



Avaliação do efeito mutagênico e citotóxico do agroquímico Roundup em células de mamíferos e anfíbios

Evaluation of the mutagenic and cytotoxic effect of Roundup on mammalian and amphibian cells

Gisele Redivo Gonçalves¹, Patricia Aline Bressiani², Anna Karolina Gomes Oliveira³, Elisângela Dusman⁴, Eduardo Michel Vieira Gomes⁵

RESUMO

O aumento do uso de agroquímicos trouxe, inegavelmente, uma maior produção agrícola, mas também, impactos ao meio ambiente e a saúde humana. Este estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade e a mutagenicidade do agroquímico Roundup® para as células hepáticas humanas (HuH7.5) *in vitro* e para os anfíbios *Lithobates catesbeianus* *in vivo*. Para o teste de citotoxicidade do MTT com as células HuH7.5 foram testadas as concentrações 0,05%, 0,025% e 0,01% do agroquímico, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Para o teste do micronúcleo com os girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) foram testadas as concentrações de 0,05%, 0,025%, 0,01% e 0,005% do Roundup®, expostos por 14 dias à estas soluções. O Roundup® reduziu significativamente a viabilidade celular em todas as concentrações testadas *in vitro*, exceto na concentração de 0,01% no tempo de 24h. *In vivo*, a maior concentração do Roundup® (0,05%) resultou na mortalidade de 100% dos animais e a concentração de 0,025% de 60% destes. O agroquímico ainda foi citotóxico, pela formação de alterações nucleares nos anfíbios, em todas as concentrações testadas e foi mutagênico nas concentrações de 0,005% e 0,01%. Desse modo, a aplicação do agroquímico em áreas de cultivo deve ser normalizada e analisada.

PALAVRAS-CHAVE: HUH7.5, *Lithobates catesbeianus*, micronúcleo, MTT.

ABSTRACT

The increased use of agrochemicals has undeniably brought greater agricultural production, but also impacts on the environment and human health. This study aimed to evaluate the cytotoxicity and mutagenicity of the agrochemical Roundup® for human liver cells (HuH7.5) *in vitro* and amphibians *Lithobates catesbeianus* *in vivo*. For the cytotoxicity test of MTT with HuH7.5 cells were tested concentrations 0.05%, 0.025% and 0.01% of agrochemical, at times of 24, 48 and 72 hours. For the micronucleus test with the bullfrog tadpoles (*L. catesbeianus*) the concentrations of 0.05%, 0.025%, 0.01% and 0.005% of Roundup were tested, exposed for 14 days to these solutions. Roundup® significantly reduced cell viability in all concentrations tested *in vitro*, except in the concentration of 0.01% in 24h. *In vivo*, the highest concentration of Roundup® (0.05%) resulted in the mortality of 100% of the animals and the concentration of 0.025% of them. The agrochemical was still cytotoxic, by the formation of nuclear changes in amphibians at all concentrations tested and was mutagenic at concentrations of 0.005% and 0.01%. Thus, the application of agrochemical in cultivation areas should be normalized and analyzed.

KEYWORDS: HUH7.5, *Lithobates catesbeianus*, micronucleus, MTT.

¹ Voluntária. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: gisaredivo@gmail.com. ID Lattes: 2100960461685853.

² Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: pbressiani@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 6244294104014856.

³ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: annoli@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 2077709013393753.

⁴ Docente no Departamento Acadêmico de Química e Biologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: edusman@utfpr.edu.br. ID Lattes: 08342282115894459.

⁵ Docente no Departamento Acadêmico de Física, Estatística e Matemática. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: eduardogomes@utfpr.edu.br. ID Lattes: 7293677011271209.



INTRODUÇÃO

A agricultura responde por, aproximadamente, 24% do PIB brasileiro (CEPEA, 2023), tendo assim um papel importante na economia nacional. O aumento da produtividade agrícola se deu, principalmente, pelo desenvolvimento da tecnologia nas áreas de maquinários, fertilizantes e corretivos, melhorias genéticas e uso de herbicidas e inseticidas (LISBÔA et al., 2021).

