



Avaliação do potencial mutagênico e citotóxico do herbicida 2,4-D, em *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae)

RESUMO

Denis Damasio

Denisdamasio01@gmail.com

Aluno da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Dois Vizinhos, UTFPR, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Elton Celton de Oliveira

elton.c.oliveira2@gmail.com

Prof. Dr. da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Dois Vizinhos, UTFPR, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Aliciane de Almeida Roque

alicianeroque@gmail.com

Mestranda do Programa de Pós-graduação em Agroecossistemas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Dois Vizinhos, UTFPR, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Tábatta Kim Marques Soares

tabattamarques@gmail.com

Aluna da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Dois Vizinhos, UTFPR, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Samara Dossena

samara.c.dossena@hotmail.com

Aluna da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Dois Vizinhos, UTFPR, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Francisco Luiz Girardi

girardi.fco@gmail.com

Aluno da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Dois Vizinhos, UTFPR, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Nédia de Castilhos Ghisi

nediaqghisi@gmail.com

Prof. Dr. da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Dois Vizinhos, UTFPR, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

OBJETIVO: Avaliar por meio dos testes de micronúcleo písceo (MN) e alterações eritrocitárias nucleares (ENA) os efeitos mutagênicos e citotóxicos do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). **MÉTODOS:** Exemplares da *Rhamdia quelen* foram submetidos durante um período de 24 horas a quatro diferentes tratamentos, sendo: 0, 15, 30 e 60 µg/L de princípio ativo dissolvidos na água do próprio aquário. A determinação das frequências de MN e ENA foram realizadas através da quantificação de 1000 eritrócitos por animal. **RESULTADOS:** Os resultados demonstraram que o herbicida 2,4-D não apresentou evidências de mutagenicidade/citotoxicidade sobre a espécie em questão, quando submetida ao período e concentrações testadas. **CONCLUSÕES:** Recomenda-se análise integrada com outros biomarcadores, bem como avaliação em diferentes períodos de exposição.

PALAVRAS-CHAVE: Pesticida. Peixe. Mutação. Contaminação.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos no mundo (FARIA et al., 2007). Os agrotóxicos constituem um universo de substâncias, que representam um meio para o controle de pragas e doenças em larga escala, ao menos em curto prazo (BOLOGNESI, 2003).

Em contrapartida aos aspectos positivos inerentes aos defensivos agrícolas, alterações em diversos níveis de organização biológica já foram reportados como consequências negativas ao seu uso. Podem-se destacar os impactos causados à biota, como consequência da contaminação da água de rios, riachos e reservatórios, gerando efeitos deletérios sobre moléculas, tecidos, órgãos, indivíduos, populações e comunidades (GRISOLIA, 2005).

Dentre os organismos aquáticos expostos aos agroquímicos, destacam-se os peixes, e devido suas características de acumular, armazenar e metabolizar poluentes têm sido amplamente empregados em programas de biomonitoramento (VAN DER OOST et al., 2003).

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), é uma molécula conhecida há bastante tempo, desenvolvida durante a Segunda Guerra Mundial, foi largamente utilizada com um dos componentes do agente laranja durante a guerra do Vietnã. Seu uso encontra-se proibido em diversos países europeus, como Dinamarca, Suécia e Noruega (ITHO, 2007).

A progressiva perda da eficácia do glifosato vem sendo um estímulo ao maior uso do 2,4-D nas lavouras brasileiras, sendo atualmente um dos herbicidas mais utilizados do Brasil (OLIVEIRA et al., 2013). Isso tem gerando polêmica, pois a toxicidade deste pesticida a saúde humana e ambiental já foram reportadas. Com base nisso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar, através dos testes de micronúcleo pisco (MN) e alterações eritrocitárias nucleares (ENA), os efeitos mutagênicos e citotóxicos do herbicida 2,4-D sobre a espécie *Rhamdia quelen*, às concentrações de 0, 15, 30 e 60 µg/L por 24h.

METODOLOGIA

O estudo foi realizado com juvenis da espécie *R. quelen* (comprimento médio de 18±2,5 cm), obtidos em piscicultura comercial, os quais foram aclimatados em tanques com aeração e temperatura controladas pelo período de 15 dias. Para os bioensaios, os animais foram distribuídos em 12 aquários de 50 litros, em grupos de 5 indivíduos. O herbicida 2,4-D (produto puro, padrão analítico Sigma Aldrich®) foi diluído na água de cada aquário, nas concentrações de 0 (controle negativo), 15, 30 e 60 µg/L, com cada uma das concentrações em triplicata. Ao final do período de 24 horas, os indivíduos foram previamente anestesiados com cloridrato de benzocaína (100mg/L) para a retirada de um pequeno volume de sangue por punção caudal. O sangue coletado foi então pingado sobre uma lâmina de microscópio, realizado esfregaço com auxílio de um extensor e após a secagem foi fixado com etanol 96% por 30 minutos. Para posterior análise em microscopia óptica, as lâminas foram coradas por 7 minutos com Giemsa 10%, diluída em tampão fosfato (pH 6,8) e após enxaguadas em água corrente. Quantificou-se as alterações verificadas em um total de 1.000 eritrócitos/peixe/lâmina, considerando apenas os que apresentavam membranas plasmáticas intactas. Para a identificação de alterações nucleares, adotaram-se os mesmos critérios utilizados por Carrasco; Tilbury; Myers (1990). Micronúcleos só foram considerados, quando seu diâmetro não excedeu cerca de 1/3 do tamanho do núcleo principal e encontravam-se nitidamente separados, com a mesma cor e intensidade. Demais anormalidades na forma elíptica padrão do núcleo das

