aquáticos, principalmente com resíduos de agrotóxicos, no entanto, existe uma lacuna na ciência sobre informações de protocolos de uso do sêmen de peixes para ensaios ecotoxicológicos. No presente trabalho, objetivou-se analisar a viabilidade do uso de sêmen criopreservado de tambaqui *Colossoma macropomum* em ensaios ecotoxicológicos como estratégia de monitoramento da qualidade de ambientes aquáticos. A pesquisa foi realizada com uma busca sistematizada por artigos científicos no período de 2000 a 2019 utilizando-se da base de dados Web of Science, a partir dos descritores “fish reproduction”, “contamination”, “toxicology”, “ecotoxicity” e “biomonitoring”, combinados com uso dos operadores booleanos “and” e “or”. Após a busca, foi feita uma primeira triagem a partir da análise de conteúdo dos títulos e do resumo. Em seguida, foi feita a leitura integral de 98 artigos, sendo selecionados 40. Numa segunda etapa, foram feitos testes ecotoxicológicos com uso de amostras seminais de machos sexualmente maduros de tambaqui provenientes de uma piscicultura local em testes ecotoxicológicos com amostras *in natura* e criopreservadas. O sêmen foi coletado oito horas pós-indução hormonal em tubos de vidro. Após avaliação inicial de inexistência de ativação prévia, o experimento foi feito em esquema fatorial analisando dois agrotóxicos utilizados em sistemas agrícolas (glifosato e fenitrotiona). Para cada agrotóxico, foram testadas cinco concentrações (6, 12, 24, 120 e 240 mg/L), com posterior análise da motilidade espermática nos tempos 0, 30 e 60 segundos pós-ativação. Como controle (negativo), foi utilizada a ativação com solução de NaCl a 0,9% e análise da motilidade nos mesmos tempos descritos para os agrotóxicos. Por último, o trabalho apresenta artigo com a análise do biomonitoramento pesqueiro no Brasil e a observância dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. Os resultados da busca sistematizada indicaram 25 espécies de peixes como bioindicadoras, com predominância do *Danio rerio* (18%). Os inseticidas estiveram presentes em 78% dos estudos, principalmente o endosulfan (35%) e a cipermetrina

(13%). Distúrbios endócrinos reprodutivos foram as vias de ação mais relatadas (57,5%). Nos testes ecotoxicológicos, os resultados indicaram que as amostras de sêmen *in natura* exibiram motilidade inicial de $89,2 \pm 4,9\%$ e tempo de duração médio de 100 segundos (até 10% de motilidade espermática). A redução da motilidade espermática ocorreu de forma significativa ($p < 0,05$) após 30 segundos tanto para o glifosato quanto para fenitrotiona em todas as concentrações, exceto na de 240 mg/L que não apresentou ativação para ambos os agrotóxicos. Para o sêmen criopreservado, houve significativa redução da motilidade espermática logo após a exposição as soluções com resíduos de glifosato nas concentrações testadas em relação ao controle, sem ter havido, no entanto, diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as concentrações dos resíduos de glifosato. Ficaram evidentes os efeitos causados por agrotóxicos na reprodução de teleósteos de água doce, com indicação de sensibilidade das células espermáticas aos agrotóxicos, demonstrando a possibilidade de uso de sêmen criopreservado de tambaqui em testes ecotoxicológicos.

Palavras-chave: Agrotóxicos; Biomonitoramento; Ecotoxicologia; Peixe amazônico; Qualidade espermática; Xenobióticos.

SANTOS, Jadson Pinheiro. **Feasibility of the use of cryopreserved semen from tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) (CHARACIFORMES: SERRASALMIDAE) in ecotoxicological assays.** 2023. 81 p. Thesis (Doctorate in Biodiversity and Biotechnology). Federal University of Maranhão, São Luís, MA-Brazil, 2023.

ABSTRACT

Fish are the predominant group of vertebrates in aquatic environments and are invited directly by the presence of contaminants in water bodies. Ecotoxicological tests have already been felt to reflect the negative effects of contamination of aquatic environments, mainly with pesticide residues; however, there is a gap in science about information on protocols for the use of fish semen for ecotoxicological tests. In the present study, the objective was to analyze the feasibility of using cryopreserved semen of tambaqui *Colossoma macropomum* in ecotoxicological assays as a strategy for monitoring the quality of aquatic environments. The research was carried out with a systematic search for scientific articles in the period from 2000 to 2019 using the “Web of Science” database, using the descriptors “fish reproduction”, “contamination”, “toxicology”, “ecotoxicity” and “biomonitoring”, combined with the use of boolean operators “AND” and “OR”. After the search, a first screening was performed based on the content analysis of titles and abstracts. Then, 98 articles were read in full, and 40 were selected. In a second step, ecotoxicological tests were carried out using seminal samples of sexually mature tambaqui males from a local fish farm in ecotoxicological tests with *in natura* and cryopreserved samples. Semen was collected eight hours after hormone induction into glass tubes. After initial assessment of the lack of prior activation, the experiment was carried out in a factorial scheme, analyzing two pesticides used in agricultural systems (glyphosate and fenitrothion). For each pesticide, five concentrations (6, 12, 48, 120 and 240 mg/L) were tested, with analysis of motility at times 0, 30 and 60 seconds after activation. As a control (negative), we used activation with a 0.9% NaCl solution and motility analysis at the same times described for pesticides. Finally, the research was carried out with the analysis of biomonitoring in Brazil and the observance of the Sustainable Development Goals, The results of the systematic bibliographic research indicated 25 species of fish, with a predominance of *Danio rerio* (17.5%). Insecticides were present in 78% of the studies, mainly endosulfan (35%) and cypermethrin (13%). Reproductive endocrine disorders were the most reported pathways of action (57.5%). In ecotoxicological tests, the results indicate that the *in natura* samples exhibited an initial motility of $89.2 \pm 4.9\%$, and a mean duration of 100

seconds (up to 10% of sperm motility). The reduction in sperm motility occurred significantly ($p < 0.05$) after 30 seconds for both glyphosate and fenitrothione in all concentrations, except for the 240 mg/L that did not show activation for both pesticides. For cryopreserved semen, there was a significant reduction in sperm motility soon after exposure to solutions with glyphosate residues at the concentrations tested in relation to the control, without, however, significant differences ($p > 0.05$) between residue concentrations of glyphosate. The effects caused by pesticides on the reproduction of freshwater teleosts were evident, with indication of sensitivity of sperm cells to pesticides, demonstrating the possibility of using cryopreserved tambaqui semen in ecotoxicological tests.

Keywords: Biomonitoring; Pesticides; Ecotoxicology; Amazon fish; Sperm quality; Xenobiotics.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
	2.1 Uso de agrotóxicos no Brasil.....	14
	2.2 Contaminação de ambientes aquáticos por agrotóxicos	15
	2.3 Ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos	16
	2.4 Reprodução de peixes nativos migradores	17
	2.5 Biologia espermática de peixes nativos.....	18
	2.6 Criopreservação do sêmen de peixes nativos	20
	Referências.....	21
3	CAPÍTULOS.....	27
	3.1 CAPÍTULO 1. REPRODUCTIVE ASPECTS OF FRESHWATER TELEOSTS EXPOSED TO PESTICIDE-CONTAMINATED ENVIRONMENTS: A SYSTEMATIC REVIEW	27
	3.2 CAPÍTULO 2. CHANGES IN SPERM MOTILITY OF THE AMAZONIAN FISH TAMBAQUI <i>COLOSSOMA MACROPONUM</i> (CUVIER 1816) (TELEOSTEI: SERRASALMIDAE) EXPOSED TO TWO PESTICIDES	43
	3.3 CAPÍTULO 3. EXPOSIÇÃO DE ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE TAMBAQUI <i>COLOSSOMA MACROPONUM</i> (CUVIER 1816) (TELEOSTEI: SERRASALMIDAE) AO GLIFOSATO.....	57
	3.4 CAPÍTULO 4. MONITORAMENTO DA PESCA NO BRASIL: COMO CUMPRIR A AGENDA 2030 SEM ESTATÍSTICAS DA PESCA?	68
4	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade de peixes existente no planeta Terra tem sido utilizada há milhares de anos como fonte de alimento, emprego e renda, principalmente a partir da atividade pesqueira e dos sistemas de cultivo (FAO, 2020). Apesar das inúmeras espécies de peixes que apresentam características apropriadas para o cultivo em todo o mundo, a piscicultura, técnica destinada ao cultivo de peixes em ambientes parcial ou totalmente controlados, tem sido dominada por um grupo de 24 espécies de água doce, respondendo por mais de 75% da produção global da piscicultura continental (FAO, 2022). Para o Brasil, embora inserido na região neotropical que apresenta a maior diversidade de peixes de água doce do mundo com mais de 5.000 espécies (REIS *et al.*, 2016; PELICICE *et al.*, 2017; VIEIRA *et al.*, 2023), a piscicultura continental é explorada com a produção de cerca de 50 diferentes espécies nativas (RODRIGUES *et al.*, 2013).

A capacidade de se ampliar a produção mundial de alimentos de forma significativa a partir da aquicultura fica evidente a partir do esforço no desenvolvimento de novas técnicas de produção, proporcionando um maior controle do ambiente aquático e dos organismos, que se traduz em ganhos de produtividade e qualidade no cultivo de vários tipos de animais e plantas aquáticas (ALVES *et al.*, 2014; SIQUEIRA, 2017). Apesar dos intensos esforços para elevação da produtividade aquícola, a falta de programas de monitoramento pesqueiro, bem como a liberação indiscriminada de agentes poluidores, como efluentes domésticos, industriais ou agrícolas (ARAÚJO *et al.*, 2001; CUNHA *et al.*, 2018), pode se tornar um fator limitante para a continuidade do crescimento da produção de pescado no mundo.

Conhecer a quantidade e o volume de peixes que são anualmente capturados a partir da atividade pesqueira, bem como identificar estratégias que possam auxiliar no monitoramento de ambientes aquáticos possivelmente poluídos, torna viável o desenvolvimento de estratégias de conservação mais eficientes (MENDONÇA, 2018). Assim, a partir de um contexto que aborde o ambiente aquático de uma forma mais completa, e levando em consideração a maior parte dos elos envolvidos na sobrevivência daquele habitat, as ações de conservação e gestão das atividades poderiam permitir uma exploração mais sustentável dos recursos naturais (UN, 2015; FAO, 2022), principalmente com um maior controle do descarte inadequado de produtos tóxicos nos ambientes aquáticos.

Os agrotóxicos, principalmente os piretróides, como a deltametrina e a cipermetrina, e organofosforados, como o glifosato, têm sido utilizados em larga escala no Brasil desde a década de 1990, com o objetivo principal de prover incrementos nas produções agrícolas pelo combate contra pragas que, se não controladas, podem exterminar toda a cultura em um curto espaço de tempo (MORAES, 2019). No entanto, ao passo que essas substâncias trazem

benefícios na agricultura, é inquestionável a quantidade de estudos que comprovam os efeitos ecotoxicológicos dos agrotóxicos para a saúde humana e de animais, principalmente daqueles que vivem em ambientes aquáticos (MONTANHA; PIMPÃO, 2012; SANTANA; CAVALCANTE, 2016; RIBEIRO; PINHEIRO, 2018). Além dos riscos diretos para a saúde humana, é possível que esteja acontecendo a contaminação dos peixes pelos produtos tóxicos que atingem os ambientes aquáticos, o que pode representar um risco adicional para os consumidores destes alimentos (WAICHMAN, 2008).

Estudos ecotoxicológicos com uso de organismos aquáticos têm sido desenvolvidos com foco na identificação de alterações com destaque para observações dos processos fisiológicos, como a respiração, pelo fato que muitos desses organismos aquáticos possuem respiração branquial. As brânquias estão em contato direto com a água, o que pode carrear diversos contaminantes para o interior desses organismos, causando-lhes alterações morfofisiológicas (CANTANHÊDE, *et al.*, 2014). Outras funções fisiológicas, como crescimento e reprodução, podem ser afetadas em virtude dos peixes desenvolverem mecanismos compensatórios que demandam energia em resposta à exposição a um agente tóxico (FERREIRA, 2016).

O sucesso reprodutivo é um fator crucial na determinação da sobrevivência de uma espécie, sendo registrado na literatura estudos com bioensaios ecotoxicológicos usando gametas e embriões de espécies aquáticas (LOSSO *et al.*, 2007; MAMINDY-PAJANY *et al.*, 2010). No entanto, diversas espécies de peixes, principalmente espécies nativas potenciais para o cultivo no Brasil (BALDISSEROTTO, 2018), possuem mecanismos de reprodução que permitem esse evento apenas uma vez no ano, fator que limita em muitos casos sua disponibilidade para os testes ecotoxicológicos ao longo de todo o ano (FABBROCINI *et al.*, 2012).

A conservação do sêmen e de embriões de peixes é praticada em todo o mundo por diversos pesquisadores e com muitas espécies. Segundo Tiersch *et al.* (2007), a criopreservação é uma biotécnica que permite conservar as células espermáticas em baixas temperaturas, mantendo sua viabilidade por tempo indeterminado, possibilitando a redução de gastos com o transporte e armazenamento de peixes adultos e conservação de material genético para uso imediato ou posterior, inclusive com grande possibilidade de implementação em laboratórios de produção de alevinos em pisciculturas (MARIA e CARNEIRO, 2012).

Contribuições significativas têm sido relatadas com o uso da criopreservação do sêmen de peixes na preservação e disponibilização dos gametas masculinos em longo prazo (CARNEIRO, 2007) e para a reprodução artificial de muitas espécies nativas, como por

exemplo, *Salminus brasiliensis* (CAROLSFELD *et al.*, 2003), *Brycon orbignyanus* (MARIA, 2005; CAROLSFELD *et al.*, 2003) e *Colossoma macropomum* (CARNEIRO *et al.*, 2012; VARELA-JUNIOR *et al.*, 2012; MARIA *et al.*, 2015). A manutenção da viabilidade dos gametas por tempo indeterminado, com uso de soluções diluidoras e crioprotetoras, torna a criopreservação uma biotécnica bastante importante na aquicultura e possível de ser adotada nos testes ecotoxicológicos em substituição ao uso de animais (SILVA *et al.*, 2015).

Nos peixes teleósteos com fertilização externa, quando ocorre a desova, os gametas são lançados no ambiente para que ocorra a fertilização (WITECH *et al.*, 2011). Nesse instante, os gametas estão expostos a vários contaminantes presentes na água, entre eles, os metais pesados mercúrio, zinco, chumbo, cobre e cádmio (KIME e NASH, 1999). Esses contaminantes, em certos níveis, prejudicam a motilidade dos espermatozoides e a fertilização dos ovócitos (KIME, 1995). Além dos metais, tem-se resíduos de agrotóxicos lixiviados nos solos pelas chuvas ou até mesmo pelo descarte inadequado dos vasilhames (FERREIRA, 2016).

O tambaqui *Colossoma macropomum*, é uma espécie nativa com grande interesse social, econômico e biológico no Brasil, principalmente por apresentar características favoráveis à sua produção em cativeiro, prática desenvolvida em todas as regiões do Brasil, mas que também apresenta grande importância na pesca praticada na região amazônica (OLIVEIRA *et al.*, 2020; PEIXEBR, 2023). Essa grande importância socioeconômica e ambiental levou ao desenvolvimento de ações de formação de bancos de germoplasma em algumas regiões do país (PÁDUA *et al.*, 2020), fato que possibilita a disponibilização de células espermáticas ao longo do ano e de forma imediata para uso em análises experimentais a partir de amostras biológicas criopreservadas e conservadas, o que permite inferir uma maior facilidade de aprovação de protocolos em comitês de ética em experimentação animal por se tratarem de células reprodutoras e não de animais inteiros.

No tocante as metas e Objetivos de Desenvolvimento Sustentável – ODS preconizados pela ONU na Agenda 2030 (UN, 2015), o uso de protocolos padronizados para análises ecotoxicológicas a partir de material biológico celular com ampla disponibilidade vem de encontro a necessidade de geração de estudos que auxiliem no combate à poluição aquática e terrestre e a conservação da biodiversidade elencados no ODS 6 – água potável e saneamento, ODS 14 – vida na água, e ODS 15 – vida terrestre.

Diante dos efeitos evidentes que podem ser provocados diretamente na reprodução dos peixes a partir da contaminação dos ambientes aquáticos por agrotóxicos, a hipótese do presente estudo é que a exposição dos espermatozoides de peixes a resíduos de agrotóxicos em condições experimentais (laboratoriais) pode gerar alterações na qualidade seminal,

levando uma redução nas taxas de fertilização de *C. macropomum* em bioensaios. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi analisar a viabilidade do uso de sêmen criopreservado de tambaqui *C. macropomum* com exposição a resíduos de glifosato e fenitrotona em ensaios ecotoxicológicos.

O presente documento está dividido em uma revisão bibliográfica, contendo a descrição de particularidades sobre as principais características do uso de agrotóxicos, contaminação de ambientes aquáticos, processo reprodutivo em peixes de água doce e biotecnologias utilizadas em ensaios ecotoxicológicos. Em seguida, a segunda parte da tese conta com quatro capítulos representados pelos artigos que foram gerados a partir dos estudos e experimentos desenvolvidos ao longo da pesquisa. O primeiro artigo, relata uma revisão de literatura sistemática sobre os efeitos da exposição de peixes de água doce aos agrotóxicos no processo reprodutivo, publicado em 2021 na Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade.

O segundo artigo apresenta resultados de uma análise da exposição de espermatozoides de tambaqui *C. macropomum* a resíduos de dois agrotóxicos, publicado em 2023 na revista Biota Neotropica. O terceiro artigo apresenta resultados preliminares da exposição de espermatozoides criopreservados de tambaqui *C. macropomum* a resíduos de agrotóxicos como potencial para estudos ecotoxicológicos, a ser submetido no periódico Aquatic Ecotoxicology. O quarto e último artigo da tese, faz uma abordagem sobre importância da estatística pesqueira no Brasil como uma ferramenta de monitoramento ambiental em alinhamento aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável implementados pela Agenda 2030, artigo esse também publicado em 2023 no periódico Biota Neotropica, como uma forma de demonstrar, além do desenvolvimento de protocolos de análise experimental como o aqui apresentado, a importância de se conhecer o que o homem extrai do ambiente aquático, bem como a dinâmica das populações pesqueiras naturais, disponibilizando dados sistematizados capazes de serem utilizados por órgãos e instituições ambientais de forma mais ampla na tomada de decisões para mitigação ou compensação de danos ambientais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Uso de agrotóxicos no Brasil

A agropecuária brasileira tem sido considerada estratégica para o crescimento do país, apresentando um importante papel na sociedade como promotor de desenvolvimento socioeconômico e geração de emprego e renda (GARCIA e PEREIRA-FILHO, 2014). Nessa perspectiva, e associado à existência de diferentes paisagens e clima, o que oferece oportunidade de cultivos para uma gama de variedades de produtos agrícolas, o Brasil tornou-se um dos maiores *players* na produção global de alimentos, produzindo e exportando *commodities* agrícolas (ARTUZO *et al.*, 2019).

Com uma extensa área propícia ao crescimento da produção de alimentos a partir da agropecuária e impulsionado pela enorme demanda por alimentos em escala nacional e global (CAMARGO *et al.*, 2017), a produção agrícola extensiva no Brasil tem se expandido de forma acelerada com uma grande intensificação tecnológica, permitindo que o país se tornasse o segundo maior exportador mundial de produtos agrícolas (BROVINI *et al.*, 2021). Essa demanda crescente por alimentos e o foco na produção de *commodities* com valoração internacional estimulou o uso intenso de agrotóxicos (IBAMA, 2020) de modo a permitir altas produtividades e reduzir as perdas provocadas por problemas ao longo do ciclo produtivo.

Historicamente, o Brasil apresenta uma grande relação do crescimento do setor agropecuário a partir da intensificação do uso de agrotóxicos, tornando-se o maior consumidor global responsável por cerca de 20% de todos os produtos químicos utilizados no mundo com a mesma finalidade desde 2009 (PIGNATI *et al.*, 2017; BASSANI *et al.*, 2018). Também conhecidos como pesticidas ou defensivos agrícolas, os agrotóxicos são substâncias químicas rotineiramente utilizadas para combater o estabelecimento de pragas (animais ou vegetais), como fungos, bactérias, insetos e ervas daninhas, nas mais diversas culturas espalhadas pelo país (PERES *et al.*, 2003).

Apesar dos benefícios oferecidos com o uso dos agrotóxicos, essa prática não atinge apenas os alvos principais, que são as pragas nas culturas, mas também acabam sendo transportados, contaminando matrizes ambientais, trabalhadores, moradores do entorno e outros animais (PIGNATI *et al.*, 2017). A contaminação de outros ambientes e animais por agrotóxicos, como os peixes presentes em rios e lagos, é relatada em estudos diversos, desde relações entre herbicidas utilizados em culturas de arroz e os peixes ali presentes (COPATI *et al.*, 2009), bem como efeitos genotóxicos, lesões em brânquias e em fígados de peixes nativos (CUNHA *et al.*, 2018), demonstrando que os agrotóxicos podem apresentar alto potencial tóxico em ambientes aquáticos.

2.2 Contaminação de ambientes aquáticos por agrotóxicos

O ambiente aquático é composto pelos ecossistemas marinhos, como oceanos, estuários, recifes de coral e zonas costeiras, que cobrem cerca de 71% da superfície da Terra, e por ecossistemas de água doce, como rios, lagos e riachos, além de zonas úmidas, que perfazem cerca de 1% da superfície terrestre (HÄDER *et al.*, 2020). Juntos, esses ambientes são explorados pelo homem há centenas de milhares de anos e fornecem alimentação, transporte e recreação, além de servir essencialmente para o bom funcionamento das atividades urbanas, industriais e agropecuárias (NAVARRO-ORTEGA *et al.*, 2015; FAO, 2020).

Embora sejam considerados fornecedores de um dos componentes principais para o bem-estar humano e para o desenvolvimento socioeconômico, os ambientes aquáticos estão continuamente sendo contaminados com produtos químicos potencialmente tóxicos provenientes das atividades domésticas, industriais e agrícolas (BEGUM, 2004). Como consequência dos processos intensificados de contaminação dos ambientes aquáticos, tem-se a redução da disponibilidade de água com qualidade compatível para as necessidades do ser humano, assim como exposição constante da biota aquática aos contaminantes tóxicos que inviabilizam a proliferação da biodiversidade natural nos ambientes aquáticos (MONTANHA *et al.*, 2011).

Dentre os principais contaminantes encontrados nos ambientes aquáticos, tem-se os agrotóxicos, que são largamente utilizados no setor agropecuário brasileiro (DELLAMATRICE e MONTEIRO, 2014). A acumulação dessas substâncias ocorre por meio dos processos de lixiviação do solo das áreas plantadas em períodos chuvosos, ou até mesmo pela dispersão no ar ocasionada pela pulverização dessas substâncias nas plantações, muitas vezes com uso de aeronaves (CAMPOS *et al.*, 2021), o que intensifica ainda mais esse processo.

Na aquicultura, técnica destinada ao cultivo de organismos aquáticos, o uso dos agrotóxicos é uma prática rotineira em muitas unidades de produção, apesar de menos intensa que na agricultura, com foco no combate de parasitos, como os crustáceos *Lernaea* sp. e *Ergasilus* sp. do grupo dos copépodos, e os braquiúros *Dolops* sp. e *Argulus* sp., além de insetos que podem se alimentar de larvas de peixes, como os Odonatas (LUVIZOTTO-SANTOS *et al.*, 2009; BOTELHO *et al.*, 2012). Sistemas de produção na aquicultura infestados com pragas podem gerar grandes prejuízos ao longo do ciclo produtivo. Nesse caso, o processo de biomagnificação, caracterizada pela retenção de compostos tóxicos pelos animais ao longo da cadeia alimentar em um determinado ambiente, pode ser ainda mais intenso pelo uso direto no ambiente aquático, mesmo que aplicados pontualmente nos

viveiros e tanques de cultivo isolados entre si (MONTANHA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2018).

A ação dos agrotóxicos no combate às pragas pode ser observada em processos bioquímicos chave (local de ação primário), responsáveis pelo desenvolvimento normal dos indivíduos, e consequente modo de ação que envolve o conjunto de alterações bioquímicas e fisiológicas em consequência do local de ação primário afetado, culminando na morte da praga (PAVANI, 2016). No entanto, esses danos acabam sendo observados também nos animais não alvos praticado o tratamento, podendo afetar toda uma cadeia alimentar dependente daquele ambiente. Assim, a bioacumulação dos agrotóxicos nos ambientes aquáticos, como piretroides e organofosforados (MORAES, 2019), pode inviabilizar o uso da água para as mais diversas atividades, bem como ocasionar efeitos deletérios na biota ali presente (CANTANHEDE *et al.*, 2014), como alterações morfológicas, estruturais e fisiológicas, principalmente no sistema nervoso, endócrino e reprodutivo dos peixes (FERREIRA, 2016).

2.3 Ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos

O uso de animais aquáticos em estudos que avaliem diferentes níveis e tipos de estresse é uma prática antiga e que já demonstrou a importância de se observar os efeitos adversos de alterações ambientais e sua interação com os animais (MAGALHÃES e FERRÃO-FILHO, 2008). A partir da intensificação das ações antrópicas com maior pressão ao meio ambiente, o termo ecotoxicologia foi sugerido por *René Truhaut* em 1969 em uma conferência ambiental em Estocolmo, mas teve suas definições e conceituações dada por *Jean-Michel Jouany*, jovem assistente de *René Truhaut*, que registrou pela primeira vez a definição de uma ciência que estuda os efeitos de substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais e vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado, em publicação no ano de 1971 (TRUHAUT, 1977; VASSEUR, 2019).

A ecotoxicologia aquática envolve o transporte, a distribuição, a transformação e o destino dos contaminantes no ambiente aquático, apresentando efeitos tóxicos que podem se manifestar em diferentes níveis de organização, desde estruturas celulares até indivíduos, populações e comunidades (COSTA *et al.*, 2008). Desde 1975, diversos estudos foram desenvolvidos no Brasil para a definição de processos e métodos de avaliação, de forma aguda e crônica, de curta duração, com destaque para ensaios com sedimentos, além de

grupos de organismos compreendendo algas, microcrustáceos, peixes de águas continentais e marinhas (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008; BERTOLETTI, 2012).