O uso de herbicidas se tornou tão popular que diversos produtores começaram a importar estas mercadorias, dentre elas o glifosato, conhecido pelo nome comercial de Roundup® (EMBRAPA, 2018). O glifosato, por ser o pesticida com mais vendas no Brasil, virou alvo de pesquisas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e, conseqüentemente, de diversos estudos em todo o país. Assim, é necessário avaliar se o Roundup® será restringido pois, por mais que não existam evidências suficientes para ele se provar carcinogênico, ainda existe a possibilidade de outras características toxicológicas além desta (ANVISA, 2022).

O crescente número de uso de inseticidas e pesticidas pode ser danoso ao meio ambiente. Dessa forma, para determinar o quanto uma substância é prejudicial à natureza, faz-se o uso de bioindicadores. Bioindicadores são espécies que demonstram se ocorreram ou não transformações naquele local, principalmente pela medição de seus parâmetros biológicos, chamados biomarcadores (CAMPELO et al., 2022).

Um exemplo é o uso do bioindicador anfíbio e o biomarcador teste do micronúcleo. O teste do micronúcleo é utilizado para evidenciar os efeitos citotóxicos e mutagênicos que os agroquímicos podem causar (FENECH, 2000). Outro exemplo é o uso de cultura celular *in vitro* e o teste de citotoxicidade. Testes de toxicologia *in vitro* avaliam as alterações presentes nas células feitas por mecanismos externos. Um teste comumente utilizado é o método do MTT *in vitro*, que é amplamente aplicado em células de mamíferos, e tem como base a detecção de degenerações celulares causadas por poluentes em quaisquer quantidades, tendo como resultado a morte celular (MOSMANN, 1983).

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade e a mutagenicidade do agroquímico Roundup® para cultura de células de mamíferos e para os girinos de *Lithobates catesbeianus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

SOLUÇÃO TRATAMENTO

O agroquímico Roundup® foi adquirido em comércio local. Foram preparadas suspensões nas concentrações de 0,005%, 0,01%, 0,025% e 0,05% de Roundup® diluídas em água destilada estéril.

TESTE DE CITOTOXICIDADE COM CULTURA DE CÉLULAS

As células hepáticas (HUH7.5) foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² contendo 10 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA) e incubadas em estufa tipo BOD a 37 °C com 5% de CO₂.



Para realizar o teste da atividade citotóxica foi utilizado o ensaio MTT, de acordo com o protocolo sugerido por Mosmann (1983), com modificações. Foram utilizadas placas de cultivo de 96 poços onde, em cada poço, foram semeadas $1,0 \times 10^4$ células HUH7.5, com exceção do poço de controle sem célula (branco). Após 24 horas, o meio de cultura de cada poço foi descartado e adicionou-se 100 μL de meio completo para os grupos: controle negativo (CO-) (meio de cultura), controle positivo (CO+) com o agente citotóxico metil metanossulfanato (MMS 500 μM) e os tratamentos com as concentrações de 0,01%, 0,025% e 0,05% do agroquímico. Antes do tratamento, as soluções de Roundup® foram filtradas em milipore 0,22 μm .

As células foram incubadas por 24, 48 e 72 horas e, após esse tempo, o meio de cultura foi substituído por 100 μL de meio de cultura não suplementado, acrescido de MTT (0,167 mg mL⁻¹).

Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão das absorbâncias e submetidos à análise de variância (one way ANOVA), seguido do teste de Dunnet, com o uso do programa Action Stat. As diferenças foram consideradas sendo estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor que 0,05.

Os valores percentuais de viabilidade celular (VC) foram estimados por meio da Equação 1.

$$VC = \left(\frac{ABS_T}{ABS_{CO-}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

- VC = Viabilidade celular [%];
- ABS_T = Absorbância do tratamento;
- ABS_{CO-} = Absorbância do controle negativo.

TESTE DE CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE EM GIRINOS DE *Lithobates catesbeianus*

O teste do micronúcleo com sangue de girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) seguiu a metodologia descrita por Gauthier *et al.* (2004) e Gonçalves *et al.* (2015), com modificações. Os girinos foram obtidos de uma fonte comercial, todos provenientes da mesma desova e na mesma fase de desenvolvimento (entre fases 26 a 39 de Gosner). Eles foram aclimatados em aquários contendo 5 litros de água mineral por 7 dias. Em seguida, foram separados em grupos de 5 girinos por aquário, juntamente com 5 litros das amostras de cada concentração do Roundup® (0,005%, 0,01%, 0,025% e 0,05%). O grupo controle negativo foi realizado com 5 litros de água mineral. O projeto tem aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Protocolo 20.594.198-3).

