

# **BIOMARCADORES COMPORTAMENTAIS DA TOXICIDADE AGUDA DO HERBICIDA ROUNDUP TRANSORB® NO PEIXE *POECILIA RETICULATA***

Thiago Lopes ROCHA<sup>1\*</sup>, Ana Paula Rezende dos SANTOS<sup>1</sup>, Joana Cristina neves de Menezes FARIA<sup>1</sup>, Alex Rodrigues GOMES<sup>1</sup>, Simone Maria Teixeira SABÓIA-MORAIS<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Depto. de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB) / UFG.

<sup>2</sup>Profa. Dra. / Orientadora – Depto. de Morfologia – ICB / UFG

\*E-mail: thiagorochabio20@gmail.com

**Palavras-chave:** Alterações comportamentais; Guaru; Biomarcadores; Biomonitoramento.

## **INTRODUÇÃO**

A utilização mundial de herbicidas tem possibilitado o crescente aumento na produção alimentícia e o controle de ervas daninha e/ou exóticas. Contudo, seu uso indiscriminado e excessivo provocou impactos nocivos em vários ecossistemas, especialmente o aquático. Nesse cenário, a poluição do ambiente aquático com agrotóxicos é um grave problema ambiental e de saúde pública mundial devido à persistência desses tóxicos no ambiente e seus efeitos de bioacumulação, bioativação, fácil dispersão na água e danos para a biota (REYNAUD et al., 2008; LUSHCHAK et al., 2009).

O estudo da poluição aquática possibilita a prevenção e/ou mitigação dos danos de poluentes aos organismos, incluindo o ser humano. Contudo, as análises dos parâmetros físico-químicos da água são limitadas para descrever o status biológico dos ecossistemas. Isso porque elas não refletem a biodisponibilidade dos poluentes e suas interações com os organismos vivos. Desse modo, o monitoramento e avaliação de risco ambiental não podem ser baseados apenas em análises físico-químicas da água, pois esses parâmetros não indicam ou predizem os efeitos nocivos dos poluentes nos organismos aquáticos. Para uma análise mais complexa da poluição aquática, tem-se sugerido o uso de biomarcadores, os quais são respostas biológicas adaptativas a estressores, evidenciadas como alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais. Esse conceito

de biomarcador inclui as alterações comportamentais, que em alguns casos podem ser um *endpoint* toxicológico mais sensível (TIERNEY et al. 2007).

O biomonitoramento baseado em biomarcadores comportamentais ainda se apresenta limitado, pois existe escassez de conhecimentos sobre os quadros clínicos comportamentais das espécies bioindicadoras e de metodologias padronizadas para comparação semiquantitativa e/ou quantitativa das mudanças comportamentais nos peixes induzidas por agrotóxicos. Nesse sentido, no presente trabalho, pretenderam-se descrever uma metodologia para análise etotoxicológica: os Índices de alterações comportamentais (Ics), baseando-se no nível de significância e no valor de *score* das modificações do comportamento. Além da padronização dos Ics, os autores realizam o estudo das alterações comportamentais no guaru *Poecilia reticulata* induzidas pelo herbicida comercial Roundup Transorb<sup>®</sup> (RDT), um herbicida baseado em glifosato que possui ampla utilização no Centro-Oeste e em escala mundial.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Machos adultos de *P. reticulata* ( $0,11 \pm 0,03$ g de peso total e  $2,35 \pm 0,23$ cm de comprimento total) foram coletados do Biotério de Animais Aquáticos do Laboratório de Comportamento Celular (LCC - UFG), Goiânia, Goiás, Brasil. No biotério, os animais eram mantidos em tanques de 250 litros e alimentados três vezes ao dia, em quantidade de alimento suficiente para ser consumida em até 5 minutos, com ração comercial (alconBASIC<sup>®</sup>) com 45% de proteína bruta. Os parâmetros físico-químicos da água dos tanques foram controlados quanto a oxigenação (11ppm), temperatura da água ( $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ ), fotoperíodo (12:12 horas claro/escuro), amônia dissolvida ( $0\mu\text{l/L}$  a  $0,01\mu\text{l/L}$ ), pH ( $6,9 \pm 0,1$ ) e salinidade (0‰).

