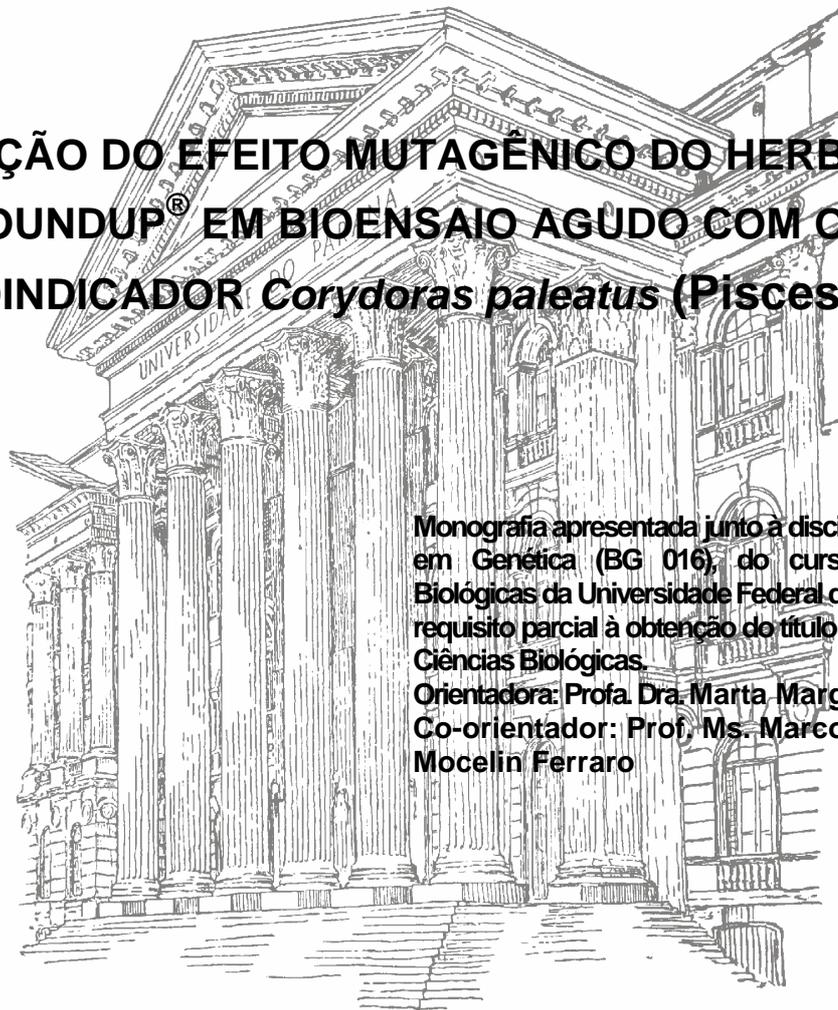


**NÉDIA DE CASTILHOS GHISI**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO MUTAGÊNICO DO HERBICIDA  
ROUNDUP® EM BIOENSAIO AGUDO COM O  
BIOINDICADOR *Corydoras paleatus* (Pisces).**



Monografia apresentada junto à disciplina de Estágio em Genética (BG 016), do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Margarete Cestari

Co-orientador: Prof. Ms. Marcos Vinícius Mocelin Ferraro

**CURITIBA  
2007**

**NÉDIA DE CASTILHOS GHISI**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO MUTAGÊNICO DO HERBICIDA ROUNDUP® EM BIOENSAIO  
AGUDO COM O BIOINDICADOR *Corydoras paleatus* (Pisces).**

Monografia apresentada junto à disciplina de Estágio em Genética (BG 016), do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: **Profa. Dra. Marta Margarete Cestari**

**Co-orientador:** Prof. Ms. Marcos Vinícius Ferraro

**CURITIBA  
2007**

Dedico este trabalho a meu pai, cujo único erro neste mundo foi ter deixado essa vida....

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Marta Margarete Cestari por seu incentivo, confiança, ensinamentos, apoio e ajuda, além da sua paciência e amizade.

Ao meu co-orientador Marcos por sua tão valiosa amizade, seu bom humor apesar de todas as dificuldades que todos com certeza enfrentam nessa vida, além de toda colaboração nas coletas.

A também minha banca Wanessa, por toda sua ajuda e paciência, pelo auxílio com as estatísticas do trabalho, e pelos convites de bar e DGG.

Aos funcionários do Parque Costa e da Fazenda Canguiri, que permitiram a realização das coletas.

Aos meninos do laboratório de citogenética animal e mutagênese ambiental, simplesmente indispensáveis nas coletas Marcos, Rafael, Felipe, Luis Fernando, Luís Felipe, e um especial para o Laércio, minhas sinceras desculpas pela água fria. E aqueles meus amigos do laboratório que não puderam prestigiar a oportunidade das coletas, mas que mesmo assim me apoiaram: Wanessa, Cristina, Ana Paula, Thais, Taynah, pois todos, conforme sua assiduidade, sempre animam o laboratório.

A minha família toda, sem excluir nenhum, pois todos deram muito apoio nos momentos que precisei, não me deixando desistir.

A minha mãe e minha irmã, fortes guerreiras que eu amo.

Ao professor Ives. A Luis Fernando Dubok, pela atenção e dicas.

Um especial para Elton Celton de Oliveira, por me apoiar, auxiliar e aturar nos momentos de estresse, você tem sido maravilhoso...

A Acione Francisca Moreira, que tem sido uma mãe pra mim aqui.

Aos meus eternos amigos e amigos que tantos me apoiaram, eu digo que aqui faltariam páginas para agradecê-los.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“SE NAQUELE INSTANTE CAÍSSE NA TERRA UM HABITANTE DE MARTE, HAVIA DE FICAR EMBASBACADO AO VERIFICAR QUE EM UM DIA TÃO MARAVILHOSAMENTE BELO E MACIO, DE SOL TÃO DOURADO, OS HOMENS EM SUA MAIORIA ESTAVAM METIDOS EM ESCRITÓRIOS, OFICINAS, FÁBRICAS... E SE PERGUNTASSE A QUALQUER UM DELES: ‘HOMEM, PORQUE TRABALHAS COM TANTA FÚRIA DURANTE TODAS AS HORAS DE SOL?’ - OUVIRIA ESTA RESPOSTA SINGULAR: ‘PARA GANHAR A VIDA’... E NO ENTANTO A VIDA ALI ESTAVA A SE OFERECER TODA, NUMA GRATUIDADE MILAGROSA. OS HOMENS VIVIAM TÃO OFUSCADOS POR DESEJOS AMBICIOSOS QUE NEM SE DAVAM POR CONTA DELA. NEM COM TODAS AS CONQUISTAS DA INTELIGÊNCIA TINHAM DESCOBERTO UM MEIO DE TRABALHAR MENOS E VIVER MAIS. AGITAVAM-SE NA TERRA E NÃO SE CONHECIAM UNS AOS OUTROS, NÃO SE AMAVAM COMO DEVIAM. A COMPETIÇÃO OS TRANSFORMOU EM INIMIGOS. E HAVIA MUITOS SÉCULOS, TINHAM CRUCIFICADO UM PROFETA QUE SE ESFORÇAVA POR LHES MOSTRAR QUE ELES ERAM IRMÃOS, APENAS E SEMPRE IRMÃOS”  
(ÉRICO VERÍSSIMO)

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1 Biomonitoramento de Poluição Ambiental, Bioensaio e Biomarcadores</b> .....	2
<b>1.2 Caracterização do Agrotóxico/ Defensivo Agrícola Roundup</b> .....	3
<b>1.3 História do Glifosato E Propriedades Gerais de Controle de Pragas</b> .....	3
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	7
<b>2.1 Teste do Micronúcleo Písceo</b> .....	7
<b>2.2 Ensaio Cometa</b> .....	7
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	10
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	10
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	10
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	11
<b>4.1. Organismo utilizado</b> .....	11
<b>4.2 Métodos</b> .....	12
<b>4.2.1 Bioensaio</b> .....	12
<b>4.2.2 Teste do Micronúcleo Písceo</b> .....	12
<b>4.2.3 Ensaio Cometa</b> .....	13
<b>4.2.4 Análise Estatística</b> .....	15
<b>5. RESULTADOS</b> .....	17
<b>6. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES</b> .....	23
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	28

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Em a) fórmula do glifosato N-(fosfonometil) glicina; b) sal de glifosato isopropilamina (Cox, 1999)..... 4
- Figura 2.** Mecanismo de ação do glifosato em plantas. O glifosato inibe a síntese de aminoácidos essenciais pela inibição competitiva da enzima enolpiruvilshiquimato fosfato sintase (EPSPS); o chiquimato está destacado. WILLIAMS, 2000, com alterações..... 5
- Figura 3.** Um modelo simplificado para degradação do glifosato no ambiente terrestre, segundo Williams, 2000..... 6
- Figura 4.** Ilustração de *Corydoras paleatus* mostrando uma fêmea e um macho. Fonte: <gcmsite.yaroslavl.ru/aqua/aqua16.htm> acessado em 30/05/2007..... 11
- Figura 5.** Diferentes classes de dano observadas no ensaio cometa ao microscópio com lente de imersão; a= dano zero; b= dano 1; c= dano 2; d= dano 3; e= dano 4, possivelmente em apoptose..... 15
- Figura 6.** Foto mostrando algumas das alterações morfológicas nucleares encontradas nas lâminas de esfregaço sanguíneo, obtidas ao microscópio de captura, usando a objetiva de imersão. As setas vermelhas indicam malformações, enquanto as setas azuis indicam células com núcleos normais..... 18
- Figura 7:** Comparação das taxas de dano apresentada pelos diferentes tratamentos com base na média, no teste do MNP. SE= Erro padrão; SD= Desvio padrão; Mean=Média..... 19
- Figura 8:** Comparação das taxas de dano apresentada pelos diferentes tratamentos com base na mediana, no teste de MNP..... 19
- Figura 9:** Comparação das taxas de dano apresentada pelos diferentes tratamentos com base na média, pelo ensaio cometa de sangue. SE= Erro padrão; SD= Desvio padrão; Mean=Média..... 20
- Figura 10:** Comparação das taxas de dano apresentada pelos diferentes tratamentos com base na mediana, pelo ensaio cometa de sangue..... 20
- Figura 11:** Comparação das taxas de dano apresentada pelos diferentes tratamentos com base na média, pelo ensaio cometa de fígado. SE= Erro padrão; SD = Desvio padrão; Mean=Média..... 21
- Figura 12:** Comparação das taxas de dano apresentada pelos diferentes tratamentos com base na mediana, pelo ensaio cometa de fígado..... 21

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Relação entre dano e tempo de exposição ao contaminantes, através dos dados obtidos pelos três biomarcadores utilizados, com seus respectivos valores para média mais ou menos desvio padrão, mediana e primeiro e terceiro quartis (25% e 75%).....	22
---	----

## RESUMO

O Roundup® é um herbicida sistêmico não seletivo a base de glifosato. Descritos pelos fabricantes como pesticidas de “baixa toxicidade e boa compatibilidade ambiental”, os herbicidas à base de glifosato representam um bálamo quando se trata da vegetação indesejada. Além disso, a criação de transgênicos resistentes a Roundup contribui não só para o aumento da produção agrícola, mas também pode resultar em mais resíduos de glifosato que podem ser bioacumulados ao longo da cadeia trófica, podendo afetar animais e, entre eles os humanos. Utilizou-se como bioindicador o peixe *Corydoras paleatus*, original da Bacia do Rio Amazonas e amplamente distribuído no Sul do Brasil. Seu destaque deve-se à sua característica ruderal nativa, se distribuindo em regiões com forte interferência humana, como áreas de agricultura intensiva e relacionadas à piscicultura, apresentando valor comercial como peixe ornamental. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito genotóxico da exposição de exemplares de *Corydoras paleatus* ao Roundup®, utilizando-se como biomarcadores as técnicas do Ensaio Cometa de eritrócitos e hepatócitos e o Micronúcleo Písceo de eritrócitos (MNP). Os peixes foram expostos à água contaminada em concentração de Roundup  $6,67 \cdot 10^{-3}$  l/l (0,00667ml/l) por períodos de 3, 6 e 9 dias, e um grupo controle foi exposto somente a água destilada. O MNP mostrou não haver diferença significativa entre os controles e os grupos contaminados; a despeito disso, o ensaio cometa de sangue revelou diferença significativa entre o grupo controle quando comparado aos contaminados com cada um dos diferentes tempos de exposição; e Ensaio Cometa com células do fígado também revelou diferença entre o grupo controle e os três tratamentos. O potencial genotóxico do Roundup deveras tem apresentado resultados inconsistentes e muitas vezes controversos, e, apesar de cada método de teste ter suas vantagens, nenhum é universal. Sugere-se afinal que sejam feitos estudos mais aprofundados sobre a biologia de *Corydoras paleatus*, seu comportamento, sua taxa metabólica e as respostas mais específicas de cada tecido a contaminação. Seria válida também a avaliação de danos diários aos animais, e com no mínimo três concentrações para avaliar a formação de alguma tendência na comparação de dias, danos e concentrações.

