

Área: Ciência de Alimentos

EXPOSIÇÃO CRÔNICA PRÉ-PUBERTAL A RESÍDUOS DE GLIFOSATO PROMOVE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS EM RATOS

Jessica Nardi*, Patricia Bonamigo Moras, Carina Koeppel, Luciana Grazziotin Rossato

Laboratório de Toxicologia, Curso de Farmácia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS

**E-mail: nardi.je@gmail.com*

RESUMO – Existem algumas complicações que prejudicam a digestão da lactose, sendo a mais prevalente delas a intolerância à lactose. A principal forma de tratamento é através de mudanças alimentares, e uma das alternativas consiste em substituir o leite de vaca pelo de soja. Atualmente, aproximadamente 85% da área de soja plantada no país consiste de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato, o que permite seu uso para eliminar ervas daninhas da plantação. Assim, os herbicidas a base de glifosato são os agrotóxicos mais utilizados nessas culturas. Estudos demonstraram que os grãos de soja tratados com esse herbicida podem conter concentrações elevadas desse agrotóxico após a colheita, o que leva a uma preocupação quanto aos produtos fabricados a partir desse grão, como o leite de soja. Crianças no período de lactação que apresentam intolerância à lactose e utilizam leite de soja na alimentação estão proporcionalmente mais expostas aos resíduos de glifosato considerando a sua menor massa corporal e pela idade na qual a exposição a esses resíduos ocorre. O presente trabalho buscou avaliar a toxicidade comportamental de um herbicida a base de glifosato administrado com leite de soja, que foi administrado a ratos Wistar machos no período pré-pubertal (23-65 dias de vida). Após o período de tratamento, realizou-se o teste do Campo Aberto e o teste do Labirinto em Cruz Elevado. Observou-se que ratos tratados com leite de soja suplementado com glifosato (100mg/kg) apresentaram alteração no seu comportamento em relação à ansiedade, apresentando um padrão de comportamento relacionado com atividade ansiolítica, sugerindo um efeito ansiolítico causada por este tratamento.

Palavras-chave: leite de soja, glifosato, alterações comportamentais, ansiedade.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o ingrediente ativo mais comercializado dentre os herbicidas utilizados nas lavouras brasileiras é o glifosato, o qual a comercialização em 2009 ultrapassou 90 mil toneladas (REBELO *et al.*, 2010). Além disso, aproximadamente 85% da área total de soja plantada no Brasil é composta de soja geneticamente modificada resistente a esse herbicida, e a principal maneira de fazer o controle de ervas daninhas nessas lavouras acontece pelo uso desse agrotóxico (MONSANTO, 2012). Nesse contexto, surge a preocupação referente ao consumo dos produtos tratados com o herbicida por pessoas que utilizam alimentos a base de soja como sua principal fonte de proteína, e, principalmente, em relação a crianças que apresentam intolerância à

lactose ou outras alergias que impedem o consumo do leite materno ou de leite procedente de outras fontes animais (MATTAR e MAZO, 2010; RICKLI e ANDREAZZI, 2010).

Existem limites considerados seguros em relação à ingestão de resíduos de glifosato, sendo a Ingestão Diária Aceitável (IDA) de 0,042mg/kg, que é calculada baseada em um indivíduo adulto com cerca de 60kg (BRASIL, 2014), e o Limite Máximo de Resíduos (LMR), de 10mg/kg na cultura de soja geneticamente modificada, valor determinado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (BRASIL, 2014). Porém, existem registros de que os resíduos encontrados nos grãos mostraram-se acima do LMR (BOHM *et al.*, 2008). Em relação ao glifosato, vem-se demonstrando que há uma relação entre a exposição ao herbicida e a ocorrência de dano neurodegenerativo (ASTIZ, ALANIS e MARRA, 2012; SAMSEL e SENEFF, 2013; CATTANI *et al.*, 2014), doença de Parkinson (DP) (RICHARDSON *et al.*, 2009; BARBOSA *et al.*, 2001; SAMSEL e SENEFF 2013) e desordens metabólicas como desregulação endócrina (DALLEGRAVE, 2003; ROMANO *et al.*, 2008) e estresse oxidativo (DALLEGRAVE *et al.*, 2002; EL-SHENAWY, 2009; MESNAGE, BERNAY e SÉRALINI, 2012).

