

AÇÃO PROTETORA DO TROLOX FRENTE AO DANO OXIDATIVO INDUZIDO PELO GLIFOSATO E TROP® EM MODELO ANIMAL

Vilmair Zancanaro¹
Camila katerin Perondi²
Aline Conte³
Claudriana Locatelli⁴

Recebido em: 12 mar. 2018
Aceito em: 12 jan. 2019

RESUMO: O glifosato é um herbicida utilizado em vários tipos de culturas e é considerado de baixa toxicidade, no entanto, os mecanismos de toxicidade das formulações ainda não estão bem esclarecidos. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do Trop® e do glifosato sobre os parâmetros oxidativos, potencial genotóxico, função renal e hepática, em animais submetidos ou não ao tratamento com vitamina E. Utilizou-se camundongos *Swiss* machos albinos, divididos em nove grupos (n=8): Controle (salina); glifosato (50 e 500 mg/kg); Trop® (50 e 500 mg/kg); Glifosato e vitamina E (20 e 200 mg/kg); Trop® e vitamina E (20 e 200 mg/kg). O tratamento foi realizado em dose única via oral. Após 48 horas, os animais foram sacrificados o sangue e o fígado coletados. O potencial genotóxico foi avaliado pela técnica de micronúcleos, a peroxidação lipídica através das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); a capacidade antioxidante pela concentração de glutathiona reduzida (GSH) e catalase (CAT); a função renal através das dosagens de uréia e creatinina e a função hepática através das dosagens da Alanina-amino-transferase (ALT) e Aspartato-amino-transferase (AST). Os resultados mostram que não houve um aumento no número de micronúcleos nos eritrócitos demonstrando assim que não houve danos no DNA. Os níveis de TBARS e atividade da CAT teve aumento significativo em comparação aos animais controle e redução da GSH. Os valores de uréia e creatinina tiveram um aumento significativo quando os animais foram tratados com as doses de 500mg/Kg, no entanto, estes efeitos foram revertidos quando os animais foram tratados com combinação de vitamina E 200 mg/Kg. As dosagens de AST e ALT não evidenciaram alterações entre os grupos tratados. Os resultados mostram que uma exposição única ao glifosato pode causar dano oxidativo hepático e alteração na função renal que pode ser revertido pela administração de anti-oxidantes em particular a vitamina E.

Palavras-chave: Glifosato. Dano Oxidativo. Potencial Genotóxico.

TROLOX OF PROTECTIVE ACTION FRONT OXIDATIVE DAMAGE INDUCED BY GLYPHOSATE AND TROP® IN ANIMAL MODEL

||| ABSTRACT: Glyphosate is an herbicide used in various types of cultures, considered

¹ Universidade Alto Vale do Rio do Peixe - UNIARP. Caçador/SC. Mestre em Ciência e Biotecnologia: vilmair@uniarp.edu.br.

² Universidade do Oeste de Santa Catarina – UNOESC. Videira/SC. Núcleo de Biotecnologia. Curso de Farmácia: mila_perondi@yahoo.com.br.

³ Universidade do Oeste de Santa Catarina – UNOESC. Videira/SC. Núcleo de Biotecnologia. Curso de Farmácia: alineconte91@gmail.com.

⁴ Universidade do Oeste de Santa Catarina – UNOESC. Videira/SC. Núcleo de Biotecnologia. Professora Doutora: claudrilocatelli@gmail.com.

to have low toxicity, however, the mechanisms of toxicity of the formulations are not well understood. The aim of the study was to evaluate the effects of Glyphosate on Trop[®] and oxidative parameters, potential genotoxic and renal function in animals submitted or not to treatment with vitamin E. Male albino Swiss mice were used divided into nine groups (n=8). The control group (saline); Glyphosate (50 and 500mg/kg); Trop[®] (50 and 500mg/kg); Glyphosate + Vitamin E (20 and 200 mg/kg); Trop[®] + Vitamin E (20 and 200 mg/kg). Treatment was performed in a single oral dose, 48 hours after treatment the animals were sacrificed the blood and liver were collected. The genotoxic potential was assessed by micronucleus technique. The evaluation of lipid peroxidation was accomplished by determination of thiobarbituric acid reactive species (TBARS). The antioxidant status was evaluated by concentration of reduced glutathione (GSH) and the catalase (CAT) activity. The renal function was evaluated through the urea and creatinine dosages. The results show that there was not increase in the number of micronuclei in erythrocytes of the peripheral blood of animals treated with Glyphosate or Trop[®] thus demonstrating that DNA damage has not occurred when animals were treated with the herbicide. However, the oxidative parameters were altered, the levels of TBARS and CAT activity had a significant increase compared to control animals and significantly reduced GSH. The values of urea and creatinine were significantly higher when animals were treated with doses of 500mg/Kg, however, these effects were reversed when the animals were treated with combination of vitamin E 200mg/Kg. The results show that even a single exposure to Glyphosate may cause hepatic oxidative and renal damage which can be reversed by the administration of antioxidants in particular vitamin E.

Keywords: Glyphosate. Oxidative damage. Genotoxic potential.

INTRODUÇÃO

Em um cenário mundial de crescente demanda pela produção de alimentos e, conseqüentemente de maiores áreas para cultivo, o uso de mecanismos para potencializar a atividade agrícola tem se tornado cada vez mais necessário (ARANHA, 2013). O glifosato [(N-fosfometil-glicina)] é o herbicida mais utilizado no mundo para o controle de ervas daninhas através da inibição do crescimento das plantas, interferindo na produção dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, o que provoca uma redução na síntese proteica (FAUS et al., 2015; PEREIRA et al., 2014).

