



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL
CURSO DE AGRONOMIA**

LUIZ FERNANDO COSTA HOLANDA

**DISTÚRBIOS FISIOLÓGICOS EM PÓS-LARVA DE *Macrobrachium Rosenbergii*
SUBMETIDOS A EXPOSIÇÃO AGUDA POR GLIFOSATO: EFEITOS NA DEFESA
ANTIOXIDANTE, COLINESTERASE E METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS**

LARANJEIRA DO SUL

2022

LUIZ FERNANDO COSTA HOLANDA

**DISTÚRBIOS FISIOLÓGICOS EM PÓS-LARVA DE *Macrobrachium Rosenbergii*
SUBMETIDOS A EXPOSIÇÃO AGUDA POR GLIFOSATO: EFEITOS NA DEFESA
ANTIOXIDANTE, COLINESTERASE E METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Agronomia com Ênfase em Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de bacharel em Agronomia.

Orientadora Prof^a. Dr^a. Silvia Romão

LARANJEIRAS DO SUL

2022

Holanda, Luiz Fernando Costa

Distúrbios Fisiológicos em Pós-Larva de *Macrobrachium Rosenbergi* Submetidos a Exposição Aguda por Glifosato: efeitos na defesa antioxidante, colinesterase e metabolismo de aminoácidos / Luiz Fernando Costa
Holanda. -- 2022.

48 f.:il.

Orientadora: Pr^a. Dr^a. Silvia Romão

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Agronomia, Laranjeiras do Sul, PR, 2022.

1. Extresse Oxidativo. 2. Metabolismo de Aminoácidos.
3. Defesa Antioxidante. 4. Efeito da exposição ao
glifosato. 5. Colinesterase. I. Romão, Silvia, orient.
II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

LUIZ FERNANDO COSTA HOLANDA

DISTÚRBIOS FISIOLÓGICOS EM PÓS-LARVA DE *MACROBRACHIUM ROSENBERGII* SUBMETIDOS A EXPOSIÇÃO AGUDA POR GLIFOSATO: EFEITOS NA DEFESA ANTIOXIDANTE, COLINESTERASE E METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Agronomia com Ênfase em Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de bacharel em Agronomia.

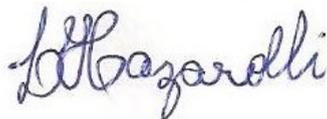
Este trabalho de conclusão foi defendido e aprovado pela banca em:

07/04/2022.

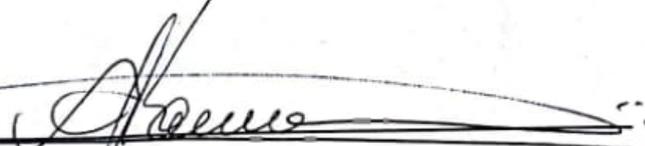
BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Silvia Romão – UFFS
Orientadora



Prof.ª Dr.ª Luisa Helena Cazarolli – UFFS
Avaliador



Prof. Dr. Carlos José Raupp Ramos – UFFS
Avaliador

Este trabalho é dedicado aos meus pais, a minha companheira, amigos e professores que me deram força, suporte e apoio durante essa longa jornada longe de casa.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a minha mãe pelo apoio e incentivo, mesmo muitas pessoas não acreditando em mim, a minha família pelo suporte durante todos esses anos em que estive longe de casa, a minha namorada que independente do que aconteça sempre me dá forças e me incentiva a continuar sempre a frente com a cabeça erguida. Aos professores que em todos os anos de graduação sempre guiando seus alunos e incentivando, além do conhecimento transmitido e as lições que puderam nos passar. A professora Silvia Romão por toda dedicação e ajuda prestada durante esse ano de projeto e desenvolvimento do TCC. Aos meus estimados colegas e amigos que me ajudaram com conselhos, conversas, o tempo em si que deixaram de fazer outra coisa para estarem comigo, sou muito grato a todos que puderam fazer parte desse meu caminho que foi a graduação.

RESUMO

A agricultura vem trazendo diversos impactos ao meio ambiente da forma em que é feita atualmente, onde a produção acarreta elevado uso de pesticidas, que possui importante papel principalmente devido ao potencial tóxico, ausência de mecanismos eficientes de degradação, acúmulo no organismo e transferência entre as cadeias tróficas. O cultivo continental do Camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii*, em áreas permeadas por lavouras, levanta o questionamento quanto ao efeito da exposição do glifosato nestes animais. Com isso, esse trabalho teve como objetivo analisar o efeito da exposição do glifosato sobre os parâmetros fisiológicos em pós-larvas de camarões de água doce (*M. rosenbergii*) por meio de análise de biomarcadores bioquímicos. Foram utilizadas pós-larvas de camarões de água doce *M. rosenbergii*, que passaram por aclimatação e expostos ao glifosato, em 1500 animais com peso médio de 0,024 g. O ensaio foi feito separando grupo experimental exposto ao glifosato com 100 mg/L e grupo controle, sendo realizado coletas dos animais para posteriores testes bioquímicos em 2, 6, 9, 12, 24, 48, 96 horas. Foram realizados testes para defesa antioxidante, metabolismo de aminoácidos e efeitos neurotóxicos (colinesterases). No experimento foram identificadas 41 mortes de animais nas 6 primeiras horas, além de comportamento natatório irregular nas primeiras 12 horas no grupo exposto. Foi observado aumento da atividade da colinesterase em 2, 6, 9 horas, e posteriormente em 48 horas houve uma diminuição dessa atividade. Não houve variação significativa na atividade da CAT em todo o experimento. Em 6 horas de ensaio houve aumento da atividade da GST e diminuição em 9 horas. Houve aumento da concentração de GSH em 12, 24 e 48 horas após exposição. A concentração de LPO aumentou em 96 horas após o início do experimento e da exposição. AST apresentou indução em 6 horas, já a ALT apresentou o mesmo em 6, 48 e 96 horas após início do experimento. E o GLDH apresentou redução da atividade em 9 horas, aumento em 48 horas e redução em 96 horas no grupo exposto. A exposição com glifosato causa efeitos letais, alterações comportamentais e fisiológicas em *M. rosenbergii* após exposição aguda. As alterações fisiológicas estão relacionadas, entre outras, em interferências no metabolismo de aminoácidos, colinesterases e na defesa antioxidante dos animais.

Palavras-chave: camarão. pesticida. defesa antioxidante. marcador bioquímico.

ABSTRACT

Agriculture has been bringing several impacts to the environment in the way it is currently done, where production entails high use of pesticides, which has an important role mainly due to the toxic potential, lack of efficient mechanisms of degradation, accumulation in the body and transference between the trophic chains. The continental cultivation of the freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii*, in areas permeated by crops, raises the question as to the effect of glyphosate exposure on these animals. Thus, this work aimed to analyze the effect of glyphosate exposure on physiological parameters in post-larvae of freshwater shrimp (*M. rosenbergii*) through the analysis of biochemical biomarkers. Freshwater shrimp *M. rosenbergii* post-larvae, which underwent acclimatization and were exposed to glyphosate, were used in 1500 animals with a mean weight of 0.024 g. The trial was carried out separating the experimental group exposed to glyphosate with 100 mg/L and the control group, and the animals were collected for subsequent biochemical tests in 2, 6, 9, 12, 24, 48, 96 hours. Tests for antioxidant defense, amino acid metabolism and neurotoxic effects (cholinesterases) were performed. In the experiment, 41 animal deaths were identified within the first 6 hours, in addition to irregular swimming behavior in the first 12 hours in the exposed group. An increase in cholinesterase activity was observed at 2, 6, and 9 hours, and then a decrease in cholinesterase activity at 48 hours. There was no significant variation in CAT activity throughout the experiment. In 6 hours of the experiment there was an increase in GST activity and a decrease in 9 hours. There was an increase in GSH concentration at 12, 24 and 48 hours after exposure. The concentration of LPO increased at 96 hours after the beginning of the experiment and exposure. AST showed induction in 6 hours, ALT showed the same in 6, 48 and 96 hours after the beginning of the experiment. GLDH showed decreased activity at 9 hours, increased at 48 hours, and decreased at 96 hours in the exposed group. The glyphosate exposure causes lethal effects, behavioral and physiological changes in *M. rosenbergii* after acute exposure. The physiological changes are related, among others, to interferences in amino acid metabolism, cholinesterases and in the antioxidant defense of the animals.

Keywords: shrimp. pesticides. antioxidant defense. biochemical marker.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquema da morfologia externa de *M. rosenbergii* mostrando os tagmas, somitos e principais apêndices céfalo-torácicos e abdominais18
- Figura 2 – Esquema de separação dos animais nas coletas em todos os diferentes períodos. Preparação das alíquotas e separação para as análises bioquímicas.....25

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Atividade da Colinesterase em pós-larva de <i>M. rosenbergii</i> submetidos a 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas.....	31
Gráfico 2 – Atividade da CAT em pós-larva de <i>M. rosenbergii</i> submetidos a 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas	32
Gráfico 3 – Atividade da GST em pós-larva de <i>M. rosenbergii</i> submetidos a 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas.....	33
Gráfico 4 – Atividade da GSH em pós-larva de <i>M. rosenbergii</i> submetidos a 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas.....	34
Gráfico 5 – Atividade da LPO em pós-larva de <i>M. rosenbergii</i> submetidos a 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas.....	35
Gráfico 6 – Atividade da AST em pós-larva de <i>M. rosenbergii</i> submetidos a 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas.....	36
Gráfico 7 – Atividade da ALT em pós-larva de <i>M. rosenbergii</i> submetidos a 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas.....	37
Gráfico 8 – Atividade da GLDH em pós-larva de <i>M. rosenbergii</i> submetidos a 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

ACHÉ	Acetilcolinesterase
AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
CAT	Catalase
CL50	Concentração letal 50%
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GLDH	Glutamato desidrogenase
GST	Glutathiona S transferase
GSH	Glutathiona reduzida
LPO	Peroxidação lipídica
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 JUSTIFICATIVA	14
3 OBJETIVOS	15
3.1 GERAL	15
3.2 ESPECÍFICOS	15
4 REFERENCIAL TEÓRICO	16
4.1 GLIFOSATO: ESTRUTURA QUÍMICA E USO NA AGRICULTURA	16
4.2 CAMARÃO DE ÁGUA DOCE	17
4.3 DEMANDA DE PRODUÇÃO DO CAMARÃO	18
4.4 EFEITOS TÓXICOS	19
4.5 MARCADORES BIOQUÍMICOS	21
4.5.1 Colinesterases	21
4.5.2 Defesa antioxidante e estresse oxidativo	21
5 MATERIAIS E MÉTODOS	23
5.1 DESENVOLVIMENTO DOS ANIMAIS	23
5.2 ENSAIO DE EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO	24
5.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	25
5.3.1 Preparo das amostras	25
5.3.2 Metodologia das análises bioquímicas	26
5.3.2.1 Proteína	26
5.3.2.2 Colinesterase	26
5.3.2.3 CAT	26
5.3.2.4 GST	27
5.3.2.5 GSH	27
5.3.2.6 GLDH	28
5.3.2.7 AST	28

5.3.2.8 ALT	28
5.3.2.9 LPO	29
5.3.3 Análises Estatísticas	29
6 RESULTADOS	30
6.1 MORTALIDADE E ESTÍMULO	30
6.2 ATIVIDADE DA COLINESTERASE	30
6.3 ATIVIDADE DA CATALASE	31
6.4 ATIVIDADE DA GST	32
6.5 ATIVIDADE DA GSH	33
6.6 ATIVIDADE DA LPO	34
6.7 ATIVIDADE AST	35
6.8 ATIVIDADE ALT	36
6.9 ATIVIDADE GLDH	37
7 DISCUSSÃO	38
8 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

O Brasil conta com uma vasta área de produção agropecuária, sendo um dos países que mais exportam produtos desta categoria, e de fato essa atividade possui grande papel sobre a economia. No entanto, tal produção acarreta elevado uso de defensivos agrícolas, colocando o Brasil como o maior consumidor do mundo, em relação a esse insumo. Além disso, agroquímicos muitas vezes são aplicados de forma irracional e sem controle dos órgãos competentes, acarretando contaminações das matrizes ambientais como o solo, as águas superficiais, o ar, a chuva, os alimentos, e consequentemente os seres humanos são afetados nessa cadeia (PIGNATI *et al.*, 2017).