Por ocuparem diferentes posições na cadeia alimentar dos ecossistemas aquáticos, os peixes são frequentemente utilizados como bioindicadores da qualidade ambiental desses ecossistemas (LI *et al.*, 2010). Habitualmente, são indicados como organismos sentinelas que respondem a mudanças em vários níveis estruturais, desde fatores celulares, fisiológicos, bioquímicos, genéticos e histológicos, até variações nos padrões de comportamento, que podem afetar a estrutura populacional da espécie em resposta a estressores presentes no ambiente (LIMA *et al.*, 2018).

Santos et al. (2021) relataram os efeitos ocasionados no processo reprodutivo de peixes de água doce expostos a agrotóxicos em ensaios ecotoxicológicos. Segundo os autores, de modo geral, foram classificadas as principais vias de ação dos agrotóxicos no processo de reprodução dos peixes, entre as quais se destacam distúrbios endócrinos reprodutivos; expressão gênica (EG); estresse oxidativo; histopatologia gonadal (HG); índice gonadosomático (IGS); desenvolvimento embrionário (DE) e alterações na qualidade espermática, confirmando que as estratégias e mecanismos reprodutivos em peixes podem ser diretamente influenciadas por diversas alterações nas características abióticas locais, como poluição industrial, urbana e agrícola.

2.4 Reprodução de peixes nativos migradores

Os peixes constituem o grupo mais diverso dentre os vertebrados, distribuindo-se por uma grande variedade de ambientes aquáticos, com características físico-químicas e biológicas distintas (BUKUP *et al.*, 2007). A região Neotropical, compreendida por uma extensa área que se estende desde a América Central até a América do Sul, incluindo parte do sul do México e da península Baixa Califórnia e ilhas do Caribe, tem-se a maior biodiversidade de peixes de água doce do mundo com cerca de 8 a 9 mil espécies estimadas (GUIMARÃES *et al.*, 2020; PELICICE *et al.*, 2021).

Ao longo do tempo, essa grande variedade de ambientes possibilitou que os peixes desenvolvessem padrões de ciclo de vida dos mais variados possíveis, incluindo estratégias reprodutivas que se adequam às condições ambientais em que determinadas espécies proliferam e passam a maior parte de suas vidas (VAZOLLER, 1996). Essas estratégias reprodutivas são normalmente divididas, a partir de um contexto espacial, em sedentárias, aquelas espécies que encontram condições favoráveis para sobreviver, crescer e reproduzir em áreas restritas (AGOSTINHO *et al.*, 2007), e migradoras, caracterizadas pelo grupo de espécies que demandam ampla área de vida e são reconhecidas pela segregação, no tempo e

no espaço, dos *habitats* usados para reprodução, crescimento e alimentação durante os estádios de (ANDRADE *et al.*, 2015; BARZOTO e MATEUS, 2017).

O processo de migração permite que os peixes sofram alterações fisiológicas provocadas por diferenças nas características ambientais, permitindo principalmente que o processo de vitelogênese seja finalizado, o que resulta em aumento relevante no peso das gônadas (SUZUKI *et al.*, 2000). Esse movimento de migração, geralmente realizado em direção às áreas de cabeceiras dos rios, onde a incidência de predação de sua prole é menor, pode variar de forma relevante entre as espécies migradoras, desde poucos quilômetros a centenas deles (AGOSTINHO *et al.*, 2007; BARTHEM *et al.*, 2017).

Alcançado o ponto ideal ou mais propício para as desovas, normalmente durante a época das cheias dos rios, os gametas das espécies de peixes migradoras são lançados em águas movimentadas, que facilitam o contato entre eles e a fecundação (VAZOLLER, 1996). Na sequência, os ovos fecundados são transportados de forma passiva com a corrente em direção às partes baixas da bacia, onde se localizam os berçários naturais representados pelas lagoas marginais e áreas alagadas pelas cheias dos rios, conhecidas como remansos e que disponibilizam alimento e abrigo em abundância para as formas jovens (SATO e GODINHO, 2003; AGOSTINHO *et al.*, 2007).

Todo esse processo de desova com fertilização e fecundação externas de espécies de peixes migradores proporciona o contato direto dos gametas com a água (WITECH *et al.*, 2011). Em se tratando de ambientes aquáticos contaminados, esse contato direto pode provocar alterações na qualidade do sêmen, como redução das taxas de motilidade e alterações morfológicas, gerando prejuízos para o processo de fertilização (KIME e NASH, 1999; FERREIRA, 2016) e, conseqüentemente, recrutamento dos estoques naturais.

2.5 Biologia espermática de peixes nativos

O sêmen é composto essencialmente pelo plasma seminal constituído por minerais e substâncias orgânicas responsáveis pela regulação do metabolismo espermático, e pelas células espermáticas que, de modo geral, apresentam pouca variação estrutural entre as espécies de peixes, podendo ser divididos morfológicamente em cabeça, peça intermediária e cauda (VIVEIROS *et al.*, 2014).

Diferentemente dos mamíferos, a maioria das espécies de peixes de água doce apresenta fertilização externa e os espermatozoides só iniciam sua movimentação após sofrerem choque hiposmótico quando liberados na água (RURANGWA *et al.*, 2004). Logo após a liberação dos espermatozoides no meio aquático, durante a reprodução natural para a maioria das espécies de peixes de água doce, a motilidade espermática é iniciada pela

reduzida osmolaridade do meio externo que, juntamente com possíveis alterações no pH, levam imediatamente ao reajuste da concentração iônica interna pelo processo osmorregulatório da membrana, levando à sua polarização (COSSON, 2004). Em resposta a este choque hiposmótico, o volume citoplasmático das células espermáticas das espécies de água doce aumenta em até três vezes como resultado do influxo de água (PERCHEC-POUPARD *et al.*, 1997).

Adicionalmente, a diminuição da concentração iônica atinge valores em que a atividade da ATPase é ótima, proporcionando, assim, alta taxa de motilidade (COSSON, 2004). Os efeitos da combinação entre a lenta renovação do ATP e a redução da concentração iônica a níveis de bloquear a atividade da ATPase, suprimem quase que totalmente a intensidade flagelar e conseqüentemente a motilidade espermática segundos após a ativação da mesma (MARIA, 2005). Por esta razão a determinação da motilidade espermática deve ser realizada em condições controladas, utilizando soluções ativadoras mais adequadas e o procedimento de avaliação deve ser realizado logo após a ativação dos espermatozoides.

O processo de ativação também pode acarretar alterações ultraestruturas nos espermatozoides em função da variação da osmolaridade e temperatura do meio que os circunda. Diversas classificações de alterações morfológicas têm sido propostas, sendo a mais utilizada a metodologia proposta por Herman *et al.* (1994), onde as alterações morfológicas são classificadas em primárias (flagelo dobrado, cabeça isolada, gotas citoplasmáticas proximal e distal) e em secundárias (flagelo quebrado, enrolado, degenerado, macrocefalia, microcefalia). As alterações primárias estariam ligadas à etapa da espermatogênese em decorrência de causas que acometem os reprodutores, como enfermidades, consanguinidade, restrição alimentar, estresse ambiental, entre outros. Já as secundárias estariam relacionadas aos procedimentos de manejo durante a coleta do sêmen e à confecção das lâminas para avaliação de patologias (HERMAN *et al.*, 1994).

A qualidade seminal em peixes tem sido avaliada principalmente pela motilidade espermática. No entanto, a qualidade seminal pode sofrer influência de muitos fatores, como a concentração, a viabilidade e a morfologia espermáticas (BEDORE, 1999; KAVAMOTO *et al.*, 1999). O conhecimento destes parâmetros em conjunto é fundamental para a avaliação mais precisa da qualidade seminal e possibilita a classificação do reprodutor como apto ou não para ser utilizado em procedimentos de fertilização artificial (VIVEIROS, 2005) e em programas de conservação de recursos genéticos a partir da criopreservação de amostras seminais de espécies com importante valor biológico e econômico, como o tambaqui *C. macropomum*.

2.6 Criopreservação do sêmen de peixes nativos

Várias são as estratégias desenvolvidas para se viabilizar a conservação dos recursos genéticos de espécies de peixes com relevância ambiental e econômica, desde a elaboração de estratégias, planos, políticas e ações voltadas para a manutenção da diversidade genética e de outros valores desses recursos, até toda a estruturação e manutenção de material biológico preservado, de forma a contribuir para a produção e produtividade alimentar e de peixes, no presente e no futuro (VILLELA *et al.*, 2020).

Nessa perspectiva, diversos estudos para viabilizar a formação de bancos de germoplasma já foram desenvolvidos. Seu intuito é conservar os recursos genéticos de espécies de peixes nativos a partir da criopreservação do sêmen dessas espécies, como por exemplo *Prochilodus lineatus* (CRUZ, 2001), *Salminus maxillosus* = *Salminus brasiliensis* (CAROLSFELD *et al.*, 2003), *Brycon orbignyanus* (MARIA, 2005) e *Colossoma macropomum* (CARNEIRO *et al.*, 2012; MARIA *et al.*, 2015). A criopreservação do sêmen de peixes é uma técnica de conservação de longo prazo que tem permitido a manutenção da viabilidade dos gametas por tempo indefinido, o que torna essa técnica bastante importante em procedimentos de reprodução artificial em pisciculturas (MARIA e CARNEIRO, 2012; VARELA-JUNIOR *et al.*, 2012).

Durante o processo de criopreservação, os espermatozoides ficam sujeitos aos efeitos deletérios devido as temperaturas situarem-se abaixo do ponto de congelamento do meio. Tal situação pode ocasionar a formação de cristais de gelo no interior da célula, desidratação e desnaturação de macromoléculas, levando ao encolhimento dos espermatozoides de forma irreversível (MEDEIROS *et al.*, 2002; MARIA, 2005; CARNEIRO, 2007). Os efeitos adversos da criopreservação podem ser minimizados pelo uso de protocolos específicos, sendo necessária a adição de soluções protetoras, compostas por diluidores e crioprotetores intra e extracelulares, além da determinação de velocidades mais adequadas de resfriamento, congelamento e descongelamento (HARVEY e CAROLSFELD, 1993; MARIA e CARNEIRO, 2012).

Os benefícios gerados pela criopreservação do sêmen de peixes nativos ainda são pouco observados na prática, principalmente por ser uma tecnologia ainda com custo elevado. No entanto, a manutenção da viabilidade dos gametas proporcionada pela criopreservação por tempo indeterminado, surge como uma biotécnica bastante importante na conservação dos recursos genéticos para uso imediato, em procedimentos de reprodução artificial de espécies nativas ameaçadas (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2016), ou para uso futuro, principalmente como forma de recuperar populações ameaçadas pela degradação do ambiente,

além de disponibilizar material biológico durante todo o ano para uso em testes ecotoxicológicos em substituição ao uso de animais (SILVA *et al.*, 2015).

Referências

- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. *Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil*. 1 ed. Maringá: EdUEM, 2007. p. 501
- ALVES, A. L.; VARELA, E. S.; MORO, G. V.; KIRSCHNIK, L. N. G. **Riscos genéticos da produção de híbridos de peixes nativos**. 1 ed. Palmas, Documentos Embrapa Pesca e Aquicultura, 2014. p. 60
- ANDRADE, E. S.; ANDRADE, E. A.; FELIZARDO, V. O.; PAULA, D. A. J.; VERAS, G. C.; MURGAS, L. D. S. Biologia reprodutiva de peixes de água doce. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.1, p. 195-201, 2015.
- ARAUJO, E. J. A.; MORAIS, J. O. R.; SOUZA, P. R.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T. Efeito de poluentes químicos cumulativos e mutagênicos durante o desenvolvimento ontogenético de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). **Acta Scientiarum**, v.23, p.391-399, 2001.
- ARTUZO, F. D.; FOGUESATTO, C. R.; MACHADO, J. A. D.; OLIVEIRA, L.; SOUZA, A. R. L. O potencial produtivo brasileiro: uma análise histórica da produção de milho. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 12, n. 2, p. 515-540, 2019. <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2019v12n2p515-540>.
- BALDISSEROTTO, B. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. 3 ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2018.
- BARTHEM, R. B.; GOULDING, M.; LEITE, R. G.; CAÑAS, C.; FORSBEG, B.; VENTICINQUE, E.; *et al.* Goliath catfish spawning in the far western Amazon confirmed by the distribution of mature adults, drifting larvae and migrating juveniles. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-13, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep41784>.
- BARZOTTO, E.; MATEUS, L. Reproductive biology of the migratory freshwater fish *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) in the Cuiabá River basin, Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, p.1-8, 2017. <https://doi.org/10.1111/jai.13262>.
- BASSANI, D.; SILVA, L. R.; BIRK, L.; SOUZA, S. C. W.; OLIVEIRA, E. F.; DALLEGRAVE, E.; *et al.* Pesticides in Brazil: A viewpoint about the Poison Law. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 1253-1254, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05669>.
- BEDORE, Alessandra Gomes. **Caracterização e criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 1999. Dissertação (Mestrado) – UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 199.
- BEGUM, G. Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (Linn) and recovery response. **Aquatic Toxicology**, v. 66, p. 83-92, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.08.002>.
- BERTOLETTI, E. A presunção ambiental e a Ecotoxicologia aquática. **Revista das Águas**, n. 12, p. 4-11, 2012. Disponível em: < <http://revistadasaguas.pgr.mpf.gov.br/edicoes-darevista/edicao-atual/materias/presuncao-ambiental>>. Acesso em: 20/04/2022.
- BOTELHO, R. G.; ALVEZ, P. A. T.; MARANHO, L. A.; MONTEIRO, S. H.; SOUSA, B. I. A.; AVELAR, A. S.; *et al.* Prós e contras da aplicação de pesticidas na aquicultura. **Visão agrícola**, n. 11, p. 45-48, 2012.
- BROVINI, E. M.; DEUS, B. C. T.; VILAS-BOAS, J. A.; QUADRA, G. R.; CARVALHO, L.; MENDONÇA, R. F.; *et al.* Three-best-seller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. **Science of the Total Environment**, v. 771, n. 144754, p. 1-12, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144754>.

- BUCKUP, P.; MENEZES, N.; GHAZZI, M. *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Rio de Janeiro: Museu Nacional, Série Livros, n. 23, 2007. p. 195.
- CAMARGO, F. A. O.; SILVA, L. S.; MERTEN, G. H.; CARLOS, F. S.; BAVEYE, P. C.; TRIPLETT, E. W. Brazilian agriculture in perspective: Great expectations vs reality. *Advances in Agronomy*, v. 141, p. 53-114, 2017. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2016.10.003>.
- CAMPOS, A. L.; IGNÁCIO, A. R. A.; OLIVEIRA-JUNIOR, E. S.; LÁZARO, W. L. O avanço do agrotóxico no Brasil e seus impactos na saúde e no ambiente. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, v. 14, n.1, p. 191-204, 2021. <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2021v14n1e007934>.
- CANTANHÊDE, S. M.; MEDEIROS, A. M.; FERREIRA, F. S.; FERREIRA, J. R. C.; ALVEZ, L. M. C.; CUTRIM, M.; *et al.* Uso de biomarcador histopatológico em brânquias de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque Ecológico Laguna da Jansen, São Luís-MA. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 66, n. 2, p. 593-601, 2014. <https://doi.org/10.1590/1678-41626348>.
- CARNEIRO, P.C.F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, p. 361-366, 2007.
- CARNEIRO, P.C.F.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; MARIA, A. N. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. *Cryoletters*, v. 33, p. 385-393, 2012.
- CAROLSFELD, J.; GODINHO, H. P.; ZANIBONI-FILHO, E.; HARVEY, B. J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*, v. 63, p. 472-489, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00170.x>.
- COPATI, C. E.; GARCIA, L. O.; BALDISSEROTTO, B. Uma importante revisão sobre o impacto de agroquímicos da cultura de arroz em peixes. *Biota Neotropica*, v. 9, n. 4, p. 235-242, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032009000400023>.
- COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquaculture International*, v. 12, p. 69-85, 2004. <https://doi.org/10.1023/B:AQUI.0000017189.44263.bc>.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em Ambientes Aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038>.
- CRUZ, V. L. B. **Criopreservação do sêmen de curimatá (*Prochilodus lineatus*)**. 2001. Dissertação (Mestrado em Zoologia de Vertebrados) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.
- CUNHA, F. S.; SOUSA, N. C.; SANTOS, R. F. B.; MENESES, J. O.; COUTO, M. V. S.; ALMEIDA, F. T. C.; *et al.* Deltamethrin-induced nuclear erythrocyte alteration and damage to the gills and liver of *Colossoma macropomum*. *Environmental Science and Pollution Research*, n. 25, v. 15, p. 15102-15110, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1622-1>.
- DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 18, n. 12, p. 1296–1301, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v18n12p1296-1301>.
- FABROCINI, A.; D'ADAMO, R.; DEL-PRETE, F.; LANGELLOTTI, A. L.; RINNA, F.; SILVESTRI, F.; *et al.* Cryopreserved semen in ecotoxicological bioassays: Sensitivity and reliability of cryopreserved *Sparus aurata* spermatozoa. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 84, p. 293–298, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.024>.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020 – Meeting the sustainable development goals**. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO, 2020. Disponível em: <http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture>. Acessado em: 10/06/2021.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards blue transformation**. Rome, Food and

- Agriculture Organization of the United Nations – FAO, 2022. Disponível em: <https://www.fao.org/documents/card/en/c/cc046en.pdf>. Acessado em: 15/08/2022.
- FERREIRA, L. S. V. **Efeitos histopatológicos dos agrotóxicos deltametrina, imidacloprido, glifosato e diuron nas brânquias de quatro espécies de peixes amazônicos**. 2016. Dissertação (Mestrado Biologia de Água Doce e Pesca Interior) – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA, Manaus, 2016.
- GARCIA, J. R.; VIEIRA-FILHO, J. E. R. **Reflexões sobre o papel da política agrícola brasileira para o desenvolvimento sustentável**. Texto para discussão / Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada - Brasília: Rio de Janeiro: IPEA, 2014.
- GUIMARÃES, E. C.; BRITO, P. S.; GONÇALVES, C. S.; OTTONI, F. P. An inventory of Ichthyofauna of the Pindaré River drainage, Mearim River basin, Northeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 20, n. 4, p. 1-13, 2020. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2020-1023>.
- HÄDER, D. P.; BANASZAK, A. T.; VILLAFANE, V. E.; NARVARTE, M. A.; GONZÁLEZ, R. A.; HELBLING, E. W. Anthropogenic pollution of aquatic ecosystems: emerging problems with global implications. **Science of the Total Environment**, v. 713, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136586>.
- HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. *Induced breeding in tropical fish culture*. Ottawa: IDRC, 1993. p.144.
- HERMAN, H. A.; MITCHELL, J. R.; DOAK, G. A. *The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle*. Illinois: Interstate Publisher, 1994. p. 392
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos. 2019**. Brasília, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, 2020. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatoriosde-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao>. Acesso em: 20/04/2022.
- KAVAMOTO, E. T.; BARNABE, V. H.; CAMPOS, B. E. S.; ANDRADE-TALMELLI, E. F. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatã, *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881) (OSTEICHTHYES, CHARACIFORMES, PROCHILODONTIDAE). **Boletim do Instituto de Pesca de São Paulo**, v. 25, p. 61-66, 1999.
- KIME, D. E. The effects of pollution on reproduction in fish. **Reviews in Fish in Biology and Fishers**, v.5, p.52-96, 1995. <https://doi.org/10.1007/BF01103366>.
- KIME, D. E.; NASH, J. P. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. **The Science of the Total Environment**, v. 233, p. 123-129, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00219-3](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00219-3).
- LI, L.; ZHENG, B.; LIU, L. Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: definitions, approaches and trends. **Procedia Environmental Sciences**, vol. 2, p. 1510–1524, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2010.10.164>.
- LIMA, L. B. D.; MORAIS, P. B.; ANDRADE, R. L. T.; MATTOS, L. V.; MORON, S. E. Use of biomarkers to evaluate the ecological risk of xenobiotics associated with agriculture. **Environmental Pollution**, v. 237, p. 611–624, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.011>.
- LOSSO, C.; PICONE, M.; NOVELLI, A. A.; DELANEY, E.; GHETTI, P.; GHIRARDINI, A. V. Developing toxicity scores for embryotoxicity tests on elutriates with the sea urchin *Paracentrotus lividus*, the oyster *Crassostrea gigas*, and the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, p. 220–226, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00244-006-0136-x>.
- LUVIZOTTO-SANTOS, R.; ELER, M. N.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; VIEIRA, E. M. O uso de praguicidas nas pisciculturas e pesqueiros situados na bacia do rio Mogi-Guaçu. **Boletim do Instituto de Pesca de São Paulo**, n. 35, v. 3, p. 343 - 358, 2009.

- MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Basiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.
- MAMINDY-PAJANY, Y.; LIBRALATO, G.; ROMÉO, M.; HUREL, C.; LOSSO, C.; GHIRARDINI, A. V.; *et al.* Ecotoxicological evaluation of Mediterranean dredged sediment ports based on elutriates with oyster embryotoxicity tests after composting process. **Water Resource**, v. 44, p. 1986–1994, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.11.056>.
- MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- MARIA, A. N.; CARNEIRO, P. C. F. Criopreservação de sêmen de peixes no Brasil: estado da arte e perspectivas futuras. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 124-131, 2012.
- MARIA, A. N.; CARVALHO, A. C. M.; ARAÚJO, R. V.; SANTOS, J. P.; CARNEIRO, P. C. F.; AZEVEDO, H. C. Use of cryotubes for the cryopreservation of tambaqui fish semen (*Colossoma macropomum*). **Cryobiology**, v. 70, n. 2, p. 109-14, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.02.004>.
- MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327-344, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00674-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00674-4).
- MENDONÇA, J. T. Monitoramento pesqueiro: Avaliação de estratégias de coleta. **Investigação Qualitativa em Ciências Sociais**, v. 7, n. 3, p. 27-36, 2018.
- MONTANHA, F. P.; ASTRAUSKAS, J. P.; KIRNEW, M. D.; NAGASHIMA, J. C.; PIMPÃO, C. T. Degradação de ambientes aquáticos por exposição a compostos químico. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 17, p. 1-12, 2011.
- MONTANHA, F. P.; PIMPÃO, C. T. Efeitos toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em peixes-Revisão. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 18, p. 1–58, 2012.
- MORAES, R. F. **Agrotóxicos no brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – Brasília, Rio de Janeiro, Ipea. 2019.
- NAVARRO-ORTEGA, A.; ACUÑA, V.; BELLIN, A.; BUREK, P.; CASSIANI, G.; CHOUKR-ALLAH, R.; *et al.* Managing the effects of multiple stressors on aquatic ecosystems under water scarcity. The GLOBAQUA Project. **Science of the Total Environment**, v. 503–504, p. 3–9, 2015.
- OLIVEIRA, C. M.; BORGES, E. L.; AMARAL, R. V. A.; CARDOSO, N. A.; SOUSA, R. G. C. Difference in nutritional values between wild and farmed tambaqui in the north region of Brazil. **Food Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 716-721, 2020. <https://doi.org/10.1590/fst.17220>.
- PÁDUA, J. G.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; MELO, S. C. M. **Bancos e coleções de germoplasma da Embrapa: conservação e uso**. (Eds. Técnicos) – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Documentos 371, 2020. 167 p.
- PAVANI, Nilton Dias. **Pesticidas: uma revisão dos aspectos que envolvem esses compostos**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura Plena em Química) – Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2016.
- Associação Brasileira de Piscicultura – PEIXEBR. **Anuário brasileiro da piscicultura PeixeBR 2023**. São Paulo/Brasil. 2023. 65 p. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuario/>>. Acesso em: 11/05/2023.
- PELICICE, F. M.; AZEVEDO-SANTOS, V. M.; VITULE, J. R.; ORSI, M. L.; LIMA-JUNIOR, D. P.; MAGALHÃES, A. L.; POMPEU, P. S.; PETRERE, M.; AGOSTINHO, A. A. Neotropical freshwater fishes imperilled by unsustainable policies. **Fish and Fisheries**, v. 18, n. 6, p. 1119-1133, 2017. <https://doi.org/10.1111/faf.12228>.

- PELICICE, F. M.; BIALETZKI, A.; CAMELIER, P.; CARVALHO, F. R.; GARCÍA-BERTHO, E.; POMPEU, P. S.; *et al.* Human impacts and the loss of neotropical freshwater fish diversity. **Neotropical Ichthyology**, v. 19, n. 3, p. 1-15, 2021. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2021-0134>.
- PERCHEC-POUPARD, G.; GATTI, J. L.; COSSON, J.; JEULIN, C.; FIERVILLE, F.; BILLARD, R. Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 110, p. 315-327, 1997. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1100315>.
- PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. (Org.). **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora da Fiocruz, 2003. p. 21-41.
- PIGNATI, W. A.; LIMA, F. A. N. S.; LARA, S. S.; CORREA, M. L. M.; BARBOSA, J. R.; LEÃO, L. H. C.; *et al.* Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for Health Surveillance. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3281-3293, 2017. <https://doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>.
- REIS, R. E.; ALBERT, J. S.; DI-DARIO, F.; MINCARONE, M. M.; PETRY, P.; ROCHA, L. A. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of Fish Biology**, v. 89, n. 1, p. 12-47, 2016. <https://doi.org/10.1111/jfb.13016>.
- RIBEIRO, N. U. F.; AMÉRICO-PINHEIRO, J. H. P. Peixes como bioindicadores de agrotóxicos em ambientes aquáticos. **Revista Científica ANAP Brasil**, v. 11, n. 22, p. 65-75, 2018. <https://doi.org/10.17271/19843240112220181859>.
- RODRIGUES, A. P. O.; LIMA, A. F.; ALVES, A. L.; ROSA, D. K.; TORATI, L. S.; SANTOS, V. R. V. **Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 440 p.
- SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; ALMEIDA-MONTEIRO, P. S.; NASCIMENTO, R. V. Tecnologia de conservação de sêmen de peixes: resfriamento, congelamento e uso de antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, n. 4, p. 194-199, 2016.
- SANTANA, M. B. M.; CAVALCANTE, R. N. Transformações metabólicas de agrotóxicos em peixes: uma revisão. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 257-268, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/61504>. Acessado em: 10/01/2023.
- SANTOS, M. L. S.; ALVES, I. C. C.; BORDALO, A. O.; MELO, N. F. A. C.; PALHETA, G. D.; SOUZA, R. A. L. Poluição Aquática. In: SOUZA, R. A. L. (Org.). **Ecossistemas aquáticos: tópicos especiais**. 1 ed. Belém, EDUFRA: Universidade Federal Rural da Amazônia, p. 83-110, 2018.
- SANTOS, J. P.; ALMEIDA, S. J. M.; COSTA, C. C.; GUIMARÃES, E. C.; TEIXEIRA, E. G.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Reproductive aspects of freshwater fishes exposed to pesticide-contaminated environments: A systematic review. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 8, n. 19, p. 1155-1168, 2021. [https://doi.org/10.21438/rbgas\(2021\)081935](https://doi.org/10.21438/rbgas(2021)081935).
- SATO, Y.; GODINHO, H. P. Migratory fishes of the São Francisco River. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. (Org.). **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status**. Ottawa: World Fisheries Trust: International Development Research Centre; Washington, D.C.: International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank, 2003. p. 195-232.
- SILVA, J. S.; ROCHA, I. K. B. S.; FREITAS, L. C.; PEREIRA, N. J.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Princípios bioéticos aplicados aos estudos ecotoxicológicos aquáticos. **Revista Bioética**, v. 23, n. 92, p. 409-418, 2015. <https://doi.org/10.1590/1983-80422015232079>.
- SIQUEIRA, T. V. Aquicultura: a nova fronteira para aumentar a produção mundial de alimentos de forma sustentável. **Boletim Regional, Urbano e Ambiental**, n 17, p. 53-60, 2017.