A Organização Mundial de Saúde considera a exposição a pesticidas um problema de saúde pública. A cada ano, contaminam mais de três milhões de pessoas em todo o mundo. Destes, 70% vive em países em desenvolvimento, como o Brasil. Entre os problemas de saúde, o envenenando pode ocorrer pelo efeito cumulativo, como em situações que culminam em depressão, infertilidade, impotência, defeitos de nascimento, câncer e mal de Parkinson (UBESSI et al., 2015). Estudos têm descoberto que vários agrotóxicos possuem propriedades genotóxico ou mutagênico os quais são fatores de risco iniciais na indução cancerígena e efeitos reprodutivos em longo prazo. Os efeitos genotóxico de poluentes podem ser monitorados usando testes *in vitro* e *in vivo* e o teste do micronúcleo (MN) que possui sensibilidade na detecção de danos no DNA (BAKRY; ISMAIL; EL-ATTI, 2015).

O Teste de Micronúcleos permite avaliar de forma rápida e confiável danos cromossômicos causados por perda de cromossomos inteiros ou por quebras cromossômicas. Esse teste tem sido largamente empregado para avaliar ação genotóxica induzida por agentes químicos ou físicos. Primeiramente utilizado em roedores este teste tem demonstrado aplicabilidade em outros grupos como plantas e peixes (ARANHA, 2013). Além de respostas celulares, a ação do glifosato também pode ser avaliada através de análises bioquímicas para avaliação da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs podem causar danos aos lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (ARMILIATO, 2014).

O estudo das Substâncias Reativas ao Acido Tiobarbitúrico (TBARS) avalia produtos da peroxidação lipídica em membrana microsomal, entre eles, o malondialdeído (MDA). O malondialdeído é um aldeído reativo (baixa estabilidade) amplamente utilizado como biomarcador na avaliação do estresse oxidativo (BASSO et al., 2013.) Os organismos também apresentam mecanismos de defesa antioxidante que neutralizam o efeito causado pelas EROS, onde se destaca a ação da glutatona reduzida (GSH), um potente antioxidante natural. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes na defesa das células contra o estresse oxidativo e possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos. Esta molécula apresenta papel redutor em muitas reações, tendo uma função importante na detoxificação do H₂O₂, outros peróxidos e radicais livres (ARMILIATO, 2014). Outra enzima importante é a catalase (CAT) que possui a função de transformar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Enzimas antioxidantes como a CAT e a ação da vitamina E neutralizam as EROS e contribuem para o sistema de defesa antioxidante (DAVID, 2011).

Os rins e o fígado são os principais órgãos excretores do organismo. Uma sobrecarga, com acúmulo de substâncias nocivas pode ser responsável por distúrbios funcionais do rim e do fígado, que pode evoluir para insuficiência renal e hepática (COSTA et al., 2014).

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do Trop® e glifosato sobre o potencial genotóxico, parâmetros oxidativos, função hepática e renal, em animais submetidos ou não ao tratamento com vitamina E.

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS E TRATAMENTO

Utilizou-se camundongos Swiss machos albinos, divididos em nove grupos (n =8): Controle (salina); glifosato (50 e 500 mg/kg); Trop® (50 e 500 mg/kg); Glifosato + Vitamina E (20 e 200 mg/kg); Trop® + Vitamina E (20 e 200 mg/kg). O tratamento foi realizado em dose única via oral. Após 48 horas, os animais foram eutanasiados e o sangue e fígado

foram coletados.

ANÁLISES DO POTENCIAL GENOTÓXICO

O potencial genotóxico foi avaliado através da técnica de micronúcleos conforme descrito por Schmid (1975). Para cada animal foram analisados 2000 eritrócitos policromáticos (PCEs) e 2000 eritrócitos normocromáticos (NCEs) e o resultado expresso em total de células contendo micronúcleos. As lâminas foram analisadas utilizando-se microscópio de luz visível, em objetiva de imersão de 120X e ocular de 10X, aumento final de 1200X. A identificação entre policromática e normocromática baseia-se na diferença da coloração de cada um, sendo que os policromáticos são células com coloração roxa e os normocromáticos com coloração rosa. Essa diferença nas colorações dos eritrócitos é devido à quantidade de RNAs presentes em seu citoplasma.

ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Avaliação dos Parâmetros Oxidativo

O tecido hepático foi retirado para avaliação dos parâmetros oxidativos, TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico), GSH (Glutathiona Reduzida) e CAT (Catalase).

Avaliação da peroxidação lipídica foi realizada através da determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este método avalia o dano celular, o método utilizado foi descrito por Bird e Draper (1984), baseia-se na oxidação provocada por espécies reativas de oxigênio em biomoléculas tais como lipídios, carboidratos, ácidos nucléicos, levando à formação de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA). O nível da lipoperoxidação é indicado pela formação de malondialdeído (MDA) e outras substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A absorbância foi monitorada a 535nm. A concentração de TBARS na amostra foi calculada a partir da curva analítica de malondialdeído e os resultados foram expressos como μmol de MDA/mg de proteína.

Avaliação da concentração de glutathiona reduzida (GSH) foi realizada pelo método de Tietze (1969). Grupos sulfidrilas da GSH interagem com DTNB ((ácido 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico)), obtendo-se o GSTNB (forma oxidada da GSH), há liberação de TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzóico). Sendo assim, a intensidade de cor produzida pelo TNB é diretamente proporcional à atividade da glutathiona redutase sobre a GSTNB e dos níveis de GSH intracelular. Absorbância foi monitorada a 412 nm. Os resultados foram expressos em mM/mg proteína.

