

**DISTÚRBIOS FISIOLÓGICOS EM *MACROBRACHIUM ROSENBERGII* SUBMETIDOS A
CONTAMINAÇÃO AGUDA POR GLIFOSATO — EFEITOS NA DEFESA
ANTIOXIDANTE, COLINESTERASE E METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS**

**LUIZ FERNANDO COSTA HOLANDA^{1,2,*}, KEVEEN JHONATHAN SOARES ESCORSIN^{2,3},
MILENA CIA RETCHESKI^{2,3}, LUISA HELENA CAZAROLLI^{2,4}, SILVIA ROMÃO^{2,5}**

1 INTRODUÇÃO

A carcinicultura é uma área da produção aquícola que vem crescendo gradativamente nos últimos anos, principalmente em pequenas propriedades agrícolas em busca de novas fontes de renda, sendo a criação de camarão de água doce uma das escolhas por apresentar um bom valor de mercado e facilidade de cultivo em regiões rurais. O desempenho do cultivo de *M. rosenbergii* próximo a áreas agrícolas com uso intensivo de agrotóxicos, pode ser influenciado pelo efeito destes compostos na fisiologia do animal, portanto é fundamental o conhecimento do comportamento fisiológico desses animais frente à contaminação com agrotóxicos (NEW e VALENTI, 2000).

O glifosato é um herbicida pós emergente, sistêmico, não seletivo, hidrossolúvel e de amplo espectro, estável na presença de luz e de temperaturas acima de 60 °C (AMARANTE JÚNIOR et al., 2002). Existem informações controversas sobre a capacidade do glifosato de interferir na atividade da acetilcolinesterase, enzima utilizada como marcador de neurotoxicidade (MODESTO, 2009). Outro efeito identificado para o composto é o estabelecimento de condição de estresse oxidativo, por atingir o sistema de defesa antioxidante podendo levar a aumento de produção de espécies reativas de oxigênio, causando grandes danos ou morte celular (DAFRE, 2012; FERREIRA, 2010).

Durante o ciclo produtivo, os camarões sofrem diversas situações estressantes que podem gerar desequilíbrios fisiológicos e prejudicar a produção. O momento da estocagem é particularmente frágil, pois o animal em estágio de pós-larva passa por um período de transporte em ambientes de alta densidade e baixa qualidade da água, que pode durar aproximadamente 24 horas, e posteriormente é transferido diretamente para o ambiente de engorda, estando sujeito a grandes

¹ Graduando em Agronomia - ênfase em Agroecologia, UFFS, *campus Laranjeiras do Sul*, contato: luiz.holanda934@gmail.com

² Grupo de pesquisa: Agroecologia

³ Graduando de Engenharia de Aquicultura, UFFS, *campus Laranjeiras do Sul*- PR.

⁴ Doutor em Farmácia; UFFS, *campus Laranjeiras do Sul*- PR.

⁵ Doutor em Ciências-Bioquímica; UFFS, *campus Laranjeiras do Sul* - PR. Orientador

variações ambientais e predação. Nesta situação, a presença de glifosato no ambiente de cultivo, mesmo que em baixa concentração e de forma aguda, pode intensificar a condição de estresse imposta pela estocagem e contribuir para baixos desempenhos da produção.

2 OBJETIVOS

Analisar os efeitos da contaminação de glifosato sobre pós larva de camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* no estágio de desenvolvimento de pós larva.

3 METODOLOGIA

O experimento foi desenvolvido com pós larvas de camarões de água doce *M. rosenbergii* provenientes da criação própria presente na Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, *campus* Laranjeiras do Sul, PR, sendo realizado no laboratório de Experimentação Animal. Os animais adultos, oriundos de tanques de cultivo acompanhados pelo projeto, foram transferidos para o laboratório, aclimatados e alimentados, e após a identificação da reprodução, as fêmeas gravíticas foram separadas em caixas de 25 litros, em sistema de recirculação e isoladas em maternidades impedindo o canibalismo das larvas recém eclodidas. Após a eclosão, as larvas foram separadas em larvicultura em um novo sistema de recirculação, em caixas de 300 litros, abastecidos com água com salinidade de 12 a 16 ‰, acoplado a um biofiltro, oxigenação constante e temperatura média de 28 a 30 °C. As larvas foram alimentados com *Artemia* (aproximadamente quatro artemias por larva), cinco vezes ao dia, durante oito dias, e após a este período foi mantido fornecimento de artemias duas vezes ao dia e complementada a alimentação com ração tipo “flan” constituída por ovo de galinha, farinha de peixe, leite em pó, farinha de trigo, óleo de fígado de bacalhau, pré-mix de vitaminas e minerais e água. Esta condição foi mantida até o momento em que ocorreu metamorfose final com transformação dos animais em pós-larvas.