A agricultura vem trazendo diversos impactos ao meio ambiente da forma em que é feita atualmente, o uso intensivo dos solos junto ao uso desenfreado de insumos químicos potencializa desequilíbrios no ecossistema neste modelo insustentável de exploração da terra. Os agroquímicos têm importante papel neste contexto, principalmente devido ao potencial tóxico, ausência de mecanismos eficientes de degradação, acúmulo no organismo e transferência entre as cadeias tróficas (JARDIM *et al.*, 2009).

Na agricultura, o uso de pesticidas vem sendo intensificado há muito tempo. Há relatos de uso a partir de 1700 com o arsênio para controlar insetos em jardins, mas somente a partir do séc. XX com a criação do DDT (diclorodifeniltricloroetano) a era dos agroquímicos deu seu grande passo em direção a situação atual (TAVELLA *et al.*, 2011).

São considerados agrotóxicos todas as substâncias químicas utilizadas no controle de pragas e doenças, no âmbito da agricultura. O glifosato, que se encontra no grupo dos herbicidas, é um composto orgânico sintético com solubilidade em água (SOARES *et al.*, 2017), identificado como uma possível solução para combater e controlar plantas daninhas consideradas como fatores de baixa produtividade das culturas implantadas.

Na atividade aquícola, o cultivo dos camarões vem crescendo muito no mundo, sendo altamente rentável, mostrando-se um dos ramos da aquicultura que mais cresce. Geralmente são criados por pequenos agricultores e são entregues no

mercado regional (VALENTI, 2002). O *M. rosenbergii* é a espécie mais utilizada em projetos de cultivo de camarões de água doce, além de ter sido reconhecida como uma forma de produzir crustáceos com baixo impacto ambiental (NEW *et al.*, 2000).

O cultivo de *M. rosenbergii* vem sendo testado e implementado na região centro sul do Paraná, pois tem um potencial enorme em se tornar uma boa fonte de renda para os pequenos produtores da região, que sempre inovam e buscam fontes de renda diversificadas. Considerando que o cultivo de camarão e não somente ele, estão se desenvolvendo em áreas permeadas por lavouras com uso de herbicidas, identifica-se a importância do estudo das alterações fisiológicas e comportamentais desses animais frente à contaminação com pesticidas em ambiente aquático.

2 JUSTIFICATIVA

Os pesticidas possuem importantes funções nos sistemas de cultivos convencionais, porém a sua movimentação, potencializado pela forma de aplicação, podendo ser carregados pelos ventos ou lixiviados, com frequência leva estes compostos aos ecossistemas aquáticos gerando contaminações que podem causar mortalidade dos organismos vivos nesse ambiente (AMÉRICO *et al.*, 2015). A agricultura é apenas uma das fontes não-pontuais de poluição, porém é indicada como a maior contribuinte de todas as categorias de poluentes (TOMITA; BEYRUTH, 2002).

Segundo Souza (2014), o glifosato possui a característica de ser hidrossolúvel, sendo assim facilmente carregado pela água em chuvas fortes chegando até os corpos d'água. A fácil dispersão, acompanhada de lixiviação, torna o glifosato um composto de difícil rastreabilidade, quanto a sua origem e local de aplicação, agravando ainda mais o uso desses agroquímicos e seu potencial de contaminação.

Em todo o ciclo de produção, os camarões passam por diversas situações de estresse que geram desequilíbrios fisiológicos e podem prejudicar a produção. Um momento particularmente frágil é a estocagem, 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 variações ambientais e predação. Neste contexto, o 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 (HOLANDA *et. al.*, 2021).

Na região Centro-Sul do Paraná, o cultivo de *M. rosenbergii* vem sendo trabalhado por produtores rurais com interesse de buscar novas fontes de renda e produção. Há bons resultados em relação a adaptações na criação desses animais, quando bem manejados e principalmente realizado planejamento evitando o período de inverno devido a baixa resistência dos animais às baixas temperaturas da região. Com isso, o aumento do cultivo dos camarões em áreas rurais que estão expostas ao ambiente agrário, apresenta um conseqüente aumento do potencial de contaminação destes animais por pesticidas, entre eles o glifosato, devido a sua ampla utilização na agricultura mundial.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Analisar o efeito da exposição aguda do glifosato sobre os parâmetros fisiológicos em pós-larvas de camarões de água doce (*M. rosenbergii*) por meio de análise de biomarcadores bioquímicos.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a taxa de mortalidade de *M. rosenbergii* submetido a exposição aguda do glifosato.
- Identificar alterações comportamentais de *M. rosenbergii* submetido a exposição aguda por glifosato.
- Verificar o efeito da exposição aguda do glifosato sobre o estresse oxidativo (dano celular - peroxidação lipídica - LPO) e defesa antioxidante (Glutathiona reduzida - GSH e atividade das enzimas catalase - CAT e glutathiona s transferase - GST) em *M. rosenbergii*.

- Avaliar o efeito da exposição aguda por glifosato na atividade das colinesterases, em *M. rosenbergii*.
- Determinar os efeitos do glifosato sobre o metabolismo de aminoácidos (aspartato transaminase – AST, alanina transaminase – ALT e glutamato desidrogenase – GLDH), em *M. rosenbergii*.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 GLIFOSATO: ESTRUTURA QUÍMICA E USO NA AGRICULTURA

O Brasil é um dos países que mais ampliaram o consumo de pesticidas no mundo, partindo de um consumo de 58 mil toneladas em 1991 para 375 mil toneladas em 2015, o que representa quase 10% de todo consumo de pesticidas utilizados pelas maiores economias do mundo. Sendo que deste total consumido de agroquímicos, 173 mil toneladas são de glifosato, o que representa um valor extremamente alto se comparado com o volume de outros ingredientes ativos utilizados na agricultura (MORAES, 2019).

Segundo Spadotto (2002), o sul do Brasil se destaca com o uso intensivo de herbicidas, seguido pela região centro-oeste, e a região sudeste. Os estados que mais utilizam herbicidas são o Paraná, o Rio Grande do Sul e São Paulo. Parte-se de um pressuposto que o uso de herbicidas é necessário para se produzir em larga escala, política que vem sendo empregada desde a revolução verde, onde as culturas mais presentes no Brasil são as que inflam o mercado desses insumos agrícolas. Neste contexto, a soja é o cultivo em que mais se destaca o uso de herbicidas, com uma média de 5,5 litros por hectare de glifosato aplicado (PIGNATI, *et al.*, 2017).

O glifosato (N-(fosfometil)glicina) é um herbicida que pertence ao grupo das glicinas substituídas, é classificado como pós-emergente, sistêmico, não seletivo, hidrossolúvel e de amplo espectro (GALLI *et al.*, 2005). Sua fórmula molecular é $C_3H_8NO_5P$, sendo um sólido cristalino, com densidade de 0,5 g/cm³, muito estável na presença de luz e de temperaturas acima de 60 °C, com pouca mobilidade no solo (AMARANTE *et al.*, 2002).

O glifosato é comercialmente vendido em concentrações de 48 a 80% m/v de

Sal de Isopropilamina de N-(phosphonomethyl) glicina, o formulado total é utilizado em quantidade que variam de 1 a 6 L/ha dependendo da cultura de aplicação, além de existir diversos produtos comerciais que usam o ingrediente ativo na composição da formulação. É um herbicida utilizado para controle não seletivo de plantas espontâneas em áreas cultivadas e pré-plantio, é muito utilizado em culturas anuais e perenes, além de plantas invasoras aquáticas. Sua classificação toxicológica é categoria 5 onde é improvável de causar dano agudo (GLIFOSATO, MONSANTO DO BRASIL LTDA., 2022).

O glifosato, na planta, atua na inibição competitiva de uma enzima crítica da via do chiquimato, a 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), essa enzima é catalisadora de uma das reações de síntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano, além de outros processos como inibição da síntese de clorofila (GALLI, *et al.*, 2005).

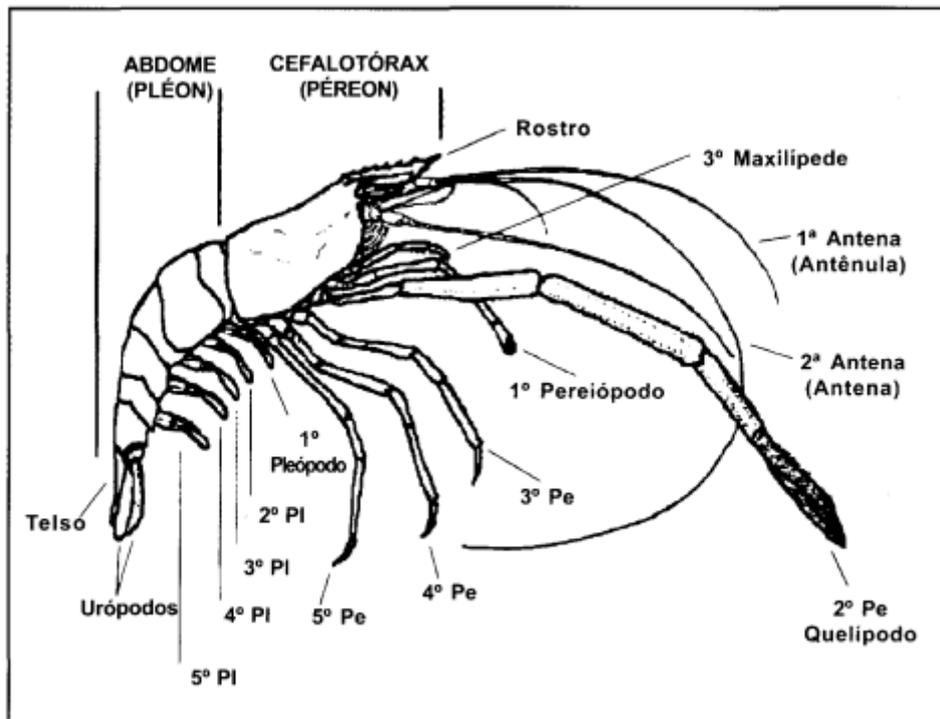
4.2 CAMARÃO DE ÁGUA DOCE

O camarão *M. rosenbergii*, também conhecido como gigante da malásia, é um crustáceo que pertence à família dos Palemonídeos, espécie nativa da Ásia e da Austrália, além de algumas ilhas do oceano Índico e Pacífico, sendo introduzido no Brasil nos anos 70. É considerado o maior camarão de água doce, variando seu tamanho entre 23 a 33 centímetros, podendo chegar a 500 g de peso, seu corpo é acinzentado, contando com o segundo pereiópodo com coloração azulada (PINHEIRO; HEBLING, 1998).

M. rosenbergii é associado a macrofauna bentônica, que caminha junto aos fundos dos rios com auxílio dos apêndices ambulatórios (pereiópodos), utilizando para nadar os apêndices abdominais (pleópodos). Para seu cultivo, a temperatura ideal está na faixa de 28 a 30 °C, sendo temperaturas inferiores a 15°C letais. Em situações onde se sentem ameaçados, executam um movimento de contração da musculatura abdominal muito rápido, com o auxílio do leque caudal, faz com que nade rapidamente e consiga fugir rapidamente. É um animal onívoro que se alimenta de organismos zoobentônicos e vegetais, porém algumas situações como falta de alimento pode levar uma situação de canibalismo, o que torna seu cultivo em

densidades elevadas um problema (PINHEIRO; HEBLING, 1998). As principais estruturas do corpo do *M. rosenbergii* podem ser observadas na figura 1.

