



Evento: XXXIV Seminário de Iniciação Científica

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO GLIFOSATO NO PERFIL OXIDATIVO NO TECIDO MUSCULAR DE RATOS WISTAR¹

Elisângela de Fátima Balzan Valentini², Samara Cristine Knebel³, Laura Schleder Correa⁴, Alessa Schwede Walker⁵, Luã Henrique Urrutigaray⁶, Thiago Gomes Heck⁷, Mirna Stela Ludwig⁸

¹ Projeto de pesquisa desenvolvido na Unijui; com financiamento da agência CNPq.

² Estudante do curso Medicina, bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - PIBIC/CNPq. Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI - GPpF. elisangela.valentini@sou.unijui.edu.br.

³ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde- PPGAIS (UNICRUZ/UNIJUI/URI). Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI - GPpF. samara.knebel@sou.edu.br.

⁴ Doutoranda Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde- PPGAIS (UNICRUZ/UNIJUI/URI). Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI - GPpF. laura.schleder@sou.unijui.edu.br.

⁵ Biomédica pela UNIJUI. Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI - GPpF. alessa.schwede@unijui.edu.br

⁶ Bolsista; estudante do curso Psicologia; Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - PIBIC/CNPq. Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI - GPpF. lua.urrutigaray@sou.unijui.edu.br.

⁷ Docente no Programa de Pós Graduação em Atenção Integral à Saúde e Programa de Pós-Graduação em Modelagem Matemática e Computacional, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em (In)Atividade Física e Saúde (INCT-CNPq). Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI - GPpF. thiago.heck@unijui.edu.br.

⁸ Professora Orientadora, Docente do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde- PPGAIS (UNICRUZ/UNIJUI/URI). Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI - GPpF. ludwig@unijui.edu.br.

INTRODUÇÃO

Os herbicidas são substâncias que atuam no controle de ervas daninhas, aumentando, assim, o rendimento da produção agrícola (Di Noi et al., 2024). Dentre os grupos químicos de herbicidas existentes, os mais comercializados e usados na proteção das culturas são os organofosforados, classe representada principalmente pelo glifosato (Baćmaga et al., 2024; IBAMA, 2022). Glifosato é um tipo de herbicida não seletivo e seu uso expandiu-se globalmente com a criação de sementes geneticamente modificadas para tolerá-lo; assim, esse dessecante não prejudicaria o crescimento de culturas de interesse agrícola (Costas-Ferreira et al., 2022). Desse modo, sabe-se que o uso cada vez maior desse herbicida no campo e até mesmo em áreas urbanas amplia a chance de exposição e contato humano, com o potencial de causar alterações orgânicas e riscos toxicológicos para as populações (Benbrook, 2016).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dispôs sobre a manutenção do ingrediente ativo glifosato em produtos agrotóxicos do Brasil e estabeleceu a dose de



Ingestão Diária Aceitável (IDA) de herbicidas à base de glifosato (HBG) via água potável e alimentos em 0,5 mg/kg/dia (ANVISA, 2020). Entretanto, a dose diária aceitável frequentemente é excedida, fato que se comprova pelos efeitos crônicos relacionados com o acúmulo desse metabólito nos organismos vivos, como mudanças na composição das microbiotas no solo, nas plantas e nos intestinos animais (Van Bruggen et al., 2018).

O estudo de Nozdrenko et al. (2021) observou uma diminuição da força e da reserva energética muscular de ratos durante a exposição subcrônica ao herbicida (dose de 10 µg/kg/dia). Modelos experimentais *in vivo* demonstraram que a exposição ao glifosato gerou, além do aumento de EROs, diminuição na atividade das enzimas antioxidantes no músculo esquelético, demonstrando a grande toxicidade gerada por esse herbicida (Jayaraman et al., 2023). O músculo esquelético é um tecido metabólico muito ativo. Sua atividade natural gera espécies reativas de oxigênio (Kozakowska et al., 2016). Entretanto, suas células são ricas em enzimas antioxidantes que, além de neutralizar o excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs), também regulam a regeneração muscular.

Sabe-se que a exposição materna a HBG na dose de 1,85 mg/ml por 30 dias, durante o desenvolvimento de filhotes de camundongo, foi capaz de causar fibrose muscular no sóleo, além de diminuir o metabolismo desse músculo (Barbosa et al., 2022). Assim, a exposição contínua aos HBG causa riscos potenciais ao pleno funcionamento desse tecido importante. Desse modo, considerando alguns efeitos já estudados sobre a exposição aos HBG no músculo esquelético, no contexto do Objetivo de Desenvolvimento Sustentável para 2030 (ODS-ONU) 3 (Saúde e Bem-Estar) e 15 (Vida Terrestre), busca-se analisar neste estudo a lipoperoxidação e a atividade antioxidante da enzima superóxido dismutase no músculo esquelético de ratos Wistar expostos de maneira crônica à dose IDA de HBG.