Para a aclimação em água doce, as pós-larvas foram separadas e transferidas para água com salinidade de 6 ‰ por 12 horas, posteriormente 50 % do volume foi substituído por água doce mantido por 12 horas e então substituída por água doce. Para o ensaio de contaminação foram utilizados 300 animais, divididos em seis aquários de dois litros (50 animais). Todos os aquários foram mantidos com oxigenação constante e temperatura de 28 °C. O ensaio de contaminação foi realizado separando dois grupos em triplicata, sendo, grupo experimental, contaminado com glifosato 100 mg/L e grupo controle, sem glifosato. Para a contaminação foi utilizado o produto comercial ROUNDUP® WG.

Após a contaminação foi realizado acompanhamento do comportamento dos animais e realizado ensaio de resposta a estímulo mecânico. O ensaio consistiu de estímulo mecânico suave, com o uso de um bastão de vidro, em animais que estavam parados no momento da observação.

Foram realizadas seis verificações nas primeiras 12 horas e uma verificação ao final do período de ensaio, após 24 horas de contaminação. Com 24 horas de contaminação foram contabilizados os animais, identificado se houve mortes, coletados e congelados em temperatura de - 85 °C para determinação das atividades das enzimas colinesterase e GST em microplaca e realização de leitura em espectrofotômetro.

Para as análises bioquímicas, as pós-larvas foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 50 mM, centrifugadas 12.000 xg, por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante utilizado para as análises. A determinação da concentração de proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976) para o cálculo normalizado das demais análises. A análise da atividade da enzima colinesterase foi realizada por meio do método de Ellman et al., (1961). O princípio da atividade da Glutathione transferase (GST) foi baseado na GST catalisando a reação do composto antioxidante não enzimático, o tripeptídeo glutathione (GSH), com um eletrófilo hidrofóbico, xenobiótico ou endógeno, que podem ser tóxicos para o organismo. Com esta metodologia a GST catalisa a reação do substrato CDNB com o GSH, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento de absorvância a 340 nm. Análise de normalidade das amostras e Anova foram realizadas para os resultados de atividades enzimáticas de Colinesterase e GST.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve mortalidade de animais dos grupos controles e contaminados por glifosato no período do ensaio. Após duas horas de contaminação foi observado movimentação características das pós-larvas, que corresponde a movimentação natatória constante em sentido circular em torno das paredes laterais dos aquários. Após quatro horas de contaminação, os animais do grupo contaminado apresentaram visível redução da atividade natatória, mantendo-se no fundo do aquário. Ao realizar ensaio de estímulo à movimentação mantinham-se imóveis até serem tocados pelo bastão de vidro, fazendo um movimento rápido para o lado, esse comportamento se manteve durante 12 horas de contaminação, porém após 24 horas os animais já se encontravam com movimentação normalizada, com o padrão de natação semelhante aos animais dos grupos controles.

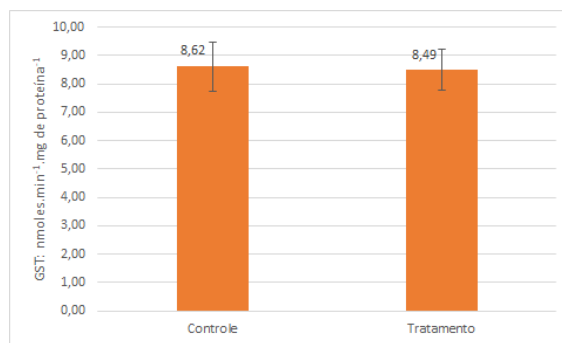
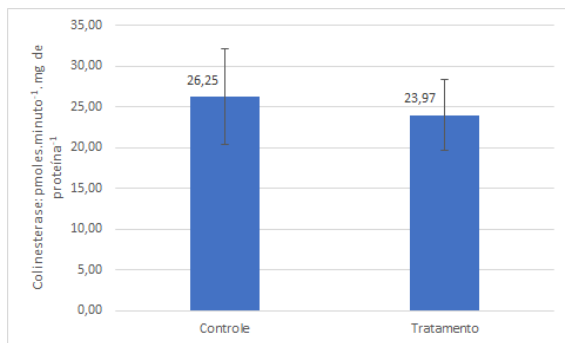
As alterações comportamentais encontradas em pós-larvas de *M. rosenbergii* submetidas ao glifosato indicam que o composto interfere na capacidade de movimentação dos animais. Mensah et al., (2011) relataram interferência na capacidade motora em camarões de água doce *Caridina nilotica* submetidos ao herbicida glifosato, relatando movimentos lentos e erráticos. A indução ou inibição da colinesterase pode influenciar no processo de neurotransmissão colinérgica e promover efeitos de letargia ou nado errático (MIRON et al., 2005), e quando altos níveis de inibição são estabelecidos a paralisia pode causar a morte do animal (Cattaneo, 2009).