Figura 1 – Esquema da morfologia externa de *M. rosenbergii* mostrando os tagmas, somitos e principais apêndices céfalo-torácicos e abdominais (Pe = pereiópodo; PI = pleópodo).



Fonte: PINHEIRO; HEBLING, 1998.

Essa espécie com o passar do tempo assumiu um importante papel para o aumento da produção de camarão como fonte de proteínas na alimentação humana sendo considerada uma das principais *commodities* entre os produtos de origem aquática, muito pelo fato de estar distribuído por todas as zonas tropicais e subtropicais do mundo, e que no Brasil, se apresenta tecnologia de cultivo amplamente difundida no país (VALENTI, 2002; NEW *et al.*, 2000).

4.3 DEMANDA DE PRODUÇÃO DO CAMARÃO

Nos últimos anos a produção mundial de camarões teve uma considerável expansão, pela escassez desse tipo de produto no mercado. Ligado a isso está a

melhoria de tecnologia de produção e o modo em que se é feito a produção desses animais (KRUMMENAUER *et al.*, 2012). O Brasil vem investindo cada vez mais na carcinicultura, pelo fato da demanda recorrente destes produtos no mercado, que surge nos anos 90, com a necessidade em adquirir novas fontes de proteína animal (NEW *et al.*, 2000; VALENTI, 2002).

O cultivo desses animais é realizado geralmente em produção de pequena escala por pequenos produtores, estima-se que na virada dos anos 2000, a produção tenha ultrapassado 200.000 toneladas, que representa quase 20% do que se produz no setor de camarões marinhos (VALENTI, 2002). Pelo fato do cultivo do *Macrobrachium* possuir rápido desenvolvimento, com potencial de alta produtividade, além de ser sustentável causando pouco impacto ambiental, é um ótimo investimento tendo em vista que gera lucro, empregos e utiliza mão de obra familiar (NEW *et al.*, 2000; VALENTI, 2002).

4.4 EFEITOS TÓXICOS

A solubilidade em água é um dos principais meios pelos quais o glifosato chega nos corpos d'água, além da aplicação do mesmo para eliminar plantas aquáticas. Conseqüentemente, a contaminação do ambiente aquático por glifosato influencia o ecossistema geral, junto aos animais que não são alvos desses compostos e acabam sofrendo influência em seu organismo. De certo modo esses organismos acabam se tornando indicadores toxicológicos pela alteração de sua fisiologia natural, modificando a ação de enzimas e órgãos, e podendo levar a morte destes animais (LORENSI *et al.*, 2020).

Segundo o Conselho Nacional Do Meio Ambiente (CONAMA - resolução nº 357/2005), prevê que a qualidade de água dos ambientes aquáticos deve ser avaliada por indicadores biológicos. A importância das análises biológicas se dá pelo fato de que análises da presença de compostos químicos na água são quantitativas, realizadas por amostragens em períodos pré-determinados e podem não detectar a presença dos compostos, que na sua maioria são de fácil degradação. Porém efeitos fisiológicos, resultantes de exposição agudas ou crônicas, são mais persistentes e dessa forma organismos e comunidades aquáticas são usados para avaliar se o ambiente está sujeito a contaminação. Outro aspecto importante é que

muitas comunidades aquáticas acumulam moléculas tóxicas no organismo por mais tempo e em maior quantidade que a água, por se alimentarem de matéria orgânica que estão ligadas a esses compostos (MODESTO, 2009).

Novas formulações são produzidas buscando diminuir os efeitos tóxicos dos pesticidas a organismos não alvos, porém registros são encontrados indicando que os herbicidas possuem certa toxicidade ao ser humano e espécies de plantas e animais, seja devido ao contato no momento da aplicação ou por exposição a esses compostos químicos no ambiente (OLIVEIRA, 2017). Mesmo não sendo alvos, a contaminação por glifosato vem sendo relatada em diversos estudos onde o ser humano e animais tem seu sistema endócrino afetado, junto a alterações no ciclo estral de fêmeas, síntese de enzimas e comportamento sexual (PIETROBOM; SENEM, 2015).

Pesquisas apontam a influência de pesticidas em geral sobre a fisiologia de organismos aquáticos, especialmente de organofosforados e carbamatos, que apresentam uma grande interferência na atividade da acetilcolinesterase (SILVA, 2016). Tu *et al.*, (2009) demonstraram os efeitos em camarão-tigre-gigante (*Penaeus monodon*), com a inibição da atividade da AChE por endosulfan e deltametrina. A inibição da atividade da enzima na espécie de camarão *Palaemonetes pugio* por Diclorvon (BOLTON-WARBERG *et al.*, 2007) e os agrotóxicos fosalone e carbaril também foram capazes de inibir a enzima no camarão branco (*Palaemon serratus*) (BOCQUENÉ; GALGANI, 1991).

A presença do glifosato no ambiente é preocupante e serve de alerta, pois essa molécula pode ser acumulada nos organismos, em períodos entre a exposição e a detoxificação, e conseqüentemente a cadeia trófica pode ser afetada pelo consumo desses animais, podendo chegar até o ser humano, contrariando as baixas probabilidades de bioacumulação e de dispersão em um sistema de seres vivos (MELO, 2020). Porém, há poucos estudos sobre os efeitos fisiológicos do glifosato em crustáceos.

4.5 MARCADORES BIOQUÍMICOS

4.5.1 Colinesterases

Esses marcadores estão geralmente ligados aos primeiros sinais de alterações biológicas detectados, as colinesterases são muito importantes para avaliação de intoxicação por glifosato, pois estudos apresentam que a exposição a essa molécula leva a diminuição de atividade enzimática no cérebro (MODESTO, 2010). A acetilcolinesterase é uma enzima que hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina, que é produzida no citoplasma de terminações nervosas e responsável como neurotransmissor no sistema nervoso central e periférico (ARAÚJO *et al.*, 2016).

A acetilcolinesterase atua principalmente na via de transmissão do sinal nervoso, separando o neurotransmissor acetilcolina em acetato e colina, o que garante a finalização da transmissão da informação nervosa e formação de matéria prima para a regeneração do neurotransmissor (ARAÚJO *et al.*, 2016). As colinesterases, acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, também atuam na biotransformação de xenobióticos que limitam a toxicidade e protege os organismos de compostos como os organofosforados (KLAASSEN; WATKINS III, 2012).

Existem diversos produtos químicos que são utilizados no cultivo na agricultura, alguns deles se destacam como os organofosforados e carbamatos que possuem alto potencial de inibição das enzimas acetilcolinesterases (AChE), que gera uma série de respostas fisiopatológicas (HORN *et al.*, 2016).

4.5.2 Defesa antioxidante e estresse oxidativo

O estresse oxidativo é uma consequência do desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e os mecanismos oxidativos celulares que ocorrem nos organismos vivos, que podem ser causados por diversos fatores estando ligados com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou a redução da disponibilidade de antioxidantes. Esse processo acarreta no aumento da oxidação de biomoléculas podendo causar perda de funções biológicas, ou desequilíbrio

homeostático, que se manifesta em dano oxidativo potencial contra células e tecidos. Na peroxidação lipídica (LPO), as EROs fazem com que ocorra a oxidação de ácidos graxos e de fosfolípídeos das membranas, o que acarreta na perda de seletividade, danificando as mesmas e conseqüentemente prejudicando o funcionamento das células (CAVALLI, 2013).

Segundo Dafre (2012), o sistema de defesa antioxidante possui vários componentes enzimáticos e não enzimáticos, atuando na manutenção de espécies reativas de oxigênio em baixas concentrações. As EROs estão presentes nos ambientes celulares por importantes funções desempenhadas na sinalização e defesa celular, porém desequilíbrios em suas concentrações podem causar dano e morte celular devido à grande reatividade destas moléculas com macromoléculas orgânicas como DNA, proteínas e lipídeos. As enzimas do sistema de defesa antioxidante são importantes indicadores da interferência dos pesticidas nos organismos.

Nesse sentido, as enzimas catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST) presente no estudo, são fundamentais para catalisar reações que neutralizam as EROs. A CAT tem ação de diminuição no acúmulo de peróxidos de hidrogênio, transformando-o em água. A GST (Glutathione-S-transferase) atua na detoxificação de substâncias tóxicas catalisando a ligação da GSH (glutathione reduzida) com moléculas xenobióticas ou endógenas, tornando-as menos tóxicas, mais solúveis em água e mais facilmente excretadas (BARREIROS *et al.* 2006; FERREIRA, 2010).

As aminotransferases são enzimas ligadas ao metabolismo central dos organismos, atuando nas células, de forma mais intensa no fígado, com a remoção dos grupamentos amino através de reações de transaminação, transferindo-os para os grupamentos do α -cetoglutarato, que produzem α -cetoácido análogo do aminoácido e glutamato, dessa forma essas reações possuem o papel de coletar os grupos aminos de muitos aminoácidos diferentes em apenas L-glutamato, que é fundamental como doador de grupamento amino a algumas vias biossintéticas ou para vias de excreção que eliminam compostos nitrogenados. A aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) também são importantes aminotransferases que desempenham a função de indicadores de lesões hepáticas e cardíacas provenientes de intoxicação, quando detectadas em alta concentração no plasma sanguíneo (PINTO, 2010).

Após a formação do glutamato pelas aminotransferases, a glutamato desidrogenase (GLDH) atua na oxidação do glutamato, com conseqüente redução do NAD^+ ou NADP^+ , formando uma imina e posteriormente, por hidrólise, regenerando o α -cetoglutarato e liberando amônio (NH_4^+), que nos organismos aquáticos é liberado no ambiente como excremento (BARREIROS; BARREIROS, 2012). Com isso, as aminotransferases e o GLDH possuem um importante papel no metabolismo de aminoácidos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DESENVOLVIMENTO DOS ANIMAIS

O experimento foi desenvolvido com pós-larvas de camarões de água doce *M. rosenbergii* provenientes de produção 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 controladas por aquecedores. As larvas foram alimentadas com *Artemia* (aproximadamente quatro artemias por larva), cinco vezes ao dia, durante oito dias, e após 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 mistura de vitaminas e minerais e água. Esta condição foi mantida até o momento em que ocorreu metamorfose final dos animais em pós-larvas.

Para a aclimação em água doce, a água do tanque foi substituída até chegar a uma salinidade próxima de 6 ‰, e assim foram mantidos por 12 horas, posteriormente 50 % do volume do tanque foi substituído por água doce mantido por

12 horas e então substituída por água doce em sua totalidade.

5.2 ENSAIO DE EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO

Para o ensaio de es foram utilizados 1500 animais com peso médio de 0,024 g, divididos em 12 aquários de 7 litros (125 animais/aquário). Todos os aquários foram mantidos com oxigenação constante e temperatura de 28 °C. O ensaio de exposição aguda foi realizado separando dois grupos em triplicata, sendo, grupo experimental, exposto ao glifosato 100 mg/L e grupo controle, sem glifosato, os aquários foram selecionados de forma aleatória e identificados conforme tratamento. Para a exposição foi utilizado o produto comercial ROUNDUP® WG. Foram realizadas coletas dos animais para posteriores testes bioquímicos em diferentes tempos, sendo em 2, 6, 9, 12, 24, 48, 96 horas após início do experimento.

