

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

CAROLAINÉ MARIA DINIZ

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA DE PARENTAIS DO PEIXE *POECILIA*
RETICULATA (PETER, 1859) AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO , COM ÊNFASE
EM MORTALIDADE E MARCADORES BIOQUÍMICOS NA PROLE**

LARANJEIRAS DO SUL

2023

CAROLAINÉ MARIA DINIZ

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA DE PARENTAIS DO PEIXE *POECILIA*
RETICULATA (PETER, 1859) AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO, COM ÊNFASE
EM MORTALIDADE E MARCADORES BIOQUÍMICOS NA PROLE**

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

Orientador: Prof. Dr. Silvia Romão

LARANJEIRAS DO SUL

2023

RESUMO

Os herbicidas mais comercializados mundialmente, são a base de glifosato, destacando-se o produto comercial ROUNDUP® WG. Sua alta demanda na agricultura deve-se ao amplo espectro de ação. Sabe-se que esse composto apresenta baixa toxicidade para animais mamíferos, no entanto, os efeitos provenientes do seu uso sob os organismos aquáticos ainda são pouco conhecidos. Diante do exposto, o presente estudo avaliou o uso do roundup sob o cultivo do peixe ornamental lebiste (*Poecilia reticulata*) e os efeitos sobre a prole. O delineamento experimental foi constituído em duas fases. Na fase I foram utilizados 108 exemplares da espécie alojados em 6 unidades experimentais com volume útil de 10L cada, sendo 3 tratamentos controle e 3 tratamentos teste (Roundup 1 mg.L⁻¹) na densidade de 18 peixes por unidade experimental. Nessa fase foi realizado o cultivo e reprodução dos exemplares. Na fase II, a prole proveniente da reprodução da fase I foi cultivada durante 30 dias em ambiente livre de glifosato e observados os efeitos crônicos oriundos da fase anterior sobre o desenvolvimento dos juvenis. Analisando os resultados obtidos, não houve diferença significativa no número de nascidos por fêmea no grupo glifosato comparado com o controle, assim como na enzima colinesterase não houve variações nas atividades, também não foram observadas variações nas atividades das enzimas de defesa antioxidante (GR, CAT, GST) e marcadores não enzimáticos (GSH e LPO) e não houve alterações nas atividades de marcadores enzimáticos do metabolismo de aminoácidos (AST e ALT). Os resultados indicam que a exposição dos parentais ao glifosato, na fase de amadurecimento gonadal, reprodução e desenvolvimento embrionário, não causou interferência na reprodução, assim como nas vias metabólicas investigadas (passagem de informação nervosa colinérgica, defesa antioxidante e metabolismo de proteínas).

Palavras-chave: glifosato, herbicida, lebistes, toxicidade.

ABSTRACT

The most commercialized herbicides worldwide are based on glyphosate, highlighting the commercial product ROUNDUP® WG. Its high demand in agriculture is due to the wide spectrum of action. It is known that this compound has low toxicity to mammalian animals, however, the effects from its use on aquatic organisms are still little known. Given the above, the present study evaluated the use of roundup under the cultivation of the ornamental guppy fish (*Poecilia reticulata*) and the effects on the offspring. The experimental design consisted of two phases. In phase I, 108 specimens of the species were housed in 6 experimental units with a useful volume of 10L each, with 3 control treatments and 3 test treatments (Roundup 1 mg.L⁻¹) at a density of 18 fish per experimental unit. In this phase, the cultivation and reproduction of the specimens was carried out. In phase II, the offspring from the reproduction of phase I was grown for 30 days in a glyphosate-free environment and the chronic effects from the previous phase on the development of juveniles were observed. Analyzing the results obtained, there was no significant difference in the number of births per female in the glyphosate group compared to the control, as well as in the cholinesterase enzyme there were no variations in the activities, nor were there any variations in the activities of the antioxidant defense enzymes (GR, CAT , GST) and non-enzymatic markers (GSH and LPO) and there were no changes in the activities of enzymatic markers of amino acid metabolism (AST and ALT). The results indicate that parental exposure to glyphosate, during gonadal maturation, reproduction and embryonic development, did not interfere with reproduction, as well as with the investigated metabolic pathways (passage of cholinergic nerve information, antioxidant defense and protein metabolism).

Keywords: glyphosate, herbicide, guppies, toxicity.

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Diniz, Carolaine Maria
EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA DE PARENTAIS DO PEIXE
POECILIA RETICULATA (PETER, 1859)AO HERBICIDA À BASE DE
GLIFOSATO , COM ÊNFASE EM MORTALIDADE E MARCADORES
BIOQUÍMICOS NA PROLE / Carolaine Maria Diniz. -- 2023.
33 f.

Orientadora: Prof. Dra. Silvia Romão

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Agronomia, Laranjeiras do Sul, PR, 2023.

1. Glifosato, Herbicida, Lebistes, Toxicidade e
Prole.. I. Romão, Silvia, orient. II. Universidade
Federal da Fronteira Sul. III. Título.

CAROLAINÉ MARIA DINIZ

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA DE PARENTAIS DO PEIXE *Poecilia reticulata* (PETER, 1859) AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO, COM ÊNFASE EM MORTALIDADE E MARCADORES BIOQUÍMICOS NA PROLE

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia linha de formação em Agroecologia pela Universidade Federal da Fronteira Sul- *Campus Laranjeiras do Sul* (PR)

Orientador: Dra. Sílvia Romão

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 14/07/2023.

BANCA EXAMINADORA

Sílvia Romão

Dra. Sílvia Romão

Karine Telaska

Especialista. Karine Telaska

Milena Cia R.

Engenheira de Aquicultura. Milena Cia

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE – Acetilcolinesterase

BChE – Butirilcolinesterase

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

EPSPS: 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase

ERO – Espécie Reativa de Oxigênio

CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

CL50 – Concentração Letal 50%

DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico

GLDH – Glutamato Desidrogenase

GSSG – Glutationa oxidada

GST – Glutationa S Transferase

H₂O – Água H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

LPO – Lipoperoxidação

MDA – Malondialdeído

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mM – Milimolar

NADH – Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo

NADP – Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

nm – Nanômetro

O₂⁻ – Radical superóxido

OH – Radical hidroxila

TBA – Ácido tiobarbitúrico

μL – Microlitro

± – Desvio Padrão

UFFS – Universidade Federal da Fronteira Sul

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 8 |
| 2 OBJETIVOS..... | 9 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 9 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 9 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA..... | 10 |
| 3.1 A ESPÉCIE <i>Poecilia reticulata</i> | 10 |
| 3.2 INTERAÇÕES ENTRE HERBICIDAS E O ECOSISTEMA AQUÁTICO..... | 10 |
| 3.3 COMPLEXO ENZIMÁTICO ASSOCIADO À TOXICIDADE..... | 11 |
| 3.4 HERBICIDA ROUNDUP®..... | 12 |
| 3.5 SISTEMA NERVOSO..... | 14 |
| 3.5.1 COLINESTERASE..... | 14 |
| 3.6 DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICOS..... | 14 |
| 3.6.1 DEFESA ANTIOXIDANTE- GLUTATIONA S TRANSFERASE – GST..... | 14 |
| 3.6.2 CATALASE (CAT)..... | 15 |
| 3.6.3 GLUTATIONA REDUTASE (GR)..... | 15 |
| 3.7 DEFESA ANTIOXIDANTE NÃO ENZIMÁTICOS..... | 15 |
| 3.7.1 MARCADOR DE DANO- LPO- PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (TBARS)..... | 15 |
| 3.7.2 GLUTATIONA (GSH)..... | 15 |
| 3.8 METABOLISMO DE PROTEÍNAS..... | 16 |
| 3.8.1 ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST)..... | 16 |
| 3.8.2 ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT)..... | 16 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 17 |
| 4.1 IN VIVO..... | 17 |
| 4.2 ANÁLISE BIOQUÍMICA..... | 17 |
| 4.2.1 MÉTODO DE BRADFORD (BRADFORD, 1976)..... | 18 |
| 4.2.2 ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST)..... | 18 |
| 4.2.3-ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT)..... | 18 |
| 4.2.4 MARCADOR DE DANO- LPO- PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (TBARS)..... | 19 |
| 4.2.5 DEFESA ANTIOXIDANTE- GLUTATIONA S TRANSFERASE – GST..... | 19 |
| 4.2.6- CATALASE (CAT)..... | 19 |
| 4.2.7- COLINESTERASE..... | 19 |
| 4.2.8- GLUTATIONA REDUTASE (GR)..... | 20 |
| 4.2.9- GLUTATIONA (GSH)..... | 20 |
| 4.3 ESTATÍSTICA..... | 20 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 21 |
| 5.1 ACETILCOLINESTERASE..... | 22 |
| 5.2 DEFESA ANTIOXIDANTE..... | 22 |
| 5.3 METABOLISMO DE PROTEÍNAS..... | 25 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 27 |
| 7 REFERÊNCIAS..... | 28 |