hemácias também foram quantificadas conforme os critérios de classificação de Fenech (2000). Para análise estatística, os resultados obtidos foram comparados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando o nível de significância de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta o número médio de micronúcleos e demais anomalias nucleares para cada 1.000 células contabilizadas de cada exemplar de *Rhamdia quelen*, submetidos a três concentrações de 2,4-D pelo período de 24 horas. Durante o período da exposição ao pesticida, não se observou mortalidade em nenhum grupo.

Tabela 1 - Médias e desvio padrão de micronúcleos e anormalidades nucleares em eritrócitos de *Rhamdia quelen* expostos aos diferentes tratamentos.

[$\mu\text{g/L}$]	NT	LB	BL	BN	VC	MN
15	0.73 $\pm$ 1.12	4.07 $\pm$ 3.56	1.60 $\pm$ 1.85	0.20 $\pm$ 0.4	0.27 $\pm$ 0.57	1.13 $\pm$ 1.78
30	0.67 $\pm$ 0.86	2.87 $\pm$ 2.98	1.07 $\pm$ 1.65	0.13 $\pm$ 0.33	0.53 $\pm$ 1.08	1.20 $\pm$ 2.97
60	1.20 $\pm$ 2.22	5.07 $\pm$ 6.56	0.80 $\pm$ 1.37	0.20 $\pm$ 0.54	0.47 $\pm$ 1.08	2.53 $\pm$ 4.84
0	0.67 $\pm$ 1.19	1.93 $\pm$ 2.56	0.47 $\pm$ 1.49	0.20 $\pm$ 0.4	0.07 $\pm$ 0.24	0.53 $\pm$ 1.49

Fonte: Autoria própria (2017). Nota: [$\mu\text{g/L}$]: Concentração empregada, NT: Notched (Entalhado), LB: Lobed (Lobado), BL: Blebbed (em bolha), BN: Binucleated (Binucleado), VC: Vacuolated (Vacuolado), MN: Micronúcleo.

Como os dados não atenderam os pressupostos de normalidade e homogeneidade optou-se pela aplicação do teste de Kruskal-Wallis. Assim, embora na Tabela 1 se possa observar que em relação à média, o grupo controle (0 $\mu\text{g/L}$) apresentou as menores taxas de danos, estas diferenças não se revelaram significativas após aplicação do teste estatístico, sendo o valor de $P \geq 0,05$ (Figura 1).

ENA: KW-H(3,60) = 1.5978, $p = 0.6599$

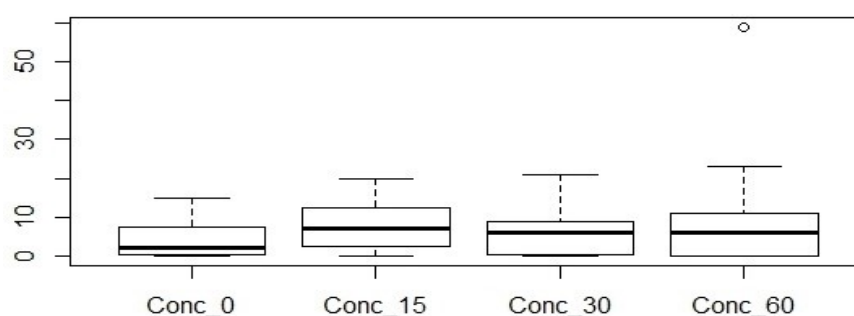


Figura 1 – Frequência de micronúcleo písceo e alterações morfológicas nucleares (ENAs) em *Rhamdia quelen*, após exposição hídrica ao 2,4-D nas concentrações de 0, 15, 30 e 60 $\mu\text{g/L}$, pelo período de 24 horas. KW-H: resultado do teste de Kruskal-Wallis. ($p < 0,05$).

Segundo a Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde, o valor máximo para concentração permitida de 2,4-D na água potável é de 30 µg/L (PORTARIA n° 518, 2005). Em estudos com concentrações parecidas, o herbicida 2,4-D demonstrou diversos efeitos negativos sobre a saúde dos organismos testados. Vigário et al. (2014) relatou um aumento significativo na presença de micronúcleos e edemas nucleares em hepatócitos do peixe *Poecilia vivípara*, no grupo tratado com 40µl/L de 2,4-D. Efeitos genotóxicos também foram reportados por Farah et al. (2003), que constataram aumento significativo na frequência de ENAs em peixes, após 48, 72 e 96 horas de exposição. Assim, o trabalho de Fahah e colaboradores confirmou uma resposta dependente da concentração e do período de exposição, com incidência máxima nas maiores concentrações e durações. Portanto, existe certa probabilidade de que exemplares de *Rhamdia quelen* quando expostos ao 2,4-D por um maior período, possam apresentar efeitos genotóxicos.