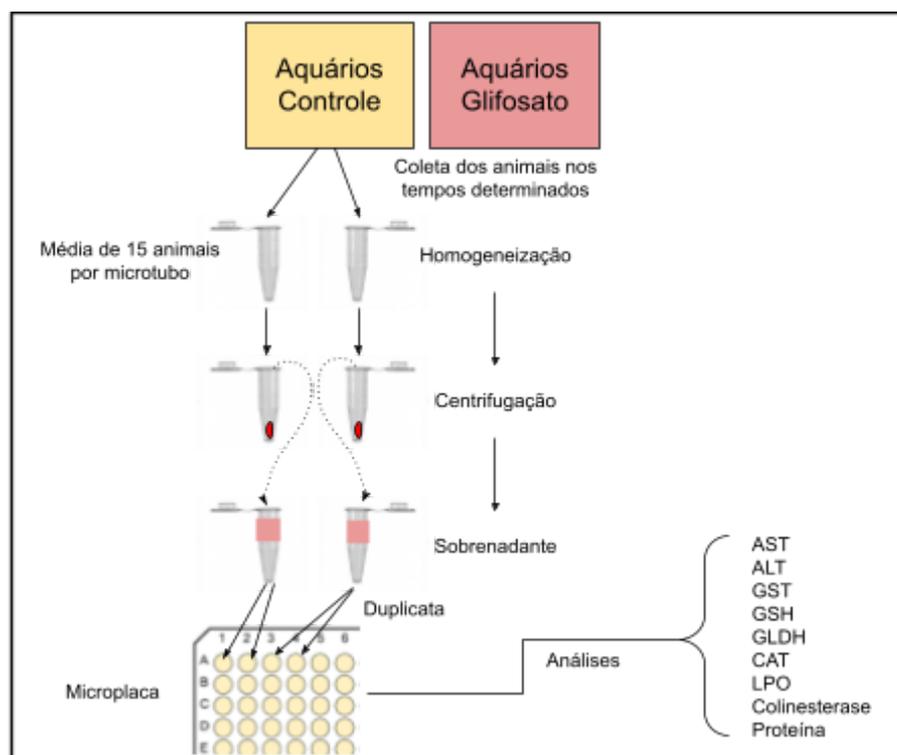
Feito a exposição, foi realizado acompanhamento do comportamento dos animais e realizado ensaio de resposta a estímulo mecânico. O ensaio consistiu de estímulo mecânico suave, com o uso de um bastão de vidro, em animais que estavam parados no momento da observação, sendo realizado verificações a cada coleta dos animais. Nesses períodos de coleta também foram verificados e registradas as mortes. A cada 24 horas foi realizada limpeza dos aquários, retirando 30 % da água do fundo para retirar restos de alimentação e excremento, sendo posteriormente realizada reposição da água dos aquários. Nos aquários exposto ao glifosato foi realizada reposição de água com glifosato para manter a concentração do composto durante o período de ensaio, o que caracteriza em uma exposição semi-estática, pois ocorre a renovação da solução. Em todos os períodos de coletas foram separados animais para análises bioquímicas, onde os mesmos foram sacrificados em gelo, separados em microtubos e congelados em temperatura de -85 °C.

5.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

5.3.1 Preparo das amostras

Para o preparo das amostras dos animais, os mesmos foram homogeneizados em tampão PBS pH 7,2 (1:10 p/v) em banho de gelo. Em seguida foram centrifugadas por 10 minutos a 11093 xg, a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido, separado em alíquotas e congelado para análises posteriores. As análises de proteína, LPO e enzimas foram realizadas em microplaca, com incubação em banho-maria e leitura em espectrofotômetro de microplaca. Para este experimento foi realizada a análise de proteínas, colinesterase, catalase (CAT), Glutathione S transferase (GST), glutathione reduzida (GSH), glutamato desidrogenase (GLDH), aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT) e lipoperóxidos com afinidade ao ácido tiobarbitúrico (LPO), de todo material homogeneizado das pós-larva de camarão.

Figura 2 – Esquema de separação dos animais nas coletas em todos os diferentes períodos. Preparação das alíquotas e separação para as análises bioquímicas.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

5.3.2 Metodologia das análises bioquímicas

5.3.2.1 Proteína

A determinação da concentração de Proteína foi realizada para o cálculo normalizado das demais análises. Proteínas totais solúveis dos tecidos foram determinadas pelo método de Bradford (1976). O método consiste na interação entre o BG-250, que é um corante ácido, junto a proteínas com aminoácidos que possuem cadeias laterais com propriedades básicas ou aromáticas. No pH ácido da reação ocorre a interação da proteína e o BG-250 que provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que leva a mudança de coloração inicial de castanha para tons de azul, absorvendo luz no comprimento de onda de 595 nm. Os resultados foram expressos em mg de proteína/mL.

5.3.2.2 Colinesterase

A concentração da enzima colinesterase foi realizada por meio do método de Ellman *et al.*, (1961), que consiste em detectar o 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina e o 5-tio-2-nitrobenzoato formados pela reação entre a tiocolina (produto da hidrólise da acetiltiocolina pela colinesterase) e o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB). A análise foi feita em duplicata, em 185 μ L de solução contendo 130 μ L de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) e 50 μ L de iodeto de acetiltiocolina (ATC) e 5 μ L de amostra. A reação foi acompanhada, medindo o acréscimo de absorbância em comprimento de onda de 415 nm por 9 minutos com intervalo de 30 segundos. Os resultados foram expressos em μ moles de 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina.minuto⁻¹.mg de proteína⁻¹.

5.3.2.3 CAT

A determinação da atividade da CAT foi realizada pelo método de Aebi (1984), que acompanha o decréscimo da absorbância a 240 nm, a partir do degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, cujo coeficiente de extinção molar é de

$40 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. O material dividido em duplicata foram adicionadas em placas UV com 96 poços de $300 \mu\text{L}$, com $290 \mu\text{L}$ de meio de reação ($180 \mu\text{L}$ de H_2O_2 , $2,5 \text{ ml}$ de Tampão Tris-HCl $1,0 \text{ M}$, EDTA $5,0 \text{ mM}$, pH $8,0$ e $47,32 \text{ ml}$ de Água deionizada) e $10 \mu\text{L}$ de amostra. A reação foi acompanhada por 1 minuto com intervalo de 2 segundos. Os resultados foram expressos em μmoles de H_2O_2 degradado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína $^{-1}$.

5.3.2.4 GST

A concentração da GST foi realizada pelo método de Habing *et al.* (1976). A reação ocorre pela GST que catalisa a reação do substrato CDNB com o GSH, formando um tioéter que é visto pelo aumento de absorbância em 340 nm . A análise foi realizada em duplicata, em microplaca UV, contendo 90μ do sistema de reação (Tampão fosfato de potássio 100 mM pH $6,5$, 2 mM de CDNB, $1,5 \text{ mM}$ de GSH) e $10 \mu\text{L}$ de amostra. A leitura foi realizada a 22°C e acompanhada por leitura cinética em 340 nm , por 3 minutos com intervalo de 30 segundos. Os resultados foram expressos em μmoles de tio éter formado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína $^{-1}$.

5.3.2.5 GSH

A análise da GSH se baseia no método de Sedilak (1968), onde a precipitação de proteínas com posterior reação de tióis não proteicos com DTNB que gera um produto que absorve a luz. Para a análise foi preparado a amostra com $200 \mu\text{l}$ de sobrenadante com $50 \mu\text{l}$ de TCA 50% , além disso foi preparado o branco com $200 \mu\text{l}$ de tampão PBS junto a $50 \mu\text{l}$ de TCA 50% , os mesmos foram centrifugados a 5000 g por 10 minutos a 4°C . Para o ensaio foi utilizado uma microplaca de 96 poços, $50 \mu\text{l}$ da amostra, $50 \mu\text{l}$ do branco e $50 \mu\text{l}$ da curva padrão (Foi dissolvido $0,0012 \text{ g}$ GSH ($\text{MM} = 307,32 \text{ g}.\text{mol}^{-1}$) em $976 \mu\text{l}$ de tampão tris-base a $0,4 \text{ M}$, pH $8,9$ ($[\text{GSH}] = 4 \text{ mM}$) e a partir desta solução preparada a diluição da curva) todos em duplicatas junto a $230 \mu\text{l}$ do tampão Tris-base $0,4 \text{ M}$, pH $8,9$, $20 \mu\text{l}$ de solução de DTNB, mantido por 5 min a temperatura ambiente e por fim medido em absorbância de 415 nm . Os resultados da concentração da GSH foram expressos em nanomoles

de $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína $^{-1}$.

5.3.2.6 GLDH

A concentração da enzima GLDH, foi medida através do método Ciardiello *et al.*, (2000). Enzima, presente nas mitocôndrias, converte o glutamato em α -cetoglutarato e vice-versa. É avaliada pelo método contínuo a partir da formação de NADH, ou NADPH, acompanhada pelo aumento de absorbância em 340 nm. O sobrenadante foi pipetado em microplaca de 384 poços, em duplicata com 15 μL de amostra, 65 μL de sistema de reação (7500 μL de Tampão Tris-HCl pH 7,4 , 935,5 μL de NADP, 150 μL de ADP, 1500 μL de L - Glutamato e 2100 μL de H_2O deionizada). A reação foi avaliada por 8 minutos com intervalo de 30 segundos. Os resultados da concentração de GLDH foram expressos em μmol de NAD^+ reduzido. $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína $^{-1}$.

5.3.2.7 AST

A concentração da AST é baseada no método do kit colorimétrico comercial, seguindo as orientações do fabricante. A enzima catalisa a transferência do grupamento amina do aspartato até o cetoglutarato com formação de glutamato e oxalacetato. Deste modo o oxaloacetato formado reage com a 2-4-dinitrofenilhidrazina, que forma a hidrazona, adquirindo a coloração máxima pela adição de hidróxido de sódio. A intensidade de coloração é proporcional à atividade enzimática da amostra, acompanhada pelo aumento de absorbância de 340 nm. A leitura foi feita a 30 °C por 5 minutos com intervalo de 10 segundos. Os resultados da concentração de AST foram expressos em μmol de NADH oxidado. $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína $^{-1}$.

5.3.2.8 ALT

A concentração da ALT se baseia no método do kit colorimétrico comercial, seguindo as orientações do fabricante. A enzima catalisa a transferência do

grupamento amina da alanina até o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato. Deste modo o piruvato formado reage com a 2-4-dinitrofenilhidrazina, que forma a hidrazona, adquirindo a coloração máxima pela adição de hidróxido de sódio. A leitura foi feita a 30 °C por 5 minutos com intervalo de 10 segundos com absorvância de 340 nm. Os resultados da concentração de ALT foram expressos em $\mu\text{moles de NADH oxidado}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$.

5.3.2.9 LPO

A concentração de LPO foi feita pelo método de TBARS (FEDERICI *et al.*, 2007), onde foram comparadas a absorvância com curva padrão de Malondialdeído (MDA), que é um subproduto de peroxidação lipídica celular. O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), que é baseada em 1 molécula de MDA com 2 moléculas de TBA, com eliminação de 2 moléculas de água, resultando em um pigmento rosa com absorção de 535 nm (FEDERICI, 2007). Para preparação da amostra foi utilizado microtubo onde foi pipetado 60 μL de amostra, em seguida foi acrescentado 120 μL de ácido tricloroacético (TCA) 10%, deixado em banho de gelo por 5 minutos e centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm a 4 °C. Em seguida, no ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), foi utilizado 40 μL do sobrenadante, também diferentes concentrações de MDA para determinar a curva, foram adicionados em microplaca, em duplicata, junto a 10 μl de BHT, 140 μl de tampão PBS, 50 μl de TCA 50 %, 75 μl de TBA 1,3 % em NaOH 0,3 %. A leitura da reação foi realizada a 22 °C, após 60 minutos de incubação a 60 °C, em uma absorvância de 535 nm. Os resultados da peroxidação lipídica foram expressos em $\mu\text{mol de MDA}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$.

5.3.3 Análises Estatísticas

Os resultados das análises bioquímicas foram analisados no programa de estatística InStat Graphpad versão 3.01, onde diferenças significativas foram consideradas para $p < 0,05$. Foi realizado teste de normalidade Shapiro-wilk, posteriormente testes paramétricos de ANOVA e LSD foram realizados quando os

dados apresentarem-se homocedásticos e normais. Na ausência de homocedasticidade e normalidade, foi realizada análise não paramétrica pelo teste de Kruskal Wallis e pós teste de Student-Newman-Keuls.