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma grande produção e exportação agrícola e devido a esse fato, há um alto uso de insumos agrícolas, entre eles pesticidas, fertilizantes e sementes transgênicas (PIGNATI *et al.*, 2017). Na legislação brasileira os “agrotóxicos”, são caracterizados por compostos ou misturas de compostos químicos que tem por finalidade prevenir, destruir, ou repelir agentes patogênicos na vida vegetal ou animal que possam ser prejudiciais para plantas, animais, produtos, e aos seres humanos.

Os herbicidas à base de glifosato são os mais comercializados a nível mundial, possui cerca de 750 produtos comerciais diferentes, (GUYTON *et al.*, 2015), apresenta um amplo espectro de ação (ANDRIGHETTI *et al.*, 2014) e uma baixa toxicidade para mamíferos (DUKE; POWLES, 2008).

A sociedade está muito preocupada com a poluição, e uma das grandes preocupações é os agrotóxicos no ambiente natural e nos organismos aquáticos cultivados, pois as áreas de reservas naturais e viveiros de produção geralmente estão localizados próximos à atividades agrícolas e, portanto, sujeitas a exposição a esses compostos. Existem inúmeros dados e relatos na literatura sobre o impacto das atividades agrícolas nos sistemas aquáticos, e comunidade aquática (DAMALAS; ELEFTHEROHORINOS, 2011; DIAMOND *et al.*, 2017; BASTOS, 2013; BOIARSKI *et al.*, 2020).

O Lebiste (*P. reticulata*), é um peixe ornamental de pequeno porte adepto a água doce, de clima tropical e subtropical, é um animal que possui uma boa resistência e apresenta uma alta taxa de reprodução. Os machos possuem um porte menor que as fêmeas, são mais coloridos e possuem uma longa cauda em formato de véu, o lebiste ficou conhecido também por barrigudinho, nome esse que foi dado devido a características reprodutivas das fêmeas, pois elas ficam com ovos na barriga durante o período de gestação. Possui como característica alimentar ser onívoro, se alimentando tanto de plantas, algas e microrganismos, se adaptam bem com ração em flocos e em pó. O lebiste (*P. reticulata*), possui uma alta taxa de reprodução, é um animal que possui viviparidade, fecundação interna e os filhotes são juvenis ao nascimento, possuindo um desenvolvimento embrionário de aproximadamente 20 dias (WOURMS, 1981).

As modificações na saúde animal em ambientes aquáticos podem estar ligados a efeitos da exposição ao glifosato. Neste contexto, é objetivo do estudo a avaliação de possível interferência do glifosato na reprodução de *P. reticulata*, assim como a análise de marcadores

fisiológicos de efeitos neurotóxicos e defesa antioxidante na prole de parentais expostos ao glifosato.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar os efeitos do produto comercial roundup sobre a reprodução e prole de parentais de de *P. reticulata* cultivados em ambiente contendo o composto.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I) Avaliar o efeito da exposição de lebistes da espécie *P. reticulata* sobre a reprodução dos animais.

II) Avaliar o efeito da ação por glifosato em lebistes da espécie *P. reticulata* através da determinação da atividade de enzimas e concentração de marcadores não enzimáticos da defesa antioxidante;

III) Avaliar o efeito da ação por glifosato em lebistes da espécie *P. reticulata* utilizando marcador enzimático da biotransformação de xenobióticos e neurotóxicos;

IV) Avaliar o efeito da ação por glifosato em lebistes da espécie *P. reticulata* utilizando marcador enzimático do metabolismo de proteínas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A ESPÉCIE *Poecilia reticulata*

P. reticulata, também conhecido como guppy, é um peixe de água doce originário da América do Sul, mais especificamente das regiões tropicais e subtropicais da Venezuela, Guiana e Brasil. Ele é amplamente apreciado e criado em aquários devido à sua beleza, facilidade de criação e comportamento interessante (REZNICK, 1996).

Os guppies são conhecidos por suas cores vibrantes e variadas, com uma ampla gama de padrões e tons. Os machos geralmente são menores e mais coloridos do que as fêmeas. Além disso, os machos possuem nadadeiras caudais em forma de leque, enquanto as fêmeas possuem nadadeiras mais arredondadas. Essas diferenças de aparência são conhecidas como dimorfismo sexual (HOUDE, 1997).

Uma característica notável dos guppies é a sua capacidade de se reproduzir facilmente. Eles são vivíparos, o que significa que dão à luz alevinos vivos em vez de colocar ovos. Uma única fêmea pode produzir várias ninhadas de filhotes ao longo de sua vida. Devido a essa alta taxa de reprodução, os guppies podem se tocar rapidamente em condições estabelecidas (MAGURRAN, 2005 ; MARSHALL, 2006).

Em condições de laboratórios os lebetes possuem uma ótima adaptabilidade, por possuir uma boa resistência, manutenção e uma fácil manutenção. Sendo assim excelentes espécies para estarmos realizando pesquisas (EVANS, 2013).

3.2 INTERAÇÕES ENTRE HERBICIDAS E O ECOSSISTEMA AQUÁTICO

Alguns estudos sugerem que a exposição a herbicidas pode resultar em efeitos fisiológicos, como alterações no metabolismo, danos ao sistema imunológico e disfunção reprodutiva dos peixes (HARAYASHIKI, 2013). Além disso, certos herbicidas têm sido associados a mudanças comportamentais, incluindo a redução da atividade natatória, diminuição da taxa de alimentação e aumento da suscetibilidade a predadores. Essas respostas comportamentais podem ter consequências negativas na saúde e no bem-estar dos peixes (MARTINEZ, 2012; ANADÓN, 2009; FANTA, 2009).

A exposição a herbicidas no ecossistema aquático também pode ter efeitos indiretos nos peixes, influenciando o habitat e a disponibilidade de recursos. Alguns herbicidas podem levar à redução da diversidade e abundância de plantas aquáticas, resultando em menor

disponibilidade de alimento e abrigo para os peixes. Além disso, a perda de vegetação aquática pode levar a mudanças na qualidade da água, como aumento da turbidez e diminuição dos níveis de oxigênio dissolvido, afetando negativamente a capacidade dos peixes de sobreviver e se reproduzir (CLEMENTS, 2007 ; FERREIRA, 2020).

A toxicidade dos herbicidas no ecossistema aquático pode ser atribuída a diferentes fatores, incluindo a composição química dos herbicidas, suas concentrações no ambiente aquático e as características dos organismos aquáticos expostos. Estudos têm demonstrado que herbicidas como o glifosato, amplamente utilizado na agricultura, podem causar danos às espécies de peixes por meio de mecanismos tóxicos diretos. Esses herbicidas podem interferir nos processos fisiológicos dos peixes, como a função hormonal, levando a alterações no crescimento, desenvolvimento e reprodução. Além disso, a exposição a herbicidas também pode afetar a comunidade de organismos aquáticos, causando alterações nas interações ecológicas e na estrutura do ecossistema (GROSS-SOROKIN, 2017).