Embora o micronúcleo písceo seja um teste consolidado, de acordo com Udroui (2006), para a detecção de micronúcleos, é necessário que as populações de células em divisão passem por pelo menos um ciclo celular completo. Além disso, o número máximo de eritrócitos micronucleados em peixes, tende a ocorrer após dois a três dias de exposição, portanto tempo superior ao utilizado neste trabalho. Para tornar este teste mais responsivo enquanto biomarcador, é necessário maior conhecimento sobre a duração do ciclo dos eritroblastos, sua maturação, tempo de vida e aparecimento na circulação (FERRARO, 2009). Portanto, o real poder genotóxico do produto químico utilizado, pode não ter sido perceptível devido ao período de exposição empregado, não ser o mais adequado com a necessidade do biomarcador utilizado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente trabalho, demonstraram que para o período de 24h de exposição por via hídrica nas concentrações de 2,4-D testadas, o mesmo não demonstrou evidências de mutagenicidade/citotoxicidade em peixes da espécie *Rhamdia quelen*. Levando-se em conta a grande utilização deste pesticida no Brasil, os estudos que avaliam os possíveis efeitos genotóxicos, assim como a elucidação do processo de degradação e metabolização do 2,4-D são de suma importância para a melhor compreensão dos seus efeitos sobre os organismos vivos.

Evaluation of the mutagenic and cytotoxic potential of 2,4-D herbicide in *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae)

ABSTRACT

PURPOSE: To evaluate the mutagenic and cytotoxic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) by means of micronucleus tests (MN) and nuclear erythrocyte alterations (ENA). **METHODS:** Specimens of *Rhamdia quelen* were submitted to four different treatments during a period of 24 hours: 0, 15, 30 and 60 µg / L of active principle dissolved in the aquarium water. The determination of MN and ENA frequencies were performed by quantification of 1000 erythrocytes per animal. **RESULTS:** The results showed that the 2,4-D herbicide presented no evidence of mutagenicity / cytotoxicity on the species in question, when submitted to the period and concentrations tested. **CONCLUSIONS:** We recommend integrated analysis with other biomarkers, as well as evaluation in different periods of exposure.

KEYWORDS: Pesticide. Fish. Mutation. Contamination.

AGRADECIMENTOS

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Fundação Araucária (FA).

REFERÊNCIAS

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 543, p. 251-272, jun. 2003.

CARRASCO, K.R., TILBURY, KAREN. L., MYERS, M.S., 1990. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological Indicator of Chemical Contaminant Effects. **Fish Aquat** 47, 2123–2136.

FARAH, M. A.; ATEEQ, B.; ALI, M. N.; AHMAD, W. Evaluation of genotoxicity of PCP and 2,4-D by micronucleus test in freshwater fish *Channa punctatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, n. 1, p. 25–29, jan 2003.

FARIA, N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. Pesticides poisoning in Brazil: the official notification system and challenges to conducting epidemiological studies. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 12, p. 25-38, jan./mar. 2007.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, Austrália, v. 455, p. 81-95. 2000.

FERRARO, M. V. M. **Avaliação de três espécies de peixes – *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: cometa e dos micronúcleos**. 2009. 189 f. Tese (Doutorado em Genética)-Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2009.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2005. 392 p.

ITHO, S. Herbicidas- Clorofenoxiacéticos. **Rotina no atendimento do intoxicado**. 3.ed. Vitória: Toxen, 2007. p. 472p.

OLIVEIRA, T. G. DE et al. Agrotóxicos : Levantamento dos mais utilizados no oeste paulista e seus efeitos como desreguladores endócrinos. **IX Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n. 11, p. 375–390, 2013.

PORTARIA MS nº 518/2004. **Série E. Legislação Saúde**, Ministério da Saúde, Brasília (2005).

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology, Amsterdam**, v. 79, p. 201- 204, aug. 2006.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v 13, p. 57–149, feb. 2003.

VIGÁRIO, Ana F.; SABÓIA-MORAIS, Simone MT. Effects of the 2, 4-D herbicide on gills epithelia and liver of the fish *Poecilia vivipara*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 6, p. 523-528, 2014.

Recebido: 31 ago. 2017.

Aprovado: 02 out. 2017.

Como citar:

DAMASIO, D. et al. Avaliação do potencial mutagênico e citotóxico do herbicida 2,4-D, em *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 22., 2017, Londrina. **Anais eletrônicos...** Londrina: UTFPR, 2017. Disponível em: <<https://eventos.utfpr.edu.br/sicite/sicite2017/index>>. Acesso em:

Correspondência:

Denis Damasio

Estrada para Boa Esperança, SN, Comunidade de São Cristóvão, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

Direito autoral:

Este resumo expandido está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição-Não Comercial 4.0 Internacional.

