

## **OS EFEITOS DO ROUNDUP® NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E METABOLISMO ENERGÉTICO DO PEIXE ZEBRA (*Danio rerio*)**

OTTASSANO DE SOUZA PANETTO<sup>1</sup>, DANIELE DA SILVA FRAGA GOMES<sup>2</sup>, HELGA FERNANDES GOMES<sup>3</sup>, NATÁLIA MARTINS FEITOSA<sup>4</sup> e JORGE LUIZ DA CUNHA MORAES<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Me. em Ciências, UFRJ, Macaé-RJ, ottassano@yahoo.com.br;

<sup>2</sup>Me. em Ciências, UFRJ, Macaé-RJ, danielefragas@gmail.com;

<sup>3</sup>Dr<sup>a</sup>. em Biociências e Biotecnologia, UFRJ, Macaé-RJ, hgomes2@yahoo.com.br;

<sup>4</sup>Dr<sup>a</sup>. Prof. Adjunta, UFRJ, Macaé, nataliafeitosa@gmail.com

<sup>5</sup>Dr. Prof. Associado, UFRJ, Macaé-RJ, jorgemorae@bioqmed.ufrj.br;

Apresentado no  
Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia - CONTECC  
Palmas/TO – Brasil  
17 a 19 de setembro de 2019

**RESUMO:** O Roundup® tem o princípio ativo o composto químico glifosato, sendo atualmente o agrotóxico mais usado e vendido na agricultura mundial. O trabalho teve o objetivo de mostrar os efeitos do Roundup® sobre o metabolismo energético durante a embriogênese do peixe zebra (*Danio rerio*). O teste toxicidade dos embriões (FET) foi realizado durante 96 hpf, onde foram definidas as concentrações sub-letais do Roundup®, logo após, foram realizadas as dosagem bioquímicas. Pelos resultados observados constatou-se que a CL<sub>50</sub> (concentração que mata 50% dos embriões) para Roundup® nas condições aplicadas nesse experimento é de 25 mg/L. Foi apurada a alteração morfológica em embriões viáveis após o FET na bexiga natatória do embrião. Os resultados bioquímicos com as dosagens de proteínas totais, glicose não mostraram efeitos significativos. Contudo, a dosagem da atividade da enzima hexoquinase apresentou diferença significativa nos embriões submetidos à concentração de 5 mg/L e 15 mg/L quando comparados ao grupo controle. E os dockings moleculares das enzimas glucoquinase, hexoquinases I e II com o ligante glifosato apresentaram interações significativas, podendo assim, corroborar com este resultado encontrado no experimento bioquímico na atividade enzimática da hexoquinase.

**PALAVRAS-CHAVE:** Roundup, Toxicologia, embriologia, Metabolismo energético, Peixe Zebra.

### **THE EFFECTS OF ROUNDUP® IN THE EMBRYO DEVELOPMENT AND ENERGY METABOLISM OF THE ZEBRA FISH (*Danio rerio*)**

**ABSTRACT:** Roundup® has the chemical compound glyphosate as its active ingredient and is currently the most widely used agrochemical in agriculture worldwide. The objective of this work was to show the effects of Roundup® on energetic metabolism during embryogenesis (*Danio rerio*). Embryo toxicity test (FET) was performed during 96 hpf, where the sub-lethal concentrations of Roundup® were defined, after which the biochemical dosages were performed. From the results observed, the LC<sub>50</sub> (concentration that kills 50% of the embryos) for Roundup® under the conditions applied in this experiment is 25 mg/L. The morphological alteration was verified in viable embryos after FET in the embryo swimming bladder. Biochemical results with total protein, glucose showed no significant effects. However, the dosage of the hexokinase enzyme activity showed a significant difference in embryos submitted to a concentration of 5 mg/L and 15 mg/L when compared to the control group. And the molecular dockings of the enzymes glucoquinase, hexokinases I and II with the glyphosate ligand presented significant interactions, being able to corroborate with this result found in the biochemical experiment in the enzymatic activity of hexokinase.

**KEYWORDS:** Roundup, Toxicology, embryology, Energy metabolism, Zebra fish.

## INTRODUÇÃO

O glifosato [N-(Fosfonometil) glicina] corresponde em torno de 10% das vendas globais de herbicidas e está presente em 150 marcas comerciais. O glifosato é uma das moléculas mais eficientes já introduzidas no mercado para controle de plantas daninhas e, no Brasil, tem ação comprovada sobre cerca de 150 espécies de plantas indesejáveis as lavouras, sendo utilizado em áreas agrícolas, industriais, florestais e residenciais (Bervald *et al.*, 2010; Ahsan *et al.*, 2008).