Além dos impactos diretos nos organismos aquáticos, a contaminação por herbicidas também pode afetar a qualidade da água e os processos biogeoquímicos nos ecossistemas aquáticos. Por exemplo, certos herbicidas podem promover o crescimento excessivo de algas, levando à eutrofização dos corpos d'água. Isso resulta em diminuição dos níveis de oxigênio dissolvido, comprometendo a sobrevivência de peixes e outros organismos aeróbicos. Além disso, o aumento da turbidez da água devido à presença de herbicidas pode afetar a penetração da luz solar, reduzindo a fotossíntese das plantas aquáticas e, conseqüentemente, afetando a produção primária e a disponibilidade de alimentos na cadeia alimentar aquática (MOLLOY, 2019).

3.3 COMPLEXO ENZIMÁTICO ASSOCIADO À TOXICIDADE

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas com elevado grau de instabilidade, altamente reativas, contendo elétrons desemparelhados (radicais livres) ou não (não radicais) (GUTTERIDGE, HALLIWELL, 2000).

Quando exposto a substâncias tóxicas, como certos pesticidas, o equilíbrio entre a produção de ROS e a atividade antioxidante pode ser perturbado. Isso pode resultar em um aumento significativo na geração de ROS, superando a capacidade do sistema antioxidante em neutralizá-los (HERMES-LIMA, 2004)

Essa produção excessiva de ROS pode levar a danos oxidativos em macromoléculas celulares, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. As ROS podem reagir com essas

macromoléculas, causando alterações em sua estrutura e função. Esse dano oxidativo pode levar a disfunções celulares, estresse do retículo endoplasmático, inflamação e até morte celular, (GUTTERIDGE, 1993, GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000)

Além disso, algumas substâncias tóxicas, como certos pesticidas, podem interferir diretamente com as enzimas envolvidas no sistema antioxidante endógeno, comprovando sua eficácia. Isso pode levar a uma redução na capacidade de neutralizar as ROS e agravar ainda mais o estresse oxidativo, (HAYES- PULFORD, 1995).

Em resumo, o estresse oxidativo é um mecanismo pela qual a toxicidade de substâncias, incluindo pesticidas, pode ser mediada. O equilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade antioxidante resulta em danos oxidativos e disfunções celulares, contribuindo para os efeitos tóxicos observados, (GUTTERIDGE, 2015).

3.4 HERBICIDA ROUNDUP®

O uso excessivo de herbicidas no solo pode contaminar acidentalmente os ecossistemas aquáticos. Isso pode ocorrer por meio da limpeza dos equipamentos de pulverização, do escoamento superficial, dos processos de lixiviação e também da derivação das aplicações por via aérea (AQUINO NETO e RODRIGUES DE ANDRADE, 2011; MENSAH et al., 2015). Quando os herbicidas estão presentes nos corpos d'água, podem afetar a qualidade ambiental, influenciar o funcionamento do ecossistema e alterar a estrutura das comunidades. Isso, por sua vez, tem impacto na fauna selvagem, gerado na redução da diversidade de espécies, modificações nas cadeias alimentares e alterações nos padrões de fluxo de energia e ciclagem de nutrientes. Além disso, os herbicidas podem afetar a estabilidade e a resiliência dos ecossistemas (FLEEGER et al., 2003; RELYEA, 2005;

O Roundup, um herbicida amplamente utilizado na agricultura e em áreas urbanas, contém o ingrediente ativo glifosato, que tem sido associado a efeitos negativos nos ecossistemas aquáticos. Estudos têm mostrado que a exposição ao Roundup pode levar a alterações na comunidade de organismos aquáticos, incluindo peixes, invertebrados e plantas aquáticas.(BATTAGLIN, MEYER, KUIVILA, DIETZE, 2014) O glifosato pode afetar diretamente os peixes, interferindo em seus sistemas enzimáticos, prejudicando a saúde e o desenvolvimento. Além disso, o glifosato pode levar à redução da diversidade e abundância de plantas aquáticas, resultando em alterações na estrutura e na função do ecossistema aquático. A contaminação por glifosato também pode afetar as interações tróficas, como a

disponibilidade de alimentos, afetando assim a cadeia alimentar aquática (VANDENBRANDEN, 2018).

Roundup é uma marca comercial de herbicidas que contém glifosato como ingrediente ativo. É um dos produtos mais conhecidos e amplamente utilizados que contém glifosato. O herbicida Roundup, desenvolvido por Monsanto (agora parte da Bayer), foi utilizado durante décadas na agricultura, jardinagem e aplicações não agrícolas para controlar as plantas invasoras. Funciona ao interferir com a enzima necessária para a síntese de aminoácidos nas plantas, o que resulta na morte das mesmas (ESTADÃO, 2022)

Estudos mostram que o glifosato pode contribuir para a eutrofização dos corpos d'água, estimulando o crescimento excessivo de algas devido ao seu efeito sobre a disponibilidade de nutrientes. Isso pode levar à diminuição dos níveis de oxigênio dissolvido na água, resultando em condições hipóxicas para peixes e outros organismos aeróbicos. Além disso, a presença de glifosato na água também pode afetar negativamente a fotossíntese das plantas aquáticas devido à sua ação herbicida, comprometendo a produção primária e a disponibilidade de alimentos na cadeia alimentar aquática (OWOBI, 2020).

Em 2008, o Brasil se destacou no cenário mundial como o maior consumidor de agrotóxicos, representando 86% dos produtos vendidos na América Latina (IBGE, 2012). Além disso, dos herbicidas utilizados no território brasileiro, 62,4% são à base de glifosato, o que torna o Brasil o primeiro no ranking mundial de consumo de glifosato (IBGE, 2015).

A composição do herbicida ROUNDUP® WG é de 720,0 g/kg referentes ao ácido de N- (phosphonomethyl) glycine (Glifosato), 792,5 g/kg de Sal de Amônio de N-(phosphonomethyl) glycine (Glifosato) e 207,5 g/kg de outros compostos. A classificação toxicológica é a V, se caracteriza por ser um produto improvável de causar dano agudo, o risco ambiental é de classe III, sendo um produto nocivo ao meio ambiente (MONSANTO, 2010). Pegando como referência algumas portarias e admitido uma certa concentração em alguns países no Brasil por exemplo é admitido 500µg/L de glifosato na água para o consumo, na União Europeia é de 0,1µg/L e no Japão 2000µg/L (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

O mecanismo de ação desse composto está relacionado à biossíntese de aminoácidos aromáticos da via chiquimato. O chiquimato é um precursor para os aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptofano e tirosina nas plantas. A biossíntese destes aminoácidos essenciais é promovida pela enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintase (EPSPs), a enzima alvo do glifosato. Desta forma, o glifosato inibe a EPSPs por competição com o substrato PEP (fosfoenolpiruvato), evitando a transformação do chiquimato em corismato, o último precursor comum na biossíntese destes compostos aromáticos. A via do chiquimato representa

aproximadamente 35% da massa da planta em peso seco e, portanto, qualquer interferência na via é altamente prejudicial para a planta (STENERSEN, 2004; ANNETT *et al.*, 2014).

Há registros na bibliografia de que o glifosato apresentam efeito de modificações fisiológicas como na locomoção, comportamento, morfologia dos animais e também um efeito citotóxicos (BRIDI, 2017; TUREK *et al.*, 2017), inibição da atividade da Acetilcolinesterase, danos oxidativos e interferência no sistema de defesa antioxidante (GLUSCZAK *et al.*, 2006; MODESTO AND MARTINEZ, 2010; CATTANI *et al.* 2014; SOBJAK *et al.*, 2017; GALLEGOS *et al.*, 2018; SOBJAK *et al.* 2018; TEIXEIRA, *et al.*, 2018; WILKENS *et al.*, 2017), distúrbios neurodegenerativos, distúrbios reprodutivos, embriotóxicos, desregulação endócrina (HERNANDEZ-PLATA *et al.*, 2015; GALLEGOS *et al.*, 2018, NISHIYORI *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2014; CAVALLI *et al.*, 2013; ZEBRAL *et al.*, 2018; ROMANO *et al.*, 2009; PIRES, 2013; DEFARGE *et al.*, 2016; DRUART *et al.*, 2017; WILKENS *et al.*, 2017).

