

**VI-035 - MICROCISTINAS, AFLATOXINA B₁ E HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO: TOXICIDADE E EFEITO NA FERTILIZAÇÃO DE PEIXE****Cleiton Inácio Ramos⁽¹⁾**

Zootecnista (Universidade Estadual de Londrina-2007) e estudante de pós graduação de Mestrado do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina. Possui experiência na área de Zootecnia, produção e reprodução de peixes, fito e zooplâncton segurança alimentar, micotoxinas e ficotoxinas.

Emília Kiyomi Kuroda

Engenheira civil (Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo, 1999), mestre e doutora em Hidráulica e Saneamento (2002 e 2007) pela Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo. Docente do Departamento de Construção Civil do Centro de Tecnologia e Urbanismo da Universidade Estadual de Londrina.

Ilce Mara de Cyllos Colus

Bióloga (Universidade de São Paulo), Mestre e Doutora em Ciências Biológicas. Docente do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina.

Ken-ichi Harada

Docente da *University of Meijo, Faculty of Pharmacy*, Nagoya – Aichi, Japão.

Elisa Yoko Hirooka

Farmacêutica (Universidade Estadual de Londrina), Mestre e Doutora em Ciências de Alimentos, Docente do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina

Endereço⁽¹⁾: Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rod. Celso Garcia Cid PR445 Km380 Campus Universitário. Cx Postal 6001 CEP 86051-990. E-mail: cleitoninacioramos@hotmail.com

RESUMO

O aumento universal na demanda de produtos de pescado requer implementação de práticas capazes de assegurar a qualidade do produto final, sendo prioritário o manejo adequado aliado ao rigoroso controle de qualidade d'água. A adição de ração eleva o teor de nutrientes d'água, com ênfase ao fósforo e nitrogênio, resultando na eutrofização, morte de peixes e aumento de cianobactérias, com ênfase a *Microcystis* spp. produtoras de microcistinas (MCs). O acúmulo tecidual de MCs em peixe pode potencializar o efeito de aflatoxinas (AFs) ingeridas através do consumo de ração. Em adição, o uso de herbicidas a base de glifosato é comum na agricultura; embora se acredite que seja seguro para utilização ambiental, pesquisas demonstraram efeito mutagênico em camundongo e hepatotóxico em carpa. Considerando que AFs sejam potente iniciador de câncer hepático, aliado ao efeito promotor das MCs e uso contínuo de glifosato, a co-ocorrência dessas substâncias representaria um perigo em potencial na qualidade dos pescados e saúde humana. O trabalho propõe investigar efeitos tóxicos de aflatoxina B₁ (AFB₁), microcistina-LR (MC-LR) produzida por *Microcystis aeruginosa* TAC 95, herbicida comercial Roundup® (princípio ativo glifosato) e possível efeito combinado destes compostos em ovos de peixe e em respectivo desenvolvimento larval. O efeito da interação destes compostos foi observado em tilápia (*Oreochromis niloticus*), já que esta espécie é a mais cultivada do Brasil. MC-LR adicionada no ensaio laboratorial *in vivo* consistiu-se de extrato de *M. aeruginosa* TAC 95 cultivada em meio ASM-1 e a concentração foi quantificada por imunoensaio ELISA. A exposição aos contaminantes foi iniciada com ovos em placas de Petri, 5ng/mL de AFB₁ por 1 hora, seguida da fase de absorção do saco vitelínico das larvas em placas de cultura de célula sob concentrações determinadas em estudo prévio. Em relação ao perfil reprodutivo foram investigadas alterações teratogênicas em ovos, larvas e pós-larvas através de análise macroscópica e microscópica e concluiu-se que mesmo em doses consideradas baixas, os contaminantes utilizados mostraram-se capazes de causar malformações e influenciar no desenvolvimento da tilápia.

PALAVRAS-CHAVE: Microcistina, Aflatoxina, Glifosato, Teratogênese, Tilápia.



INTRODUÇÃO

A piscicultura nacional expressiva concentra-se nas regiões Sul e Sudeste, com destaque aos Estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Goiás. São Paulo e Paraná contribuem com 60 % da produção nacional, sendo que o primeiro Estado representa mais de 45 % da produção de peixe de água doce (COELHO, 1997). A demanda nacional dos produtos de pescado vem aumentando, sendo assunto prioritário implementar técnicas que assegurem a sustentabilidade e qualidade do produto final através das práticas de manejo, rigoroso controle de qualidade e sanitário de água e insumos, desde processamento a comercialização de ração.

