



HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO REDUZ A VIABILIDADE DE CELOMÓCITOS DE OLIGOQUETAS ¹

**Juliana Furlanetto Pinheiro², Diovana Gelati de Batista³, Isadora Sulzbacher Ouriques⁴,
Lucas Machado Sulzbacher⁵, Maria Eduarda Todendi de Bragas⁶, Thigo Gomes Heck⁷**

¹ Pesquisa Institucional desenvolvida no Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI).

² Acadêmica do curso de Medicina da UNIJUI. Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e Tecnológica financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul -PROBIC/PROBITI-FAPERGS; e-mail: juliana.pinheiro@sou.unijui.edu.br

³ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Modelagem Matemática e Computacional (PPGMMC-UNIJUI). Bolsista PROSUC-CAPE; e-mail: diovana.batista@sou.unijui.edu.br

⁴ Estudante do curso de Biomedicina da UNIJUI. Voluntária no Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF); e-mail: isadora.ourique@sou.unijui.edu.br

⁵ Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS-UNIJUI); e-mail: lucas.sulzbacher@sou.unijui.edu.br

⁶ Estudante de Ensino Médio da Escola Técnica Estadual 25 de Julho. Bolsista de Iniciação Científica no Ensino Médio; e-mail: maria.bragas@sou.unijui.edu.br

⁷ Professor do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS/UNICRUZ/UNIJUI) e Programa de Pós-Graduação em Modelagem Matemática e Computacional (PPGMMC); e-mail: thiago.heck@unijui.edu.br.

INTRODUÇÃO

Os herbicidas à base de glifosato (HBG) estão entre os pesticidas mais utilizados no mundo. Sua ampla utilização dá-se por contribuir no controle de plantas daninhas e aumentar a produtividade na lavoura (Vandenberg et al, 2017; Sharma et al, 2019; Maggi et al 2020). No solo, os HBGs podem passar pelos processos de infiltração e adsorção à matéria orgânica, atingindo assim a fauna edáfica. Dentre os seres vivos dessa fauna, estão as minhocas (oligoquetas), as quais são bioindicadores, pois são sensíveis às alterações ambientais, inclusive à presença de agrotóxicos (Sadegh-Zadeh; Wahid; Jalili, 2017). Dessa forma, podemos nos questionar se o uso de pesticidas na agricultura pode trazer riscos ao bioma terrestre (Keko et al, 2023).

Sabe-se que os celomócitos são as células responsáveis pela depuração e defesa imunológica das oligoquetas, e que podem ter sua integridade e funcionalidade prejudicadas pela exposição a poluentes (Engelmann et al, 2011, Gautam et al., 2020; Stein, Avtalion, Cooper, 1977). Estudos evidenciam que os HBGs podem induzir mortalidade, alterações morfológicas e reprodutivas em oligoquetas (Santino; Coviella; Momo, 2014; Samal; Mishra;



Sahoo, 2019). No entanto, os efeitos dos HBGs no sistema imune de minhocas precisam ser elucidados. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar se a exposição a concentrações agronômicas de HBG induzem alterações na contagem total, na densidade e na viabilidade de celomócitos de minhocas.

METODOLOGIA

Foram utilizadas 96 minhocas adultas da espécie *Eisenia andrei*, com massa corporal entre 0,3 e 0,4g, coletadas diretamente da vermicomposteira do Laboratório de Ensaios Biológicos da UNIJUÍ. Os animais foram submetidos a quatro rodas experimentais do Teste de Toxicidade Aguda, divididos nos seguintes grupos experimentais: Controle (CTRL), solo que recebeu apenas água; Glifosato 1,5 (GLY 1,5), solo exposto ao HBG em dosagem equivalente a 1,5L/ha - a metade da dosagem recomendada pelo fabricante (3L/100L de água - vide bula Monsanto®); Glifosato 3 (GLY 3), solo exposto ao HBG em dosagem equivalente a 3L/ha; e Glifosato 6 (GLY 6), exposto ao HBG na dosagem de 6L/ha, o dobro da dosagem recomendada. A cada rodada, os grupos experimentais tiveram 6 animais cada.

