

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: XXVI Seminário de Iniciação Científica

**ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR GLIFOSATO ELEVA A TAXA DE MORTALIDADE EM OLIGOQUETAS (ANNELIDA, CLITELLATA)¹
GLYPHOSATE-INDUCED OXIDATIVE STRESS ELEVATES MORTALITY RATE IN OLIGOCHAETES (ANNELIDA, CLITELLATA)**

Diovana Gelati De Batista², Lílian Corrêa Costa Beber³, Thiago Gomes Heck⁴, Antônio Azambuja Miragem⁵

¹ Pesquisa Institucional desenvolvida no Departamento de Ciências Biológicas, do Instituto Federal Farroupilha (IFFar) campus Santa Rosa, pertencente ao Grupo de Pesquisa em Resposta Celular ao Estresse (GPRCE).

² Aluna do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Instituto Federal Farroupilha (IFFar) campus Santa Rosa, diovana.g.debatista@hotmail.com.br.

³ Aluna do Curso de Mestrado em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI), liliantutty@hotmail.com.

⁴ Professor Doutor do Departamento de Ciências da Vida da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI), Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS), thiago.heck@unijui.edu.br.

⁵ Professor Doutor do Departamento de Ciências Biológicas do Instituto Federal Farroupilha (IFFAR) campus Santa Rosa, Orientador, antonio.miragem@iffarroupilha.edu.br.

INTRODUÇÃO

A crescente utilização de agrotóxicos é um dos principais desafios socioambientais da atualidade, por prejudicar a sobrevivência dos organismos vivos e as suas relações com o meio (MYERS *et al.*, 2016; JANSSENS e STOKS, 2017). Dentre os pesticidas, os herbicidas à base de glifosato são os mais utilizados no mundo, devido à sua não-seletividade e rápida degradação no solo (BENBROOK, 2016). Por não serem específicos, prejudicam organismos não-alvo, como as oligoquetas, importantes organismos edáficos que atuam como engenheiras do ecossistema (LAVELLE *et al.*, 2006). Devido às suas características comportamentais, alimentares e morfofuncionais, são utilizadas como bioindicadores de contaminação do solo (CORREIA e MOREIRA, 2010).

Um dos principais efeitos dos agrotóxicos em seres vivos é a indução do estresse oxidativo. Desequilíbrios do *status redox* induzidos por herbicida à base de glifosato prejudica o adequado funcionamento das células e pode levá-las à morte (GUILHERME *et al.*, 2012). Nesse sentido, Salvio *et al.*, (2016) evidenciaram que a exposição crônica de oligoquetas da espécie *Octolasion cyaneum* ao glifosato provocou a inibição da glutathione-S-transferase (GST), apesar de não reduzir a sua massa e tampouco induzir mortalidade. Contudo, estudos mostram que a longo prazo, a população de minhocas expostas ao glifosato tende a diminuir, até sua extinção (SANTADINO, COVIELLA e MOMO, 2014).

Considerando este contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do glifosato sobre marcadores de estresse oxidativo e taxa de mortalidade de oligoquetas expostas a herbicida à

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: XXVI Seminário de Iniciação Científica

base de glifosato.

METODOLOGIA

Foram utilizadas 84 oligoquetas adultas (*Eisenia andrei*), distribuídas aleatoriamente em 21 unidades experimentais (U.E.), sendo 7 U.E. (n=7) por tratamento, cada uma recebendo 4 animais, por 7 dias. As U.E. foram estabelecidas em potes plásticos, com volume total de 1.350 cm³ e área superficial de 0,023 m². Os animais foram mantidos no hábitat experimental, composto de 950 g de solo (95 %) e 50 g de erva-mate (5 %), a qual serviu de matéria orgânica vegetal alimentar dos animais. A umidade do meio foi regulada para 60% e a temperatura foi monitorada diariamente.

As oligoquetas foram distribuídas nos seguintes grupos experimentais: **grupo controle (CTRL)** (n=7), solo nas condições normais supracitadas, sem contaminação; **grupo glifosato (GLY)** (n=7), solo contaminado com agrotóxico (Glifosato Nortox NA ®, Nortox S/A, PR, Brasil), em solução aquosa (mimetizando a aplicação na lavoura), utilizando o processo de redução volumétrica proporcional, a fim de manter a concentração e diluição média padrão sugerida pelo fabricante (3 L/ha, em 100 L de água); e **grupo superglifosato (SGLY)** (n=7), solo contaminado com glifosato a uma concentração de 10 L/ha, simulando a concentração total aproximada de três aplicações sequenciais - que é a rotineiramente utilizada durante as safras - da dosagem indicada pelo fabricante (3 L/ha).