A contaminação do meio aquático por agrotóxicos ocorre com frequência através do processo de carreamento do solo contaminado, lixiviação, pela lavagem dos equipamentos de pulverização ou ainda por derivação no ar quando aplicado por aviões agrícolas (Ferraro, 2004). Os peixes podem entrar em contato com moléculas nocivas presentes no ambiente aquático por quatro vias: alimentação, ingestão de água, pela pele e/ou através das brânquias (Heath, 1995). Portanto, sendo organismos indicadores interessantes por serem capazes de demonstrar a sua própria situação toxicológica e a de outros organismos, por encontrarem-se no topo da cadeia alimentar (Silva, 2007).

Este estudo teve o objetivo de mostrar os efeitos do Roundup® sobre o metabolismo energético durante a embriogênese do peixe zebra (*Danio rerio*), através do teste toxicidade dos embriões (FET) que foi realizado durante 96 hpf nas fases embrionárias do embrião, logo foram definidas as concentrações sub-letais do Roundup® e realizadas as dosagem bioquímicas com as dosagens dos principais metabolitos do metabolismo energético.

## MATERIAL E MÉTODOS

A manutenção do peixe em um plantel com idade entre 6 e 24 meses que será usado para produção de ovos. Os reprodutores não podem ter sido tratados com qualquer método farmacêutico por 6 meses antes da desova. A oxigenação foi mantida em valores >6mg/L. O pH foi verificado constantemente com o objetivo de mantê-lo sempre próximo a 7.0. A temperatura foi mantida em 28° ±1 e o ciclo de luz 14/10h. (Westerfield, 1995; Lammer *et al.*, 2009).

Início do teste de toxicidade do embrião de peixe (FET) começa no dia antes do teste, os machos e fêmeas são colocados em câmaras de reprodução imediatamente antes do início da escuridão. Após 30-60 minutos da desova, os tanques de reprodução eram removidos para retirada dos ovos e transferidos para uma incubadora BOD com temperatura controlada. (Lammer *et al.*, 2009; Selderslaghs *et al.*, 2009). Após a fertilização, os embriões são selecionados aleatoriamente seguindo o modelo proposto por Lammer *et al.* (2009). Quatro poços de uma placa de vinte e quatro poços foram designados para cada nível de concentração de 1,5 mg/L, 5 mg/L, 15 mg/L e 25 mg/L de glifosato no Roundup Original® (Monsanto do Brasil Ltda) e o controle com 20 embriões cada. As placas foram incubadas a 28° C ± 1,0°C.

Ao término do FET após as 96 horas de exposição dos embriões ao agrotóxico, os embriões foram colocados em solução Tris-HCl 10 mM a pH 7,4, logo após levados ao Sonicador Unique desruptor ultra-sônico em potência 99 por 30 segundos, centrifugados a 10.000 rpm (Rotações por minuto) em 4°C durante 5 minutos na Centrífuga Universal 320R Zentrifugen e, finalmente foi separado o sobrenadante para experimentos bioquímicos e o precipitado descartado.

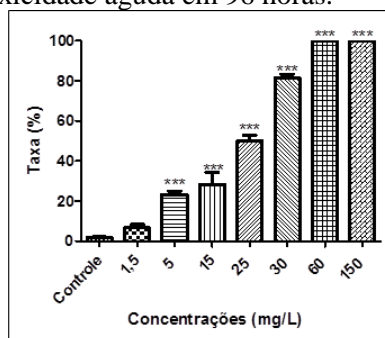
Os estudos de docking molecular foram desenvolvidos partindo-se de três estruturas: Zfishglucok (Enzima Glucoquinase d Zebra Fish), ZfishHK1 (Enzima Hexoquinase I do Zebra Fish), ZfishHK2 (Enzima Hexoquinase II do Zebra Fish) e um ligante, o glifosato.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de mortalidade foi dose-dependente, sendo a primeira concentração de 1,5 mg/L com taxa de 7% aumentando gradativamente até a concentração de 60 mg/L e 150 mg/L com ambas apresentando 100% de mortalidade. O controle apresentou uma taxa de 2% de mortalidade (figura 1). Pelos resultados observados estipulou-se que a CL<sub>50</sub> (concentração que mata 50% dos embriões) para Roundup® nas condições aplicadas nesse experimento é de 25 mg/L. O teste estatístico de tukey mostrou que existem diferenças nas concentrações de 150 mg/L, 60 mg/L, 30 mg/L, 25 mg/L, 15 mg/L, 5 mg/L quando comparadas com o Controle. Este valor da CL<sub>50</sub> é equivalente a 14.400 vezes menor do que em relação a concentração de 360 g/L de glifosato na formulação comercial do Roundup Original® que é aplicada no campo, uma vez que na prescrição do Roundup® recomenda-se a diluição de 1 litro/hectare para culturas de gramíneas. De acordo com a WORLD HEALTH ORGANIZATION