3.5 SISTEMA NERVOSO

3.5.1 COLINESTERASE

A colinesterase é uma enzima essencial para a função do sistema nervoso, sendo responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina. Essa enzima desempenha um papel crítico na regulação da atividade colinérgica, controlando a duração e a intensidade dos sinais nervosos. Estudos têm demonstrado que a disfunção da colinesterase está associada a distúrbios neurológicos, como a doença de Alzheimer e a intoxicação por agentes inibidores da colinesterase (PERRY *et al.*, 2019).

3.6 DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICOS

3.6.1 DEFESA ANTIOXIDANTE- GLUTATIONA S TRANSFERASE – GST

As GSTs desempenham um papel importante na defesa antioxidante e desintoxicação do organismo. Elas estão envolvidas na conjugação de moléculas tóxicas e reativas, como produtos químicos xenobióticos, metabólitos tóxicos e radicais livres. Variações genéticas nas GSTs podem influenciar a atividade enzimática e a capacidade do organismo de neutralizar e eliminar substâncias tóxicas (HAYES, 2000).

3.6.2 CATALASE (CAT)

A catalase é uma enzima chave envolvida na defesa antioxidante celular, desempenhando um papel crucial na decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio. Essa enzima é encontrada em uma variedade de organismos vivos e é responsável por neutralizar o H₂O₂, evitando a formação de espécies reativas de oxigênio e minimizando danos oxidativos. Estudos têm demonstrado que a atividade da catalase está associada à proteção contra o estresse oxidativo e está sujeita a regulação genética e fatores ambientais (SMITH et al., 2018).

3.6.3 GLUTATIONA REDUTASE (GR)

A Glutationa Redutase (GR) é uma enzima que desempenha um papel fundamental no sistema antioxidante celular. Ela catalisa a redução da glutatona oxidada (GSSG) de volta à sua forma reduzida (GSH), permitindo a regeneração contínua da glutatona, um importante antioxidante intracelular (BOARD et al., 1997).

3.7 DEFESA ANTIOXIDANTE NÃO ENZIMÁTICOS

3.7.1 MARCADOR DE DANO- LPO- PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (TBARS)

A peroxidação lipídica é uma reação química que ocorre quando os lipídios presentes nas membranas celulares são danificados pelos radicais livres, resultando na formação de compostos reativos, incluindo os TBARS. Os TBARS são compostos derivados da oxidação de ácidos graxos insaturados, especialmente o malonaldeído (MDA), que é um dos principais marcadores utilizados para medir os TBARS. A medição dos níveis de TBARS é frequentemente utilizada como um indicador de estresse oxidativo e dano celular, (BARBOSA et al., 2010).

3.7.2 GLUTATIONA (GSH)

A glutatona possui propriedades antioxidantes significativas e desempenha um papel fundamental na proteção das células contra o estresse oxidativo. Ela atua como um importante

reduzidor, ajudando a neutralizar os radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (MEISTER et al., 1983; RAHMAN, 2006).

3.8 METABOLISMO DE PROTEÍNAS

3.8.1 ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST)

A aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima crucial envolvida no metabolismo dos aminoácidos e no funcionamento do ciclo do ácido cítrico. A AST catalisa a transferência do grupo aminocarboxílico do aspartato para o alfa-cetoglutarato, formando glutamato e oxaloacetato. Além disso, a AST desempenha um papel importante na síntese de aminoácidos não essenciais e na produção de energia. Alterações nos níveis séricos de AST têm sido associadas a várias condições patológicas, incluindo doenças hepáticas, cardíacas e musculares (MACHADO et al., 2020).

3.8.2 ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT)

A alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima essencial envolvida no metabolismo dos aminoácidos e no funcionamento do ciclo do ácido cítrico. A ALT catalisa a transferência do grupo aminocarboxílico da alanina para o alfa-cetoglutarato, formando piruvato e glutamato. A ALT desempenha um papel crucial na gliconeogênese, na síntese de aminoácidos e na produção de energia. A atividade sérica da ALT é frequentemente utilizada como um marcador de dano hepatocelular, sendo elevada em condições como hepatite, cirrose e esteatose hepática (MALIK et al., 2020).

A atividade da alanina aminotransferase (ALT) tem sido amplamente utilizada como um biomarcador para avaliar a saúde e o status metabólico em peixes. A ALT desempenha um papel crucial no metabolismo dos aminoácidos e na função hepática, catalisando a transferência do grupo aminocarboxílico da alanina para o alfa-cetoglutarato. Estudos têm demonstrado que a atividade da ALT pode ser afetada por fatores como estresse, exposição a poluentes ambientais e alterações na dieta, fornecendo informações valiosas sobre a saúde fisiológica e o estado nutricional dos peixes (FELÍCIO et al., 2021).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 IN VIVO

A metodologia aplicada nesse experimento de peixes da espécie *P. reticulata* submetida à exposição por ROUNDUP® WG foi aprovada pela CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Fronteira Sul, CEUA 7233310720.

O experimento foi conduzido no laboratório de Experimentação Animal da Universidade Federal da Fronteira Sul - Campus Laranjeiras do Sul. Os ensaios do experimento consistiram em duas fases para análise de peixes da espécie *P. reticulata* submetidos à exposição por glifosato (produto comercial: ROUNDUP® WG).

O delineamento experimental foi constituído em duas fases (fase I e fase II). Na fase I foi cultivada durante 157 dias e utilizados 108 exemplares da espécie alojados em 6 unidades experimentais com volume útil de 10L cada, sendo 3 tratamentos controle e 3 tratamentos teste (1 mg Roundup/L) na densidade de 18 peixes por unidade experimental. Nessa fase realizou-se o cultivo dos exemplares e a reprodução dos mesmos.

Na fase II, a prole proveniente da reprodução da fase I foi cultivada durante 30 dias em ambiente livre do fármaco teste e observados os efeitos crônicos oriundos da fase reprodutiva.

Os animais foram mantidos em temperatura média de 27°C, com um aquecedor com termostato em cada aquário, oxigenação constante, pH e amônia monitorados semanalmente. Foram alimentados diariamente com ração comercial e realizada a troca de 30% da água, duas vezes por semana, mantendo a mesma concentração de glifosato semanalmente.

Os registros dos nascimentos foram utilizados para o cálculo do número de nascidos por fêmeas. Os juvenis foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia com benzocaína (100 mg/L) e congelados a -85 °C. As análises bioquímicas foram executadas no laboratório de Bioquímica/Genética da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Laranjeiras do Sul.

4.2 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Para análise dos parâmetros bioquímicos as amostras de fígado serão homogeneizadas em solução de Tris/HCl 50mM utilizando o homogeneizador elétrico IKA® T10 basic, em seguida colocado o material em centrífuga refrigerada (Sigma, 3-16 KL) a 4 °C por 10

minutos em 11000xg. O sobrenadante, obtido após a centrifugação, foi retirado e utilizado para as determinações.

4.2.1 MÉTODO DE BRADFORD (BRADFORD, 1976)

Para determinação de proteína foi utilizado o método de Bradford (1976) utilizando sobrenadante dos homogenatos e albumina bovina como padrão, é uma técnica analítica usada para determinar a concentração de proteínas em uma amostra. O método de Bradford utiliza um corante chamado "Comassie Brilliant Blue G-250", que tem afinidade por proteínas. Quando o corante é adicionado a uma solução contendo proteínas, ele se liga às proteínas e causa uma mudança na cor da solução, do marrom para o azul. Essa mudança de cor é proporcional à quantidade de proteína presente na amostra.