6 RESULTADOS

6.1 MORTALIDADE E ESTÍMULO

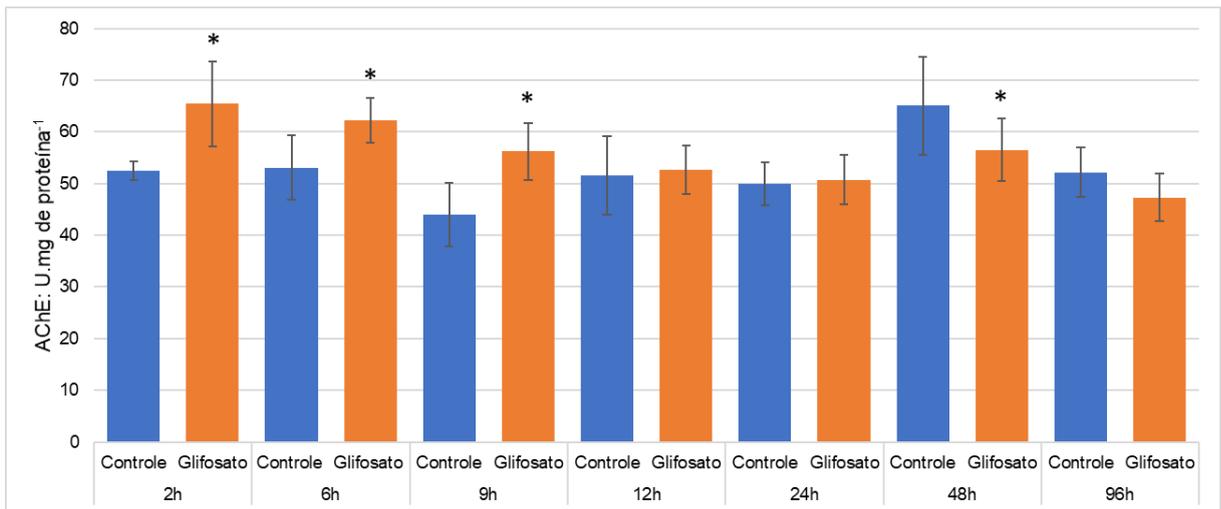
Não foi observado morte de animais nos aquários controle, entretanto nos aquários expostos ao glifosato, em 2 horas após a contaminação, foram identificados 38 animais mortos (5,06 %), e posteriormente em 6 horas foram identificados 3 (0,4 %) animais mortos. Durante o restante do experimento não foram encontrados mais animais mortos. Observou-se que os animais mortos se apresentavam mais desenvolvidos em relação aos demais indivíduos dos aquários.

Os resultados em relação ao estímulo do toque, demonstraram que os animais expostos ao composto apresentaram alterações comportamentais em relação à forma natatória. O comportamento natatório dos animais do grupo controle apresentou normalidade, sem movimentos bruscos de fuga em relação ao bastão, além de manterem o equilíbrio e sempre em movimento. Os animais do grupo exposto ao glifosato apresentaram alterações comportamentais se mantendo muitas vezes imóveis, com perda de equilíbrio e com movimentos de fuga quando tocados pelo bastão, comportamento que se manteve até 12 horas após a exposição, em seguida seus movimentos retornaram ao padrão comportamental dos animais controle que em nenhum momento do experimento apresentaram quaisquer tipos de alteração comportamental.

6.2 ATIVIDADE DA COLINESTERASE

Na atividade da enzima colinesterase do grupo exposto ao glifosato, ocorreu alteração significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle do mesmo período (Gráfico 1). Foi observado aumento da atividade da colinesterase em 2, 6, 9 horas de exposição, e posteriormente em 48 horas houve uma diminuição dessa atividade.

Gráfico 1 – Atividade da Colinesterase em pós-larva de *M. rosenbergii* submetidos a 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão. Os asteriscos representam variações significativas entre o grupo controle e o grupo exposto ao glifosato do mesmo período.

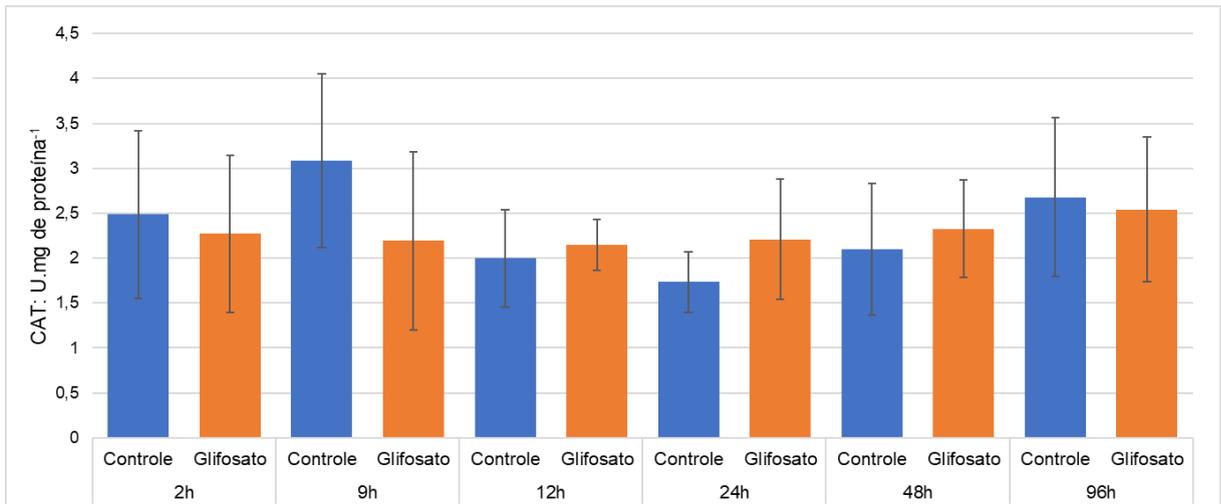


Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

6.3 ATIVIDADE DA CATALASE

Não houve variação significativa ($p > 0.05$) na atividade da CAT em todo o experimento (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Atividade da CAT em pós-larva de *M. rosenbergii* submetidos a 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão.

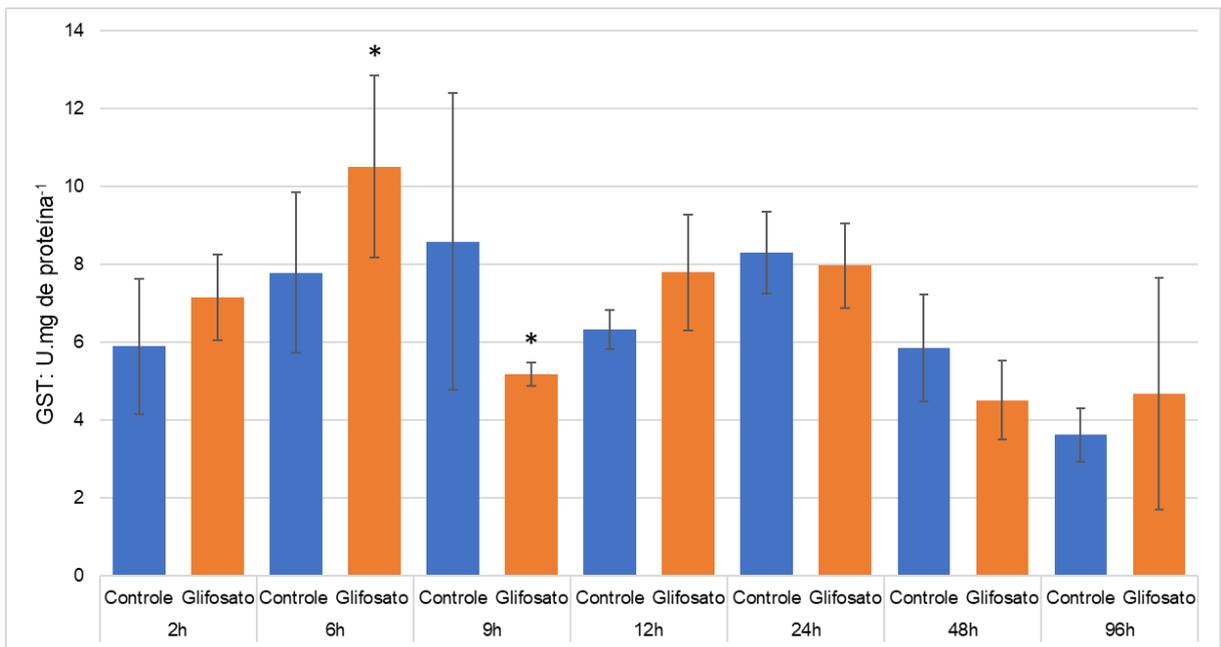


Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

6.4 ATIVIDADE DA GST

A atividade da enzima GST apresentou variação significativa ($p < 0.0001$) do grupo exposto ao glifosato em relação ao controle (Gráfico 3). Em 6 horas de ensaio houve aumento da atividade dessa enzima, e posteriormente em 9 horas ocorreu a diminuição da atividade da mesma.

Gráfico 3 – Atividade da GST em pós-larva de *M. rosenbergii* submetidos a 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão. Os asteriscos representam variações significativas entre o grupo controle e o grupo exposto ao glifosato do mesmo período.

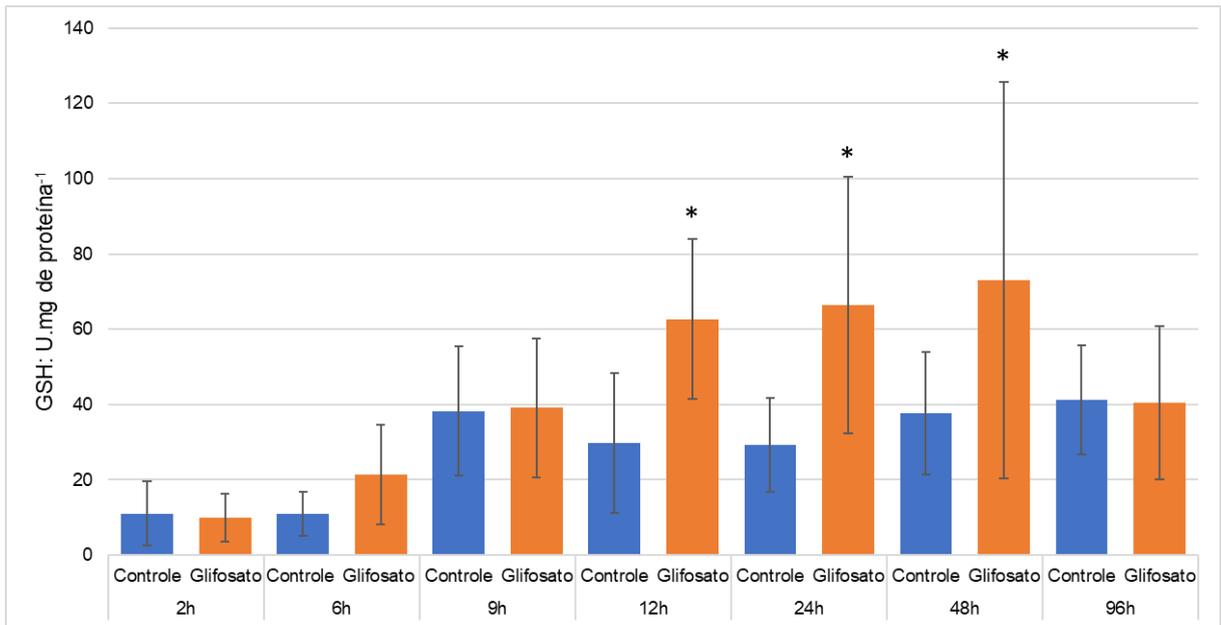


Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

6.5 ATIVIDADE DA GSH

Em relação ao conteúdo de GSH (Gráfico 4), durante o ensaio foi observado variação significativa do grupo exposto ao glifosato em relação ao controle ($p < 0.0001$). Houve aumento da concentração de GSH em 12, 24 e 48 horas após contaminação, em relação aos controles do mesmo período.

