

## Ensaio cometa em tecido hepático para avaliar os efeitos genotóxicos do herbicida 2,4-D sobre o peixe *Rhamdia quelen* (Pices)

### Comet test in hepatic tissue to evaluate the genotoxic effects of 2,4-D herbicide on the *Rhamdia quelen* (Pices) fish

**Ana Paula da Silva**

[anna-p-17@hotmail.com](mailto:anna-p-17@hotmail.com)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Tábatta Kim Marques Soares**

[tabattamarques@gmail.com](mailto:tabattamarques@gmail.com)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Aliciane de Almeida Roque**

[alicianeroque@gmail.com](mailto:alicianeroque@gmail.com)

Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

**Elton Celton de Oliveira**

[eltonoliveira@utfpr.edu.br](mailto:eltonoliveira@utfpr.edu.br)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Ricardo Yuji Sado**

[ricardoyado@utfpr.edu.br](mailto:ricardoyado@utfpr.edu.br)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Nédia de Castilhos Ghisi**

[nediaghisi@gmail.com](mailto:nediaghisi@gmail.com)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Recebido:** 30 ago. 2018.

**Aprovado:** 04 out. 2018.

**Direito autorial:**

Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



#### RESUMO

O emprego de agroquímicos nas lavouras aumentou significativamente nos últimos anos, principalmente com o desenvolvimento de cultivares transgênicos resistentes a agrotóxicos, produzindo cada vez mais resíduos que, por diversas formas de transporte, chegam aos ambientes aquáticos. Uma vez neste ambiente, os pesticidas podem ser bioacumulados e repassados pela cadeia trófica até atingir o ser humano e/ou desencadear alterações nos organismos prejudicando a sua sanidade. Este trabalho teve o objetivo de avaliar por meio do ensaio cometa de hepatócitos, o efeito genotóxico do herbicida ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), sobre o peixe *Rhamdia quelen* em concentrações realísticas. Exemplares da *R. quelen* foram submetidos por 48 horas a uma exposição hídrica a quatro diferentes concentrações de 2,4-D: 0, 15, 30 e 60 µg/L. Posteriormente os animais foram submetidos a eutanásia para coleta do tecido hepático e realização do ensaio cometa. A determinação da taxa de danos genéticos foi realizada pela quantificação de 100 nucleoides por animal. Os resultados demonstraram que o herbicida 2,4-D não apresentou efeito genotóxico significativo sobre a espécie, quando esta em questão foi submetida as concentrações testadas. Recomenda-se análise integrada com outros biomarcadores, bem como avaliação de maiores concentrações e tempos de exposição, além do teste de interações com demais substâncias presentes nos ambientes aquáticos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Agrotóxico. Poluição. Genotoxicidade. Peixe.

#### ABSTRACT

The use of agrochemicals in crops has increased significantly in the last years, especially with the development of transgenic cultivars resistant to pesticides, producing more and more waste that, through various forms of transportation, reaches the aquatic environments. Once in this environment, pesticides can be bioaccumulated and passed through the trophic chain until reaching the human being and/or triggering alterations in organisms damaging their sanity. The objective of this work was to evaluate through the comet test of hepatocytes, the genotoxic effect of the dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide on the *Rhamdia quelen* fish in realistic concentrations. Specimens of *R. quelen* were submitted to 48 hours water exposure at four different concentrations of 2,4-D: 0, 15, 30 e 60 µg/L. Subsequently the animals were submitted to euthanasia for collection of the hepatic tissue and carrying out the comet test. The determination of the genetic damage rate was performed by quantification of 100 nucleoids per animal. The results showed that the 2,4-D herbicide didn't present a significant genotoxic effect on the species, when it was submitted to the tested concentrations. Integrated analyses with other biomarkers is recommended, as well as evaluation of higher concentrations and exposure times, besides the test of interactions with other substances present in aquatic environments.

**KEYWORDS:** Agrototoxic. Pollution. Genotoxicity. Fish.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a produção agrícola se elevou com o emprego de novas tecnologias, como os agrotóxicos. Estas substâncias produzidas em larga escala e utilizada no mundo todo, possuem a finalidade de controlar pragas e doenças que atingem as lavouras (TOMITA; BEYRUTH, 2002).