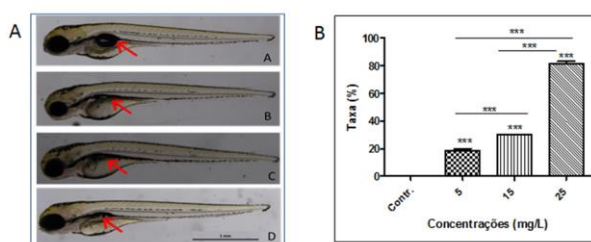
(1994) o valor da CL50-96 horas para o glifosato varia entre 2 a 55 mg.L<sup>-1</sup>, sendo esta variação atribuída às diferentes espécies de peixes e às condições dos testes.

Figura 1. Taxa de mortalidade de embriões de peixe zebra frente a diferentes concentrações de glifosato no Roundup® no teste de toxicidade aguda em 96 horas.



Após os testes de toxicidade os embriões viáveis que foram submetidos a diferentes concentrações de Roundup® por um período de 96 horas pós-fertilização (hpf) apresentaram alterações morfológicas sendo fotografados na Lupa Leica M205 FA para observação dos efeitos. Conforme imagens (figura 2A) foi observado que o controle apresentou a bexiga natatória inflada normalmente (A), enquanto que nas concentrações de 5 mg/L (B), 15 mg/L (C) e 25 mg/L (D) os peixes apresentaram dificuldade ao inflar a bexiga natatória. Uma vez o ensaio iniciado, também foi registrado no período de 96 hpf a alteração morfológica ocorrida no desenvolvimento embrionário (Figura 2B). No controle observamos que todos os embriões estavam inflando a bexiga natatória corretamente. Na concentração de 5 mg/L, 18% dos embriões não inflaram a bexiga natatória. Na concentração de 15 mg/L a mesma alteração persistiu com 30% dos embriões afetados. E finalmente a concentração de 25 mg/L indicou uma expressiva porcentagem de 82% dos embriões com esta alteração de não inflarem a bexiga natatória. A bexiga natatória do peixe zebra serve como um dispositivo variável de flutuabilidade e compartilha semelhanças com a estrutura anatômica do pulmão (Winata *et al.*, 2009).

Figura 2. (A) Análise da morfologia dos embriões em 96 horas pós-fertilização (hpf) dos embriões de peixe zebra expostos ao Roundup®. (A) controle negativo (CTRL): O CTRL apresentou bexiga natatória inflada (seta vermelha). (B-D) Concentrações com 5 mg/L (B), 15 mg/L (C) e 25 mg/L (D): peixes apresentaram dificuldades ao inflar a bexiga natatória (seta vermelha); (B) Taxa de embriões de peixe zebra com dificuldades ao inflar a bexiga natatória em cada concentração de Roundup® no ensaio de 96 hpf.



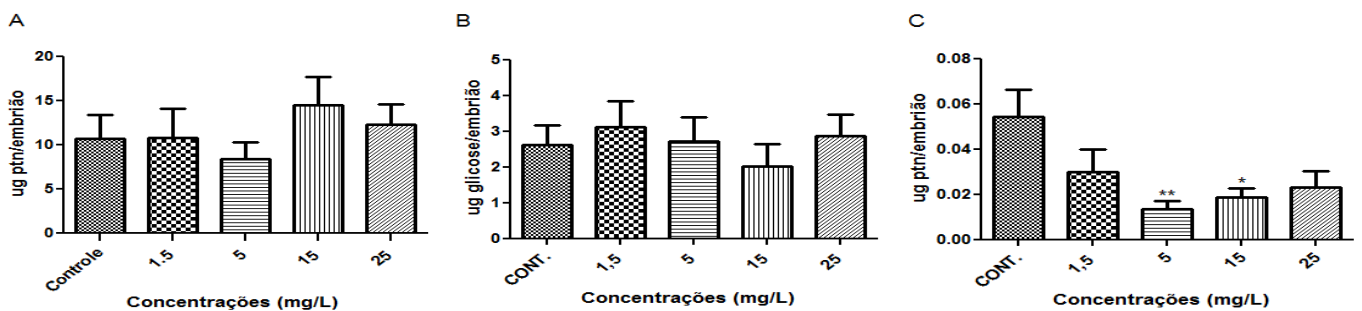
Os experimentos bioquímicos foram realizados com os embriões que sobreviveram após serem submetidos ao ensaio FET de 96 hpf. Sendo assim, foram utilizados para os testes metabólicos o grupo controle, e aqueles tratados com as concentrações subletais de 1,5 mg/L, 5 mg/L e 15mg/L e 25mg/L do Roundup®.