Os girinos permaneceram por 14 dias nestas soluções controle e tratamento, a temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com aeração constante e foram alimentados com ração de peixe a cada 2 dias. A cada 48 horas os parâmetros pH, oxigênio dissolvido e temperatura, foram determinados das soluções controle e tratamento, por meio de uma sonda multiparâmetro portátil Horiba U-52, mantendo o meio adequado ao crescimento e desenvolvimento dos animais.



Após os 14 dias, os girinos foram anestesiados e eutanasiados, sendo retirado seu sangue caudal. As lâminas com o sangue foram analisadas determinando a frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares (células segmentadas, células binucleadas, células com broto e células reniforme) em 1000 eritrócitos para cada girino, usando o microscópio óptico de luz, com aumento da objetiva de imersão (100 X).

Os cálculos do número médio de micronúcleos, do percentual de micronúcleos, do número médio de alterações nucleares e do percentual de alterações nucleares de cada grupo controle foram realizados e tratados. A análise estatística foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$; $n=5$).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

CÉLULAS HuH7.5

Ao realizar o teste de MTT em células hepáticas (HuH7.5), é visto que, no tempo de 24h a concentração de 0,01% não apresentou nenhuma alteração estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, inclusive, a viabilidade celular foi de 93,59% (Tabela 1). Já para o mesmo período de tempo, nas demais concentrações (0,025% e 0,05%), foi observada uma diminuição estatisticamente significativa das absorbâncias médias, com viabilidades celulares menores que 48% e 28% (Tabela 1), respectivamente, indicando citotoxicidade deste agroquímico.

Tabela 1 - Viabilidade celular de células tumorais hepáticas tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações (%) do agroquímico Roundup®.

Grupos	HuH7.5		
	VC [%]		
	24h	48h	72h
CO-	100	100	100
CO+	39,19*	29,66*	21,83*
0,01	93,59	68,96*	58,06*
0,025	47,61*	24,95*	20,24*
0,05	27,63*	23,26*	19,15*

CO-: Controle Negativo, CO+: Controle Positivo. * Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (CO-).

Fonte: Autoria própria, 2023.

Já nos tempos de 48 e 72 horas pode-se observar que as três concentrações avaliadas (0,01%; 0,025% e 0,05%) apresentaram absorbâncias estatisticamente menores que as do controle negativo e efeito citotóxico. Pode-se observar uma evidente redução da viabilidade celular (Tabela 1), com o passar do tempo de exposição (de 24 para 72 horas), para todas as concentrações do agroquímico Roundup®. Assim como, redução da viabilidade celular com o aumento da concentração do agroquímico (de 0,01% para 0,05%) no mesmo tempo de avaliação. Portanto, aumentando tanto a concentração do agroquímico Roundup®, quanto o período em que as células estiveram em contato com ele, diminui-se

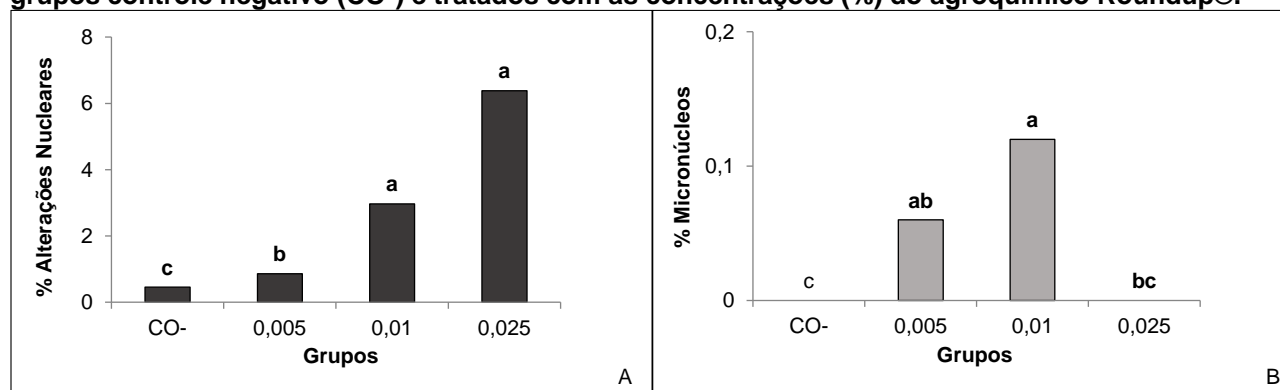
a absorvência e, conseqüentemente, uma maior citotoxicidade é observada. No estudo realizado por Oláh et al. (2022) também foram confirmados os efeitos citotóxicos do Roundup (R), seu ingrediente ativo glifosato (na forma de seu sal de isopropilamina) e seu surfactante formulador polietoxilado amina (POE-15) para as linhagens de células murinas NE-4C e MC3T3-E1.