As pós-larvas submetidas ao glifosato não apresentaram alteração na atividade da enzima colinesterase (gráfico 1A). Porém, considerando as alterações comportamentais observadas é possível supor a ocorrência de alteração da atividade e retorno à atividade padrão da enzima após 24 horas. Relatos de efeito do glifosato sobre a atividade da enzima colinesterase foram apresentados por Moraes, (2018), em juvenis de *M. rosenbergii* submetidos a 100 mg/L do produto comercial Glifosato Nortox SL. Nestes estudos o glifosato foi capaz de causar redução da movimentação e inibição da colinesterase hepatopancreática nas primeiras nove horas de contaminação, porém o efeito inibitório desapareceu após 24 horas. A inibição da enzima acetilcolinesterase foi observada em peixes (MENÉNDEZ-HELMAN et al., 2012), porém uma ausência de interferência em tecido muscular e uma redução, dependente da concentração em tecido nervoso foi observada em animais da espécie *Leporinus obtusidens* (GLUSCZAK et al., 2006). Outros estudos demonstraram que a AChE não sofre interferência do glifosato (Lopes e Rosa 2012), ou ainda induz aumento de atividade (PALAS et al., 2014).

A Enzima GST não apresentou alteração nos animais contaminados com glifosato (gráfico 1B). Relatos de Moraes, (2018), em ensaios com juvenis de *M. rosenbergii* submetidos a 100 mg/L do produto comercial Glifosato Nortox SL demonstraram ativação da GST hepatopancreática já após duas horas e mantido em 24 horas do ensaio. Esta enzima tem papel importante na detoxificação do organismo em relação a compostos endógenos e exógenos (Trivella 2006). Há relatos de aumento (SOBJAK, 2016; MORAES, 2018) e redução (PALAS et al., 2014) da atividade da GST em contaminações por glifosato. Duas hipóteses podem ser levantadas em relação à variação da capacidade do glifosato de desencadear a ativação da GST em pós-larvas (nossos resultados) e juvenis (MORAES, 2018) de *M. rosenbergii*. A primeira hipótese está relacionada à variação da fase de desenvolvimento dos animais utilizados nos ensaios e a segunda em relação ao produto comercial utilizado nos ensaios. Em peixes o produto comercial Roundup apresenta maior toxicidade, LC50, 96 horas, estimada em $3,6 \pm 0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de glifosato para *Poecilia reticulata* (Rocha et al, 2015), comparado ao produto comercial GLI-UP 480 SL, CL50 por 96 horas de 70, 55 mg.L^{-1} de glifosato para *P. reticulata* (Pires, 2013) ou ainda, ao produto comercial glifosato Nortox SL, utilizado em ensaios de desenvolvimento embrionário de *Rhamdia quelen* por 72 horas em concentração de $6,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de glifosato (Sobjak et al, 2017). A ausência de ativação da enzima GST pode indicar uma maior permanência do composto no organismo animal, aumentando com isso, a sua capacidade de interferir na fisiologia animal.

Gráfico 1: Atividade da Colinesterase e GST de *M. rosenbergii* em pós-larvas submetidas a 100 mg/L de glifosato no período de 24 horas. A: Colinesterase, B: GST. As barras correspondem a

média e desvio padrão.



5 CONCLUSÃO

O glifosato interfere no comportamento de pós-larvas de *M. rosenbergii*, causando redução de movimentação podendo tornar estes animais mais suscetíveis a predação em um sistema de produção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DAFRE, A. L. **Biomarcadores Bioquímicos: Vantagens e Limitações Técnicas**. In: XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, Porto de Galinhas – PE, 2012. p. 1.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDREAS, V. J.; FEATHERSTONE, R. M. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity**. *Biochem Pharmacol.* v.7, n.88, 1961
- FERREIRA, Daiane. **Parâmetros de Estresse Oxidativo e Estudo de Lesões Histopatológicas em Jundiás (*Rhamdia Quelen*) Expostos a Agroquímicos**. 2010. 55 f. Dissertação – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- NEW, M. B.; VALENTI, W.C.; TIDWELL, J. H.; D'ABRAMO, L.R.; KUTTY, M. N. **Freshwater Prawns Biology and Farming**. Editora: Wiley-Blackwell - John Wiley & Sons, Ltd. p. 544. 2010.
- MORAES, A. B. Análise do Efeito da Contaminação do Glifosato no Camarão de Água Doce *Macrobrachium rosenbergii*: Efeito Letal, Neurotóxico e sobre o Sistema Antioxidante. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação. Universidade Federal da Fronteira Sul. Engenharia de Aquicultura. 2018.
- SOBJAK, T.M.; ROMÃO, S.; NASCIMENTO, C.Z.; SANTOS, A.F.P.; VOGEL, L.; GUIMARÃES, A.T.B. Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of *Rhamdia quelen* fish. **Chemosphere**, v. 182, p. 267-275, 2017.

Palavras-chave: Camarão gigante da Malásia; Roundup; Pós-larva; toxicidade;

Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2020-0447

Financiamento

Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FAADCT/PR).