A fase crítica de produção com maior mortalidade ocorre na larvicultura, reduzindo a taxa de sobrevivência em habitat para 35 % em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e, 36 % em tilápia (*Oreochromis niloticus*) no final de um mês (TESSER, 2006). Fatores intrínsecos e extrínsecos envolvidos com alta mortalidade são desnutrição, manejo inadequado, predação, falta de melhoramento genético, enfatizando a importância de larvas saudáveis e resistentes, aliado ao manejo sustentável.

O uso de herbicidas a base de glifosato é comum, principalmente na produção de soja, algodão e milho, bem como em áreas industriais, comerciais e florestais não relacionadas à prática agrícola. Acredita-se que o composto ativo do glifosato seja seguro para utilização ambiental devido à rápida decomposição. O glifosato caracteriza-se como glicina substituída, capaz de afetar o ciclo do ácido shiquímico bloqueando a síntese de aminoácidos aromáticos e matando a planta, mas não afetaria o humano por não apresentar esta rota metabólica, já que estes tratam-se de aminoácidos essenciais. Porém, pesquisas demonstram que a exposição a herbicidas a base de glifosato pode causar efeito mutagênico em camundongo e hepatotóxico em carpa.

A eutrofização artificial pode resultar do manejo exacerbado na piscicultura, principalmente de arraçoamento demasiado, aumentando o teor de nutrientes, com ênfase ao fósforo e nitrogênio. A alteração física e química d'água causa déficit na qualidade sensorial e mortandade de peixe e aumento de cianobactérias como *Microcystis* potencialmente produtora de microcistinas (MCs) promotoras de câncer hepático.

A fase de larvicultura, a mais frágil devido ao alto índice de mortalidade, pode ser causada pela alta susceptibilidade a contaminantes e merece atenção especial. No aspecto da cadeia produtiva de alimento, a co-ocorrência de aflatoxina (AF), um potente iniciador de hepato-câncer, oriunda da ingestão de ração contaminada, combinada com contaminantes ambientais em água, a exemplo de MCs e glifosato, representariam um risco potencial na reprodução e sobrevivência de peixe, principalmente na fase inicial de criação. Aliado a isso, o contínuo arroçamento repercutiria na qualidade de pescado, ou seja, a segurança de alimentos seria comprometida pelo acúmulo de MC nos tecidos de peixe, cujo efeito poderia ser potencializado pela aflatoxina (AF) de difícil eliminação tecidual, afetando indiretamente a saúde do consumidor humano.

Tendo como base, o perigo da co-ocorrência dos indutores cancerígenos e de genotoxicidade em níveis passíveis de ocorrência em ambiente aquático destinado à produção de peixe, a pesquisa visa estudar os possíveis efeitos combinados dos fatores no desenvolvimento embrionário e larval de tilápia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animal experimental

Os ovos fecundados de tilápia foram coletados na Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina e 48 ovos foram aleatoriamente distribuídos por tratamento. Os ovos foram coletados após a fase de gástrula, devido à alta susceptibilidade à agitação com desprendimento celular nas fases anteriores, resultando na morte do embrião. O experimento foi realizado em microplaca (*Corning Incorporated* 3524, NY, EUA) para cultivo celular de 24 poços (1 ovo / poço com volume de 2,5 mL). As microplacas foram mantidas à 25° C durante 12 dias (BOD Tecnal, modelo TE-391), com reposição diária de meio, para impedir o acúmulo de metabólitos tóxicos, principalmente de CO₂ e NH₃.

O meio básico para a manutenção de ovos foi composto por água reconstituída de acordo com ABNT-NBR 15088, 2004 para ensaios toxicológicos em peixe (Tabela 1). Os contaminantes serão acrescidos de acordo com o protocolo de tratamento



Tabela 1: Água reconstituída (ABNT-NBR 15088, 2004).

Constituintes	Concentração (mg)	Volume de solução estoque para 1L de água reconstituída (mL)
Solução estoque A		20
CaSO ₄ . 2H ₂ O	1500	
Solução estoque B		10
KCl	200	
NaHCO ₃	4.800	
MgSO ₄ . 7H ₂ O	6.100	
Completar para 1 L com água ultra-pura		

Aflatoxina

Aflatoxina (AFB₁, 1mg, Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA) foi dissolvida em metanol e dividida em 100 µg / frasco. A concentração de AFB₁ em metanol foi quantificada a 360 nm (espectrofotômetro UV-VIS Cintra 20, GMB, Melbourne, Austrália). Para bioensaio, no momento de uso, 1 µg de AFB₁ será redissolvida em 0,5 mL de metanol sob sonicação por 15 min (HENDRIKS, 1982) e transferida para frasco âmbar para volume final de 200 mL (concentração final de 5 ng/mL de AFB₁ em água reconstituída). Para o ensaio de exposição, os ovos de peixe serão imersos por 1 hora em 20 mL de água reconstituída contendo 5 ng/mL de AFB₁ em placas de Petri.