Lithobates catesbeianus

Os parâmetros físico-químicos dos aquários demonstraram que os anfíbios estavam em meios favoráveis para sobrevivência, porém, pode-se observar a mortalidade dos anfíbios ao longo do experimento. Para a concentração de 0,025% a mortalidade final foi de 60% e, na maior concentração do Roundup® (0,05%) os anfíbios tiveram sua taxa de mortalidade máxima (100%) ao completar somente 24h em solução. Assim, pode-se observar que o agroquímico induziu a mortalidade dos animais expostos, de acordo com a concentração do mesmo.

Dos animais sobreviventes foi possível observar as alterações nucleares (Figura 1). Todos os grupos tratados com o agroquímico se mostraram citotóxicos e, novamente dependente da dose avaliada, pois, quanto maior a concentração, maior o percentual médio de alterações nucleares. Um estudo realizado por Lioi et al. (1998) demonstrou um aumento nas alterações cromossômicas em culturas de células de linfócitos bovinos quando em contato com uma maior concentração do agroquímico Roundup®, confirmando a proporcionalidade entre a dosagem e as alterações cromossômicas.

Figura 1. Percentagem média de alterações nucleares (A) e de micronúcleos (B) encontradas nos grupos controle negativo (CO-) e tratados com as concentrações (%) do agroquímico Roundup®.



Colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Fonte: Autoria própria, 2023.

Com relação ao percentual de micronúcleos (Figura 1), as concentrações de 0,005% e 0,01% se apresentaram mutagênicas, já a concentração de 0,025% não apresentou mutagenicidade. Este resultado pode ser devido a morte das células com alterações nucleares (identificadas pela citotoxicidade), o que diminuiu a presença de células com micronúcleos nesta concentração avaliada.

CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que as diferentes concentrações do herbicida Roundup® apresentaram efeito nocivo para as células hepáticas (HuH7.5) *in vitro* e para os girinos de rã-touro *in vivo*. Esses achados indicam que o Roundup®, mesmo em baixas

concentrações, pode causar danos celulares e ao material genético dos anfíbios e que seu uso deve ser monitorado e regulamentado.

Agradecimentos

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) pela infraestrutura e estímulo à produção científica e tecnológica de qualidade.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Glifosato prossegue sobre análise na ANVISA**. Julho de 2022.

CAMPELO, L. et al. **O impacto ambiental da atividade agrícola na Reserva Biológica do Mato Grande – RS**, *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 27, n. 3, p. 633 - 641, 2022.

CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. CNA. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. **“PIB do Agronegócio Brasileiro 2022”**. Março de 2023 a.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Trajетória da agricultura brasileira**. 2018.

FENECH, M. **A técnica de micronúcleos *in vitro***, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 455, 2000.

GAUTHIER L.; TARDY E.; MOUCHET F.; MARTY J. **Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the River Dadou (France), using the amphibian *Xenopus laevis***. *Science of Total Environment*, v. 323, p. 47–61, 2004.

GONÇALVES, M.W et al. **Detecting genomic damages in the frog *Dendropsophus minutus*: preserved versus perturbed areas**. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 5, p. 3947–3954, 2015.

LISBÔA, H. et al. **Plantas Daninhas**. São Paulo-SP: Grupo A, 2021.

LIQI, M. **Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures *in vitro***. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. v.403, p. 13-20, 1998.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. *Journal of immunological methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

OLÁH, M. et al. **Cytotoxic effects of Roundup Classic and its components on NE-4C and MC3T3-E1 cell lines determined by biochemical and flow cytometric assays**. *Toxicology Reports*, v. 9, p. 914-926, 2022.