## 1. INTRODUÇÃO

Apenas uma pequena parcela das muitas substâncias químicas artificiais produzidas pelo homem e lançadas ao meio já foram estudadas quanto aos seus efeitos nos seres vivos (FERRARO, 2003). Em se tratando de defensivos agrícolas, mais comumente chamados pesticidas, mais de 2,5 milhões de toneladas são aplicados na prática agrícola a cada ano ao redor do mundo (VAN DER WERF, 1996). Pesticidas tendem a ser compostos muito reativos que podem formar ligações covalentes com vários centros neofílicos das biomoléculas celulares, incluindo o DNA (CROSBY, 1982).

Muitos produtos químicos manufaturados usados para matar pragas tornaram-se importantes poluentes ambientais. Os pesticidas mais poluentes são aqueles usados para controlar as pragas e ervas daninhas que danificam as lavouras, hortas e silviculturas ou para matar pragas que transmitem doenças. Todos são pulverizados ou liberados sobre as áreas onde as pragas vivem e somente uma porção muito pequena atinge o alvo - a maior parte cai sobre a plantação (residente) ou sobre o solo nu. Tais pesticidas são, portanto usados em quantidades muito maiores do que as necessárias. Os herbicidas em especial, são usados em quantidades muito grandes e em escala global, inclusive por terem um menor custo quando comparado aos inseticidas e fungicidas (TOWNSEND *et al.*, 2006).

Os herbicidas são no geral ativos contra pragas vegetais e, quando usados em padrões comerciais, parecem ter poucos efeitos significativos sobre os animais. A poluição do ambiente por herbicidas não tem despertado a mesma ira que os inseticidas. Contudo os conservacionistas se preocupam com a perda de muitas espécies de “ervas daninhas”, que são hospedeiras tróficas, lagartas de borboletas e outros insetos e cujas sementes servem de alimento a muitas aves (TOWNSEND *et al.*, 2006).

Um avanço recente da ciência tem sido a modificação genética das espécies, tais como a soja, para produzir resistência ao herbicida não-seletivo glifosato; nessas variedades é introduzido o gene EPSP de alta expressão, que modifica o perfil de utilização desse herbicida. O glifosato desta maneira pode ser usado – de acordo com a classificação pela época de aplicação – tanto como herbicida pré-emergente (antes do desenvolvimento da cultura) quanto pós-emergente (depois do desenvolvimento da cultura) (GRISOLIA, 2005). Quando essas culturas especiais são semeadas, o agricultor pode usar o glifosato para eliminar todas as espécies de ervas daninhas dentro da plantação, uma estratégia que é particularmente preocupante para os conservacionistas, pois remove até as espécies menos representativas que não comprometeriam a produtividade da lavoura (TOWNSEND *et al.*, 2006).

Assim, pesticidas, incluindo herbicidas, inseticidas e fungicidas são usados amplamente para melhorar a produção agrícola e, como resultado, acumulam-se no ambiente (VAN DER WERF, 1996). Com muitas dessas substâncias chegando ao ambiente, em especial no aquático, onde elas, via de regra, mais se concentram, é natural pensar que algumas delas possam estar se fixando nos indivíduos que compõem as cadeias alimentares (FERRARO, 2003). Devido a sua atividade biológica, o uso de pesticidas pode causar efeitos danosos à saúde humana. Por conseguinte, a indução de danos ao DNA pode levar a reações reprodutivas adversas, a indução de câncer e muitas outras doenças crônicas (DIMITROV *et al.*, 2006).

### **1.1 Biomonitoramento de Poluição Ambiental, Bioensaio e Biomarcadores**

Para melhor se entender sobre a ação tóxica de contaminantes, pode-se trabalhar com experimentos laboratoriais, chamados bioensaios, ou através de estudos no campo, os biomonitoramentos. Os experimentos laboratoriais são utilizados para a obtenção de dados e padronização de metodologias e permitem prever e/ou avaliar efeitos de um dado xenobionte, em determinada concentração ou dosagem, em determinada espécie. Apesar de serem gerados dados complementares, deve-se atentar para o fato de que nem sempre os dados gerados sob condições experimentais podem ser intimamente relacionados com o ambiente natural.

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse sobre a genotoxicidade de águas e sedimentos. Águas e sedimentos podem ter sua genotoxicidade testada em condições laboratoriais usando sistemas biológicos como bactérias, leveduras e plantas. Interesses também têm sido focados em testes de laboratório usando organismos aquáticos como moluscos, anfíbios e peixes (MINISSI *et al.*, 1996).

Os peixes são indicados para bioensaios e biomonitoramentos, assim como mamíferos, pois podem sofrer bioacumulação, estão aptos a responder a agentes mutagênicos em baixas concentrações e são capazes de ativar o sistema enzimático do citocromo P450, um sistema de enzimas monoxigenases com o grupo heme e com diferentes especificidades por substrato. Estas enzimas desempenham um papel fundamental no metabolismo de substâncias xenobióticas e de compostos endógenos (GOKSOYR *et al.*, 1991).

Estudos sobre a toxicidade de substâncias e elementos químicos se revestem de grande importância, pois permitem determinar as respostas de um dado organismo à contaminação, permitindo avaliar o impacto e o efeito destes sobre células, tecidos e órgãos bem como inferir sobre possíveis perturbações metabólicas (PANDRANGI *et al.*, 1995).

Muitos biomarcadores têm sido utilizados como ferramentas para a detecção de exposição e para avaliação dos efeitos de poluição genotóxica. Esses biomarcadores incluem testes como avaliação de aberrações cromossômicas, adutos e quebras no DNA e medição da frequência de micronúcleo e outras anomalias nucleares (BOMBAIL *et al.*, 2001).

O uso de bioensaios permite estudar os efeitos tóxicos de determinados contaminantes de forma isolada ou associados, minimizando a influência de diferentes variáveis ambientais. Os resultados obtidos através de bioensaios não podem ser extrapolados diretamente para o ambiente, mas podem cooperar no fornecimento de uma base de dados que venham a ajudar a entender os fatores que estão interferindo na saúde dos organismos e/ou alterando as condições do próprio ambiente.

## **1.2 Caracterização do Agrotóxico/ Defensivo Agrícola Roundup**

O Roundup® é um herbicida sistêmico não seletivo que traz como principal ingrediente o glifosato (N-(fosfometil) glicina,  $C_3H_8NO_5P$ ). O glifosato (glicina + fosfato) é um aminofosfonato análogo ao aminoácido natural glicina, que ocupa o lugar desta na síntese protéica. Descritos pelos fabricantes como pesticidas de “baixa toxicidade e boa compatibilidade ambiental”, os herbicidas à base de glifosato representam um bálsamo quando se trata da vegetação indesejada.

O uso do glifosato nas lavouras aumenta a uma taxa anual de 20% ao ano, basicamente devido a recente introdução de culturas geneticamente modificadas para tolerar o herbicida (COX,1998). O advento de biotecnologia para desenvolvimento de plantas resistentes a glifosato contribui para eficiência da produção agrícola, embora seja público o interesse sobre os riscos ecológicos, a segurança e a saúde pelo uso de produtos dessas colheitas transgênicas (CONNERS & JACOBS, 1999).

A criação de transgênicos resistentes a Roundup, além de contribuir para o aumento da produção agrícola, também pode resultar em mais resíduos de glifosato aos quais animais, entre eles os humanos estarão expostos pela alimentação ou outras vias (BRAKE & EVERSON, 2004).

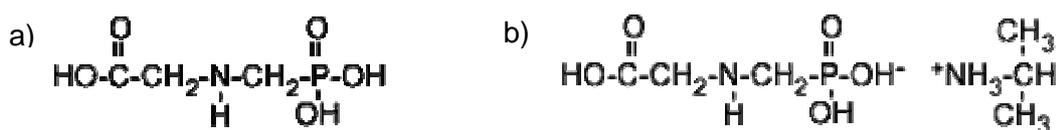
## **1.3 História do Glifosato e Propriedades Gerais de Controle de Pragas**

As propriedades herbicidas do glifosato foram descobertas pelos cientistas da Monsanto Company em 1970 (WILLIAMS *et al.*, 2000) e no ano seguinte foi patenteado pela Companhia sob o nome comercial de Roundup (SMITH & OEHME, 1992).

O herbicida Roundup foi primeiramente introduzido em 1974 para o controle não seletivo de ervas daninhas (FRANZ *et al.*, 1997). Durante os últimos 25 anos de uso

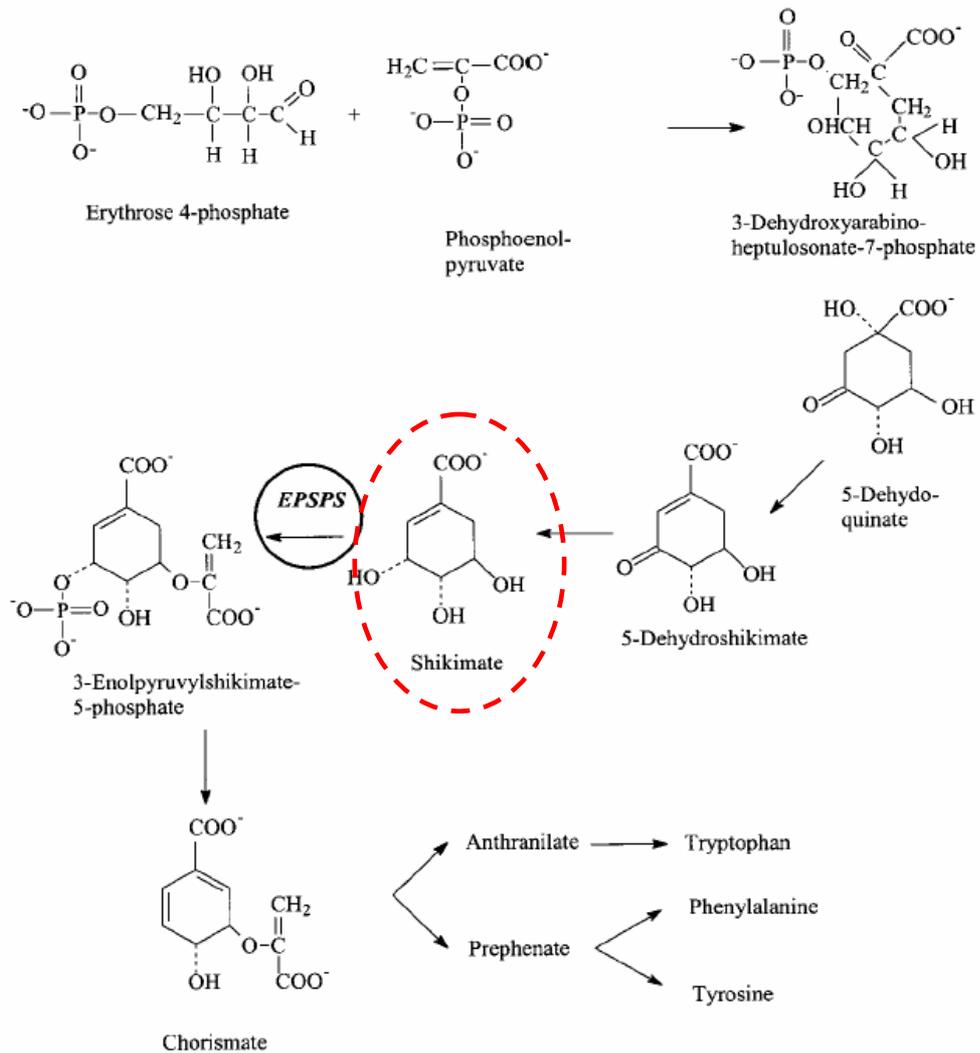
comercial, produtores, pesquisadores da agricultura e aplicadores comerciais, trabalhando em conjunto com a Monsanto Company, têm expandido os usos do Roundup. O uso de glifosato na agricultura continua a se expandir particularmente em aplicações envolvendo variedades de plantas geneticamente modificadas para tolerância ao tratamento com glifosato (Roundup-Ready). Atualmente, uma variedade de formulações baseadas em glifosato tal qual Roundup são registradas em mais de 100 países e estão disponíveis sob diferentes marcas, mas a Monsanto continua a ser a maior fornecedora comercial de glifosato e suas formulações por todo o mundo (WILLIAMS *et al.*, 2000).

