

TEMPERATURA CRÍTICA MÁXIMA DE EMBRIÕES DE *Austrolebias nigrofasciatus* EXPOSTOS AO HERBICIDA ROUNDUP®

LUIZE REAL LANSINI¹; BRUNA DE CASTRO KNOPP²; YURI DORNELLES ZEBRAL³; RICARDO BERTEAUX ROBALDO⁴

¹ Universidade Federal de Pelotas – lrl09@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – brunaknopp@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas - yurizebral@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – ricardo_robaldoufpe@ufpel.tche.br

1. INTRODUÇÃO

Austrolebias nigrofasciatus Costa & Cheffe, 2001 é uma espécie de água doce pertencente à família Rivulidae, ordem Cyprinodontiformes. As espécies que constituem a família possuem elevado grau de endemismo e estão, em sua maioria, ameaçados de extinção (COSTA, 1998). São conhecidos popularmente como peixes anuais, visto que ocorrem em poças alagáveis que secam durante certos períodos do ano. Neste ambiente estão sujeitos a grandes oscilações diárias de variáveis como pH, oxigênio dissolvido e principalmente temperatura, que chega a apresentar gradientes de até 20°C em um dia. Para tolerar estes ambientes é exigido elevado gasto energético, provavelmente próximos dos limites térmicos. Dentro desse contexto, as populações de Rivulidae estão mais susceptíveis aos danos causados pelo processo de aquecimento global. Sendo assim, trabalhos que investigam as ações da temperatura sobre a fisiologia de Rivulidae possuem relevância para a conservação do grupo. A temperatura crítica máxima (CTMax) é uma ferramenta que pode ser utilizada para o estudo do desempenho térmico de peixes. Representa a temperatura limite a qual um indivíduo pode ser exposto após elevação térmica gradual antes de morrer (RIBEIRO et. al. 2012).

O Rio Grande do Sul possui forte tradição em monoculturas empregando agrotóxicos, os quais acabam por gerar degradação e descaracterização ambiental. O Roundup® é o agrotóxico mais vendido no mundo e um dos mais utilizados na região para o controle de plantas daninhas. Possui em sua formulação o glifosato como princípio ativo, acompanhado de adjuvantes. Sua ação é não seletiva e pós-emergente, inibindo uma enzima comum a todos os vegetais (WOODBURN, 2000; HELANDER; SALONIEMI; SAIKKONEN, 2012). No que se relaciona a vertebrados, algumas ações deletérias já foram comprovadas, sendo elas: desregulação endócrina, causada pela ação do glifosato (WALSH et al., 2000), e aumento do estresse oxidativo causado por componentes adjuvantes (CAVALCANTE; MARTINEZ; SOFIA, 2008).

Em síntese, a temperatura é uma característica ambiental de extrema importância para os peixes anuais. Levando isto em consideração, este trabalho objetiva estudar a ação do herbicida Roundup® sobre a resistência térmica de *A. nigrofasciatus*, em busca de dados relevantes para estratégias de conservação do grupo.

2. METODOLOGIA

Animais experimentais

Os embriões utilizados no experimento foram obtidos através da desova de 5 casais de *A. nigrofasciatus* coletados em um charco no Campus Capão do Leão da Universidade Federal de Pelotas, sob licença do IBAMA/ICMBio (no. 15108-1). Todos os embriões se encontravam no mesmo estágio de desenvolvimento (estágio 43, pré-eclosão) (WOURMS, 1972).

Tratamentos

Foram utilizados dois tratamentos, um controle (n=12) com embriões que não passaram por exposição e um segundo tratamento (n=9) no qual os embriões foram expostos durante 96h a uma concentração de 1ppm de Roundup Transorb R[®]. Ambos os tratamentos foram divididos em repetições que continham três embriões cada. O controle continha quatro repetições e a exposição três repetições.

Desenho experimental

Após 96h de exposição, cada embrião foi individualmente colocado em uma placa de petri contendo 14mL de água a 20°C. Em seguida, a placa contendo o embrião era posta em um estereomicroscópio para obtenção do CTMax. A taxa de aquecimento da água era anotada a cada 30 s.

Obtenção do CTMax

A CTMax de cada embrião foi obtida a partir do aquecimento fornecido pela lâmpada de um estereomicroscópio (1,3 °C/minuto \pm 0,4). Para tal, o equipamento permanecia ligado até alcançar a temperatura constante de 56°C (temperatura máxima fornecida pela luz do estereomicroscópio) para que então fosse iniciado o aquecimento dos embriões. Os animais eram aquecidos até que se observasse ausência de batimentos cardíacos (através do estereomicroscópio) por 5 s (*endpoint*). Confirmado esse fato, a temperatura na qual o embrião se encontrava era anotada (CTMax) e o embrião retornava para água a 20°C. As observações foram realizadas em testes cegos onde o observador (mesmo pessoa durante todo o experimento) não sabia qual era o tratamento nem tinha acesso à temperatura na qual a água se encontrava. O intuito do teste cego foi de minimizar os efeitos do observador sobre os resultados, visto que a interpretação do *endpoint* envolve análise subjetiva.