Atividade da enzima antioxidante Catalase foi avaliada pelo método descrito por Aebi (1984), que quantifica a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (10

mM) em 240nm, pela enzima presente nas amostras. Os resultados foram expressos em mol H₂O₂/min/mg de proteína.

Análise da Ureia e Creatinina

A ureia é hidrolisada pela urease, gerando amônia e dióxido de carbono. A amônia reage com o 2-alfa-cetoglutarato e NADH em uma reação catalisada pela glutamato desidrogenase (GLDH), ocorrendo oxidação da NADH a NAD. A consequente redução da absorbância, medida em 340 ou 365 nm, é proporcional à concentração de ureia na amostra. A creatinina presente na amostra reage com o picrato em meio alcalino originando um complexo colorido. Mede-se a velocidade da formação do complexo em períodos curtos iniciais, evitando-se assim a interferência de outros compostos. As concentrações dos parâmetros bioquímicos da ureia e creatinina foram determinadas em equipamento automatizado (A25 – Biosystems, Spain).

Análise de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST)

A ALT catalisa a transferência de grupos amina da alanina para o alfa-cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. Este é reduzido a lactato por ação lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD⁺. A consequente redução da absorbância em 340 ou 365nm, monitorizada espectofotometricamente é diretamente proporcional a atividade da enzima na amostra. A AST catalisa a transferência de grupos amina do aspartato para os cetoglutarato, com formação de glutamato e oxalacetato. Este é reduzido a malato desidrogenase (MDH) enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD⁺. A consequente redução da absorbância em 340 ou 365nm, monitorizada espectofotometricamente é diretamente proporcional a atividade da enzima na amostra (GAW et al., 2001). As concentrações dos parâmetros bioquímicos da ALT e AST foram determinadas em equipamento automatizado (A25 – Biosystems, Spain).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As diferenças entre os grupos foram determinadas utilizando a análise de variância de uma via ANOVA, GraphPadPrism 5, seguida do teste post Bonferroni. Diferenças significativas foram indicadas por valores de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

O aumento da ocorrência de poluição no meio ambiente devido à atividade humana aumentou o foco de estudo em relação aos efeitos tóxicos dos poluentes ambientais. Para a avaliação da frequência de células micronucleadas foram considerados apenas eritrócitos íntegros com forma arredondada e citoplasma intacto. Foram consideradas como micronúcleos as estruturas intracitoplasmáticas com forma arredondada que se

apresentaram no mesmo plano da célula, sem refração e com tamanho de 1/20 a 1/5 do tamanho do núcleo do leucócito.

Tabela 1: Relação células policromáticas (PCE) X normocromáticas (MCE) e presença de micronúcleos (MN) no sangue periférico de camundongos tratados com glifosato (G) e Trop® (T) isolados ou associados à Vitamina E. Os valores são expressos como a média \pm o desvio padrão da média. Número de animais por grupo = 8.

Tratamento (mg/Kg ⁻¹)	PCE %	MCE %	MN %	PCE/MCE
Controle	89 \pm 4	7 \pm 2	4 \pm 0,6	17,2 \pm 4,4
G50	93 \pm 6	4 \pm 1	3 \pm 0,7	18,9 \pm 4,0
G500	95 \pm 3	3 \pm 1	2 \pm 0,56	15,5 \pm 2,0
G + T (50:20)	81 \pm 6	4 \pm 2	3 \pm 1	12,9 \pm 2,5
G + T(50:200)	96 \pm 3	2 \pm 1	3 \pm 0,4	15,9 \pm 1,9
G (500:20)	79 \pm 5	16 \pm 4	5 \pm 0,97	21,5 \pm 7,8
G (500:200)	81 \pm 7	12 \pm 5	4 \pm 0,3	17,2 \pm 4,5
T50	90 \pm 8	8 \pm 2	4 \pm 0,66	16,6 \pm 2,0
T500	86 \pm 5	12 \pm 3	4 \pm 0,67	13,0 \pm 1,7
T + E (50:20)	73 \pm 6	18 \pm 3	4 \pm 0,74	12,6 \pm 1,4
T + E (50:200)	79 \pm 8	13 \pm 5	4 \pm 0,70	15,2 \pm 2,2
T + E (500:20)	83 \pm 4	14 \pm 6	3 \pm 0,70	18,1 \pm 3,7
T + E (500:200)	87 \pm 3	9 \pm 3	4 \pm 0,86	14,8 \pm 2,4

Os resultados distribuídos na tabela 1 mostram que não houve diferença significativa entre os grupos tratados com o glifosato e o Trop®, e não houve diferença significativa entre os grupos tratados com o herbicida e os grupos que juntamente com o herbicida foram tratados com a Vitamina E. Assim, o teste do micronúcleo não apresentou danos no DNA comparado com camundongos tratados com o herbicida e Vitamina E como seu antioxidante.

Na figura 1 estão distribuídos os resultados dos parâmetros oxidativos, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, glutathione reduzida e catalase. De acordo com os resultados, o herbicida Trop® e o princípio ativo glifosato isolado afetaram o metabolismo hepático, causando alteração nos parâmetros oxidativos, com aumento nos níveis de TBARS, diminuição da GSH e da enzima catalase, sendo que a associação da Vitamina E, promoveu melhoria dos índices de hepatotoxicidade e peroxidação lipídica.