O glifosato (figura 1) como um herbicida sistêmico, não seletivo, é aplicado em pós-emergência e inibe o crescimento de plantas daninhas e cultivadas. Uma vez na planta esse herbicida interfere com a biossíntese de três aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) mediante inibição da atividade da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), enzima-chave na rota do shiquimato ou ácido chiquímico.



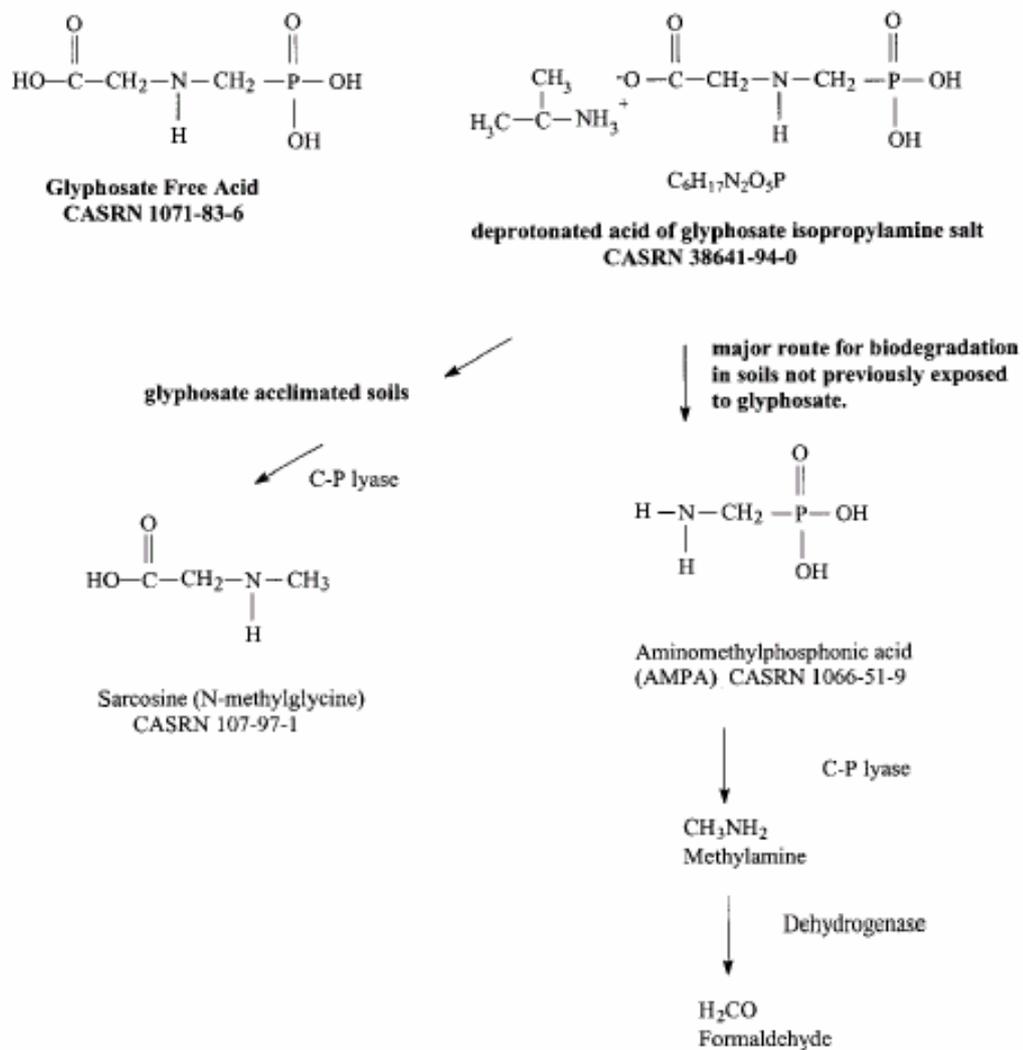
**Figura 2.** Em a) fórmula do glifosato N-(fosfonometil) glicina; b) sal de glifosato isopropilamina (Cox, 1999).

A rota do ácido chiquímico converte precursores de carboidratos derivados da glicólise e da rota da pentose fosfato em aminoácidos aromáticos. Um dos intermediários dessa rota é o ácido chiquímico que dá nome a essa seqüência de reações. O glifosato mata os vegetais por bloquear uma etapa desta rota metabólica (figura 2). A rota do ácido chiquímico está presente em plantas, fungos e bactérias, mas não é compartilhada por membros do reino animal, que não podem sintetizar aqueles três aminoácidos aromáticos, que são, portanto nutrientes essenciais na sua dieta (TAIZ & ZEIGER, 2004), isso faz o bloqueio dessa rota um inibidor efetivo da biossíntese de aminoácidos exclusivo para plantas (WILLIAMS *et al.*, 2000).



**Figura. 2.** Mecanismo de ação do glifosato em plantas. O glifosato inibe a síntese de aminoácidos essenciais pela inibição competitiva da enzima enolpiruvilshiquimato fosfato sintase (EPSPS); o chiquimato está destacado. WILLIAMS, 2000, com alterações.

O glifosato expressa sua ação herbicida mais efetivamente através do contato direto com a folhagem e subsequente translocação para todas as partes da planta. A entrada via sistema radicular é insignificante em plantas terrestres. O glifosato é predominantemente degradado no ambiente terrestre (figura 3) por microorganismos e através de algum metabolismo limitado nas plantas (WILLIAMS *et al.*, 2000; SMITH & OEHME, 1992).



**Figura. 3.** Um modelo simplificado para degradação do glifosato no ambiente terrestre, segundo Williams, 2000.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Teste do Micronúcleo Písceo**

Existe grande quantidade de químicos mutagênicos com alta probabilidade de induzir efeitos carcinogênicos em várias espécies de peixes (MINISSI *et al.*, 1996).

O teste do micronúcleo tem sido usado para estimar o nível de exposição aos contaminantes em muitas pesquisas, desde os anos 80, inicialmente com camundongos e mais tarde adaptado a peixes. Esse teste mede o dano cromossômico estrutural ou numérico e tem sido usado para avaliar genotoxicidade, sendo um indicador recomendado para estudos ambientais tanto em condições laboratoriais como no campo (BELPAEME *et al.*, 1998).

Existem vários ensaios de mutagenicidade e o teste do micronúcleo tem sido aplicado com sucesso por se tratar de um ensaio simples, seguro e sensível, e por não depender da característica cariotípica do animal em estudo (MINISSI *et al.*, 1996), pois a maioria dos peixes possui um número relativamente grande de pequenos cromossomos o que dificulta a sua visualização (HOOFTMAN & VINK, 1981). Quando eritrócitos de peixes são usados também não há consumo excessivo de tempo e não há sofrimento dos animais. Por estas razões, o teste do micronúcleo em eritrócitos de peixes tem se mostrado uma técnica promissora em investigações de mutagênese com causas ambientais (AL-SABTI & METCALFE, 1995).

A avaliação das alterações morfológicas nucleares e os micronúcleos são ensaios que têm sido bastante utilizados para investigação de efeitos genotóxicos de poluentes ambientais em peixes (AL-SABTI, 1986). Micronúcleos são cromossomos inteiros ou parciais que não foram incorporados dentro do núcleo da célula filha durante a divisão celular e que aparecem como uma pequena estrutura arredondada e escura, idêntico em aparência ao núcleo celular. Do mesmo modo, podem ocorrer alterações nucleares, formadas quando determinada quantidade de material fica levemente atrasada na mitose fazendo com que o núcleo resultante não seja oval, mas apresente uma saliência de cromatina (BOMBAIL *et al.*, 2001).

As alterações morfológicas nucleares têm sido interpretadas como lesões nucleares análogas aos micronúcleos. Os resultados de AYLLON & GARCIA-VAZQUEZ (2000) mostraram que essas anomalias são induzidas por compostos genotóxicos bem-conhecidos, mesmo quando os micronúcleos não foram induzidos.

### **2.2 Ensaio Cometa**

Nos últimos anos, tem crescido o interesse científico no ensaio cometa para demonstrar danos no DNA induzidos por contaminantes (BELPAEME *et al.*, 1998). O ensaio investiga danos no DNA (simples, dupla-fita) em nível celular individual, através da medição da migração em gel do material genético de células, depois de uma corrida eletroforética (SINGH *et al.*, 1988). O nome cometa refere-se à formação de uma longa cauda com os fragmentos de DNA, deixados após a passagem da corrente elétrica (BOMBAIL *et al.*, 2001).

O consenso geral atual é que o ensaio é simples, rápido e sensível. Contudo, uma das maiores críticas referentes a esta técnica é que a ocorrência de quebras no DNA não pode ser atribuída a uma exposição específica (BELPAEME *et al.*, 1998).

São necessários métodos sensíveis adequados para se avaliar o impacto crônico de contaminantes nos organismos. O princípio desta técnica se baseia no fato de que o DNA da célula que não tiver dano migrará de forma homogênea formando um círculo. Caso o DNA pesquisado tenha dano, serão formadas quebras no material genético e/ou conseqüentes fragmentos de diversos tamanhos, de modo que na eletroforese, os fragmentos menores migram mais rapidamente em relação aos fragmentos maiores. Ocorrendo um dano intenso no material celular, muitos fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, originando a figura típica de um cometa (OLIVE *et al.*, 1990).

Várias publicações recentes corroboram a eficácia do ensaio cometa em detectar danos ao DNA de peixes, por diferentes mutagênicos, mas as respostas podem ser variáveis, de acordo com as condições experimentais, com a espécie alvo, com o tipo de célula, a classe de mutagênico e o tempo de exposição a este (BELPAEME *et al.*, 1998).

O ensaio cometa pode ser uma ferramenta interessante para monitoramentos na demonstração de genotoxicidade de exposições e para investigar os impactos na integridade do dano no DNA, reparo e recuperação em espécies de interesse ambiental. Nesse sentido, três principais vantagens foram identificadas: (i) qualquer tipo de tecido com células nucleadas pode ser usado, (ii) são necessárias pequenas quantidades de amostras, (iii) o ensaio é rápido, sensível e barato (BELPAEME *et al.*, 1998).

O ensaio cometa é habitualmente realizado com eritrócitos, pois estes são facilmente obtidos por métodos não destrutivos e não necessitam do passo adicional de isolamento celular, porém outros tecidos também têm sido testados, pois os efeitos de genotoxicidade de contaminantes podem ser muitas vezes tecido-específicos. Pesquisas realizadas com o mutagênico EMS (etilmetanosulfato) mostraram resultados significantes para diferentes tecidos com o ensaio cometa, mostrando que sangue, fígado, brânquias e rim são sensíveis a essa substância. Os diferentes tecidos mostraram um padrão de resposta similar nos

experimentos realizados, porém foram realizadas as seguintes constatações: maior sensibilidade em células de brânquias, as respostas das células do fígado foram sempre as menores e não foi observada tendência clara em células do rim (BELPAEME *et al.*, 1998).

Como o ensaio cometa analisa as células individualmente, existe certa limitação no sentido de separá-las, para tanto devem ser utilizados os processos de fragmentação ou a aplicação de enzimas quando se trata de tecidos mais compactos do que o sanguíneo. No caso de células sanguíneas estas podem ser diluídas em soro bovino fetal ou em solução fisiológica.