Nesse contexto, é necessário considerar que as crianças intolerantes à lactose que se alimentam a base de leite de soja estão proporcionalmente mais expostas aos resíduos de glifosato devido a sua menor massa corporal, e pelo fato de que esta exposição ocorre justamente em uma fase importante do desenvolvimento do indivíduo, de amadurecimento neurológico. Considerando estes aspectos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade comportamental em ratos machos submetidos à dieta rica em glifosato em período pré-pubertal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produtos comerciais

Para a realização do experimento, foi utilizado o Roundup Original[®], fabricado pela Monsanto. O leite de soja utilizado foi adquirido no mercado, sendo escolhido o de maior teor de proteínas que é de 5,2g por porção de 200mL, da marca Ades[®].

2.2 Modelo experimental

Os estudos foram conduzidos em machos de ratos Wistar com 23 dias, que foram divididos em 4 grupos (n= 6 animais nos grupos controle e n= 7 nos grupos tratados com adição de glifosato). Os animais receberam o tratamento por via oral (gavagem), diariamente, por 35 dias. O grupo controle recebeu solução salina, o grupo controle do leite recebeu leite de soja não suplementado, o grupo glifosato 50 recebeu leite de soja suplementado com Roundup[®] na dose de 50mg/kg e o grupo glifosato 100 recebeu leite de soja suplementado com Roundup[®] na dose de 100mg/kg. As doses do estudo foram definidas a partir de resultados em estudos preliminares (DALLEGRAVE, 2003). Os animais foram acondicionados em caixas individuais para controle dos consumos de ração e água (fundamentais para a avaliação toxicológica completa). A massa corporal relativa dos animais foi avaliada diariamente e também foram feitas avaliações clínicas do estado dos animais, avaliando a ocorrência de sinais de toxicidade como piloereção, diarreia, palidez nas mucosas, presença de cianose, dor abdominal e função respiratória. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de

Animais da Universidade de Passo Fundo (Parecer CEUA 008/2014). Os animais foram eutanasiados após os 35 dias de tratamento, durante a puberdade (que ocorre aos 65 dias). A eutanásia foi realizada após indução da anestesia com ketamina/xilasina (100mg/kg e 10mg/kg, respectivamente).

2.3 Ensaios comportamentais

Os ensaios foram realizados em sala escura, iluminada com lâmpada vermelha de 80 watts, onde os animais foram alocados por uma hora antes da realização do teste para ambientação. Eles foram avaliados individualmente durante 5 minutos e os comportamentos foram registrados por filmagem. Entre a exposição de um rato e outro foi realizada a limpeza da arena com solução hidroalcoólica a 5%.

O teste do Campo Aberto foi realizado dois dias antes da eutanásia dos animais. O aparelho consiste de uma arena circular com fundo e lateral revestidos de acrílico, medindo 1 m de diâmetro por 40 cm de altura, o qual tem o fundo dividido em 25 partes semelhantes. Os comportamentos avaliados foram: a locomoção, avaliada como o número de vezes que o animal invadiu uma divisão demarcada da arena com as quatro patas; o número de vezes que o animal invadiu com as quatro patas o círculo central; o levantar, avaliado como o número de vezes que o animal se apoiou nas patas posteriores; o número de cruzamentos, o número de vezes que o animal demonstrou comportamento de *freezing* (definido como a ausência total de movimentos) e *grooming* (movimentos do animal em direção à cabeça ou a boca com as patas anteriores); o tempo de permanência nas áreas periféricas do aparelho; e os bolos fecais (ROYCE, 1977).

O teste do LCE foi realizado no dia anterior à eutanásia. O LCE consiste de dois braços fechados (50x10x40 cm), opostos, e dois braços abertos (10x50 cm), sem qualquer anteparo, dispostos em oposição um ao outro, formando uma cruz. Essa cruz é montada sobre uma base elevada a 50 cm de altura. O experimento consistiu em colocar o animal no centro da cruz, com a cabeça voltada para um braço aberto e os parâmetros avaliados foram: o tempo de permanência nos braços fechados, nos braços abertos e no centro, frequência de entradas nos braços abertos ou fechados, levantar, o *grooming* e foram contados os bolos fecais. Considerou-se que o rato entrou num dos braços quando as quatro patas estavam fora do centro da cruz (área neutra) (MONTGOMERY, 1955; HANDLEY e MITHANI, 1984).

3 RESULTADOS

Em relação ao LCE, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre o grupo que recebeu glifosato 100mg/kg e o grupo que recebeu leite de soja não suplementado, em relação ao tempo de permanência nos braços fechados. Concomitantemente a esse resultado, observou-se aumento significativo da permanência nos braços abertos do LCE no grupo tratado com 100 mg/kg em relação ao grupo de controle do leite de soja. (Tabela 1). Nos demais parâmetros avaliados neste teste não houve diferença estatística significativa. Com relação às avaliações clínicas, não houve diferença estatística significativa, nem foram constatados sinais de toxicidade nos animais ao longo do estudo. No teste do Campo aberto não houve diferença estatística significativa entre os grupos nos parâmetros avaliados pelo teste.