Gráfico 4 – Atividade da GSH em pós-larva de *M. rosenbergii* submetidos a 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão. Os asteriscos representam variações significativas entre o grupo controle e o grupo cexposto ao glifosato do mesmo período.

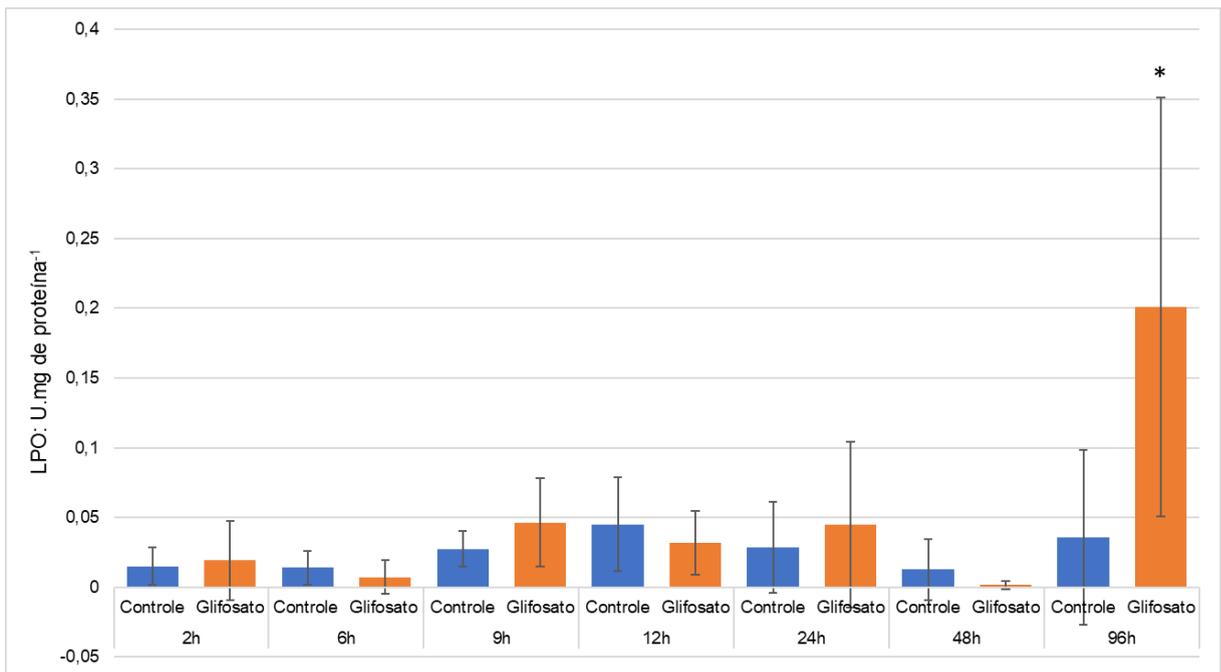


Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

6.6 ATIVIDADE DA LPO

A concentração de LPO (Gráfico 5) apresentou variação significativa ($p=0,0145$) dos grupos experimentais em relação aos controles no último período de avaliação, 96 horas após início do experimento de exposição, demonstrando um aumento da concentração de lipoperóxidos no grupo exposto ao glifosato nesse período.

Gráfico 5 – Concentração da LPO em pós-larva de *M. rosenbergii* submetidos a 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão. Os asteriscos representam variações significativas entre o grupo controle e o grupo exposto ao glifosato do mesmo período.

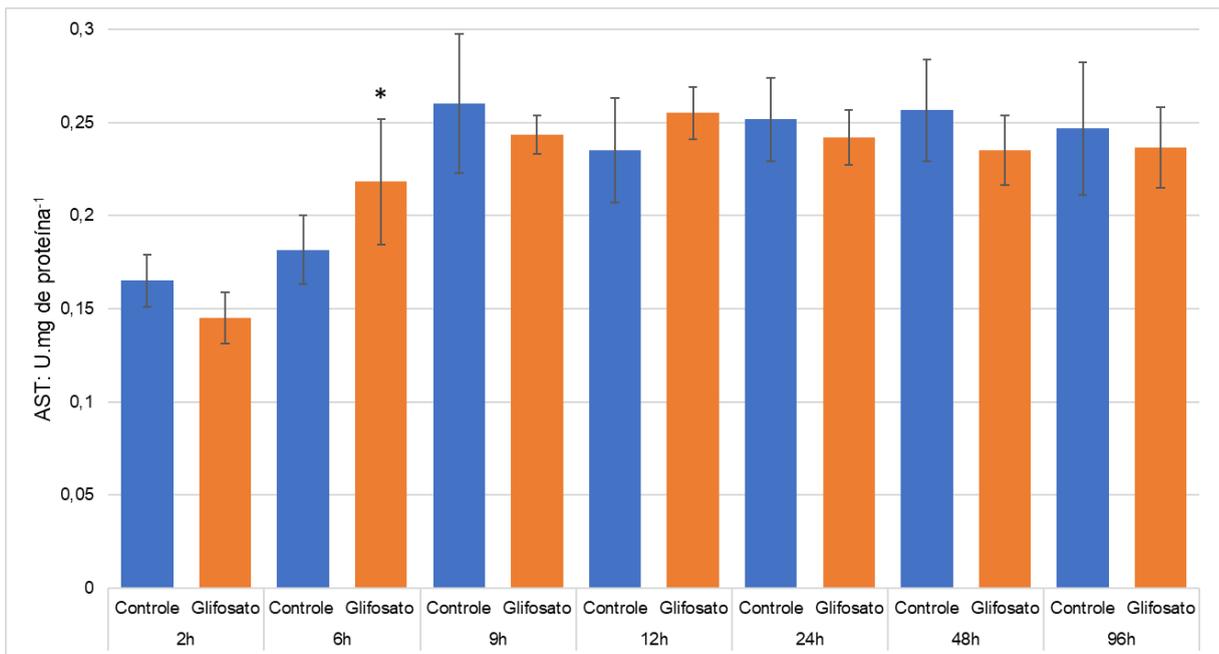


Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

6.7 ATIVIDADE AST

Foi observado variação significativa ($p < 0,001$) da AST (Gráfico 6) dos grupos experimentais em relação aos controles em 6 horas após início do experimento, demonstrando um aumento da atividade no grupo exposto ao glifosato.

Gráfico 6 – Atividade da AST em pós-larva de *M. rosenbergii* submetidos a 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão. Os asteriscos representam variações significativas entre o grupo controle e o grupo exposto ao glifosato do mesmo período.

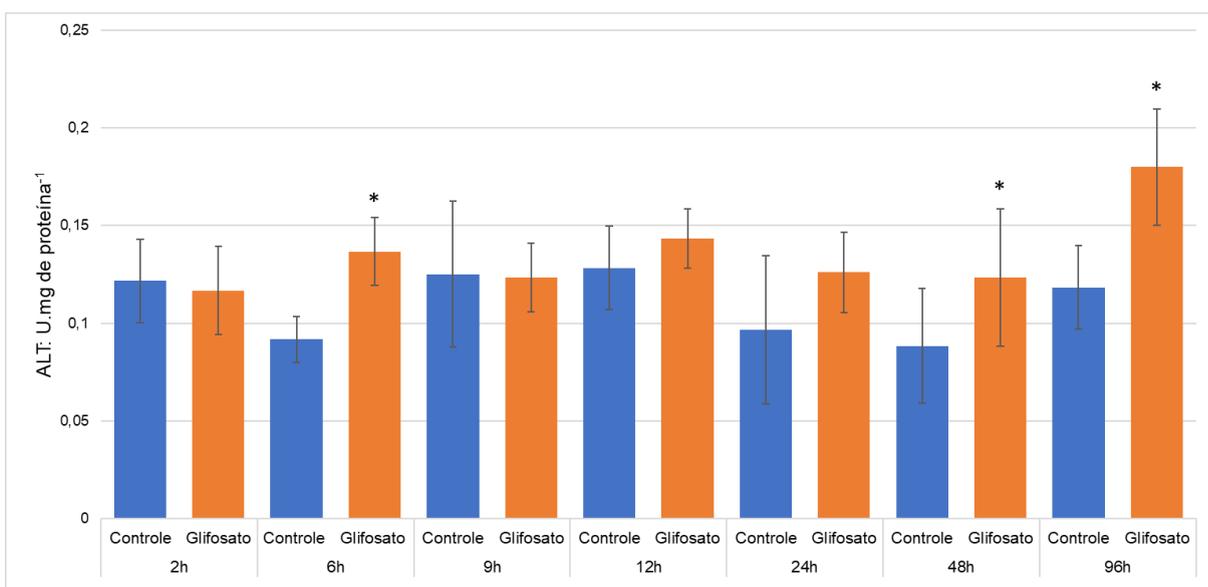


Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

6.8 ATIVIDADE ALT

Na atividade de ALT (Gráfico 7), foi observado variação significativa ($p < 0,001$) nos grupos experimentais em relação aos controles em 6, 48 e 96 horas após início do experimento, demonstrando um aumento da atividade no grupo exposto ao glifosato em todos esses períodos.

Gráfico 7 – Atividade da ALT em pós-larva de *M. rosenbergii* submetidos a 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão. Os asteriscos representam variações significativas entre o grupo controle e o grupo exposto ao glifosato do mesmo período.

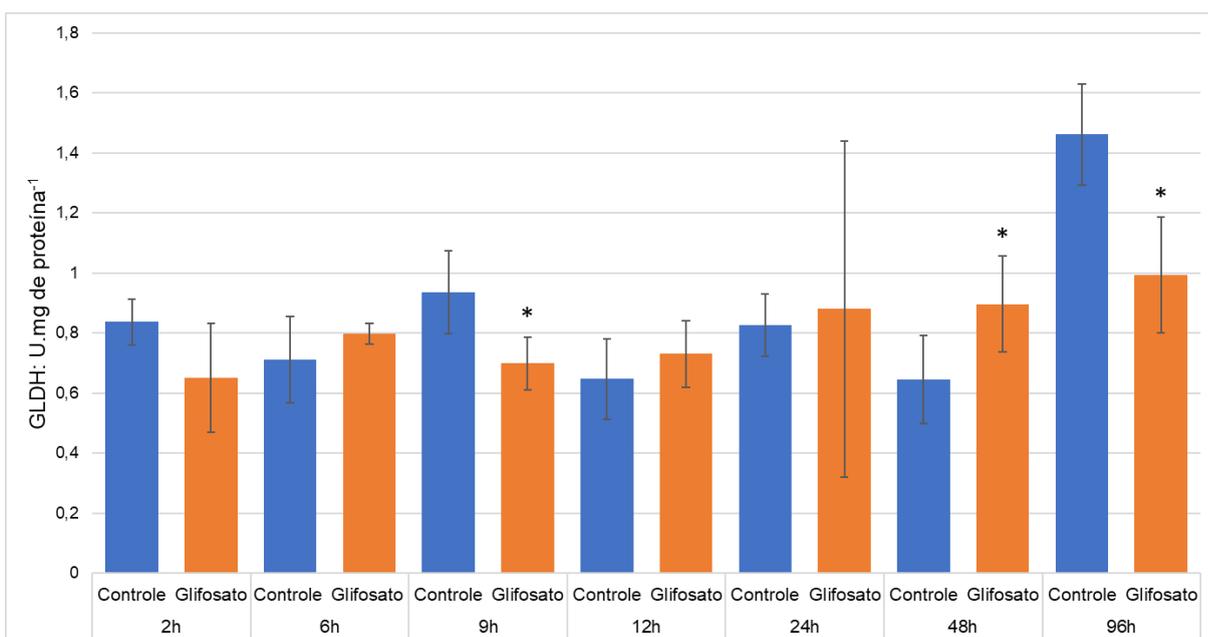


Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

6.9 ATIVIDADE GLDH

Foi observado variação significativa ($p < 0,001$) da GLDH (Gráfico 8) nos grupos experimentais em relação aos controles em 9, 48 e 96 horas após início do experimento, ocorrendo uma redução da atividade em 9 horas, aumento em 48 horas e redução em 96 horas no grupo exposto ao glifosato.