Análise estatística

Os dados são apresentados na forma de média \pm desvio padrão. Os dados referentes às taxas de aquecimento foram testados mediante ANOVA (uma via), após terem sido feitos os testes de Kolmogorov-Smirnov (normalidade) e Levene (homogeneidade da variância). Diferenças significativas entre médias foram determinadas pelo emprego do teste *Post Hoc Unequal N HSD*. Os dados acerca das CTMax foram testados a partir de testes t e correlação de Person. Toda as análises do trabalho foram feitas a partir do programa Statística 7.0[®]. Todos os testes foram considerados sob um nível de significância de 95% (p<0,05).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Taxas de aquecimento

As taxas de aquecimento, tanto entre cada repetição quanto entre cada tratamento, não apresentaram diferença estatística. Pode-se concluir, portanto, que as diferenças observadas entre os tratamentos não foram provocadas por variações nas taxas de aquecimento experimentadas por cada embrião, mas sim pela exposição em si. Tal cuidado em relação a diferenças nas taxas de aquecimento se relaciona ao fato de que a intensidade dos aquecimentos pode acabar por influenciar na CTMax (RIBEIRO et. al. 2012), sendo então um fator de confusão para a metodologia.

CTMax dos embriões

As CTMax médias do grupo controle e da exposição foram $38,20 \pm 1,26^\circ\text{C}$ e $36,12 \pm 1,09^\circ\text{C}$ respectivamente e demonstraram correlação negativa em relação aos tratamentos (Correlação de Person: $r = -0,671$; $p = <0,001$), além de terem sido estatisticamente diferentes entre si (teste t: $t=3,947$; $p = <0,001$). Apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas entre as taxas de aquecimento, estas influenciaram os grupos controle (Correlação de Person: $r = -0,320$; $p = <0,001$) e exposição (Correlação de Person: $r = -0,75$; $p = <0,001$) em intensidades diferentes.

As ações conhecidas do Roundup[®] sobre a fisiologia de vertebrados se relacionam a desregulação da esteroidogenese e diminuição na atividade de enzimas antioxidantes (WALSH et al., 2000). O estresse oxidativo também está relacionado com a elevação da temperatura. Sob temperaturas mais altas, os processos metabólicos das células ocorrem com maior intensidade, gerando assim, uma maior quantidade de radicais livres. Estes resíduos metabólicos podem gerar efeitos deletérios sobre diversos mecanismos celulares (MADEIRA et al. 2013).

Possivelmente a ação deste herbicida na CTMax relaciona-se com o processo de estresse oxidativo a partir da diminuição na produção e atividade de enzimas antioxidantes (MODESTO; MARTINEZ, 2010), assim como o aumento na peroxidação da plasmalema (BREUKELLEN et al., 2010). Danos nesta estrutura podem restringir a capacidade de ajuste de fluidez e permeabilidade de membrana (PODRABSKY; SOMERO, 2004). Dessa forma, a resistência térmica de organismos ectotérmicos pode ser prejudicada.

4. CONCLUSÕES

Pensando na importância ecológica que a tolerância térmica desses animais possui e as ações demonstradas do Roundup[®] nesse processo, conclui-se que este herbicida, mesmo em baixas concentrações e sob curto tempo de exposição, pode agir diminuindo o “*fitness*” de populações de Rivulidae por alterações em sua capacidade em lidar com estresse térmico, fator essencial para o sucesso adaptativo dessas espécies.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAVALCANTE, D. G. S. M.; MARTINEZ, C. B. R.; SOFIA, S. H. Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 655, n. 1-2, p. 41-46, 2008.

COSTA, Wilson J. E. M. Phylogeny and classification of Rivulidae revisited: origin and evolution of annualism and miniaturization in rivulid fishes (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei). **Journal of Comparative Biology**, v. 3, n. 1, p. 220–225, 1998.

HELANDER, M.; SALONIEMI, I.; SAIKKONEN, K. Glyphosate in northern ecosystems. **Trends in plant science**, v. 17, n. 10, p. 569–574, 2012.

MADEIRA, D.; NARCISO, L.; CABRAL, H.N.; VINAGRE, C.; DINIZ, M.S.; Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.166, n, p.237-243, 2013.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**, v. 81, n. 6, p. 781-787, 2010.

PODRABSKY, J. E.; SOMERO, G. N. Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. **The Journal of experimental biology**, v. 207, n. 13, p. 237–254, 2004.

RIBEIRO, P. L.; CAMACHO, A.; NAVAS, C. A. Considerations for assessing maximum critical temperatures in small ectothermic animals: insights from leaf-cutting ants. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. 920–925, 2012.

VAN BREUKELEN, F.; KRUMSCHNABEL, G.; PODRABSKY, J. E. Vertebrate cell death in energy-limited conditions and how to avoid it: what we might learn from mammalian hibernators and other stress-tolerant vertebrates. **Apoptosis: an international journal on programmed cell death**, v. 15, n. 3, p. 386–399, 2010.

WALSH, L. P.; MCCORMICK, C.; MARTIN C.; STOCCO D. M. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environmental health perspectives**, v. 108, n. 8, p. 769–776, 2000.

WOODBURN, Allan T. Glyphosate: production, pricing and use worldwide. **Pest Management Science**, v. 56, n. 4, p. 309–312, 2000.

WOURMS, John P. The developmental biology of annual fishes. III. Pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. **Journal of Experimental Zoology**, v. 182, n. 3, p. 389–414, 1972.