Após o período de exposição, as minhocas foram coletadas pelo método de catação manual (ANDERSON e INGRAM, 1993), submetidas à eutanásia e congeladas em nitrogênio com *freeze clamp* instantaneamente, estocadas em freezer (-20°C). Posteriormente, foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (KPi, pH 7,4) contendo inibidor de protease (PMSF) para realização das análises bioquímicas. A concentração de proteína foi determinada pelo método espectrofotométrico de Bradford (1976), utilizando curva de albumina como padrão. A lipoperoxidação foi mensurada pelo teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), utilizando curva de malondialdeído (MDA - 1.1.3.3 - Tetramethoxypropane) como padrão (BUEGE e AUST, 1978). Os resultados foram expressos em mcmol de MDA/L. A atividade da catalase (CAT) foi mensurada pela decomposição do peróxido de hidrogênio, a 240 nm no espectrofotômetro (AEBI, 1984).

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett. Todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o GraphPad InStat 3.0 for Windows. Comitê de Ética em Pesquisa da IFFAR (CEP nº 252.001-2017).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o período de exposição, ocorreu redução no número de espécimes dos grupos contaminados com glifosato (p < 0,008). O grupo GLY apresentou redução de 35% (p < 0,05) no número de minhocas sobreviventes, comparado ao CTRL. A taxa de mortalidade do grupo SGLY, no qual a dosagem do herbicida simulou a concentração total rotineiramente aplicada nas lavouras, foi de 67,5% (p < 0,001), em relação ao grupo controle (Figura 1).

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: XXVI Seminário de Iniciação Científica

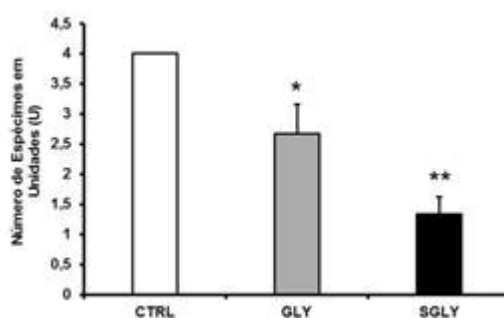


Figura 1. Médias de animais coletados após o período de exposição (7 dias). CTRL, grupo controle (n=7); GLY, contaminado com glifosato a 3 L/ha (n=6); SGLY, contaminado com glifosato a 10L/ha (n=3). Dados em Média \pm EPM. *P<0,05; **P<0,001.

A mortalidade de minhocas expostas ao glifosato em concentrações indicadas para aplicação na lavoura, conforme observado em nossos resultados, não é comum na literatura. Verificou-se apenas 4% de perdas em oligoquetas *Eisenia andrei* expostas ao herbicida durante sete dias à concentração de 47 mg/Kg de solo, uma das mais elevadas entre as testadas no estudo (BUCH, 2013). Correia e Moreira (2010) não verificaram mortalidade de minhocas da espécie *Eisenia foetida* após exposição crônica ao glifosato. Contudo, os animais apresentaram redução em sua biomassa, excessiva secreção mucosa, alterações morfológicas e redução em sua atividade, que possivelmente refletem danos a nível celular nestes animais (CORREIA; MOREIRA, 2010).

Em nossos resultados, os animais sobreviventes do grupo SGLY tiveram sua concentração de proteínas total consideravelmente superior à dos demais grupos (p=0,0162), com um aumento de 168,8%, comparado ao CTRL, e de 165,9% em relação ao GLY (Figura 2 A). Além disso, ao avaliarmos a lipoperoxidação, a partir de TBARS, a concentração de MDA (mcmol/L) dos animais expostos à maior dosagem testada (SGLY), também foi maior (p<0,05), comparada aos grupos CTRL e GLY (Figura 2 B). Contudo, não houve diferença na atividade da CAT entre os tratamentos (p=0,943): enquanto a média do CTRL foi de 44,27 \pm 10,90 (UCAT/mg prot.), a dos grupos GLY e SGLY foram de 44,93 \pm 7,26 (UCAT/mg prot.) e 49,18 \pm 13,80 (UCAT/mg prot.), respectivamente.