O primeiro teste bioquímico realizado foi a dosagem de proteínas totais dos embriões de peixe zebra que foram submetidos às diferentes concentrações de Roundup®. Os resultados entre os grupos avaliados não apresentaram diferenças significativas entre as concentrações de 1,5 mg/L, 5 mg/L, 15 mg/L e 25 mg/L quando comparados ao controle (figura 3A). Os peixes utilizam as proteínas, também, como sustento para a elevada taxa de trocas de proteína muscular, que se reflete na elevada atividade das enzimas envolvidas em processos de descarboxilação e transaminação de aminoácidos (Moon e Johnston, 1981).

O aumento da glicose plasmática como fonte de energia para a manutenção da homeostase é uma resposta muito comum em peixes sob alguma condição de estresse. Foi observado na figura 3B que não houve mudanças nos níveis de glicose nos ensaios deste trabalho. A mobilização das reservas energéticas, por vias endócrinas, pode ser considerada um mecanismo adaptativo que permite ao organismo um aumento na demanda energética durante a exposição a fatores estressantes (Martinez e Cólus, 2002).

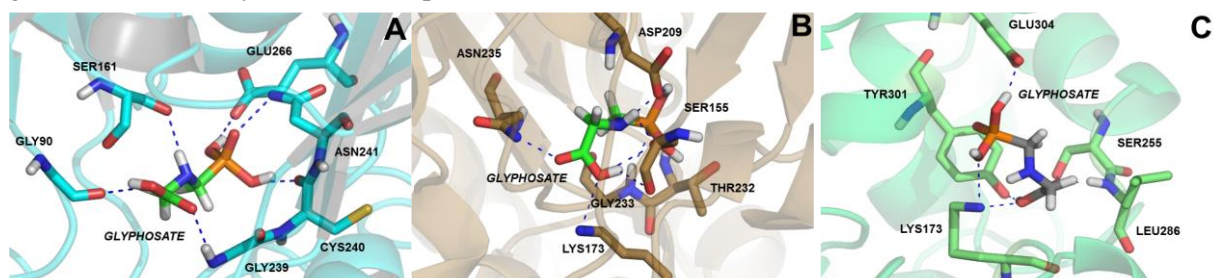
Como marcador metabólico foi definido medir neste trabalho a atividade da enzima hexoquinase, responsável pela introdução da glicose no metabolismo energético, sendo a primeira enzima da via glicolítica e responsável pela fosforilação da glicose que entra nas células. O uso de valores enzimáticos relativos à atividade da hexoquinase permite estabelecer correlações entre o uso da glicose como combustível metabólico. Os níveis da atividade enzimática da via glicolítica relativos à hexoquinase, foram utilizado por Bacila et al. (1989) para comparar o potencial glicolítico da musculatura cardíaca dos peixes *Notothenia coriiceps*, *N. rossii* e *Chaenocephalus aceratus*. A partir dos resultados observados no presente trabalho (figura 3C) verificou-se que os níveis de atividade desta enzima apresentam diferença significativa nos embriões expostos à concentração de Roundup® de 5 mg/L e 15 mg/L, quando comparados ao grupo controle.

Figura 3. (A) Dosagem de proteínas totais; (B) Dosagem dos níveis de glicose; (C) Atividade específica da enzima hexoquinase.



