

15º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2024

EFEITO DA EXPOSIÇÃO SUBLETAL DE MALATION POR 96 HORAS NO METABOLISMO ENERGÉTICO DE GIRINOS DE *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802).

LETÍCIA R. BELOTTI¹, RODRIGO ZIERI² e RODRIGO Y. CAMILO³

1 Graduanda em Licenciatura em Ciências Biológicas, IFSP, Campus Barretos, Bolsista PIBIC - CNPq leticia.rocha@aluno.ifsp.edu.br

2 Docente IFSP, Campus Barretos, rodrigozieri@ifsp.edu.br

3 Docente IFSP, Campus Barretos, rycamilo@ifsp.edu.br

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 2.08.00.00-2 Bioquímica

RESUMO

O Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos em seus sistemas de produção, muitos deles apresentando fatores de risco para os ecossistemas, como o escoamento dos fármacos para cursos d'água e aplicações de forma incorreta, este estudo busca encontrar e correlacionar possíveis relações entre doses de Malation, agrotóxico organofosforado usado comumente como inseticida no controle de pragas das lavouras e no do mosquito *Aedes aegypti*, e alterações metabólicas em girinos de *Lithobates catesbeianus*, por meio da exposição dos girinos à concentrações de 0,100 mg/L, 0,200 mg/L e 0,400 mg/L de Malation em ambiente controlado laboratorial pelo período de 96 horas. Neste trabalho, serão avaliadas as alterações no metabolismo energético através da análise dos tecidos hepático e muscular da cauda dos girinos. Os resultados observados demonstram que o Malation induziu mudanças no metabolismo de algumas moléculas, alterando a glicemia nos grupos de 0,100 e 0,200 mg/L. Diminuindo a glicose e o glicogênio hepáticos, com oscilações no tecido muscular. As proteínas e aminoácidos também sofreram alterações, sendo que no fígado houve redução na quantidade de proteínas, com aumento nos aminoácidos livres de alguns grupos, podendo indicar proteólise e gliconeogênese. Em relação aos triglicerídeos musculares, verificou-se níveis mais elevados do que no grupo controle. Em resumo, o Malation foi capaz de causar alterações metabólicas importantes nos girinos expostos, sugerindo que o este agrotóxico pode comprometer a capacidade dos girinos de responder a demandas energéticas, afetando seu crescimento e desenvolvimento. Além disso, a disrupção do metabolismo energético pode aumentar a susceptibilidade dos girinos a outros estressores ambientais.

PALAVRAS-CHAVE: Malation; Metabolismo energético; Ecotoxicologia.

EFFECT OF SUBLETAL EXPOSURE OF MALATION FOR 96 HOURS AND SEVEN-DAY RECOVERY ON THE ENERGY METABOLISM OF TADPOLES OF *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802).

ABSTRACT: Brazil is the world's largest consumer of pesticides in its production systems, many of which present risk factors for ecosystems, such as runoff of chemicals into water bodies and improper applications. This study aims to identify and correlate possible relationships between doses of Malathion, an organophosphate pesticide commonly used as an insecticide to control crop pests and the *Aedes aegypti* mosquito, and metabolic changes in *Lithobates catesbeianus* tadpoles. The tadpoles were exposed to concentrations of 0.100 mg/L, 0.200 mg/L, and 0.400 mg/L of Malathion in a controlled laboratory environment for 96 hours. This study will assess changes in energy metabolism by analyzing the hepatic and tail muscle tissues of the tadpoles. The observed results show that Malathion induced changes in the metabolism of some molecules, altering blood glucose levels in the 0.100 mg/L and 0.200 mg/L groups. Hepatic glucose and glycogen were reduced, with fluctuations observed in the muscle

tissue. Proteins and amino acids were also altered, with a reduction in liver protein levels and an increase in free amino acids in some groups, possibly indicating proteolysis and gluconeogenesis. Regarding muscle triglycerides, higher levels were observed compared to the control group. In summary, Malathion was able to cause significant metabolic changes in the exposed tadpoles, suggesting that this pesticide may compromise the tadpoles' ability to meet energy demands, affecting their growth and development. Furthermore, the disruption of energy metabolism may increase the tadpoles' susceptibility to other environmental stressors.

KEYWORDS: Malathion; Energy metabolism; Ecotoxicology.

INTRODUÇÃO

O agronegócio é uma atividade comercial importante no Brasil, para que os índices de produção se mantenham altos práticas intensivas como o uso de agrotóxicos são utilizadas (Marquezzini, 2021), Atualmente o país ocupa o posto do que mais utiliza agrotóxicos mundialmente e a contaminação ocasionada por eles tornou-se um dos problemas mais graves para a manutenção da qualidade ambiental (Avellar, 2020; Franklin; Mangas; da Silva, 2022).