Herbicida comercial a base de glifosato

Herbicida comercial à base de glifosato utilizado será Roundup® Original (Monsanto, St. Louis, EUA) sob forma de solução para imersão contendo 5 µL de Roundup® por litro de água reconstituída, de acordo com ensaios prévios realizados por Hashimoto (2007) e Francabandiera (2007). O Roundup Original, registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob n.º 00898793, é um herbicida sistêmico de ação total para aplicação em pós-emergência, derivado de glicina e concentrado solúvel; é composto de sal de isopropilamina de N-(fosfometil) glicina (480g/L), equivalente ácido de N-(fosfometil) glicina (GLYPHOSATE) (360 g/L) e ingredientes inertes (684 g/L).

Microcystis aeruginosa TAC 95

A cepa toxigênica de *Microcystis aeruginosa* TAC95 a ser utilizada no bioensaio foi fornecida pelo Prof. Dr. Ken-ichi Harada do Laboratório de Ciências Ambientais, *Faculty of Pharmacy, University of Meijo*, Nagoya – Aichi, Japão. A cepa caracteriza-se pela produção predominante de microcistina-LR (MC-LR) em elevadas concentrações. A cultura foi centrifugada a 3000xg por 10 min e, o *pellet* obtido, congelado a -20° C e liofilizado (Liotop L101 da Liobras, São Carlos, SP, Brasil). O material liofilizado foi mantido a -20° até a preparação do extrato de *M. aeruginosa* TAC95, procedendo a análise de microcistina anteriormente à contaminação de ovos.

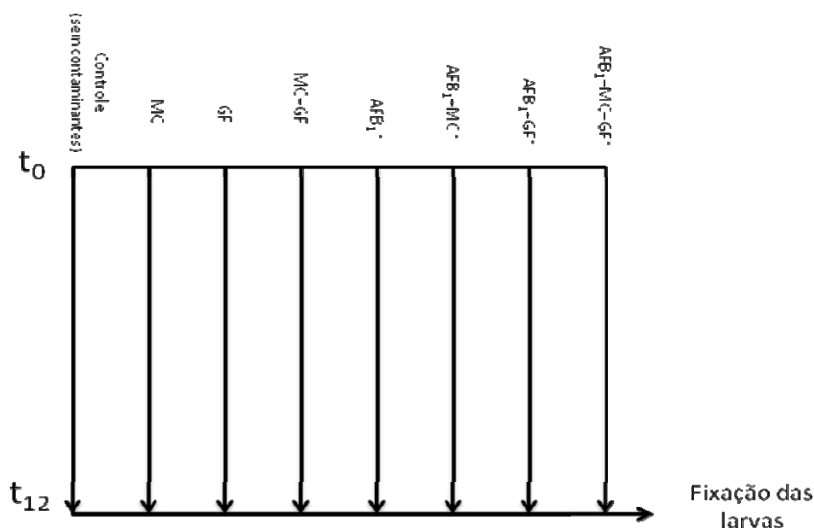
Para quantificação de MCs, foram adquiridos kits de placas (Beacon Analytical Systems Inc.) para realização de testes c-ELISA. A placa de reação contém 96 poços, o volume requerido de amostra é de 50 µL por poço e o tempo médio gasto no processo para análise após preparação das amostras é da ordem de 90 min. As amostras foram previamente filtradas em filtro tipo GF/C ou similar e em seguida, diluídas com água deionizada em proporções variadas, de forma a possibilitar a quantificação pela curva de calibração construída para a faixa entre 0 e 2,0 µg/L de MCs totais. O limite de detecção do método é de 0,16 µg/L.