Nos resultados obtidos para análise da lipoperoxidação em biomoléculas pelo método de TBARS, nossos resultados (figura 1), indicam que a vitamina E forneceu proteção na lipoperoxidação induzida pelo glifosato 50mg, Trop® 50mg e Trop® 500mg, visto que estes grupos mais a Vitamina E apresentaram menores valores de TBARS, com exceção aos grupos tratados com glifosato 500mg + Vitamina E 20 e 200mg.

Com relação à glutathione, nossos resultados demonstram que o glifosato (princípio ativo) apresentou teor de GSH mais baixo que o herbicida Trop®, apresentando maior toxicidade. A vitamina E apresentou-se efetiva em associação com o glifosato (50 e 500mg

+ Vitamina E 20 e 200mg) ou Trop® (50 e 500mg + Vitamina E 200mg), aumentando o nível da glutaciona, que é considerado benéfico para combater o estresse ambiental, protegendo as células do estresse contínuo, ou posterior mais grave (MAHER, 2005; BALLESTEROS et al., 2009).

De acordo com a figura 1, percebemos que o herbicida Trop® e glifosato geraram maior quantidade de CAT, GSH, TBAS, mostrando que a associação do Trop® com a vitamina E aumentou o valor de Catalase, ocasionando maior proteção ao organismo.

Figura 1. Parâmetros oxidativos hepáticos em ratos Wistar machos submetidos ao tratamento com Glifosato ou Trop associado ou não a vitamina E. Diferença significativa ($p \leq 0.05$) quando comparado com: Controle (a). Glifosato 50 mg/Kg (b). Glifosato 500 mg/Kg (c). Trop® 50 mg/Kg (d). Trop® 500 mg/Kg (e). TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína) (A). GSH: Glutaciona Reduzida (mM/mg de proteína) (B). CAT: Catalase ($\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ proteína) (C). Os valores são expressos como a média \pm desvio padrão ($n = 8$).

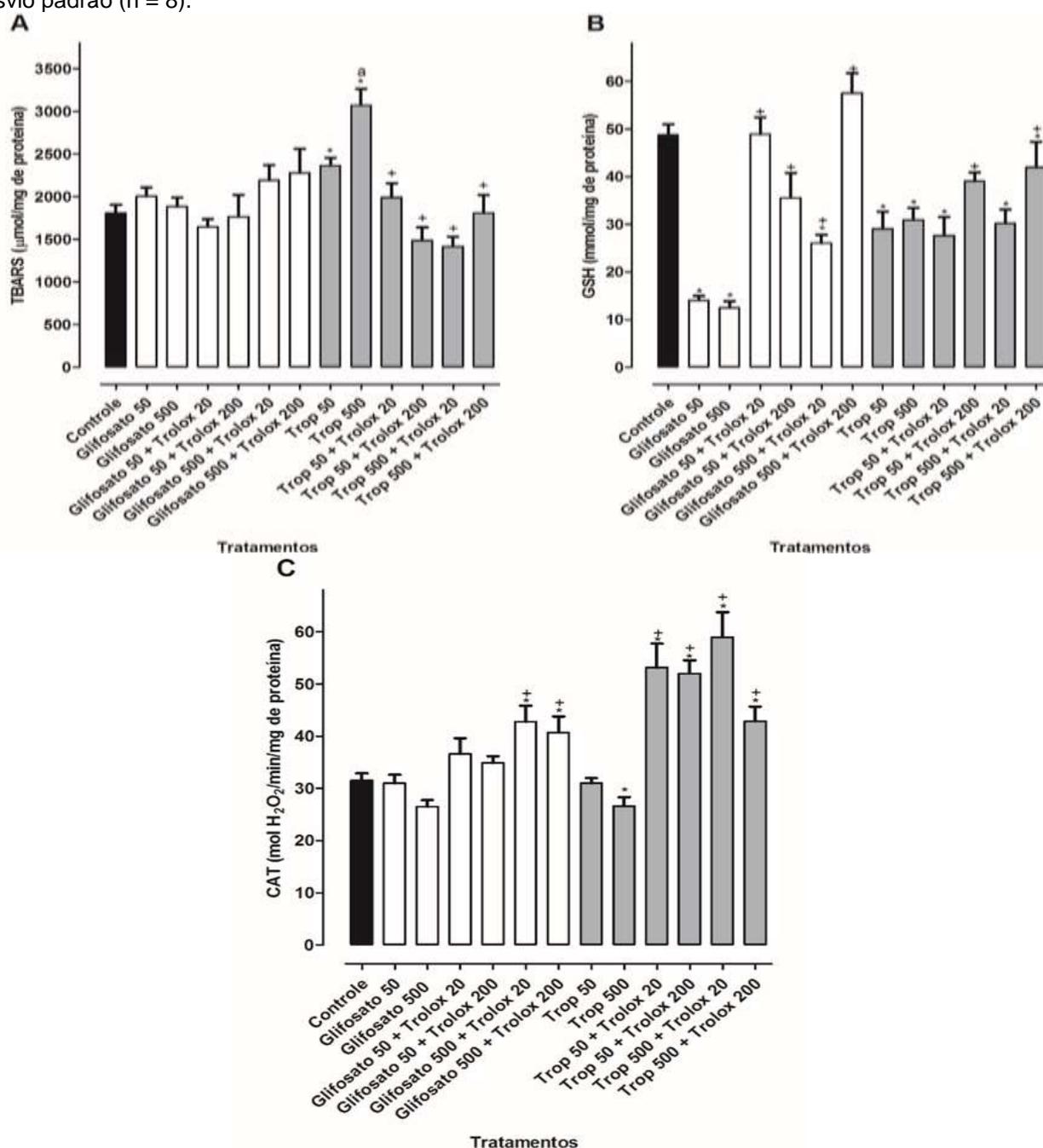


Tabela 2: Avaliação da Alanina-amino-transferase (ALT), Aspartato-amino-transferase (AST), Ureia e creatinina em camundongos tratados com glifosato ou Trop®, isolados ou associados à Vitamina E. Os valores são expressos como a média \pm desvio padrão. Número de animais por grupo (n=8).