- SUZUKI, H. I.; AGOSTINHO, A. A.; WINEMILLER, K. O. Relationship between oocyte morphology and reproductive strategy in Loricariid catfishes of the Paraná River, Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 57, n. 3, p.791-807, 2000. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2000.tb00275.x>.
- TIERSCH, T. R.; YANG, H.; JENKINS, J. A.; DONG, Q. **Sperm cryopreservation in fish and shellfish**. In: Roldan E, Gomendio M (eds): *Spermatology*, v. 65, 2007. p. 493–508. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- TRUHOUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 1, p. 151-173, 1977.
- UN - United Nations. **The Millenium Development Goals Reports 2015**. UN, New York, USA. 75 pp. 2015.
- VARELA-JUNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; GHELLER, S. M. M.; JARDIM, R. D.; LUCIA-JR, T.; STREIT-JR, D. P.; *et al.* Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology**, v. 78, p. 244-251, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.029>.
- VASSEUR, P. *Les fondements de l'écotoxicologie française. Fiche thématique N°22. HAL Open Science*, 2019. 9 p. <https://hal.inrae.fr/hal-02790713>
- VAZZOLER, A. E. A. de M. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. 1 ed. Maringá - SP, EDUEM, 1996. p. 169
- VIEIRA, L. O.; CAMPOS, D. S.; OLIVEIRA, R. F.; SOUTH, J.; COELHO, M. S. P.; PAIVA, M. J. S.; *et al.* Checklist of the fish fauna of the Munim River Basin, Maranhão, north-eastern Brazil. **Biodiversity Data Journal**, v. 11, n. e98632, 2023. <https://doi.org/10.3897/BDJ.11.e98632>.
- VILLELA, L. C. V.; KIRSCHNIK, L. N. G.; ALVES, A. L.; VARELA, E. S.; REZENDE, F. P.; TORATI, L. S.; *et al.* **Estratégias para conservação de recursos genéticos de peixes nativos de interesse econômico**. 21 ed. Palmas – TO, Documentos – Embrapa Pesca e Aquicultura, 2020. 32 p.
- VIVEIROS, A. T. M. **Criopreservação de sêmen de peixes**. In: XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, v. 16, 2005, Goiânia. Anais... Goiânia, 2005. CD-ROM.
- VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; LEAL, M. C. Biologia e conservação de espermatozoides. **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce. Jaboticabal: FUNEP**, p. 307-327, 2014.
- WAICHMAN, A.V. Uma proposta de avaliação integrada de risco do uso de agrotóxicos no estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 38, n.4, p. 45-50, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672008000100006>.
- WITECK, L.; BOMBARDELLI, R. A.; SANCHES, E. A.; OLIVEIRA, J. D. S.; BAGGIO, D. M.; SOUZA, B. E. Motilidade espermática, fertilização dos ovócitos e eclosão dos ovos de jundiá em água contaminada por cádmio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 3, p. 477-481, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000300003>.

3 CAPÍTULOS

3.1 CAPÍTULO 1. Reproductive aspects of freshwater teleosts exposed to pesticide-contaminated environments: a systematic review

Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade

Status: publicado.

Conceito Qualis Capes (2017-2020): B1

Jadson Pinheiro Santos; Simone de Jesus Melo Almeida; Claryce Cunha Costa; Erick Cristofore Guimarães; Erivânia Gomes Teixeira; Raimunda Nonata Fortes Carvalho-Neta

ABSTRACT

Fish are the predominant group of vertebrates in aquatic environments and they are directly affected by the presence of contaminants in water bodies, which undergo changes in the structure and function of communities and dynamics of the populations. The aim of the present study was to conduct a systematic review of studies that analyze the reproductive aspects of freshwater teleosts in environments contaminated by pesticides. A systematic search for scientific articles was carried out from 2000 to 2019 using the “Web of Science” database, using the descriptors: Fish reproduction, contamination, toxicology, ecotoxicity and biomonitoring, combined with the use of Boolean operators: “And” and “or”. The content analysis was performed based on the titles and the summary, with a first screening. Then, 98 articles were read in full, with 40 being selected. 25 species of fish were recorded, with a predominance of *Danio rerio* (18%). Insecticides were present in 78% of the studies, mainly endosulfan (35%) and cypermethrin (13%). Reproductive Endocrine Disorders were the most reported pathways of action (57.5%). The effects of pesticides on the reproduction of freshwater teleosts are evident, requiring studies on structural changes in gonads and a decrease in the quality of gametes.

INTRODUCTION

The historical development of cities and agricultural growth have accelerated the degradation of natural environments through an increase in the disposal of various contaminants in aquatic environments (BEGUM, 2004; MARQUES & AMERICO-PINHEIRO, 2020). This situation mainly affects freshwater bodies, leading to reduced availability of good-quality water for human supply, in addition to changes in

physicochemical characteristics that support the maintenance of the natural biodiversity of aquatic fauna and flora (MASSARO, 2006; MONTANHA et al., 2012; PASCHOALINI et al., 2019).

The toxicity of industrial and residual chemical compounds originating from agriculture has deleterious effects on both humans and other animals in the environment where they are found, especially fish in aquatic environments (RIBEIRO & AMÉRICO-PINHEIRO, 2018). Often, these effects are not noticed because they do not cause the immediate death of aquatic organisms exposed to contaminants. However, sub lethal concentrations can affect several morphological, physiological and metabolic processes of fish when those contaminants penetrate their organs (LINS et al., 2010).

Fish are the predominant group of vertebrates in aquatic environments, and because they are a food resource frequently used worldwide, they are directly affected by the presence of contaminants in water bodies (PASCHOALINI et al., 2019). It is estimated that there are currently approximately 35,000 fish species, corresponding to more than 50% of vertebrate species (FRICK et al., 2019). Worldwide, fish have great environmental importance for aquatic ecosystems as well as social importance because they are an excellent source of animal protein for riverine populations that depend on the collection of these organisms for food and income generation (FAO, 2020).

Because they occupy different positions in the food chain of aquatic ecosystems, fish are often used as bioindicators of the environmental quality of ecosystems and are indicated as sentinel organisms that respond to changes at various structural levels, including cellular, physiological, biochemical, genetic and histological, and to variations in behavior patterns, which can affect the population structure of the species in response to stressors in the environment (LIMA et al., 2018). With the need to monitor the possible effects of toxic contaminants on aquatic biota, several studies on ecotoxicology have been conducted to evaluate the effect of toxic chemicals at different levels of organization, including cellular structures, individuals, populations and communities (COSTA et al., 2008; DA COSTA PINTO et al., 2020).

The deleterious effects caused by the action of contaminants in organisms propagate through other ecosystem components, causing changes in the structure and function of communities, such as changes in the predator-prey relationship, in ecosystem function or in the characteristics and dynamics of populations, especially migration, stock renewal and reproduction (JONES & REYNOLDS, 1997). Several Neotropical species have external fertilization as a reproductive strategy, which exposes the gametes to the contaminated environment (RODRIGUES et al., 2019). Thus, the entire process of fertilization and

embryonic development can be directly affected by excess contaminants, greatly influencing the reproduction and renewal of fish stocks, causing an environmental imbalance and reduction in species diversity (MONDAL et al., 2015).

However, there are few studies that analyze the reproductive processes of freshwater fish in contaminated environments in an integrated manner, especially with regard to the toxic effects of pesticide residues in water. Thus, the aim of the present study was to conduct a systematic review of studies that analyze the reproductive aspects of freshwater teleosts in contaminated environments, focusing on the description of the toxic effects of pesticide residues on water capable of affecting the reproductive processes of bioindicator/biomonitor species.

MATERIAL AND METHODS

The present review was based on systematized searches of scientific articles that address the topic “influence of environmental contaminants on the reproductive processes of freshwater fish”. For this purpose, thorough searches were conducted in the main collection of the Web of Science database. To better focus the search, the following descriptors were used: fish reproduction, contamination, toxicology, ecotoxicity and biomonitoring. These terms were combined in a systematic search using the Boolean operators “and” and “or”.

The criteria used for article selection included the type of aquatic environment, where only studies on freshwater fish species published between 2000 and 2019 were chosen. Using the 450,671 articles retrieved, a new search was conducted to filter only studies related to “fish reproduction”, reducing the number of articles to 1,176. The articles that met the search criteria were organized in a spreadsheet in Microsoft Excel in chronological order for content analysis, initially performed by reading the titles and abstracts. A first screening was performed, reducing the number of articles from 1,176 to 98.

Next, content analysis of those 98 articles was performed through full reading of the articles, and only those that analyzed the toxic effect of contaminating substances in some of the reproductive stages in fish were selected, resulting in a final set of 40 articles analyzed in this study. The selected articles were consulted to prepare a table containing the main methods and results of each article (authors, year of publication, bioindicator species, contaminant, classification, biomonitoring method used and study site).

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the data of the 40 selected articles that analyzed the toxic effects of pesticides on the reproductive process of freshwater teleosts, covering the period between 2000 and 2019.

Subsequent analyses revealed toxicological studies with teleost fish models, addressing the bioindicator species used as well as the contaminant and its classification, in addition to the degree of exposure in the tests performed in each of the studies (acute or chronic), also emphasizing the mechanisms of action by which the contaminants influenced the reproductive processes indicated. In general, it was possible to classify three classes of pesticides (insecticides, fungicides and herbicides) and seven mechanisms of action: reproductive endocrine disorders (REDs); gene expression (GE); oxidative stress; gonadal histopathology (GH); gonadosomatic index (GSI); sperm quality; and embryonic development (ED).

The reproductive strategies and mechanisms in fish can be directly influenced by several changes in local abiotic characteristics, such as industrial, urban and agricultural pollution (LOWE-McCONNELL, 1999). Year after year, the chronic effects of pesticide toxicity in teleosts cause behavioral changes, reduced growth rates, neurological damage, histopathological changes (in gills, liver, and hematopoietic and endocrine tissues) and reproductive disorders (SABRA & MEHANA, 2015).

A total of 25 fish species were recorded (Figure 1), and *Danio rerio* was the most analyzed, occurring in 18% of the studies, followed by *Cichlasoma dimerus* (15%), *Pimephales promelas* (13%) and *Oryzias latipes* (10%). Characteristics shared by these species include reduced size, short life cycle and split spawning.

In general, small-sized fish with short reproductive cycles, such as those most used in the studies described here, have been targeted in analyses and the development of specific protocols for toxicological tests that evaluate the potential of a chemical to negatively affect fish through endocrine deregulation, mainly associated with reproduction but also secondarily by affecting growth, development and survival (USEPA, 2009; FLYN et al., 2018). However, native species that are already being used in studies with biomarkers of aquatic contamination, such as tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) (CARVALHO NETA et al., 2015), do not appear in the studies analyzed here that focus on the effects of pesticide residues on reproductive processes. Although it is not a small species and has a single spawning event, studies with this and other species that occur naturally in environments impacted by agricultural pesticides are important for evaluating the real effects of contaminants on animal health and the continuity of natural stock renewal.

Of the total contaminants found, 78% were classified as insecticides, 18% as fungicides and 5% as herbicides (Figure 2), based on the descriptions in the articles analyzed. The pesticides most studied in toxicological tests of fish reproductive systems were endosulfan (35%), cypermethrin and DDT (13%) and HCH (8%). Endosulfan is recognized as one of the most dangerous organochlorine pesticides, as are DDT and HCH, and is widely used in several countries as a broad-spectrum insecticide for commercial plantations, with India and Israel as the main producers (DA-CUNÃ et al., 2013). Once in contact with the aquatic biota, endosulfan can affect the normal regulation of numerous biological processes, including fish reproduction (HAN et al., 2011), acting as an endocrine disruptor, which affects hormonal regulation and thus causes reproductive disorders (DA-CUNÃ et al., 2016). In turn, cypermethrin, a type II synthetic pyrethroid insecticide with high efficiency and low residual power with low toxicity for mammals and birds, is also part of the group of pesticides with great toxic potential in fish due to slower metabolism and elimination in fish than in other vertebrates (MOORE et al., 2001; MONTANHA et al., 2012; KUTLUYER et al., 2016).

The mechanisms of action of the pesticides show effects at different levels of toxicity, with reproductive endocrine disorders being the most reported in more than 50% of the analyzed studies. According to Sabra & Mehana (2015), fish exposed to environmental pollutants such as insecticides, herbicides, heavy metals and xenobiotics may suffer disturbances in their natural reproductive processes, potentially resulting in changes such as decreased fertility and histological damage in the testes and in the ovaries (DA-CUNÃ et al., 2011; 2013; MARCON et al., 2015), impairment of the vitellogenesis process and interruption of the steroidogenesis process (SINGH & SINGH, 2008), delayed maturation of the gonads evidenced by changes in the gonadosomatic index (KLEINKAUF et al., 2004; SUMON et al., 2019), changes in reproductive and parental behavior, impaired olfactory response and consequent disturbance of reproductive migrations, and disturbances in the coordination between the courtship behavior of male and female fish and spawning time (JAENSSON et al., 2007).

According to Sánchez Garyzar et al. (2016), when analyzing the effect of chlorothalonil on gene expression in *D. rerio*, there are changes in transcriptional networks associated with reproduction, such as stages that included fertilization, male reproduction and testicular function, after exposure of fish to pesticides. Xiang et al. (2019), who correlated changes in the expression of key genes associated with the endocrine pathways of the reproductive system of *D. rerio* after exposure to cis-bifenthrin, also inferring a reduction in the total motility rate of spermatozoa, observed similar effects. Han et al. (2011) observed intratesticular sperm necrosis in *D. rerio* after exposure to endosulfan, suggesting that the

reductions identified in fertilization rates after prolonged exposures could be due to testicular and sperm damage.

The use of gametes in toxicological bioassays has still been little used in evaluations of the deleterious effects on the reproductive processes of fish exposed to contaminants (LOSSO et al., 2007; MAMINDY-PAJANY et al., 2010). In an acute test study evaluating the toxic effect of cypermethrin on the motility rate and duration of motility in rainbow trout (*O. mykiss*) sperm, the authors observed a high sensitivity of sperm cells to low concentrations of the pesticide (KUTLUYER et al., 2016). Fabroccini et al. (2012) analyzed the feasibility of using cryopreserved sperm cells from *Sparus aurata* in ecotoxicological tests in which sperm cells exposed to cadmium showed significant differences after 2 hours of exposure to the contaminant. Typically, toxicological tests use methodologies that subject a model organism to various concentrations of a chemical over a relatively long period to replicate conditions of chronic exposure (GORMLEY & TEACHER, 2003). However, in many cases of runoff events after heavy rainfall, chemicals can remain in the environment for a short period, requiring an increase in short-term toxicological tests.

The evaluations of parameters that characterize sperm quality, such as motility, are fast and easy to perform, require small sample volumes for testing and do not require specially equipped facilities because they can even be performed as part of field monitoring programs. When cryopreserved, semen can be easily stored and transferred (MARIA & CARNEIRO, 2012; SALMITO-VANDERLEY et al., 2016), allowing numerous opportunities to evaluate samples in future toxicological tests at a time and place based on the needs of the researchers, thus allowing a better standardization strategy for the biomonitoring in contaminated environments (FABBROCCINI et al., 2012).

Final considerations

The effects of pesticides on the reproductive processes of freshwater teleost fish are evident, mainly causing endocrine reproductive disorders, morphological changes in the gonads and a decrease in the quality of gametes. Although the toxic effects of pesticides are often not observed at levels that cause immediate changes in humans, bioaccumulation can be a risk factor for a portion of the population that feed on fish. The indiscriminate use of pesticides by the agricultural sector, especially insecticides such as endosulfan and cypermethrin and those belonging to the dichlorodiphenyltrichloroethane group, can lead to a drastic reduction in the renewal of natural fish stocks in rivers and lakes, which may result in the loss of biodiversity.

Therefore, specific studies using native fish species are essential for defining adequate protocols to be applied by regulatory institutions in requests for the release and use of pesticides in agriculture, with a specific focus on analyses of sperm quality in fish, considering that such assays involve low-cost technique and can be executed in a short period of time.

Understanding the toxic effects and the stages of the biological cycle of non-target species in toxicological tests can lead to discussions for the better management of water with multiple uses, particularly for greater effectiveness in the conservation of the aquatic environment.

Reference

- ANKLEY, G. T.; JENSEN, K. M.; KAHL, M. D.; KORTE, J. J.; MAKYNEN, E. A. (2001). Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(6), 1276–1290.
- ANKLEY, G. T.; JENSEN, K. M.; DURHAN, E. J.; MAKYNEN, E. A.; BUTTERWORTH, B. C.; KAHL, M. D.; VILLENEUVE, D. L.; LINNUM, A.; EARL GRAY, L.; CARDON, M.; WILSON, V. S. (2005). Effects of two fungicides with multiple modes of action on reproductive endocrine function in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*, v. 86, n. 2, p. 300–308
- ANKLEY, G. T.; JENSEN, K. M.; KAHL, M. D.; MAKYNEN, E. A.; BLAKE, L. S.; GREENE, K. J.; JOHNSON, R. D.; VILLENEUVE, D. L. (2007). Ketoconazole in the fathead minnow (*Pimephales promelas*): reproductive toxicity and biological compensation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 26, n. 6, p. 1214.
- AYDIN, R., & KÖPRÜCÜ, K. (2005). Acute toxicity of diazinon on the common carp (*Cyprinus carpio L.*) embryos and larvae. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 82, n. 3, p. 220–225.
- AYDIN, R.; KÖPRÜCÜ, K.; DÖRÜCÜ, M.; KÖPRÜCÜ, S. Ş.; PALA, M. (2005). Acute toxicity of synthetic pyrethroid cypermethrin on the common carp (*Cyprinus carpio L.*) Embryos and Larvae. *Aquaculture International*, v. 13, n. 5, p. 451–458.
- BALASUBRAMANI, A. & PANDIAN, T. J. (2008). Endosulfan suppresses growth and reproduction in zebrafish. *Current Science*, v. 94, n. 7, p. 883-890.
- BEGUM, G. (2004). Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (linn) and recovery response. *Aquatic Toxicology*, n. 66, p. 83-92.

- BENCIC, D. C.; VILLENEUVE, D. L.; BIALES, A. D.; BLAKE, L.; DURHAN, E. J.; JENSEN, K. M.; KAHL, M. D.; MAKYNEN, E. A.; MARTINOVIĆ-WEIGELT, D.; ANKLEY, G. T. (2013). Effects of the insecticide fipronil on reproductive endocrinology in the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 32, n. 8, p. 1828–1834.
- CARVALHO-NETA, R. N. F.; PINHEIRO-SOUSA, D. B.; SOBRINHO, I. C. M.; HORTON, E. Y.; ALMEIDA, Z. S.; TCHAICKA, L.; SOUSA, A. L. (2015) Genotoxic and hematological parameters in *Colossoma macropomum* (Pisces, Serrasalminidae) as biomarkers for environmental impact assessment in a protected area in northeastern Brazil. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 22, p. 15994-16003.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. (2008). A toxicidade em Ambientes Aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1820-1830.
- DA-COSTA-PINTO, A.; DA SILVA MARQUES, L. H. B.; DOS-SANTOS, F. L. B. (2020). Use of bioassay in ecotoxicological evaluation of urban lakes (Paulo Afonso/BA) with *Poecilia reticulata* (Peters, 1859) (Chordata: Teleostei). *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, v. 3, n. 3, p. 1297-1313.
- DA-CUÑA, R. H.; REY VÁZQUEZ, G.; PIOL, M. N.; GUERRERO, N. V.; MAGGESE, M. C.; LO NOSTRO, F. L. (2011). Assessment of the acute toxicity of the organochlorine pesticide endosulfan in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, n. 4, p. 1065–1073.
- DA-CUÑA, R. H.; PANDOLFI, M.; GENOVESE, G.; PIAZZA, Y.; ANSALDO, M.; LO NOSTRO, F. L. (2013). Endocrine disruptive potential of endosulfan on the reproductive axis of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae). *Aquatic Toxicology*, v. 126, p. 299–305.
- DA-CUÑA, R. H.; REY VÁZQUEZ, G.; DORELLE, L.; RODRÍGUEZ, E. M.; GUIMARÃES MOREIRA, R.; LO NOSTRO, F. L. (2016). Mechanism of action of endosulfan as disruptor of gonadal steroidogenesis in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 187, p. 74–80.
- DAOUK, T.; LARCHER, T.; ROUPSARD, F.; LYPHOUT, L.; RIGAUD, C.; LEDEVIN, M.; LOIZEAU, V.; COUSIN, X. (2011). Long-term food-exposure of zebrafish to PCB mixtures mimicking some environmental situations induces ovary pathology and impairs reproduction ability. *Aquatic Toxicology*, v. 105, n. 3-4, p. 270–278.
- EDWARDS, T. M.; TOFT, G.; GUILLETTE, L. J. (2010). Seasonal reproductive patterns of female *Gambusia holbrooki* from two Florida lakes. *Science of the Total Environment*, v. 408, n. 7, p. 1569–1576.

- FABBROCINI, A.; D'ADAMO, R.; DEL PRETE, F.; LANGELLOTTI, A. L.; RINNA, F.; SILVESTRI, F.; SORRENTI, G.; VITIELLO, V.; SANSONE, G. (2012). Cryopreserved semen in ecotoxicological bioassays: Sensitivity and reliability of cryopreserved *Sparus aurata* spermatozoa. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 84, p 293–298.
- FAO (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. 224 p.
- FLYNN, K.; LOTHEBACH, D.; WHITEMAN, F.; HAMMERMEISTER, D.; SWINTEK, J.; ETTERSON, M.; JOHNSON, R. (2018). The effects of continuous diazinon exposure on growth and reproduction in Japanese medaka using a modified Medaka extended one generation reproduction test (MEOGRT). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 162, p. 438–445.
- FRICKE, R., ESCHMEYER, W. N. & R. VAN DER LAAN. (2020). Eschmeyer's catalog of fishes: genera, species, references. Electronic version accessed 20 de novembro 2020. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>).
- GLABERMAN, S.; KIWIET, J.; AUBEE, C. B. (2019). Evaluating the role of fish as surrogates for amphibians in pesticide ecological risk assessment. *Chemosphere*, v. 235, p. 952–958.
- GORMLEY, K. L. & TEATHER, K. L. (2003). Developmental, behavioral, and reproductive effects experienced by Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to short-term exposure to endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 54, n. 3, p. 330–338.
- HAN, Z.; JIAO, S.; KONG, D.; SHAN, Z.; ZHANG, X. (2011). Effects of β -endosulfan on the growth and reproduction of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 30, n. 11, p. 2525–2531.
- HANSON, R.; DODOO, D. K.; ESSUMANG, D. K.; BLAY, J.; YANKSON, K. (2007). The effect of some selected pesticides on the growth and reproduction of fresh water *Oreochromis niloticus*, *Chrysichthys nigrodigitatus* and *Clarias gariepinus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 79, n. 5, p. 544–547.
- JAENSSON, A.; SCOTT, A. P.; MOORE, A.; KYLIN, H.; OLSÉN, K. H. (2007). Effects of a pyrethroid pesticide on endocrine responses to female odours and reproductive behaviour in male parr of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquatic Toxicology*, v. 81, n. 1, p. 1–9.
- JONES, J. & REYNOLDS, J. D. (1997). Effects of pollution on reproductive behaviour of fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 7, p. 463–491.
- KLEINKAUF, A.; CONNOR, L.; SWARBRECK, D.; LEVENE, C.; WALKER, P.; JOHNSON, P. J.; LEAH, R. T. (2004). General condition biomarkers in relation to

contaminant burden in European flounder (*Platichthys flesus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 58, n. 3, p. 335–355.

KUTLUYER, F.; BENZER, F.; ERIŞİR, M.; ÖĞRETMEN, F.; İNANAN, B. E. (2016). The in vitro effect of cypermethrin on quality and oxidative stress indices of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 128, p. 63–67.

LIMA, L. B. D.; MORAIS, P. B.; ANDRADE, R. L. T.; MATTOS, L. V.; MORON, S. E. (2018). Use of biomarkers to evaluate the ecological risk of xenobiotics associated with agriculture. *Environmental Pollution*, v. 237, p. 611–624.

LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. S.; CIRIO, S. M. (2010). Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. *Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais*, v. 8, n. 4, p. 469-484.

LOSSO, C.; PICONE, M.; NOVELLI, A. A.; DELANEY, E.; GHETTI, P. F.; GHIRARDINI, A. V. (2007). Developing toxicity scores for embryotoxicity tests on elutriates with the sea urchin *Paracentrotus lividus*, the oyster *Crassostrea gigas*, and the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 53, p. 220–226.