Delineamento experimental

Os tratamentos delineados no bioensaio foram preconizados, simulando-se uma provável rota de multi-contaminação ambiental no decorrer da cadeia produtiva de peixe. Assim, a experiência iniciou-se, expondo-se os ovos de tilápia ao contaminante inicial, provavelmente advinda de ração ingerida pela matriz (5ng/mL de AFB₁ por 1 hora em placa de Petri), seguida de exposição simultânea a Roundup® (glifosato) e microcistina (extrato celular concentrado e liofilizado de *M. aeruginosa* TAC 95) em microplaca para cultura de célula. No ensaio de imersão em mistura da solução de glifosato e MCs, cada unidade de tratamento constituir-se-á de 1 ovo mantido num poço em placa de cultura com água reconstituída e solução teste, com renovação do meio a cada 24 horas.



Oito tratamentos foram formulados seguindo-se o protocolo descrito na Figura 1, sendo um destes tratamentos o controle negativo (sem contaminação). Cada tratamento conterá 48 unidades experimentais sem contato entre si, mas sob as mesmas condições de ensaio e, sob concentração de contaminantes aplicada de acordo com os estudos anteriores preconizados por KAMOGAE (2007), HASHIMOTO (2007) e FRANCOBANDIERA (2007), para toxicidade crônica e subcrônica em tilápia.



AFB₁: Aflatoxina B₁

MC: Microcistina em extrato celular de *M. aeruginosa* TAC 95

GF: Glifosato

*: 1 h em AFB₁ (5ng/mL), seguido de exposição a MC (5ng/mL) e/ ou GF (5 uL/mL)

Figura 1: Delineamento experimental com esquema de exposição dos ovos de tilápia a contaminantes.

Após exposição a 5ng/mL de AFB₁ por 1 hora em placa de Petri, cada ovo dos oito tratamentos foi transferido para poço da placa de cultivo celular para o ensaio de exposição simultânea a glifosato e MC (controle, MC, GF, MC+GF, AFB₁, AFB₁+MC, AFB₁+GF e AFB₁+MC+GF).

A análise iniciou-se investigando a alteração macroscópica *in vivo* dos ovos de tilápia, assim como a eclodibilidade de ovos fecundados mantidos em placas de cultura celular, após exposição à AFB₁. O monitoramento diário perante viabilidade e efeito teratogênico em larvas até absorção de saco vitelínico teve a duração de 12 dias, quando todos os órgãos vitais já estavam desenvolvidos, estando a maioria das larvas aptas à alimentação exógena, portanto aumentando também o contato com outros contaminantes ambientais.

RESULTADOS

A cultura de *M. aeruginosa* foi concentrada por centrifugação, congelada, liofilizada e ressuspensa em solução de água ultrapura. A quantificação foi realizada com o teste de imunoenensaio ELISA, o coeficiente de correlação (R^2) da curva de quantificação foi de 0,9972 e a concentração de microcistinas totais correspondeu a 92 mg/L. Efetuou-se a diluição desta solução para obter-se a concentração de 5 ng/mL e então contaminar os ovos e larvas.

A priori, os tratamentos que entraram em contato com aflatoxina demonstraram eclosão prematura, como pode ser observado no gráfico, enquanto os outros contaminantes induziram a uma eclosão mais tardia. No entanto ao quinto dia de ensaio, todos os animais do tratamento controle já haviam eclodido e ao sexto dia todos os animais dos outros tratamentos também haviam eclodido.

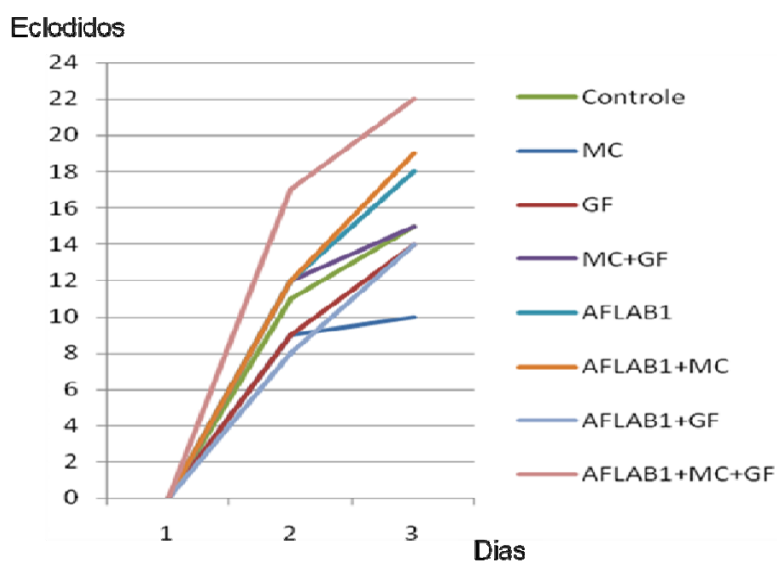


Figura 2: Eclosão durante os 3 primeiros dias de contaminação.

