

## AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO ROUNDUP® EM JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

Susana Braz MOTA<sup>1</sup>; Helen SADAUSKAS-HENRIQUE<sup>2</sup>; Vera Maria Fonseca de ALMEIDA-VAL<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista IC/CNPq; <sup>2</sup>PPG-BADPI, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA; <sup>3</sup>Pesquisadora Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, Manaus, Amazonas

### 1. Introdução

O Roundup® (RD), cujo princípio ativo é o sal glifosato, é um herbicida da classe dos organofosforados, amplamente utilizado na agricultura (Jiraungkoorskul 2002). Seu uso pode trazer benefícios para a produção agrícola, porém pode trazer prejuízos aos organismos não alvos, em especial aos aquáticos, uma vez que, os corpos d'água são considerados destino final de todo o processo de transporte e carregamento de substâncias. Na Amazônia o uso do RD se dá em especial na aquicultura, onde o herbicida é aplicado no entorno dos tanques de cultivo de peixes para a eliminação de plantas infestantes (Porto 2005). O presente estudo buscou avaliar a toxicidade aguda do RD sobre uma espécie de grande importância comercial na região, o tambaqui (*Colossoma macropomum*), uma vez que pouco se sabe sobre os efeitos do RD nos processos fisiológicos dessa espécie. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as respostas dos biomarcadores (bioquímicos, fisiológicos e genotóxicos) em tambaqui (*Colossoma macropomum*) exposto ao RD por meio de ensaios toxicológicos agudos para melhor compreensão dos ajustes fisiológicos dos peixes expostos a esse herbicida.

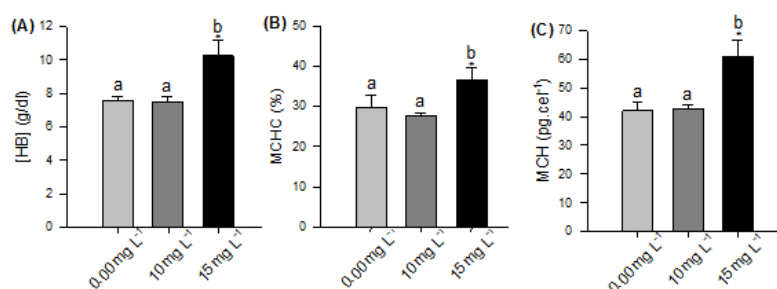
### 2. Material e Métodos

Juvenis de tambaqui (34,17±1,8g, 10,99± 0,2 cm) foram obtidos em piscicultura (Fazenda Santo Antônio, Amazonas, Brasil) e levados ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM), onde foram aclimatizados, durante 20 dias, em água de poço artesiano do INPA. Após este período os animais foram transferidos individualmente para aquários de vidro (n=8) com capacidade de 2 litros e aeração constante. Posteriormente, os animais foram expostos aos tratamentos: controle, RD na concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup> e de 15 mg.L<sup>-1</sup>, sendo tais concentrações correspondentes a 50 e 75% do valor da CL<sub>50</sub> 96h (19,94 mg/L) determinada por Miyazaki *et al.* (2004). Após o período de exposição de 96h, os animais foram anestesiados com MS222 tamponado e amostras de sangue, cérebro, brânquias e fígado foram coletadas e armazenadas em freezer -80°C até o momento das análises. O sangue total coletado foi utilizado para análise de danos no DNA dos eritrócitos, por meio do teste do cometa alcalino e parâmetros hematológicos: hematócrito (Ht), concentração de hemoglobina ([Hb]), número de eritrócitos (RBC) e cálculo das constantes corpusculares: (VCM, HCM e CHCM). Após isso, o plasma foi obtido por centrifugação e as leituras dos íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> foram realizadas por meio de espectrofotometria de absorção atômica (AAnalyst 800, Perkin Elmer Singapura). Foram analisadas as enzimas: etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) no fígado, glutathione-S- transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) nas brânquias e fígado, acetilcolinesterase (AChE) cerebral, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-ATPase branquial. A dosagem de proteínas dos tecidos se deu por meio do método de Bradford. A análise estatística foi realizada utilizando o programa SigmaStat 3.5. Os valores estão apresentados como média e erro padrão da média (SEM). Os dados foram testados quanto à normalidade (Kolmogorov-Smirnov) para que a análise de variância *one-way* fosse aplicada para determinar diferenças em relação ao controle (método de Dunnett) e entre os tratamentos (método de Holm-Sidak).

### 3. Resultados e Discussão

#### Parâmetros hematológicos e genotóxicos

Observamos que o RD na concentração de 15 mg.L<sup>-1</sup> foi capaz de causar aumento significativo (p<0.05) da [Hb] com conseqüente aumento do HCM e CHCM. O aumento da concentração de hemoglobina em vertebrados se deve basicamente à eritropoiese.