Uma vez que substâncias genotóxicas são freqüentemente tecido-específicas, a vantagem do ensaio cometa torna-se evidente, por permitir avaliar os danos do contaminante sobre um dado tecido (SASAKI *et al.*, 1997b).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos da genotoxicidade aguda utilizando o herbicida Roundup® em bioensaios semi-estáticos com a espécie *Corydoras paleatus*.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Verificar as frequências de micronúcleos e de alterações morfológicas nucleares em hemácias periféricas através do teste do micronúcleo písceo (MNP);
- Realizar o ensaio cometa em células sanguíneas e em células do tecido hepático, e comparar os resultados obtidos;
- Fazer comparação entre os diferentes tempos de exposições;

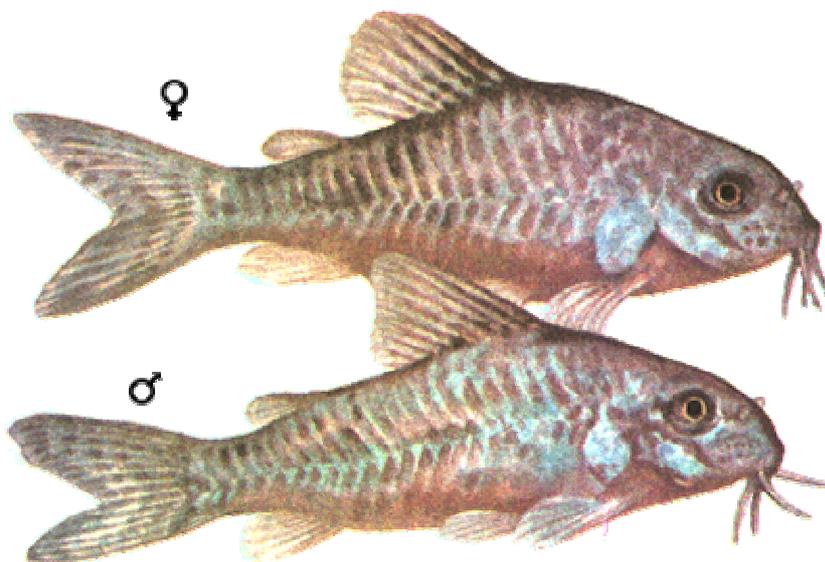
## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Organismo utilizado

*Corydoras paleatus* foi a espécie bioindicadora utilizada devido sua notável resistência a enfermidades e grande capacidade de adaptação a diferentes qualidades de água; além disso, é um peixe muito comum em rios ou lagos do sul e sudeste do Brasil e norte da Argentina, regiões com fortes interferências antrópicas, onde agriculturas intensivas e atividades de piscicultura são comuns.

Tratando-se de uma espécie de pequeno porte e de fácil manutenção em laboratório, *C. paleatus* são comedores oportunistas com preferência por larvas de dípteras e microcrustáceos não-planctônicos, o que indica que essa espécie alimenta-se próximo ao fundo. Conseqüentemente, peixes como *C. paleatus* podem absorver pesticidas não somente da água, mas também do alimento. *Corydoras paleatus* (Jenyns, 1842) foi coletada pela primeira vez por Charles Darwin em localidade não indicada.

Os animais foram obtidos de diferentes locais: no tanque do Laboratório de Mutagênese localizado na Fazenda Experimental do Canguiri da Universidade Federal do Paraná (situada no município de Pinhais, a 20 km de Curitiba - PR), no Parque Ecológico Costa, bairro Umbará em Curitiba, e em um Pet Shop. Todos rigorosamente passaram por um tempo de aclimação em laboratório antes de serem submetidos aos testes.



**Figura 4.** Ilustração de *Corydoras paleatus* mostrando uma fêmea e um macho. Fonte: <gcmsite.yaroslavl.ru/aqua/aqua16.htm> acessado em 30/05/2007.

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Bioensaio**

O bioensaio foi realizado em aquários contendo 18 litros, onde se diluiu o contaminante. Foram testados diferentes tempos de exposição (3, 6 e 9 dias), na concentração de Roundup em relação ao solvente de  $[6,67 \cdot 10^{-3} \text{ l/l}$  ou  $(0,00667 \text{ ml/l})$ ], em bioensaios semi-estáticos (com renovação de água a cada 48 horas). Cada grupo teria 20 exemplares, inclusive o controle, que foi exposto somente à água destilada. Seriam, então, quatro grupos (controle, 3 dias, 6 dias e 9 dias) somando um total de 80 indivíduos.

### **4.2.2 Teste do Micronúcleo Píscico**

A fim de se verificar a frequência de micronúcleos em hemácias periféricas, foi empregada a técnica descrita por HEDDLE (1973) e SCHMID (1975), com algumas modificações. A técnica aplicada consistiu das etapas:

- a) Lâminas bem limpas foram identificadas.
- b) O peixe foi anestesiado com benzocaína na concentração de 20%
- c) O sangue de cada animal foi coletado por punção cardíaca com seringa de insulina nova e heparinizada, uma gota sendo pingada na superfície da lâmina.
- d) Com o auxílio de uma lamínula, fez-se um esfregaço, espalhando o sangue sobre a superfície da lâmina.
- e) As lâminas, após secagem ao ar, foram fixadas em etanol 96% por 30 minutos em cubetas.
- f) As lâminas foram coradas com Giemsa 10% diluída em tampão fosfato (pH 8,6) por 10 minutos.
- g) A análise das lâminas fez-se varrendo aleatoriamente as mesmas até a contagem de 2000 células de cada animal. Na análise, foram consideradas somente hemácias nucleadas com membranas nuclear e citoplasmática intactas, sendo consideradas como micronúcleos as partículas que em relação ao núcleo principal: não excederem 1/3 do seu tamanho, estivessem nitidamente separadas, com bordas distinguíveis e com mesma cor e refringência do núcleo. As alterações na forma elíptica normal dos núcleos das hemácias que não se enquadraram no conceito de micronúcleo, mas que puderam ser descritas como alterações morfológicas nucleares segundo CARRASCO, TILBURY e MYERS (1990) também foram analisadas.

O teste do micronúcleo é frequentemente aplicado em conjunto com o teste do Cometa sob condições alcalinas ( $\text{pH} > 13$ ) e assim foi feito.



### 4.2.3 Ensaio Cometa

A técnica utilizada foi a descrita por SPEIT e HARTMANN (1999), com alterações conforme FERRARO, 2003. Antes da coleta do material para análise, foram preparadas as lâminas com cobertura de agarose e a agarose de baixo ponto de fusão (LMP) segundo as etapas descritas a seguir:

#### Preparação das lâminas com cobertura de agarose

- a) Foram dissolvidos 1,5 g de agarose normal em 100 ml de PBS em Erlenmeyer, com agitação por duas horas. Essa mistura foi então levada ao forno de microondas até sua fervura e completa dissolução.
- b) Após fervura, a agarose foi deixada em temperatura ambiente. Após a solidificação da agarose, esta foi picada e levada novamente ao forno de microondas. Essa etapa foi repetida mais uma vez. Ao final desse processo, a agarose foi mantida em banho-maria a 70°C.
- c) As lâminas, previamente limpas, foram então mergulhadas na agarose aquecida, sendo que, o lado da lâmina contendo a porção não esmerilhada, limpo com um lenço de papel.
- d) As lâminas foram deixadas *overnight* em superfície plana e à temperatura ambiente para solidificar a cobertura de agarose.

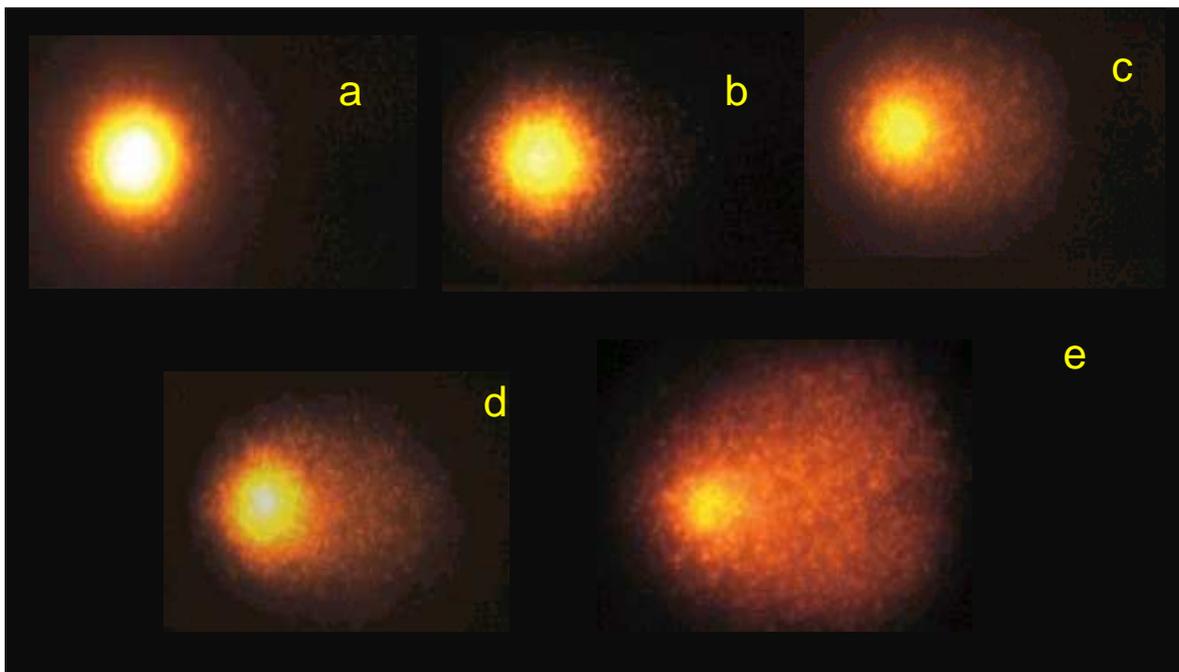
#### Preparação da agarose de baixo ponto de fusão (LMP)

- a) Foram dissolvidos 100 mg de agarose normal em 20 ml de PBS.
- b) Essa solução foi então levada para fervura em forno de microondas somente uma vez.
- c) A agarose foi mantida em geladeira até o momento do uso, quando foi então aquecida em banho-maria e mantida em 37°C.

### **Para Sangue (e estendida para Fígado)**

- a) Após o peixe anestesiado, o sangue foi obtido por punção cardíaca, com seringa heparinizada.
- b) O sangue coletado (aproximadamente 1ml) foi colocado em tubo de microcentrifuga do tipo ependorf, misturado com 1ml de PBS e mantido sob refrigeração e ao abrigo da luz até a montagem das lâminas. O fígado, por sua vez, foi retirado e colocado também num ependorfe contendo 1ml de PBS. Após, o fígado foi desagregado com duas pinças e fragmentado por sucção com uma seringa de vidro sem agulha. A partir daqui o fígado e o sangue receberam o mesmo tratamento.
- c) Da solução no ependorf, foram coletados 10 µl e misturados com 120 µl de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C).

- d) Esta suspensão celular foi então depositada sobre uma lâmina que já coberta com agarose.
- e) Após a deposição da mistura agarose LMP e suspensão celular sobre a lâmina, esta foi então coberta com uma lamínula e levada a geladeira por 15 minutos.
- f) Decorrido o tempo de refrigeração, as lamínulas foram gentilmente retiradas.
- g) As lâminas foram então acondicionadas em cubetas contendo solução de lise, até a eletroforese, no mínimo 60 minutos.
- h) Após o tempo de lise, as lâminas foram então transferidas para a cuba de eletroforese. A eletroforese foi realizada sob refrigeração e na ausência de luz, com uma solução de eletroforese com pH maior que 13.
- i) Antes do início da corrida eletroforética, as lâminas permaneceram na solução de eletroforese por 30 minutos para a desespiralização do DNA.
- j) Em seguida, a corrida de eletroforese foi iniciada a 25V e 300 mA por 25 minutos.
- l) Após o tempo de corrida, as lâminas foram retiradas da cuba e neutralizadas com um tampão de neutralização (pH 7,5) por 3 seções de 5 minutos cada.
- m) As lâminas foram fixadas em etanol 96% por 5 minutos.
- n) Para a coloração, foram adicionadas 20µl de brometo de etídeo em cada lâmina, que foi então coberta com lamínula e levada ao microscópio de epifluorescência com aumento de 400x.
- o) as lâminas foram randomicamente varridas, analisando-se 100 núcleos em cada lâmina; estes foram classificados de acordo com o dano, conforme o comprimento da cauda formada após a corrida eletroforética. A classificação dos núcleos (Fig. 5) foi realizada conforme as classes: 0 (sem dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano máximo) e 4 (núcleo em apoptose). Foi realizada a quantificação dos tipos de danos e a atribuição de escores em cada classe. Os escores foram obtidos através da multiplicação do número de cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe.