Eclosão tardia leva a produção de larvas mais desenvolvidas e a eclosão precoce causa a liberação de embriões imaturos, a maioria dos quais são incapazes de sobreviver (WOYNAROVICH, 1989).

A eclosão prematura é indicio de um mecanismo de defesa. O peixe dentro do ovo não possui mobilidade e depende de cuidados maternos, no entanto o período embrionário é uma fase mais sensível que a fase adulta e quando a matriz porta os ovos na cavidade bucal, ela não se alimenta e encontra-se em estado debilitado, incapaz de diferir concentrações muito baixas de contaminantes, que talvez possa ser tóxico a sua prole. Ao eclodir prematuramente, o embrião ganha mobilidade e capacidade de se locomover para um ambiente menos contaminado para completar sua formação e dar continuidade ao seu ciclo de vida.

Algumas substâncias, como o tanino, tem a propriedade de adstringência em proteínas da superfície do ovo, tornando-as inacessíveis a ação das enzimas que dissolvem a membrana deste, com isso o ovo retém o embrião em seu interior por mais tempo (WOYNAROVICH, 1989).

Foram observadas as mal formações citadas pela literatura como desvios da coluna vertebral (para os lados- fig. 3D e para baixo- fig. 3B), megalocardia (fig. 3C) e edema no pericárdio. Também foi possível observar ocorrência de convulsões conforme descrita por Perdie, 2009. As larvas foram acompanhadas diariamente até o 12º dia onde mais que 90% já estavam em estágio pós-larval.

O estágio pós-larval é caracterizado por HAFEZ et HAFEZ, 2004 onde é definido que o peixe no estágio larval ainda não possui boca, intestino, ânus, brânquias e bexiga natatória, os animais não nadam como peixe adulto e no caso da tilápia, ficando estática no fundo do recipiente com nados rápidos até a superfície e volta ao fundo do recipiente. Ao atingir a fase de pós-larva, o saco vitelínico já está completamente absorvido e a bexiga natatória já é funcional, o animal consegue controlar sua natação como um animal adulto e está apto para receber alimentação exógena.

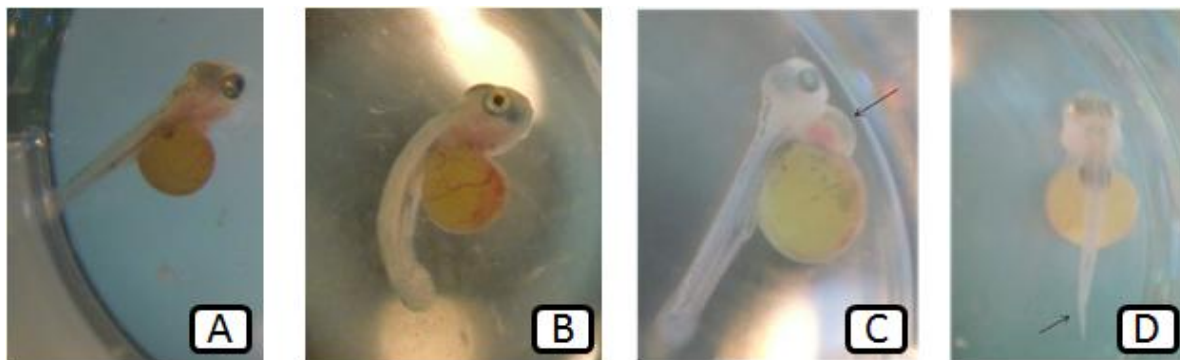


Figura 3: A-Larva normal; B- Coluna vertebral desviada; C- Megalocardia; D- Cauda desviada.

Discutem-se vários parâmetros na produção animal, porém o mais importante é a reprodução, pois se essa não ocorrer, os outros valores não possuem significado algum. No entanto, durante toda a fase de absorção do saco vitelínico em que ocorreu a contaminação (12 dias), todos os tratamentos apresentaram sobrevivência acima de 80% (figura 4), superior à sobrevivência de larvas em seu habitat natural e em cultivo comercial de 38%(Hayashi, 2002).