Tratamento (mg/Kg ⁻¹)	Avaliação Hepática		Avaliação Renal	
	ALT	AST	Ureia	Creatinina
Controle	58 \pm 0,81	46 \pm 2,39	60,6 \pm 0,76	0,51 \pm 0,012
G 50	56 \pm 0,56	45 \pm 1,59	58 \pm 0,68	0,52 \pm 0,007
G 500	57 \pm 1,67	44 \pm 0,97	63 \pm 0,23*	0,56 \pm 0,008*
G + T (50:20)	52 \pm 0,44	46 \pm 0,91	59 \pm 1,69	0,52 \pm 0,010
G + T(50:200)	55 \pm 0,50	45 \pm 0,67	58 \pm 0,86	0,52 \pm 0,009
G (500:20)	56 \pm 1,57	43 \pm 1,43	57 \pm 0,96**	0,54 \pm 0,007
G (500:200)	56 \pm 0,86	44 \pm 1,49	57 \pm 0,66**	0,52 \pm 0,010
T50	58 \pm 0,76	45 \pm 0,68	66 \pm 0,59 ^a	0,54 \pm 0,008
T500	59 \pm 0,67	48 \pm 0,66	68 \pm 0,49 ^a	0,58 \pm 0,014*
T + E (50:20)	55 \pm 1,22	45 \pm 1,16	56 \pm 1,24**	0,53 \pm 0,011
T + E (50:200)	54 \pm 2,38	45 \pm 0,92	58 \pm 1,28 ⁺	0,52 \pm 0,014
T + E (500:20)	56 \pm 1,53	45 \pm 1,32	60 \pm 0,67**	0,56 \pm 0,010
T + E (500:200)	60 \pm 1,43	46 \pm 0,58	56 \pm 1,04**	0,56 \pm 0,006

* diferença significativa em relação ao controle $p < 0.05$

⁺ diferença significativa em relação aos respectivos grupos sem trolox

^a diferença significativa em relação ao tratamento com Glifosato

Na tabela 2 estão distribuídos os resultados dos parâmetros hepáticos e renais. As alterações hepáticas foram avaliadas pelas dosagens das enzimas séricas alanina-amino-transferase (ALT) e aspartato-amino-transferase (AST). As dosagens séricas de AST e ALT não evidenciaram alterações entre os grupos tratados.

As dosagens séricas de ureia e creatinina demonstraram diferenças significativas em relação ao controle no grupo tratado ($p < 0.05$). Os valores de ureia e creatinina foram significativamente maiores quando os animais foram tratados com doses de 500mg/Kg, no entanto, estes efeitos foram revertidos quando os animais foram tratados com a combinação de vitamina E 200 mg/kg (Tabela 2). A creatinina é um indicador mais sensível para avaliar do dano renal, e assim acredita-se que o herbicida causou lesões renais detectáveis por esse método.

DISCUSSÃO

A integridade do DNA é de extrema importância para a manutenção das funções celulares normais e a perda da estabilidade genômica está relacionada com diversos processos patológicos, principalmente relacionados com o processo da carcinogênese. O ensaio do micronúcleo tem sido amplamente usado para medir genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*. O teste *in vivo* é especialmente relevante porque permite obter maiores informações sobre as condições experimentais, tais como o metabolismo, a farmacocinética e os processos de reparo do DNA. É utilizado primeiro para avaliar a habilidade da substância teste para induzir danos cromossômicos estruturais ou numéricos, ambos associados com o aparecimento e/ou progressão de tumores (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

Segundo Carvalho et al. (2004), o aumento da frequência de micronúcleos é

indicativo de elevação das taxas de mutações, o que está relacionado ao desenvolvimento de carcinomas.

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são um dos principais marcadores biológicos do estresse oxidativo em membranas celulares (DRAPER; HADLEY, 1990).

Os radicais O_2 são produtos da redução, o H_2O_2 e, principalmente o radical OH, são alguns dos responsáveis pela lesão celular, promovendo a peroxidação lipídica, com lesão das mitocôndrias, lisossomos e da própria membrana celular, levando à morte das células. No rim, tais alterações são responsáveis por um aumento da permeabilidade tubular com perda das funções de transporte, bem como redução da fosforilação oxidativa mitocondrial e liberação inapropriada de enzimas líticas lisossômicas, que acelerariam o processo de degradação celular, com conseqüente diminuição da função renal (PERCÁRIO, 2010).

Jasper et al. (2012), em estudos feitos com Roundup® 50 e 500 mg/Kg em camundongos do tipo *swiss*, apresentaram lesões hepáticas relacionadas ao estresse oxidativo e a lipoperoxidação induzida pelo glifosato, com aumento significativo do TBARS. Controle (94 nM/g), glifosato 50 mg/Kg (180 nM/g) e glifosato 500 mg/Kg (303 nM/g). Segundo Langiano e Martinez (2008) em estudos realizados com espécies de peixes (*Piaractus brachypomus* e *Prochilodus lineatus*), o glifosato provocou várias alterações hepáticas, e processos degenerativos e a atividade hepática da enzima catalase em peixes *Prochilodus lineatus* aumentou significativamente no grupo exposto a 10 ppm de Roundup® durante 24 horas.