LOWE-McCONNELL, R.H. (1999). Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. São Paulo, Edusp, 534 p.

MA, Y.-N.; CAO, C.-Y.; WANG, Q.-W.; GUI, W.-J.; ZHU, G.-N. (2016). Effects of azocyclotin on gene transcription and steroid metabolome of hypothalamic pituitary gonad axis, and their consequences on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, v. 179, p. 55–64.

MAMINDY-PAJANY, Y.; LIBRALATO, G.; ROMÉO, M.; HUREL, C.; LOSSO, C.; GHIRARDINI, A. V.; MARMIER, N. (2010). Ecotoxicological evaluation of Mediterranean dredged sediment ports based on elutriates with oyster embryotoxicity tests after composting process. *Water Resistence*, v. 44, p. 1986–1994.

MARCON, L.; MOUNTEER, A. H.; BAZZOLI, N.; BENJAMIN, L. DOS A. (2015). Effects of insecticide Thiodan® on the morphology and quantification of ovarian follicles in lambaris *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) in different treatments. *Aquaculture Research*, v. 47, n. 8, p. 2407–2418.

MARCON, L.; SILVA FILHO, P. B.; LOPES, D. S.; MOUNTEER, A. H.; BENJAMIN, L. A. (2014). O inseticida Thiodan® sobre o desenvolvimento folicular de lambaris. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.44, n. 12, p. 2245-2251.

MARIA, A. N. & CARNEIRO, P. C. F. (2012). Criopreservação de sêmen de peixes no Brasil: estado da arte e perspectivas futuras. *Ciência Animal*, v. 22, n. 1, p. 124-131, 2012.

- MARQUES, M. B. L. & AMÉRICO-PINHEIRO, J. H. P. (2020). Ocorrência de clorpirifós em ambientes aquáticos e seus efeitos ecotoxicológicos em bioindicadores. *Revista Nacional de Gerenciamento de Cidades*, v. 8, n. 65.
- MARTYNIUK, C. J.; DOPERALSKI, N. J.; PRUCHA, M. S.; ZHANG, J.-L.; KROLL, K. J.; CONROW, R.; BARBER, D. S.; DENSLOW, N. D. (2016). High contaminant loads in Lake Apopka's riparian wetland disrupt gene networks involved in reproduction and immune function in largemouth bass. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, v. 19, p. 140–150.
- MASSARO, F. C. (2006). Estudos ecotoxicológicos com *Hydra viridissima* (Cnidaria: Hydrozoa). São Carlos, 2006. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, SP.
- MONDAL, K.; KARMAKAR, B.; HAQUE, S. (2015). A review on effects of pyrethroids pesticides on fresh-water fish behaviour and fish reproduction. *Journal of Global Bioscience*, v. 4 (6), p. 2594-2598.
- MONTANHA, F. P.; GALEB, L. A.G.; MIKOS, J. D.; GANECO, L. N.; PEREIRA, T. P.; TANAKA, A.; KIRSCHNIK, P. G.; PIMPÃO, C; T. (2012). Pyrethroid toxicity in silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 12, p. 1297-1303.
- MOORE, A. & WARING, C. P. (2001). The effects of a synthetic pyrethroid pesticide on some aspects of reproduction in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquatic Toxicology*, v. 52, n. 1, p. 1–12.
- PASCHOALINI, A. L.; SAVASSI, L. A.; ARANTES, F. P.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. (2019). Heavy metals accumulation and endocrine disruption in *Prochilodus argenteus* from a polluted neotropical river. *Ecotoxicology and Environmental. Safety*. 169, 539–550.
- PIAZZA, Y. G.; PANDOLFI, M.; LO NOSTRO, F. L. (2010). Effect of the organochlorine pesticide endosulfan on GnRH and gonadotrope cell populations in fish larvae. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 61(2), 300–310.
- PIAZZA, Y.; PANDOLFI, M.; DA CUÑA, R.; GENOVESE, G.; LO NOSTRO, F. (2015). Endosulfan affects GnRH cells in sexually differentiated juveniles of the perciform *Cichlasoma dimerus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 116, p. 150–159.
- PRASAD, M.; KUMAR, A.; MISHRA, D.; SRIVASTAV, S. K.; SRIVASTAV, A. K. (2010). Alterations in blood electrolytes of a freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* in response to treatment with a botanical pesticide, *Nerium indicum* leaf extract. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 37, n. 3, p. 505–510.
- RIBEIRO, N. U. F.; & AMÉRICO-PINHEIRO, J. H. P. (2018). Peixes como bioindicadores de agrotóxicos em ambientes aquáticos. *Fórum Ambiental*, v. 14, p. 846-856.

- RODRIGUES, G. Z. P.; MACHADO, A. B.; GEHLEN, G. (2019). Influência de metais no comportamento reprodutivo de peixes, revisão bibliográfica. *Revista Geama*, v. 5, n. 1, p. 4-13.
- ROEX, E. W. M.; KEIJZERS, R.; VAN GESTEL, C. A. M. (2003). Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquatic Toxicology*, v. 64, n. 4, p. 451–460.
- SABRA, F. S.; & MEHANA, E-S. E-D. (2015). Pesticides toxicity in fish with particular reference to insecticides. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences*, v. 03, n. 01, p. 40-60.
- SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; ALMEIDA-MONTEIRO, P. S.; NASCIMENTO, R. V. (2016). Tecnologia de conservação de sêmen de peixes: resfriamento, congelação e uso de antioxidantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 40, n. 4, p. 194-199.
- SÁNCHEZ GARAYZAR, A. B.; BAHAMONDE, P. A.; MARTYNIUK, C. J.; BETANCOURT, M.; MUNKITTRICK, K. R. (2016). Hepatic gene expression profiling in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to the fungicide chlorothalonil. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, v. 19, p. 102–111.
- SILVA BARNI, M. F.; GONZALEZ, M.; MIGLIORANZA, K. S. B. (2014). Assessment of persistent organic pollutants accumulation and lipid peroxidation in two reproductive stages of wild silverside (*Odontesthes bonariensis*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 99, p. 45–53.
- SINGH, P. B. & SINGH, V. (2008). Pesticide bioaccumulation and plasma sex steroids in fishes during breeding phase from north India. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 25, n. 3, p. 342–350.
- SUMON, K. A.; SAHA, S.; VAN DEN BRINK, P. J.; PEETERS, E. T. H. M.; BOSMA, R. H.; RASHID, H. (2016). Acute toxicity of chlorpyrifos to embryo and larvae of banded gourami *Trichogaster fasciata*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, v. 52, n. 2, p. 92–98.
- SUMON, K. A.; YESMIN, M. F.; VAN DEN BRINK, P. J.; BOSMA, R. H.; PEETERS, E. T. H. M.; RASHID, H. (2019). Effects of long-term chlorpyrifos exposure on mortality and reproductive tissues of Banded Gourami (*Trichogaster fasciata*). *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, v. 54, n. 7, p. 549–559.
- UREN WEBSTER, T. M.; LAING, L. V.; FLORANCE, H.; SANTOS, E. M. (2014). Effects of glyphosate and its formulation, roundup, on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology*, v. 48, n. 2, p. 1271–1279.

- USEPA. (2009). Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines OPPTS 890.1350: Fish Short-Term Reproduction Assay. United States Environmental Protection Agency – Prevention Pesticides and Toxic Substances, EPA 740-C-09-007, 93 p.
- VELDHOEN, N.; IKONOMOU, M. G.; DUBETZ, C.; MACPHERSON, N.; SAMPSON, T.; KELLY, B. C.; HELBING, C. C. (2010). Gene expression profiling and environmental contaminant assessment of migrating Pacific salmon in the Fraser River watershed of British Columbia. *Aquatic Toxicology*, v. 97, n. 3, p. 212–225.
- VINCZE, K.; GEHRING, M.; BRAUNBECK, T. (2014). (Eco)toxicological effects of 2,4,7,9-tetramethyl-5-decyne-4,7-diol (TMDD) in zebrafish (*Danio rerio*) and permanent fish cell cultures. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, n. 13, p. 8233–8241.
- XIANG, D.; ZHONG, L.; SHEN, S.; SONG, Z.; ZHU, G.; WANG, M.; WANG, Q.; ZHOU, B. (2019). Chronic exposure to environmental levels of cis-bifenthrin: Enantioselectivity and reproductive effects on zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, v. 251, p. 175-184.

Table 1. List of articles analyzed with possible effects of pesticide residues on the reproductive process of freshwater teleosts from the “Web of Science” database.

AUTOR(S)	BIOINDICATOR SPECIES	CONTAMINANT	CLASSIFICATION	DEGREE OF EXPOSURED	MECHANISM OF ACTION	COUNTRY
Ankley et al., (2001)	<i>Pimephales promelas</i>	Methoxychlor	Inseticide	Acute	RED	EUA
Moore et al., (2001)	<i>Salmo salar</i>	Cypermethrin	Inseticide	Acute	RED and ED	UK
Gormley e Teacher (2003)	<i>Oryzias latipes</i>	Endosulfan	Inseticide	Acute	RED and ED	CANADA
Roex et al., (2003)	<i>Danio rerio</i>	Parathion	Inseticide	Chronic	RED	NETHERLANDS
Kleinkauf et al., (2004)	<i>Platichthys flesus</i>	DDT and Hexachlorobenzene	Inseticide and Fungicide	Chronic	RED	UK
Chandra et al., (2004)	<i>Cyprinus carpio</i>	Carbofuran	Inseticide	Chronic	RED	INDIA
Aydin et al., (2005a)	<i>Cyprinus carpio</i>	Cypermethrin	Inseticide	Acute	ED	TURKEY
Ankley et al., (2005)	<i>Pimephales promelas</i>	Prochloraze fenarimol	Fungicide	Acute	RED	EUA
Aydin et al., (2005b)	<i>Cyprinus carpio</i>	Diazon	Inseticide	Acute	ED	TURKEY
Hanson et al., (2007)	<i>Oreochromis niloticus</i> <i>Clarias gariepinus</i> <i>Chrysichthys nigrodigitatus</i>	Lindano, pentaclorofenol (PCP) and propoxur	Fungicide	Acute	GSI	GANA
Ankley et al., (2007)	<i>Pimephales promelas</i>	Ketoconazole	Fungicide	Acute	RED	EUA
Woo et al., (2008)	<i>Oryzias latipes</i>	Iprobenfos	Fungicide	Chronic	GE	KOREA
Singh & Singh (2008)	<i>Rita</i> <i>Mystus tengara</i> <i>Cyprinus carpio</i> <i>Labeo rohita</i>	HCH, DDT, aldrina, endosulfan and Chlorpyrifos	Inseticide	Chronic	RED	INDIA
Balasubramani et al., (2008)	<i>Danio rerio</i>	Endosulfan	Inseticide	Chronic	RED	INDIA
Kim et al., (2008)	<i>Oryzias latipes</i>	Cartap and Cypermethrin	Inseticide and Fungicide	Acute	ED	KOREA
Arellano-Aguilar et al., (2009)	<i>Girardinichthys multiradiatus</i>	Parathion	Inseticide	Chronic	RED and ED	MEXICO
Edwards et al., (2010)	<i>Gambusia holbrooki</i>	DDT, DDE and bifenilos policlorados (PCBs)	Inseticide	Chronic	RED	EUA
Veldhoen et al., (2010)	<i>Oncorhynchus nerka</i> <i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Octacloroestirene, clorobenzenos, DDTs, HCHs and ciclodienos	Inseticide	Chronic	GE	CANADA
Piazza et al., (2011)	<i>Cichlasoma dimerus</i>	Endosulfan	Inseticide	Chronic	RED	ARGENTINA
Han et al., (2011)	<i>Cichlasoma dimerus</i>	Endosulfan	Inseticide	Acute	RED	ARGENTINA
Da-Cunã et al., (2011)	<i>Cichlasoma dimerus</i>	Endosulfan	Inseticide	Acute	GH	ARGENTINA
Montanha et al., (2012)	<i>Rhamdia quelen</i>	Cypermethrin and deltametrin	Inseticide	Acute	ED	BRAZIL

AUTOR(S)	BIOINDICATOR SPECIES	CONTAMINANT	CLASSIFICATION	DEGREE OF EXPOSURED	MECHANISM OF ACTION	COUNTRY
Beyger et al., (2012)	<i>Jordanella floridae</i>	Endosulfan	Inseticide	Acute/chronic	ED	CANADA
Bencic et al., (2013)	<i>Pimephales promelas</i>	Fipronil	Inseticide	Chronic	RED	EUA
Da-Cunã et al., (2013)	<i>Cichlasoma dimerus</i>	Endosulfan	Inseticide	Chronic	RED and GH	GERMANY
Silva-Barni et al., (2014)	<i>Odontesthes bonariensis</i>	Endosulfan and DDT	Inseticide	Chronic	RED	GERMANY
Vincze et al., (2014)	<i>Danio rerio</i>	Tetrametil decynediol	Herbicide	Acute	ED	GERMANY
Webster t al., (2014)	<i>Danio rerio</i>	Glyphosate	Herbicide	Acute	Oxidative stress	UK
Piazza et al., (2015)	<i>Cichlasoma dimerus</i>	Endosulfan	Inseticide	Chronic	RED	ARGENTINA
Da-Cunã et al., (2016)	<i>Cichlasoma dimerus</i>	Endosulfan	Inseticide	Acute	RED	ARGENTINA
Ma et al., (2016)	<i>Danio rerio</i>	Azocyclotin	Fungicide	Chronic	RED	CHINA
Garayzar et al., (2016)	<i>Danio rerio</i>	Clorotalonil	Fungicide	Chronic	GE	CANADA
Martyniuk et al., (2016)	<i>Micropterus salmoides</i>	Methoxychlor	Inseticide	Chronic	GE	EUA
Kutluier et al., (2016)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Cypermethrin	Inseticide	Acute	Oxidative stress and sperm quality	TURKEY
Marcon et al., (2016)	<i>Astyanax bimaculatus</i>	Endosulfan	Inseticide	Acute	GH	BRAZIL
Sumon et al. (2016)	<i>Trichogaster fasciata</i>	Chlorpyrifos	Inseticide	Acute	ED	NETHERLANDS
Flyn et al., (2018)	<i>Oryzias latipes</i>	Diazon	Inseticide	Chronic	RED	EUA
Glaberman et al., (2019)	<i>Pimephales promelas</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Propiconazol	Fungicide	Chronic	RED	EUA
Xiang et al. (2019)	<i>Danio rerio</i>	Cis-bifenthrin	Inseticide	Chronic	RED	EUA
Sumon et al. (2019)	<i>Trichogaster fasciata</i>	Chlorpyrifos	Inseticide	Chronic	HG e GSI	BANGLADESH

*(REDs) Reproductive Endocrine Disorders; (GSI) Gonadosomatic Index; (ED) Embryonic Development; (GE) Gene Expression; (GH) Gonadal Histopathology; (DDT) Dichlorodiphenyltrichloroethane; (DDE) Dichlorodiphenyldichlorethylene; (HCH) Hexachlorocyclohexane.

Figure 1. Main species used in toxicological studies of pesticides in fish reproductive systems.

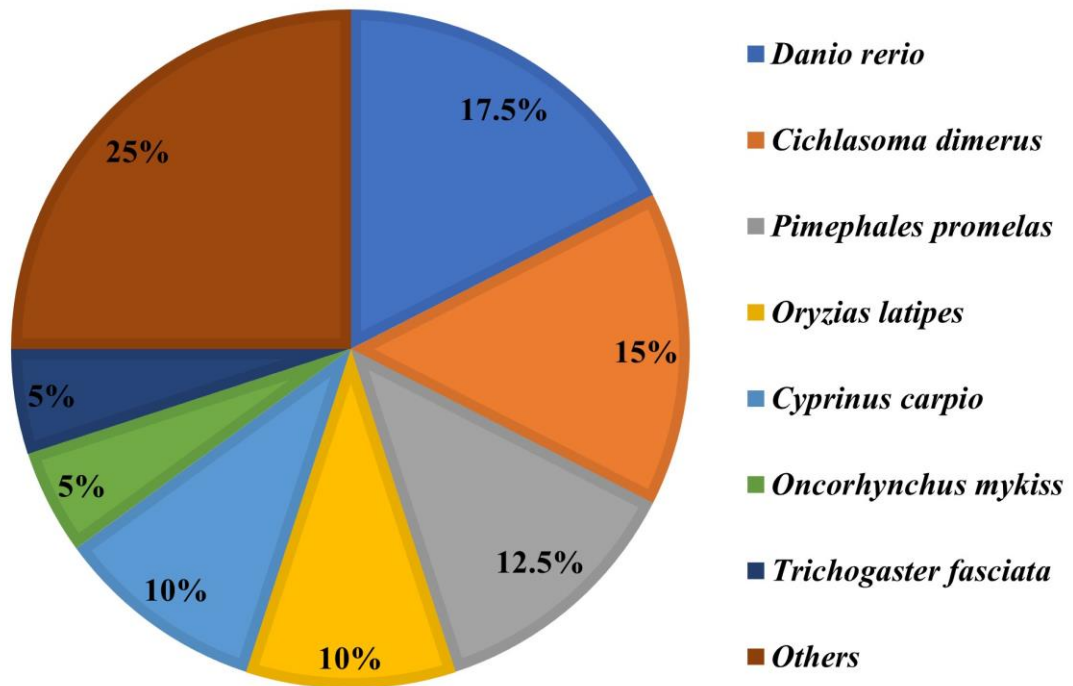
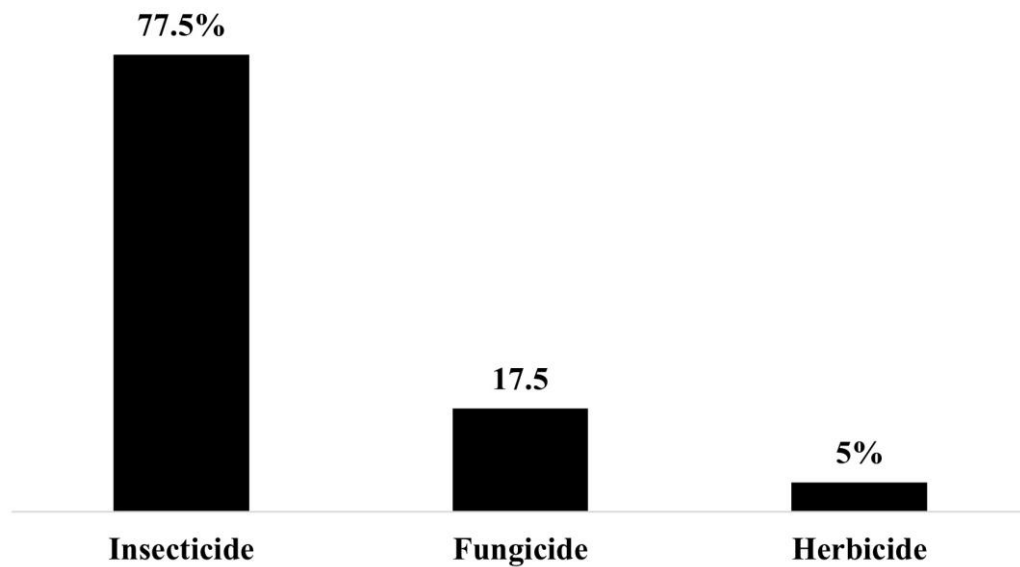


Figure 2. Classification of the most found pesticides according to the description present in the analyzed articles.



3.2 CAPÍTULO 2. Changes in sperm motility of the Amazonian fish tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier 1816) (Teleostei: Serrasalminidae) exposed to two pesticides

Revista Biota Neotropica

Status: Publicado.

Conceito Qualis Capes (2017-2020): B1

ALTERAÇÕES NA MOTILIDADE ESPERMÁTICA DO PEIXE AMAZÔNICO TAMBAQUI *Colossoma macropomum* (Cuvier 1816) (Characiformes: Serrasalminidae) EXPOSTO A DOIS PESTICIDAS

Jadson Pinheiro Santos; Simone de Jesus Melo Almeida; Claryce Cunha Costa; Achilles Nina Santos Ferreira; Erivânia Gomes Teixeira; Erick Cristofore Guimarães; Pâmella Silva de Brito; Felipe Polivanov Ottoni; Raimunda Nonata Fortes Carvalho-Neta

Abstract

The great biodiversity of Neotropical fish species that have external fertilization as a reproductive strategy, like the tambaqui, requires more careful analyzes in toxicological tests of the various pesticides implemented in Brazilian agriculture over the last few years. In this context, the objective of the present work was to evaluate possible sperm alterations in tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen exposed to two different pesticide residues. Seminal samples of sexually mature tambaqui males from a local fish farm were used. Semen was collected eight hours after hormone induction into graduated glass tubes. After initial assessment of the lack of prior activation, the experiment was carried out in a factorial scheme, testing two pesticides widely used in agricultural systems (glyphosate and fenitrothion). For each pesticide, five concentrations were tested (6, 12, 24, 120 and 240 mg/L), with motility analysis at times 0, 30 and 60 seconds after activation. As a control, activation with 0.9% NaCl solution and motility analysis at the same times described for pesticides were used. Results indicate that *in natura* samples exhibited initial motility of $89.2 \pm 4.9\%$ and mean duration of 100 seconds (up to 10% sperm motility). The reduction in sperm motility occurred significantly ($p < 0.05$) after 30 seconds in all concentrations tested, except for the concentration of 240 mg/L because no activation was observed. The tests described here demonstrate that tambaqui semen was sensitive to the process of exposure to pesticide residues, and can be used in biomonitoring analyzes of the aforementioned agricultural pesticides.

Keywords: Agriculture; biomonitoring; ecotoxicology; Amazonian fish; aquatic pollution; seminal quality.

Resumo

A grande biodiversidade das espécies de peixes neotropicais que possuem a fertilização externa como estratégia reprodutiva, a exemplo do tambaqui, exige análises mais criteriosas em testes toxicológicos dos diversos agrotóxicos implementados na agricultura brasileira ao longo dos últimos anos. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar possíveis alterações espermáticas no sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) exposto a resíduos de dois diferentes pesticidas. Foram utilizadas amostras seminais de machos de tambaqui sexualmente maduros provenientes de uma piscicultura local. O sêmen foi coletado oito horas pós indução hormonal em tubos de vidro graduados. Após avaliação inicial de inexistência de ativação prévia, foi realizado o experimento em esquema fatorial, sendo testados dois pesticidas muito utilizados em sistemas agrícolas (glifosato e fenitrotiona). Para cada pesticida foram testadas cinco concentrações (6, 12, 24, 120 e 240 mg/L), com análise da motilidade nos tempos 0, 30 e 60 segundos pós ativação. Como controle, foi utilizada a ativação com solução de NaCl a 0,9% e análise da motilidade nos mesmos tempos descritos para os pesticidas. Resultados indicam que as amostras *in natura* exibiram motilidade inicial de $89,2 \pm 4,9\%$ e tempo de duração médio de 100 segundos (até 10% de motilidade espermática). A redução da motilidade espermática ocorreu de forma significativa ($p < 0,05$) após 30 segundos em todas as concentrações testadas, exceto na concentração de 240 mg/L por não ter sido observada ativação. Os testes aqui descritos demonstram que o sêmen de tambaqui se mostrou sensível ao processo de exposição aos resíduos de pesticidas, podendo ser utilizado em análises de biomonitoramento dos referidos agrotóxicos.

Palavra-chave: Agricultura; biomonitoramento; ecotoxicologia; peixe amazônico; poluição aquática; qualidade seminal.

Introduction

In recent decades, the world has been facing a serious problem: the “Biodiversity Crisis”. As the human population grows exponentially, increasing demand for natural resources, species are becoming extinct both locally and globally, especially in tropical zones of the world, at rates much higher than natural extinction rates. This is caused directly due to human actions, such as pollution, destruction of natural habitats, modification of natural habitats, deforestation, agricultural expansion, overfishing and overhunting, introduction of

exotic species, fragmentation of habitats, among others (Wilson 1985, Savage 1995, Primack & Rodrigues 2001, Brooks et al. 2022, Singh 2002, Brook et al. 2006, Pimm et al. 2006, Laurance 2006, Wheeler 2008, Costa et al. 2012, Pimm et al. 2014, Ceballos et al. 2015). When we compare biodiversity and health of freshwater environments with terrestrial or marine, the scenario is even worse: the so-called "Freshwater Biodiversity Crisis". Although the threats are the same as those already mentioned, the proportional area of freshwater environments is much smaller when compared to terrestrial or marine environments, representing less than 1% of the planet's surface, but comprising a very rich biodiversity. In addition, several human activities are dependent on freshwater, and humanity directly depends on this resource as well (Dudgeon et al. 2006, Darwall et al. 2018, Harrison et al. 2018, Latrubesse et al. 2019, Reid et al. 2019).

Even though the "Biodiversity Crisis" has become an increasingly serious problem, especially the "Freshwater Biodiversity Crisis", due to agricultural expansion, Brazil has arisen as one of the countries that most employ pesticides in the past decades, more expressively from 2002 onwards, showing that we are failing to face and deal appropriately with the "Biodiversity Crisis". This fact raises concerns about the increased use of these substances, mainly due to the possibility of contaminating man and animals (Rembischevsk & Caldas 2018). A fact that hinders the conservation of Brazilian fauna. In this context, the determination of lethal and sublethal doses of pesticides in living organisms should be analyzed in toxicity tests (Ragassi et al. 2017).

In an attempt to monitor the environmental changes caused by the indiscriminate discharge of toxic substances with xenobiotic potential, researchers report the need for ecotoxicological studies as a way to assess the possible aggressions of these substances that are released into the natural environment, such as agricultural pesticides, and their interaction with ecosystems and their biodiversity (Montanha & Pimpão 2012). According to Torres et al. (2017), such indiscriminate release of polluting agents in aquatic environments has become a limiting factor for the continued supply of fish consumer markets, whether from fishing or even aquaculture. In addition to the direct risks to human health, it is possible that fish are being contaminated by toxic products that reach aquatic environments, which may represent an additional risk for their consumers (Waichman 2008).

The tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier 1816) is the most farmed native fish species in the country (PEIXEBR 2022), as it presents a good adaptation to climate conditions, which are considered ideal for round fish species. It is important to emphasize that

the cultivation of native species to supply the market is important to reduce the negative pressures that fishing can exert on the populations of these species, and to prevent the local extinction of species as well. *Colossoma macropomum* presents external fecundation and fertilization, as well as annual reproduction and total spawn, with the river flooding period being the main spawning season for this fish (Vieira et al. 1999). In teleosts with external fertilization such as round fish, when spawning occurs, the gametes are released into the environment for fertilization to occur (Witeck et al. 2011). At that moment, gametes are exposed to various contaminants present in the water, including heavy metals mercury, zinc, lead, copper, and cadmium (Kime & Nash 1999), as well as pesticides leached from the soil by the rain or even by the inadequate disposal of containers and waste (Ferreira 2016), which end up acting as endocrine disruptors in fish (Uren-Webster et al. 2014). Furthermore, these trace elements, at certain levels, can impair sperm motility and oocyte fertilization (Kime 1995), thus causing often irreversible damage to the maintenance of natural stocks renewal and reproductive cycles, and, consequently, to the maintenance of the variability and diversity of fish.

In the past few years, several studies involving the characterization of sperm and embryos from a number of native fish species have generated successful sperm analysis protocols in conjunction with the cryopreservation technique, conservation of cells at low temperatures. This allows the availability throughout the year of biological samples for many species of environmental interest (Viveiros et al. 2009, Carneiro et al. 2012, Salmito-Vanderley et al. 2016), whose usefulness in ecotoxicological tests can now be analyzed. In this context, the objective of the present work was to evaluate possible sperm alterations in the semen of tambaqui *C. macropomum* exposed to two different pesticides, to assess whether these pesticides cause any negative effects that interfere with the reproduction of the species, and, consequently, affecting the maintenance of natural stocks renewal.

Material and Methods

Our study was conducted during the period between January and May of 2021, in the facilities of a fish farm located in the municipality of Santa Inês, State of Maranhão, northeastern Brazil (latitude 03°40'00" south and longitude 45°22'48" west), at approximately 250 km from the capital city of São Luís. Experiments were conducted with the approval of the Ethics Committee for the Use of Animals at the Universidade Estadual do Maranhão (CEUA/UEMA) under license 01200.002200/2015-06(449).

Seminal samples were collected from six males of the tambaqui species *C. macropomum*, selected from the breeding stock of the fish farm and which presented semen release when submitted to gentle pressure in the abdominal region. Then, the fish were placed in masonry tanks, with constant water circulation for subsequent hormonal induction, using 2.0 mg of raw carp pituitary extract – CPE per kg of live fish (Pinheiro et al. 2016).

After 8 hours of hormonal induction, the fish were restrained and their urogenital region was cleaned and dried with a paper towel to avoid contamination (by water, mucus, or urine). Then, semen collection was performed in graduated glass test tubes. Samples were kept in an isothermal box at a temperature ranging from 4 to 6 °C.

Samples were identified and analyzed individually at the fish farm breeding laboratory for absence of sperm motility by observation under a light microscope at 400x magnification. After confirmation that sperm were immobile, 2 µL aliquots of semen from each sample were activated with 100 µL of 0.9% NaCl saline solution for initial characterization, observing the staining, viscosity, initial subjective sperm motility rate and motility duration time, also under an optical microscope with 400x magnification. Samples with subjective motility above 80% were included in the experiment (Santos 2013).

Milt samples of each male were exposed to two pesticides (glyphosate 480 g/L – ISORGAN; and fenitrothion, SUMITHION 500 g/L) at five concentrations (6, 12, 24, 120 e 240 mg/L), with dilution in 0.9% NaCl saline solution. Exposition began with the direct activation of 2 µL aliquots of semen with 100 µL of each of the pesticide dilutions. There was an immediate subjective analysis of sperm motility at times 0 (after homogenization), 30 and 60 seconds after activation/exposure, with the aid of a light microscope with a magnification of 400x, by the same evaluator. As a control treatment, we conducted the analysis of sperm motility after activation with a 0.9% NaCl solution (Santos 2013) with the same analysis times described for pesticide residues.

The chosen experimental design was a factorial test. A statistical analysis was performed through the assessment of means and standard deviations, from which the analysis of variance test (ANOVA) was obtained. When there was observable difference between treatments, the Scott-Knott test was applied, at a significance level of 5% in the statistical program SISVAR 5.7.

Results

During the initial observation period, semen samples from all individuals presented white color and high viscosity. *In natura* samples exhibited an initial motility of $89.2 \pm 4.9\%$ and a mean duration of 100 seconds (up to 10% of sperm motility). The activations were carried out at environmental temperature (27-29°C) and the solutions containing pesticide residues showed a pH ranging from 5.2 to 5.5 for Glyphosate and from 5 to 5.7 for Fenitrothion, based on the value of 5.9 for NaCl.

From the tested treatments with direct exposure of semen to pesticide residues, it was possible to observe the effect of exposing tambaqui semen to residues of glyphosate (Figure 1) and fenitrothion (Figure 2) soon after exposure. All treatments showed a significant reduction ($p < 0.05$) when compared to sperm activated only with 0.9% NaCl, with more deleterious effects at concentrations above 24 mg/L glyphosate, and sperm agglutination at a concentration of 240 mg/L, it is not possible to attribute sperm motility rate subjectively.

Discussion

Glyphosate is an herbicide belonging to the organophosphate group and is classified as a low toxic product (Class IV) (ANVISA 2021), widely used mainly in plant cultures, such as rice, potatoes, bananas, onions, corn, pastures, soybeans, ornamental shrubs, and flowers, at different stages of development. Changes in body structure, early hatching of eggs, embryo mortality and larval depigmentation are indicative of the toxic effects of these substances (Sanchez 2015).

Lopes et al. (2014), in an experiment conducted with fish *Danio rerio* (Hamilton 1822), observed that sperm exposed for 24 and 96 hours to 5 and 10 mg/L of glyphosate exhibited a decrease in motility and in its duration. Moreover, according to these authors, individuals that were subjected to higher concentrations for a prolonged period showed functional and membrane changes in sperm mitochondria, as well as a reduction in DNA integrity, indicating that glyphosate is a highly dangerous agent for the reproduction of this species, and even harming others.

The tambaqui species is considered a biological model due to its resilience to environmental changes (Val & Oliveira 2021). It has been pointed out as a bioindicator of environmental pollution and used in several toxicological studies, such as the assessment of genotoxic and hematological parameters (Carvalho-Neta et al. 2015), and branchial lesions and erythrocytic abnormalities (Castro et al. 2019), both using individuals from an

environmental protection area from the Upaon-Açu island, State of Maranhão, northeastern Brazil. Regarding agricultural defensives specifically, studies carried out with tambaqui by Cunha et al. (2018) indicated alteration and damage of nuclear erythrocytes in the gills and liver of tambaqui exposed to pesticides such as deltamethrin.

As observed for glyphosate, sperm motility rates were significantly reduced ($p < 0.05$) after direct activation in all tested concentrations of fenitrothion (figure 2), with no sperm motility being verified at a concentration of 240 mg/L right after direct activation (time 0). Fenitrothion, also belonging to the group of organophosphates, is a class II insecticide (moderate toxicity) widely used in pest control (Milanez et al. 2007). In Brazil, it has been used in agriculture since 1959, authorized in cotton, onion, chrysanthemum, apple, and soy crops, to control ants (ANVISA 2021). In aquaculture, it is used to control insect larvae, just as already reported in Bangladesh, India, to combat the tiger beetle (Rahma et al. 2020). Even considering their history of use in Brazilian agriculture and livestock, there are few organophosphates and pesticides in general that are authorized by the national legislation for fish farming (Tavechio et al. 2009), with no formal authorization or indication of the use of Fenitrothion in aquaculture being recorded.

Agricultural pesticides, mainly pyrethroids and organophosphates, have been largely used in Brazil since the 1990s, with the main objective of providing increases in agricultural production by combating pests that, if not controlled, can exterminate the entire crop in a short period of time (Moraes 2019). However, while these substances bring benefits to agriculture, the number of studies that prove the ecotoxicological effects of pesticides on human and animal health, especially those living in aquatic environments, is undeniable (Montanha & Pimpão 2012, Santana & Cavalcante 2016, Ribeiro & Américo-Pinheiro 2018).

Several species of Neotropical fish employ external fecundation and fertilization as a reproductive strategy, with total discharge of male and female gametes in the water (Witeck et al. 2011), a fact that provides a large exposure of gametes to the contaminated environment (Rodrigues et al. 2019). As a result, the entire fertilization process, from sperm motility to embryonic development, can be directly affected by excess contaminants, such as pesticide residues leached from the soil by rain, or even by inadequate disposal of containers and residues (Kime & Nash 1999, Ferreira 2016). These contaminants greatly influence the reproduction and renewal of fish species stocks, which can lead to an environmental imbalance and a reduction in species diversity (Mondal et al. 2015).

Amazonian fish known as round fish, such as the tambaqui *Colossoma macropomum*, and the pirapitinga *Piaractus brachipomus* (Cuvier 1818), as well as their hybrids, have become the most important native species of Brazilian fish farming, especially in the North and Northeast regions of the country (Muniz et al. 2008, PEIXEBR 2021), due to their good adaptation to the climatic conditions found in those regions, which are considered ideal for these species. They are species that have external fecundation and fertilization, with annual and total reproduction, with the river flooding period being the main spawning season for this group of fish (Vieira et al. 1999). In captivity, they are reproduced through the hormonal induction technique, using raw Carp Pituitary Extract – CPE (Maria et al. 2011), in addition to synthetic hormones.

Normally, the action of organophosphates occurs through the irreversible inhibition of enzyme acetylcholinesterase (AChE), responsible for the degradation of acetylcholine, the main neurotransmitter in the central nervous system of insects (Barboza et al. 2018). In this sense, organophosphates are widely used in fish farms to control fish parasites, as well as to combat insect larvae of order Odonata, which have the habit of preying on fish larvae and causing financial damage to producers (Fortunato et al. 2020). Despite being efficient in combating and chemically controlling dragonfly nymphs and other insects, organophosphates have been proven to be considerably toxic (Queiroz 2017).

Organophosphates combined with pyrethroids are already used both in agriculture and in livestock, as the mixture of both promotes synergism in their actions (Trevis et al. 2010). In a study to assess the toxic effect of the mixture between organophosphates and pyrethroids in *Pimephales promelas* larvae, it was observed that the combination resulted in high toxicity (Wheelock et al. 2005), demonstrating the importance of conducting studies aimed at evaluating the application of the mixture of these two pesticides in aquatic environments.

In a recent study published by Santos et al. (2021), when evaluating the toxic effects of pesticides on the reproductive processes of freshwater fish based on articles published from 2000 to 2019, they observed that insecticides were present in 78% of the studies, mainly endosulfan (35%) and cypermethrin (13%), which are classified respectively as organochlorine and pyrethroid. The authors also highlighted that the most reported routes of action in the studies (57.5%) were reproductive endocrine disorders, with changes ranging such as decreased fertility due to histological damage to testicles and ovaries; impairment of the vitellogenesis process and interruption in the steroidogenesis process; delay in gonad maturation evidenced by alterations in the gonadosomatic index; alteration in reproductive

and parental behavior; compromised olfactory response and consequent disorder in reproductive migrations; as well as disturbances in the coordination of courtship behavior of male and female fish and spawning time (Jaensson et al. 2007, Singh & Singh 2008, Marcon et al 2015, Sumon et al. 2019).

Our study is the first one reporting the use of sperm cells from native Neotropical fish (tambaqui) directly exposed to pesticides in ecotoxicological tests. Tests demonstrated that these organisms are highly susceptible to changes that can be caused by contact with pesticide residues, such as glyphosate and fenitrothion. Therefore, the presence of pesticides in freshwater environments can interfere in the reproduction of tambaqui fishes, and consequently, in the renewal of this fish species stocks. However, the determination of a protocol for analysis must be conducted, as to standardize the techniques and to express a result that can be taken into consideration by competent government bodies that mediate requests for the authorization of use of new chemical substances as agricultural pesticides in Brazil. In addition, we believe that the results here obtained would be extrapolated to other native species that have a similar reproductive cycle or biology, helping us to understand how contaminants generated by agricultural production can affect the reproduction of these species, and how can we adopt conservation actions to prevent this.

Acknowledgment

We thank the Institutional Program of Scientific Scholarships at UEMA, the AQUAPESC fish farm, and FAPEMA for financing our project.

References

- ANVISA. Regularização de produtos – agrotóxicos: monografias autorizadas. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2021. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas-por-letra>
- BARBOZA, H.T.G., NASCIMENTO, X.P.R., FREITAS-SILVA, O., SOARES, A.G. & DA-COSTA, J.B.N. 2018. Compostos Organofosforados e seu Papel na Agricultura. *Revista Virtual de QUímica*, 10(1): 172-193.
- BROOKS, T.M., MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, C.G., FONSECA, G.A.B., RYLANDS, A.B., KONSTANT, W.R., FLICK, P., PILGRIM, J., OLDFIELD, S., MAGIN, G. & HILTON-TAYLOR, C. 2002. Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conserv. Biol.* 16: 909–923.
- BROOK, B.W., BRADSHAW, C.J.A., KOH, L.P. & SODHI, N.S. 2006. Momentum drives the crash: mass extinction in the tropics. *Biotropica* 38: 302–305.
- CARNEIRO, P.C., AZEVEDO, H.C., SANTOS, J.P. & MARIA, A.N. 2012. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. *CryoLetters* 33(5): 385-393.

- CARVALHO-NETA, R.N.F., PINHEIRO SOUSA, D.B., MACÊDO-SOBRINHO, I.C., HORTON, E.Y., ALMEIDA, Z.S., TCHAICKA, L. & SOUSA, A.L. 2015. Genotoxic and hematological parameters in *Colossoma macropomum* (Pisces, Serrasalminidae) as biomarkers for environmental impact assessment in a protected area in northeastern Brazil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22(20): 15994–16003.
- CASTRO, J.S., SODRÉ, C.F.L., SOUZA, C.B., PINHEIRO-SOUSA, D.B. & CARVALHO-NETA, R.N.F. 2019. Histopathological and hematological biomarkers in tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) from an environmental protection area of Maranhão, Brazil. *Rev. Ambient. e Água* 14(1): 1–10.
- CBRA. 1998. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte, CBRA.
- CEBALLOS, G., EHRLICH, P.R., BARNOSKY, A.D., GARCÍA, A., PRINGLE, R.M. & PALMER, T.M. 2015. Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Sci. Adv.* 1(5): e1400253.
- CUNHA, F.S., SOUSA, N.C., SANTOS, R.F.B., MENESES, J.O., COUTO, M.V.S., ALMEIDA, F.T.C., SENA-FILHO, J.G., CARNEIRO, P.C.F., MARIA, A.N. & FUJIMOTO, R.Y. 2018. Deltamethrin-induced nuclear erythrocyte alteration and damage to the gills and liver of *Colossoma macropomum*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25(15): 1–10.
- DARWALL, W., BREMERICH, V. & DE WEVER, A. 2018. The Alliance for Freshwater Life: A global call to unite efforts for freshwater biodiversity science and conservation. *Aquatic. Conserv.: Mar. Freshw. Ecosyst.* 28: 1015–1022.
- DUDGEON, D., ARTHINGTON, A.H., GESSNER, M.O., KAWABATA, Z., KNOWLER, D.J., LÉVÊQUE, C., NAIMAN, R.J., PRIEUR-RICHARD, A., SOTO, D., STIASSNY, M.L.J. & SULLIVAN, C.A. 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol. Rev.* 81: 163–182.
- EL-SAYED, Y.S. & SAAD, T.T. 2007. Subacute intoxication of a deltamethrin-based preparation (Butox ® 5% EC) in monosex Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 102: 293-299.
- FERREIRA, L.S.V. 2016. Efeitos histopatológicos dos agrotóxicos deltametrina, imidacloprido, glifosato e diuron nas brânquias de quatro espécies de peixes amazônicos. Dissertação de mestrado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, INPA, Manaus.
- FORTUNATO, M.H.T., MELO, C.L. & MENDES, H.F. 2020. Piscicultura brasileira e a influência da ordem Odonata: uma revisão. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR* 23(1): 1-7.
- HARRISON, I., ABELL, R., DARWALL, W., THIEME, M.L., TICKNER, D. & TIMBOE, I. 2018. The freshwater biodiversity crisis. *Science* 362(6421): 1369.
- JAENSSON, A., SCOTT, A.P., MOORE, A., KYLIN, H. & OLSÉN, K.H. 2007. Effects of a pyrethroid pesticide on endocrine responses to female odours and reproductive behaviour in male parr of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquat. Toxicol.* 81(1): 1–9.
- KIME, D. E. 1995. The effects of pollution on reproduction in fish. *Rev. Fish. Biol. Fisher.* 5: 52-96.
- KIME, D.E. & NASH, J.P. 1999. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. *Sci. Total Environ.* 233: 123-129.

- LATRUBESSE, E.M., ARIMA, E., FERREIRA, M. E., NOGUEIRA, S. H., WITTMANN, F., DIAS, M.S., DAGOSTA, F.C.P. & BAYER, M. 2019. Fostering water resource governance and conservation in the Brazilian Cerrado biome. *Conserv. Sci. Pract.* 1(e77): 1-8.
- LAURANCE, W.F. 2006. Have we overstated the tropical biodiversity crisis? *Trends Ecol. Evol.* 22(2): 65-70.
- LOPES, F.M., JUNIOR, A.S.V., CORCINI, C.D., DA SILVA, A.C., GUAZZELLI, V.G., TAVARES, G. & ROSA, C.E. 2014. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. *Aquat. Toxicol.* 155: 322-326.
- MARCON, L., MOUNTEER, A.H., BAZZOLI, N. & BENJAMIN, L. DOS A. 2015. Effects of insecticide Thiodan® on the morphology and quantification of ovarian follicles in lambaris *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) in different treatments. *Aquac. Res.* 47(8): 2407–2418.
- MARIA, A.N., AZEVEDO, H.C., SANTOS, J.P. & CARNEIRO, P.C.F. 2011. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. *Zygote* 20(1): 39-43.
- MILANEZ, T.V., NAKANO, V.E., KUSSUMI, T.A., ROCHA, S.B. & TOLEDO, H.H.B. 2007. Determinação de fenitrotiona em farinha de trigo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 66(2): 108-112.
- MONDAL, K., KARMAKAR, B. & HAQUE, S. 2015. A review on effects of pyrethroids pesticides on fresh water fish behaviour and fish reproduction. *Glob. J. Bio-Sci. Biotechnol.* 4(6): 2594-2598.
- MONTANHA, F.P., PIMPÃO, C.T. & TITULAR-PUCPR, M.V. 2012. Efeitos toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em peixes-Revisão. *Rev. Cient. Eletrônica Med. Vet.* 18: 1-58.
- MOORE, A. & WARING, C.P. 2001. The effects of a synthetic pyrethroid pesticide on some aspects of reproduction in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquat. Toxicol.* 52(1): 1–12.
- MORAES, R.F. 2019. Agrotóxicos no brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – Brasília, Rio de Janeiro, Ipea.
- MUNIZ, J.A.S.M., CATANHO, M.T.J.A. & SANTOS, A.J.G. 2008. Influência do fotoperíodo natural na reprodução induzida do tambaqui, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818). *Bol. Inst. Pesca* 34(2): 205 – 211.
- PEIXEBR. Associação Brasileira da Piscicultura. Anuário PeixeBR da Piscicultura 2021. 2022. Edição Texto Comunicação Corporativa. São Paulo, São Paulo.
- PIMM, S., RAVEN, P., PETERSON, A., ŞEKERCIOĞLU, Ç.H. & EHRLICH, P.R. 2006. Human impacts on the rates of recent, present, and future bird extinctions. *PNAS* 103(29): 10941–10946.
- PIMM, S.L., JENKINS, C.N., ABELL, R., BROOKS, T.M., GITTLEMAN, J.L., JOPPA, L.N., RAVEN, P.H., ROBERTS, C.M. & SEXTON, J.L. 2014. The Biodiversity of species and theirs rates of extinctions, distributions and protection. *Science* 344(6187): 1246752.
- PINHEIRO, J.P.S., LEITE-CASTRO, L.V., OLIVEIRA, F.C.E., LINHARES, F.R.A., LOPES, J.T. & SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. 2016. Qualidade do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) criopreservado em diferentes concentrações de gema de ovo. *Ciênc. Anim. Bras.* 17(2): 267-273.

- PRIMACK, R.B, RODRIGUES, E. 2001. *Biologia da conservação*. Editora Rodrigues, Londrina.
- QUEIROZ, J.C. 2017. Controle químico de ninfas de libélula (Insecta, Odonata) durante a larvicultura do jundiá (*Rhamdia quelen*). Dissertação de mestrado (Zootecnia - Setor de Ciências Agrárias), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Paraná.
- RAHMAN, M.S., SUMON, K.A., UDDIN, M.J. & SHAHJAHAN, M. 2020. Toxic effects of fenitrothion on freshwater microcosms in Bangladesh. *Toxicol. Rep.* 7: 1622–1628.
- RAGASSI, B., AMÉRICO-PINHEIRO, J.H.P. & SILVA-JUNIOR, O.P. 2017. Ecotoxicidade de agrotóxicos para algas de água doce. *Ver. Cient. ANAP Brasil* 10(19).
- REID, A.J., CARLSON, A.K., CREED, I.F., ELIASON, E.J., GELL, P.A., JOHNSON, P.T.J., KIDD, K.A., MACCORMACK, T.J., OLDEN, J.D., ORMEROD, S.J., SMOLL, J.P., TAYLOR, W.W., TOCKNER, K., VERMAIRE, J.C., DUDGEON, D. & COOKE, S.J. 2019. Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biol. Rev.* 94: 849–873.
- REMBISCHEVSK, P. & CALDAS, E.D. 2018. Agroquímicos para controle de pragas no Brasil: análise crítica do uso do termo agrotóxico como ferramenta de comunicação de risco. *Vigil. Sanit. Debate* 6(4): 2-12.
- RIBEIRO, N.U.F. & AMÉRICO-PINHEIRO, J.H.P. 2018. Peixes como bioindicadores de agrotóxicos em ambientes aquáticos. *Fórum Ambient.* 14: 846-856.
- RODRIGUES, G.Z.P., MACHADO, A.B. & GEHLEN, G. 2019. Influência de metais no comportamento reprodutivo de peixes, revisão bibliográfica. *Rev. Geama* 5(1): 4-13.
- SALMITO-VANDERLEY, C.S.B., ALMEIDA-MONTEIRO, P.S. & NASCIMENTO, R.V. 2016. Tecnologia de conservação de sêmen de peixes: resfriamento, congelação e uso de antioxidantes. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 40(4): 194-199.
- SANCHEZ, J.A.A. 2015. Efeitos comparativos de herbicidas à base de glifosato sobre parâmetros oxidativos e qualidade espermática no peixe estuarino *Jenynsia multidentata*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- SANTANA, M.B.M. & CAVALCANTE, R.N. 2016. Transformações metabólicas de agrotóxicos em peixes: uma revisão. *Orbital: Electron. J. Chem.* 8(4): 257-268.
- SANTOS, J. P. 2013. *Cinética espermática e fertilização de ovócitos de Tambaqui Colossoma macropomum com sêmen in natura e criopreservado*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.
- SANTOS, J.P., ALMEIDA, S.J.M., COSTA, C.C., GUIMARÃES, E.C., TEIXEIRA, E.G. & CARVALHO-NETA, R.N.F. 2021. Reproductive aspects of freshwater fishes exposed to pesticide-contaminated environments: A systematic review. *Revista GeAS*, 8(19): 1155-1168.
- SAVAGE J. M. 1995. Systematics and the Biodiversity Crisis. *BioScience* 45(10): 673-679.
- SINGH, P.B. & SINGH, V. 2008. Pesticide bioaccumulation and plasma sex steroids in fishes during breeding phase from north India. *Environ. Toxicol. Phar.* 25(3): 342–350.
- SINGH, J.S. 2022. The biodiversity crisis: a multifaceted review. *Curr. Sci.* 82(6): 638-647.
- SUMON, K.A., YESMIN, M.F., VAN DEN BRINK, P.J., BOSMA, R.H., PEETERS, E.T.H.M. & RASHID, H. 2019. Effects of long-term chlorpyrifos exposure on mortality and reproductive tissues of Banded Gourami (*Trichogaster fasciata*). *J. Environ. Health, Part B* 54 (7): 549–559.

- TAVECHIO, W.L.G., GUIDELLI, G. & PORTZ, L. 2009. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em Piscicultura. Bol. Inst. Pesca 35(2): 335 - 341.
- TORRES, I. A., SILVA, T.M.F., RODRIGUES, L.S., SILVA, I.J., COSTA, T.A., SOTO-BLANCO, B., MELO, M.M. 2017. Physicochemical analysis of water, sediment and riparian vegetation of a fish farming located in an agroindustrial area at the border of Ribeirão da Mata (Minas Gerais, Brazil). Eng. Sanit. Ambient. 22(4): 773-780.
- TREVIS, D., HABR, S.F., VAROLI, F.M. & BERNARDI, M.M. 2010. Toxicidade aguda do praguicida organofosforado diclorvos e da mistura com o piretróide deltametrina em *Danio rerio* e *Hyphessobrycon bifasciatus*. Bol. Inst. Pesca 36(1): 53–59.
- VAL, A.L. & OLIVEIRA, A.M. 2021. *Colossoma macropomum* - A tropical fish model for biology and aquaculture. J. Exp. Zool. A. Ecol. Genet. Physiol. 00: 2536.
- VENTURIERI, R. & BERNARDINO, G. 1999. Hormônios na reprodução artificial de peixes. Rev. Pan. Aqu. 9(55): 39-48.
- VIEIRA, E.F., ISAAC, V.J. & FABRÉ, N.N. 1999. Biologia reprodutiva do tambaqui, *Colossoma macropomum* CUVIER, 1818, (Teleostei, Serrasalminae), no baixo Amazonas, Brasil. Acta Amazon. 29(4): 625-638.
- VIVEIROS, A.T.M., ORFÃO, L.H., MARIA, A.N. & ALLAMAN, I.B. 2009. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. Anim. Reprod. Sci. 112: 293–300.
- WAICHMAN, A.V. 2008. Uma proposta de avaliação integrada de risco do uso de agrotóxicos no estado do Amazonas, Brasil. Acta Amazon. 38(1): 45-50.
- UREN-WEBSTER, T.M., LAING, L.V., FLORANCE, H. & SANTOS, E.M. 2014. Effects of Glyphosate and its Formulation, Roundup, on Reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*). Environ. Sci. Technol. 48(2): 1271–1279.
- WHEELER, D.Q. 2008. The New Taxonomy. The Systematics Association, Special Volume Series 76, CRC Press, New York.
- WHEELLOCK, C.E., SHAN, G. & OTTEA, J. 2005. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. J. Pestic. Sci. 30: 75–83.
- WILSON, E.O. 1985. The biological diversity crisis: a challenge to science. Issues Sci. Technol. 2: 20–29.
- COSTA, W.J.E.M., AMORIM, P.F. & MATTOS, J.L.O. 2012. Species delimitation in annual killifishes from the Brazilian Caatinga, the *Hypsolebias flavicaudatus* complex (Cyprinodontiformes: Rivulidae): implications for taxonomy and conservation. Syst. Biodivers. 10(1): 71-91.
- WITECK, L., BOMBARDELLI, R.A., SANCHES, E.A., OLIVEIRA, J.D.S., BAGGIO, D.M. & SOUZA, B.E. 2011. Motilidade espermática, fertilização dos ovócitos e eclosão dos ovos de jundiá em água contaminada por cádmio. Rev. Bras. Zootecn. 40(3): 477-481.

