

Exposição trófica de peixes ao herbicida 2,4-D: avaliação de danos através do teste de Micronúcleos e ENA

Trophic exposure of fish to herbicide 2,4-D: damage assessment by micronucleus test and ENA

RESUMO

Nos últimos anos houve um grande crescimento da população humana, um fato que trouxe demanda por um aumento na produção de alimento e consequentemente no uso de defensivos agrícolas. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade e mutagenicidade do herbicida 2,4-D (Ácido diclorofenoxiacético), através do teste de micronúcleos e alterações nucleares eritrocitárias (ENA), após a exposição crônica via oral de peixes da espécie *Rhamdia quelen*. Os tratamentos foram constituídos de 4 grupos: 1) controle (água destilada), 2) 1µg/100ml, 3) 10µg/100ml, 4) 100µg/100ml. Os animais foram divididos entre dois tempos de coleta de material biológico (22 e 42 dias) e passaram por gavagem a cada 10 dias. Os resultados demonstraram mudanças no total de anormalidades do tipo micronúcleo, em bolha, e lobado. Percebe-se que no tempo de 42 dias houve aumento significativo na taxa geral de anormalidades morfológicas nucleares nas três doses de contendo 2,4-D. Desta forma, podemos concluir que o 2,4-D apresenta potencial citotóxico e mutagênico quando exposto oralmente por tempos maiores que 22 dias.

PALAVRAS-CHAVE: Mutação. Alterações nucleares eritrocitárias. Agrotóxico.

ABSTRACT

In recent years there has been a growth in the human population, a fact that has had the demand for an increase in food production and, consequently, no use of pesticides. This chemical activity of the microbially and mutagenicity of herbicide 2,4-D (Dichlorophenoxyacetic Acid), from the production of micronuclei and erythrocyte nuclear changes (ENA), after chronic species of the species of *Rhamdia quelen*. These were made up of 4 groups: 1) control (distilled water), 2) 1 µg / 100 ml, 3) 10 µg / 100 ml, 4) 100 µg / 100 ml. The animals were divided between two times of biological material collection (22 and 42 days) and gavage every 10 days. The results showed changes in the total of bubble and lobed micronucleus abnormalities. Losing that there is no time of 42 days to increase the overall rate of nuclear morphological abnormalities in the three doses of 2,4-D containing. Thus, we can conclude that 2,4-D has cytotoxic and mutagenic potential when exposed orally for more than 22 days.

KEYWORDS: Mutation. Erythrocyte nuclear changes. Pesticide

Emanuele Barreto Stange de Lima

emanuelelima@alunos.utfpr.edu.br

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

Natana Raquel Zuanazzi

natana_zuanazzi@hotmail.com

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

Hilda Vanessa Poquioma Hernandez

vpoquiomah@gmail.com

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

Ana Paula da Silva

anna-p-17@hotmail.com

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

Tainá dos Santos

taaiinnaa@hotmail.com

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

Tábatta Kim Marques Soares

tabattamarques@gmail.com

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

Elton Celton de Oliveira

eltonoliveira@utfpr.edu.br

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

Nédia de Castilhos Ghisi

nediaghisi@gmail.com

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

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

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



INTRODUÇÃO

Com a crescente demanda de alimentos, desde a 'Revolução Verde' e com a 'Revolução Biotecnológica', a agricultura teve um remanejamento da forma de produção, utilizando novas tecnologias e intensificando o uso produtos químicos, chamado defensivos agrícolas. Esses, também conhecidos como pesticidas ou agroquímicos, segundo Sabik, et al. (2000), são substâncias químicas, naturais ou sintéticas com a finalidade de prevenir, controlar ou eliminar pragas. São produtos que representam uma grande movimentação na economia do país, gerando cerca de 180 bilhões por ano (OLIVEIRA; COSTA, 2019).

Os defensivos agrícolas podem ser classificados a partir do organismo-alvo a que se destinam, destacando-se principalmente: herbicidas, inseticidas, fungicidas, etc. Um dos produtos que ganhou muito espaço no mercado recentemente foi o 2,4-D ou ácido diclorofenoxiacético, um herbicida que possui um mecanismo de ação capaz de mimetização das auxinas naturais das plantas (MUNRO et al., 1992). Na nova reclassificação toxicológica dos agrotóxicos, publicada em 01/08/de 2019 pela ANVISA, alterou o 2,4- D da Classe I - Extremamente Tóxico para a Categoria 4 (Produto Pouco Tóxico) – faixa azul. Nesta mesma publicação, a Classificação Toxicológica para a DL₅₀ Oral enquadra produtos com 2,4-D na Categoria 4 (Nocivo se ingerido). Ainda, destaca-se que o resultado no teste do MICRONÚCLEO (MN) é relatado como negativo. Considerando-se que há resultados divergentes sobre sua toxicidade, é necessário estudos mais aprofundados sobre seus efeitos.