O Malation é um agrotóxico organofosforado utilizado como inseticida, que atua inibindo a acetilcolinesterase no sistema nervoso, levando hiperestimulação e morte, ele é lipofílico e é absorvido pela pele e mucosas (Fusiguer, 2022), estudos indicam efeitos citotóxicos, genotóxicos e carcinogênicos (Moore; Patlolla; Tchounwou, 2011; Ojha; Gupta, 2015; Bastos et al., 2018; Gupta; Gupta; Kaushik, 2023), ele é utilizado na agricultura para controle de pragas (Knapik, 2018) e na saúde pública para o controle do vetor *Aedes aegypti* (Fusiguer, 2022), o uso indevido de agrotóxicos contamina os ecossistemas e pode chegar ao meio aquático dulcícola colocando em risco os organismos que dele dependem (Avellar, 2020).

Anfíbios, como a rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), dependem da água para reprodução e para sua respiração cutânea, o que os torna bioindicadores de qualidade ambiental (Condessa, 2014; Prestes; Vincenci, 2019; Fusiguer, 2022; Peluso et al., 2023), a rã-touro é usada como animal modelo em estudos devido seu valor comercial e fácil obtenção em ranários (Vizotto, 1984; Bury; Whelan, 1984). Neste trabalho os girinos de rã-touro foram submetidos a três concentrações subletais de Malation e glicogênio, glicose, triglicerídeos, aminoácidos livres e proteínas totais foram avaliados em tecido hepático e muscular da cauda para comparar e integrar as dinâmicas do metabolismo.

MATERIAL E MÉTODOS

Os girinos foram adquiridos em um criatório comercial RANAMAT e divididos em tanques para serem aclimatados, os parâmetros da água eram controlados em relação a temperatura, de cloração e aeração com compressores de ar, a limpeza e alimentação dos girinos era diária. Após 15 dias, 80 animais foram selecionados e separados em 8 aquários de 15 litros com 10 animais cada, dois desses aquários eram para os animais do grupo controle, a alimentação foi suspensa e os outros 6 foram divididos em três grupos de dois aquários, que foram expostos respectivamente a dosagens de 0,098, 0,197 e 0,395 miligramas por litro de Malation, a aeração e o controle de temperatura foram mantidos.

Ao final das 96 horas os animais foram eutanasiados com o uso de Benzocaína (5g/L) diluída em água por via cutânea, no momento da secção da cauda o sangue foi utilizado para medir a glicemia utilizando o glicosímetro G-Tech Lite, a cauda e o fígado (sem a vesícula biliar) eram então separados e armazenados em microtubos individuais, com a devida identificação, as amostras foram armazenadas e congeladas no freezer na temperatura de -20°C para posteriormente serem analisadas.

A análise dos metabolitos glicose e triglicerídeos foram feitas através de testes comerciais da LabTest específicos com a leitura feita através do biofotômetro utilizando os comprimentos de onda indicados no manual de cada teste.

Já para o glicogênio foi utilizado o método descrito por Bidinoto e colaboradores (1997), a solução obtida foi então utilizada para a determinação de açúcares redutores totais, conforme o método descrito por Dubois e colaboradores (1956), a concentração de glicogênio está expressa em μmol de glicosil-glicose por grama de tecido.

Para proteínas totais o método utilizado para determinar a concentração (expressa em mg/mL) foi conduzida em comparação com o padrão de caseína pura, e a leitura das amostras foi feita com Biofotômetro em comprimento de onda 280 nm.

O conteúdo de aminoácidos livres (expresso em mol/mL) foi determinado nas amostras conforme o método de Copley (1941) e a leitura óptica do extrato celular foi realizada em um Biofotômetro em comprimento de onda de 562 nm.

A avaliação estatística dos dados foi conduzida por meio do software BioEstat 5.0. Utilizamos o teste estatístico ANOVA General Linear Model, seguido pelo pós-teste de Tukey para a comparação entre os diferentes grupos. O critério de significância adotado foi de $p < 0,05$. Os gráficos foram elaborados utilizando o software Origin 6.0, com base nas médias e no desvio padrão da média (D.P.M).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios das análises das concentrações de glicose, glicogênio, triglicerídeos, aminoácidos livres e proteínas totais nos tecidos sanguíneo, hepático e muscular da cauda de *L. catesbeianus* submetidos a exposição por sete dias estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1: Valores médios das concentrações das moléculas analisadas dos indivíduos que passaram por uma exposição Malation por sete dias.