Gráfico 8 – Atividade da GLDH em pós-larva de *M. rosenbergii* submetidos a 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão. Os asteriscos representam variações significativas entre o grupo controle e o grupo exposto ao glifosato do mesmo período.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

7 DISCUSSÃO

O comportamento natatório observado em pós-larvas de *M. rosenbergii* expostos ao glifosato indica que o mesmo 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). Como a indução ou inibição da colinesterase podem influenciar nos processos de neurotransmissão colinérgica, podendo promover efeitos de letargia ou nado errático (MIRON *et al.*, 2005), os resultados de alteração do comportamento natatório podem estar diretamente relacionados com os efeitos de indução das colinesterases encontrados nas primeiras horas de ensaio (2, 6 e 9 horas).

Poucas informações sobre o efeito letal do glifosato em crustáceos são encontradas na literatura. Efeitos foram relatados por Bastos (2013), que avaliou a toxicidade do glifosato em cultivo de *Daphnia magna* determinando a concentração efetiva mediana (CE50) de 32 µg/L. Mensah *et al.*, (2012) identificaram CL50 96 horas do glifosato para o camarão *Caridina nilotica* em fase neonatal, juvenil e adulta, com valores de 2,5, 7,0 e 25,3 mg/L. Ali *et al.*, (2018) estudaram a CL50 em 24 e 48 horas, dos compostos glifosato e malation em artêmia, obtendo os valores

de 58.3 e 17.3 mg/L para malation e 28 e 19 µg/L para glifosato, respectivamente. Estudos utilizando copépodos expostos ao Roundup®, apontam maior mortalidade nos grupos expostos ao glifosato em concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 mg/L quando comparado ao controle. A CL50 foi estimada para camarões *P. annae* em 48 horas (1,059 mg/L) e para *P. roux* 72 horas (107,53 mg/L) e 96 horas (60,97 mg/L) (DEEPANANDA *et al.*, 2011).

Moraes (2018) a partir da CL50 realizada em camarões de água doce *M. rosenbergii* em estágio juvenil, demonstra a sensibilidade e a letalidade que os camarões apresentam quando expostos ao Glifosato Nortox SL, onde 100% dos animais submetidos a 150 mg/L de glifosato morreram, além de porcentagens parciais de mortes para concentrações de 10, 50 e 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas. Estes resultados demonstram que os efeitos de mortalidade do glifosato ocorrem tanto em juvenis quanto em pós-larvas do *M. rosenbergii* (MORAES, 2018).

As pós larvas utilizadas neste estudo apresentavam peso médio de 0,024 g e aproximadamente 15 dias após metamorfose final, porém foi nítido que somente os animais que apresentaram maior peso morreram com a exposição ao glifosato na concentração de 100 mg/L. Como Moraes (2018), relata que obteve 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, sugere-se que o glifosato atua em alguma via metabólica que é mais crítica em animais maiores, ocasionando sua morte devido a mudanças fisiológicas profundas que ocorrem nesse crustáceo com o passar do seu desenvolvimento. De modo que, na comparação com estes dados previamente coletados porém não publicados, sugere-se que os efeitos do glifosato são maiores em organismos juvenis, mas não houve aprofundamento da situação nesse experimento.

As alterações de atividade das enzimas AST, ALT e GLDH em animais submetidos a contaminação por glifosato indicam que o composto interfere no metabolismo de aminoácidos e excreção de amônia dos animais. Em 6 horas de ensaio foi observado aumento da atividade das enzimas AST e ALT dos animais do grupo exposto ao glifosato e após 48 e 96 horas apenas a ALT apresentou-se induzida.

As enzimas AST e ALT são aminotransferases que atuam na transferência de grupamentos amins para o glutamato (PINTO, 2010), estando relacionadas a destinação do grupamento carbônico do aminoácido para produção de energia, com conseqüente formação de glutamato tendo como destino a via de produção de amônia, ou ainda com a transferência do grupamento amina para via de síntese de outros aminoácidos demandados pelo organismo. Oruç e Üner (1999), demonstram o efeito conhecido do herbicida 2,4D que alteram parâmetros do metabolismo de carboidratos e proteínas em *Cyprinus carpio* expostos ao herbicida por 1, 2, 3, 4, 15 e 30 dias em concentrações subletais de 50 e 80 mg/L.

Em relação à atividade da GLDH observou-se alterações de redução de atividade (9 e 96 horas) e aumento da atividade (48 horas). Esta enzima está fortemente relacionada à excreção de amônia, portanto o aumento de atividade, principalmente acompanhando o aumento de atividade das enzimas AST e ALT, pode estar relacionado ao aumento do uso de aminoácidos para suprir a demanda energética (PINTO, 2010; BARREIROS, 2012). Porém, sua redução, em períodos de aumento da atividade AST e ALT pode indicar a transferência de grupamentos amina para síntese de novos aminoácidos.

Como AST e ALT apresentaram um aumento da atividade em 6 horas, seguidas de redução de atividade da GLDH em 9 horas, aparentemente o excesso de grupamento amina produzido 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 para suprir a demanda energética, pois o glutamato é desviado para a formação de aminoácidos (KING *et al.*, 1985). O déficit energético pode ser um dos fatores envolvidos na geração de estresse oxidativo.

As colinesterases geralmente são inibidas por organofosforados, porém o glifosato possui uma estrutura diferente dos demais organofosforados, em alguns organismos ocorre alterações nessa enzima, podendo ser um aumento ou

diminuição da atividade (ARAÚJO *et al.*, 2016). No experimento é certo que nos primeiros períodos ocorreu um aumento da atividade, o que pode ser explicado pela necessidade de resposta a variação ambiental, aumentando a demanda de sinalização nervosa e conseqüentemente de atividade de acetilcolinesterase na neurotransmissão. Estudos mostraram que o glifosato também induziu o aumento de atividade da AChE em peixes *Anabas testudineus* e *Heteropneustes fossilis*, em 30 dias de exposição (PALAS *et al.*, 2014). Este efeito também observado para a espécie de peixe *Cyprinus carpio* (CATTANEO *et al.*, 2011) e em músculo de *Leporinus obtusidens* (SALBEGO *et al.*, 2010) quando expostos ao composto.

Porém, em 48 horas ocorre uma inibição da atividade do grupo exposto ao glifosato em relação ao controle e em seguida retorna ao normal. Monserrat *et al.*, (2002) demonstra que o glifosato puro inibe a AChE em tecidos musculares e cerebrais do mexilhão *Perna perna* e dos peixes *Danio rerio* e *Jenynsia multidentata*. Além de Arias *et al.* (2007), identificou que a exposição a organofosforados e carbamatos, amplamente utilizados na agricultura, gera a inibição da enzima acetilcolinesterase em peixes, mesmo em regiões mais industrializadas. E a indução e inibição dessa enzima também foi identificada em embriões de *R. quelen* submetidos ao glifosato, observado indução da atividade da acetilcolinesterase em 12 horas e inibição em 24 horas de exposição ao glifosato, apresentando os efeitos neurotóxicos, acompanhado de dificuldade de manutenção das atividades do sistema antioxidante (SOBJAK, 2016). Isso pode estar relacionado ao organismo buscar uma compensação fisiológica pelo estresse causado, até uma situação normal, com isso as atividades das vias metabólicas vão se alterando até a homeostase.

Não ocorreu alterações de atividade da enzima CAT entre o grupo controle e experimentais indicando que a presença do glifosato não induziu esta via de degradação do peróxido de hidrogênio. O mesmo dado pode ser visto por Glusczak *et al.* (2007), onde não houve alterações na atividade da enzima no fígado de *Rhamdia quelen* expostas a 0,2 e 0,4 mg/L de glifosato por 96 horas. Considerando que a enzima glutatona peroxidase (GPx) também atua na degradação do peróxido de hidrogênio (SOBJAK, 2016) pode-se considerar que mesmo ocorrendo aumento de peróxido de hidrogênio nas células esta via alternativa poderia garantir proteção antioxidante impedindo danos por estresse oxidativo na ausência de indução da

catalase. Porém a enzima GPx não foi analisada.

A concentração da GSH apresentou aumento em 12, 24 e 48 horas nos animais expostos ao glifosato comparados ao controle. Esta molécula tem importante papel no sistema antioxidante celular, seja no efeito de captação de moléculas reativas de oxigênio de forma espontânea, ou fazendo parte de um efeito enzimático através da atividade da GST e/ou GPx, onde a GPx atua para evitar a acumulação de peróxido de hidrogênio no organismo, usando em sua atividade a GSH, tornando-a oxidada (GSSG), e a GST catalisa a ligação da GSH (glutathiona reduzida) com moléculas xenobióticas, tornando-as menos tóxicas (BARREIROS *et al.*, 2006; BARBOSA, 2010; FERREIRA, 2010), ou ainda da GR, que catalisa a redução da GSSG, regenerando GSH e com isso garantindo a manutenção da defesa antioxidante e de detoxificação com base na GSH (MODESTO, 2009), estas enzimas participam do sistema de defesa, agindo através da prevenção, evitando a geração de radicais livres e não-radicaais, que provocam efeitos oxidativos. Portanto, o aumento da concentração da GSH indica uma indução da resposta antioxidante nos animais.

A atividade da GST apresentou aumento em 6 horas, indicando indução da defesa antioxidante em presença de glifosato. O mesmo foi observado por Ferreira (2010), que mostraram um aumento na atividade da GST no fígado de *Rhamdia quelen* expostos ao glifosato. Modesto e Martinez (2010) demonstram o aumento na atividade da GST em *Prochilodus lineatus* após 24 e 96 h exposição ao glifosato, sugerindo que esta elevação é decorrente do aumento do processo de biotransformação do herbicida pelo animal, bem como por ocorrer a metabolização dos lipoperóxidos, que indica a ativação dos mecanismos de defesa.

Este aumento da GST está relacionado ao uso de GSH, pois a GST forma um complexo da GSH com moléculas endógenas e exógenas durante a reação de neutralização de moléculas tóxicas (BARREIROS *et al.*, 2006; FERREIRA, 2010). Como este complexo é excretado, ocorre uma tendência a redução de GSH disponível que pode limitar a atividade da GST e induzir atividade da GR, assim como da via de produção de GSH garantindo a reposição de GSH e com isso a manutenção da proteção contra efeitos danosos do estresse oxidativo buscando homeostase no sistema antioxidante. Este efeito pode ser acompanhado pelos resultados de redução da atividade da GST em 9 horas e na sequência, do aumento

da concentração da GSH em 12, 24 e 48 horas de exposição.

A LPO apresentou aumento de atividade no último período de análise, 96 horas. Modesto (2009) relata que juvenis do peixe *Prochilodus lineatus*, que foram expostos a 1 mg/L de Roundup Transorb® (RDT1), 5mg/L de Roundup Transorb® e 10 mg/L de Roundup®, por períodos de 6, 24 e 96 horas, apresentaram aumento de LPO e GST em 24 e 96 horas em relação do controle ao tratamento. O aumento da peroxidação lipídica é indicativo de que houve um desequilíbrio entre produção e neutralização de EROs, ocorrendo aumento de EROs e consequente dano oxidativo nas células (COGO *et al.*, 2009; RONDÓN-BARRAGÁN *et al.*, 2012).

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 relacionado 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 estava presente após 96 horas de contaminação, ocorrendo um aumento expressivo de peroxidação lipídica neste momento.

Portanto o ensaio foi capaz de demonstrar que o composto glifosato interfere na atividade da colinesterase, no metabolismo de aminoácidos e no sistema de defesa antioxidante levando as células a uma situação de estresse oxidativo.

