



AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CELULAR DO HERBICIDA GLIFOSATO EM *Astyanax spp.*

Maico Roberto Luckmann Rodrigues da Silva¹

RESUMO: Os agrotóxicos são agentes químicos amplamente utilizados na agricultura no controle de ervas invasoras. Dentre os agrotóxicos, o organofosforado Roundup® é um dos herbicidas mais usados no Brasil. Seu princípio ativo é o glifosato, um agente tóxico que atinge os corpos d'água através do lençol freático por meio da lixiviação e infiltração da água das chuvas, da irrigação ou da percolação no solo. Concentrações subletais podem provocar alterações moleculares e celulares que afetarão a morfologia, fisiologia e bioquímica dos tecidos. Este estudo teve como objetivo principal analisar a frequência de micronúcleo em eritrócitos de *Astyanax spp.* Dois grupos de peixes foram expostos por 72 horas (exposição aguda) à concentração de 65 µg/L de glifosato diluído na água em aquário. A concentração de glifosato utilizada no experimento foi determinada com base na Resolução N° 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que estabelece a concentração máxima permitida de glifosato (65 µg/L) em águas dos rios no Brasil. Os resultados apresentaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) com o aumento da taxa de micronúcleo dos peixes do grupo tratado com 65 µg/L de glifosato em relação ao grupo controle (sem a presença de glifosato). Os efeitos nocivos do glifosato sobre o DNA dos eritrócitos de *Astyanax spp.*, apontam para uma preocupação séria à biologia de peixes e deve ser levado em consideração nos estudos de impactos ambientais.

Palavras chaves: Micronúcleos. Toxicidade Celular. Glifosato. Eritrócitos. *Astyanax spp.*

ASSESSMENT OF CELLULAR TOXICITY IN THE HERBICIDE GLYPHOSATE *Astyanax spp.*

ABSTRACT: Pesticides are chemicals widely used in agriculture to control weeds. Among the pesticides, organophosphate Roundup® is a herbicide commonly used in Brazil. Its active ingredient is glyphosate, a toxic agent that reaches the water bodies through groundwater through leaching and infiltration of rainwater, irrigation or percolation into the soil. Sublethal concentrations can cause molecular and cellular

¹Acadêmico do curso de Ciências Biológicas (Bacharel) da Universidade do Contestado -UnC - Campus Concórdia. Atualmente é bolsista do Curso de Extensão do Programa de Educação Superior para o Desenvolvimento Regional (PROESDE). Foi Bolsista do Art. 170 em 2013. E-mail: maik.roberto@hotmail.com

changes that will affect the morphology, physiology and biochemistry of tissues. This study aimed to analyze the frequency of micronuclei in erythrocytes of *Astyanax spp.* Two groups of fish were exposed for 72 hours (acute exposure) at a concentration of 65 mg/L of glyphosate diluted in water in the aquarium. The concentration of glyphosate used in the experiment was determined on the basis of Resolution No. 357/2005 of the National Environmental Council (CONAMA), which establishes the maximum permissible concentration of glyphosate (65 g/L) in river waters in Brazil. The results were statistically significant ($p \leq 0.05$) with increasing rate of micronucleus fish group treated with 65 mg/L of glyphosate in the control group (without the presence of glyphosate). The harmful effects of glyphosate on the DNA of erythrocytes *Astyanax spp.*, point to a serious concern to the biology of fish and should be taken into account in studies of environmental impacts.

Key words: Micronuclei. Cellular toxicity. Glyphosate. Erythrocytes. *Astyanax spp.*

INTRODUÇÃO

A poluição causa grande desequilíbrio nos diversos ecossistemas, sendo gerada principalmente por resíduos químicos oriundos de atividades agrícolas e industriais, por esgoto sem tratamento e por acúmulos de lixo.

Dentre os resíduos químicos, os agrotóxicos são agentes mais tóxicos, constituídos por uma grande variedade de compostos, que afetam tanto os organismos animais quanto vegetais. No oeste do estado de Santa Catarina, a agricultura é a atividade econômica predominante e nas últimas décadas houve um aumento no uso de agrotóxicos na região resultando em um comprometimento da fauna e da flora, que pode levar a alterações significativas na biologia das espécies.