Para os bioensaios, os animais foram divididos em seis grupos contendo oito peixes, os quais foram expostos às concentrações de 0, 4, 8, 16, 32 e  $64\mu\text{l/L}$  do herbicida por litro de água de clorada. Essas concentrações possuem uma quantidade do princípio ativo glifosato (N-fosfometil glicina) igual a 1,92; 3,84; 7,68; 15,36 e 30,72 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os parâmetros físico-químicos da água nos aquários experimentais foram mantidos de modo semelhante àqueles descritos para a manutenção dos animais no biotério. A exposição aguda ocorreu em sistema estático sem renovação de água, provido de aeração. A mortalidade

acumulativa e as alterações comportamentais foram monitoradas nos períodos de 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 e 96h de exposição, sendo que cada grupo era analisado por um período total de 2 minutos, com a mensuração da quantidade de animais que apresentava cada alteração comportamental. Nesses períodos, mensurou-se a proporção de animais que exibiam cada comportamento por meio da razão do número de peixes alterados pelo número total de peixes em exposição. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e as condições físico-químicas da água monitoradas ao longo da exposição, tal como padronizada pelo guia 203 da OECD (OECD, 1992). O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFG) e está protocolado sob nº 046 desde 2008.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A exposição aguda de machos do *P. reticulata* ao herbicida RDT induziu mudanças comportamentais e mortalidade diferenciada de acordo com a concentração e o tempo de exposição. No período de 64 horas, o herbicida, nas concentrações de 32 e 64µl/L, foi altamente tóxico para o guaru e promoveu a mortalidade de 100% dos espécimes. As concentrações de 2, 4 e 8µl/L do RDT promoveram alterações comportamentais, as quais não causaram em morte durante a exposição aguda.

As alterações comportamentais individuais dos peixes foram classificadas em sete categorias morfofuncionais (Cmf) de acordo com a reação morfofisiológica: 1. Distúrbios respiratórios, 2. Distúrbios respiratórios, 3. Distúrbios nanatórios, 4. Distúrbios tegumentares, 5. Distúrbios reprodutivos. Cada modelo reacional inclui alterações comportamentais resultantes de disfunções nos principais sistemas dos organismos, permitindo a integração de múltiplos parâmetros biológicos na análise da poluição aquática.

Com o intuito de se criar os índices de alterações comportamentais, foram atribuídos níveis de significância (Ns) a cada modificação do comportamento. A importância das alterações comportamentais está relacionada com a severidade das alterações e com a capacidade do animal em revertê-las. Dessa maneira, podem-se agrupar as mudanças comportamentais em três categorias de acordo com o seu nível de significância: alterações comportamentais leves (Ns = 1), moderadas (Ns =

2) e severas (Ns = 3). Além do Ns, foram criados valores de Score (S) das alterações comportamentais. Cada mudança no comportamento é analisada baseada na razão do número de indivíduos alterados pelo número total de animais analisados. Dessa maneira, as disfunções no comportamento podem receber um valor de score que varia de 0 a 5, de acordo com a porcentagem de animais afetados: 0% (S=0), 1 a 20% (S=1), até 81 a 100% (S=5).

Com o auxílio do Ns e do S, propõem-se a utilização de dois índices de alterações comportamentais: O Índice comportamental morfofuncional (Icmf) que é calculado pelo somatório da multiplicação do nível de significância (Ns) e do valor de score (S) de todas as alterações (alt) presente em uma determinada classificação morfofuncional (cmf); e o Índice comportamental total (Ict) que é calculado pelo somatório da multiplicação do nível de significância (Ns) e do valor de score (S) de cada alteração (alt) presente em todas as classificações morfofuncionais (cmf).

