

## Efeito do herbicida 2,4-D sobre o tecido hepático do jundiá *Rhamdia quelen* submetido a ensaio agudo

### Effect of 2,4-D herbicide on the hepatic tissue of *Rhamdia quelen* submitted an acute assay

#### RESUMO

A utilização de agrotóxicos tem crescido consideravelmente nos últimos anos e estudar seus efeitos sobre a biota ganhou relevância. Assim, este trabalho buscou avaliar as respostas histopatológicas no fígado de *Rhamdia quelen* a partir da sua exposição aguda ao herbicida 2,4-D. Os animais foram obtidos de uma piscicultura comercial e transportados até a UNEPE-Piscicultura da UTFPR-DV, onde foram aclimatados. Posteriormente, foram alocados em caixas plásticas de 60L para exposição hídrica ao herbicida 2,4-D nas concentrações de 15, 30 e 60 µg/L. Além destes, um grupo controle negativo também foi considerado. Os tratamentos foram realizados em triplicatas, sendo alocados cinco indivíduos por caixa. Após os tempos de exposição de 24 e 48 horas, os animais foram anestesiados e sacrificados em benzocaína para retirada do fígado. Um fragmento foi fixado em ALFAC e conservado em álcool 70%. O material foi desidratado, diafanizado e incluído em resina. As peças foram microtomadas em 7µm e as lâminas resultantes coradas com Hematoxilina-Eosina. Com auxílio da microscopia de luz foram encontradas duas histopatologias: vacuolização citoplasmática e centros de melanomacrófagos. A frequência das histopatologias entre os tratamentos foi similar, não se observando efeito agudo. Estudos crônicos e outros biomarcadores precisam ser considerados para uma análise mais conclusiva.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bioensaios. Histopatologias. Peixes. Agrotóxicos.

**Tainá dos Santos**  
[taaiinna@hotmail.com](mailto:taaiinna@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Dois Vizinhos, PR, Brasil.

**Nédia de Castilhos Ghisi**  
[nediaghisi@utfpr.edu.br](mailto:nediaghisi@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Dois Vizinhos, PR, Brasil.

**Elton Celton de Oliveira**  
[eltonoliveira@utfpr.edu.br](mailto:eltonoliveira@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Dois Vizinhos, PR, 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.



#### ABSTRACT

The pesticides have been a considerably increase in recent years and the study your effects on biota gained relevance. This study aimed to evaluate the histopathological responses in the liver of *Rhamdia quelen* submitted in the 2,4-D herbicide on acute assay. The animals were obtained from a commercial fish farm and transported to UNEPE-Fish Farm of UTFPR-DV, where they were acclimatized. Subsequently, they were placed in 60L plastic boxes for hydric exposure to the herbicide 2,4-D at concentrations of 15, 30 and 60 µg/L. In addition, a negative control group was also considered. The treatments were performed in triplicate, being allocated five individuals per box. After exposure times of 24 and 48 hours, the animals were anesthetized and sacrificed in benzocaine for liver removal. One fragment was fixed in ALFAC and conserved in 70% alcohol. The material was dehydrated, diaphanized and included in resin. The blocks were microtomeed at 7µm and the resulting slides stained with Hematoxylin-Eosin. Two histopathologies were found: cytoplasmic vacuolization and melanomacrophage centers. The histopathology frequencies were similar between

treatments, with no acute effect observed. Chronic studies and other biomarkers need to be considered for more conclusive analysis.

**KEYWORDS:** Bioassays. Histopathologies. Fish. Pesticides.

## INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos tem aumentado consistentemente nos últimos anos e com isso emerge uma crescente preocupação da sociedade com os perigos da contaminação, o que torna este um problema de importância mundial. Os produtos, tais como o herbicida 2,4-D, vem atingindo não somente as suas espécies alvo, mas também organismos não alvos. Neste último contexto é que estão inseridos os peixes, nos quais é possível observar diversas respostas de efeito fisiológico, genético, bioquímico e outros quando em contato com os agroquímicos (OOST et al, 2003).

Neste sentido, os bioensaios são ferramentas muito úteis, pois permitem avaliar a relação causa-efeito entre organismo e substância teste. Os peixes formam um grupo de destaque neste tipo de avaliação, visto que se adaptam bem aos experimentos em laboratório e possuem grande semelhança fisiológica com os demais vertebrados (BEEBY, 2001).

Além disso, este grupo taxonômico permite uma investigação mais aprofundada de parâmetros moleculares, celulares, teciduais e tantos outros que indicam uma exposição dos animais a contaminantes. Os biomarcadores referem-se às disfunções biológicas precoces que ocorrem ao nível interno dos organismos. Elas permitem avaliar os efeitos dos contaminantes com grande segurança (BARTELL, 2006).