METODOLOGIA

Este resumo integra um recorte de um estudo experimental conduzido e realizado no Laboratório de Ensaio Biológicos (LEBio) da UNIJUÍ. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIJUÍ (CEUA/UNIJUÍ), protocolo nº 028/24.

Foram utilizados 24 ratos Wistar (12 machos e 12 fêmeas), de 120 a 150 dias de idade, provenientes e alojados no Biotério da UNIJUÍ. Os animais foram alojados em caixas específicas para roedores, sendo três animais por caixa, com temperatura ambiente controlada



(22 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais foram divididos em 04 grupos experimentais por 12 semanas: Controle: fêmeas (CF, n=6) e machos (CM, n=6) receberam água *ad libitum*; Glifosato: fêmeas (GF, n=6) e machos (GM, n=6) receberam água com glifosato (dose de 0,5 mg/kg/dia por animal, representando a dose de IDA recomendada pela ANVISA). Todos os animais receberam ração e água *ad libitum*. Ao final do estudo, os animais foram eutanasiados por overdose anestésica para coleta dos tecidos de interesse.

Para analisar os efeitos do glifosato sobre a lipoperoxidação no músculo gastrocnêmio foi utilizada a Técnica de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). Os tecidos homogeneizados foram precipitados com ácido tricloroacético (TCA) a 10%, levados ao banho-maria com ácido tiobarbitúrico (TBA) por 15 minutos a 100 °C e depois centrifugados. As absorbâncias foram avaliadas a 535 nm. A curva padrão foi confeccionada utilizando-se o malondialdeído (MDA) e os resultados foram expressos em η mol de MDA/mg de tecido (BUEGE;AUST,1978). Para análise estatística foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk seguido de análise comparativa de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns, no programa estatístico GraphPad Prism 11.0, com $P < 0,05$.

A análise da atividade da superóxido dismutase (SOD) nesse tecido foi realizada pela técnica de inibição da auto-oxidação do pirogalol. Em uma cubeta foram adicionados 954 μ L de tampão Tris/1 mM de EDTA 50 mM (pH 8,2), 4 μ L de catalase (CAT; 30 μ M), 10 μ L de homogeneizado e 32 μ L de pirogalol (24 mM em HCl 10 mM). O peróxido de hidrogênio gerado na presença de SOD reage, então, com pirogalol na presença de catalase para formar uma solução de cor amarelada, detectada a 37 °C em espectrofotômetro (420 nm) a cada 20s por 120s. Os resultados foram expressos em unidades de SOD/mg de proteína (Marklund; Marklund, 1974). Para análise estatística, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk seguido de ANOVA de uma via, com pós-teste de Tukey, no programa GraphPad Prism 11.0, considerando $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo evidenciam que a exposição crônica ao herbicida à base de glifosato não modificou a lipoperoxidação das membranas celulares, bem como a atividade antioxidante da enzima superóxido dismutase, no tecido muscular esquelético.



Figura 1A. Avaliação da lipoperoxidação no tecido gastrocnêmio. Fonte: próprio autor. MDA: malondialdeído. CM: Controle Macho (n=6); GM: Gly Macho (n=6); CF: Controle Fêmea (n=6); GF: Gly Fêmea (n=6). Kruskal-Wallis, seguido de pós teste de Dunn's, P = 0,2207. Dados expressos em mediana, valores mínimo e máximo e quartis.

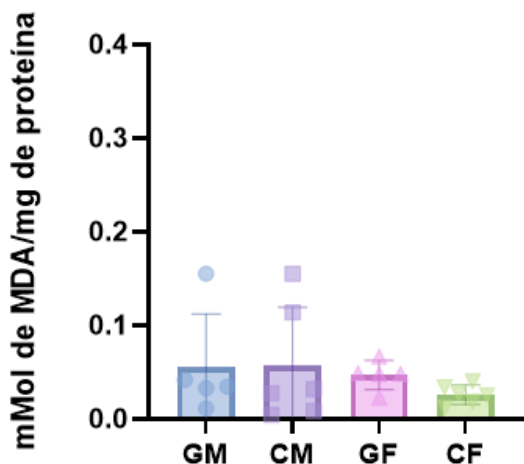
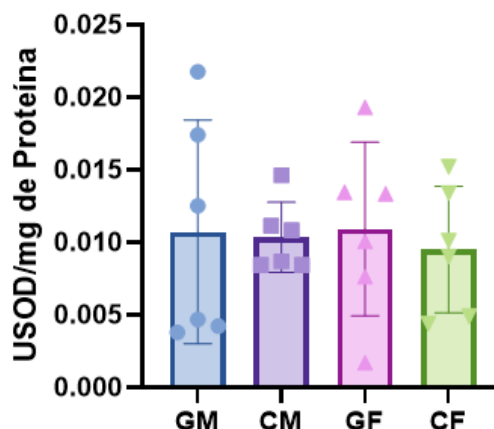