Dentre os agrotóxicos, o organofosforado Roundup® é um dos herbicidas mais usados no Brasil e no mundo. Seu princípio ativo é o glifosato (N-fosfometilglicina), geralmente comercializado na forma de sal isopropilamônio, cujas propriedades químicas permitem que se solubilize facilmente nos ambientes aquáticos.

Considerando que a contaminação dos ambientes aquáticos por agrotóxicos na região do município de Concórdia é uma realidade preocupante, e que os peixes são alvos diretos desta contaminação, torna-se imprescindível a realização de estudos direcionados a avaliação da toxicidade celular do glifosato em peixes.

Analisando a importância de reconhecer os mecanismos celulares para avaliação da toxicidade do herbicida glifosato, amplamente utilizado na agricultura, propõe-se neste estudo utilizar como modelo experimental o peixe *Astyanax spp.*, um peixe nativo já utilizado em outras pesquisas relacionadas a micronúcleo. A espécie *Astyanax spp.*, apresenta sensibilidade quando exposto a produtos químicos por ser capaz de absorver de forma rápida os compostos que são diretamente adicionados na água e acumulá-los em diferentes tecidos.

Segundo Hinton e Lauren (1990), o termo biomarcador de poluição ambiental refere-se a órgãos específicos que sofreram alterações morfológicas, estruturais nas células e/ou tecidos e funcionamento, como consequência da exposição a um contaminante. Evidentes sinais de toxicidade, como diminuição na tomada de alimento, perda do equilíbrio e da pigmentação e morte são precedidas por mudanças bioquímicas, fisiológicas e/ou morfológicas do organismo. A avaliação qualitativa ou quantitativa dessas mudanças antes da morte do organismo fornece indicações antecipadas de toxicidade (MEYERS; HENDRICKS, 1985).

O glifosato tem fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$, massa molar de 169,1 g/mol, e apresenta-se na forma de sal isopropilamônio. Em condições ambientais, tanto o glifosato quanto seus polímeros sólidos cristalinos são muito solúveis em água. É comumente usado no combate a ervas daninhas anuais e perenes, monocotiledôneas ou dicotiledôneas, em culturas de arroz irrigado, cana-de-açúcar, café, citros, entre outras espécies, onde geralmente o mesmo é usado na concentração de 48% (SANTOS *et al.*, 2002).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) o grau de toxicidade aguda deste herbicida é baixo, mas de qualquer forma pode impedir ação e funções enzimáticas nos animais em geral, sendo especialmente em peixes devido a alguns compostos presentes em sua fórmula. Mesmo o glifosato não tendo um grau alto de toxicidade sua utilização em alguns países da Europa é limitado a um valor de 0,1 µg/L de água potável por indivíduo, desde que o valor máximo não ultrapasse de 0,5 µg/L. Para alimentos a tolerância varia de 0,10 mg/Kg a 50,00 mg/Kg (SANTOS *et al.*, 2002).

O teste do micronúcleo foi originalmente desenvolvido por Schmid (1975) para células da medula óssea de camundongos e foi adaptado por Hooftman e de Raat (1982) para o estudo de células sanguíneas de peixes mantidos em laboratórios. Micronúcleos são cromossomos inteiros ou parciais que não foram incorporados dentro do núcleo da célula filha durante a divisão celular e que aparecem como uma pequena estrutura arredondada e escura, idêntico em aparência ao núcleo celular (Ramsdorf, 2007).

MATERIAIS E METODOS

Para o estudo foram utilizados peixes juvenis do gênero *Astyanax spp.* Esta espécie com comprimento médio entre 5 a 7 cm, foi adquirida em lagoas de piscicultura, supostamente livres de substâncias genotóxicas, em área rural na propriedade do senhor Nivaldo Wuaden, no município de Peritiba - Santa Catarina (27°22'51.3" S e 51°54'37.7"W).