Dentre os tecidos dos peixes, o fígado é bastante utilizado para a detecção de histopatologias (danos), devido à metabolização de diversas substâncias. Especificamente o fígado desenvolve um papel fundamental na fisiologia dos peixes, exercendo função de metabolizar lipídeos, proteínas e carboidratos. Além disso, é responsável pelo armazenamento e degradação de substâncias, excreção hormonal e detoxificação de substâncias químicas (SCHINONI, 2006).

Sabendo disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as histopatologias em tecido hepático da espécie de peixe bioindicadora *Rhamdia quelen* após a exposição hídrica realizada ao herbicida 2,4-D.

## MATERIAL E MÉTODOS

A espécie bioindicadora utilizada na realização desse trabalho foi o peixe *Rhamdia quelen* conhecido popularmente como Jundiá, conforme apresentado na figura 1. Trata-se de um animal nativo do Brasil, encontrados em água doce e

bastante adaptado a regiões de menor temperatura como observado na região Sul (BARCELLOS et al., 2001).

Figura 1- Exemplar da espécie *Rhamdia quelen* coletado no viveiro da UTFPR-DV



Fonte: Autoria própria. (2019)

Os peixes foram adquiridos de uma piscicultura comercial e transportados até a UNEPE-Piscicultura da UTFPR-DV, onde foram inicialmente tratados com um banho de permanganato de potássio para profilaxia contra doenças e parasitas e, em seguida, aclimatados por duas semanas.

A substância teste utilizada neste trabalho foi o herbicida 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) de elevado grau de pureza (99%) da linha Pestanal® da Sigma-Aldrich. As concentrações foram determinadas com base no limite recomendado pela Organização Mundial da Saúde e pela Legislação Brasileira para águas potáveis, que delimita uma concentração máxima de 30µg/L para esse agrotóxico. A partir disso, se estabeleceu uma concentração mais baixa e uma mais elevada, conforme descrito a seguir.

Foram determinados quatro grupos experimentais para a realização deste trabalho: 1) Controle – exposição dos animais somente em água; 2) Grupo CC1: exposição dos animais em 15µg/L de 2,4-D; 3) Grupo CC2: exposição dos animais na concentração de 30µg/L de 2,4-D; 4) Grupo CC3: exposição dos animais em 60µg/L de 2,4-D. Todos os grupos foram realizados em triplicatas e em cada recipiente foi alocado cinco indivíduos. Foram utilizadas caixas plásticas de 60 L e o ensaio foi estático, sem troca do volume de água durante o procedimento. Os tempos de exposição utilizados foram de 24 horas e de 48 horas.

Após a exposição, os animais foram coletados e anestesiados com cloridrato de benzocáína a 20% e posteriormente foram sacrificados com uma sobredosagem do anestésico. Em seguida, os animais foram seccionados para exposição dos fígados, os quais tiveram um fragmento de 5g coletado e alocado em solução ALFAC (80% de Álcool, 15% Formol e 5% de Ácido Acético) onde permaneceram por um período de 8 a 12 horas. Em seguida foram conservados em álcool 70% até o seu devido processamento. Para tal, realizou-se a desidratação do tecido em séries alcoólicas, diafanização em xilol e inclusão do tecido em resina (em estufa à 60°C). Posteriormente foi realizada a trimagem das peças e a sua microtomia a 7µm para a confecção de lâminas histológicas permanentes. Por fim, as lâminas passaram por uma bateria de coloração de Hematoxilina e Eosina.

As lâminas foram analisadas em microscopia de luz para a identificação e quantificação das histopatologias em tecido hepático, conforme descrito por Bernet et al. (1999). As frequências de lâminas com e sem danos foram analisadas

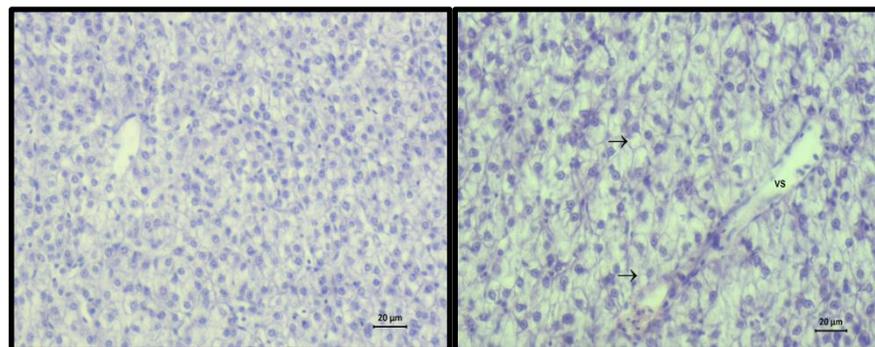
entre os tratamentos e tempos de exposição através da aplicação de um teste de qui-quadrado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na microscopia do material foi possível registrar a ocorrência de duas histopatologias: 1- as vesículas citoplasmáticas que, geralmente, ocorrem quando existe um acúmulo de gorduras no fígado. Esta patologia ocorre quando as vesículas lipídicas tomam o espaço das células devido a dificuldade de metabolização, dando origem a uma doença conhecida como esteatose hepática. 2- os centros de melanomacrófagos que geralmente estão associados a processos de inflamação e de eliminação de células mortas, podendo em elevadas frequências indicar efeito de agentes estressores.