8 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, colinesterases e na defesa antioxidante dos animais. Desse modo a exposição a esse composto induziu e inibiu a atividade colinesterásica, também induzindo o sistema antioxidante, além de alterar enzimas do metabolismo de aminoácidos.

O glifosato poderá afetar o desempenho produtivo de *M. rosenbergii* em ambientes sujeitos a presença desse composto, como em áreas rurais permeadas por lavouras com intenso uso de pesticidas.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. **Catalase in vitro. Methods Enzymol.** v. 105, p. 121-126, 1984.
- ALI, J. *et al.* ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES TOXICITY ON BRINE SHRIMP, ARTEMIA. **Journal CleanWAS** 2 (1) 23-26. 2018.
- AMARANTE, O. P. J. *et al.* **Glifosato: Propriedades, Toxicidade, Usos e Legislação.** Química Nova, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.
- AMÉRICO, J.H.P. *et al.* **O uso de agrotóxicos e os impactos nos ecossistemas aquáticos.** Revista Científica ANAP Brasil, v. 8, n. 13, 2015, p. 101-115.
- ARAÚJO, C. R. M. *et al.* Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista Virtual de Química.** Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-PE, v.8, n. 6, p. 2016.
- ARIAS, A. R. L. *et al.* Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. Rio de Janeiro -RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, p. 61-72,2007.1818-1834,2016.
- BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, n.23(4), p.629-643, jul./ago. 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; BARREIROS, M. L.. **QUÍMICA DE BIOMOLÉCULAS: METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS.** 2012. Disponível em: <https://cesad.ufs.br/ORBI/public/uploadCatalogo/11353727032012Quimica_Biomoleculas_Aula_13.pdf>. Acesso em: 20 de Mar. de 2022.
- BARREIROS. A. L. B. S. *et al.* **Estresse Oxidativo:** Relação entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. **Quim. Nova**, Salvador, v. 29, n. 1, p. 113-123. 2006.
- BASTOS, D. N. **Toxicidade do herbicida glifosato em Daphnia magna e pós-larvas de Rhamdia quelen.** 2013. 39 f. Dissertação - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2013.
- BOCQUENÉ, G.; GALGANI, F. Acetylcholinesterase activity in the common prawn (*Palaemon serratus*) contaminated by carbaryl and phosalone: choice of a method for detection of effects. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** Nantes, v.22, n.3, p.337-444, 1991.
- BOLTON-WARBERG, M. *et al.* Acute toxicity and acetylcholinesterase inhibition in grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) and oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to the organophosphate dichlorvos: laboratory and field studies. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v.52, n.2, p.207-216, 2007.
- 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.**, v. 72, p. 248, 1976.
- CATTANEO, R. **PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS EM CARPAS (*Cyprinus carpio*)**

EXPOSTOS A UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DE CLOMAZONE (GAMIT).

2011. Tese (Doutorado) - Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS, 2011.

CAVALLI, V. L. L. O. **Alterações bioquímicas induzidas pelo herbicida glifosato Roundup sobre células testiculares de ratos pré-púberes.** (Dissertação) Florianópolis, SC, 2013. 165 p.

CIARDIELLO, M. A. *et al.* **L-Glutamate dehydrogenase from the Antarctic fish *Chaenocephalus aceratus* Primary structure, function and thermodynamic characterisation: relationship with cold adaptation.** *Biochimica et Biophysica Acta* p11- 23. 2000.

COGO, A. J. D. *et al.* Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. 2009. **Natureza on line.** Disponível em: < <http://www.naturezaonline.com.br> > Acesso em 25 de Mar. de 2022.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. 1989. **RESOLUÇÃO CONAMA Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005.** Conselho Nacional de Meio Ambiente - CONAMA, Brasil.

CROUCH, R.K.; GANDY, S.C.; KINSEY, G. **The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs.** *Diabetes*, v.30, p.235-241, 1981.

DAFRE, A. L. **Biomarcadores Bioquímicos: Vantagens e Limitações Técnicas.** In: XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, Porto de Galinhas – PE, 2012. p. 1.

DEEPANANDA, K.H.M.A.; GAJAMANGE, D.; SILVA, W.A.J.P.; WEGIRIYA, H.C.E. Acute toxicity of a glyphosate herbicide, Roundup®, to two freshwater crustaceans. **J. Natl. Sci. Found. Sri Lanka**, n.39, p. 169-173, 2011.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol.**, v. 7, p. 88-95, 1961.

FEDERICI, G. *et al.* Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, v. 84, p. 415-430, 2007.

FERREIRA, D. **Parâmetros de Estresse Oxidativo e Estudo de Lesões Histopatológicas em Jundiás (*Rhamdia Quelen*) Expostos a Agroquímicos.** 2010. 55 p. Dissertação – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

GALLI, A. J. B *et al.* Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. [S.l: s.n.], 2005.

GLIFOSATO. **BULA de Agrotóxico ROUNDUP ORIGINAL.** São Paulo - SP. MONSANTO DO BRASIL LTDA. Disponível em: < https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2021-02/rounduporiginal.pdf > Acesso em 10 de Mar. de 2022.

GLUSCZAK, L. *et al.* Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comp. Biochem. Physiol.** Part C 146, 519-524, 2007

HABING, W. H. *et al* (1976). **Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mescapturic acid formation**. J. Biol. Chem. v. 249, p. 7130-7139.

HOLANDA, L. F. C. *et al*. **DISTÚRBIOS FISIOLÓGICOS EM *MACROBRACHIUM ROSENBERGII* SUBMETIDOS A CONTAMINAÇÃO AGUDA POR GLIFOSATO — EFEITOS NA DEFESA ANTIOXIDANTE, COLINESTERASE E METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS**. In: XI JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA. v. 1 n. 11 (2021). **Anais Eletrônicos**. Disponível em: < <https://portaleventos.uffs.edu.br/index.php/JORNADA/issue/view/120> > Acesso em 04 de Fev. 2022.

HORN, R. C. *et al*. (2016). **Avaliação “in vitro” do efeito da infusão de *Cunila microcephala* Benth sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase e biomarcadores de estresse oxidativo em eritrócitos de agricultores**. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, 18(1), 341-348.

JARDIM, I. C. S. F. *et al*. **Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - Um enfoque às maçãs**. Química Nova vol.32 no.4 São Paulo, 2009.

KING, F. D. *et al*. (1985) A pathway of nitrogen metabolism in marine decapod crabs. **Comp Biochem Physiol B** 80:401-403

KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull**, segunda edição, 2012

KRUMMENAUER, D. *et al*. **Demanda faz crescer interesse por criação de camarões em estufas**. Visão Agrícola (USP / ESALQ), 2012, p. 24 - 27.

LORENSI, C. *et al*. GLIFOSATO: UMA REVISÃO DA TOXICIDADE EM PEIXES. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 9, n. 2, 3 mar. 2020.

MELO, M. S. **Toxicidade do herbicida à base de glifosato (Roundup WG®) no hepatopâncreas e sistema endócrino do camarão de água doce *Macrobrachium potiuna***. 2020. 125 p. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

MENSAH, P. K. *et al*. 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.

MIRON, D. *et al*. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 61, p. 398-403, 2005.

MODESTO, K. A. **Efeitos de dois herbicidas à base de glifosato para um peixe neotropical, com enfoque nos biomarcadores bioquímicos**. 2009. 80 f. Dissertação - Universidade Estadual de Londrina, Curso de Ciências Biológicas, Londrina, 2009.

MODESTO, K.A., MARTINEZ, C.B.R., 2010. **Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish**

Prochilodus lineatus. Chemosphere 78, 294-299.
doi:10.1016/j.chemosphere.2009.10.047

MONSERRAT, J. M. *et al.* (2002). Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species. **Mar. Environ. Res.**, 54: 781-785p. 2002.

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. (Monografia) Universidade Federal da Fronteira Sul / Laranjeiras do Sul - PR, 2018.

MORAES, R. F. **Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória**. TD 2506. Brasília: IPEA, setembro de 2019.

NEW, M. B. *et al.* 2000. **Sustainability of fresh water prawn culture**. In: New, M. B., Valenti, W. C. 2000. **Freshwater Prawn Culture**. Blackwell Science, USA.

OLIVEIRA, R. S. Jr. **Capítulo 6 - Introdução ao Controle Químico**. Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, 2017.

ORUÇ, E. Ö.; ÜNER, N. Effects of 2,4-Diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolisms in the serum, muscle and liver of *Cyprinus carpio*. **Environ Poll**, v. 105, p. 267-272, 1999.

PALAS, S. *et al.* Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 107, p. 120-125, September, 2014.

PIETROBON, C. B.; SENEM, J. V. Avaliação dos efeitos toxicológicos do herbicida glifosato sobre o estômago de ratos Wistar machos. **Cultivando o Saber**, v. 8, n. 2, p. 172- 183, 2015.

PIGNATI, W. A.; *et. al.* **Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde**. Ciência saúde coletiva [online]. 2017, vol.22, n.10, pp.3281-3293. ISSN 1678-4561.
<http://dx.doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>.

PINHEIRO, M. A. A.; HEBLING, N. J. Biologia de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879), p.21-46, in Valenti, W.C. (ed.), **Carcinicultura de água doce. Tecnologia para produção de camarões**. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília, 1998.

PINTO, S. B. **Comparação entre as dosagens de ast (aspartato aminotransferase) e alt (alanina aminotransferase) em presença e na ausência de piridoxal fosfato**. 2010. p. 34. (Graduação) - Curso de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2010.

RONDÓN-BARRAGÁN, I.S. *et al.*, 2012. **El glifosato (Roundup®) y Cosmoflux® 411F inducen estrés oxidativo en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*)**. **ORINOQUIA** 16, 162-176

SALBEGO, J. *et al.* Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.58, p.740-745, 2010.

SEDILAK, J.; LINDSAY, R.H.C. **Estimation of total, protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent.** *Analytical Biochemistry*, 25: 192–205, 1968.

SILVA, M. P. **Efeitos da Exposição ao Glifosato Sobre Biomarcadores de Estresse Oxidativo em Jundiás (*Rhamdia quelen*).** 2016. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2016.

SOARES, D. F. FARIA, A. M. ROSA, A. H. **Análise de risco de contaminação de águas subterrâneas por resíduos de agrotóxicos no município de Campo Novo do Parecis (MT), Brasil.** *Eng Sanit Ambient*, Ituiutaba, v.22, n.2, p. 277-284, mar/abr. 2017.

SOBJAK, T. M. **Atividade do Sistema antioxidante e efeitos neurotóxicos de *Rhamdia sp.*: experimentos manipulativo e natural.** 2016. 67 f. Dissertação - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2016.

SOUZA, M. A. **Risco de contaminação da água por glifosato: Validação do modelo A.R.C.A. em uma lavoura de soja no entorno do Distrito Federal.** (Tese de Doutorado em Engenharia Florestal), Publicação PPGEFL. TD – 38/2014 Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, 2014.

SPADOTTO, C. A. **Uso de Herbicidas no Brasil.** Comitê de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. 2002. Disponível: <<http://www.cnpma.embrapa.br/herbicidas/>> Acesso em 02 de Abr. de 2021.

TAVELLA, L. B. *et al.* **O USO DE AGROTÓXICOS NA AGRICULTURA E SUAS CONSEQUÊNCIAS TOXICOLÓGICAS E AMBIENTAIS.** ACSA - Agropecuária Científica no Semi-Árido, v.07, n 02 abril/junho 2011 p. 06 - 12.

TOMITA, R.Y.; BEYRUTH, Z. **Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático.** *Biológico* 2002; 64:135-42.

TU, H. T. *et al.* Acetylcholinesterase activity as a biomarker of exposure to antibiotics and pesticides in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Ecotoxicology Environmental Safety**, Namur, v. 72, p.1463- 1470, 2009.

VALENTI, W. C. **Criação de camarões de água doce.** In: Congresso de Zootecnia, 12° , Vila Real, Portugal, 2002, Vila Real: Associação Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos. Anais... p. 229-237.