A quantificação da concentração de proteína utilizando o método de Bradford é feita por comparação com uma curva padrão, que é construída utilizando soluções de proteína de concentrações conhecidas. A absorbância da amostra é medida em um espectrofotômetro e comparada com os valores da curva padrão para determinar a concentração de proteína na amostra desconhecida.

4.2.2 ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST)

Aspartato aminotransferase (AST), também conhecida como transaminase glutâmico-oxaloacética sérica (TGO), é uma enzima encontrada principalmente no fígado e em outros órgãos (Berg et. al. 2018). A atividade de Aspartato aminotransferase nos sobrenadantes dos homogenatos foi determinada utilizando kits comerciais (Gold analisa) e seguindo as instruções dos fabricantes e adaptados os volumes para microplaca, com expressão dos resultado em U/L/mg de proteína.

4.2.3-ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT)

A alanina aminotransferase, ALT também conhecida como transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), é uma enzima encontrada principalmente no fígado, mas também em menor quantidade em outros tecidos, como músculos e rins (Berg et. al. 2018). A atividade de alanina aminotransferase (ALT) nos sobrenadantes dos homogenatos foi determinada utilizando kits comerciais (Gold analisa) e seguindo as instruções dos fabricantes e adaptados os volumes para microplaca, com expressão dos resultado em U/L/mg de proteína.

4.2.4 MARCADOR DE DANO- LPO- PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (TBARS)

A determinação da peroxidação lipídica (estresse oxidativo em órgãos/tecidos) foi avaliada através do Método TBARS, caracterizado pela reação de malondialdeído (MDA) e ácido 2- tiobarbitúrico (TBA). O procedimento consistiu em pipetar em duplicata 40 µL do sobrenadante da amostra de órgãos homogeneizados, 40 µL de H₂O_{mq} (branco), 40 µL de diferentes concentrações de MDA para preparação de curva padrão de MDA, 10 µL de BHT em todos os poços da microplaca com micropipeta multicanal, 140 µL de tampão PBS, 50 µL de TCA 50% com multicanal e pipetar 75 µL de TBA 1,3% em NaOH 0,3% com micropipeta multicanal. A microplaca permaneceu em banho maria por 1 hora a 60°C. E após resfriar a placa, foi medido absorvância no espectrofotômetro a 535 nm, com resultados expressos em µmol MDA/mg de proteína (FEDERICI; SHAW; HANDY, 2007).

4.2.5 DEFESA ANTIOXIDANTE- GLUTATIONA S TRANSFERASE – GST

Através do Método de Habing et al. (1974) foi determinado a atividade da enzima de defesa antioxidante Glutationa S Transferase (GST). Em microplacas de 96 poços foi pipetado 10 µL das amostras homogeneizados em duplicata, 20 µL de tampão fosfato de potássio (branco) pH 6,5, com pipeta multicanal foi pipetado 180 µL do sistema de reação. Logo em seguida medida a absorvância a 340 nm no espectrofotômetro durante 5 minutos, com intervalos de 30 segundos. O sistema de reação (125 poços) é caracterizado por conter tampão fosfato de potássio pH 6,5 com 100 mM, GSH 1,5 mM, CDNB em etanol 2 mM, sendo os resultados expressos em µmoles de tio éter formado/min/mg de proteína= U/mg de proteína.

4.2.6- CATALASE (CAT)

Para a determinação da catalase na microplaca foi pipetado 10 µl do sobrenadante da amostra, adicionado 990 µl do sistema de reação, misturado por inversão, medindo a absorvância a 240 nm, por 60 segundos em intervalos de 2 segundos.

4.2.7- COLINESTERASE

A colinesterase é caracterizada por ser uma enzima importante na transmissão do impulso nervoso (MOTA, 2012).

Foram pipetados 20 µl do tampão (branco, em triplicata) em microplaca de 96 poços mais 20 µl do sobrenadante da amostra em triplicata em microplaca de 96 poços, em seguida foi pipetado 130 µl de solução de DTNB (Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico) com micropipeta multicanal, logo após foi pipetado rapidamente 50 µl de iodeto de acetiltiocolina com micropipeta multicanal), foi medido o acréscimo na absorbância imediatamente a 405 nm (tempo total = 5-7 min, intervalos = 40-52 s) em espectrofotômetro de microplaca (os valores de ABS deverão aumentar com o tempo).

4.2.8- GLUTATIONA REDUTASE (GR)

Foram pipetados 25 µl do sobrenadante da amostra (em triplicata) em microplaca de 384 poços, em seguida foi pipetado 25 µl de Tris HCl 50mM pH 7,4 (branco, em triplicata) em microplaca de 38 poços logo após pipetado mais 75 µl de sistema de reação (com micropipeta multicanal) foi medido o decréscimo na absorbância imediatamente a 340 nm (tempo total = 10 min, intervalos = 40 s) em espectrofotômetro de microplaca (os valores de ABS deverão diminuir com o tempo).

4.2.9- GLUTATIONA (GSH)

Foi adicionado 50 µl da solução de ácido tricloroacético a 50% aos 200 µl do sobrenadante ainda congelado do tecido, no branco, foi pipetado 50 µl da solução de ácido tricloroacético a 50% em 200 µl de PBS, Misturado bem levado na centrifugação a 5000 g por 10 min e 4 °C em seguida pipetados 50 µl do branco em microplaca em triplicata, logo após pipetado mais 50 µl da curva-padrão em microplaca em triplicata e então pipetado 50 µl do sobrenadante das amostras em microplaca em triplicata, adicionado em todos os poços utilizados 230 µl do tampão Tris-base 0,4 M, pH 8,9 mais 20 µl de solução de DTNB em todos os poços da microplaca foi aguardado 5-10 min a temperatura ambiente e medido a absorbância a 415 nm.

4.3 ESTATÍSTICA

Os resultados serão descritos como médias e desvio padrão. Foram realizados teste de normalidade Kolmogorov and Smirnov e de Homocedasticidade das amostras. Para

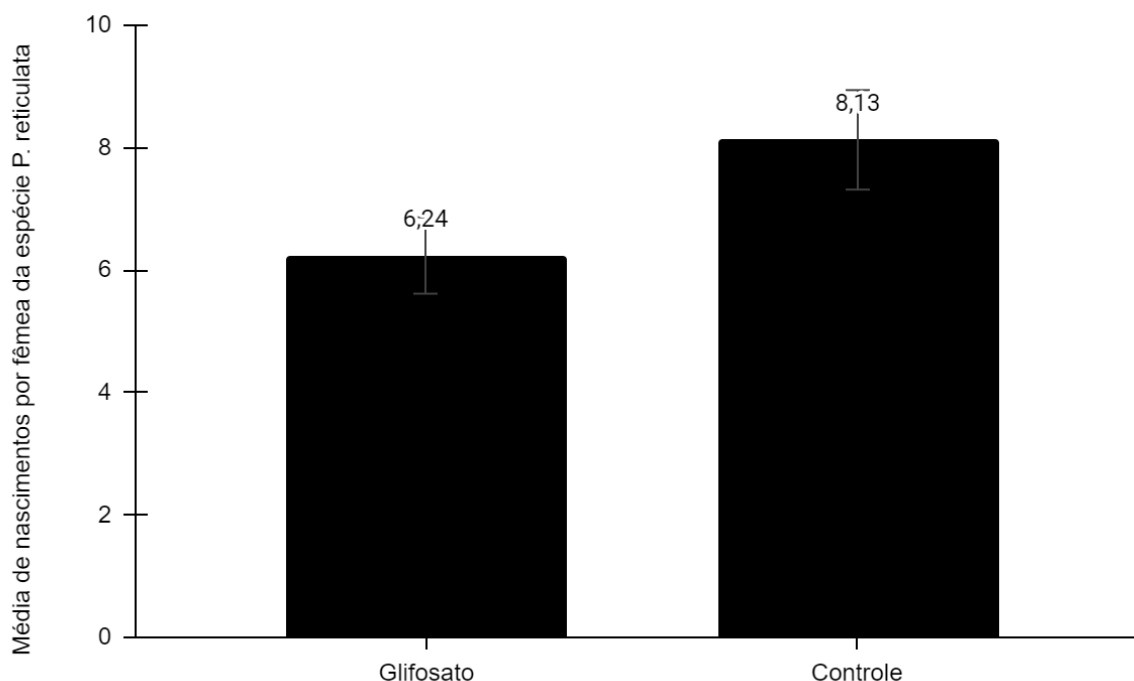
amostras normais e homocedásticas foi realizado teste T não pareado, para amostras normais e heterocedásticas foi realizado teste T não pareado com correção de Welch.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados expressos em média e desvio padrão demonstraram uma variação do pH de $7.43 \pm 0,379$ para a água dos animais submetidos ao teste, e pH 7.78 ± 0.128 para a água do aquário controle. Do mesmo modo, a temperatura se manteve estável em todo o período, com média de $26,7^{\circ}\text{C} \pm 0,293$. No aquário com glifosato a amônia apresentou a média $0.003 \text{ mg/L} \pm 0.001 \text{ mg/L}$ para a água e a amônia de $0.006 \text{ mg/L} \pm 0.003 \text{ mg/L}$ para a água do aquário controle.