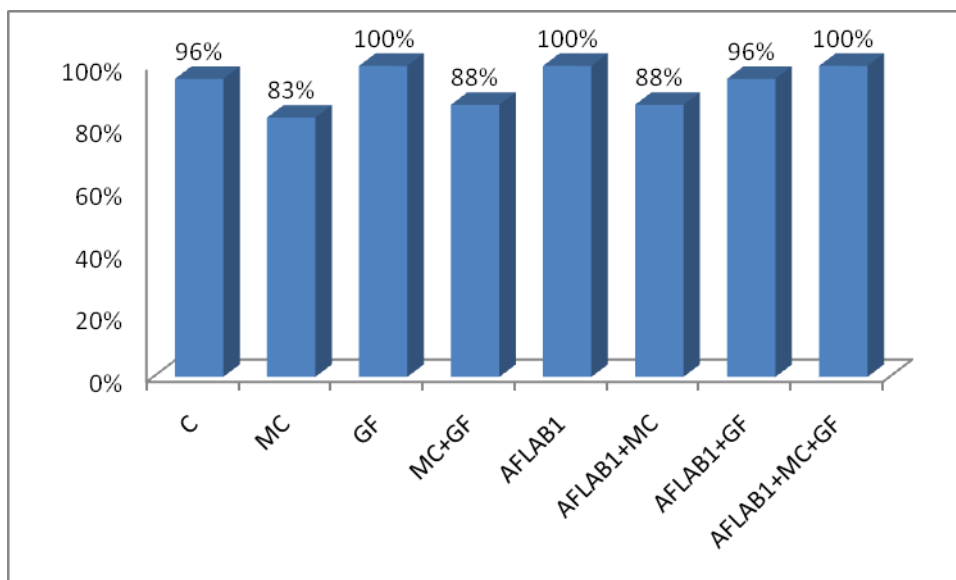


Figura 4: Porcentagem de sobrevivência das larvas ao 12º dia.

CONCLUSÕES

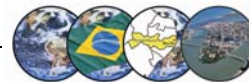
Com base no trabalho realizado, concluiu-se que:

Mesmo em concentrações baixas os contaminantes testados apresentaram propriedades teratogênicas;

Apesar de não influenciar a mortalidade, os contaminantes apresentaram alto potencial para causar malformações;

As malformações não foram específicas para os contaminantes ou a combinação deles;

Devido aos peixes estarem abaixo do homem na escala evolutiva, possuem células menos diferenciadas e com isso uma maior capacidade de regeneração, sendo que a maioria das malformações identificadas regeneraram-se permitindo o desenvolvimento normal do peixe no estágio seguinte;



Recomenda-se aprofundar o estudo para averiguar possíveis alterações em órgãos, tecidos, células ou na fisiologia do animal. A utilização de um mamífero, como camundongo, para experimentos iria aproximar os resultados encontrados aos possíveis efeitos em humanos;

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria José Sparça Salles pela ajuda indispensável, aos técnicos da Fazenda Escola da UEL e aos órgãos financiadores CAPES, CNPq e Fundação Araucária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FRANCOBANDIERA, A. I. **Genotoxicidade Subcrônica de Microcystis aeruginosa, Aflatoxina B1 e Herbicida à Base de Glifosato em Tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus)**. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciência de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.
2. HAFEZ, S. E., HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7ª Edição, São Paulo, Editora Manole, 2007.
3. HASHIMOTO, E.H., SANTOS, M.A., ONO, E.Y.S., HAYASHI, C., BRACARENSE, A.P.F.R.L., HIROOKA, E.Y. Bromatologia e contaminação com fumonisina e aflatoxina em rações utilizadas na piscicultura da Região de Londrina, estado do Paraná, Brasil. **Semina. Ciências Agrárias**. V.24.n1. 123-134.2003.
4. HENDRICKS, J.D. Chemical carcinogenesis in fish. In Aquatic toxicology. Ed. WEBER, L.J. p.149-211. **Raven Press**. New York, 1982.
5. KAMOGAE, M.; HASHIMOTO, E. H.; MILLET, A. P.; FRANCOBANDIERA, A. I.; PÁDUA, C. G. de ; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. do C.; COLUS, I. M. de S.; ITANO, E. N.; KAWAMURA, O.; TSUTSUMI, T.; NAGATA, S.; HARADA, K.-I.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. Imunoistoquímica: detecção de microcistina em tilápia exposta ao extrato de Microcystis aeruginosa (Cyanobacteria). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n.3, 2007.
6. TESSER, M. B. & PORTELLA, M. C. Ingestão de ração e comportamento de larvas de pacu em resposta a estímulos químicos e visuais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.5, p.1887-1892, 2006.
7. WOYANAROVICH, E., HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais**. FAO/CNPq, Brasília, 1989.