Com a liberação de transgênicos resistentes ao herbicida ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), o seu baixo custo e sua ação superior ao glifosato, permitiram que o 2,4-D ganhasse o mercado. Dados do Sistema de Controle do Comércio e Uso de Agrotóxicos no Estado do Paraná – SIAGRO demonstram que o consumo de 2,4-D no Paraná vem aumentando nos últimos anos (ADAPAR, 2017), gerando discussões sobre seus possíveis efeitos em espécies não-alvo, principalmente por este herbicida ter sido empregado na Guerra do Vietnã, como componente do Agente Laranja (AMARANTE JUNIOR et al., 2002) e que evidenciou efeitos sobre a saúde humana em veteranos da guerra (ITHO, 2007).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA (2015), este herbicida é classificado como um agroquímico de toxicidade classe I, sendo extremamente tóxico, podendo causar sérios danos à saúde humana, prejudicando o coração, fígado e o sistema nervoso (AMARANTE JUNIOR et al., 2002). Como qualquer outro agroquímico, o 2,4-D, se aplicado de maneira inadequada e/ou excessiva pode deixar resíduos no solo, na água, no ar, nas plantas e animais, podendo chegar ao homem pela cadeia alimentar (ARIAS et al., 2007).

Quando estes resíduos chegam aos ambientes aquáticos, dependendo das suas características, pode se ligar ao material em suspensão, ao sedimento ou ser absorvido pelos organismos, podendo causar alterações na sua estrutura biológica (SILVA; SANTOS, 2007; TOMITA; BEYRUTH, 2002).

Estudos recentes demonstram que o 2,4-D possui efeitos tóxicos sobre várias espécies de peixes. Estes revelam danos cromossômicos e no DNA, caracterizando o efeito genotóxico do 2,4-D em doses relativamente altas (RUIZ DE ARCAUTE; SOLONESKI; LARRAMENDY, 2016). Diante disto, buscou avaliar, através do ensaio cometa do tecido hepático, o efeito genotóxico do herbicida 2,4-D sobre a espécie de peixe *Rhamdia quelen*, em concentrações realísticas.

## METODOLOGIA

O projeto foi previamente submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEUA-UTFPR), e aprovado sob protocolo nº 2016-18 e foi realizado na UNEPE Piscicultura – UTFPR-DV. O estudo utilizou exemplares de *Rhamdia quelen*, obtidos em piscicultura comercial, os quais foram aclimatados por 15 dias em tanques de 250L com aeração constante e temperatura a 28°C.

Após a aclimação, os exemplares foram divididos em 12 aquários de 50 L em grupos de 5 indivíduos. O herbicida 2,4-D puro (padrão analítico – Sigma Aldrich®) foi diluído diretamente na água do experimento. As concentrações utilizadas foram baseadas na Resolução 357/2005 do CONAMA, que determina a quantidade máxima de 2,4-D permitida em águas doces de classe III sendo de 30 µg/L (BRASIL, 2005), sendo assim, determinou-se as concentrações de 0, 15, 30 e 60 µg/L, todas com triplicata.

Ao final de 48 horas, os animais foram anestesiados com cloridrato de benzocaína (100mg/L) para a retirada de uma porção do fígado. O tecido

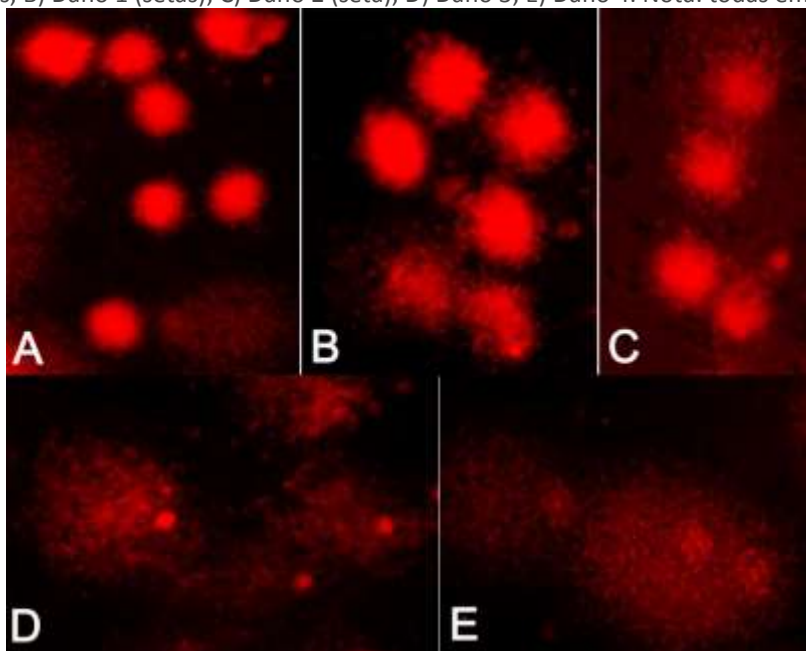
hepático foi mergulhado em soro bovino fetal para a desagregação celular com o auxílio de um Micro Homogeneizador. Desta solução, retirou-se uma amostra de 15  $\mu$ L, que foi misturado em 120  $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%). Esta suspensão foi espalhada em lâminas previamente recobertas por agarose comum, sobreposto a lamínula e levadas a geladeira para a tonificação da agarose.