Não foram observadas alterações do número de nascidos por fêmeas no grupo exposto ao glifosato ($6,24 \pm 1,93$), quando comparado ao controle ($8,13 \pm 3,24$). (figura 1).

Figura 1 – Média de nascimento por fêmeas da espécie *P. reticulata* expostos a ROUNDUP® WG.



O glifosato é identificado como um agente que causa alterações na fisiologia e comportamento animal, existem registros na literatura que apresentam mudanças na locomoção, comportamento e morfologia dos animais (BRIDI, 2017). Além disso, foram observados efeitos citotóxicos (TUREK et al., 2017), inibição da atividade da enzima colinesterase (GLUSCZAK et al., 2006; MODESTO AND MARTINEZ, 2010), danos

oxidativos e interferência no sistema de defesa antioxidante (CATTANI et al., 2014; SOBJAK et al., 2017; GALLEGOS et al., 2018; SOBJAK et al., 2018; TEIXEIRA, et al., 2018; WILKENS et al., 2017), distúrbios neurodegenerativos (HERNANDEZ-PLATA et al., 2015; GALLEGOS et al., 2018, NISHIYORI et al., 2014), problemas reprodutivos (LOPES et al., 2014; CAVALLI et al., 2013), efeitos prejudiciais ao embrião (ZEBRAL et al., 2018) e desregulação endócrina (ROMANO et al., 2009; PIRES, 2013; DEFARGE et al., 2016; DRUART et al., 2017; WILKENS et al., 2017). Porém neste estudo não foi possível identificar efeitos reprodutivos, indicando que a concentração utilizada (1mg.L⁻¹) não causou alteração sobre o número de prole em relação ao grupo controle.

5.1 ACETILCOLINESTERASE

A indução ou inibição da colinesterase pode influenciar no processo de neurotransmissão colinérgica e promover efeitos de letargia ou nado errático (MIRON et al., 2005). No presente estudo não houve alterações (tabela 1), do glifosato, em relação ao grupo controle.

Tabela 1. Atividade da Colinesterase em peixes da espécie *P. reticulata* expostos a 1,0 mg/L de ROUNDUP® WG.

| | Controle | Glifosato |
|---|----------------|-----------------|
| Colinesterase (<i>mmoles.minuto⁻¹mg de proteína⁻¹</i>) | 244,75 ± 47,72 | 237,38 ± 54,931 |

Na literatura há informações contrastantes em relação à capacidade do glifosato interferir na atividade das colinesterases. No peixe *Cnesterodon decemmaculatus* o glifosato causou redução da atividade da acetilcolinesterase em homogenato do corpo animal (MENÉNDEZHELMAN et al., 2012), em outro estudo com animais *Danio rerio* demonstraram que a AChE não sofre interferência do glifosato (BRIDI, 2017).

5.2 DEFESA ANTIOXIDANTE

Não foram identificadas variações significativas na concentração de GSH da espécie *P. reticulata* exposta ao glifosato em comparação com o grupo controle (Tabela 2). Da mesma forma, não foram observadas alterações nas atividades das enzimas GR, GST e catalase

(Tabela 2). No presente estudo com a espécie *P. reticulata*, não foram encontradas alterações na concentração de LPO nos animais expostos ao glifosato, em relação ao controle (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade de defesas antioxidantes em peixes da espécie *P. reticulata* expostas a 1,0 mg/L de ROUNDUP® WG.

| | <i>Controle</i> | <i>Glifosato</i> |
|--|-------------------|-------------------|
| <i>GSH</i> ($\mu\text{M mg proteína}^{-1}$) | 2,57 \pm 2,56 | 2,04 \pm 0,43 |
| <i>GR</i> (<i>nM. mg proteína</i> ⁻¹) | 2,3 \pm 1,4 | 2,0 \pm 0,78 |
| <i>CAT</i> ($\mu\text{M de H}_2\text{O}_2$ degradado.min ⁻¹ . μg^{-1} de proteína) | 196 \pm 61,75 | 147 \pm 46,11 |
| <i>GST</i> ($\mu\text{M/ mg proteína}^{-1}$) | 43,99 \pm 49,02 | 31,80 \pm 18,89 |
| <i>LPO</i> ($\mu\text{moles de MDA.mg prot}^{-1}$) | 154 \pm 106 | 93 \pm 16 |

A Glutathione Redutase (GR) é uma enzima essencial envolvida na manutenção dos níveis de glutathione reduzida (GSH) no organismo. A atividade da GR tem sido investigada em diferentes estudos relacionados à contaminação por substâncias químicas, incluindo pesticidas como o glifosato (SIES et al., 1979).

Um estudo realizado por Modesto e Martinez (2010) avaliou a atividade da GR em peixes da espécie *Prochilodus lineatus* expostos ao glifosato. Os resultados mostraram um aumento significativo na atividade da GR após 24 e 96 horas de exposição ao glifosato. É importante ressaltar que os efeitos do glifosato na atividade da GR podem variar dependendo das condições experimentais, como a concentração de glifosato, a duração da exposição e a espécie de peixe estudada.

A catalase é uma enzima presente em quase todas as células vivas que desempenha um papel crucial na proteção do organismo contra os danos causados pelos radicais livres. Ela catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, reduzindo assim os níveis de H₂O₂ e evitando a formação de espécies reativas de oxigênio (SCANDALIOS, 2005). A catalase, entre as enzimas antioxidantes, é a principal enzima para a detoxificação de espécies reativas de oxigênio em todos os organismos e catalisa o H₂O₂ tóxico em H₂O e O₂ inofensivos. Um estudo relacionado ao efeito de glifosato em peixes demonstrou que após exposição ao glifosato em condições de laboratório, o fígado, músculo, brânquia e cérebro de *Anabas testudineus* e *Heteropneustes fossilis* mostraram um aumento significativo (p<0.05)

na atividade da catalase, provavelmente em resposta aos níveis elevados de radicais livres hepáticos (SAMANTA et al., 2014).

A GSH é importante molécula da defesa antioxidante por participar das reações com enzimas antioxidantes e detoxificantes, (LUSHCHAK, BAGNYUKOVA, 2006). Alguns estudos têm mostrado que a exposição ao glifosato pode levar a alterações nos níveis de GSH em peixes. Por exemplo, pesquisa realizada por Bridi (2017) investigou os efeitos da exposição ao glifosato em peixe-zebra (*Danio rerio*) e observou redução nos níveis de GSH no cérebro dos peixes expostos ao herbicida. Esse resultado sugere que o glifosato pode interferir na capacidade antioxidante do organismo, levando ao estresse oxidativo.