Os representantes de *Astyanax spp.*, foram mantidos em laboratório em 2 aquários com água decolorada, armazenados a uma densidade de 1 g de peixe por litro, num total de 6 peixes em cada aquário. A aclimatação foi realizada por um

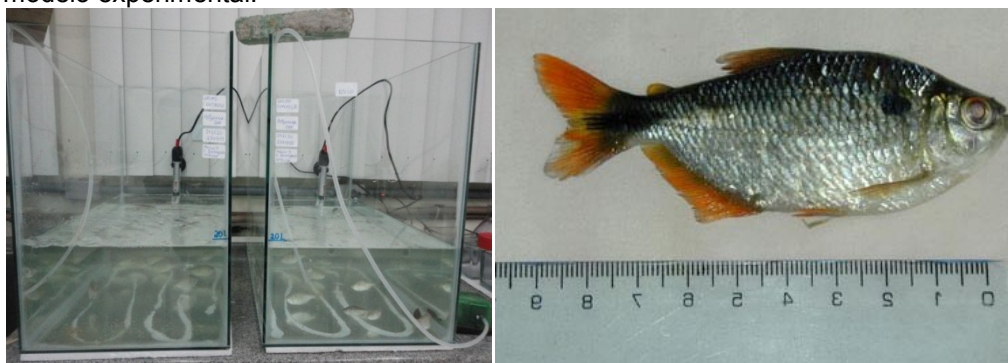
período de 3 dias sob aeração constante, alimentação diária com ração para peixes, na temperatura controlada de 24 (± 1 ° C) e fotoperíodo natural.

Os peixes foram expostos por 72 horas à concentração de 65 $\mu\text{g/L}$ de glifosato diluído na água do aquário (concentração regulamentada pela Resolução do CONAMA nº 357 de 2005 para água de rios no Brasil). Foi realizado o teste de micronúcleo que investiga os eritrócitos, com o objetivo de avaliar dano cromossômico *in vivo*. Os peixes foram divididos em dois grupos (Figura 1).

Grupo I – Peixes expostos a 65 $\mu\text{g/L}$ de glifosato

Grupo II – Peixes não expostos ao glifosato (controle negativo)

Figura 1 – Aquários utilizados no experimento e exemplar do peixe *Astyanax spp.*, utilizado como modelo experimental.



Fonte: Dados da pesquisa (2013)

Para a análise do micronúcleo foi extraído sangue das brânquias, e utilizado a técnica de esfregaço com posterior fixação em álcool metílico e coloração com Giemsa 5%. Os eritrócitos foram analisados em microscópio de luz. Foram contadas cerca de 3000 células por peixe e avaliado a formação de micronúcleos.

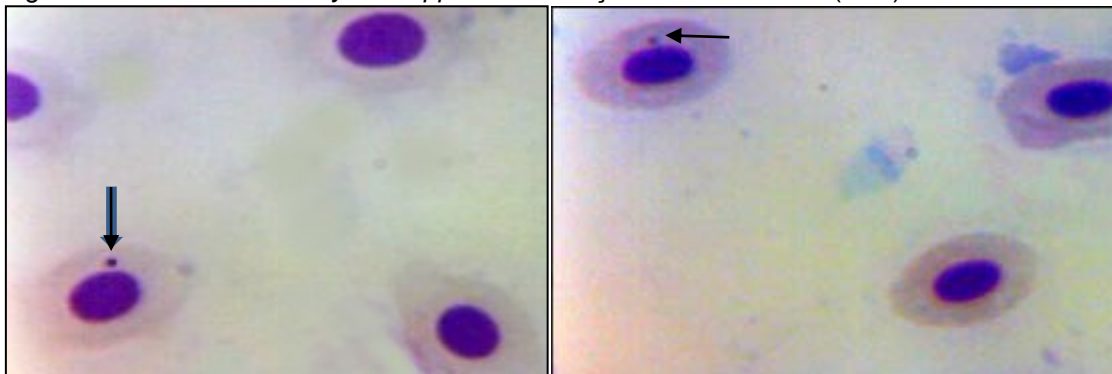
RESULTADOS E DISCUSSÕES

Vários estudos têm utilizado o teste de indução de micronúcleos para se avaliar a exposição de peixes em diferentes poluentes e em condições de laboratório (MANNA et al, 1985), há diversos relatos da capacidade que os agrotóxicos, especificamente o glifosato, têm em causar danos e alterações no material genético de animais, incluindo a espécie humana (PAZ--Y-MIÑO, 2007). Os nossos resultados apresentaram um aumento significativo de micronúcleos nos peixes expostos ao herbicida glifosato.