Durante os experimentos, os animais foram colocados em potes plásticos, que constituíram as Unidades Experimentais (UEs). Cada UE continha 95% de solo livre de matéria orgânica e 5% de erva-mate. A umidade do composto foi ajustada para 60%. Antes do período experimental, as minhocas foram aclimatadas durante 24 horas, em que não receberam nenhum tratamento. Após o período de aclimação, os animais foram coletados das UEs e distribuídos em novas UEs, contendo composto idêntico ao anterior, no entanto, expostas ao HBG nas respectivas concentrações: GLY 1,5 - 0,9 mL de HBG em 60 mL de água da torneira, correspondendo a 1,5L/ha (1,5 L/100 L de água); GLY 3 - 1,8 mL de HBG em 60 mL de água da torneira, correspondendo a 3L/ha (3 L/100 L de água); e GLY 6 - 3,6 mL de HBG em 60 mL de água da torneira, correspondendo a 6L/ha (6 L/100 L de água). O grupo CTRL recebeu apenas 60 mL de água. O período experimental foi de 48 horas.

Ao final do período experimental, os animais foram retirados das UEs e o fluido celômico foi coletado pelo método de extrusão não-invasiva adaptado de Eyambe (1991), que consiste na coleta do fluido por meio do contato de cada minhoca com 1mL de solução de 5% etanol e 95% solução salina (NaCl 0,9%) suplementada com EDTA (2,5 mg/ml) com um pH

7,3, durante 3 minutos, após isso era adicionado 1mL de LBSS, para encerrar a extrusão. Ao final da extrusão, as minhocas foram eutanasiadas.

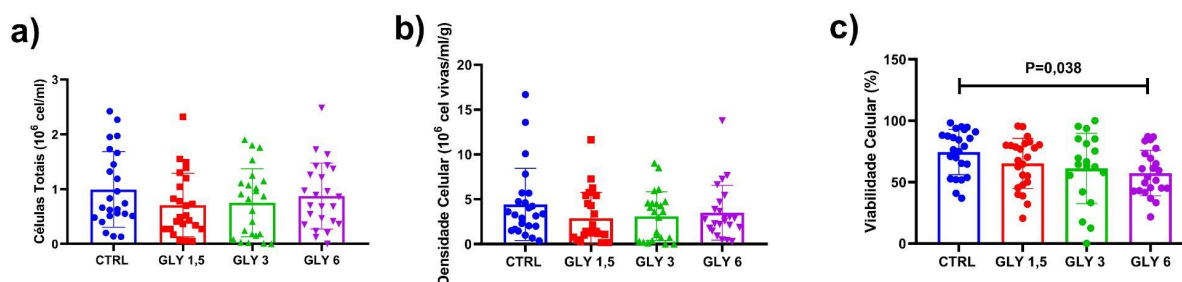
Para a contagem total de células, checagem de viabilidade celular e densidade celular, foram diluídos 30 μ L de fluido celômico em 30 μ L de Trypan Blue e analisados em câmara de Neubauer® em microscópio óptico. A contagem total de células considerou o número de células contadas no quadrante central da câmara, em $n \times 10^6$ cel/mL; a viabilidade celular considerou a porcentagem de células vivas em relação ao total contado de células; e a densidade celular foi expressa em média de 10^6 células vivas mL^{-1}/g de massa corporal.

A análise estatística foi realizada no software Graphpad Prism 8.0.1. Os resultados foram apresentados em média $\pm$ desvio padrão. A normalidade dos dados foi checada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparar os diferentes grupos, os dados de viabilidade celular foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida do Teste de Múltiplas Comparações de Tukey. Dados relativos à contagem total e densidade celular foram analisados por meio do Teste de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn. Foi considerado significativo $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificamos que oligoquetas expostas a maior dosagem de HBG (grupo GLY6) tiveram redução na viabilidade celular ($P=0,038$) (Figura 1c). Todavia, não houve alteração na contagem total ($P= 0,419$) e nem na densidade dos celomócitos ($P=0,352$) (Figura 1a e 1b).

Figura 1- Efeitos do herbicida à base de glifosato na contagem total, na densidade e na viabilidade dos celomócitos de oligoquetas.



Fonte: Elaborado pelos autores. CTRL: grupo controle; GLY 1,5, GLY 3 e GLY 6, grupos expostos ao HBG nas concentrações de 1,5L/ha, 3L/ha e 6L/ha, respectivamente. a) Contagem total de celomócitos. $P= 0,419$. b) Densidade de celomócitos. $P= 0,352$. c) Viabilidade dos celomócitos. $P = 0,038$ em CTRL vs GLY 6.