Outro estudo realizado por Bagatto et al. (2011) investigou os efeitos da exposição crônica a um herbicida à base de glifosato em peixe da espécie *Prochilodus lineatus*. Os resultados indicaram alterações nos mecanismos de defesa antioxidante, incluindo a redução nos níveis de GSH no fígado dos peixes expostos ao herbicida. Essas alterações sugerem a ocorrência de estresse oxidativo decorrente da exposição ao glifosato

A principal função da glutatona é proteger as células contra danos oxidativos, neutralizando os radicais livres e outros compostos reativos de oxigênio que podem ser gerados durante processos metabólicos normais ou em resposta a estresse ambiental, como exposição a toxinas ou agentes oxidantes (BARBOSA et al, 2010).

Distúrbios no sistema antioxidante foram descritos em diferentes espécies, como *Prochilodus lineatus* (LANGIANO e MARTINEZ, 2008), *Prochilodus lineatus* (MODESTO, 2009), *Rhamdia quelen* (FERREIRA, 2010), *Heteropneustes fossilis* (PALAS et al., 2014).

A Glutathione S-Transferase (GST) é uma família de enzimas multifuncionais que desempenham papéis essenciais no organismo. Elas são capazes de catalisar a conjugação de compostos exógenos com Glutathione Reduzida (GSH), como evidenciado por Huber et al. (2008) e Oliveira (2012). Além disso, as GSTs têm a capacidade de remover eletrófilos reativos, protegendo assim proteínas e ácidos nucleicos dos organismos, conforme destacado por Nunes et al. (2006) e citado por Ferreira et al. (2010). Devido a essas propriedades, as GSTs têm sido amplamente utilizadas como eficientes marcadores fisiológicos, especialmente em estudos de exposição a elementos contaminantes.

Segundo Harayashiki et al. (2013) não encontraram efeitos significativos na atividade da GST em músculo, brânquias e fígado de machos e fêmeas da espécie *Poecilia vivipara* expostos ao Roundup®. Em contraste, Martinez (2010) apresenta estudos que relatam um aumento na atividade da Glutathione S-transferase (GST) em peixes da espécie *Prochilodus lineatus* após 24 e 96 horas de exposição ao Roundup®. Por outro lado, Luschchak et al.

(2009) observaram uma diminuição de 29-34% na atividade da GST no fígado de *Carassius auratus L.* após 96 horas de contaminação por concentrações de 2,5-20 mg L⁻¹ de Roundup®.

A TBARS é frequentemente usada como marcador de estresse oxidativo (LUSHCHAK et al., 2009). O fígado desempenha um papel fundamental na desintoxicação dos animais, e as concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs) e componentes antioxidantes são indicadores importantes para avaliar o estresse nesse órgão (SANCHEZ, 2015).

Um estudo realizado por Bagatto et al. (2011) avaliou os efeitos da exposição crônica ao glifosato em peixes da espécie *Danio rerio* (zebrafish). Os resultados mostraram um aumento significativo nos níveis de TBARS no fígado dos peixes expostos ao glifosato, indicando o aumento do dano oxidativo aos lipídios. Outro estudo realizado por Rodrigues et al. (2013) investigou os efeitos da exposição subletal ao glifosato em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia). Os resultados mostraram um aumento nos níveis de TBARS no fígado dos peixes expostos ao glifosato, indicando o estresse oxidativo e o dano oxidativo aos lipídios.

Além das divergências de comportamento observadas na defesa antioxidante, nos diferentes ensaios de exposição de peixes ao glifosato também pode-se observar que ensaios crônicos com efeitos na prole não foram anteriormente relatados.

5.3 METABOLISMO DE PROTEÍNAS

Não foram observadas alterações nas análises de AST e ALT (Tabela 3). Estudos têm demonstrado que a atividade da ALT pode aumentar em resposta a diferentes tipos de estresse, incluindo estresse ambiental, manipulação, transporte e exposição a contaminantes químicos. A medição da atividade da ALT em peixes pode fornecer informações valiosas sobre seu estado fisiológico e adaptativo em condições desafiadoras (ADAMS ET AL., 2019).

A atividade da alanina aminotransferase (ALT) pode variar entre diferentes espécies de peixes, refletindo suas adaptações fisiológicas e demandas metabólicas específicas. Por exemplo, peixes de água doce podem exibir níveis mais elevados de atividade da ALT em comparação com peixes marinhos, possivelmente devido a suas necessidades metabólicas distintas (ADAMS ET AL., 2019). Compreender a variação da atividade da ALT entre espécies de peixes pode contribuir para uma melhor compreensão de suas estratégias adaptativas e capacidade de enfrentar estressores ambientais (GAO ET AL., 2018).

A atividade da aspartato aminotransferase (AST) em peixes pode ser influenciada por estresse ambiental (TORRES, 2021). Segundo Sarkar (2019), fatores como temperatura, salinidade, poluentes químicos e alterações na qualidade da água podem afetar os níveis de AST em peixes, a elevação desses níveis em resposta ao estresse ambiental pode refletir adaptações metabólicas e respostas fisiológicas dos peixes para lidar com condições desafiadoras.

Tabela 3. Atividade de AST E ALT em peixes da espécie *P. reticulata* expostas a 1,0 mg/L de ROUNDUP® WG.

| | <i>Controle</i> | <i>Glifosato</i> |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------|
| <i>AST</i> (μ / mg proteína) | 107,0 \pm 63,21 | 192,46 \pm 141,0 |
| <i>ALT</i> (μ / mg proteína) | 61,89 \pm 21,97 | 58,77 \pm 15,58 |

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante os ensaios de exposição ao glifosato (ROUNDUP® WG), não houve diferença significativa no número de nascidos por fêmea no grupo glifosato comparado com o controle.

A exposição crônica ao ROUNDUP® WG na concentração de 1 mg.L⁻¹ não interferiu na reprodução, na atividade da enzima colinesterase, na defesa antioxidante (GSH, GR, CAT, GST e LPO) e metabolismo de proteínas (ALT e AST). Os resultados indicam que a exposição dos parentais ao glifosato, na fase de amadurecimento gonadal, reprodução e desenvolvimento embrionário, não causou interferência na reprodução, assim como nas vias metabólicas investigadas (neurotransmissão colinérgica, defesa antioxidante e metabolismo de proteínas).

7 REFERÊNCIAS

- ADAMS, S. M., Larkin, S. L., & Ham, K. (2019). **Aminotransferase activities as indicators of stress response in fish: a review.** *Journal of Aquatic Animal Health*, 31(3), 197-211.
- ANNETT, R.; HABIBI, H. R.; HONTELA, A. **Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment.** *Journal of Applied Toxicology*, v. 34, n. 5, p. 458–479, 2014. Acesso em: 20 Jan 2023
- AQUINO NETO, S.; RODRIGUES DE ANDRADE, A. Cap 19: **Electrochemical oxidation of herbicides.** In: Soloneski, S. e Larramendy, M.L. 2011. *Herbicides, theory and applications*, pp. 622, 2011. Acesso em: 10 Fev 2023
- Bagatto, B., Burgos, L., Segatto, A. L. A., Bonan, C. D., Costa, M. M., & Gluszcak, L. (2011). **Chronic exposure to glyphosate-based herbicide alters antioxidant defenses in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(3), 428-433. Acesso em: 18 Fev 2023
- Board, P. G. (2011). **Identification, characterisation and crystal structure of the Mu class glutathione transferases.** *Drug metabolism reviews*, 43(2), 194-214. Acesso em: 10 Fev 2023
- Board, P. G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermiin, L. S., Schulte, G. K., & Danley, D. E. (1997). **Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases.** *Journal of Biological Chemistry*, 272(13), 871-874.
- Bradford, M. M. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254. Acesso em: 25 fev 2023
- Bridelius-Flohé, R., & Flohé, L. **Basic Principles and Emerging Concepts in the Redox Control of Transcription Factors.** *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(8), 2335-2381 (2011). Acesso em: 18 Abr 2023
- Bridi, D. (2017). **Efeitos da exposição ao glifosato sobre parâmetros comportamentais em peixe-zebra (*Danio rerio*).** Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- CATTANI, D. et al. **Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: Involvement of glutamate**

excitotoxicity. *Toxicology*, v. 320, n. 1, p. 34-45, 2014. Acesso em: 25 Jan 2023.