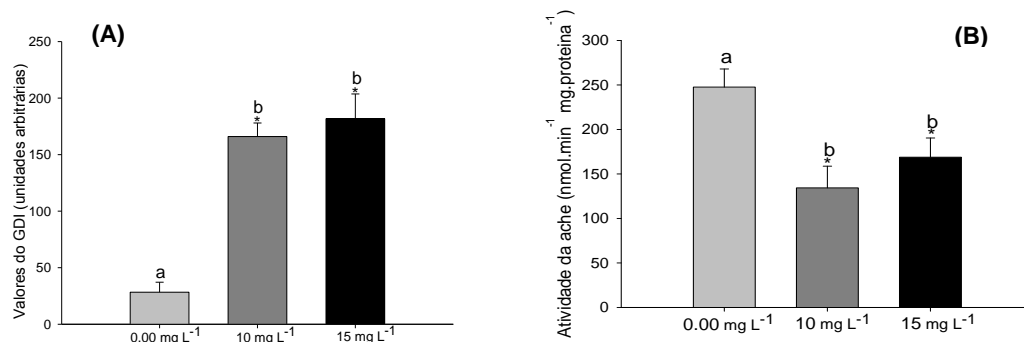


**Figura 1.** (A) Concentração hemoglobina ([Hb]) e Constantes corpusculares: (B) Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e (C) hemoglobina corpuscular média (HCM) de juvenis de tambaqui expostos aos tratamentos: Controle (0,00 mg L<sup>-1</sup>), RD (10 mg L<sup>-1</sup>) e RD (15 mg L<sup>-1</sup>) durante 96h. Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0.05) entre os grupos. \* Significa diferença estatística (p<0.05) em relação ao controle.

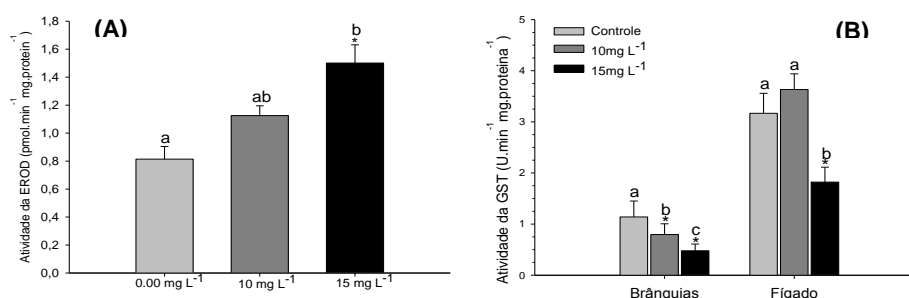
No entanto, não observamos aumento na contagem de células vermelhas (RBC) ou na porcentagem de eritrócitos (Hct). Dessa forma, com base em nossos resultados, podemos dizer que o RD causou um aumento na síntese de hemoglobina dos eritrócitos a fim de suprir a demanda de oxigênio dos tecidos. Langiano *et al.* (2006) e Mataqueiro *et al.* (2002) também observaram alterações nos parâmetros hematológicos de peixes expostos ao RD e outros herbicidas após 96 horas de exposição. Quebras no DNA frente a exposição a xenobióticos são muito relatadas na literatura (Rodrigues *et al.* 2010; Laffon *et al.* 2006). Elas podem ocorrer devido ao estresse oxidativo, metabolismo de xenobióticos ou pelo efeito direto dos mesmos nas células. Em nosso trabalho, o RD provocou aumento nas quebras no DNA dos eritrócitos de juvenis de tambaqui expostos às duas concentrações estudadas, quando comparadas ao grupo controle ( $p < 0.05$ ). Ferraro *et al.* (2009) e Martinez *et al.* (2010), também encontraram danos genotóxicos nas células (sangue, brânquias e fígado) de peixes expostos ao RD, corroborando as alterações genotóxicas observadas neste trabalho (Figura 2(A)).