A viabilidade é mensurada pela razão entre o total de células vivas e o total de células da amostra, o que significa dizer que quando há redução, a concentração de células vivas na amostra está diminuída. O estresse oxidativo é um dos fatores que pode estar relacionado à perda da capacidade funcional, perda da integridade e danos ao DNA e, consequentemente, à morte celular em organismos expostos aos HBGs (Batista et al. 2023). Em mamíferos expostos a estes herbicidas, a perda da homeostase celular, o desenvolvimento do estresse oxidativo e, consequentemente, a morte celular estão associados com a desregulação dos níveis de cálcio intracelular (Batista et al. 2023). No entanto, se este é o mecanismo pelo qual os celomócitos de minhocas também são prejudicados, levando à redução em sua viabilidade conforme aqui relatamos, é ainda uma questão a ser respondida.

A atividade imunológica inata dos mamíferos e outros vertebrados é semelhante à atividade desempenhada pelos celomócitos das minhocas (Engelmann et al, 2011). Em uma revisão de literatura, Peillex e Pelletier (2020) relataram alterações imunológicas ao nível da cascata do complemento e na atividade fagocítica de peixes expostos ao HBG, respostas, estas, mediadas pela imunidade inata. Em conjunto, esses dados indicam que os HBG podem representar riscos à saúde imunológica de diferentes organismos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição à maior dosagem agronômica de HBG (6L/ha) testada em nosso estudo prejudica a viabilidade dos celomócitos de oligoquetas, sem alterar a contagem total e a densidade celular. Tendo em vista o papel imunológico destas células, bem como as funções ecológicas das minhocas, o monitoramento de regiões e organismos expostos aos HBG se faz necessário, de modo a identificar e minimizar riscos ao meio ambiente e à saúde.

Palavras-chave: Minhocas; Agrotóxico; Herbicida; Celomócitos.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica e Tecnológica (PIBIC CNPq, PIBIC UNIJUÍ, PROBIC FAPERGS, PIBIT CNPq, PIBIT UNIJUÍ, PROBIT FAPERGS) e a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela



concessão de bolsas. Ao Programa de Pós Graduação em Atenção Integral à Saúde e ao Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUÍ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COOPER, Edwin L. Effector mechanisms of natural immunity: an invertebrate perspective. In: *Neuroimmune Biology*. Elsevier, 2005. p. 103-121.

DE BATISTA, Diovana Gelati et al. Disturbance of cellular calcium homeostasis plays a pivotal role in glyphosate-based herbicide-induced oxidative stress. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 30, n. 4, p. 9082-9102, 2023.

ENGELMANN, Péter et al. Earthworm innate immune system. *Biology of Earthworms*, p. 229-245, 2011.

GAUTAM, Arunodaya et al. Shift in phagocytosis, lysosomal stability, lysozyme activity, apoptosis and cell cycle profile in the coelomocytes of earthworm of polluted soil near a tannery field of India. ***Ecotoxicology and Environmental Safety***, v. 200, p. 110713, 2020.

GASCHLER, Michael M .; STOCKWELL, Brent R. Peroxidação lipídica na morte celular. *Comunicações de pesquisa bioquímica e biofísica* , v. 482, n. 3, pág. 419-425, 2017.

KARACA, Ayten (Ed.). *Biologia das minhocas* . Springer Science & Business Media, 2010.

MAGGI, F. et al. The global environmental hazard of glyphosate use, *Science of The Total Environment*, v. 717, 2020

PEILLEX, Cindy; PELLETIER, Martin. The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. *Journal of Immunotoxicology*, v. 17, n. 1, p. 163-174, 2020.

VANDENBERG, Laura N. et al. Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides?. *J Epidemiol Community Health*, v. 71, n. 6, p. 613-618, 2017.

SADEGH-ZADEH, Fardin; ABD WAHID, Samsuri; JALILI, Bahi. Sorption, degradation and leaching of pesticides in soils amended with organic matter: A review. *Advances in Environmental Technology*, v. 3, n. 2, p. 119-132, 2017.

SANTADINO, M.; COVIELLA, C.; MOMO, F. Glyphosate sublethal effects on the population dynamics of the earthworm *Eisenia fetida* (savigny, 1826). *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 225, n. 12, 2014.

SHARMA, Anket et al. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, v. 1, p. 1-16, 2019.