

EFEITO DA CONTAMINAÇÃO DO GLIFOSATO NO CAMARÃO DE ÁGUA DOCE *Macrobrachium rosenbergii*: EFEITO NEUROTÓXICO, SOBRE O SISTEMA ANTIOXIDANTE E METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS

**LUIZ VITOR MAXIMOWSKI¹², LUIZ FERNANDO COSTA HOLANDA³, MILENA
CIA RETCHESKI⁴, LUISA HELENA CAZAROLLI⁵, SILVIA ROMÃO^{2,6}**

1 Introdução

Diversos estudos têm demonstrado a influência de agrotóxicos em geral sobre a fisiologia animal. Em especial os organofosforados e carbamatos apresentam uma grande interferência na atividade da acetilcolinesterase (SILVA, 2016).

A carcinicultura é uma atividade relevante na aquicultura nacional, principalmente em pequenas propriedades agrícolas por apresentar um bom valor de mercado e facilidade de cultivo em regiões rurais. O desempenho do cultivo de *Macrobrachium 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).

2 Objetivos

Analisar os efeitos da exposição de glifosato sobre camarão de água doce *M. rosenbergii* no estágio de desenvolvimento de pós-larva.

3 Metodologia

Os animais foram criados e reproduzidos no laboratório, em ambiente climatizado. A larvicultura foi realizada em sistema de recirculação, com salinidade de 12 a 16 ‰ acoplado a um biofiltro, oxigenação constante e temperatura média de 28 a 30 °C e as larvas foram

1 Engenheiro de Aquicultura, UFFS, *campus Laranjeiras do Sul*, contato: lvitor049@gmail.com

2 Grupo de Pesquisa: Agroecologia

3 Engenheiro Agrônomo, UFFS, *campus Laranjeiras do Sul*.

4 Engenheira de Aquicultura, Mestranda Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFF, *campus Laranjeiras do Sul*, Apresentadora

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

6 Doutor em Ciências-Bioquímica, UFFS, *campus Laranjeiras do Sul* - PR, **Orientadora.**

alimentados com *Artemia* e flan formulado no laboratório a base de farinha de peixe, ovos, farinha de trigo, leite, óleo de fígado de bacalhau e água. As pós-larvas foram aclimatadas a água doce com diminuição gradativa da salinidade durante 24 horas e posteriormente submetidas a exposição ao glifosato por um período de 96 horas. Os animais, 1440 pós-larvas de camarão *M. rosenbergii*, com peso médio de 0,0245 g, foram separados em 12 aquários de 7 litros (120 animais por aquário), distribuídos em 2 tratamentos, 0 (controle) e 100 mg/L de glifosato, em 7 períodos de tratamento (2, 6, 9, 12, 24, 48 e 96 horas) com 3 repetições por tratamento. Para a contaminação foi utilizado o produto comercial ROUNDUP® WG. Os animais foram acompanhados a cada período, realizando ensaio de estímulos à movimentação, e separando os animais mortos. Posteriormente foi realizada coleta de duas amostras de 15 animais de cada aquário em cada tempo estipulado e congelados a -85 °C para posterior análises bioquímicas. Os animais coletados foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio 50 mM em gelo, centrifugados 12.000 xg, por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante armazenado para as análises de concentração de proteína, lipoperóxidos com afinidade ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Federici, shaw & handy, 2007), glutathiona reduzida – GSH (SEDLAK & LINDSAY, 1968), atividade das enzimas colinesterase (ELLMAN *et al.* 1961), aspartato transaminase – AST (Kit comercial), Alanina transaminase – ALT (Kit comercial), glutamato desidrogenase (GLDH) (Ciardiello *et al.*, 2000), catalase – CAT (AEDI, 1984), Glutathiona S transferase – GST (KEEN, HABIG & JAKOBY, 1976), todas realizadas em microplaca e leitura espectrofotométrica.

4 Resultados e Discussão

Houve morte de animais do grupo exposto ao glifosato após 2 horas ($5,3 \pm 3,3$ % dos animais), seguido de 3 mortes após 6 horas e ausência de mortes no restante do período do ensaio. As pós larvas apresentavam aproximadamente 15 dias após metamorfose final, porém foi nítido que somente os animais que apresentaram maior peso morreram com a exposição ao glifosato. Moraes (2018), em CL50 em *M. rosenbergii* em estágio juvenil expostos ao Glifosato Nortox SL identificou mortalidade de 100% dos animais submetidos a 150 mg/L de glifosato e mortalidades parciais em concentrações de 10, 50, 100 e 150 mg/L de glifosato no período de 96 horas. Neste estudo há relatos de grande mortalidade de animais juvenis com peso médio de $0,493 \pm 0,148$ g (60 dias após metamorfose) em concentração equivalente de

glifosato, e ainda que nesta concentração houve paralisia intensa, perda de equilíbrio e até queda dos animais, portanto sugere-se que o glifosato atua em alguma via metabólica que é mais crítica em animais maiores, ocasionando sua morte devido as mudanças fisiológicas profundas que ocorrem nesse crustáceo com o passar do seu desenvolvimento.

Após quatro horas de contaminação, os animais do grupo exposto ao glifosato apresentaram visível redução da atividade natatória, mantendo-se no fundo do aquário e imóveis até serem tocados pela pinça, fazendo um movimento rápido para o lado, esse comportamento se manteve durante 12 horas de contaminação, porém a partir de 24 horas os animais apresentavam padrão de natação semelhante aos animais dos grupos controles. Este comportamento indica que o composto altera a capacidade de movimentação dos animais. Há relatos de interferência na movimentação em camarões de água doce *Caridina nilotica* submetidos ao herbicida glifosato, com movimentos lentos e erráticos (MENSAH, et. al. 2012).