A catalase evita o acúmulo de metahemoglobina e decompõe peróxido de hidrogênio (espécie reativa de oxigênio (ROS) que causa estresse oxidativo), em água e oxigênio molecular (GAETANI et al., 1989). Quando o organismo estiver passando por algum tipo de estresse oxidativo, a tendência da enzima catalase é aumentar, para tentar neutralizar as EROs.

Em trabalhos anteriores relacionados com as diferentes formulações à base de glifosato, demonstraram que o glifosato pode ocasionar danos oxidativos no fígado, com aumento da atividade de enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase (GPx), Glutathiona redutase (GR), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona-S-transferase (GST), aumento da lipoperoxidação, e redução dos níveis de GSH. Porém estes estudos utilizaram organismos aquáticos, que são sensíveis ao herbicida (MODESTO; MARTINEZ, 2010b; ORTIZ-ORDOÑEZ et al., 2011).

Cavusoglu et al. (2011), administrou uma única dose intraperitoneal (50 mg/kg de peso corporal) de glifosato - Roundup® em camundongos albinos Swiss. Após 15 dias, os camundongos apresentaram dano hepático significativo, relacionados com níveis alterados de glutathiona e aumento da lipoperoxidação.

Poucos estudos foram realizados em mamíferos. De acordo com Cox (1998) a dose letal (DL50) do glifosato Roundup® por via oral em ratos é superior a 4.320 miligramas por quilograma (mg/kg) de peso corporal. Em coelhos sua toxicidade cutânea aguda (DL50) é

maior do que 2.000 mg/kg de peso corporal, também causa irritação na pele e olhos dos mesmos, classificando o glifosato como toxicidade de Categoria III. Se o glifosato for administrado por via intraperitoneal o glifosato será 10 e 20 vezes mais tóxico para os ratos (DL50 de 192-467 mg/kg). Em cães que receberam o glifosato por via intravenosa ocorreu depressão cardíaca.

De acordo com Gehin et al. (2006), em estudos feitos em queratinócitos humanos (HaCaT) com Roundup 3 plus® e glifosato isolado, ocorreu alterações significativas na capacidade antioxidante celular com alterações enzimáticas na catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase, também houve aumento da peroxidação lipídica, porém com a suplementação de N-acetil-L-cisteína, Vitamina C ou Vitamina E, ocorreu aumento das defesas antioxidantes e redução da peroxidação lipídica. Cavusoglu et al. (2011) demonstraram que o extrato de folhas de *Ginkgo biloba* L. (150mg/kg de peso corporal), diminuiu a hepatotoxicidade e peroxidação lipídica induzida pelo glifosato (50mg/kg de peso corporal). O ácido lipóico também foi efetivo, apresentando excelentes propriedades antioxidantes, em estado pró-inflamatório induzido pela contaminação com pesticida, bloqueando a ativação da morte celular programada, restaurando as regiões do cérebro que tiveram os níveis de glutathione e α -tocoferol diminuídos pelo pesticida (ASTIZ et al., 2012).

Assim, como demonstrado por Gluszczak et al. (2007) e Modesto e Martinez (2010) o glifosato pode provocar estresse oxidativo, sobretudo em células de cérebro, músculo e fígado de peixes. Nestes órgãos também foram observadas alterações nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), após a exposição por 96 h nas concentrações de 0.2 ou 0.4mg/L de glifosato. Os níveis elevados de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico induzidos por contaminantes aquáticos, tais como herbicidas também têm sido observados em estudos realizados por LI et al., 2003 e ÜNER et al., 2005.

De acordo com Cattani (2013) em seus estudos sobre alterações bioquímicas no hipocampo de ratos imaturos pela exposição aguda e crônica ao glifosato Roundup®, resultou em aumento dos níveis de TBARS em comparação ao grupo controle indicando fortemente a indução de estresse oxidativo pelo herbicida, com diminuição da GSH.

Além dos efeitos agudos provocados pelo glifosato, podem ocorrer efeitos crônicos, alterações genéticas dos fetos em ratas grávidas, morte da rata, perda de peso, entre outros (AMARANTE Jr et al., 2002). Também pode provocar diminuição da libido, no volume de ejaculação, concentração de espermatozoides, concentração de frutose no sêmen. De acordo com Beuret et al. (2005), a exposição oral a solução de glifosato 1% ocasionou sobrecarga dos sistemas de defesa antioxidante maternos e fetais, aumento nos índices de TBARS, e aumento da enzima GPx na análise do fígado dos fetos.

A vitamina E está sendo considerada o mais potente antioxidante no organismo, ocasionando o retardamento do envelhecimento precoce, estando associada à prevenção de doenças crônicas e protegendo o DNA contra os possíveis danos. A deficiência da vitamina E em ratos ocasionou infertilidade, em coelhos distrofia muscular e em frangos encéfalo malácia cerebral, a sua deficiência também pode ocasionar as doenças crônicas

(PENTEADO, 2003).

O método rotineiramente usado para avaliar a função renal é a mensuração da concentração plasmática de substâncias normalmente excretadas pelos rins. A avaliação dos níveis de ureia e creatinina são os testes mais comumente utilizados na rotina médica veterinária. Segundo Romano (2007), em seu estudo utilizando ratos *Wistar*, o herbicida Roundup® causou comprometimento da função renal e alterações patológicas nesse órgão.

Faria (2013), estudou 49 trabalhadores expostos aos agrotóxicos do município de Divinópolis com média de idade de 42 anos, sendo todos do sexo masculino. Mais de 61% dos trabalhadores utilizavam EPI completo e mais da metade (54%) informou que faz uso do glifosato. Foi encontrado aumento da creatinina sérica em 76.6% e 8.2% de ureia nos trabalhadores pesquisados. A biomonitorização de efeito para a avaliação da exposição ocupacional a agrotóxicos é complexa sendo limitado o estabelecimento do nexo causal entre as alterações de parâmetros laboratoriais e a exposição ocupacional aos agrotóxicos. A avaliação periódica da função medular, hepática e renal deve ser incentivada para prevenir danos à saúde em decorrência da exposição a esses compostos.

Segundo Salbego et al. (2014), as alterações metabólicas também podem intervir no processo de crescimento. O autor atribuiu à redução no crescimento das piavas (*Leporinus obtusidens*) exposta ao glifosato a vários fatores: menor exploração do nutriente disponível, redução do oxigênio nos tecidos confirmou por resposta fermentativa no fígado e músculo. Estas alterações sugerem que, para a manutenção do peixe em água contaminada com glifosato, uma grande demanda de energia é necessária. Os resultados obtidos permitem concluir que baixo crescimento observado em piavas expostas ao glifosato pode estar relacionado à mudança na atividade de enzimas digestivas. A atividade das enzimas digestivas em todas as partes do trato gastrointestinal aumentou significativamente em piavas expostas a ambas as concentrações de glifosato. A exposição a longo prazo (90 dias) ao glifosato 1.0 ou 5.0 mg L⁻¹ não afetou o consumo de ração, mas reduziu o crescimento e ocasionou alteração hematológica

Para Benedetti et al. (2004) a exposição oral de ratos *Wistar* machos ao glifosato-Biocarb® por um período de 75 dias ocorreu o aumento dos níveis de enzimas hepáticas ALT e AST e com aumento de tecido conjuntivo e a deposição de colágeno no fígado, ocasionando dano hepático significativo. Em contradição com Larsen et al. (2012), que em suas análises feitas com ratos *Wistar* expostos durante 30 ou 90 dias com baixos níveis de exposição ao herbicida, não houve alterações no fígado, rins, nem no intestino delgado, e a quantidade de TBARS após o tratamento com o herbicida foi semelhante ou menor do que os resultados obtidos para o grupo controle.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que o herbicida Trop® e o princípio ativo glifosato isolado, em uma única dose, não causaram danos ao DNA, no entanto, são capazes de

alterar os parâmetros oxidativos, com aumento nos níveis de TBARS, diminuição da GSH e da enzima catalase, sendo que a associação da Vitamina E causa uma melhora nesses parâmetros. A função hepática não apresentou alteração significativa ao contrário da função renal apresentou alteração da creatinina. Com relação ao mecanismo de toxicidade das formulações de glifosato, estes ainda não foram completamente elucidados, por isso, necessitam de pesquisas contínuas para que a toxicidade em mamíferos seja completamente esclarecida. Sugerimos para próximos testes, não um tratamento agudo e sim um tratamento crônico e também a utilização de novas concentrações de antioxidantes para que se prossigam estudos nesse assunto tão importante.

REFERÊNCIAS

AEBI, H.L. Catalase *in vitro*. In: Packer, L. (Ed.), **Methods in Enzymology**. Academic Press, Orlando.105: 121–126, 1984.

AMARANTE Jr, O.P; SANTOS, T.C.R; BRITO, N.M; RIBEIRO, M.L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, São Paulo, 25(4): p.20, 2002.

ARANHA, R. C. Potencial de toxicidade dos herbicidas glifosato e imazetapir em *Colossomama cropomum* (PISCES). **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal do Oeste do Pará. Setembro de 2013.

ASTIZ, M; ALANIZ, M.J; MARRA, C.A. The oxidative damage and inflammation caused by pesticides are reverted by lipoic acid in rat brain. **Ecotoxicology Neurochemistry International**. 61: 1231–1241, 2012.

ARMILIATO, N. Toxicidade celular e bioquímica do glifosato sobre os ovários do peixe *Daniorerio*. **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. Florianópolis. 2014.

BAKRY, F.A; ISMAIL SOMAYA, M; EL-ATTI.MAHMOUD S.A.B.D. Glifosato herbicide induces genotoxic effect and physiological disturbances in *Bulinus truncatuss* snails. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. Elsevier. 2015.

BALLESTEROS, M.L; WUNDERLINAND, D.A; BISTONI, M.A. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. **Ecotoxicology Environmental Safety**. 72: 199-205. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2008.01.008, 2009.

BASSO, E. G. De. P. et al. Avaliação do dano no cérebro de camundongos adultos expostos a material particulado. Salão do Conhecimento. Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. 2013.

BENEDETTI, A.L. et al. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb. **Toxicology Lett**. 153(2): 227–232. DOI: 10.1016/j.toxlet.2004.04.008, 2004.

BEURET, C.J. et al. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant

rats and their fetuses. **Reproductive Toxicology**. 19: 501–504.
DOI:10.1016/j.reprotox.2004.09.009, 2005.