Figure 1. Percent sperm motility (mean $\pm$ standard error) of Tambaqui semen exposed to different concentrations of glyphosate.

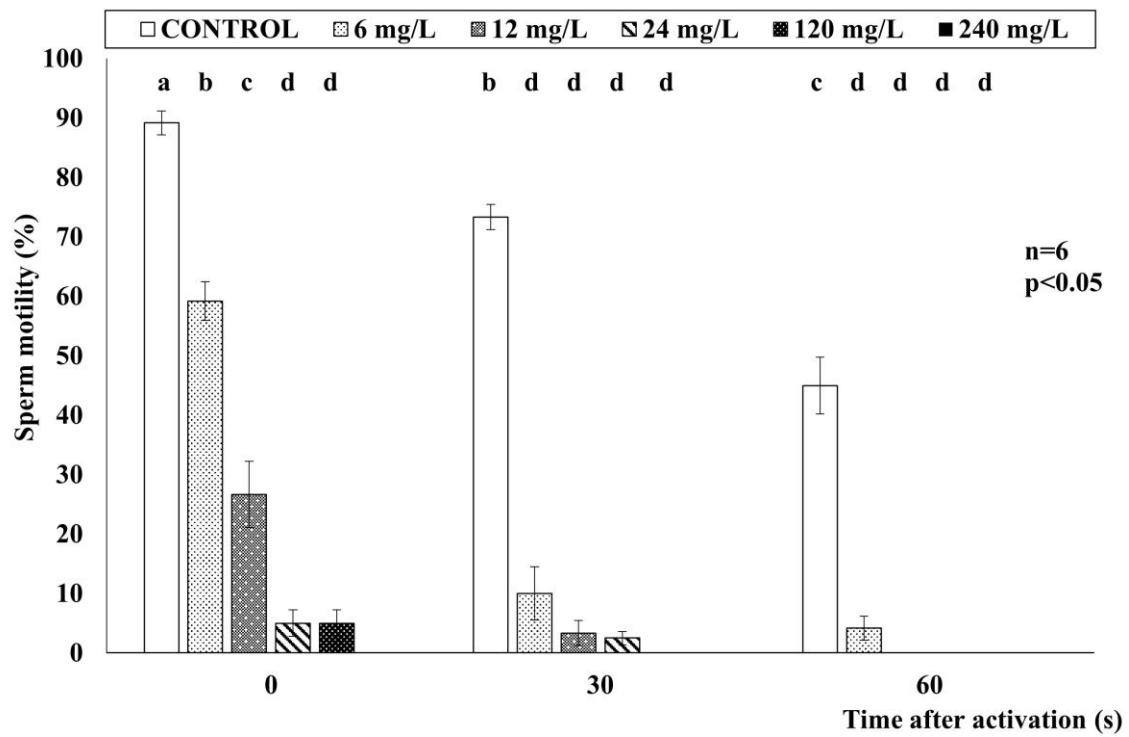
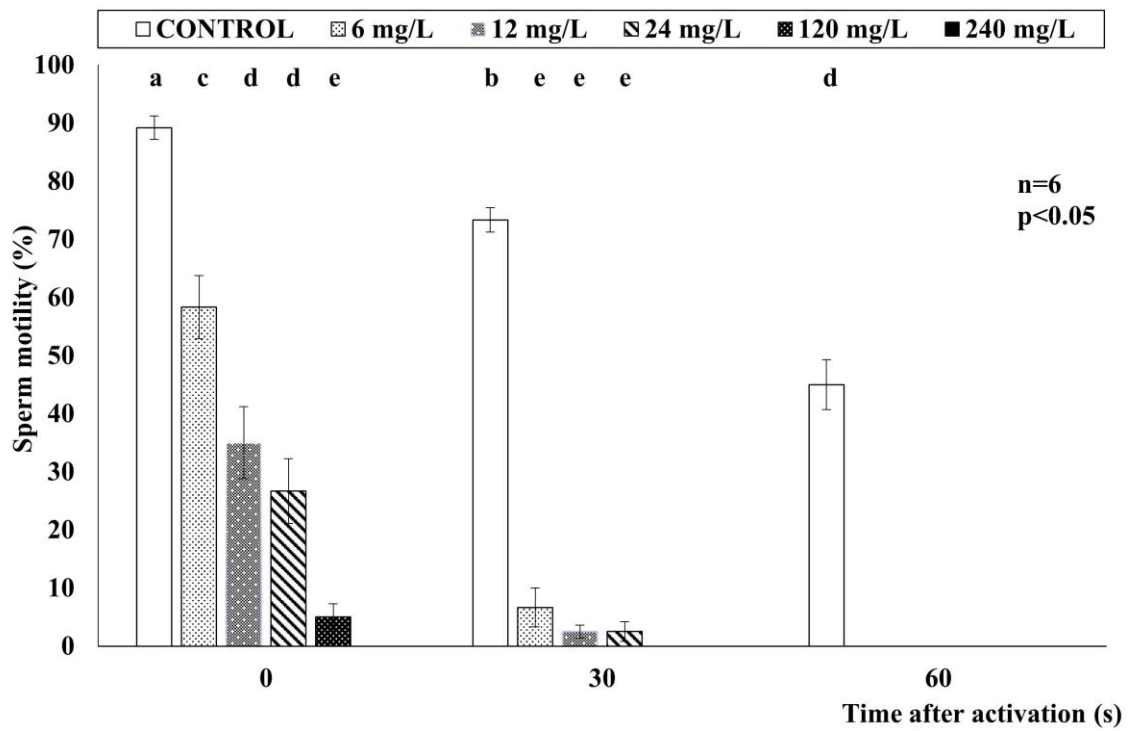


Figure 2. Percent sperm motility (mean $\pm$ standard error) of Tambaqui semen exposed to different concentrations of fenitrothion.



3.3 CAÍTULO 3. Exposição de espermatozoides criopreservados de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier 1816) (Teleostei: Serrasalminidae) ao glifosato

Aquatic Ecotoxicology

Status: a ser submetido.

Resumo

Estudos recentes demonstram a possibilidade de uso de células espermáticas de peixes nativos em testes ecotoxicológicos. No entanto, existe uma lacuna para o fornecimento constante de células espermáticas tendo em vista que muitas das espécies de peixes comercialmente produzidas e domesticadas reproduzem-se apenas uma vez ao longo do ano. O presente trabalho objetivou caracterizar alterações na motilidade de espermatozoides criopreservados de tambaqui *Colossoma macropomum* expostos ao glifosato. Foram utilizadas amostras seminais de oito machos selecionados e induzidos hormonalmente. A coleta foi feita entre 220 e 240 horas-grau pós-indução, sendo feita análise de inativação espermática, com posterior análise da qualidade do sêmen *in natura*, sendo selecionadas as amostras com motilidade subjetiva superior a 80%. Nos procedimentos para congelamento, foi utilizada a adição de uma solução crioprotetora contendo 70% de glicose (5%), 10% de DMSO e 5% gema de ovo, diluídos na proporção de 1:10 (sêmen:solução crioprotetora). O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 mL após período de estabilização de 20 minutos. Em seguida, foi iniciada a etapa de congelamento com a inserção de *racks* contendo as palhetas em botijão tipo *dry-shipper*, com transferência das *racks* para estocagem em botijão de nitrogênio líquido após 2 horas. Para a caracterização inicial das amostras de sêmen, foram verificadas as taxas de motilidade subjetiva nos tempos 0, 30 e 60 segundos pós ativação com o NaCl a 0,9% (controle). Alíquotas de 1 µL de sêmen foram fixadas em solução de formol citrato para posterior análise de concentração espermática e morfologia espermática. Os testes de exposição foram realizados com ativação direta de 2 µL de sêmen em 50 µL de soluções contendo glifosato nas concentrações de 6, 12, 24, 120 e 240 mg/L. Na sequência, realizou-se teste de motilidade espermática subjetiva nos tempos 0, 30 e 60 segundos pós ativação. Não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) entre os tempos 0 e 30 segundos no tratamento controle, com redução apenas para 60 segundos. Para os resíduos de glifosato, houve diferença significativa ($p<0,05$) em todas as concentrações em relação ao controle. No entanto, quando feitas comparações entre as concentrações dos resíduos de glifosato, não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$). Os resultados aqui apresentados demonstram a possibilidade de uso do sêmen criopreservado de tambaqui em ensaios ecotoxicológicos.

Palavras-chave: Biomonitoramento aquático, Ecotoxicologia, Peixe amazônico

Introdução

A conservação do sêmen e de embriões de peixes é praticada em todo o mundo por diversos pesquisadores e técnicos com muitas espécies, como por exemplo, a criopreservação do sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum* (CARNEIRO *et al.*, 2012; VARELA-

JUNIOR *et al.* 2012; SANTOS, 2013), com o objetivo principal de formação de bancos de germoplasmas com o propósito de conservação dos recursos genéticos. Apesar disso, a perda da biodiversidade em nossos rios está em constante crescimento, principalmente pelo uso indiscriminado de substâncias tóxicas que, por sua vez, entram em contato direto (e indireto) com os organismos aquáticos (SANTOS *et al.*, 2021).

Todos os anos milhões de hectares de terra são convertidos para trabalhos agropecuários e urbanos, acarretando desmatamentos, poluição doméstica, industrial e agrícola. Em paralelo as mudanças do território, uma quantidade diversa de resíduos que são liberados na natureza provoca sérios problemas toxicológicos (MONTANHA; PIMPÃO, 2012). Entre os vários produtos que são despejados direto no ecossistema, como rios e lagos, sem nenhum tipo de tratamento, os agrotóxicos são dos mais utilizados com o objetivo de controlar pragas na agricultura. No entanto, os animais aquáticos acabam sendo expostos aos agrotóxicos devido à ingestão de alimentos contaminados, através das superfícies corpóreas e por meio das brânquias que absorvem esses elementos químicos (NAKAGOME; NOLDIN; RESGALLA JUNIOR, 2006).

Estudos ecotoxicológicos com uso de organismos aquáticos têm se intensificado com destaque para as análises dos processos fisiológicos, como nutrição e respiração. As brânquias dos organismos aquáticos estão em contato direto com o meio, tornando-se essencialmente susceptíveis a diversos contaminantes, causando-lhes alterações morfofisiológicas (CANTANHÊDE, *et al.*, 2014). Outros processos, como crescimento e reprodução, podem ser afetados em função dos peixes desenvolverem mecanismos limitantes e compensatórios que demandam energia em resposta à exposição a agente tóxico (FERREIRA, 2016).

Por possuir fecundação e fertilização externas, o tambaqui, espécie de peixe nativo da ordem Characiformes mais cultivada do país (STREIT-JUNIOR. *et al.*, 2012), está sujeito ao efeito de diversos contaminantes presentes na água, entre eles, os metais pesados como mercúrio, zinco, chumbo, cobre e cádmio (KIME e NASH, 1999), além de agrotóxicos lixiviados nos solos de áreas agrícolas ou até mesmo pelo descarte inadequado dos vasilhames e embalagens (FERREIRA, 2016). Os agrotóxicos, principalmente piretróides, como a deltametrina, e organofosforados como o glifosato e a fenitrotiona, são amplamente utilizados no país, para prover incrementos na agricultura e combater as pragas que, se não controladas, podem gerar prejuízos à cultura em um curto espaço de tempo (MORAES, 2019).

Segundo levantamento realizado por Santos et al. (2021), os efeitos dos agrotóxicos no processo reprodutivo dos peixes podem ser expressos desde distúrbios endócrinos reprodutivos, alterações na expressão gênica, alterações gonadais, no desenvolvimento embrionário e na qualidade espermática. Esse último, ainda pouco estudado, já foi avaliado por Kutluyer et al. (2016) em teste agudo para avaliar o efeito tóxico da cipermetrina na taxa de motilidade e duração da motilidade em espermatozoides de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), sendo observada alta sensibilidade das células espermáticas mesmo em baixas concentrações do agrotóxico.

O desenvolvimento de novas tecnologias de produção como a criopreservação, proporciona maior controle sobre os processos chave como na larvicultura, o que se traduz em melhoria da produtividade e qualidade do pescado (ALVES et al., 2014; SIQUEIRA, 2017). A contaminação dos ambientes aquáticos pode levar a perda da diversidade de peixes e, conseqüentemente, afetar todo o ambiente. Além disso, pode alcançar espécies de interesse comercial comprometendo sua disponibilidade e higidez do pescado. Em complementação e considerando as questões relacionada à saúde e bem-estar animal, há a necessidade de serem estabelecidos testes ecotoxicológicos mais práticos sem a exposição direta dos peixes para avaliar os efeitos desses contaminantes.

O teste de toxicidade aguda em peixes não é compatível com a maioria das legislações atuais de bem-estar animal pelo fato de que a mortalidade é o ponto final primário, o que levanta a hipótese de que os peixes sofrem angústia e talvez dor (LAMMER et al., 2009). Uma das alternativas mais promissoras para testes de toxicidade aguda em substituição ao uso dos peixes vivos é o teste de toxicidade em embriões e larvas de zebrafish (*Danio rerio*), já incluídos como componente obrigatório na rotina de testes de efluentes na Alemanha desde 2005, contando ainda com padronização certificada em nível internacional (ISO, 2007).

Novas biotecnologias, como a criopreservação de sêmen, estão disponíveis, o que pode tornar os testes toxicológicos ainda mais acessíveis. A criopreservação é uma técnica de grande interesse para a piscicultura, tendo em vista que a técnica permite preservar esse material genético em baixas temperaturas, para que a estrutura e a função das células e tecidos vivos sejam mantidas, sendo geneticamente viáveis e reversivelmente inativas do ponto de vista metabólico (PEGG, 2007). Em se tratando de questões bioéticas, o uso de sêmen de peixes em ensaios ecotoxicológicos se torna prioritário devido a possibilidade de refinar a pesquisa com uso de vertebrados, reduzindo assim a necessidade da exposição de indivíduos

vivos aos testes, fatores que podem acelerar os trâmites em avaliações por comitês de ética em experimentação animal ou até mesmo excluir essa exigência por parte dos comitês.

Nos últimos anos, diversos estudos envolvendo a caracterização de espermatozoides e embriões de diferentes organismos aquáticos resultaram em protocolos exitosos que, aliados às técnicas de criopreservação, armazenam células em baixas temperaturas, permitindo acesso durante todo o ano, independentemente da disponibilidade natural dos espécimes, como por exemplo, na utilização em bioensaios (SILVA *et al.*, 2015). Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar alterações na motilidade de espermatozoides criopreservados de tambaqui *Colossoma macropomum* expostos ao agrotóxico glifosato.

Material e métodos

Caracterização da área de estudo

A área de estudo está localizada no município de Santa Inês-MA, distante cerca de 250 km de São Luís, capital do Maranhão, e é explorada principalmente por diversas pisciculturas, desde a produção de alevinos até a engorda, fase final do pescado. Os exemplares foram capturados em tanques escavados da Piscicultura AQUAPESC. Após captura e seleção, oito peixes machos de tambaqui, foram transportados até o laboratório de reprodução da piscicultura e acondicionados em tanques de alvenaria com circulação constante de água, para posterior indução hormonal e espermição.

Indução hormonal, coleta e análise do sêmen

Os peixes foram induzidos com 2 mg de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) por kg de peixe. A coleta de sêmen foi feita 220 e 240 horas-grau pós-indução, iniciando com a contenção do animal sobrepondo uma toalha sobre sua cabeça e, em seguida, fazendo a limpeza da região abdominal de cada indivíduo com papel toalha afim de se evitar contaminações por fezes, urina, sangue e/ou água. Após a limpeza, foi feita massagem abdominal no sentido cranio-caudal para a retirada do sêmen que foi estocado em tubos de vidro graduados. Imediatamente, os tubos foram armazenados em caixa térmica com gelo com temperatura aproximada de 5°C para verificação da imobilidade inicial dos espermatozoides, sendo descartadas amostras com ativação prévia ou que apresentaram motilidade espermática subjetiva inicial inferior a 80%.

Nos procedimentos para congelamento, foi adicionada uma solução crioprotetora constituída por um diluidor, sendo utilizada solução de glicose a 5%, um crioprotetor intracelular, conhecido como DMSO (dimetilsulfóxido), e um crioprotetor extracelular, a gema de ovo (MARIA *et al.*, 2010; SANTOS, 2013). Após a diluição, as amostras passaram por um período de estabilização de 20 minutos, sendo inseridos posteriormente em palhetas de 0,5 mL e acondicionados em racks metálicos, seguindo para o processo de congelamento em botijão de vapor de nitrogênio do tipo *dry-shipper*. Após duas horas, os racks com as palhetas foram transferidos para um botijão de nitrogênio líquido para o armazenamento. O descongelamento foi feito em um banho-maria a 60 °C durante 8 segundos, sendo transferidos para microtubos e estocados em temperatura ambiente para as análises.

A análise de concentração e morfologia espermáticas do sêmen *in natura* e do sêmen criopreservado foi realizada nas instalações do Laboratório de Ictiofauna e Piscicultura Integrada – LABIPI, da Universidade Estadual do Maranhão. As amostras foram avaliadas em microscópio de luz com aumento de 1.000x e uso do óleo de imersão. Para a concentração espermática, alíquotas de 10 µL de sêmen fixado foram adicionadas em câmara hematómica de Neubauer, onde foram contados 5 campos em cada lado da câmara e o número de espermatozoides contados expressos em bilhões de espermatozoides por mL, de acordo com contagem proposta pelo Manual de Exame Andrológico (CBRA, 1998).

Para a análise da morfologia espermática, foram selecionados 3 µL do sêmen fixado, produzindo-se três esfregaços por amostra que foram corados com 3 µL de corante rosa de Bengala. Posteriormente, as lâminas foram observadas em microscópio de luz com óleo de imersão (aumento de 1.000x), para contagem e classificação de pelo menos 200 espermatozoides de acordo com procedimento descrito em Maria et al. (2010).

Na tabela 1 são apresentados os dados referentes à caracterização espermática dos reprodutores de tambaqui *C. macropomum*, os quais possuíam peso médio de 8 kg com tempo médio de vida entre 4 e 8 anos. As amostras de sêmen apresentaram coloração esbranquiçada, com volume médio de 2,2 mL e concentração média de $6,9 \times 10^9$ espermatozoides.mL⁻¹. A motilidade subjetiva do sêmen *in natura* apresentou uma porcentagem média de $91,7 \pm 2,9\%$, com os dados referentes a cinco reprodutores. Cerca de 76% dos espermatozoides nas amostras apresentaram-se normais, com maiores frequências de espermatozoides apresentando flagelo dobrado, seguidas de flagelo fraturado.

Tabela 1. Parâmetros de qualidade espermática do sêmen de tambaqui *C. macropomum* (média±desvio-padrão).

Parâmetro	<i>In natura</i>	Descongelado
Volume (mL)		2,2±0,8
Motilidade subjetiva (%)	91,7±2,9	60±6%
Concentração espermática (spz x 10 ⁹ .ml ⁻¹)	5,0±1,2	-
Morfologia espermática (%)		
Espermatozoides normais	86,9±5,9	76±7
Cabeça isolada	1,4±0,8	1±1
Cabeça degenerada	0,3±0,3	1±1
Microcefalia	0,2±0,2	0±0
Macrocefalia	0,5±0,0	1±1
Peça intermediária degenerada	0,5±0,8	0±0
Flagelo dobrado	6,0±3,2	13±4
Flagelo enrolado	2,5±2,5	2±2
Flagelo fortemente enrolado	0,6±0,2	2±1
Flagelo fraturado	1,1±0,5	3±1
Total de anormalidades	13,1±5,9	23±11

Exposição do sêmen de tambaqui criopreservado ao glifosato pós descongelamento

Após o sêmen ser devidamente coletado e armazenado, deu-se início ao processo de exposição aos resíduos de glifosato no Laboratório de Reprodução Animal na Universidade Estadual do Maranhão. Após a verificação da inexistência de ativação inicial dos espermatozoides, 2 µL de cada amostra de sêmen foram ativadas com 50 µL de solução fisiológica de NaCl a 0,9% quando foi avaliada a motilidade subjetiva inicial em microscópio de luz com aumento de 400x, sendo descartadas as amostras com motilidade inferior a 50%. Seleccionadas as amostras de cinco machos, foi dado prosseguimento para a caracterização inicial da qualidade espermática, sendo verificadas as taxas de motilidade subjetiva nos tempos 0, 30 e 60 segundos pós-ativação com o NaCl a 0,9%. Alíquotas de 1 µL de sêmen descongelado foram fixadas em solução de formol-citrato para posterior análise da morfologia espermática.

Além da ativação das células espermáticas com NaCl, utilizou-se a ativação espermática direta com uso de soluções contendo resíduos de glifosato nas concentrações de 6, 12, 24, 120 e 240 mg/L. Logo em seguida, realizou-se teste de motilidade espermática de forma subjetiva, como descrito por Santos et al. (2023).

Análise de dados

Os dados foram tabulados no software Excel, com as taxas de motilidade subjetiva expressas em porcentagem (média±desvio-padrão). Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância e, quando observada diferença entre os tratamentos, aplicou-se o teste Scott-Knott, com nível de significância de 5% no programa estatístico Sisvar 5.7.

Resultados e discussão

Com base nos tratamentos testados, foi possível observar o efeito da exposição do sêmen de tabaqui a resíduos de glifosato ao longo do tempo, conforme a tabela 2. A redução da motilidade espermática ocorreu de forma imediata assim que houve a exposição as concentrações do herbicida, sendo observada diferença significativa ($p < 0,05$) em todas as concentrações testadas em relação ao controle (NaCl 0,9%). No entanto, quando feitas comparações entre as concentrações do agrotóxico, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$). Ao longo do tempo, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) nas análises de motilidade subjetiva apenas na concentração de 6 mg/L de glifosato e para o NaCl a 0,9% após 60 segundos de ativação.

Tabela 2. Redução da motilidade espermática subjetiva (%) do sêmen descongelado de tabaqui exposto a resíduos de glifosato.

TRATAMENTO	TEMPO (s)		
	0	30	60
CONTROLE (NaCl 0,9%)	58±6%Aa	50±9%Aa	20±14%Ab
6 mg/L	31±15%Ba	17±10%Ba	5±5%Ab
12 mg/L	13±10%Ba	6±5%Ba	3±3%Aa
24 mg/L	8±11%Ba	4±5%Ba	5±3%Aa
120 mg/L	-	-	-
240 mg/L	-	-	-

*Médias seguidas de letra maiúsculas diferentes nas colunas e de letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Modificações na estrutura corporal, na eclosão antecipada de ovos, mortalidade de embriões e despigmentação de larvas são indicativos dos efeitos tóxicos dessas substâncias (SANCHEZ, 2015). Mais recentemente, Santos *et al.* (2023) demonstraram os efeitos nocivos da exposição de espermatozoides de tabaqui aos pesticidas glifosato e fenitrotiona, em que a taxa de motilidade espermática reduziu imediatamente após a exposição aos resíduos dos

agrotóxicos e evoluiu com o aumento das concentrações, indicando a possibilidade do uso de células espermáticas em estudos ecotoxicológicos.

O tambaqui já foi utilizado em diversos estudos toxicológicos e citado como bioindicador de poluição ambiental, considerando parâmetros genotóxicos e hematológicos verificados por Carvalho-Neta *et al.* (2015) e lesões branquiais e anormalidades eritrócíticas observadas por Castro *et al.* (2019), ambos a partir de indivíduos provenientes de uma área de preservação ambiental na Ilha de São Luís, Maranhão. Em se tratando especificamente de agrotóxicos, os estudos feitos por Cunha *et al.* (2018) indicaram alteração e dano de eritrócitos nucleares nas brânquias e fígados de tambaqui expostos à deltametrina.

Diversas espécies de peixes neotropicais possuem como estratégia reprodutiva a fecundação e fertilização externas, com eliminação total dos gametas masculinos e femininos na água (WITECH *et al.*, 2011), fato que acarreta uma grande exposição ao ambiente contaminado (RODRIGUES *et al.*, 2019). Com isso, todo processo de fertilização, desde a motilidade espermática até o desenvolvimento embrionário, pode ser afetado diretamente pela presença de contaminantes, como os resíduos de agrotóxicos lixiviados nos solos pelas chuvas, ou pelo descarte inadequado dos vasilhames e embalagens (KIME; NASH, 1999; FERREIRA, 2016), influenciando sobremaneira na reprodução e renovação dos estoques de espécies de peixes, o que pode levar a um desequilíbrio ambiental e redução da diversidade de espécies (MONDAL *et al.*, 2015).