**Figura 5.** Diferentes classes de dano observadas no ensaio cometa ao microscópio com lente de imersão; a= dano zero; b= dano 1; c= dano 2; d= dano 3; e= dano 4, possivelmente em apoptose.

#### 4.2.4 Análise Estatística

Os cálculos aqui realizados não se fundamentam nas premissas de que: a distribuição de freqüências dos erros amostrais é normal; as variâncias são homogêneas; os efeitos dos fatores de variação são aditivos e os erros independentes. Por isso, nossa amostra não é aceitavelmente simétrica, e não possui um único ponto máximo centrado no intervalo de classe onde está a medida da distribuição, e conseqüentemente o histograma de freqüência não possui um contorno semelhante ao desenho em forma de sino da curva normal. Diante disto, os dados obtidos foram analisados com testes não paramétricos.

Os termos paramétrico e não-paramétrico referem-se à média e ao desvio-padrão, que são os parâmetros que definem as populações que apresentam distribuição normal. Toda essa argumentação foi feita porque se nota muitas vezes artigos científicos, além de trabalhos e teses acadêmicas, em que se usaram testes não-paramétricos, mas os resultados são apresentados em termos de média  $\pm$  desvio-padrão da distribuição, ou então em termos de média  $\pm$  erro-padrão da média, erro este que é também um valor calculado em função do desvio-padrão da amostra. Por isso, justifico desde já a apresentação de dois gráficos para cada ensaio, o primeiro, repetido de muitos trabalhos científicos, baseado na média e desvio padrão (o que não é o ideal para testes não paramétricos), e o segundo apropriado para os testes utilizados – baseado na mediana e primeiro e terceiro quartis.

A mediana é o número no centro de um conjunto de números; isto é, metade dos números possui valores que são maiores do que a mediana e a outra metade possui valores menores.

Os dados obtidos para o Teste de Micronúcleo Písceo e Alterações Morfológicas Nucleares, bem como para os Ensaio Cometa por não se distribuírem de acordo com a curva normal foram analisados com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (usado para mais de duas amostras independentes) através do programa BIOESTAT 2.0. O nível de significância considerado nas análises foi de 0,05. O programa Excell para Windows foi utilizado para o cálculo das medianas e quartis, bem como a média e desvio padrão. Para confecção dos gráficos *box-plot*, os dados foram plotados no programa estatístico STATISTIC 6.0.

## 5. RESULTADOS

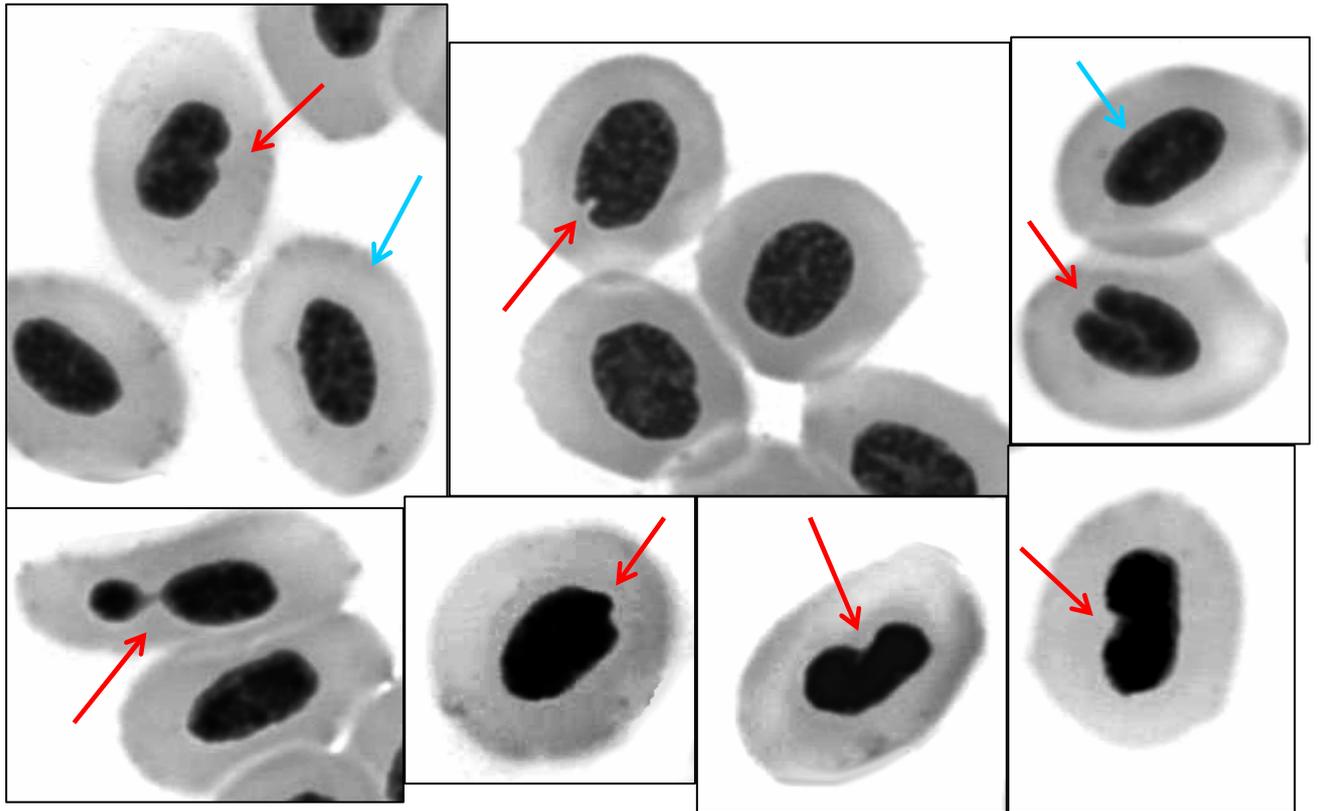
O glifosato foi testado como a mistura comercial complexa, de rótulo Roundup, por ser esta ser a forma como é aplicado na agricultura e conseqüentemente introduzido no ambiente.

Nas lâminas onde foram realizados os esfregaços sanguíneos analisaram-se 2000 células de cada indivíduo, observando-se a presença ou ausência das estruturas classicamente descritas como micronúcleos bem como as alterações morfológicas nucleares encontradas (figura 6). Os resultados obtidos dessa maneira foram então analisados através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, que mostrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os controles e os grupos contaminados com os tempos de 3, 6, e 9 dias ( $p=0,1662$ ,  $p=0,1053$  e  $p=0,4411$ , respectivamente). Não obstante, obteve-se significância entre os tempo de 3 e 6 dias de contaminação ( $p=0,0027$ ), este segundo apresentando maior taxa de danos; e entre 3 e 9 dias de contaminação ( $p=0,0299$ ), este último mostrou mais danos por sua vez. Os tempos de 6 e 9 dias não revelaram diferença estatística significativa ( $p=0,3848$ ) (figuras 7 e figura 8).

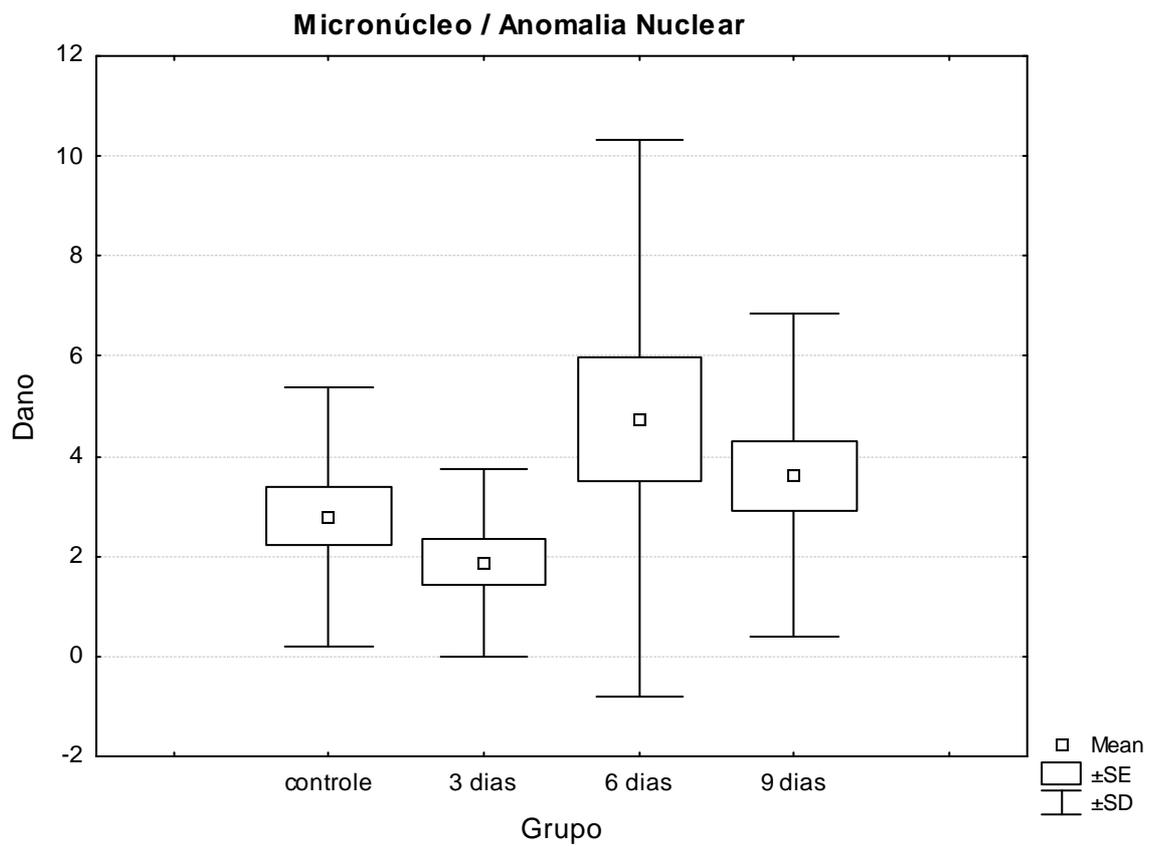
Os resultados obtidos pelo Ensaio Cometa de sangue revelaram diferença significativa entre o grupo controle em relação aos diferentes tempos de contaminação. Comparando-se os dados do controle com 3 dias de contaminação,  $p=0$ ; controle e 6 dias,  $p=0,0037$ ; e controle e 9 dias,  $p=0$ . O tempo de 3 dias mostrou maior dano que qualquer um dos outros grupos. Houve significância na comparação entre os grupos de 3 e 6 dias de contaminação ( $p=0,0133$ ), que não foi observada entre 3 e 9 dias ( $p=0,6627$ ) e 6 e 9 dias ( $p=0,0635$ ). A maior taxa de dano ocorreu em 3 e 9 dias, com decréscimo em 6 dias; sendo que, 3 e 9 dias apresentam taxas bem próximas, com o controle mostrando-se bem abaixo (figuras 9 e 10).

Pelo Ensaio Cometa de Fígado também revelou diferença entre o grupo controle e os três tratamentos, observando-se na comparação entre controle e 3 dias  $p = 0$ , entre controle e 6 dias  $p=0$ , e para controle e 9 dias  $p = 0,0005$ . Neste caso a diferença entre 3 e 6 dias não foi significativa em suas taxas de dano ( $p=0,7752$ ), mas ocorreu para a comparação entre 3 e 9 dias ( $p=0,0223$  sendo 3 dias mais danificado) e para 6 com 9 dias ( $p=0,01$  sendo 6 dias o de maior dano). Os gráficos do ensaio cometa com fígado denotam que 3 e 6 dias possuem taxas muito próximas, que decresce em 9 dias ( figuras 11 e 12).