Chance, B., & Maehly, A.C. **Assay of Catalases and Peroxidases.** *Methods in Enzymology*, 2, 764-775 (1955). Acesso em: 15 Mar 2023.

DUKE, S. O.; POWLES, S. B. **Glyphosate: a once-in-a-century herbicide.** *Pest Management Science*, v. 64, n. 1, p. 319–325, 2008. Acesso em: 28 Abr 2023.

FELÍCIO, A. A., Ribeiro, R. P., Marins, L. F., Cyrino, J. E., & Urbinati, E. C. (2021). Biochemical and hematological responses of jundia *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Pimelodidae) to dietary vitamin E and exposure to environmental nitrite. *Aquaculture*, 531, 735846.

FLEEGER, J. W.; CARMAN, K. R.; NISBET, R. M. **Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems.** *Science of the Total Environment*, v. 317, n. 1–3, p. 207–233, 2003. Acesso em: 15 Mai 2023

GAO, L., Wang, C., Xu, Y., Zhang, Y., & Xie, P. (2018). **Comparative study of aminotransferase activities in five fish species from the Yangtze River.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 163, 441-448.

GIANNINI, E. G., Testa, R., & Savarino, V. (2005). **Liver enzyme alteration: a guide for clinicians.** *Canadian Medical Association Journal*, 172(3), 367-379. Acesso em: 19 Jun 2023

GLUSCZAK, L. et al. **Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*).** *Ecotoxicol. Environ. Saf*, v. 65, p. 237–241, 2006. Acesso em: 20 Jan 2023

GUYTON, K. Z. et al. **Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate.** *The Lancet Oncology*, v. 16, p. 490–491, 2015. Acesso em: 05 Jun 2023

HERNANDEZ-PLATA et al. **The herbicide glyphosate causes behavioral changes and alterations in dopaminergic markers in male Sprague-Dawley rat.** *NeuroToxicology*, v. 46, p. 79–91, Jan. 2015. Acesso em: 10 Jun 2023

HAYES, J. D., & Strange, R. C. (2000). **Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences.** *Pharmacology*, 61(3), 154-166.

IBGE. **Indicadores de desenvolvimento sustentável - Brasil 2012.** *Estudos e Pesquisas - Informações Geográficas*, v. 9, pp. 350, 2012. Acesso em: 05 Jun 2023

LOPES, F.M., ROSA, C. E. **Efeito da Exposição ao Herbicida Glifosato Sobre a Atividade da Enzima Acetilcolinesterase do Peixe *Danio rerio***. XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, Porto de Galinhas – PE, 2012. Acesso em: 10 Jun 2023

MACHADO, M. V., Cortez-Pinto, H., & Diogo, L. N. (2020). **Diagnostic accuracy of aspartate aminotransferase to platelet ratio index (APRI) for significant liver fibrosis assessment in patients with non-alcoholic fatty liver disease**. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 55(5), 570-576.

MALIK, R., Khan, M. S., & Pandey, P. (2020). **Serum alanine aminotransferase (ALT) as a biomarker for liver disease: A review**. *Annals of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 6(2), 1-6.

MEISTER, A., & Anderson, M. E. (1983). **Glutathione**. *Annual Review of Biochemistry*, 52(1), 711-760.

MODESTO, Kathya Assmann. **Efeitos de dois herbicidas à base de glifosato para um peixe teleósteo e para anfíbios anuros**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005. Acesso em: 17 Jun 2023

NICKMANN, R. et al. **Evidence for glyphosate-induced oxidative stress in plants**. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. 48, n. 8, p. 734-741, 2013. Acesso em: 05 Mar 2023

OETTING, F. S. et al. **The effect of glyphosate herbicide on sexual and asexual reproduction of tadpoles of the frog *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae)**. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 37, n. 2, p. 217-223, 2015. Acesso em: 25 fev 2023

OKABE, Y. et al. **Effects of glyphosate on egg incubation, larvae hatching and survival, and metamorphosis of *Rana catesbeiana* tadpoles**. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. 43, n. 4, p. 327-332, 2008. Acesso em: 10 Jun 2023

OKABE, Y. et al. **Acute toxicity of herbicides to the early life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.) using the partial life-cycle test**. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 80, n. 4, p. 370-373, 2008. Acesso em: 18 Mar 2023

PERRY, E. K., Marshall, E., Perry, R. H., Irving, D., Smith, C. J., Blessed, G., & Fairbairn, A. F. (2019). **Decreased cerebral blood flow in Alzheimer's disease: effects on cortical cholinergic activities and the cholinergic receptor system**. *Journal of Neurology*,

Neurosurgery & Psychiatry, 48(6), 570-577.

PINTO, R. D. et al. **Toxicological effects of the herbicide Roundup® on the neotropical fish *Prochilodus lineatus***. Chemosphere, v. 95, p. 52-59, 2014. Acesso em: 03 Jun 2023

PRADO, R. S. et al. **Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity**. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 112, p. 25-31, 2015. Acesso em: 17 Abr 2023.

PRIOLI, A. J. et al. **Chronic sublethal exposure to glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*)**. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 41, p. 1-8, 2016. Acesso em: 15 Abr 2023

RAHMAN, I., & Adcock, I. M. (2006). **Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD**. European Respiratory Journal, 28(1), 219-242.

RODRIGUES, P. M. et al. **Pesticides in freshwater ecosystems: Occurrence, effects, and current challenges**. Ecotoxicology and Environmental Contamination, v. 13, n. 1, p. 1-15, 2018. Acesso em: 26 Jun 2023.

SARKAR, R., Rawat, S., & Kumari, P. (2019). **Hepatic biomarkers in fish: an overview**. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 8(3), 749-752.

SALBU, B. et al. **Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide in the earthworm, *Eisenia fetida***. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 56, n. 3, p. 295-302, 2003. Acesso em: 14 Mar 2023

SAMANTA et al., **Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 72 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, 107-125, 2014.

SCANDALIOS, J. G. (2005). **Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 38(7), 995-1014.

SCALIA, R. M. et al. **Impact of glyphosate-based herbicides on the gut microbiota of Nile tilapia**. Aquaculture Research, v. 51, n. 4, p. 1435-1448, 2020. Acesso em: 19 abr 2023

SILVA, L. L. et al. **Effects of glyphosate-based herbicide on embryonic, larval, and juvenile development in the ribbed mussel (*Geukensia demissa*)**. Ecotoxicology and

Environmental Safety, v. 125, p. 41-47, 2016. Acesso em: 07 Mar 2023

SMITH, A. B., Johnson, C. D., & Parker, E. F. (2018). **The role of catalase in cellular antioxidant defense: insights from model organisms and human studies.** Free Radical Biology and Medicine, 120, 113-120.

SOUZA, R. L. S. et al. **Acute effects of the herbicide Roundup Transorb on the energy metabolism of the euryhaline polychaete *Laeonereis acuta*.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 167, p. 486-492, 2019. Acesso em: 09 Mai 2023

Free Radical Biology and Medicine: **Uma revista científica especializada em pesquisa sobre radicais livres, estresse oxidativo e suas implicações em doenças.** Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/journal/free-radical-biology-and-medicine>. <Acesso em: 10 Jun 2023>