Os resultados de pH e temperatura encontraram-se dentro da faixa adequada para peixes de água doce (OSTRENKY; BOEGER, 1998) variando de pH $7.14 \pm 0,4$ entre os aquários e temperaturas de $24^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ nos dois aquários.

Os resultados obtidos neste estudo apresentaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) nos eritrócitos de *Astyanax spp.*, (Figura 2), para a taxa de micronúcleo dos peixes do grupo tratado com $65 \mu\text{g/L}$ de glifosato em relação ao grupo controle (sem a presença de glifosato).

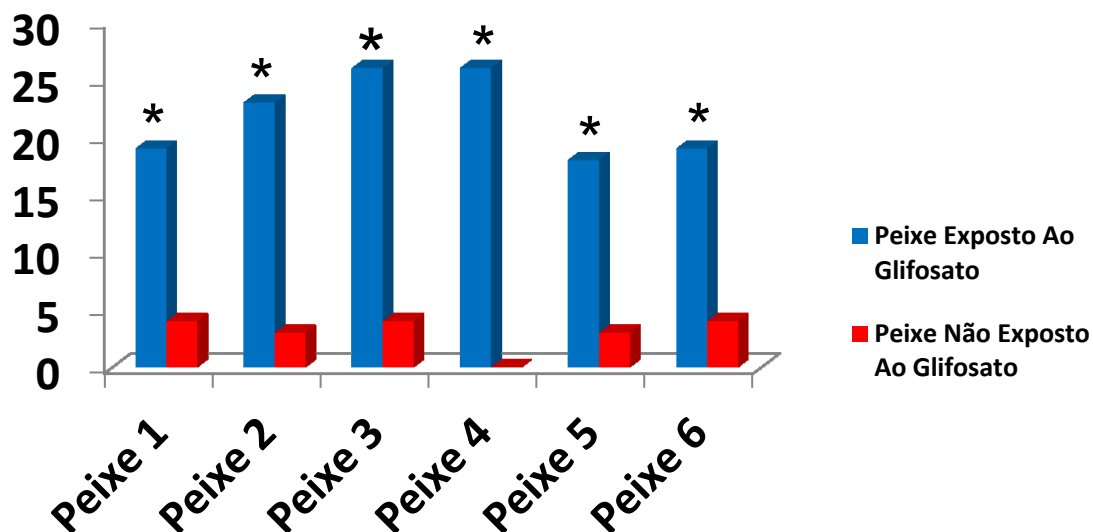
Figura 2 – Eritrócitos de *Astyanax spp.* com formação de micronúcleo (seta) e eritrócitos normais.



Fonte: Dados da pesquisa (2013)

Sobre presença de micronúcleos nos peixes expostos ao glifosato, contando 1500 eritrócitos por lâmina, em um total de 3000 células de cada peixe, observou-se que as quantidades de micronúcleos representaram uma média de 21,83 micronúcleos. Já a quantidade de micronúcleos observadas no grupo controle negativo representou uma média de 3,80 micronúcleos. O Gráfico 1 representa a quantidade de micronúcleos observados, os asteriscos indicam diferença significativa entre os peixes expostos ao glifosato e não expostos ao glifosato. Os dados são expressos em média e erro padrão ($p \leq 0,05$). A lâmina 4 do grupo controle negativo teve que ser descartada, então a mesma representou um valor de zero para a pesquisa.

Gráfico 1 - Gráfico representando as médias de micronúcleos dos grupos de estudo.



Fonte: Dados da pesquisa (2013)

Existem grandes variações com base nos estudos sobre o potencial genotóxico de glifosato e formulações, tal como o Roundup®, devido às diferentes formulações farmacêuticas, as doses aplicadas, os métodos utilizados e os organismos estudados (CAVALCANTE *et al*, 2008). As diferenças entre os resultados publicados de diferentes estudos podem ser levadas em conta devido à diferença dos efeitos gerados destes produtos, visto que nestes estudos, herbicidas à base de glifosato podem resultar tanto na ausência quanto na incidência de danos ao DNA.