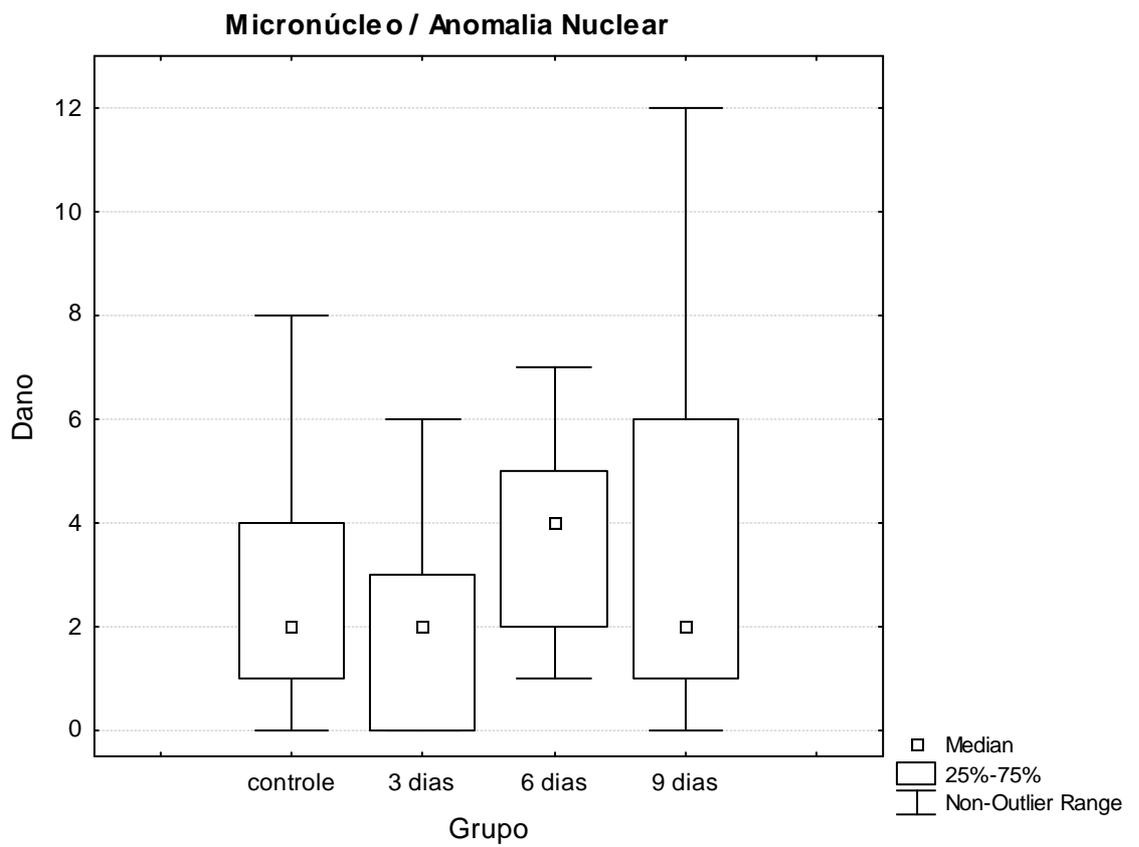
Os resultados também estão resumidos e apresentados na Tabela 1, mostrando valores numéricos obtidos para cada biomarcador, em termos de Média  $\pm$  Desvio Padrão (SD), Mediana e primeiro quartil seguido do terceiro quartil.



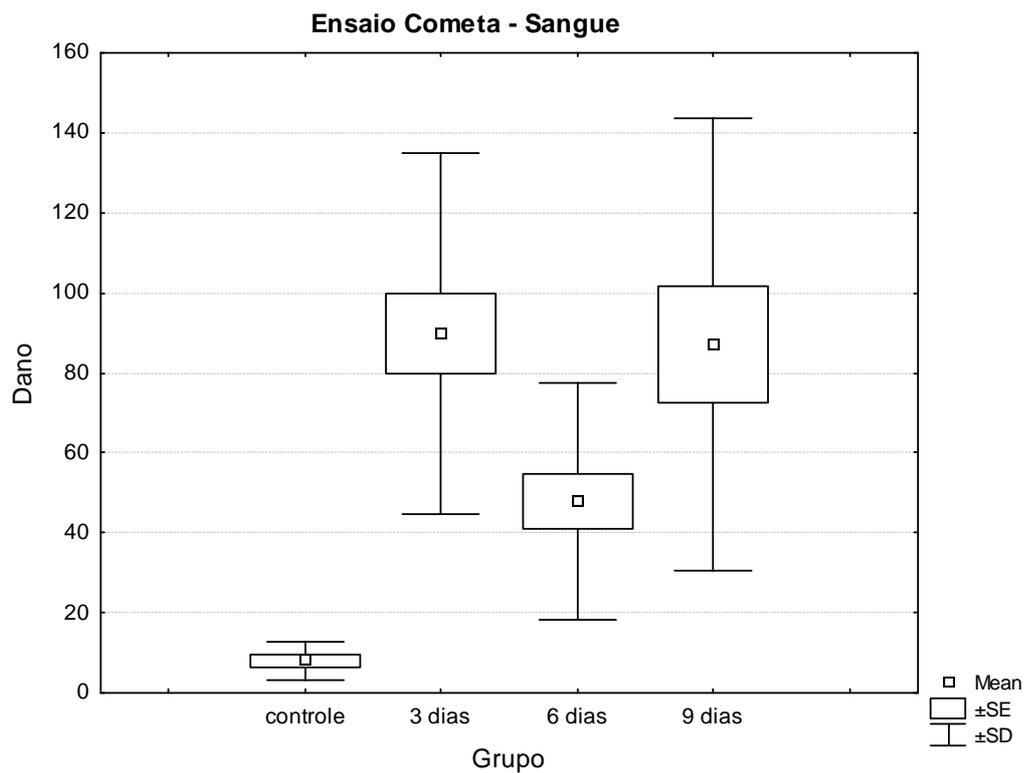
**Figura 6.** Foto mostrando algumas das alterações morfológicas nucleares encontradas nas lâminas de esfregaço sanguíneo, obtidas ao microscópio de captura, usando a objetiva de imersão. As setas vermelhas indicam malformações nucleares, enquanto as setas azuis indicam células com núcleos normais.



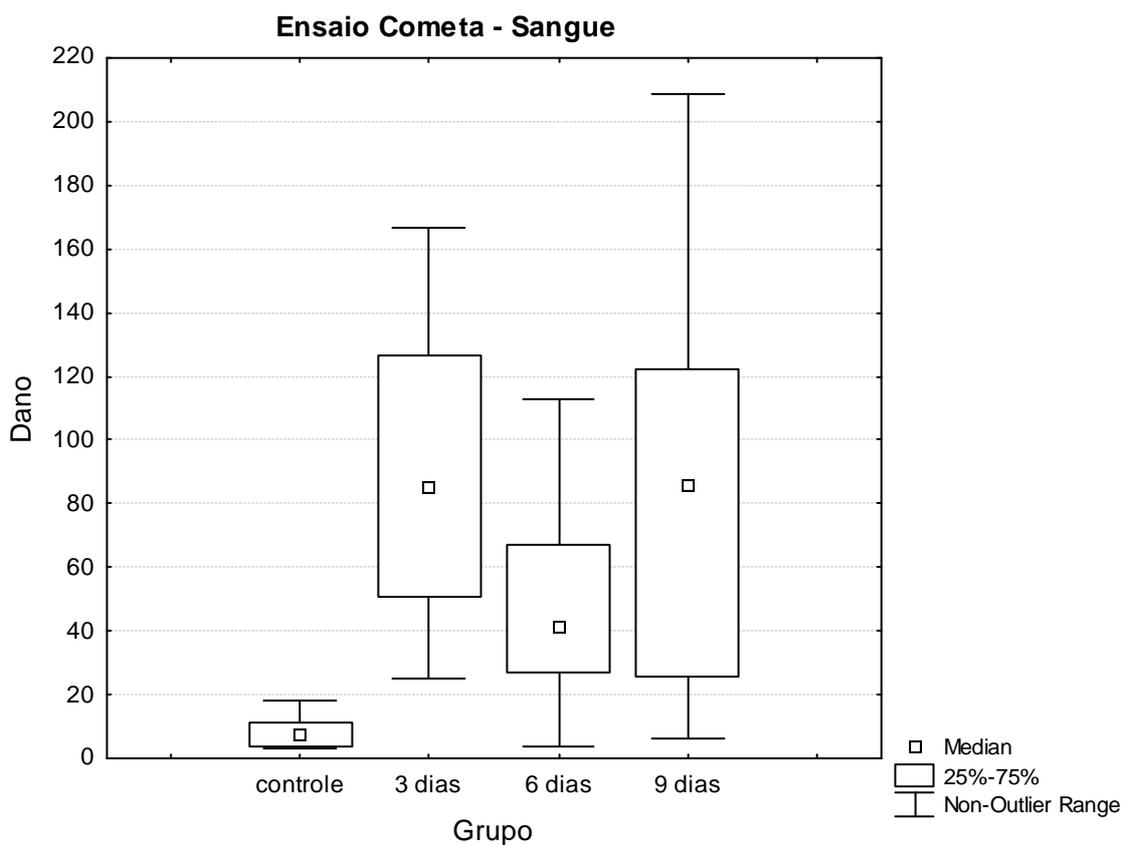
**Figura 7:** Comparação das taxas de dano apresentada pelos diferentes tratamentos com base na média, no teste do MNP. SE= Erro padrão; SD= Desvio padrão; Mean=Média.



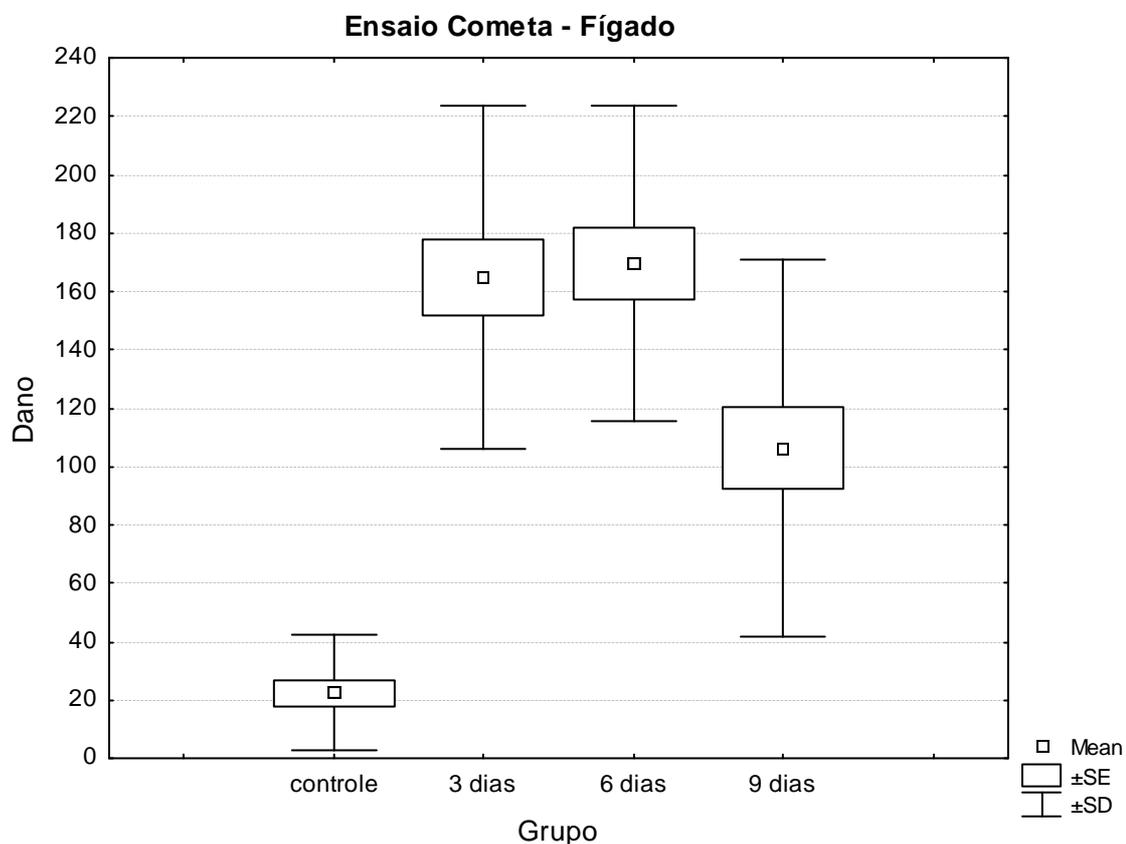
**Figura 8:** Comparação das taxas de dano apresentada pelos diferentes tratamentos com base na mediana, no teste de MNP.