O estudo qualitativo das mudanças comportamentais do *P. reticulata* indica que o RDT induz alterações comportamentais da Cmf1 (Distúrbios respiratórios), Cmf2 (Distúrbios circulatórios), Cmf3 (Distúrbios natatórios), Cmf4 (Distúrbios tegumentares) e Cmf6 (Distúrbios sociais) (**Figura 1**). Uma das alterações da Cmf4 do comportamento do *P. reticulata* identificada após a exposição aguda ao RDT são o escurecimento das nadadeiras e de todo o corpo. Segundo Roulin et al. (2008), em vertebrados, a coloração baseada em melanina pode estar sob controle genético, e em algumas espécies é dependente do meio externo.

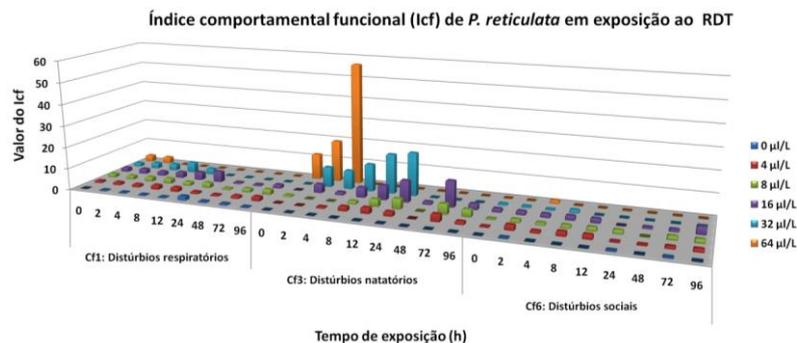


Figura 1. Índice comportamental morfofuncional (Icmf) de *P. reticulata* em exposição aguda ao herbicida Roundup Transorb® (RDT).

O Ict apresentou variação ao longo das concentrações do herbicida e do período de exposição. O RDT na concentração de 64µl/L induz mudanças

comportamentais com altos valores de Ns e S nos períodos iniciais de exposição (0, 2 e 4h). Após o último período, não se verifica o lct de 64µl/L porque 100% dos peixes morreram no período de 8 horas. Os animais expostos às maiores concentrações apresentaram lct elevado quando comparados ao grupo de 0µl/L.

## **CONCLUSÕES**

O presente trabalho é o primeiro estudo a criar os Índices de alterações comportamentais baseados no nível de significância e no valor de score das modificações comportamentais de peixes. Esses índices se apresentaram viáveis no estudo da toxicidade aguda do RDT para a espécie biomonitora *P. reticulata* e podem ser potentes biomarcadores da toxicidade aguda de herbicidas baseados em glifosato.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**Lushchak, O., Kubrak, O. I., Storey, J. M., Storey, K. B., Lushchak, V. I.** 2009. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*, **76**, 932-937.

**OECD.** 1992. *Test 203: fish acute toxicity test*. In: OECD Guidelines for testing of chemicals.

**Reynaud, S., Raveton, M., Ravanel, P.** 2008. Interactions between immune and biotransformation systems in fish: A review. *Aquatic Toxicology*, **87**, 139-145.

**Roulin, A., Almasi, B., Rossi-Pedruzzi, A., Ducrest, A. -L, Wakamatsu, K., Miksik, I., Blount, J. D. & J. -E; Jenni, L.** 2008. Corticosterone mediates the condition-dependent component of melanin-based coloration. *Animal Behaviour*, **75**, 1351-1358.

**Tierney, K. B., Singh, C. R., Ross, P. S. & Kennedy, C. J.** 2007. Relating olfactory neurotoxicity to altered olfactory-mediated behaviors in rainbow trout exposed to three currently-used pesticides. *Aquatic Toxicology*, **81**, 55-64.

**Instituição de fomento:** CNPq e CAPES.