Tabela 1: Resultados dos parâmetros avaliados no LCE. Os resultados encontram-se expressos como a média±desvio padrão (n=6 animais por grupo nos controles e n=7 nos grupos acrescidos de glifosato). A análise estatística foi realizada com o teste de One-Way ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Tukey (**p* <0.05 vs leite de soja).

Grupos	Entradas braços abertos	Entradas braços fechados	Permanência braços abertos (s)	Permanência braços fechados (s)	Centro (s)	Grooming	Levantar	Bolos fecais
Controle	7,83 ± 1,6	6,67 ± 3,2	120,33 ± 18,78	100,17 ± 26,66	79,5 ± 13,68	1,67 ± 0,82	15,33 ± 4,76	0,5 ± 1,22
Leite de soja não suplementado	5,83 ± 2,79	5,83 ± 2,4	93,67 ± 35,87	125,00 ± 22,66	81,33 ± 20,47	0,67 ± 0,52	19,67 ± 7,89	0,0 ± 0,0
Leite de soja + Glifosato 50mg/kg	7,29 ± 2,87	8,14 ± 2,34	103,71 ± 31,64	109,00 ± 25,45	94,0 ± 39,36	1,00 ± 1,00	19,86 ± 6,87	0,14 ± 0,38
Leite de soja + Glifosato 100mg/kg	7,86 ± 1,57	7,43 ± 3,21	131,43 ± 36,65*	89,86 ± 22,45*	78,71 ± 20,21	1,00 ± 1,53	16,57 ± 3,78	1,14 ± 1,46

4 DISCUSSÃO

A diminuição no tempo de permanência nos braços fechados e consequente aumento no tempo de permanência nos braços abertos do LCE apresentado pelos animais do grupo que recebeu 100mg/kg sugere que o glifosato possa apresentar atividade ansiolítica na dose de 100mg/kg. O LCE é provavelmente o modelo animal mais utilizado atualmente na investigação dos mecanismos neurais da ansiedade e no estudo de drogas que atuam no tratamento de transtornos relacionados a esse problema (RODGERS e DALVI, 1997; CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005; MORATO, 2006). Handley e Mithani (1984) observaram que os animais demonstravam preferência pela exploração dos braços fechados do LCE. Quando o animal é colocado no LCE, ocorre a geração de um conflito entre os impulsos exploratórios e os impulsos de medo, onde os impulsos exploratórios seriam evocados da mesma maneira tanto nos braços fechados como nos braços abertos, porém, nos braços abertos, os níveis de impulsos de medo e ansiedade seriam maiores (MONTGOMERY, 1955; HANDLEY e MITHANI, 1984; PELLOW *et al.*, 1985; HOGG, 1996; RODGERS e DALVI, 1997). Esta hipótese é corroborada pelos níveis séricos de corticosterona nos ratos confinados aos braços abertos do LCE, que são significativamente maiores quando comparados aos níveis dos animais confinados nos braços fechados (PELLOW *et al.*, 1985). A exposição dos animais a compostos ansiolíticos reduz a aversão aos braços abertos e promove sua exploração (HOGG, 1996). No experimento realizado por Pellow e colaboradores (1985) foi observado que a administração de fármacos ansiolíticos, como o diazepam, levou a um aumento no tempo de permanência nos braços abertos, enquanto compostos ansiogênicos, como a ioimbina, provocaram uma diminuição no número de entradas nos braços abertos e nos fechados, e no tempo de permanência dos animais nos braços abertos. Porém, o uso do LCE como modelo de ansiedade apresenta algumas limitações, principalmente em relação a variáveis orgânicas de

linhagem, sexo e idade (no nosso caso, o período de exposição ao glifosato foi realizado pré-pubertal) além de variáveis interlaboratoriais no procedimento (DAWSON e TRICLEBANK, 1995; RODGERS e DALVI, 1997).

5 CONCLUSÃO

Apesar das limitações em relação aos testes comportamentais relatadas anteriormente, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que ratos tratados no período pré-pubertal com leite de soja suplementado por 100mg/kg apresentaram alteração no seu comportamento em relação à ansiedade, apresentando um padrão de comportamento relacionado com atividade ansiolítica. Mais estudos são necessários para determinar o real impacto destes resultados para a saúde humana considerando os níveis reais de resíduos de glifosato encontrados nos produtos derivados da soja e a importante exposição pré-pubertal a derivados de soja contendo estes resíduos por indivíduos intolerantes à lactose.