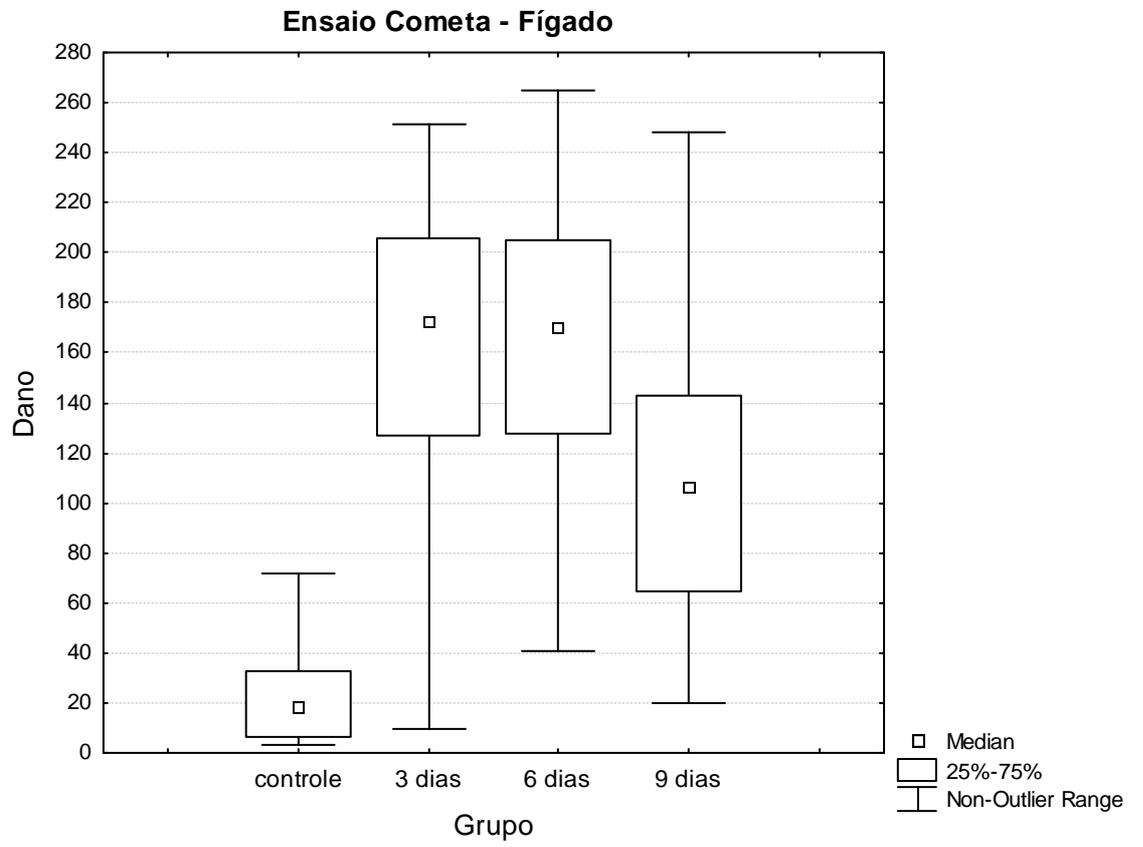
**Figura 9:** Comparação das taxas de dano apresentada pelos diferentes tratamentos com base na média, pelo ensaio cometa de sangue. SE= Erro padrão; SD= Desvio padrão; Mean=Média.



**Figura 10:** Comparação das taxas de dano apresentada pelos diferentes tratamentos com base na mediana, pelo ensaio cometa de sangue.



**Figura 11:** Comparação das taxas de dano apresentada pelos diferentes tratamentos com base na média, pelo ensaio cometa de fígado. SE = Erro padrão; SD = Desvio padrão; Mean = Média.



**Figura 12:** Comparação das taxas de dano apresentada pelos diferentes tratamentos com base na mediana, pelo ensaio cometa de fígado.

**Tabela 1.** Relação entre dano e tempo de exposição ao contaminantes, através dos dados obtidos pelos três biomarcadores utilizados, com seus respectivos valores para média mais ou menos desvio padrão, mediana e primeiro e terceiro quartis (25% e 75%).

<b>BIOMARCADOR</b>	<b>ESTIMATIVA</b>	<b>Controle</b>	<b>3 dias</b>	<b>6 dias</b>	<b>9 dias</b>
<b>Micronúcleo/Alterações</b>	Média ± SD	2,8 ± 2,59	1,89 ± 1,88	4,75 ± 5,56	3,62 ± 3,22
<b>Morfológicas Nucleares</b>	Mediana	2,00	2,00	4,00	2,00
	Quartis 1-3	1,00 - 4,00	0,00 - 2,75	2,00 - 5,00	1,00 - 6,00
	Média ± SD	8,10 ± 4,86	89,75 ± 45,18	47,85 ± 29,79	87,20 ± 56,62
<b>Ensaio Cometa Sangue</b>	Mediana	7,50	85,50	41,50	86,00
	Quartis 1-3	4,00 - 10,50	50,75- 124,75	28,00 - 62,50	48,00 -121,50
	Média ± SD	22,25 ± 9,83	164,85± 58,65	169,55± 53,85	106,14±64,53
<b>Ensaio Cometa Fígado</b>	Mediana	18,00	172,50	170,00	106,00
	Quartis 1-3	6,75 - 32,50	129,25-203,75	130,25-204,50	65,00 -143,00

## 6. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Nesse estudo foram aplicadas três metodologias principais de avaliação de genotoxicidade em exemplares de *Corydoras paleatus* e observou-se uma disparidade entre os resultados. Se MNP e ensaio Cometa são efetivos biomarcadores de genotoxicidade então deveríamos esperar que os resultados obtidos no presente trabalho estivessem correlacionados. Isso não foi observado no presente trabalho bem como para Bombail *et al.* (2001). É de conhecimento geral que cada teste tem suas características distintas e restrições, não havendo assim um teste universal para avaliar o perigo dos agentes genotóxicos (RUSSO, *et al.*, 2004).

Para ensaio cometa, BELPAEME *et al.* (1998) observaram que quando se considera a variação entre peixes controle esta é muitas vezes maior que a variação entre os peixes expostos, em oposição a KIRSCH-VOLDERS *et al.* (2006) que encontrou que a variabilidade entre doadores humanos pode somente ser observada depois do tratamento e não em culturas controle. BELPAEME *op cit* concluiu que a variação dentro de uma lâmina (intraindividual) é muitas vezes maior que a variação interindividual (entre indivíduos). Os desvios e os quartis notados no presente estudo, corroboram a diversidade de respostas intraindividual e interindividual, mas no geral observou-se uma maior heterogeneidade nos grupos contaminados.

O potencial genotóxico do Roundup tem sido estudado amplamente e resultados inconsistentes e muitas vezes controversos, têm sido obtidos tanto para um mesmo método como para métodos distintos. Usualmente também o glifosato ou sua formulação comercial, Roundup, tem sido testados; e mais raro, ambos são testados separadamente (DIMITROV *et al.*, 2006).

Existem duas visões opostas sobre os efeitos do glifosato no meio (SIVIKOVÁ & DIANOVSKÝ, 2005). Em oposição aos relatórios de fabricante sobre a não periculosidade e nenhum efeito deprimente a saúde humana (WILLIAMS *et al.*, 2000), surgem argumentações de que o glifosato/ Roundup oferece uma série de riscos a saúde e ao ambiente (COX, 1999).

Segundo os defensores do Roundup, a absorção oral e dérmica de glifosato é baixa, e ambos seus produtos são eliminados sem serem metabolizados (WILLIAMS *et al.*, 2000); não deixaria atividade residual no solo, e é praticamente não tóxico a mamíferos, aves e peixes, não mostrando bioacumulação na cadeia alimentar (SMITH & OEHME, 1992). Nenhuma toxicidade ocorreria em estudos agudos, crônicos e subcrônicos, e não há evidências convincentes do dano direto ao DNA *in vivo* ou *in vitro*. O Roundup, além disso,

não demonstraria nenhum potencial tumorigênico, carcinogênico ou teratogênico e/ou etc (WILLIAMS *et al.* 2000).

Por outro lado, arguições contra o Roundup defendem que os produtos à base de glifosato são altamente tóxicos para pessoas e animais. Entre os sintomas mais comuns citam-se irritação nos olhos e pele, dor de cabeça, náuseas, entorpecimento, elevação da pressão arterial e palpitações (COX, 1999).

Embora a comercialização de herbicidas à base de glifosato seja liberada, estudos laboratoriais detectaram efeitos adversos em todas as categorias de testes toxicológicos. Entre estes se incluem toxicidade a médio prazo (lesões em glândulas salivares), toxicidade a longo prazo (inflamações nas mucosas do estômago), danos genéticos (em células sanguíneas do corpo humano), efeitos reprodutivos (redução do número de espermatozoides em ratos; maior frequência de espermatozoides anormais em coelhos), e carcinogenicidade (maior frequência de tumores no fígado de ratos e câncer de tireóide em ratas) (COX, 1999).

O glifosato foi classificado pelo U.S. Environmental Protection Agency como “extremamente persistente”, sendo registrada uma persistência superior a cem dias nos testes de campo em Iowa e Nova Iorque. O glifosato foi detectado nos rios depois de ter sido aplicado em florestas e áreas urbana e agrícola (COX, 1999). Apesar disso, WILLIAMS *et al.*, (2000) afirma que o glifosato recentemente caiu para as substâncias naturais inócuas tal qual dióxido de carbono e ácido fosfônico. No Brasil, o Roundup está enquadrado na classe IV, comercialmente vendido com rótulo verde, considerado como composto químico pouco tóxico para o homem.

DIMITROV *et al.* (2006), comparou a genotoxicidade dos herbicidas Roundup (glifosato), Stomp (pendimetaline) e Reglone (diquat) em plantas (*Cephus capillaris L.*) e medula óssea de rato (administração oral dos contaminantes nestes) avaliando taxas de aberrações cromossômicas e micronúcleo. O Roundup não induziu aberrações cromossômicas em nenhum dos sistemas teste (organismos) e revelou-se negativo para indução de micronúcleo em medula óssea de rato *in vivo*, sendo assim o menos prejudicial desses herbicidas. Já doses de glifosato intraperitoniais diárias, resultaram em reduções de peso, de hemoglobina sanguínea, na contagem de células sanguíneas vermelhas e no hematócrito (OLORUNSOGO *et al.*, 1979). A toxicidade maior seria revelada pela administração intraperitoneal do glifosato. Não obstante, o glifosato não afetou a metemoglobina dos eritrócitos do sangue de ovelha (SMITH & OEHME, 1992).

Com relação à contaminação aquática, a preocupação ocorre com os componentes das formulações, especialmente os surfactantes. O Roundup pode ser até 30 vezes mais tóxico aos peixes que o produto técnico do glifosato, justamente por causa dos ditos

componentes “inertes” das formulações (GRISOLIA, 2005). O surfactante seria mais tóxico que o glifosato puro; a combinação dos dois se tornaria ainda mais tóxica (COX, 1999).

Praticamente todos os pesticidas contêm outros ingredientes além do ingrediente “ativo” que propicia a ação exterminadora. Tais ingredientes são erroneamente chamados “inertes”. Seu objetivo é facilitar o uso do produto ou torná-lo mais eficiente. Em geral os “inertes” não são identificados no rótulo do pesticida. No caso dos produtos à base de glifosato, vários ingredientes “inertes” foram identificados (COX, 1999)

GRISOLIA (2005) cita muitos resultados positivos para a mutagenicidade do Roundup para vários sistemas-teste, como em *Salmonella typhimurium*, pelo teste de mutação reversa; em *Drosophila melanogaster* induziu mutações letais recessivas ligadas ao sexo; aberrações cromossômicas em *Allium cepa* e culturas de linfócitos humanos; indução de micronúcleo em células de medula óssea de camundongo; quebras de fita de DNA de células de fígado e rins de camundongos; lesões no DNA de *Rana catesbeiana* pela exposição ao roundup mostradas pelo teste Cometa; entre outros.