Em seguida, as lamínulas foram retiradas, alocando-se as lâminas em solução de lise a temperatura de 4°C pelo período de 24 horas, para o rompimento das membranas biológicas. Decorrido o período mínimo, as lâminas foram alocadas em cuba de eletroforese e recobertas com uma solução de NaOH e 200mM EDTA, pH>13, onde repousaram durante 20 minutos.

Na sequência, realizou-se a eletroforese por 30 min a 300 mA e 25V, seguindo com a neutralização em solução TRIS 0,4M, pH 7,5 e fixação em etanol 100% por 10 minutos. Depois de secas, as lâminas foram coradas com brometo de etídio diluído em água destilada (1:200). Utilizou-se 10  $\mu$ L dessa mistura por lâminas, que após recobertas com lamínula foram analisadas em microscópio de epifluorescência, sendo computadas 100 nucleídeos/lâmina em teste cego.

Os nucleídeos foram analisados usando a classificação visual baseada na migração de fragmentos de DNA, seguindo as classes: 0 – sem dano aparente; 1 – dano pequeno; 2 – dano médio; 3 – dano grande e 4 – dano máximo (Figura 1). Os escores foram obtidos multiplicando-se o número de cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe.

Figura 1 – Classes de danos observadas em células de *Rhamdia quelen*. A) Sem danos; B) Dano 1 (setas); C) Dano 2 (seta); D) Dano 3; E) Dano 4. Nota: todas em 400X.

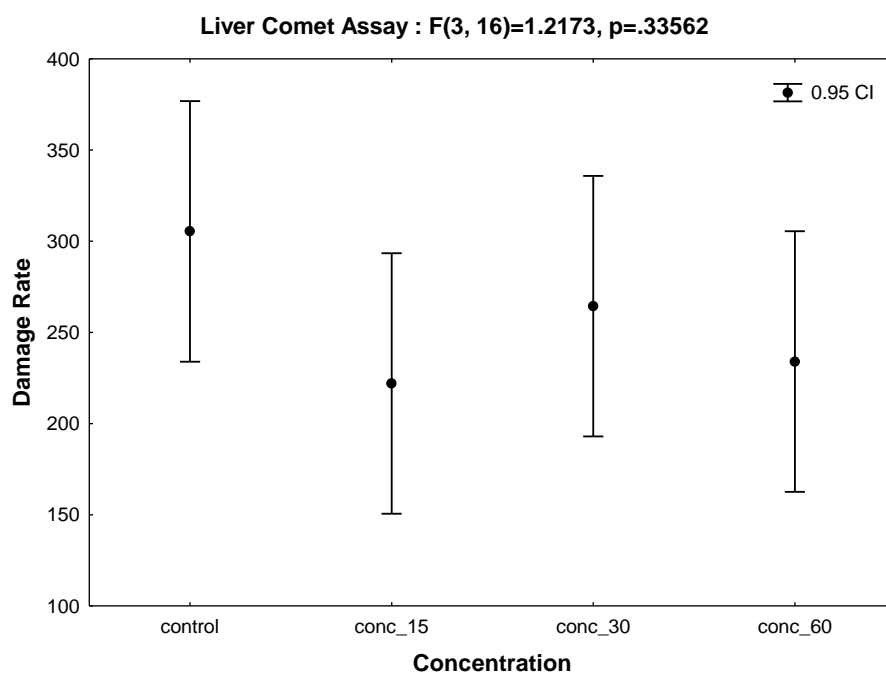


Fonte: ROQUE, 2018.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e homocedasticidade. Como os pressupostos foram atendidos, os dados foram submetidos a ANOVA. Constatou-se que a taxa de danos genéticos em hepatócitos não apresentou variações significativas entre as concentrações de 2,4-D e o controle (Figura 2).

Figura 2 – Comparação de médias para os valores de danos verificados no ensaio cometa de hepatócitos de *R. quelen*, submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D, no período de 48h.



Fonte: Autoria própria (2018).

Os dados avaliados não apresentaram diferença significativa na taxa de danos genéticos entre as diferentes concentrações de 2,4-D. Estas concentrações foram empregadas baseadas na legislação brasileira, pois são consecutivamente a metade, a exata e o dobro da concentração permitida pela resolução CONAMA nº 357/2005 em água doce de classe III, que também é destinado ao consumo humano, após tratamento convencional ou avançado.