<i>Sangue</i>				
	CONTROLE	MALATION (0,100 mg/L)	MALATION (0,200 mg/L)	MALATION (0,400 mg/L)
<i>Glicose</i> ¹	12,838±1,660 ^b	17,100±2,931 ^a	15,925±1,441 ^a	13,913±1,620 ^b
<i>Fígado</i>				
<i>Triglicerídeos</i> ²	42,535±6,272 ^a	31,324±9,875 ^b	34,011±5,014 ^b	45,380±7,802 ^a
<i>Proteínas</i> ²	5,671±0,830 ^a	4,026±0,641 ^b	4,875±0,825 ^b	4,731±0,519 ^b
<i>Aminoácidos</i> ²	1,306±0,215 ^a	0,961±0,299 ^b	0,961±0,180 ^b	1,481±0,272 ^a
<i>Glicose</i> ²	24,460±3,791 ^a	17,100±4,739 ^b	16,357±6,703 ^b	16,248±4,856 ^b
<i>Glicogênio</i> ³	2,986±0,374 ^a	2,039±0,604 ^b	2,374±0,244 ^b	3,026±0,359 ^a
<i>Músculo caudal</i>				
<i>Triglicerídeos</i> ²	0,584±0,196 ^b	0,855±0,191 ^a	0,863±0,205 ^a	1,007±0,198 ^a
<i>Proteínas</i> ²	0,571±0,076 ^b	0,752±0,130 ^a	0,539±0,114 ^b	0,328±0,069 ^c
<i>Aminoácidos</i> ²	0,045±0,006 ^d	0,059±0,005 ^b	0,052±0,006 ^c	0,066±0,004 ^a
<i>Glicose</i> ⁴	0,668±0,226 ^b	1,159±0,252 ^a	1,070±0,174 ^a	1,190±0,233 ^a
<i>Glicogênio</i> ³	0,466±0,034 ^c	0,520±0,034 ^b	0,623±0,040 ^a	0,633±0,038 ^a

Letras diferentes na mesma linha significa diferenças estatísticas ($p < 0,05$) (média \pm D.P.M.) (n=10). 1 Expressos em mg/dL de sangue; 2 Expressos em mg/g tecido; 3 Expressos em $\mu\text{mol/g}$ tecido e 4 Expressos em $\mu\text{g/g}$ tecido

Durante a exposição de sete dias ao Malation, os tecidos analisados mostraram alterações significativas.

Perfil glicídico:

No sangue, os grupos expostos a 0,100 mg/L e 0,200 mg/L de Malation apresentaram níveis de glicose superiores aos outros grupos. No fígado, a glicose foi maior no grupo controle. No músculo caudal, a glicose aumentou significativamente em todos os grupos expostos.

O glicogênio hepático foi maior no grupo controle e no grupo exposto a 0,400 mg/L, enquanto no músculo caudal, as concentrações de glicogênio foram maiores nos grupos expostos a 0,200 mg/L e 0,400 mg/L.

Perfil proteico:

Os aminoácidos hepáticos foram maiores no grupo controle e no grupo exposto a 0,400 mg/L. No músculo caudal, todos os grupos expostos tiveram aumento de aminoácidos, com o grupo de 0,400 mg/L

apresentando a maior concentração. As proteínas hepáticas diminuíram em todos os grupos expostos, enquanto no músculo caudal, houve aumento de proteínas no grupo de 0,100 mg/L e redução no grupo de 0,400 mg/L.

Perfil lipídico:

Os triglicerídeos hepáticos foram semelhantes entre o grupo controle e o grupo exposto a 0,400 mg/L, enquanto no músculo caudal, os triglicerídeos aumentaram em todos os grupos expostos.

CONCLUSÕES

Quando um animal é exposto a um estressor, como um pesticida, o corpo desencadeia reações metabólicas para manter a homeostase, incluindo hiperglicemia, causada pela liberação de catecolaminas e glicocorticoides (Soares, 2016). No estudo, os grupos expostos a 0,100 mg/L e 0,200 mg/L de Malation por sete dias apresentaram aumento da glicemia, com o maior crescimento observado no grupo de 0,100 mg/L. O grupo exposto a 0,400 mg/L teve níveis de glicemia semelhantes ao controle.

A exposição a xenobióticos aumenta a demanda energética, esgotando as reservas de glicogênio, especialmente no fígado, uma molécula importante para manter a homeostase em situações críticas (Dornelles; Oliveira, 2013). A glicose liberada pode ser usada para síntese de glicoproteínas, componentes essenciais das células (Wilkens, 2017). Foi observada uma redução na glicose hepática nos grupos expostos, possivelmente devido ao uso dessa molécula para gerar ATP no processo de detoxificação (Chagas, 2019; Wilkens, 2017). No tecido muscular caudal, houve aumento de glicose, possivelmente devido ao aumento da glicemia ou ao efeito da corticosterona, que inibe a captação de glicose nos tecidos periféricos, permitindo que o músculo a utilize (Wilkens, 2017).

Os níveis de glicogênio no fígado foram maiores no grupo controle em comparação aos grupos expostos a 0,100 e 0,200 mg/L, o que pode ser explicado pelo aumento dos níveis glicêmicos nesses grupos, sugerindo que a glicose liberada pela glicogenólise foi utilizada para manter o funcionamento dos tecidos e desintoxicar o organismo (Soares, 2016). No músculo caudal, os níveis de glicogênio foram semelhantes ao controle no grupo de 0,100 mg/L, enquanto nos grupos de 0,200 e 0,400 mg/L os níveis foram maiores, indicando preservação das reservas de glicogênio ou o uso de outros substratos energéticos.

Quanto às proteínas, no músculo caudal, o grupo de 0,200 mg/L apresentou uma média menor do que o controle, mas sem relevância estatística, enquanto o grupo de 0,100 mg/L teve níveis maiores e o grupo de 0,400 mg/L apresentou redução significativa, cerca de 44% menor em comparação ao controle. No fígado, todos os grupos expostos apresentaram menor quantidade de proteínas, com o grupo de 0,100 mg/L exibindo a menor quantidade. A diminuição das proteínas pode estar relacionada ao uso de substratos para produção de ATP ou para criar lipoproteínas, necessárias ao reparo celular (Dornelles; Oliveira, 2013). A ação do Malation sobre a enzima acetilcolinesterase pode explicar o aumento de proteínas no grupo de 0,100 mg/L, como uma resposta adaptativa à hiperestimulação muscular, e a redução no grupo de 0,400 mg/L pode estar ligada à superação da capacidade de adaptação do tecido muscular, levando à degradação proteica (Chagas, 2019).

No fígado, o grupo controle e o de 0,400 mg/L apresentaram maiores quantidades de aminoácidos livres, enquanto os grupos de 0,100 e 0,200 mg/L tiveram menores níveis, possivelmente devido ao uso na síntese proteica ou na gliconeogênese. No músculo, houve aumento de aminoácidos em todos os grupos expostos, sugerindo proteólise no grupo de 0,400 mg/L, que não conseguiu sintetizar novas proteínas (Militão, 2021).

Em relação aos triglicerídeos, os níveis no fígado foram semelhantes entre o controle e o grupo de 0,400 mg/L, enquanto no tecido muscular, os grupos expostos apresentaram níveis mais elevados, possivelmente devido à menor disponibilidade de oxigênio, o que prejudica a oxidação dos compostos, consequência de danos na epiderme causados pelo Malation (Fusiguer, 2022).

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Os autores Rodrigo Y. Camilo e Rodrigo Zieri contribuíram na metodologia e na supervisão do experimento, Letícia R. Belotti participou da execução, da coleta de dados, da redação do manuscrito,

pesquisa e da análise de dados em conjunto com o Rodrigo Y. Camilo, que também atuou na revisão, análise estatística e supervisionou a coleta de dados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente aos meus professores Rodrigo Y. Camilo e Rodrigo Zieri, as minhas colegas de laboratório e à equipe de técnicos dos laboratórios. Ao CNPq pela bolsa do PIBIC e ao IFSP Barretos.

REFERÊNCIAS

AVELLAR, Á. A. D. S. **Determinação multirresíduo de agrotóxicos em água empregando SPE e UHPLC-MS/MS.** Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, p.100. 2020.

BASTOS, P. L. *et al.* Carcinogenicidade e mutagenicidade do malathion e seus dois análogos: uma revisão sistemática. **Ciência & Saúde Coletiva**, Pernambuco, 2020., p. 3273-3297.

BURY, R.B.; WHELAN, J.A., **Ecology and management of the bullfrog.** U.S. Fish and Wildlife Service Resource. Publication, 1984.

CHAGAS, B. R. C. **Respostas metabólicas em girinos de rã- touro, *Lithobates catesbeianus* após exposição ao zinco, cobre e cádmio.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos do *Campus* de Sorocaba. Sorocaba, p. 98. 2019.