#### Enzimas de biotransformação, defesa antioxidante e neurotoxicidade

Agrotóxicos podem ser biotransformados e se tornar menos tóxicos para os organismos por diferentes mecanismos. **EROD**: A alteração na atividade dessa enzima é bastante documentada na presença de poluentes. No presente estudo, a atividade da EROD hepática aumentou significativamente em relação ao controle ( $p < 0.05$ ) nas duas concentrações estudadas. A enzima EROD age catalisando a biotransformação de vários xenobióticos, transformando compostos hidrofóbicos em hidrofílicos por meio do processo de hidrólise, sendo esse o primeiro passo para excreção e desintoxicação. Assis *et al.* (2009) e Haluzová *et al.* (2011) também reportaram um aumento na atividade dessa enzima em peixes expostos a herbicidas e fungicidas. **GST**: Esta enzima é importante no processo de desintoxicação dos vertebrados, pois conjuga uma série de substratos eletrofílicos, oriundos da primeira etapa da biotransformação (EROD), em glutathione reduzida, protegendo a célula contra os efeitos deletérios dos xenobióticos. A indução da atividade dessa enzima pode ser considerada benéfica no processo de desintoxicação celular do organismo. Por outro lado, sua inibição é pouco compreendida. No presente estudo houve inibição significativa dessa enzima em relação ao controle ( $p < 0.05$ ) tanto no fígado quanto nas brânquias em animais expostos às duas concentrações estudadas (10 e 15 mg.L<sup>-1</sup>). Ballesteros *et al.* 2009, também encontrou inibição da GST nas brânquias, fígado e músculo de *Jenynsia multidentata* expostos ao organoclorado endossulfan. Esses resultados sugerem que pode haver uma falha no sistema de biotransformação durante o período de exposição ao xenobiótico, levando ao estresse oxidativo. A atividade da acetilcolinesterase no cérebro dos juvenis de tambaqui apresentou inibição significativa nos dois tratamentos (10 mg.L<sup>-1</sup> e 15 mg.L<sup>-1</sup>) (Figura 2 (B)), o que pode sugerir danos que interferem na atividade colinérgica cerebral dos peixes, como dificuldade de natação e capacidades de fuga. Modesto e Martinez (2010) também observaram inibição da atividade da AchE no cérebro e músculo. No presente trabalho, não foram medidos parâmetros comportamentais a fim de corroborar esta hipótese.

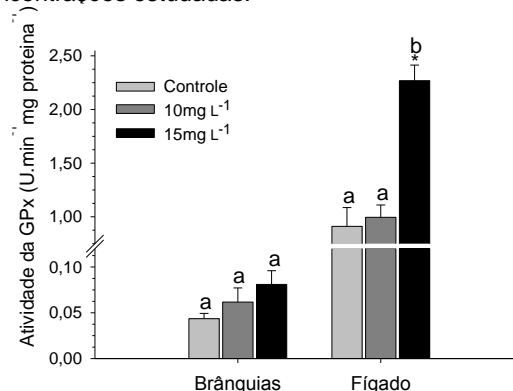


**Figura 2. (A)** Índice de Danos Genético (GDI) e **(B)** Atividade da Ache em juvenis de tambaqui expostos aos tratamentos: Controle (0,00 mg L<sup>-1</sup>), RD (10 mg L<sup>-1</sup>) e RD (15 mg L<sup>-1</sup>) durante 96h de exposição. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0.05$ ) entre os grupos. \* Significa diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle.



**Figura 3. (A)** Atividade da EROD e **(B)** atividade da GST em juvenis de tambaqui expostos aos tratamentos: Controle (0,00 mg L<sup>-1</sup>), RD (10 mg L<sup>-1</sup>) e RD (15 mg L<sup>-1</sup>) durante 96h de exposição. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0.05$ ) entre os grupos. \* Significa diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle.

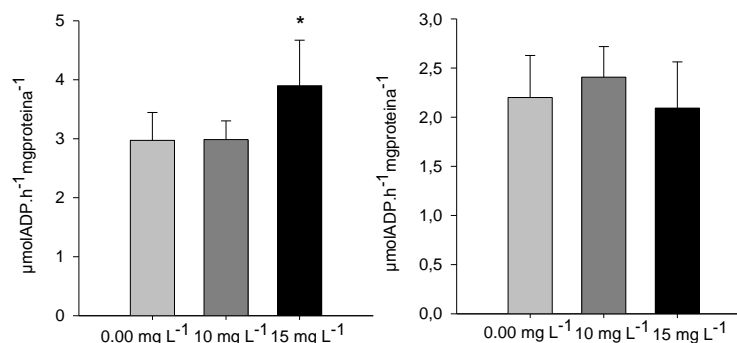
A SOD é a primeira enzima da linha de defesa antioxidante, é responsável por catalisar a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. Entretanto, a GPx metaboliza uma variedade de peróxidos, inclusive peróxido de hidrogênio. Essas enzimas agem em conjunto na tentativa de neutralizar a geração das espécies reativas de oxigênio, que podem causar peroxidação das membranas e moléculas de DNA. No presente estudo, a atividade da GPx aumentou significativamente ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle no fígado e brânquias somente em animais expostos à concentração de  $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (Figura 4). Contudo, a SOD não apresentou alteração significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle em nenhum dos indivíduos expostos ao RD nas duas concentrações estudadas.