O Brasil é menos permissível para esta substância, comparado com o Canadá que permite até 100 µg/L nas águas classificadas como potáveis (HEALTH CANADA, 1993). Entretanto, o limite brasileiro torna-se 300 vezes superior, se comparada à permitida para consumo pela União Europeia de apenas 0,1µg/L (COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, 1998).

Os resultados encontrados neste trabalho corroboram com os obtidos na pesquisa de Roque (2018), em que utilizou as mesmas concentrações no mesmo período de exposição, ao realizar ensaio cometa com eritrócitos de *R. quelen*. Porém, estes resultados não descartam totalmente o potencial tóxico do 2,4-D, visto que esta foi uma exposição aguda (tempo de exposição curto) e as doses testadas foram baixas, comparando com outros trabalhos.

Na pesquisa realizada por Ruiz de Arcaute, Soloneski e Larramendy (2016), foram testadas concentrações na faixa de 252 a 756 mg/L de 2,4-D, sob diversos



períodos de exposição, inclusive ao de 48h, em espécimes de *Cnesterodon decemmaculatus*. Esse estudo analisou danos primários no DNA, no núcleo e mortalidade, sendo encontrado quebras primárias no DNA, no período de 48h. Por outro lado, a concentração mínima nele utilizada (252mg/L) é 4200 vezes superior à nossa maior (60µg/L), e é mais próxima da concentração dos ambientes eutrofizados.

Este herbicida não é encontrado isolado no ambiente natural, fato que deve ser considerado na avaliação do seu efeito sobre organismos não-alvos. Desta forma há a necessidade de trabalhos adicionais com emprego de outros biomarcadores e diferentes formas de exposição ao 2,4-D. Mas, sobretudo são necessários testes relacionando concentrações e tempos de exposição maiores ao herbicida e mais semelhantes aos ambientes naturais.

## CONCLUSÃO

O teste com doses realísticas de 2,4-D não demonstrou genotoxicidade em células hepáticas de *Rhamdia quelen* exposto durante 48 horas. As doses de 15, 30 e 60 µg/L do herbicida, não apresentaram diferenças em relação ao grupo controle, tampouco quando comparadas entre si.

Entretanto o presente estudo não garante efetivamente que o defensivo agrícola seja isento de riscos genéticos. Além das baixas doses, e curta exposição, não se avaliou interações do 2,4-D com outros pesticidas agrícolas, como ocorre na natureza. Sugere-se trabalhos ainda mais próximos do meio, verificando maiores concentrações e exposições e interações, como ocorre nos ambientes aquáticos.

## REFERÊNCIAS

ADAPAR – Agência de Defesa Agropecuária do Paraná. **Dados siagro**. 2017.

Disponível em: <

[http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GSV/Agrotoxicos/RESULTADOS\\_PUBLICADOS/dados\\_siagro.xls](http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GSV/Agrotoxicos/RESULTADOS_PUBLICADOS/dados_siagro.xls)>. Acesso em: 24 abr. 2018.

AMARANTE JUNIOR, O. P. et al. Revisão das propriedades, usos e legislação ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). **Cadernos de Pesquisa**, São Luís, v. 13, n. 1, p.

60–70, jan./jun. 2002.

ANVISA. **Índice monográfico 2,4-D**. 2015. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bdea3b804745780e857bd53fbc4c6735/D27++24-D.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

ARIAS, A. R. L. et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S.l.], v. 12, n. 1, p. 61–72, 2007.

CONAMA. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63.



COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. Diretiva 98/83/CE do Conselho de 3 de Novembro de 1998. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias Europeias**, p. 332–354, 1998.

HEALTH CANADA. **Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid**. [s.l: s.n.], 1993. Disponível em: <<https://www.canada.ca/content/dam/canada/health-canada/migration/healthy-canadians/publications/healthy-living-vie-saine/water-dichlorophenoxyacetic-eau/alt/water-dichlorophenoxyacetic-eau-eng.pdf>>. Acesso em: 23 jul. 2018.

ITHO, S. F. **Rotina no atendimento do intoxicado**. Vitória: Toxen, 2007.

ROQUE, A. A. **Biomarcadores genéticos para avaliação dos efeitos do herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) sobre o peixe nativo *Rhamdia quelen***. 80 f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2018.

RUIZ DE ARCAUTE, C.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 128, p. 222–229, 2016.

SILVA, J. M.; SANTOS, J. R. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 565–573, 2007.

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 135–142, jul./dez. 2002.

### AGRADECIMENTOS

Agradecimento ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo financiamento do projeto (Processo: 406661/2016-2) e pela bolsa de Iniciação Científica.