E na seqüência, questionamentos são levantados com relação a esses resultados positivos: as freqüências de micronúcleo não são aumentadas quando tratadas com sal de glifosato-isopropilamina (uma das formulações do glifosato), que também não causa dano cromossômico em *Allium cepa*; além disso, as doses de roundup que induziram a formação de micronúcleo foram bastante altas, perto do nível tóxico. O mesmo pode se dizer para o Teste de Ames. Isso corrobora a informação que o Roundup é mais tóxico que seu ingrediente ativo isolado. Em *Allium cepa* somente as duas doses mais altas de Roundup foram estatisticamente significativas (GRISOLIA, 2005).

LI & LONG (1988), funcionários da Monsanto Company, fizeram praticamente os mesmos testes de mutação gênica e com vários organismos testes, e em todos os autores relatam resultados negativo: não mutagênico. Do mesmo modo, WILLIAMS *et al.* (2000) usando-se de informações de pesquisas conduzidas pela Monsanto Company e com o apoio e completo acesso a base de dados de estudos e documentação desta, concluiu que o Roundup não possui potencial tumorigênico, não causa dano direto ao DNA nem *in vitro* nem *in vivo*, é não teratogênico, não carcinogênico, e não afeta a reprodução.

Os resultados obtidos no presente trabalho com os dois ensaios usando eritrócitos circulantes apresentaram controvérsias. O teste do Micronúcleo associado com anomalia nuclear não revelou diferença após o tratamento com Roundup, concordando mais com trabalhos como o de DIMITROV *et al.* (2006). Mas o ensaio cometa mostrou uma clara tendência de aumento dos danos após a aplicação de Roundup na água. Talvez essa disparidade entre os ensaios se justifique pelo ensaio cometa ser relativamente mais sensível que o teste do Micronúcleo Písceo, mostrando assim danos que não se revelam

neste último. Alguns autores realmente aceitam que o ensaio cometa é mais sensível que o teste do micronúcleo, apesar da concordância geralmente demonstrada entre os dois biomarcadores (HARTMANN *et al.*, 2001; DIXON *et al.*, 2002; KLOBUCAR *et al.*, 2003). O ensaio cometa também apresentaria maior correlação dose-resposta do que o teste do micronúcleo.

O glifosato também, em outras avaliações, não induziu mutação genética em uma variedade de ensaios com bactérias *in vitro*, incluindo o ensaio de reversão na já citada *Salmonella typhimurium* com e sem ativação metabólica (MORIYA *et al.*, 1983). Nenhum efeito clastogênico do herbicida foi encontrado em culturas de linfócitos periféricos bovinos, não obstante seu efeito genotóxico foi confirmado no método de troca das cromátides irmãs depois de 24 horas de incubação (SIVIKOVÁ & DIANOVSKÝ, 2005).

SMITH & OEHME (1992) encontraram que proteínas hepáticas de ratos ficaram inalteradas depois da administração do glifosato, e nenhuma mudança foi vista na proteína solúvel ou fosfolípídeos microssomais contidos no fígado; o glifosato também teria diminuído a atividade do citocromo P450 e das monoxigenases. Por sua vez, BOLOGNESI *et al.* (1997) documentou atividades de dano no DNA em fígado e rim de camundongo, e também aumento na frequência de micronúcleo na medula óssea *in vivo* tanto com Roundup quanto com glifosato. O resultado aqui obtido para fígado, usando-se do ensaio cometa concorda com este segundo autor: revela uma disposição clara de maior dano ao DNA das células de peixe após a contaminação experimental com Roundup.

Com relação ao ensaio Cometa praticamente todas as publicações prévias aceitam que este é realmente capaz de detectar danos no DNA causados por diferentes classes mutagênicos em peixes. Mas a resposta pode, é claro, depender das condições experimentais, das espécies, do tipo de célula, do mutagênico e da duração da exposição (BELPAEME *et al.*, 1998).

Afinal de contas, dados de avaliações indicam que a formulação técnica do Roundup é no mínimo ligeiramente genotóxica em ensaios de curta duração. Diferenças nas respostas dos organismos-teste para glifosato e para Roundup em sua formulação comercial podem ser devido à toxicidade das diferentes composições e surfactantes contidos no produto comercial.

Diante da inconsistência dos dados observados e discrepância observada entre os diferentes testes ao qual foram submetidos os *Corydoras paleatus*, sugere-se que sejam feitos estudos mais aprofundados sobre a biologia de tal peixe, seu comportamento, sua taxa metabólica e as respostas específicas de cada tecido a contaminação, para comprovar se este é realmente um bom organismo bioindicador, ou se devido a sua grande capacidade de adaptação e resistência os efeitos sejam camuflados ou não se definem com clareza. É

valida também a sugestão da comparação da aplicação destes mesmos testes com outros peixes.

Sugerem-se também estudos comparativos da aplicação do contaminante diretamente na água com a injeção intraperitoneal deste - que foi citada como a administração de maior toxicidade em animais, apesar de não ocorrer no ambiente natural. Seriam também interessantes estudos usando-se de técnicas modernas como a genética molecular, que garantem uma maior precisão e certeza nos resultados, além de estudos de monitoramento diário de dano ao DNA.

O ideal seria se estes testes fossem feitos para um mesmo peixe, evitando-se assim a heterogeneidade ou variação interindividual, com método de cultura *in vitro* ou até mesmo *in vivo*, respeitando-se é claro um tempo de recuperação do peixe e renovação celular, mas há, é claro, a possibilidade dos danos serem realmente persistentes. Seria válida também a avaliação de danos diários aos animais, usando no mínimo três concentrações para avaliar a formação de alguma tendência na comparação de dias, danos e concentrações.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SABTI, K. Clastogenic effects of live carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp (*Cyprinus carpio L.*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 85C, p.5-9, 1986.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v.343, p. 121-135, 1995.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Introduction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research**, v.476, p. 177-186, 2000.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K. & KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research** 415(3), p.167-84, 1998.

BOLOGNESI, C.; BONATTI, S.; DEGAN, P.; CALLERANI, E.; PELUSO, M.; RABBONI, R.; ROGGERI, P.; ABBONDANDOLO, A. Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.1957-1962, 1997.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterflyfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v.44, p.383-392, 2001.

BRAKE, D. G. & EVERSON, D. P. A generational study of glyphosate-tolerant soybeans on mouse fetal, postnatal, pubertal and adult testicular development. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 29–36, 2004

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as *in situ* biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.47, p.2123-2136, 1990.

CONNERS A. J. & JACOBS J. M. E. Genetic engineering of crops as potential source of genetic hazard in the human diet. **Mutation Research**, v.443, p. 223–234, 1999.

COX, C. Glyphosate Factsheet. **Journal of Pesticide Reform**, v.108, nº3, 1998.

CROSBY, D. G. Pesticides as environmental mutagens. **Genetic Toxicology: An Agricultural Perspective**, p.201-218, 1982.

DIMITROV, D. B.; GADEVA, P. G.; BENOVA, D. K; BINEVA, M. V. Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems. **Mutagenesis**, v. 21(6), p.357-382, 2006.

DIXON, D. R.; PRUSKI, A. M.; DIXON, L. R.; JHA, A. N. Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. **Mutagenesis**, v. 17, p. 495-507, 2002.

FERRARO, M.V.M. **Avaliação do efeito mutagênico do tributilestanho (TBT) e do chumbo inorgânico (PbII) em *Hoplias malabaricus* (Pisces) através dos ensaios: Cometa, Micronúcleo e de Aberrações Cromossômicas.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

FRANZ, J. E.; MAO, M. K.; SIKORSKI, J. A. Glyphosate: a unique global herbicide. Washington: **American Chemical Society**, (Monograph, 189). 1997

GOKSOYR, A.; ANDERSON, T.; BUHLER, D.R.; STEGEMAN, J.J.; WILLIAMS, D.E.; FORLIN, L. Immunochemical cross-reactivity of  $\beta$ -naphthoflavone – inducible cytochrome P450 in Liver Microsomes from Different Fish Species and Rat. **Fish Physiology**, San Diego, v. 9, p. 1-13, 1991.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosome damage. **Mutation Research**, v.18, p.187-192, 1973.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução.** Editora Universidade de Brasília; Brasília, 392p. 2005.

HARTMANN, A.; ELHAJOUJI, A.; KISKINIS, E.; POETTER, F.; MARTUS, H.J.; FJALLMAN, A.; FRICAUFF, W.; SUTER, W. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food Chem. Toxicol.**, v. 39, p. 843-858, 2001.

HINTON D. E. & LAURÉN D. J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. In: ADAMS, S. M. (Ed) Biological indicators of stress in fish. Bethesda: American Fisheries Society Symposium 8, 1990. p 51-66.

HOOFTMAN, R. & VINK, G. J. Cytogenetic effects on the eastern mudminnow *Umbra pigmaea* exposed to ethyl methanesulfonate benzo[a]pyrene and river water. **Ecotoxicology Environment Safety**. v. 5, p. 216-269, 1981.

KIRSCH-VOLDERS M.; MATEUCA R.A.; ROELANTS M; TREMP A; ZEIGER E; BONASSI S; HOLLAND N; CHANG W. P.; AKA P.V.; DEBOECK M.; GODDERIS L.; HAUFROID V.; ISHIKAWA H.; LAFFON B.; MARCOS R.; MIGLIORE L.; NORPPA H.; TEIXEIRA J.P.; ZIJNO A.; FENECH M. The effects of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on micronucleus frequencies in human lymphocytes in vivo. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. v.15(5),p.1038-42, 2006.

KLOBUCAR, G.I.V.; PAVLICA, M.; ERBEN, R.; PAPES, D. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. **Aquat. Toxicol**, v. 64, p. 15-23, 2003.

LEMONS, N.G.; DIAS, A.L.; SILVA-SOUZA, A.T.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. **Environmental and Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 197-201, 2005.

LI, A. P & LONG, T. J. An Evaluation of the Genotoxic Potential of Glyphosate. **Toxicological Sciences**, v.10, p. 537 – 546, 1988

McCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. **Biomarkers of environmental contamination.** Lewis, Boca Raton, USA, 1990.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. **Mutation Research**. v.367, p.245-251, 1996.

MORIYA, M.; OHTA, T.; WATANABE, K.; MIYASAWA, T., KATO, K.; SHIRASU, Y. Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems. **Mutation Research**. v. 116, p.185-216, 1983.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. **Radiation Research**, Oak Brook, v.122, p. 86- 94, 1990.

OLORUNSOGO, O. O.; BABABUNMI E.A.; BASSIR, O. Effect of Glyphosate on Rat Liver Mitochondria In Vivo. **Bull. Environment Contam. Toxicol.** v.22, p.357-364, 1979.

PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline single cell (comet): assay and genotoxicity monitoring using bullhead and carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 26, p.345-356, 1995.

ROSEMBERG, D. M. & RESH, V. H. Freshwater biomonitoring an benthic macroinvertebrates, New York, London, Chapman & Hall, 488p,1993.

RUSSO, C.; ROCCO, L.; MORESCALCHI, M. A.; STINGO, V. Assessment of environments stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p.168-174, 2004.

SASAKI, Y.F.; TSUDA, S.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E. Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. **Mutation Research**, v. 388, p. 33 – 44 , 1997b.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v.31, p.9-15, 1975.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quatification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, p.184-191, 1988.

SIVIKOVÁ, K. & DIANOVSKÝ, J. Cytogenetic effect of technical glyphosate on cultivated bovine peripheral lymphocytes. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 209, p. 15-20, 2005.

SMITH, E. A. & OEHME D.M.V, F. W.; The Biological Activity to Plants and Animals: A Literature Review. **Vet. Human Toxicol.** v. 34 (6), p 531-543, 1992.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (Single-cell gel test), A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: Henderson, D.S. (Ed.), **Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols – Eukaryotic Systems**, Human Press, Totowa v.113, p. 203-211, 1999.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**; Editora Artmed 3ªed. Porto Alegre, 2004.

TOWNSEND, C. R.; BEGON, M.; HARPER, J.L. **Fundamentos em Ecologia**. 2<sup>a</sup> Ed. Artmed. Porto Alegre. 2006.

VAN DER WERF, H. M. G. Accessing the impact of pesticides on the environment. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v.60, p.81-96, 1996.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.31, p. 117-165, 2000.