Através das fotomicrografias mostradas na figura 2, foi possível apenas captar informações sobre as vesículas citoplasmáticas.

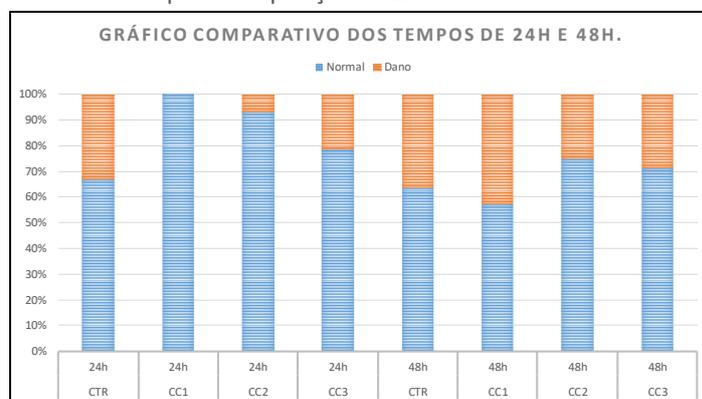
Figura 2 – A: Tecido normal. B: Tecido com vacualizações citoplasmáticas representadas com flechas.



FORNTE: Ana Paula da Silva (2018)

É possível observar através da figura 3 que todos os grupos experimentais apresentaram frequências similares de indivíduos com e sem danos histopatológicos tanto em 24 como em 48 horas de exposição.

Figura 3 – Frequência de indivíduos com e sem histopatologias em tecido hepático nos tempos de exposição de 24 e 48 horas.



Fonte: Autoria Própria. (2019)

O resultado do teste do qui-quadrado confirma a similaridade na frequência de danos entre os tratamentos:

24 horas  $\chi^2 = 5,99$ ;  $p > 0,05$ ; Não significativo;

48 horas:  $\chi^2 = 1,13$ ;  $p > 0,05$ ; Não significativo.

## CONCLUSÃO

Foi possível observar que os protocolos de histologia são realmente ferramentas muito importantes para estudar diversos tipos de tecidos, seja de origem animal ou vegetal. Contudo, vale ressaltar que a técnica também possui limitações de respostas, visto que efeitos agudos de contaminantes sobre tecidos/órgãos são muito raros, uma vez que o período de exposição é muito curto para que danos teciduais sejam evidenciados. No entanto, esse projeto está vinculado a um projeto maior, que avalia efeito de múltiplos biomarcadores e, portanto, essa resposta precisa ser apreciada em um contexto amplo para que possa ser mais conclusiva.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao CNPq e a UTFPR.

## REFERÊNCIAS

BARCELLOS, L. J.; WASSERMANN, G. F.; SCOTT, A P.; et al. Steroid profiles in cultured female jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the first reproductive cycle. **General and comparative endocrinology**, v. 121, p. 325–332, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11254374> Acesso em 01 de agosto de 2019.

BARTELL, S.M. Biomarkers, Bioindicators, and Ecological Risk Assessment - A Brief Review and Evaluation. **Environmental Bioindicators**, 1: p. 60-73, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15555270591004920> . Acesso em 2 de julho de 2019.

BEEBY, A. What do sentinels stand for? **Environmental Pollution**, 112: p. 285-298, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15555270591004920> Acesso em 15 de julho de 2019.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, 22: 25–34, 1999. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x> Acesso em 15 de julho de 2019

OOST, R. VAN DER; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 13( 2): 57–149, 2003. Disponível em: [http://www.dbbe.fcen.uba.ar/contenido/objetos/vanderOostetal2003Fishbioaccumulationandbiomarkersreview\\_1465491986892607.pdf](http://www.dbbe.fcen.uba.ar/contenido/objetos/vanderOostetal2003Fishbioaccumulationandbiomarkersreview_1465491986892607.pdf). Acesso em 19 de agosto de 2019.

SCHINONI, M. I. Fisiologia Hepática. Gaz. méd. Bahia 2006;76: Suplemento 1:S5-S9 Disponível em: <http://www.gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/viewFile/305/296> . Acesso em 02 de julho de 2019.