Os ambientes aquáticos são os primeiros a serem afetados efetivamente por agentes genotóxicos, uma vez que são os receptores finais de diversos tipos de poluentes, acumulando componentes tóxicos através de deposição e escoamento pelas águas da chuva. É extremamente difícil o monitoramento de todos os parâmetros que causam a contaminação nos ambientes aquáticos. Contudo é possível submeter diferentes formas plantas, animais e outros seres vivos a xenobióticos de interesse e analisar suas respostas metabólicas com o uso de diferentes tipos de biomarcadores (PEAKALL, 1994).

O problema dos contaminantes ambientais está relacionado principalmente com os efeitos ambientais a curto e longo prazo. Mesmo com a presente proibição de diversos componentes químicos em vários países, estas substâncias individualmente ou em misturas são lançadas diariamente, e pouco se sabe sobre os efeitos cumulativos e sinérgicos. Desta forma, é importante a avaliação através do uso de bioindicadores. Segundo Van Der Oost; Beyer; Vermeulen (2003) um bioindicador é definido como um organismo que fornece informações sobre as condições ambientais do seu habitat pela sua presença ou ausência ou pelo seu comportamento ou outros parâmetros biológicos.

Em avaliações ecotoxicológicas bioensaios são de grande importância pois determinam os efeitos tóxicos dos poluentes lançados a um corpo d'água na biota aquática, possibilitando inclusive o controle da bioacumulação

desses poluentes nos tecidos dos organismos (PORTO, 1991).

Visto a importância de testes para a avaliação dos xenobióticos BOLOGNESI; e HAYASHI (2011) afirmam que o teste do Micronúcleo, devido sua simplicidade, é uma das técnicas para identificar alterações genômicas em animais aquáticos. Os MN são formados no processo de divisão celular devido a perda de um cromossomo inteiro ou parte dele e podem ser atribuídos a diferentes eventos de dano ao DNA (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011).

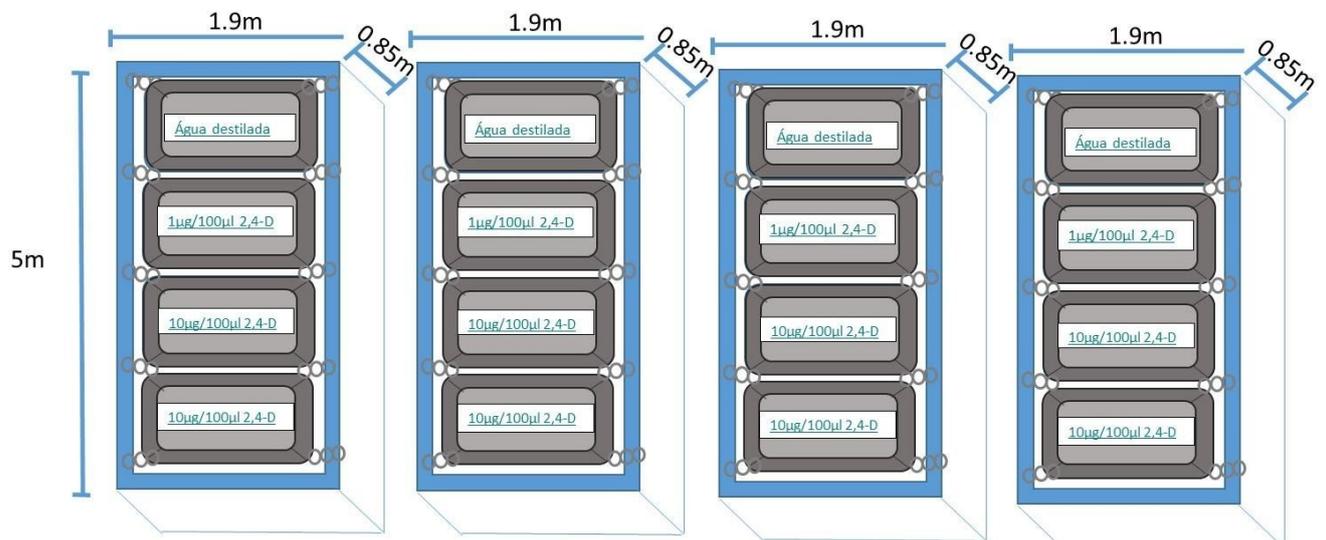
Juntamente ao teste de MN, avaliam-se também as ENA alterações nucleares eritrocitárias (ENA). As ENAs são atribuídas a problemas na lâmina, uma proteína do núcleo que confere o formato oval regular e a estabilidade do núcleo (ALBERTS et al., 2010).