Contribuições significativas têm sido relatadas com o uso da criopreservação do sêmen de peixes na preservação e disponibilização dos gametas masculinos no longo prazo (CARNEIRO, 2007) e para a reprodução artificial de muitas espécies nativas, como por exemplo *Salminus brasiliensis* (CAROLSFELD *et al.*, 2003), *Brycon orbignyanus* (MARIA, 2005; CAROLSFELD *et al.*, 2003) e *Colossoma macropomum* (CARNEIRO *et al.*, 2012; VARELA-JUNIOR *et al.*, 2012; MARIA *et al.*, 2015).

Diferentemente do encontrado em experimentos com o sêmen *in natura*, o aumento da concentração dos resíduos de glifosato na ativação do sêmen descongelado não apresentou alterações significativas ($p > 0,05$) na motilidade espermática, sugerindo menor sensibilidade ao composto. A qualidade do sêmen pós-descongelamento depende do tipo e concentração do crioprotetor intracelular utilizado, como também da combinação entre o crioprotetor, diluente e diluição (VIVEIROS *et al.*, 2009). O diluente, geralmente uma solução rica em sais e/ou carboidratos, promove o aumento do volume de sêmen, facilitando sua distribuição em doses,

e atua como fonte de energia para o espermatozoide pós-descongelado (SALMITO-WANDERLEY *et al.*, 2016). Por outro lado, os crioprotetores possuem como função proteger as células espermáticas dos efeitos deletérios provocados pela criopreservação, fatores esses que, em combinação com o suprimento de energia pelos diluidores, podem ter reduzido o efeito tóxico do glifosato nos espermatozoides pós-descongelamento.

Referências

- ALVES, A. L.; VARELA, E. S.; MORO, G. V.; KIRSCHNIK, L. N. G. **Riscos genéticos da produção de híbridos de peixes nativos**. Documentos Embrapa Pesca e Aquicultura, n. 3, 2014. 60 p.
- CANTANHÊDE, S. M.; MEDEIROS, A. M.; FERREIRA, F. S.; FERREIRA, J. R. C.; ALVES, L. M. C.; CUTRIM, M. V. J.; SANTOS, D. M. S. **Uso de biomarcador histopatológico em brânquias de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque Ecológico Laguna da Jansen, São Luís-MA**. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 66, n. 2, p. 593–601, 2014.
- CARNEIRO, P. C. F. **Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 31, p. 361–366, 2007.
- CARNEIRO, P. C. F.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; MARIA, A. N. **Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods**. Cryoletters, v. 33, p. 385–393, 2012.
- CAROLSFELD, J.; GODINHO, H. P.; ZANIBONI-FILHO, E.; HARVEY, B. J. **Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation**. Journal of Fish Biology, v. 63, p. 472–489, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00170.x>
- CARVALHO-NETA, R. N. F.; PINHEIRO SOUSA, D. B.; MACÊDO-SOBRINHO, I. C.; HORTON, E. Y.; ALMEIDA, Z. S.; TCHAICKA, L.; SOUSA, A. L. **Genotoxic and hematological parameters in *Colossoma macropomum* (Pisces, Serrasalminidae) as biomarkers for environmental impact assessment in a protected area in northeastern Brazil**. Environmental Science and Pollution Research, v. 22, n. 20, 15994–16003, 2015.
- CASTRO, J. S.; SODRÉ, C. F. L.; SOUZA, C. B.; PINHEIRO-SOUSA, D. B.; CARVALHO-NETA, R. N. F. **Histopathological and hematological biomarkers in tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) from an environmental protection area of Maranhão, Brazil**. Revista Ambiente & Água, v. 14, n. 1, 1–10, 2019.
- CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte, CBRA. 1998.
- CUNHA, F. S.; SOUSA, N. C.; SANTOS, R. F. B.; MENESES, J. O.; COUTO, M. V. S.; ALMEIDA, F. T. C.; et al. **Deltamethrin-induced nuclear erythrocyte alteration and damage to the gills and liver of *Colossoma macropomum***. Environmental Science and Pollution Research, n. 25, v. 15, p. 15102–15110, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1622-1>.
- FERREIRA, L. S. V. **Efeitos histopatológicos dos agrotóxicos deltametrina, imidacloprido, glifosato e diuron nas brânquias de quatro espécies de peixes amazônicos**. 2016. 50 f. Dissertação (Mestrado Biologia de Água Doce e Pesca Interior) – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA, Manaus, 2016.

ISO. **Water Quality - Determination of the acute toxicity of wastewater to zebrafish eggs (*Danio rerio*)**. ISO n. 15088, 2007.

KIME, D. E. & NASH, J. P. **Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish**. *The Science of the Total Environment*, v. 233, p. 123–129, 1999.

LAMMER, E.; CARR, G. J.; WENDLER, K.; RAWLINGS, J. M.; BELANGER, S. E.; & BRAUNBECK, T. **Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test?** *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 149, n. 2, p. 196–209, 2009. doi:10.1016/j.cbpc.2008.11.006

MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 71 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; SILVA, C. A.; CARNEIRO, P. C. F. **Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum***. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 26, p. 779–783, 2010.

MARIA, A. N.; CARVALHO, A. C. M.; ARAÚJO, R. V.; SANTOS, J. P.; CARNEIRO, P. C. F.; AZEVEDO, H. C. **Use of cryotubes for the cryopreservation of tambaqui fish semen (*Colossoma macropomum*)**, *Cryobiology*, v. 70, n. 2, p. 109–114, 2015.

MONDAL, K.; KARMAKAR, B.; HAQUE, S. **A review on effects of pyrethroids pesticides on fresh-water fish behaviour and fish reproduction**. *Journal of Global Bioscience*, v. 4, n. 6, p. 2594–2598, 2015.

MONTANHA, F. P. & PIMPÃO, C. T. **Efeitos toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em peixes-Revisão**. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, n. 18, p. 1–58, 2012.

MORAES, R. F. **Agrotóxicos no brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – Brasília, Rio de Janeiro, Ipea. 2019.

NAKAGOME, F.; NOLDIN, J. A.; RESGALLA JUNIOR, C. **Toxicidade aguda e análise de risco de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura do arroz irrigado sobre o cladóceros *Daphnia magna***. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 16, p. 93–100, 2006.

PEGG, D. E. Principles of Cryopreservation. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Ed). **Methods in molecular biology: Cryopreservation and freeze-drying protocols**. 2ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc. v. 368, p. 39–58, 2007.

RODRIGUES, G.Z.P.; MACHADO, A.B.; GEHLEN, G. **Influência de metais no comportamento reprodutivo de peixes, revisão bibliográfica**. *Revista Geama*, v. 5, n. 1, p. 4–13, 2019.

SALMITO-VANDERLEY, C.S.B.; ALMEIDA-MONTEIRO, P.S.; NASCIMENTO, R.V. **Tecnologia de conservação de sêmen de peixes: resfriamento, congelamento e uso de antioxidantes**. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 40, n. 4, p. 194–199, 2016.

SANCHEZ, J. A. A. **Efeitos comparativos de herbicidas à base de glifosato sobre parâmetros oxidativos e qualidade espermática no peixe estuarino *Jenynsia multidentata*** (Master's thesis). 2015.

- SANTOS, J. P. **Cinética espermática e fertilização de ovócitos de Tambaqui *Colossoma macropomum* com sêmen in natura e criopreservado**. 2013. 74 f. Dissertação (mestrado em Biotecnologia em Recursos Naturais) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2013.
- SANTOS, J. P.; ALMEIDA, S. J. M.; COSTA, C. C.; GUIMARÃES, E. C.; TEIXEIRA, E. G.; CARVALHO-NETA, R. N. F. **Reproductive aspects of freshwater fishes exposed to pesticide-contaminated environments: A systematic review**. Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade, v. 8, n. 19, p. 1155–1168, 2021.
- SANTOS, J. P.; FERREIRA, A. N. S.; ALMEIDA, S. J. M.; COSTA, C. C.; GUIMARÃES, E. C.; TEIXEIRA, E. G.; CARVALHO-NETA, R. N. F. **Changes in sperm motility of the Amazonian fish Tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier 1816) (Characiformes: SERRASALMIDAE) exposed to two pesticides**. Biota Neotropica, v. 23, n. 2, e20231471, 2023. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2023-1471>
- SILVA, J. S.; ROCHA, I. K. B. S.; FREITAS, L. C.; PEREIRA, N. J.; CARVALHO-NETA, R. N. F. **Princípios bioéticos aplicados aos estudos ecotoxicológicos aquáticos**. Revista Bioética, v. 23, n. 92, p. 409–418, 2015. <https://doi.org/10.1590/1983-80422015232079>.
- SIQUEIRA, T. V. **Aquicultura: a nova fronteira para aumentar a produção mundial de alimentos de forma sustentável**. Boletim Regional, Urbano e Ambiental do Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea), p. 53–60, 2017.
- SREIT-JUNIOR, D. P.; POVH, J. A.; FORNARI, D. C.; GALO, J. M.; GUERREIRO, L. R. J.; OLIVEIRA, D.; DIGMAYER, M.; GODOY, L. C. **Recomendações técnicas para a reprodução do tambaqui**. Teresina: Embrapa Meio Norte, Documentos Técnicos 212, 2012. 30p.
- VARELA-JUNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; GHELLER, S. M. M.; JARDIM, R. D.; LUCIA-VEIGA, RS de S. **Respostas metabólicas do tambaqui (*Colossoma macropomum*) de cativeiro exposto à concentrações subletais de paration-metílico**. 2012. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.
- VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; MARIA, A. N.; ALLAMAN, I. B. **A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen**. Animal Reproduction Science, v. 112, p. 293–300, 2009.
- WITECK, L.; BOMBARDELLI, R. A.; SANCHES, E. A.; OLIVEIRA, J. D. S.; BAGGIO, D. M.; SOUZA, B. E. **Motilidade espermática, fertilização dos ovócitos e eclosão dos ovos de jundiá em água contaminada por cádmio**. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 40, n. 3, p. 477–481, 2011.

3.4 CAPÍTULO 4. Monitoramento da pesca no Brasil: como cumprir a agenda 2030 sem estatísticas da pesca?

Fisheries monitoring in Brazil: How can the 2030 agenda be met without fisheries statistics?

Biota Neotropica

Status: Publicado.

Conceito Qualis Capes (2017-2020): B1

Jadson Pinheiro Santos, Erick Cristofore Guimarães, Edson Bortoletto Garciov-Filho, Pâmella Silva de Brito, Danilo Francisco Corrêa Lopes, Marcelo Costa Andrade, Felipe Polivanov Ottoni, Luiz Jorge Bezerra da Silva Dias, Marcelo Rodrigues dos Anjos, Raimunda Nonata Fortes Carvalho-Neta, Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues, Marluce Aparecida Mattos de Paula Nogueira, Fernando Mayer Pelicice, Angelo Antonio Agostinho, Philip Martin Fearnside

ABSTRACT

Every activity that operates involves in the exploitation of natural resources, such as fishing, needs to be organized and conducted based on information from monitoring programs to allow continuous evaluation. With the increasing fishing pressure in Brazil, the understanding of the importance of fisheries monitoring programs and how they can inform and assist in conservation decision-making remains limited. Based on the literature on fisheries and participatory conservation, we call attention to the need to generate information on the national fisheries sector in order to improve fisheries in the country. Given the context of the need to generate information on fishing stocks under exploitation, as well as to identify potential alternative fisheries and carry out various sectoral analyses in compliance with the 2030 Agenda for Sustainable Development, is presented and discussed in the present paper the lack of a system of continuous fishing monitoring in Brazil and its effects on the fisheries sustainability in the country.

Keywords: sustainable development, fishing resources, conservation

RESUMO

Toda atividade que atua envolvendo a exploração de recursos naturais, como a pesca, precisa ser organizada e conduzida com base nas informações dos programas de monitoramento para permitir uma avaliação contínua. Com o aumento da pressão pesqueira no Brasil, o

entendimento da importância dos programas de monitoramento da pesca e como eles podem informar e auxiliar na tomada de decisões de conservação permanece limitado. Com base na literatura sobre pesca e conservação participativa, chamamos a atenção para a necessidade de gerar informações sobre o setor pesqueiro nacional para melhorar a pesca no país. Dado o contexto da necessidade de gerar informações sobre os estoques pesqueiros em exploração, bem como identificar potenciais alternativas de pesca e realizar diversas análises setoriais em conformidade com a Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável, é apresentada e discutida no presente trabalho a falta de um sistema de monitoramento contínuo da pesca no Brasil e seus efeitos na sustentabilidade da pesca no país.

Palavras-chave: desenvolvimento sustentável, recursos pesqueiros, conservação

INTRODUCTION

Every activity that involves the exploitation of natural resources, such as fishing, needs to be organized and conducted based on information from monitoring programs to allow continuous reassessment of the activity in order to adjust procedures and support management actions, which ensure the protection of stocks, and biodiversity (Pereira et al., 2013; Mendonça, 2018). The periodic monitoring of this information system makes it possible to identify and correct knowledge gaps and to guarantee access and transparency to the actors involved such that maximum efficiency is achieved and the resource is harvested in a sustainable way.

The fragility of the fisheries policy laws and the lack or inefficiency of monitoring and management have been the main drivers of the depletion of fisheries resources on a planetary scale, where various fisheries have capture levels above the natural replacement capacity of the exploited stocks, compromising the sustainability of the activity and the health of the fish, seas and oceans (OCEANA, 2016), as well as inland aquatic ecosystems (Allan et al., 2005). To face this reality and the need to maintain a balance between human population growth and social, economic and environmental demands, representatives of heads of state and government met in September 2015 at the headquarters of the United Nations (UN) in New York, launched the “2030 Sustainable Development Agenda” with 17 Sustainable Development Goals, or SDGs (UN, 2015). In 2017, Brazil presented its Voluntary National Report on the SDGs at an event to support SDG 14 “Conserve and ensure the sustainable use and development of the oceans, seas, freshwater bodies and marine resources” (Brazil, 2017). In this report, the country described actions linked to the elaboration of plans for the

management of fisheries resources, including monitoring with coverage of species relevant to the fisheries sector and for the conservation of biodiversity.

Decision makers need updated data on the exploitation in order to control and promote the activities without reaching the overexploitation threshold (FAO, 2020). Given the context of the need to generate information on fishing stocks under exploitation, as well as to identify potential alternative fisheries and carry out various sectoral analyses in compliance with the 2030 Agenda for Sustainable Development, is presented and discussed in the present paper the lack of a system of continuous fishing monitoring in Brazil and its effects on the fisheries sustainability in the country.

RESULTS AND DISCUSSION

Fisheries in Brazil and the precariousness of monitoring

South America has the greatest diversity of fish on the planet, considering marine, estuarine and freshwater species, corresponding to about 30% of all fish species in the world, about one-third of the world's freshwater fish species, and one-fourth of the planet's marine fish species (Buckup et al. 2007, Reis et al. 2016, Cassemiro et al., 2023). Brazil has the largest hydrographic network in the region and more than 8500 km of coastline, making this country the continent's leader in diversity of species of fish (Buckup et al. 2007, Reis et al. 2016,).

Fishing is the extraction of aquatic organisms from their natural environment for the purpose of consumption, recreation and commercialization as food or hobby (aquarium) (Frédou et al. 2021). The large territorial extent, combined with the enormous diversity of native fish species, gives the Brazil a huge potential for both marine and freshwater fisheries. The lack of monitoring hampers properly responses to the multiple threats facing aquatic ecosystems in Brazil, which include expansion of agricultural and urban areas, overfishing, pollution, river damming and construction of hydroelectric power plants, aquaculture, few river regulations, soil erosion and silting of the freshwater environments, deforestation, ghost fishing, modification and diversion of the river channels, species introductions, irregular water abstraction for different urban, industrial and agricultural uses, release of domestic and industrial effluents and chemical products from agricultural activities, and others (Fearnside et al. 2021). In Brazilian marine ecosystems, the activity is practiced along the entire coast and is related to a territorial strip that houses about 2/3 of the Brazilian population (Araújo & Maia 2011).

Despite providing the livelihood of many riverine and coastal populations, information on the socioeconomic importance and sustainability of fishing activity is fragmented, limited or even non-existent, especially those related to artisanal or small-scale fishing (Silva 2014, FAO 2022), which is precisely the most widespread modality in Brazil. There is a notorious lack of an integrated fisheries monitoring system that generates essential information on the socioeconomic situation of fishermen, in addition to biological, economic, environmental and technological data linked to fishing activities (EMBRAPA 2021) for the development of fisheries management programs, and, consequently, the organization of the activity and maintenance of fish stocks in exploitation (Silva 2014). Historically, there is enormous inefficiency in the census and maintenance of records obtained by fishing colonies and the federal government on fishing activities and catches, which generates an inaccurate and underestimated census of the fishing production chain (Rodrigues, 2022). The information available on continental fisheries in Brazil has already been classified as extremely poor, in quality and quantity (Welcomme 1990, Agostinho et al. 2007).

The first fish landing monitoring in Brazil records were published by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) for the years from 1946 to 1953 (IBGE 1955). Subsequently, responsibility for monitoring the activity was transferred to the Fisheries Development Superintendence (SUDEPE), an agency under the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) from 1950 to 1988 (MAPA 1962). The structuring of fisheries monitoring in Brazil gained more tools with the creation, in the mid-1990s, of the Fishing Statistical Data Generation System (ESTATPESCA) (Aragão 2008). In 1989, SUDEPE was abolished and incorporated into the newly created Brazilian Institute of the Environment and Renewable Resources (IBAMA), and from 1989 to 2007 monitoring was the responsibility of IBAMA's Center for Research and Fisheries Extension in the Northeast (CEPENE) (IBAMA 1995). Isolated and discontinued initiatives took place in several parts of the Paraná-Paraguay basin, such as those of Embrapa for the Paraguai river basin, and Iguaçu river basin (Petrere & Agostinho 1993, OKADA et al. 2005), Paraná Tietê e Grande basins (AES-Tietê 2007). Even with these tools and structural mobilization, many limitations regarding the methods used made the data insufficient to elucidate the real scenario of fishing in Brazil, a deficiency that persists to the present.

In 2008, despite the progress made with the creation of the Ministry of Fisheries and Aquaculture (MAPA), the values began to be estimated using statistical imputation models (Zamboni et al. 2020); fisheries statistics were published until 2011, and the transfer of information on fishing activity to FAO were completely suspended beginning in 2014 (FAO,

2018). Since then, Brazilian fisheries began to face deeper difficulties, without specific public policies for the sector, such as the establishment of quotas of fishing, strengthening the local socio-economy, access to lines of credit and support for the governance of fishing communities (EMBRAPA 2021).

One of the main obstacles to the maintenance of a fisheries monitoring program is the cost of technical personnel and the maintenance of monitoring activities, which require the responsible institutions to adjust their collections and methodologies to include as much information as possible to help in the planning and operationalization of financial resources (Mendonça 2018). Establishing operational fisheries monitoring in Brazil represents a great logistical, human, and financial challenge, considering the territorial extent of the country, the difficulty access to certain locations, the diversity of ecosystems, fish and fishing methods, and the diffuse character of fishing activity. One of the promising strategies launched by specialists and researchers around the world is self-reporting, such as the model proposed by the São Paulo Fisheries Institute (IP/SP) and the actions used by the Chico Mendes Institute for Biodiversity (ICMBio) under the Global Socioeconomic Monitoring Initiative for Coastal Management (SocMon), which is used in more than 30 countries to generate information for coastal management (Gomes & Barros 2017, Mendonça 2018, Dias & Seixas 2019), a strategy linked to the obtaining information in a participatory manner with community involvement.

It is essential that Brazilian authorities resume fisheries monitoring programs. The relevance of monitoring fish landings for a sustainable fisheries management is highlighted by Fredou et al. (2021), who emphasize the importance of government involvement in continuous programs for the collection and analysis of data in a systematic way, encompassing technical, socioeconomic, and ecological information and ensuring the application of the Fisheries Ecosystem Approach. In fact, monitoring represents the main challenge for national fisheries management. From this perspective, public managers, researchers, local leaders and other actors will be able to devise more effective and participatory strategies for each region, fishing fleet, fishing gear, target and fish species (including non-target species). This would significantly reduce the risk of generating perfunctory data.

It is also very important that authorities seek to improve methodologies, including the consideration of new variables, such as: i) morphometric and reproductive data on target and non-target species, aiming at stock assessment analysis, minimum capture size, size at first maturity (L50), natural mortality, fishing mortality; ii) social and economic data, including

prices of fish sales at each step from the producer to the final consumer and the costs of labor, boats and other operating expenses, in addition to relevant information on family income and on satisfaction with the profession. With this volume of information, it will be possible to generate ecosystem models encompassing all of the variables necessary for efficient fisheries management, not just production estimates.

In order to meet the needs of generating information on the national fishing sector and help in complying with the SDGs, there is an urgent need to create a federal institute destined exclusively for the management of fisheries in the country, which can actually develop actions that strengthen discussions in the sector, in line with the conduct of scientific research and the need to guide public policies to promote sustainable fishing in Brazil. Attention should be paid to the following guidelines:

- I - Work with existing data and metadata reporting systems and create online systems for exchanging information, including reporting on key indicators, and providing opportunities for horizontal and vertical coordination.
- II. Create a national network that allows the compilation of data collected punctually by state and municipal governments through their secretariats.
- III. Expand and strengthen the Permanent Management Committees, which enable the effective participation of civil society in building an efficient fisheries system.
- IV. Create a National Fisheries and Aquaculture Database similar to the Brazilian navy's National Bank of Oceanographic Data (BNDO).
- V. Create digital tools (apps and statistical programs applied to fisheries and aquaculture) to obtain and process national fisheries data.
- VI. Use self-reporting to carry out fishing monitoring, as it enables the recording of accurate data on fishing, enabling better conditions for collecting information, reducing costs, logistics and the need for technical personnel to visit fishermen.
- VII. Resumption of strategic programs for the assessment of marine and estuarine fish stocks similar to the Program for the Sustainable Assessment of Living Resources in the Exclusive Economic Zone of Brazil (REVIZEE).
- VIII. Create certification or quality seals backed by fish tracking mechanisms, for both species of commercial and ecological importance and for non-target species.
- IX. Modernization and expansion of the Floating Teaching Laboratories Project funded by the Ministry of Education.
- X. Popularization of ocean science with a view to democratizing scientific knowledge and promoting the right to information and social participation.

CONCLUSION

In contrast to increasing fishing pressure in Brazil, the understanding of the importance of fisheries monitoring programs and how they can inform and assist in conservation decision-making remains limited. Based on the literature on fisheries and participatory conservation, we call attention to the need to generate information on the national fisheries sector in order to improve fisheries in the country. Fishing monitoring data and information is critical for decision-making on conservation and to guide public policies that promote sustainable fishing in Brazil.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Instituto Maranhense de Estudos Socioeconômicos e Cartográficos (IMESC) for sharing part of the data analyzed in this study; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Finance Code 001) and Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grants PDCTR-08797/22 to PSB and 307974/2021-9 to FPO); and Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas (FAPESPA; grant 028/2021 to ECG).

REFERENCES

- AES-Tietê. 2007. Programa de manejo e conservação de bacias hidrográficas e reservatórios: ictiofauna e qualidade da água. Promissão, SP, Eco Consultoria Ambiental.
- AGOSTINHO, A.A., GOMES, L.C. & PELICICE, F. 2007. Ecologia e Manejo dos Recursos Pesqueiros em Reservatórios do Brasil. Maringá, EDUEM.
- ALLAN, J.D., ABELL, R., HOGAN, Z., REVENGA, C., TAYLOR, B.W., WELCOMME, R.L. & WINEMILLER, K. 2005. Overfishing of inland waters. *Bioscience*. 55: 1041–1051. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2005\)055\[1041:OOIW\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2005)055[1041:OOIW]2.0.CO;2)
- ARAGÃO, J.A.N. 2008. Sistema de geração de dados estatísticos da pesca – ESTATPESCA: manual do usuário. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, DF, Brazil.
- ARAÚJO, R.C.P. & MAIA, L.P. 2011. Analysis of the problems and objectives of traditional and uprising economic activities in the coastal zone of Ceará State. *Arq. Ciên. Mar.* 44(3): 20–39.
- BRAZIL. 2017. Relatório nacional voluntário sobre os objetivos de desenvolvimento sustentável. Secretaria de Governo da Presidência da República, Ministério do Planejamento, Desenvolvimento e Gestão, Presidência da República, Brasília, DF, Brazil.
- BUCKUP, P.A., MENEZES, N.A. & GHAZZI, M.S. 2007. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de Janeiro, Museu Nacional.

DIAS, A.C.E. & SEIXAS, C.S. 2019. Delineamento Participativo do Protocolo de monitoramento da Pesca artesanal da comunidade de Tarituba, Paraty, RJ. *Ambient. Soc.* 22: 1-24.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 2021. Boletim do monitoramento pesqueiro na Bacia Tocantins-Araguaia. Araguacema, TO. No. 21. EMBRAPA Pesca e Aquicultura, Palmas, TO, Brazil.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. Meeting the sustainable development goals. FAO, Rome, Italy. <https://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>. (last access in 10/10/2022)

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in Action. FAO, Rome, Italy. <https://www.fao.org/3/ca9229en/ca9229en.pdf>. (last access in 15/10/2022)

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards blue transformation. FAO, Rome, Italy. <https://www.fao.org/documents/card/en/c/cc046en.pdf>. (last access in 15/08/2022)

FEARNSIDE, P.M., BERENGUER, E., ARMENTERAS, D., DUPONCHELLE, F., GUERRA, F.M., JENKINS, C. N., BYNOE, P., GARCÍA-VILLACORTA, R., MACEDO, M., VAL, A.L., DE ALMEIDA-VAL, V.M.F. & NASCIMENTO, N. 2021. Drivers and impacts of changes in aquatic ecosystems. Chapter 20. In C. Nobre & A. Encalada et al. eds. Amazon Assessment Report 2021. Science Panel for the Amazon (SPA). United Nations Sustainable Development Solutions Network, New York, NY, USA. Part II. <https://doi.org/10.55161/IDMB5770>

FRÉDOU, F.L., EDUARDO, L.N., LIRA, A. & PELAGE, L. 2021. Chapter 14: Atividade pesqueira artesanal no nordeste do Brasil. In *Ciências do Mar: dos Oceanos do Mundo ao Nordeste do Brasil*. Olinda, PE: Via Design Publicações, p. 374-405.