BIRD, R.P; DRAPER, H.H. Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination. **Methods Enzymology**, 105: 299–305. PMID:6727668, 1984.

CARVALHO, A. C. et al. Melanoma hereditário: prevalência de fatores de risco em um grupo de pacientes no Sul do Brasil. **Brazilian Annals of Dermatology**, v. 79, n. 1, p. 53-60, 2004.

CATTANI, D. Mecanismos envolvidos na excitotoxicidade de glutamatérgica induzida pela exposição aguda ou crônica ao Roundup® sobre o hipocampo de ratos imaturos. Universidade Federal de Santa Catarina. f. 126. **Dissertação (Mestrado)**. Florianópolis, p:73-88, 2013.

COSTA, E.L de O; PETROIANU, A; MAGELA, G.de A J. Influência da exclusão do íleo terminal nas funções hepáticas e renais em presença de colestase extra-hepática. **Rev. Col. Bras. Cir.** vol.41 no.2 Rio de Janeiro Mar./Apr. 2014.

COX, C. Glyphosate (ROUND UP). Northeast Coalition for Alternatives to Pesticides. **Journal of Pesticide Reform/Fall**. Eugene, Oregon. 18(3): 344-504, 1998.

DAVID, C. DE. A quercetina protege o fígado na lesão hepática induzida por Tioacetamina (TAA) e suas complicações. **Tese (Doutorado)**. Universidade do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2011.

DRAPER, H. H; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymology**, 186: 421-431. PMID:2233309, 1990.

FARIA, V.H.F. Glifosato: desenvolvimento de metodologia para determinação em soja e milho e avaliação de parâmetros laboratoriais em trabalhadores expostos a agrotóxicos. **Dissertação (Mestrado)**. Faculdade de Farmácia da UFMG. 2013.

FAUS, I. et al. Proteinkinase GCN2 mediates responses to glyphosate in Arabidopsis. **BMC Plant Biol.** 15, 1 e12, 2015.

GAETANI, G.F. et al. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood**. 73: 334-339. PMID: 2491951. 1989.

GEHIN, A; GUYON, C; NICOD, L. Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. **Environ. Toxicol. Pharmacol. Elsevier**. 22(1): 27–34. DOI:10.1016/j.etap.2005.11.003, 2006.

GAW, A; COWAN, R. A; O`REALLY, D. S. J; STEWART, M. J; SHEPHERD, J. **Bioquímica clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

GLUSCZAK, L., D.S. et al. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. 146C: 519–524. DOI:10.1016/j.cbpc.2007.06.004, 2007.

JASPER, R. et al. Evaluation of biochemical, hematological and oxidative parameters in mice exposed to the herbicide glyphosate-Roundup. **InterdiscipToxicol**. v. 5(3), p. 133

140, 2012.

LANGIANO, V.C; MARTINEZ, C.B. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, Toxicology & Pharmacology*. v.147. n. 2, p. 222-231, 2008.

LARSEN K, NAJLE R, LIFSCHITZ A, VIRKEL G. Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2012 Nov;34(3):811-8. doi: 10.1016/j.etap.2012.09.005. Epub 2012.

LI, W; D, YIN, Y, ZHOU, S, HU AND L, WANG. 3,4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environmental Saf*. 56: 251–255. DOI: 10.1016/S0147-6513(02)00117-3, 2003.

KRISHNA G, HAYASHI M. KRISHNA G, HAYASHI M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res*. 2000 Nov 20;455(1-2):155-66. *Mutat Res*. Nov 20;455(1-2):155-66, 2000.

MAHER, P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Research Reviews*. 4(2):288-314. PMID: 15936251, 2005.

MODESTO, K.A; MATINEZ, C.B.R. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*. 78: 294-299. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.10.047, 2010a.

ORTIZ-ORDONEZ, E. et al. Effect of Yerbimat herbicide on lipid peroxidation, catalase activity, and histological damage in gills and liver of the freshwater fish *Goodea atripinnis*. *Arch. Environmental Contamination and Toxicology*. 1(3): 443–452. DOI: 10.1007/s00244-011-9648-0, 2011.

PENTEADO, M.V.C. **Vitaminas, aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. São Paulo: Manole. p.123-155. ISBN: 852041544X, 2003.

PEREIRA, L.E. et al. Efeito do glifosato na absorção de zinco pela soja. **IX Jornada Acadêmica da Embrapa**. Londrina. Paraná; UNOPAR. 2014.

PERCÁRIO, S. Prevenção do estresse oxidativo na síndrome de isquemia e reperfusão renal em ratos com suplementação nutricional com antioxidantes. *Rev. Nutr*. Campinas. 23(2):259-267.mar./abr.. 2010.

ROMANO, R.M. Efeitos da exposição pré-púbere ao herbicida glifosato no desenvolvimento reprodutivo de ratos Wistar machos. **Dissertação (Mestrado)**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2007.

SALBEGOI, J. et al. Glyphosate on digestive enzymes activity in piava (*Leporinus obtusidens*). v.44, n.9, p.1603-1607, set, 2014. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.44, n.9, p.1603-1607, set, 2014

SCHMID W. The micronucleus test. *Mutat Res*; 31: 9-15, 1975.

TIETZE, F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical**

Biochemistry, Nova Iorque. 27: 502-522, 1969.

UBESSI, LD. et al. Use of protective equipment by farmers who use pesticides in relation to health problems. **J Nurs UFPE online**. Recife.9(4):7230-8.Apr. 2015.

Agradecimentos: Comitê de ética da UNOESC

Financiadores: PIBIq/CNPq