**Figura 4.** Atividade da GPx em juvenis de tambaqui expostos aos tratamentos: Controle ( $0,00 \text{ mg L}^{-1}$ ), RD ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) e RD ( $15 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante 96h de exposição. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0.05$ ) entre os grupos. \* Significa diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle.

#### Parâmetros osmorregulatórios

A atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase foi induzida nas brânquias na maior concentração utilizada do RD (Figura 6). Não foi observada diferença significativa na atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase, e no íon  $\text{K}^+$  indicando que a regulação iônica manteve os níveis plasmáticos deste íon. Porém, houve um aumento nos níveis de  $\text{Na}^+$  na concentração de  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , uma resposta importante, pois revela que o RD nessa concentração, interfere na capacidade osmorregulatória da espécie.



**Figura 5.** Atividade da  $\text{H}^+$ ATPase (A) e  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase (B) em juvenis de tambaqui expostos aos tratamentos: Controle ( $0,00 \text{ mg L}^{-1}$ ), RD ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) e RD ( $15 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante 96h de exposição. \* Significa diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle.

#### Análise histológica das brânquias

Os peixes expostos ao Roundup<sup>®</sup> mostraram sinais de lesões branquiais como: edema intersticial, congestão das lamelas, descolamento do epitélio lamelar e hiperplasia do epitélio do filamento. As alterações histológicas observadas na concentração de  $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  sugerem que o Roundup<sup>®</sup> compromete a estrutura e o funcionamento do órgão.

**Tabela 1.** Índice de alterações histológicas (IAH) nas brânquias de juvenis de tambaqui expostos aos tratamentos: Controle ( $0,00 \text{ mg L}^{-1}$ ), RD ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) e RD ( $15 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante 96h de exposição.

	Animal (n)	IAH	Efeitos
Controle (0,0 mg. L-1)	6	2,85	Funcionamento normal do órgão
10 mg. L-1	6	8,75	Funcionamento normal do órgão
15 mg. L-1	6	11,28*	Danos leves a moderados no órgão

\*Significa diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle.

#### 4. Conclusão

Conclui-se que a utilização do herbicida RD, mesmo em baixas concentrações, pode causar um desequilíbrio no sistema de defesa antioxidante e a xenobióticos do tambaqui, além de causar danos na estrutura e funcionamento das brânquias, quando os mesmos são expostos agudamente a esse herbicida, mesmo sem alterar seu equilíbrio osmorregulatório.

#### 5. Referências Bibliográficas

- Assis, H.C.S.; Nicareta, L.; Salvo, L.M.; Klemzi, C.; Truppel, J.H.; Calegari, R. 2009. Biochemical biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish *Ancistrus multispinis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(6):1401-1407.
- Ballesteros, M.L.; Wunderlin, D.A. 2009. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicol Environ Safety*, 72:199-205.
- Ferraro, M.V.M.; Fenocchio, A.S.; Mantovani, M.S.; Oliveira, R.C.; Cestari, M.M. 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genet Mol Bio*, 27(1):103-107.
- Jiraungkoorskul, W.; Upatham, E.; Kruatrache, M.; Sahaphong, S.; Vichasri-Grams, S.; Pokethitiyook, P. 2002. Histopathological effects of Roundup, a Glyphosate Herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *ScienceAsia*, 28: 121-127.
- Laffon, B.; Fraga-Iriso, R.; Pérez-Cadahía, B.; Méndez, J. 2006. Genotoxicity associated to exposure to Prestige oil during autopsies and cleaning of oil-contaminated birds. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 1714-1723.
- Langiano, V.C. 2006. *Toxicidade do Roundup e seus efeitos para o peixe neotropical Prochilodus lineatus*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Paraná. 62p.
- Mataqueiro, M.I. 2002. *Toxicidade aguda e subaguda do inseticida methyl paration no pacu (Piaractus mesopotamicus)*. Dissertação de Mestrado, Centro de aquicultura da Universidade Estadual Paulista Campos de Jaboticabal, Jaboticabal, São Paulo. 41p.
- Miyazaki, D.M.Y.; Machado Neto, J.G.; Castagnolli, N. 2004. Toxicidade aguda de triclofon, paration metílico e glifosato para alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e tambacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos (ENBRAPOA), 8., 2008, Laguna. Anais. Maringá: Biblioteca Setorial da UEM, p. 203.
- Modesto, K.; Martinez, C. 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 81: 781–787.
- Porto, M.S.A. 2005. *Indicadores de estresses em peixes da Amazônia: sensibilidade em face do tipo de estressor*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 38 p.
- Rodrigues, R.V.; Miranda-Filho, K.C.; Gusmão, E.P.; Moreira, C.B.; Romano, L.A.; Sampaio, L.A. 2010. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *Sci Total Environ*, 408: 2054-2059.