Foi observado aumento da atividade da enzima colinesterase em 2, 6, 9 horas de contaminação, e posteriormente em 48 horas de contaminação houve uma diminuição dessa atividade. Como a indução ou inibição da colinesterase podem influenciar nos processos de neurotransmissão colinérgica, com promoção de efeitos de letargia ou nado errático (MIRON et al., 2005), os resultados encontrados podem estar diretamente relacionados com os efeitos de indução das colinesterases encontrados nas primeiras horas de ensaio.

Em relação aos marcadores de resposta antioxidante, a enzima GST apresentou aumento de atividade em 6 horas de ensaio e posteriormente em 9 horas ocorreu a diminuição da atividade da mesma. Porém não foi observado variação da enzima catalase no período do ensaio. Em relação ao marcador de defesa GSH, houve aumento da concentração de GSH em 12, 24 e 48 horas de ensaio, em relação aos controles do mesmo período. Já o marcador de dano oxidativo, LPO, apresentou aumento nos grupos experimentais em relação aos controles no último período de avaliação, 96 horas após início do experimento.

Em uma análise global, a ausência de alteração da atividade da enzima catalase, o aumento da GST em 6 horas, seguido de redução em 9 horas e aumento da GSH em 12, 24 e 48 horas indicam que houve uma indução da defesa antioxidante relacionada ao ciclo da GSH, com possível participação, também, das enzimas GR e GPX, que não foram analisadas. A

indução foi capaz de proteger os animais de danos oxidativos, porém esta proteção não foi suficiente em 96 horas, onde ocorreu um aumento expressivo de peroxidação lipídica.

Em relação aos marcadores do metabolismo de proteínas, foi observado aumento da atividade da enzima AST dos grupos experimentais em relação aos controles em 6 horas após início do experimento. A enzima ALT, apresentou aumento de atividade em 6, 48 e 96 horas. e a enzima GLDH apresentou redução em 9 e 96 horas, com aumento em 48 horas.

As alterações de atividade das enzimas AST, ALT e GLDH em animais submetidos a exposição ao glifosato indicam que o composto interfere no metabolismo de aminoácido e excreção de amônia dos animais. Como AST e ALT apresentaram um aumento da atividade em 6 horas, seguidas de redução de atividade da GLDH em 9 horas, aparentemente o grupamento amina não foi excretado, mas sim transferido para síntese de outros aminoácidos, provavelmente demandados para síntese de proteínas importantes para a resposta fisiológica frente ao estresse criado pela presença do glifosato. Um efeito semelhante pode ser observado em 96 horas de ensaio, onde um aumento de atividade da ALT foi acompanhado de diminuição da atividade da GLDH. Porém, em 48 horas de ensaio, os animais expostos ao glifosato apresentaram aumento de atividade da ALT acompanhado de aumento de atividade da GLDH, indicando neste momento um pico da degradação de aminoácidos, provavelmente para suprir a aumento na demanda energética.

5 Conclusão

A exposição ao glifosato causa efeitos letais, alterações comportamentais e fisiológicas em *M. rosenbergii*. As alterações fisiológicas estão relacionadas, entre outras, em interferências no metabolismo de aminoácidos e na defesa antioxidante dos animais. O glifosato poderá afetar o desempenho produtivo de *M. rosenbergii* em ambientes sujeitos a presença desse composto, como em áreas rurais permeadas por intenso uso de agrotóxicos.

Referências Bibliográficas

AEBI H. Catalase in vitro. In: *Methods in Enzymology*. pp. 121–126. Academic Press. 1984.

COYLE, S. D., ALSTON, D. E.; SAMPAIO, C. M. S. NURSERY Systems and Management. In **Freshwater Prawns Biology and Farming**. Edited by New, M. B; Valenti, W. C; Tidwell, J. H.; D'Abramo, L. R; Kutty, M. N. Blackwell Publishing Ltd. 2010.

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.

FEDERICI G., SHAW B.J. & HANDY R.D. (2007). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology** 84, 415–430.2007.

CIARDIELLO, M. A., CAMARDELLA, L., CARRATORE, V., & PRISCO, G. DI. 1-Glutamate dehydrogenase from the Antarctic fish *Chaenocephalus aceratus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, 1543(1), 11–23. 2000.

KEEN J.H., HABIG W.H. & JAKOBY W.B. Mechanism for the Several Activities of the Glutathione S-Transferases. **The Journal of Biological Chemistry**. 251, 6183–6168. 1976.

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.

MENSAH, P. K.; MULLER, C. G.; PALMER, C. G. Using growth measures in the freshwater shrimp *Caridina nilotica* as biomarkers of Roundup pollution of South African freshwater systems. **Physics and Chemistry of the Earth**. p. 262-268, 2012.

NEW, M. B., VALENTI, W. C. 2000. **Freshwater Prawn Culture**. Blackwell Science, USA.

SEDLAK J. & LINDSAY R.H. Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. **Analytical Biochemistry** 25, 192–205. 1968.

SILVA Ana Cecília Abreu. Biomarcadores de Contaminação Ambiental. 72 f. Dissertação - Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2016.

Palavras-chave: aquicultura; agrotóxico; marcadores bioquímicos; estresse oxidativo; espécies reativas de oxigênio.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2020-0447

Financiamento: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico