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

ANÁLISE DO COMPORTAMENTO NATATÓRIO DE LARVAS DE *Lithobates catesbeianus* APÓS A EXPOSIÇÃO SUBLETAL DO INSETICIDA MALATHION 500CE

[1]MIRELLA B. SPATINI, [1]NICOLE T. BARBOSA, [1]LETÍCIA R. BELOTTI, [1]GABRIEL H. LOPES, [2]RODRIGO Y. CAMILO, [2]RODRIGO ZIERI

[1] Graduando em Licenciatura em Ciências Biológicas – IFSP Barretos, Laboratório de Ensaios Ecotoxicológicos de Animais Aquáticos. m.spatini@aluno.ifsp.edu.br
[2] Docente IFSP Barretos - Laboratório de Ensaios Ecotoxicológicos de Animais Aquáticos - IFSP Barretos

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 2.02.02.00-7 Morfologia dos Grupos Recentes

RESUMO:

O uso generalizado e inapropriado de agrotóxicos levantou sérias preocupações ambientais, especialmente no que diz respeito à contaminação aquática. Nesse cenário, os anfíbios emergem como fundamentais bioindicadores da saúde ambiental devido à sua pele permeável e ciclo de vida que inclui fases aquáticas e terrestres. O Malathion, um agrotóxico de fácil comercialização, utilizado no controle de larvas de *Aedes aegypti* e em diversas culturas agrícolas como arroz, algodão, feijão, café, soja e trigo, foi o químico utilizado neste estudo. A presente pesquisa analisou o comportamento natatório de girinos de *Lithobates catesbeianus* (rã-touro-americana) expostos a concentrações de 0,00 mg/L, 0,1 mg/L e 0,4 mg/L do Malathion 500 CE por um período de 96 horas. Os resultados mostraram que os girinos expostos ao Malathion percorreram distâncias menores e apresentaram velocidades máxima e média reduzidas em comparação com o grupo controle. No entanto, não houve diferenças significativas entre as diferentes concentrações de Malathion. Esses achados sugerem que o Malathion 500 CE afeta negativamente o comportamento natatório dos girinos, reduzindo sua velocidade e distância percorrida, independentemente da dose utilizada.

PALAVRAS-CHAVE: agrotóxico; exposição aguda; malathion; *Lithobates catesbeianus*; comportamento natatório.

ANALYSIS OF SWIMMING BEHAVIOR IN *Lithobates catesbeianus* LARVAE AFTER SUBLETHAL EXPOSURE TO THE INSECTICIDE MALATHION 500CE

ABSTRACT: The widespread and inappropriate use of pesticides has raised serious environmental concerns, particularly regarding aquatic contamination. In this context, amphibians emerge as key bioindicators of environmental health due to their permeable skin and life cycle that includes both aquatic and terrestrial phases. Malathion, a readily available pesticide used in the control of Aedes aegypti larvae and in various agricultural crops such as rice, cotton, beans, coffee, soybeans, and wheat, was the chemical used in this study. This research analyzed the swimming behavior of Lithobates catesbeianus (American bullfrog) tadpoles exposed to concentrations of 0.00 mg/L, 0.1 mg/L, and 0.4 mg/L of Malathion 500 CE over a period of 96 hours. The results showed that the tadpoles exposed to Malathion covered shorter distances and exhibited reduced maximum and average speeds compared to the control group. However, there were no significant differences between the different concentrations of Malathion. These findings suggest that Malathion 500 CE negatively affects the swimming behavior of the tadpoles, reducing their speed and distance traveled, regardless of the dose used.

KEYWORDS: pesticide; acute exposure; Malathion; *Lithobates catesbeianus*; swimming behavior.

INTRODUÇÃO

O uso extensivo e inapropriado de agrotóxicos na agricultura tem gerado graves impactos ambientais, sobretudo em ecossistemas aquáticos, onde substâncias químicas podem se dispersar facilmente com a ação dos ventos e da água da chuva, atingindo locais distantes de onde foram aplicadas e, consequentemente, organismos não-alvos (Morello; Collet, 2013). A contaminação de corpos d'água por essas substâncias afeta diretamente a biodiversidade local, sendo os anfíbios um dos grupos mais vulneráveis a essa contaminação. Devido à alta permeabilidade cutânea e ao ciclo de vida bimodal, os anfíbios estão entre os grupos mais sensíveis à exposição a contaminantes (Gonçalves *et al*., 2019; Agostini *et al*., 2020).

Diante disto, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos subletais do inseticida Malathion 500CE no comportamento natatório de girinos de *Lithobates catesbeianus* (rã-touro-americana). A espécie em questão foi escolhida por ser amplamente utilizada em estudos ecotoxicológicos e ser considerada um bioindicador eficaz para monitorar a qualidade ambiental. Para a pesquisa, foram analisadas as mudanças na distância percorrida e nas velocidades máxima e média dos girinos expostos a diferentes concentrações do inseticida, comparando-os a um grupo controle que não teve contato com o químico.

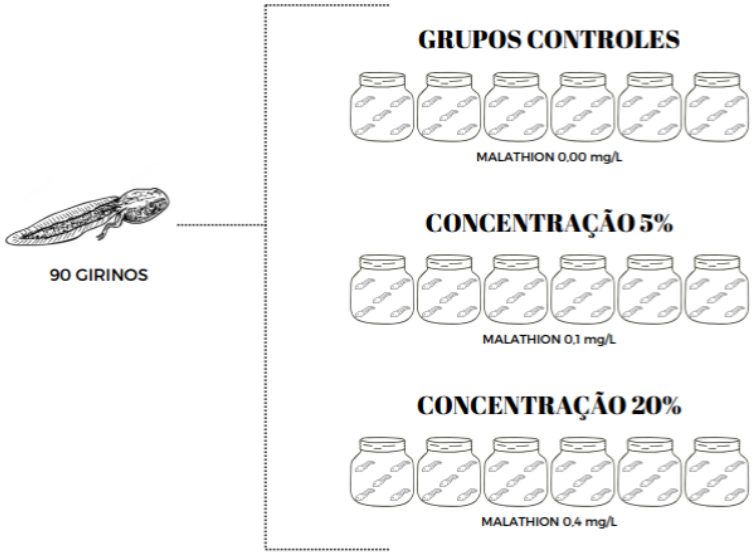
A relevância deste estudo reside na necessidade de investigar como agrotóxicos amplamente utilizados podem afetar organismos aquático, visto que, apesar do crescente número de pesquisas, o conhecimento sobre os impactos ambientais e na saúde humana ainda é insuficiente. É crucial aprofundar o entendimento das perturbações, permitindo o desenvolvimento de medidas mitigadoras ou a erradicação de práticas que causem interferências ambientais severas.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no laboratório de ensaios ecotoxicológicos de animais aquáticos do Instituto Federal de São Paulo (IFSP), Campus Barretos. Foram utilizados 90 girinos de *L. catesbeianus*, adquiridos do ranário Ranamat, em Matão/SP. Os girinos foram aclimatados por 30 dias em tanques de 50 litros com aeração constante, alimentados com ração floculada para peixes, em temperatura ambiente (± 27°C) e fotoperíodo de 12/12, assegurando condições adequadas antes da exposição ao inseticida.

Os girinos foram divididos em três grupos para o experimento: grupo controle (0,00 mg/L), grupo com 0,1 mg/L e grupo com 0,4 mg/L. Cada grupo foi alocado em seis recipientes de vidro de 3 litros, com cinco girinos em cada recipiente (*Figura 1*). Em seguida, foram expostos ao Malathion 500 CE em concentrações subletais de 0,1 mg/L e 0,4 mg/L, baseadas na concentração letal (CL50) do produto e na Resolução nº 357/05 do CONAMA. A CL50 do Malathion 500 CE é de 2,00 mg/L, e a concentração máxima permitida de Malathion em corpos d'água, segundo a Resolução do CONAMA, é de 100 µg/L. Assim, para este estudo, foram utilizadas 5% (0,1 mg/L) e 20% (0,4 mg/L) da CL50.

FIGURA 1. Representação esquemática dos 90 girinos, dispostos aleatoriamente em 18 recipientes, contendo 5 girinos cada.



Após 96 horas de exposição, os girinos foram filmados individualmente por 90 segundos, sendo estimulados próximos à região da cauda a cada 15 segundos para simular ataques predatórios. O software Kinovea foi usado para medir a distância percorrida e as velocidades máxima e média dos girinos. Para as análises estatísticas foi realizado teste de normalidade de Shapiro-Wilk, transformação logarítmica dos dados, seguido da verificação da homocedasticidade através do teste de Levene. Utilizamos a análise de variância ANOVA-one-way com nível de significância $p<0,05$, seguida de teste post-hoc de Tukey-HSH para verificação de diferença entre os pares dos tratamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

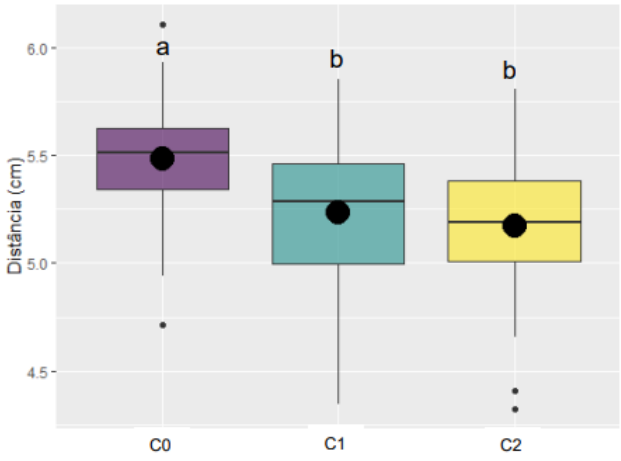
Os resultados do estudo destacam o impacto do Malathion no comportamento natatório dos girinos de *L. catesbeianus*, evidenciando alterações significativas em comparação com o grupo controle. Os girinos expostos ao Malathion em concentrações de 0,1 mg/L e 0,4 mg/L apresentaram uma redução na distância percorrida, velocidade máxima e velocidade média, indicando um efeito adverso do agrotóxico (*Tabela 1).*

TABELA 1. Valores médios das três medidas analisadas (distância percorrida, velocidade máxima e velocidade média) do grupo controle, grupo 5% e grupo 20%.

Grupos	Distância (cm)	Vel. Máx (m/s)	Vel. Média (m/s)
a - Controle (C0)	250,28 ± 72,12	0,29 ± 0,057	0,026 ± 0,0079
b - 0,1 mg/L (C1)	199,13 ± 67,80	0,22 ± 0,041	0,020 ± 0,0075
c – 0,4 mg/L (C2)	184,96 ± 56,74	0,21 ± 0,045	0,021 ± 0,006

Na análise dos dados, a *Figura 2* demonstra que o grupo controle, não exposto ao Malathion, percorreu distâncias médias significativamente maiores do que os grupos expostos. Especificamente, a distância percorrida pelos girinos expostos a 0,1 mg/L foi reduzida em aproximadamente 1,26 vezes em comparação ao grupo controle. Na concentração mais alta de 0,4 mg/L, a redução foi ainda mais acentuada, cerca de 1,35 vezes. Estas diferenças foram estatisticamente significativas ($F2,87=7,62$; $p=0,00089$). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações de 0,1 mg/L e 0,4 mg/L ($p=0,72$), sugerindo que ambas as concentrações tiveram efeitos semelhantes no comportamento dos girinos.

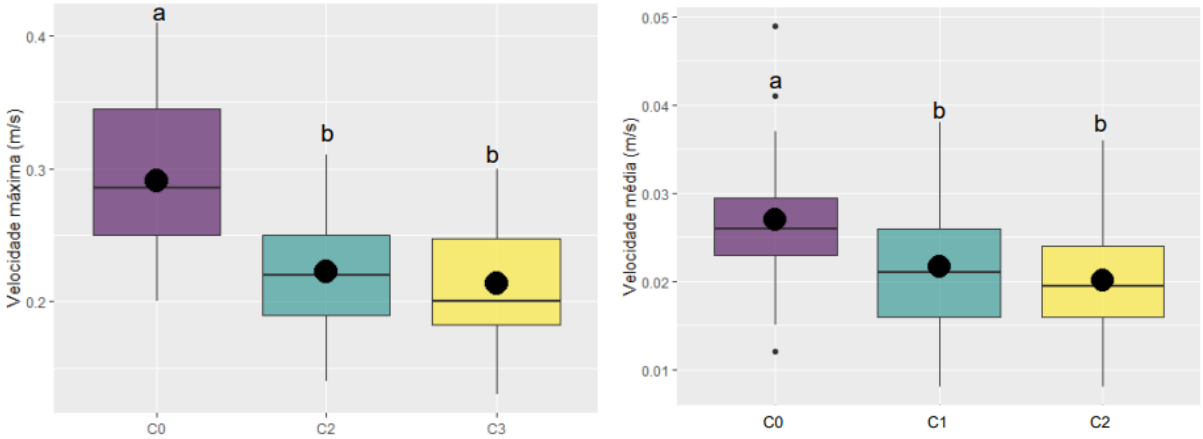
FIGURA 2. Representação gráfica da distância média percorrida dos grupos C0, C1 e C2. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p<0,05$).



Além disso, a análise das velocidades máxima e média revelou resultados consistentes. Os girinos expostos ao Malathion apresentaram velocidades máximas e médias menores do que os girinos do grupo controle (*Figura 3*). A velocidade máxima foi reduzida em cerca de 1,32 vezes na concentração de 0,1 mg/L e em 1,38 vezes na de 0,4 mg/L. A velocidade média dos girinos também diminuiu, com

uma redução de aproximadamente 1,3 vezes na concentração de 0,1 mg/L e 1,23 vezes na concentração de 0,4 mg/L. Essas diferenças também foram estatisticamente significativas (velocidade máxima: F2,87=21,36; p=2,85e-08; velocidade média: F2,87=6,98; p=0,00154). Contudo, entre as duas concentrações de Malathion, não houve diferenças significativas para a velocidade máxima (p=0,711) e a velocidade média (p=0,719).

FIGURA 3. Representação gráfica da média da velocidade máxima e média dos grupos C0, C1 e C2. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (p<0,05).



Por se tratar de um inseticida organofosforado, o Malathion atua inibindo permanentemente a enzima acetilcolinesterase, responsável pela degradação da acetilcolina. Uma vez que a acetilcolinesterase é inibida, ela impede a interrupção da acetilcolina, ocasionando o seu acúmulo e impactando na transmissão do impulso nervoso, o que interfere nas funções do controle motor e sinais de alerta dos girinos (Fischer, 2021). Tais interferências citadas acima podem estar relacionadas aos resultados obtidos neste experimento, na qual a exposição ao Malathion impactou negativamente no comportamento natatório dos animais, sugerindo que sua atuação afetou a ação dessa enzima nesses indivíduos, resultando em um atraso na percepção e reação aos estímulos que simulavam ataques predatórios.

No trabalho de Fort *et al*. (2018), o autor realizou um experimento com indivíduos juvenis da espécie de *L. catesbeianus*, analisando o efeito após a administração oral de uma dose única da substância pura do Malathion. A dosagem administrada manifestou o mesmo efeito dos resultados obtidos neste trabalho, causando letargia e interferindo na atividade natatória dos animais.

Fusiger (2022), em seu estudo sobre os efeitos adversos do malathion em anfíbios, identificou diversas interferências ocasionadas pelo composto em anuros. Dentre elas, foi observado impactos no nado de girinos de *Xenopus laevis* (rã-de-unhas-africana). Na presente pesquisa, também foi possível identificar interferências no comportamento natatório de girinos, no caso de *L. catesbeianus*, quando submetidos a exposição ao composto, indicando que a substância em questão atua de maneira similar em mais de uma espécie do grupo. Além disso, reforça-se que os agrotóxicos de maneira geral apresentam uma função biocida sem ação seletiva, o que pode ocasionar agravamentos em espécies não-alvo (Santos, 2021).

Retoma-se também que a concentração máxima permitida de malathion em corpos d'água cuja função não seja voltada a atividade de abastecimento da população é de 100 µg/L. Para o experimento em questão, na dosagem mais baixa (de 5%) utilizamos 0,1 mg/L, o que corresponde a 100 µg/L, sendo que nessa concentração obtivemos o mesmo efeito no comportamento natatório quando comparado à exposição na concentração de 20% da CL50. Logo, observa-se que a concentração limite de Malathion permitida pela resolução nº 357/05 do CONAMA em corpos de água, sem a função de abastecimento da população, ainda é prejudicial para os girinos de *L. catesbeianus*.

CONCLUSÕES

Neste estudo, observou-se que os girinos expostos ao Malathion apresentaram uma alteração no comportamento natatório, caracterizada por uma redução na distância percorrida e nas velocidades máxima e média, em comparação ao grupo controle.

Durante as 96 horas de exposição ao composto, os girinos não mostraram mudanças visíveis em seu comportamento. Contudo, as análises dos resultados revelaram que o Malathion 500 CE afetou significativamente esses parâmetros.

Em relação às concentrações testadas, não foi detectada uma diferença significativa entre os grupos expostos a 0,1 mg/L e 0,4 mg/L, uma vez que os resultados foram bastante similares. No entanto, comparado ao grupo controle, ambos os grupos expostos ao Malathion apresentaram uma redução na velocidade e na distância percorrida.

Portanto, conclui-se que o Malathion 500 CE impacta negativamente o comportamento de nado dos girinos de *L. catesbeianus*, diminuindo sua velocidade e distância percorrida, mesmo em concentrações mais baixas, como 0,1 mg/L, sem diferença significativa em relação à concentração de 0,4 mg/L.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

G.H.L. e L. R. B. colaboraram na aclimatação e no manejo dos girinos. N. T. B. contribuiu para a metodologia e auxiliou nos experimentos. R. Z. e R. Y. C. atuaram na orientação e coorientação do trabalho, auxiliando na metodologia, no preparo do experimento e na revisão do conteúdo.

AGRADECIMENTOS

Aos que participaram, direta ou indiretamente, do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, contribuindo para a minha jornada acadêmica e enriquecendo o meu crescimento científico.

REFERÊNCIAS

AGOSTINI, M. G. et al. Pesticides in the real world: The consequences of GMO - based intensive agriculture on native amphibians. **Biological Conservation**, v. 241, n. 108355, p.1-8, 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006320719309905. Acesso em: 30 nov. 2023.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 357, de 15 de junho de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.** 2005. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcda_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf. Acesso em: 13 dez. 2023.

FISCHER, A. K. **Efeitos adversos do inseticida malation sobre peixes**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021. Disponível em: https://dspace.unila.edu.br/bitstream/handle/123456789/6345/Efeitos%20Adversos%20do%20Inseticida%20Malation%20sobre%20Peixes%20- %20Amanda%20Kawka%20Fischer.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 16 dez. 2023.

FORT, D. J.et al. Evaluation of an acute oral gavage method for assessment of pesticide toxicity in terrestrial amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 436–450, 2018.

FUSIGER, F. A. **Efeitos adversos do inseticida malation sobre anfíbios**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino- Americana, Foz do Iguaçu, 2022. Disponível em: https://dspace.unila.edu.br/bitstream/handle/123456789/6782/Efeitos%20Adversos%20do%20Inseticida%20Malation%20sobre%20Anf%c3%adbios?sequence=1&isAllo wed=y. Acesso em: 16 dez. 2023

GONÇALVES, M. W. et al. Assessing Genotoxicity and Mutagenicity of Three Common Amphibian Species Inhabiting Agroecosystem Environment. **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, v. 77, n. 3, p. 409-420, 2019.

MORELLO, C. COLLET, S. A. O. Os agrotóxicos e sua influência no meio ambiente e na saúde humana. **Os desafios da escola pública paranaense na perspectiva do professor PDE**, Paraná, v. 1, 2013. Disponível em: http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/cadernospde/pdebusca/producoes_pde/2013/2013_uem_bio_artigo_celia_morello.pdf. Acesso em: 15 dez. 2023.

SANTOS, A. T. **Exposição aguda e crônica de fipronil em girinos de rã touro (Lithobates catesbeianus):** efeitos genotóxicos e morfológicos. 2021. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2021. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/7685b71b-c9be-4a52-839d2ec246b6fc2d/content. Acesso em: 16 dez. 2023.