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: XXVI Seminário de Iniciação Científica

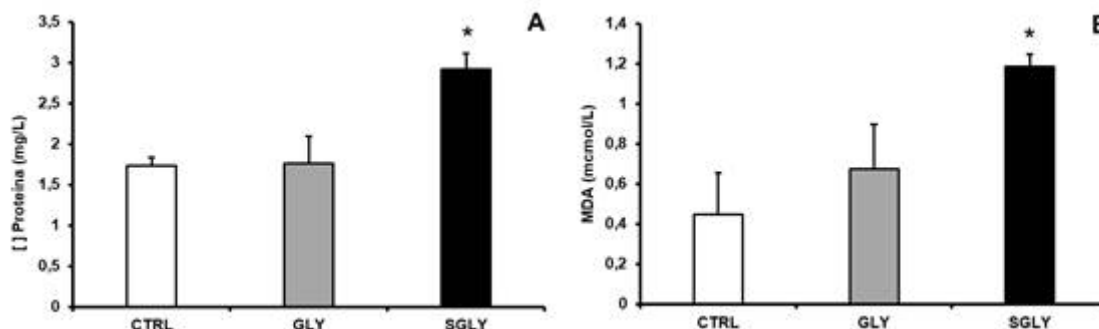


Figura 2. A: Médias de concentração de proteínas das oligoquetas após período de exposição (7 dias). **B:** Médias de concentração de MDA das oligoquetas após período de exposição (7 dias). CTRL, grupo controle; GLY, contaminado com glifosato a 3 L/ha; SGLY contaminado com glifosato a 10L/ha. Dados expressos em Média \pm EPM. *P<0,05.

Em interessante estudo, Contardo-Jara, Klingelmann e Wiegand (2009), ao exporem oligoquetas da espécie *Lumbriculus variegatus* a doses subletais de glifosato durante quatro dias, verificaram que o herbicida foi acumulado nos tecidos dos animais, e que as enzimas antioxidantes SOD e CAT tiveram sua atividade aumentada, o que indica indução de estresse oxidativo. Perante este contexto, embora não tenhamos observado alterações na atividade da catalase, o aumento nas proteínas totais e nos níveis de MDA do grupo SGLY indica o provável abalo celular induzido pelo herbicida. Por isso, novos estudos são necessários, para conhecermos os efeitos deste agrotóxico sobre outros marcadores de estresse celular e, assim, compreendermos as principais vias envolvidas em sua toxicidade, que contribuíram para a mortalidade das oligoquetas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição ao glifosato eleva a taxa de mortalidade de oligoquetas sem alterar a atividade da catalase. No entanto, nossos resultados mostram claramente uma modificação no padrão proteico e nos níveis de MDA dos animais contaminados, o que sugere fortemente que existe uma disfunção metabólica, via elementos do *status redox*, que possivelmente resulta na mortalidade avaliada.

Palavras-chave: Agrotóxico; minhocas; sobrevivência; estado redox.

Keywords: Agrotoxic; earthworms; survival; redox status.

REFERÊNCIAS:

AEBI, H. Oxygen Radicals in Biological Systems. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 1947, p. 121-126, 1984.

ANDERSON, J.M.; INGRAM, J.S.I. Tropical Soil Biology and Fertility: A Handbook of Methods. 2ªEd. **C.A.B Internafional**, 1993.

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: XXVI Seminário de Iniciação Científica

BENBROOK, C. M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Science Europ**, v. 28, n. 3, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72:248-254, 1976.

BUCH, A.C. *et al.* Toxicity of three pesticides commonly used in Brazil to *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) and *Eisenia andrei* (Bouché, 1972). **Applied Soil Ecology**, v. 69, p. 32-38, 2013.

BUEGE, J.A., Aust, S.D. Microsomal lipid, Peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52. Academic Press, New-York, p. 302-310, 1978.

CONTARDO-JARA, V.; KLINGELMANN, E.; WIEGAND, C. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. **Environ. Poll**, v. 157, p. 57-63, 2009.

CORREIA, F. V; MOREIRA, J. C. Effects of Glyphosate and 2,4-D on Earthworms (*Eisenia foetida*) in Laboratory Tests. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 85, p. 264-268, 2010.

GUILHERME, S.; *et al.* DNA damage in fish [*Anguilla anguilla*] exposed to a glyphosate-based herbicide-Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. **Gen Tox Environ Mutag**, v. 743, Issues 1-2, p. 1-9, 2012.

JANSSENS, L.; STOKS, R. Stronger effects of Roundup than its active ingredient glyphosate in damselfly larvae. **Aquatic Toxicology**, v. 193, p. 210-216, 2017.

LAVELLE, P. *et al.* Soil invertebrates and ecosystem services. **Eur J Soil Biol**, Jersey: v. 42, n. 1, p. 3-15, 2006.

MYERS, J. P. *et al.* Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures. **Environ Health**, v.17, p.15-19, 2016.

SALVIO, C. *et al.* Survival, Reproduction, Avoidance Behavior and Oxidative Stress Biomarkers in the Earthworm *Octolasion cyaneum* Exposed to Glyphosate. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 96, p. 314-319, 2016.

SANTADINO, M.; COVIELLA, C.; MOMO, F. Glyphosate Sublethal Effects on the Population Dynamics of the Earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). **Water Air Soil Pollut**, 225:2207. 2014.