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade e mutagenicidade do herbicida 2,4-D, através do teste de micronúcleos e alterações nucleares eritrocitárias (ENA), após a exposição crônica via oral de peixes da espécie *Rhamdia quelen*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para o experimento foram utilizados exemplares de *Rhamdia quelen* adquiridos em piscicultura comercial. Os espécimes passaram por um período de oito dias para aclimação em 16 tanques redes (Fig. 1) e foram submetidos a bioensaios de exposição oral de 2,4-D (padrão analítico Sigma Aldrich®). Os tratamentos foram constituídos de 4 grupos: 1) controle (água destilada); 2) 1µg/100µl; 3) 10µg/100µl; 4) 100µg/100µl. Os animais foram divididos entre dois tempos de coleta de material biológico (22 e 42 dias) e passaram por gavagem a cada 10 dias. Os seguintes parâmetros da água eram analisados duas vezes por semana e controlados: pH, dureza da água, oxigênio dissolvido, amônia, nitrito, bem como também a luminosidade e a vazão da água.

Figura 1 – Representação esquemática do delineamento amostral



Fonte: Autoria própria (2019)

As gavagens foram realizadas no dia 0, 10°, 20°, 30° e 40° após o início do experimento. A amostragem de material biológico foi realizada em 22 dias e 42 dias. Os peixes foram previamente anestesiados com benzocaína. Com o auxílio de uma seringa heparinizada foi retirado amostras de sangue por de punção caudal. O mesmo foi utilizado para o Teste de Micronúcleo e ENAs. Realizou-se uma extensão sanguínea em lâminas de microscópio, posteriormente fixada em etanol por 30 min. As lâminas foram coradas com Giemsa 10%. Foram analisadas 1.000 células por animal. As alterações morfológicas nucleares analisadas foram: Micronúcleo, núcleos Lobado, Entalhado, em bolha, Binucleado, Vacuolado (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990). Apenas foram computadas as células as que estavam com a membrana citoplasmática intacta.

Os resultados foram estatisticamente analisados, utilizando o Programa STATISTICA. Testes de pressupostos foram previamente aplicados e definiu-se por ANOVA uni e bi fatorial para determinar se havia diferença entre os grupos, seguida de teste de post hoc.

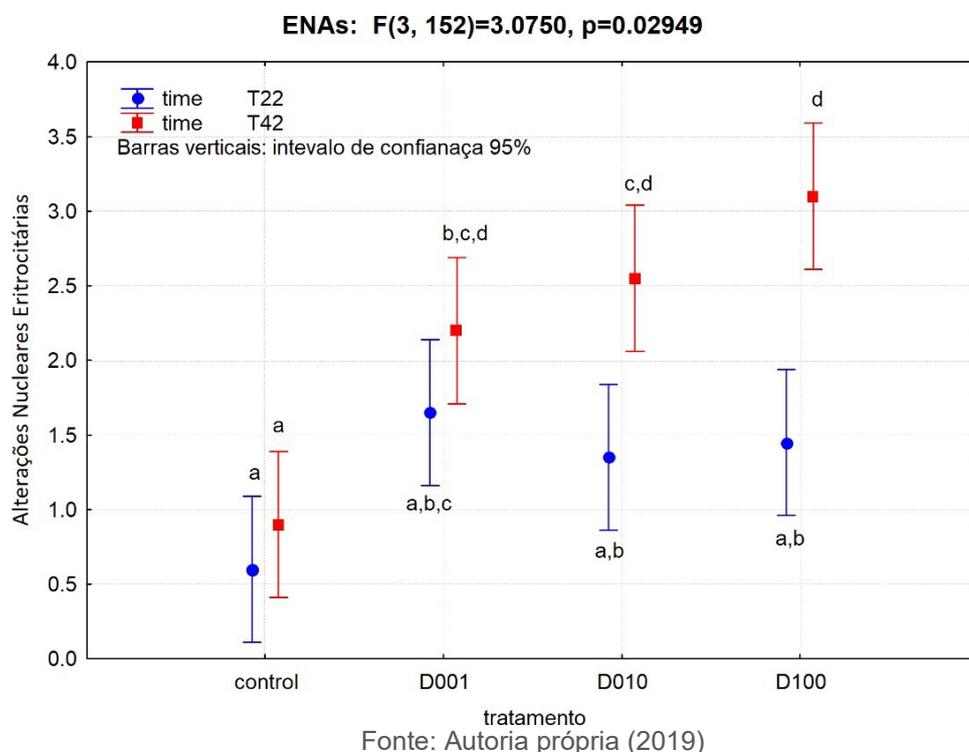
RESULTADOS E DISCUSSÕES

Quando se analisou todas as alterações eritrocitárias nucleares agrupadas por ANOVA bifatorial, verificou-se que ocorreu diferença significativa entre os grupos (Fig. 2), em relação aos tempos e as dosagens ($p=0,002949$). Ainda, pode perceber-se na Fig. 2 que uma exposição de 22 dias (organismos submetidos a 3 gavagens) não apresenta diferença entre os organismos que receberam 2,4-D e os organismos que receberam água destilada. Já no tempo de 42 dias de exposição oral (5 gavagens), percebe um aumento significativo nas médias de taxas de danos nos eritrócitos de organismos expostos, onde todos os indivíduos que ingeriram 2,4-D apresentam taxas maiores que os que receberam somente água.