CONDESSA, S. S. **Estresse oxidativo causado pelo cromo hexavalente e ação da vitamina C em *Astyanax aff. bimaculatus* (Teleostei: Characidae) machos adultos e potencial biossortivo da casca de coco verde (*Cocos nucifera* L.).** Tese (Doutorado em Análises quantitativas e moleculares do Genoma; Biologia das células e dos tecidos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p. 204. 2014.

DORNELLES, M. F.; OLIVEIRA, G. T. Effect of Atrazine, Glyphosate and Quinclorac on Biochemical Parameters, Lipid Peroxidation and Survival in Bullfrog Tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 66, n.3, p. 415-429.

FRANKLIN, W. M.; MANGAS, M. B.P.; DA SILVA, B., J. G., Determinação de Contaminantes Emergentes em Amostras de Água no Brasil por Técnicas Voltamétricas: Revisão da Literatura. **Revista Virtual de Química**, v. 15, n. 1, p. 1-30. 2022. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/362003611_Determination_of_Emerging_Contaminants_in_Water_Samples_in_Brazil_by_Voltammetric_Techniques_A_Literature_Review. Acesso em: 30 jan. 2023.

FUSIGUER, F. A. **Efeitos adversos do inseticida malation sobre anfíbios.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Foz do Iguaçu, p. 54. 2022.

GUPTA, R.; GUPTA, T.; KAUSHIK, D. Ameliorative effect of ellagic acid and Vitamin C against malathion-induced toxicity in testis of adult Wistar rats. **Journal of biochemical and molecular**

toxicology, v. 37, n. 5, e23314, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36650745/>. Acesso em: 30 jan. 2023.

KNAPIK, L. F. O. **Ecotoxicidade do inseticida malathion e seus efeitos sobre os biomarcadores ensaio cometa e acetilcolinesterase em *Daphnia magna***. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Curitiba, p. 62. 2018.

MARQUEZINI, S. **Uma visão geral sobre os agrotóxicos no brasil, resíduos na água e efeitos em organismos aquáticos**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, p.73. 2021. Disponível em: <https://rd.uffs.edu.br/handle/prefix/6540>. Acesso em: 27 fev. 2024.

MILITÃO, G.F.G.; ZIERI, R; CAMILO, R.Y. Determinação da Concentração Letal (CL50) de Malathion 500 CE em girinos de *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802). In: SALÃO DE PESQUISA E INOVAÇÃO, VI, 2021, Barretos: **Anais Salão de Pesquisa e Inovação: IFSP Câmpus Barretos**, 2021. Disponível em: <https://intra.brt.ifsp.edu.br/eventos/spi/?pag=tmpeicoesanteriores>. Acesso em: 30 de jan. de 2023.

MOORE, P. D.; PATLOLLA, A. K.; TCHOUNWOU, P. B. Cytogenetic evaluation of malathion-induced toxicity in Sprague-Dawley rats. **Mutation research**, v. 725, n. 1–2, p. 78–82, 2011.

OJHA, A.; GUPTA, Y. K. Evaluation of genotoxic potential of commonly used organophosphate pesticides in peripheral blood lymphocytes of rats. **Human & experimental toxicology**, v. 34, n. 4, p. 390–400, 2014.

PELUSO, J. et al., Metals, pesticides, and emerging contaminants on water bodies from agricultural areas and the effects on a native amphibian, **Environmental Research**, V. 226, 2023.

PRESTES, R. M.; VINCENCI, K. L. Bioindicadores como avaliação de impacto ambiental. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, Curitiba, set. 2019., p. 1473-1493.

MARQUEZINI, S. **Uma visão geral sobre os agrotóxicos no brasil, resíduos na água e efeitos em organismos aquáticos**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, p.73. 2021. Disponível em: <https://rd.uffs.edu.br/handle/prefix/6540>. Acesso em: 27 fev. 2024.

SOARES, C. A. P. **Estudo de indicadores de estresse em *Brycon amazonicus* (matrinxã) exposto a deltametrina (Keshet®)**. Dissertação (Mestrado em em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p.91. 2016.

WILKENS, A. L. L. **Efeito dos herbicidas boral® 500 sc e glifosato® isolados e em mistura sobre o balanço oxidativo, os níveis de glicose e de corticosterona de *Rana catesbeiana* Shaw, 1802**. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, p. 83. 2017.

VIZOTTO, L.D. Ranicultura. **Ciência e Cultura**. v.36, p.42-45. 1984.