Nos resultados das interações no docking molecular realizados nos modelos Zfishglucok (figura 4A), ZfishHK1 (figura 4B), ZfishHK2 (figura 4C) com o ligante glifosato, pode-se concluir que os modelos propostos apresentam interações significativas quando comparadas às proteínas molde da glucoquinase e das hexoquinases I e II. Fato este, que nos demonstra que os modelos estão de acordo com o descrito na literatura. Essas interações significativas destes dockings corroboram com o resultado significativo encontrado no experimento realizado neste trabalho que foi a dosagem da atividade enzimática da hexoquinase (figura 3C), podendo assim, relatar a importância da prevenção na aplicação dos agrotóxicos como o Roundup® (Glifosato) para que não ocorra a contaminação de pessoas envolvidas, e acometendo principalmente em um melhor funcionamento da atividade de enzimas essenciais como a hexoquinase.

Figura 4. (A) Docking Molecular do modelo ZfishGlucok com ligante glifosato e as interações com os respectivos resíduos. (B) Docking Molecular do modelo ZfishHK1 com ligante glifosato e as interações com os respectivos resíduos. (C) Docking Molecular do modelo ZfishHK2 com ligante glifosato e as interações com os respectivos resíduos.



## CONCLUSÃO

Esta pesquisa destaca um resultado inédito de  $CL_{50}$  da concentração de 25 mg/L do agrotóxico Roundup® (Glifosato) na mortalidade do embrião de peixe zebra. Nos experimentos referentes ao metabolismo foram testados os níveis de proteínas totais, glicose do peixe-zebra e não houve diferenças significativas nos experimentos. Entretanto, na atividade enzimática da hexoquinase houve diferenças significativas nos embriões expostos a 5 mg/L e 15 mg/L. E os dockings da glucoquinase, hexoquinases I e II com o ligante glifosato apresentaram interações significativas, podendo assim, corroborar com o resultado encontrado no experimento bioquímico na atividade enzimática da hexoquinase.

## REFERÊNCIAS

- Ahsan, N.; Lee, D. G.; Lee, K. W.; Alam, I.; Lee, S. H.; Bahk, J.D.; Lee B. H. Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 46, n. 12, p. 1062-1070, 2008.
- Bacila, M.; Rosa, R.; Rodrigues, E. Fluoride inhibition of enolase from Antarctic organisms. *Pesquisa Antártica Brasileira*, v.1, n.1, p. 31 - 34. 1989.
- Bervald, C. M. P.; Mendes, C. R.; Timm, F. C.; Moraes, D. M.; Barros, A. C. S. A.; PESK, S. T. Desempenho fisiológico de sementes de soja de cultivares convencional e transgênica submetidas ao glifosato. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 32, n. 2. 2010.
- Ferraro, M. V. M.; Fenocchio, A. S.; Mantovani, M. S.; Ribeiro, C. O.; Cestari, M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology*, v. 27, n. 1, p. 103-107, 2004.
- Heath, A.G. *Water Pollution and Fish Physiology*. 2.ed. CRC/Lewis Publishers, Boca Raton , Florida. 1995. 342p.
- Lammer, E.; Carr, G. J.; Wendler, K.; Rawlings, J. M.; Belanger, S. E.; Braunbeck, T. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test. *Comparative Biochemistry and Physiology, Parte C*, v. 149, n. 2, p. 196-209, 2009.
- Martinez, C. B. R.; Cólus, I. M. S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: Medri M.; Bianchini E.; Shibatta O.; Pimenta J. (Org.). *A bacia do rio Tibagi*. Londrina: MC Gráfica, p. 551-577. 2002.
- Moon, T. W.; Johnston, I. A. Amino acid transport and interconversions in tissue of freshly caught and food-deprived plaice, *Pleuronectes platessa* L. *Journal of Fish Biology*, v. 19, n. 6, p. 653-663. 1981.
- Selderslaghs, I. W.; Van Rompay, A. R.; De Coen, W.; Witters, H. E. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reproductive Toxicology*, v. 28, n. 3, p. 308-320, 2009.
- Silva, S. C. T. Avaliação Ecotoxicológica de efluentes têxteis: uma aplicação dos bioensaios de toxicidade aquática. Natal: CEFET/RN, 2007. 114f. Monografia (Curso Superior em Meio Ambiente).
- Westerfield, M. *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*, Institute of Neuroscience. University of Oregon. 1995.
- Winata, C. L.; Korzh, S.; Kondrychyn, I.; Zheng, W.; Korzh, V.; Gong, Z. Development of zebrafish swimbladder: the requirement of Hedgehog signaling in specification and organization of the three tissue layers. *Developmental Biology*, v. 331, n. 2, p. 222-236, 2009.
- World Health Organization (WHO). Glyphosate. *Environmental Health Criteria*. Publication Nº 159, 1994. 177p.