Das anormalidades analisadas, os Micronúcleos apresentaram uma diferença significativa ($p=0,00007$) entre os controles e os animais expostos. Os micronúcleos originam-se de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que ficam para trás na anáfase durante a divisão nuclear (FENECH, 2007).

A exposição a esse agente xenobionte provocou um aumento significativos de a anormalidades do tipo em bolha ($p=0,00896$) e lobado ($p=0,00809$). Por outro lado, a ingestão de 2,4-D não elevou significativamente as ENAs do tipo Binucleado ($p=0,2656$), Entalhado ($p=0,5737$) e Vacuolado ($p=0,3946$).

Figura 2. Resultados do total de ENAs nos quatro tratamentos e dois tempos de exposição tróficas de *Rhamdia quelen* ao 2,4-D.



Resultados semelhantes foram obtidos em peixes expostos por via hídrica ao 2,4-D. O trabalho de Ruiz De Arcaute; Soloneski; Larramendy (2016) observou que a exposição hídrica ao 2,4-D na faixa de 252-756 mg / L elevou a frequência de MNs em peixes expostos tanto a 48 e 96 h. Ainda neste trabalho, os núcleos em bolha foram induzidos em tratamentos com duração de 48 e 96 h, e os núcleos entalhados foram apenas induzidos em peixes expostos por 96 h. Ateeq et al., (2002) verificou que 2,4-D nas concentrações de 25, 50 e 75 ppm possui potencial genotóxico e citotóxico aos peixes, pois encontrou um aumento significativo na taxa de micronúcleos, bem como nas frequências de células com alterações. Além disso, linfócitos humanos também foram expostos a 0,4 e 4µg/ml 2,4-D. Observou-se que ambas as concentrações de pesticidas causaram um aumento nas quebras de cromátides cromossomos, no número de micronúcleos e número de gemas nucleares nestas células (ZELJEZIC; GARAJ-VRHOVAC, 2004).

Em conclusão, nossos resultados representam o primeiro experimento com exposição trófica de peixes ao 2,4-D e traz evidência do potencial citotóxico e mutagênico deste herbicida em um tempo maior de exposição quando ingerido.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ATEEQ, B. et al. **Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor**. Mutation research, v. 518, n. 2, p. 135–44, 25 jul. 2002.

BELPAEME, K., DELBEKE, K., ZHU, L. & KIRSCH-VOLDERS, M., Cytogenetic studies of PCB 77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v.11, n. 5, 1996, p. 485–492.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 205–13, jan. 2011.

CARRASCO, K.; TILBURY, K.; MYERS, M. Assessment of the piscine micronucleus test as in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, p. 2123–2136, 1990.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes. **Nature Protocol**, v. 2, p. 1084 a 1104, 2007.

MUNRO, I. C. et al. A Comprehensive, Integrated Review and Evaluation of the Scientific Evidence Relating to the Safety of the Herbicide 2,4-D. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 11, n. 5, p. 559–664, 1992.

OLIVEIRA, F.; COSTA, L.; **A indústria de defensivos agrícolas**. BNDES Setorial 35, p. 233 – 276. Disponível em <<https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/1513>>. Acesso em: 21 de jun. 2019.

PEAKALL, D. W. (1994). Biomarkers: the way forward in environmental assessment. **Toxicol. Ecotoxicology. News**, v. 1 p. 55-60.

PORTO, M.F.A. **Estabelecimento de parâmetros de controle da poluição**. In: BRANCO et al. Hidrologia Ambiental. São Paulo: ABRH/ EDUSP, v.3. 1991.

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment**. 2º ed. Washington: Taylor & Francis, 1995.

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.

SABIK, H.; JEANOT, R.; ROUNDEUAU, B. Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. **Journal of Chromatography A**, 2000. Disponível em < [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01084-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01084-5)>. Acesso em: 21 de jun. 2019.

SILBERGELD, E.K. (1998) - Toxicologia. In: OIT (Ed.) - **Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo**. Madrid, Oficina Internacional del Trabajo, 84 p.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.

ZELJEZIC, D.; GARAJ-VRHOVAC, V. Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation. **Toxicology**, v. 200, p. 39–47, 2004.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, Fundação Araucária e UTFPR por fornecer recursos financeiros para o desenvolvimento desta pesquisa. Agradecemos também ao UNEPE Piscicultura.