FRICKE, R., ESCHMEYER, W.N. & VAN DER LAAN, R. (eds). 2022. Eschmeyer's Catalog of Fishes: Genera, Species, References. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. (last access in 10/09/2022)

GOMES, A.N. & BARROS, G.M. 2017. Relatório Diagnóstico Continental-Costeiro das Áreas Marinhas da Estação Ecológica de Tamoios: Estruturas Artificiais Instaladas. Instituto Chico Mendes da Biodiversidade (ICMBio), Paraty, RJ, Brazil.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 1995. Estatística da Pesca 1990: Brasil, grandes regiões e Unidades da federação, IBAMA, Tamandaré, PE, Brazil.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 1955. Anuário Estatístico do Brasil 1946-1953. Conselho Nacional Estatístico, IBGE, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária de Abastecimento. 1962. Pesca: estrutura e produção 1962. MAPA, Brasília, DF, Brazil.

- MENDONÇA, J.T. 2018. Monitoramento pesqueiro: Avaliação de estratégias de coleta. *CIAIQ*. 7(3): 27-36.
- OKADA, E.K., AGOSTINHO, A.A. & GOMES, L.C. 2005. Spatial and temporal gradients in artisanal fisheries of a large Neotropical reservoir, the Itaipu Reservoir, Brazil. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 62(3):714 – 724.
- PEREIRA, R.C., ROQUE, F.O., CONSTANTINO, P., SABINO, J. & PRADO, M.U. 2013. Monitoramento in situ da biodiversidade - Proposta para um Sistema Brasileiro de Monitoramento da Biodiversidade. ICMBio, Brasília, DF, Brazil.
- PERES, M. 2016. Gestão pesqueira é desafio para o país. <https://brasil.oceana.org/blog/gestao-pesqueira-e-desafio-para-o-pais/> (last access in 20/08/2022)
- PETREIRE, JR.M. & AGOSTINHO, A.A. 1993. La pesca en el tramo brasileno del rio Paraná. *Fao Inf. Pesca*. 490: 52 – 72.
- REIS, R.E., ALBERT, J.S., DI DARIO, F., MINCARONE, M.M., PETRY, P. & ROCHA L.A. 2016. Fish biodiversity and conservation in South America. *J. Fish Biol.* 89(1): 12-47.
- RODRIGUES, A. 2022. Polícia investiga suspeitos de desviar R\$ 1,5 bi do seguro defeso. Agência Brasil, Brasília, DF, Brazil. <https://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2022-03/policia-investiga-suspeitos-de-desviar-r-15-bi-do-seguro-defeso> (last access in 17/05/2022)
- UN - United Nations. 2015. The Millenium Development Goals Reports 2015. UN, New York, USA.
- ZAMBONI, A., DIAS, M. & WANICKI, L. 2020. Auditoria da pesca: Brasil 2020: Uma avaliação integrada da governança, da situação dos estoques e das pescarias. 1. ed. Oceana Brasil, Brasília, DF, Brazil. <https://static.poder360.com.br/2021/04/auditoria-da-pesca-brasil-2020.pdf>
- WELCOMME, R.L. 1990. Status of fisheries in South America Rivers. *Interciencia*. 15(6): 337-345.

4 CONCLUSÕES

Os efeitos dos agrotóxicos nos processos reprodutivos de peixes teleósteos de água doce são evidentes, causando principalmente distúrbios endócrino-reprodutivos, alterações morfológicas nas gônadas e diminuição da qualidade dos gametas.

A redução das taxas de motilidade espermática do sêmen *in natura* de tambaqui pós-exposição aos agrotóxicos indica a possibilidade de uso dessas células em testes ecotoxicológicos agudos. Os testes realizados com a exposição dos espermatozoides criopreservados também demonstraram que é possível estabelecer metodologia com o uso dessa biotecnologia em bioensaios. Entretanto, é necessário intensificar experimentos com maior amplitude de concentrações de resíduos de agrotóxicos e com diferentes agrotóxicos, de modo a estabelecer mais parâmetros, como tempo de duração, anormalidades espermáticas e concentração letal a 50% dos espermatozoides móveis pós-descongelamento e expostos aos resíduos.

Este é o primeiro estudo que relata o uso de espermatozoides de peixes nativos neotropicais expostos diretamente a agrotóxicos em testes ecotoxicológicos, inferindo que essas células são altamente suscetíveis a alterações causadas pelo contato com resíduos de agrotóxicos, como glifosato e fenitrotiona, com efeitos mais severos atribuídos a fenitrotiona.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. *Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil*. 1 ed. Maringá: EdUEM, 2007. p. 501
- ALVES, A. L.; VARELA, E. S.; MORO, G. V.; KIRSCHNIK, L. N. G. *Riscos genéticos da produção de híbridos de peixes nativos*. 1 ed. Palmas, Documentos Embrapa Pesca e Aquicultura, 2014. p. 60
- ANDRADE, E. S.; ANDRADE, E. A.; FELIZARDO, V. O.; PAULA, D. A. J.; VERAS, G. C.; MURGAS, L. D. S. Biologia reprodutiva de peixes de água doce. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.1, p. 195-201, 2015.
- ARAGÃO, J. A. N. & MARTINS, S. **Censo Estrutural da Pesca – Coleta de Dados e Estimação de Desembarques de Pescado**. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais – IBAMA, Brasília/DF, 2006. 180 pp.
- ARAUJO, E. J. A.; MORAIS, J. O. R.; SOUZA, P. R.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T. Efeito de poluentes químicos cumulativos e mutagênicos durante o desenvolvimento ontogenético de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). **Acta Scientiarum**, v.23, p.391-399, 2001.
- ARTUZO, F. D.; FOGUESATTO, C. R.; MACHADO, J. A. D.; OLIVEIRA, L.; SOUZA, A. R. L. O potencial produtivo brasileiro: uma análise histórica da produção de milho. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 12, n. 2, p. 515-540, 2019. <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2019v12n2p515-540>.
- BALDISSEROTTO, B. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. 3 ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2018.

- BARTHEM, R. B.; GOULDING, M.; LEITE, R. G.; CAÑAS, C.; FORSBEG, B.; VENTICINQUE, E.; *et al.* Goliath catfish spawning in the far western Amazon confirmed by the distribution of mature adults, drifting larvae and migrating juveniles. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-13, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep41784>.
- BARZOTTO, E.; MATEUS, L. Reproductive biology of the migratory freshwater fish *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) in the Cuiabá River basin, Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, p.1-8, 2017. <https://doi.org/10.1111/jai.13262>.
- BASSANI, D.; SILVA, L. R.; BIRK, L.; SOUZA, S. C. W.; OLIVEIRA, E. F.; DALLEGRAVE, E.; *et al.* Pesticides in Brazil: A viewpoint about the Poison Law. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 1253-1254, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05669>.
- BEDORE, Alessandra Gomes. **Caracterização e criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 1999. Dissertação (Mestrado) – UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 199.
- BEGUM, G. Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (Linn) and recovery response. **Aquatic Toxicology**, v. 66, p. 83-92, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.08.002>.
- BERTOLETTI, E. A presunção ambiental e a Ecotoxicologia aquática. **Revista das Águas**, n. 12, p. 4-11, 2012. Disponível em: < <http://revistadasaguas.pgr.mpf.gov.br/edicoes-darevista/edicao-atual/materias/presuncao-ambiental>>. Acesso dia: 20/04/2022.
- BOLPAGNI, R.; BRESCIANI, K.; FENOGLIO, S. Aquatic biomonitoring: lessons from the past, challenges for the future. **Journal of Limnology**, v. 76, n. s1, p. 1-4, 2017. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2017.1695>
- BOSTOCK, J.; MCANDREW, B.; RICHARDS, R. Aquaculture: global status and trends. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 365, n. 1554, p. 2897-912, 2010. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0170>.
- BOTELHO, R. G.; ALVEZ, P. A. T.; MARANHO, L. A.; MONTEIRO, S. H.; SOUSA, B. I. A.; AVELAR, A. S.; *et al.* Prós e contras da aplicação de pesticidas na aquicultura. **Visão agrícola**, n. 11, p. 45-48, 2012.
- BRASIL. Presidência da República. **Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais**; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial da União. 2008. [acesso 20 maio 2023]. Seção 1.
- BROVINI, E. M.; DEUS, B. C. T.; VILAS-BOAS, J. A.; QUADRA, G. R.; CARVALHO, L.; MENDONÇA, R. F.; *et al.* Three-best-seller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. **Science of the Total Environment**, v. 771, n. 144754, p. 1-12, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144754>.
- BUCKUP, P.; MENEZES, N.; GHAZZI, M. *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Rio de Janeiro: Museu Nacional, Série Livros, n. 23, 2007. p. 195
- BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Caderno de Saúde Pública do Rio de Janeiro**, v. 19, n. 2, p. 465-473, 2003.
- CAMARGO, F. A. O.; SILVA, L. S.; MERTEN, G. H.; CARLOS, F. S.; BAVEYE, P. C.; TRIPLETT, E. W. Brazilian agriculture in perspective: Great expectations vs reality. **Advances in Agronomy**, v. 141, p. 53-114, 2017. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2016.10.003>.
- CAMPOS, A. L.; IGNÁCIO, A. R. A.; OLIVEIRA-JUNIOR, E. S.; LÁZARO, W. L. O avanço do agrotóxico no Brasil e seus impactos na saúde e no ambiente. **Revista em**

- Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 14, n.1, p. 191-204, 2021. <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2021v14n1e007934>.
- CANTANHÊDE, S. M.; MEDEIROS, A. M.; FERREIRA, F. S.; FERREIRA, J. R. C.; ALVEZ, L. M. C.; CUTRIM, M.; *et al.* Uso de biomarcador histopatológico em brânquias de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque Ecológico Laguna da Jansen, São Luís-MA. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 2, p. 593-601, 2014. <https://doi.org/10.1590/1678-41626348>.
- CARNEIRO, P.C.F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 361-366, 2007.
- CARNEIRO, P.C.F.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; MARIA, A. N. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. **Cryoletters**, v. 33, p. 385-393, 2012.
- CAROLSFELD, J.; GODINHO, H. P.; ZANIBONI-FILHO, E.; HARVEY, B. J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v. 63, p. 472-489, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00170.x>.
- COPATI, C. E.; GARCIA, L. O.; BALDISSEROTTO, B. Uma importante revisão sobre o impacto de agroquímicos da cultura de arroz em peixes. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 4, p. 235-242, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032009000400023>.
- COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, v. 12, p. 69-85, 2004. <https://doi.org/10.1023/B:AQUI.0000017189.44263.bc>.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em Ambientes Aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038>.
- CRUZ, V. L. B. **Criopreservação do sêmen de curimatá (*Prochilodus lineatus*)**. 2001. Dissertação (Mestrado em Zoologia de Vertebrados) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.
- CUNHA, F. S.; SOUSA, N. C.; SANTOS, R. F. B.; MENESES, J. O.; COUTO, M. V. S.; ALMEIDA, F. T. C.; *et al.* Deltamethrin-induced nuclear erythrocyte alteration and damage to the gills and liver of *Colossoma macropomum*. **Environmental Science and Pollution Research**, n. 25, v. 15, p. 15102-15110, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1622-1>.
- DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 12, p. 1296–1301, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v18n12p1296-1301>.
- FABROCINI, A.; D'ADAMO, R.; DEL-PRETE, F.; LANGELLOTTI, A. L.; RINNA, F.; SILVESTRI, F.; *et al.* Cryopreserved semen in ecotoxicological bioassays: Sensitivity and reliability of cryopreserved *Sparus aurata* spermatozoa. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 84, p. 293–298, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.024>.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020 – Meeting the sustainable development goals**. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO, 2020. Disponível em: <http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture>. Acessado em: 10/06/2021.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards blue transformation**. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO, 2022. Disponível em: <https://www.fao.org/documents/card/en/c/cc046en.pdf>. Acessado em: 15/08/2022.
- FERREIRA, L. S. V. **Efeitos histopatológicos dos agrotóxicos deltametrina, imidacloprido, glifosato e diuron nas brânquias de quatro espécies de peixes amazônicos**. 2016. Dissertação (Mestrado Biologia de Água Doce e Pesca Interior) – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA, Manaus, 2016.

- GARCIA, J. R.; VIEIRA-FILHO, J. E. R. **Reflexões sobre o papel da política agrícola brasileira para o desenvolvimento sustentável**. Texto para discussão / Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada - Brasília: Rio de Janeiro: IPEA, 2014.
- GUIMARÃES, E. C.; BRITO, P. S.; GONÇALVES, C. S.; OTTONI, F. P. An inventory of Ichthyofauna of the Pindaré River drainage, Mearim River basin, Northeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 20, n. 4, p. 1-13, 2020. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2020-1023>.
- GUIMARÃES, M. V.; FREIRE, J. E. C.; MENEZES, L. M. B. Utilização de animais em pesquisas: breve revisão da legislação no Brasil. **Revista Bioética**, v. 24, n. 2, p. 217-224, 2016. <https://doi.org/10.1590/1983-80422016242121>.
- HÄDER, D. P.; BANASZAK, A. T.; VILLAFANE, V. E.; NARVARTE, M. A.; GONZÁLEZ, R. A.; HELBLING, E. W. Anthropogenic pollution of aquatic ecosystems: emerging problems with global implications. **Science of the Total Environment**, v. 713, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136586>.
- HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. *Induced breeding in tropical fish culture*. Ottawa: IDRC, 1993. p.144.
- HERMAN, H. A.; MITCHELL, J. R.; DOAK, G. A. *The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle*. Illinois: Interstate Publisher, 1994. p. 392
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos. 2019**. Brasília, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, 2020. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatoriosde-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao>. Acesso em: 20/04/2022.
- KAVAMOTO, E. T.; BARNABE, V. H.; CAMPOS, B. E. S.; ANDRADE-TALMELLI, E. F. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatã, *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881) (OSTEICHTHYES, CHARACIFORMES, PROCHILODONTIDAE). **Boletim do Instituto de Pesca de São Paulo**, v. 25, p. 61-66, 1999.
- KIME, D. E. The effects of pollution on reproduction in fish. **Reviews in Fish in Biology and Fishers**, v.5, p.52-96, 1995. <https://doi.org/10.1007/BF01103366>.
- KIME, D. E.; NASH, J. P. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. **The Science of the Total Environment**, v. 233, p. 123-129, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00219-3](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00219-3).
- LI, L.; ZHENG, B.; LIU, L. Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: definitions, approaches and trends. **Procedia Environmental Sciences**, vol. 2, p. 1510–1524, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2010.10.164>.
- LIMA, L. B. D.; MORAIS, P. B.; ANDRADE, R. L. T.; MATTOS, L. V.; MORON, S. E. Use of biomarkers to evaluate the ecological risk of xenobiotics associated with agriculture. **Environmental Pollution**, v. 237, p. 611–624, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.011>.
- LIU, Z.; SHANGGUAN, Y.; ZHU, P.; SULTAN, Y.; FENG, Y.; LI, X.; MA, J. Developmental toxicity of glyphosate on embryo-larval zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 236, n. 113493, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113493>.
- LOSSO, C.; PICONE, M.; NOVELLI, A. A.; DELANEY, E.; GHETTI, P.; GHIRARDINI, A. V. Developing toxicity scores for embryotoxicity tests on elutriates with the sea urchin *Paracentrotus lividus*, the oyster *Crassostrea gigas*, and the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, p. 220–226, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00244-006-0136-x>.
- LUVIZOTTO-SANTOS, R.; ELER, M. N.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; VIEIRA, E. M. O uso de praguicidas nas pisciculturas e pesqueiros situados na bacia do rio Mogi-Guaçu. **Boletim do Instituto de Pesca de São Paulo**, n. 35, v. 3, p. 343 - 358, 2009.

- MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Basiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.
- MAMINDY-PAJANY, Y.; LIBRALATO, G.; ROMÉO, M.; HUREL, C.; LOSSO, C.; GHIRARDINI, A. V.; *et al.* Ecotoxicological evaluation of Mediterranean dredged sediment ports based on elutriates with oyster embryotoxicity tests after composting process. **Water Resource**, v. 44, p. 1986–1994, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.11.056>.
- MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- MARIA, A. N.; CARNEIRO, P. C. F. Criopreservação de sêmen de peixes no Brasil: estado da arte e perspectivas futuras. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 124-131, 2012.
- MARIA, A. N.; CARVALHO, A. C. M.; ARAÚJO, R. V.; SANTOS, J. P.; CARNEIRO, P. C. F.; AZEVEDO, H. C. Use of cryotubes for the cryopreservation of tambaqui fish semen (*Colossoma macropomum*). **Cryobiology**, v. 70, n. 2, p. 109-14, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.02.004>.
- MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327-344, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00674-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00674-4).
- MENDONÇA, J. T. Monitoramento pesqueiro: Avaliação de estratégias de coleta. **Investigação Qualitativa em Ciências Sociais**, v. 7, n. 3, p. 27-36, 2018.
- MONTANHA, F. P.; ASTRAUSKAS, J. P.; KIRNEW, M. D.; NAGASHIMA, J. C.; PIMPÃO, C. T. Degradação de ambientes aquáticos por exposição a compostos químico. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 17, p. 1-12, 2011.
- MONTANHA, F. P.; PIMPÃO, C. T. Efeitos toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em peixes-Revisão. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 18, p. 1–58, 2012.
- MORAES, R. F. **Agrotóxicos no brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – Brasília, Rio de Janeiro, Ipea. 2019.
- NAVARRO-ORTEGA, A.; ACUÑA, V.; BELLIN, A.; BUREK, P.; CASSIANI, G.; CHOUKR-ALLAH, R.; *et al.* Managing the effects of multiple stressors on aquatic ecosystems under water scarcity. The GLOBAQUA Project. **Science of the Total Environment**, v. 503–504, p. 3–9, 2015.
- OLIVEIRA, C. M.; BORGES, E. L.; AMARAL, R. V. A.; CARDOSO, N. A.; SOUSA, R. G. C. Difference in nutritional values between wild and farmed tambaqui in the north region of Brazil. **Food Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 716-721, 2020. <https://doi.org/10.1590/fst.17220>.
- PÁDUA, J. G.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; MELO, S. C. M. **Bancos e coleções de germoplasma da Embrapa: conservação e uso**. (Eds. Técnicos) – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Documentos 371, 2020. 167 p.
- PAVANI, Nilton Dias. **Pesticidas: uma revisão dos aspectos que envolvem esses compostos**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura Plena em Química) – Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2016.
- Associação Brasileira de Piscicultura – PEIXEBR. **Anuário brasileiro da piscicultura PeixeBR 2023**. São Paulo/Brasil. 2023. 65 p. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuario/>>. Acesso em: 11/05/2023.
- PELICICE, F. M.; AZEVEDO-SANTOS, V. M.; VITULE, J. R.; ORSI, M. L.; LIMA-JUNIOR, D. P.; MAGALHÃES, A. L.; POMPEU, P. S.; PETRERE, M.; AGOSTINHO, A. A. Neotropical freshwater fishes imperilled by unsustainable policies. **Fish and Fisheries**, v. 18, n. 6, p. 1119-1133, 2017. <https://doi.org/10.1111/faf.12228>.

- PELICICE, F. M.; BIALETZKI, A.; CAMELIER, P.; CARVALHO, F. R.; GARCÍA-BERTHO, E.; POMPEU, P. S.; *et al.* Human impacts and the loss of neotropical freshwater fish diversity. **Neotropical Ichthyology**, v. 19, n. 3, p. 1-15, 2021. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2021-0134>.
- PERCHEC-POUPARD, G.; GATTI, J. L.; COSSON, J.; JEULIN, C.; FIERVILLE, F.; BILLARD, R. Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 110, p. 315-327, 1997. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1100315>.
- PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. (Org.). **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora da Fiocruz, 2003. p. 21-41.
- PIGNATI, W. A.; LIMA, F. A. N. S.; LARA, S. S.; CORREA, M. L. M.; BARBOSA, J. R.; LEÃO, L. H. C.; *et al.* Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for Health Surveillance. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3281-3293, 2017. <https://doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>.
- POIKANE, S.; BERG, M. V. D.; HELLSTEN, S.; HOYOS, C.; ORTIZ-CASAS, J.; PALL, K.; *et al.* Lake ecological assessment systems and intercalibration for the European Water Framework Directive: Aims, achievements and further challenges. **Procedia Environmental Science**, v. 9, p. 153-168, 2011.
- REIS, R. E.; ALBERT, J. S.; DI-DARIO, F.; MINCARONE, M. M.; PETRY, P.; ROCHA, L. A. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of Fish Biology**, v. 89, n. 1, p. 12-47, 2016. <https://doi.org/10.1111/jfb.13016>.
- RIBEIRO, N. U. F.; AMÉRICO-PINHEIRO, J. H. P. Peixes como bioindicadores de agrotóxicos em ambientes aquáticos. **Revista Científica ANAP Brasil**, v. 11, n. 22, p. 65-75, 2018. <https://doi.org/10.17271/19843240112220181859>.
- RODRIGUES, A. P. O.; LIMA, A. F.; ALVES, A. L.; ROSA, D. K.; TORATI, L. S.; SANTOS, V. R. V. **Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 440 p.
- RURANGWA, E.; KIME, D. E.; OLLEVIER, F.; NASH, J. P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v. 234, p. 1-28, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.006>.
- SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; ALMEIDA-MONTEIRO, P. S.; NASCIMENTO, R. V. Tecnologia de conservação de sêmen de peixes: resfriamento, congelamento e uso de antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, n. 4, p. 194-199, 2016.
- SANTANA, M. B. M.; CAVALCANTE, R. N. Transformações metabólicas de agrotóxicos em peixes: uma revisão. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 257-268, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/61504>. Acessado em: 10/01/2023.
- SANTOS, M. L. S.; ALVES, I. C. C.; BORDALO, A. O.; MELO, N. F. A. C.; PALHETA, G. D.; SOUZA, R. A. L. Poluição Aquática. In: SOUZA, R. A. L. (Org.). **Ecossistemas aquáticos: tópicos especiais**. 1 ed. Belém, EDUFRA: Universidade Federal Rural da Amazônia, p. 83-110, 2018.
- SANTOS, J. P.; ALMEIDA, S. J. M.; COSTA, C. C.; GUIMARÃES, E. C.; TEIXEIRA, E. G.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Reproductive aspects of freshwater fishes exposed to pesticide-contaminated environments: A systematic review. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 8, n. 19, p. 1155-1168, 2021. [https://doi.org/10.21438/rbgas\(2021\)081935](https://doi.org/10.21438/rbgas(2021)081935).
- SATO, Y.; GODINHO, H. P. Migratory fishes of the São Francisco River. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. (Org.). **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status**. Ottawa: World Fisheries Trust:

- International Development Research Centre; Washington, D.C.: International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank, 2003. p. 195-232.
- SCOPEL, C. F. V.; SOUSA, C.; MACHADO, M. R. F.; DOS SANTOS, W. G. BPA toxicity during development of zebrafish embryo. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 81, n. 2 p. 437-447, 2021. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.230562>.
- SILVA, J. S.; ROCHA, I. K. B. S.; FREITAS, L. C.; PEREIRA, N. J.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Princípios bioéticos aplicados aos estudos ecotoxicológicos aquáticos. **Revista Bioética**, v. 23, n. 92, p. 409-418, 2015. <https://doi.org/10.1590/1983-80422015232079>.
- SIQUEIRA, T. V. Aquicultura: a nova fronteira para aumentar a produção mundial de alimentos de forma sustentável. **Boletim Regional, Urbano e Ambiental**, n 17, p. 53-60, 2017.
- SUZUKI, H. I.; AGOSTINHO, A. A.; WINEMILLER, K. O. Relationship between oocyte morphology and reproductive strategy in Loricariid catfishes of the Paraná River, Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 57, n. 3, p.791-807, 2000. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2000.tb00275.x>.
- TIERSCH, T. R.; YANG, H.; JENKINS, J. A.; DONG, Q. **Sperm cryopreservation in fish and shellfish**. In: Roldan E, Gomendio M (eds): *Spermatology*, v. 65, 2007. p. 493–508. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- TRUHOUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 1, p. 151-173, 1977.
- UN - United Nations. **The Millenium Development Goals Reports 2015**. UN, New York, USA. 75 pp. 2015.
- VARELA-JUNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; GHELLER, S. M. M.; JARDIM, R. D.; LUCIA-JR, T.; STREIT-JR, D. P.; *et al.* Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology**, v. 78, p. 244-251, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.029>.
- VASSEUR, P. *Les fondements de l'écotoxicologie française. Fiche thématique N°22. HAL Open Science*, 2019. 9 p. <https://hal.inrae.fr/hal-02790713>
- VAZZOLER, A. E. A. de M. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. 1 ed. Maringá - SP, EDUEM, 1996. p. 169
- VIEIRA, L. O.; CAMPOS, D. S.; OLIVEIRA, R. F.; SOUTH, J.; COELHO, M. S. P.; PAIVA, M. J. S.; *et al.* Checklist of the fish fauna of the Munim River Basin, Maranhão, north-eastern Brazil. **Biodiversity Data Journal**, v. 11, n. e98632, 2023. <https://doi.org/10.3897/BDJ.11.e98632>.
- VILLELA, L. C. V.; KIRSCHNIK, L. N. G.; ALVES, A. L.; VARELA, E. S.; REZENDE, F. P.; TORATI, L. S.; *et al.* **Estratégias para conservação de recursos genéticos de peixes nativos de interesse econômico**. 21 ed. Palmas – TO, Documentos – Embrapa Pesca e Aquicultura, 2020. 32 p.
- VIVEIROS, A. T. M. **Criopreservação de sêmen de peixes**. In: XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, v. 16, 2005, Goiânia. Anais... Goiânia, 2005. CD-ROM.
- VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; LEAL, M. C. Biologia e conservação de espermatozoides. **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce. Jaboticabal: FUNEP**, p. 307-327, 2014.
- WAICHMAN, A.V. Uma proposta de avaliação integrada de risco do uso de agrotóxicos no estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 38, n.4, p. 45-50, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672008000100006>.
- WITECK, L.; BOMBARDELLI, R. A.; SANCHES, E. A.; OLIVEIRA, J. D. S.; BAGGIO, D. M.; SOUZA, B. E. Motilidade espermática, fertilização dos ovócitos e eclosão dos ovos de jundiá em água contaminada por cádmio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 3, p. 477-481, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000300003>.