6 REFERÊNCIAS

- ASTIZ, M.; ALANIZ, M.; MARRA, C. The oxidative damage and inflammation caused by pesticides are reverted by lipoic acid in rat brain. **Neurochem Int**, v. 61, p. 1231-1241, 2012.
- BARBOSA, E.R.; COSTA, M.; BACHESCHI, L.A. *et al.* Parkinsonism after glycine-derivate exposure. **Mov Disord**, v. 16, p. 565-568, 2001.
- BOHM, G.M., GENOVESE, M.I., PIGOSSO, G. *et al.* Resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico e teores de isoflavonas em soja BRS 244 RR e BRS 154. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 192-197, 2008.
- BRASIL. **Exposição Crônica aos Agrotóxicos: Avaliação do Risco Dietético** [s. d.] Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência Geral de Toxicologia. <http://www.bvsde.paho.org/bvstox/tallerplagui/brasilLidiaNunesGoncalves.pdf>. Acessado em: 11 de set. de 2014.
- CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety- like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1193-1205, 2005.
- CATTANI, D.; CAVALLI, V.; RIEG, C., *et al.* Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity. **Toxicology** v. 5, p. 34-45, 2014.
- DALLEGRAVE, E. **Toxicidade reprodutiva do herbicida glifosato-Roundup® em ratos wistar**. 2003. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- DALLEGRAVE, E., MANTESE, F.D., DALSENTER, P.R. *et al.* Oral acute toxicity of glyphosate in Wistar rats. **Online Journal of Veterinary Research**, v. 1, p. 29-34, 2002.
- DAWSON, G.R.; TRICKLEBANK, M.D. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agentes. **Trends Pharmac Sci**, v. 16, p. 33-36, 1995.
- EI-SHENAWY, N.S. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, p. 379-385, 2009.

- HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behavior. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 327, p. 1-5, 1984.
- HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, p. 21-30, 1996.
- MATTAR, R.; MAZO, D.F.C. Intolerância a lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Rev Assoc Med Bras**, v. 56, p. 230-236, 2010.
- MESNAGE, R., BERNAY, B., SÉRALINI, G.-E. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. **Toxicology**, v. 313, p. 122-128, 2012.
- MORATO, S. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. **Psicologia USP**, v. 17, p. 159-174, 2006.
- MONSANTO. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 6., 2012, Cuiabá. **Anais eletrônicos...** Cuiabá: Embrapa Soja, 2012. Disponível em: <<http://www.cbsoja.com.br/anais/apresentacao/monsanto.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2014.
- MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J Comp Physiol Psychol**, v. 48, p. 254-260, 1955.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; *et al.* Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience**, v. 14, p. 149-167, 1985.
- REBELO, R.M.; VASCONCELOS, R.A.; BUYS, B.D. *et al.* **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental**. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2010. https://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/produtos_agrotoxicos_comercializados_brasil_2009.pdf. Acessado em 10 abr. 2014.
- RICHARDSON, J.R.; SHALAT, S.L.; BUCKLEY, B. *et al.* Elevated serum pesticide levels and risk of Parkinson Disease. **Arch Neurol**, v. 66, p. 870-875, 2009.
- RICKLI, C. B.; ANDREAZZI M. A. Intolerância a lactose e suas consequências no metabolismo do cálcio. In: V MOSTRA INTERNA DE TRABALHOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5. , 2010. Maringá. **Anais eletrônicos...** Maringá: CESUMAR- Centro Universitário de Maringá, 2010, 5 p. Disponível em: <http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/mostras/quin_mostra/cristiane_rickli_barbosa_1.pdf>. Acesso em: 24 abr. 2014.
- RODGERS, R.J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 21, p. 801-810, 1997.
- ROMANO, R.M., ROMANO, M.A., MOURA, M.O., *et al.* A exposição ao glifosato-Roundup causa atraso no início da puberdade em ratos machos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.45, p. 481-487, 2008.
- ROYCE, J.R. On the construct validity of open-field measures. **Psychological Bulletin**, v.84, p.1098-1106, 1977.
- SAMSEL, A.; SENEFF, S. Glyphosate's suppression of Cytochrome P450 enzymes and amino acid biosynthesis by the gut microbiome: pathways to modern diseases. **Entropy**, v. 15, p. 1416-1463, 2013..