Figura 1B. Análise da atividade da enzima superóxido dismutase no tecido muscular esquelético. Fonte: próprio autor. USOD: Unidades de Superóxido Dismutase. CM: Controle Macho (n=6); GM: Gly Macho (n=6); CF: Controle Fêmea (n=6); GF: Gly Fêmea (n=6). ANOVA de uma via seguida de pós teste de Tukey, P = 0,9707. Dados expressos como média ± desvio padrão.



A peroxidação lipídica é o processo de degradação dos ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares, induzida principalmente por espécies reativas de oxigênio. A lipoperoxidação resulta em danos à estrutura das membranas e componentes celulares, prejudicando assim o fluxo de substâncias para os meios intra e extracelulares, levando até mesmo à apoptose (Lima; Abdalla, 2001). Além disso, quando as células musculares são expostas a agentes perturbadores do estado redox, mensageiros intracelulares promovem a transmissão de sinais que estimulam a expressão de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) (Ji, 2007).

A ausência de alterações na lipoperoxidação e na defesa antioxidante enzimática no músculo esquelético, constatada em nosso estudo, sugere que, nas condições experimentais testadas, a exposição diária por 12 semanas (crônica) à dose de IDA de HBG não gerou dano às membranas e ao metabolismo celular. É pertinente supor que outros mecanismos de defesa antioxidantes, como sistema glutatona, defesa não enzimática e proteínas do choque térmico, possam ter sido suficientes para realizar a defesa contra espécies reativas de oxigênio e atuar contra danos oxidativos neste tecido.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição diária crônica à dose de IDA de herbicida à base de glifosato não foi capaz de causar alterações no perfil oxidativo do músculo esquelético de ratos Wistar.



Entretanto, considerando que existem outros mecanismos de defesa contra o estresse celular e oxidativo, novos estudos serão realizados a fim de avaliá-los neste e em outros tecidos importantes.

Palavras-chave: Glifosato. Estresse oxidativo. Músculo esquelético. Lipoperoxidação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao PIBIC e ao CNPq pelos financiamentos (444286/2024-1, 403136/2024-5, 405546/2023-8, 307926/2022-2) e concessão de bolsas. Agradeço aos colegas e professores do GPeF pelo apoio e parceria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA. Resolução da diretoria colegiada - RDC no 441, de 2 de dezembro de 2020. **Dispõe sobre a manutenção do ingrediente ativo Glifosato.** [s. l.], 2020.
- Baćmaga, M., Wyszowska, J., & Kucharski, J. (2024). Environmental implication of herbicide use. **Molecules** (Basel, Switzerland), 29(24), 5965.
- Barbosa, Ariadne *et al.* Maternal exposure to glyphosate-based herbicide promotes changes in the muscle structure of C57BL/6 mice offspring. **Anatomical Record (Hoboken, N.J.: 2007)**, v. 305, n. 11, p. 3307–3316, 2022.
- Benbrook, Charles M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences Europe**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 3, 2016.
- Costas-Ferreira, Carmen *et al.* Toxic Effects of Glyphosate on the Nervous System: A Systematic Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 4605, 2022a.
- Di Noi, A. *et al.* (2024). Assessing the effects of a commercial fungicide and an herbicide, alone and in combination, on *Apis mellifera*: Insights from biomarkers and cognitive analysis. **Chemosphere**, 359(142307), 142307.
- Jayaraman, Selvaraj *et al.* Glyphosate potentiates insulin resistance in skeletal muscle through the modulation of IRS-1/PI3K/Akt mediated mechanisms: An in vivo and in silico analysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 242, p. 124917, 2023.
- Kozakowska, M. *e col.* O papel do estresse oxidativo na lesão e regeneração muscular esquelética: enfoque em enzimas antioxidantes. **Revista de Pesquisa Muscular e Motilidade Celular**, v. 36, n. 6, p. 377–393, 1 dez. 2016.
- LIMA, Émerson Silva e ABDALLA, Dulcinéia Saes Parra. **Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.
- Nozdrenko, D. *et al.* Analysis of biomechanical parameters of muscle soleus contraction and blood biochemical parameters in rats with chronic glyphosate intoxication and therapeutic use of C60 fullerene. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4977, 2021.
- Painéis de informações de agrotóxicos. **Ibama.** Disponível em: <<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos#Painelcomercializacao>>.
- Van Bruggen, A H C *et al.* Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 616–617, p. 255–268, 2018.