Além de eritrócitos, outras células são utilizadas no monitoramento dos efeitos genotóxicos de poluentes, podendo então observar-se melhor respostas específicas de tecidos, sendo assim diferentes tecidos, como o intestino, o fígado, brânquias, gônadas, rim, baço e músculo, são escolhidos para a determinação do dano no DNA (CAVALCANTE *et al*, 2008). Esta é uma questão que deve ser levada em conta, uma vez que uma maior quantidade de testes em tecidos diferentes pode apontar com mais clareza o quanto um organismo em questão pode ser afetado.

O uso intensivo e extensivo de produtos químicos na sociedade moderna envolve substâncias químicas (GUILLEN *et al* 2012), que causa a especulação quanto o agente em questão que possa vir a ser prejudicial. A contaminação de ambientes aquáticos apresenta graves consequências para o bem-estar dos organismos expostos, porque os poluentes podem induzir mutações e câncer (BEYERSMANN e HARTWIG, 2008). Por isso deve-se ter em mente que a quantidade e a própria utilização de herbicidas, percolados em rios devido ação das chuvas, e além de serem os principais poluentes das águas superficiais e aquíferos podem se fazer presentes em águas destinadas ao consumo humano podendo afetar a qualidade de vida desta população.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Se houver exposição sucessiva a agentes genotóxicos a capacidade de reparo do organismo fatalmente será suplantada, o que pode levar a fenômenos degenerativos capazes de gerar morte celular ou danos cumulativos no sentido da transformação maligna (CARRARD, 2007). Logo os efeitos nocivos do glifosato sobre o DNA dos eritrócitos de *Astyanax spp.*, demonstradas no estudo são uma preocupação séria para a biologia de peixes e deve ser levado em consideração nos estudos de impactos ambientais. Estes resultados contribuem para a compreensão da toxicidade do glifosato para os organismos não-alvo e o seu potencial efeito genotóxico.

REFERÊNCIAS

- BEYERSMANN, D.; HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. **Arch Toxicol.** v. 82, p. 493–512, 2008.
- CARRARD, Vinicius Coelho. Teste dos Micronúcleos – Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal. **R. Fac. Odontol.** Porto Alegre, v. 48, p. 77-81, 2007.
- CAVALCANTE, D.; MARTINEZ, C. B. R.; SOFIA, S. H. **Genotoxic effects of Roundup on the fish Prochilodus lineatus.** Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 15 abr. 2008. Disponível em: http://www.researchgate.net/publication/51412755_Genotoxic_effects_of_Roundup_on_the_fish_Prochilodus_lineatus Acesso em: 08 jan. 2014.
- GUILLÉN D. et al. Prioritization of chemicals in the aquatic environment based on risk assessment: analytical, modeling and regulatory perspective. **Sci Total Environ,** v. 440, p. 236–252, 2012.
- HOOFTMAN, R. N.; DE RAT, W. K. Induction of nuclear abnormalities (micornuclei) in peripheral blood erythrocytes of Eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research,** v. 104, p. 147-152, 1982.
- HINTON, D.E., LAURÉN, D.J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. In: ADAMS, S.M. (Ed) **Biological indicators of stress in fish.** Bethesda: American Fisheries Society Symposium 8'. p. 51-66, 1990.
- MEYERS, T.R., HENDRICKS, J.D. Histopathology. In: RAND, G.M., PETROCELLI, S.R. (Eds.) **Fundamentals of aquatic toxicology:** methods and applications. Washington; Hemisphere Pub. p.283-331, 1985.

OSTRENSKY, A.; BOEGER, W. **Piscicultura**: fundamentos e técnicas de manejo. Guaíba: Agropécuaária, 211p, 1998.

PAZ-Y-MIÑO, C. Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 2, p. 456-460, 2007.

RAMSDORF, W. Utilização de duas espécies *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 23, p.308–313, 2007.

SANTOS, Teresa C. R. dos; JUNIOR, Ozelito P. de A. **Glifosato**: propriedades, toxicidade e legislação. SCIELO: São Paulo, 2002.

SCHMIDT, W. The micronuclei test. **Muat Res**, v. 31, p 1-15, 1975.

Artigo recebido em: 02/06/2014

Artigo aprovado em: 15/12/2014