

Toxicidade do herbicida 2,4-D sobre o desenvolvimento inicial de embriões de ave (*Gallus gallus domesticus* L. 1758)

Toxicity of 2,4-D herbicide on the initial development of bird embryos (*Gallus gallus domesticus* L. 1758)

RESUMO

Bruna Gabriele da Silva Pinto
brunagabrielli28@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Patrícia Franchi De Freitas
patriciafreitas@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Nédia de Castilhos Ghisi
nediaghisi@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

O estudo avaliou os efeitos do herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) em embriões de aves (*Gallus gallus domesticus* L. 1758) após 72 horas de incubação. As concentrações utilizadas foram: 15, 30 e 60 $\mu\text{g/L}^{-1}$ de 2,4-D (padrão analítico Sigma Aldrich®) diluídos em 100 μl água destilada H_2O ; três grupos controles: fechado sem alteração; veículo injetado com 100 μl de H_2O ; controle positivo MMS - 60 $\mu\text{g/L}^{-1}$ em 100 μl de H_2O . Utilizou-se ovos fertilizados, distribuídos em seis grupos experimentais, 20 ovos cada, totalizando 120 ovos para análise da frequência cardíaca. Para a análise morfológica, foram apenas 10 ovos para cada tratamento, considerando apenas os vivos, os quais foram submetidos a eutanásia, coletados e preparados, através da técnica de montagem total. Dados da análise da frequência cardíaca apresentaram o $p > 5\%$, com distribuição normal padrão dos dados. Observou-se que as doses de 15 e 30 $\mu\text{g/L}^{-1}$, aumentaram a frequência cardíaca dos embriões, sendo que as médias foram muito próximas da significância ($p = 0,05014$). Quanto à análise morfológica, observou-se extensas malformações nas três concentrações de 2,4-D. Os controles fechado e veículo apresentaram normalidade na morfologia do embrião, diferentemente do MMS, que apresentou embriões com gastrosquise (falha no fechamento lateral do corpo).

PALAVRAS-CHAVE: Morfologia. Pesticida. Contaminantes. Mutação.

ABSTRACT

The study evaluated the effects of the herbicide 2,4-D on bird embryos (*Gallus gallus domesticus* L. 1758) after 72 hours of incubation. The concentrations used were: 15, 30 and 60 $\mu\text{g/L}^{-1}$ of 2,4-D (analytic standard Sigma Aldrich®) diluted in distilled H_2O ; and three control groups: closed without change; injected vehicle 100 μl H_2O ; and the positive control MMS - 60 $\mu\text{g/L}^{-1}$ in 100 μl of H_2O . Fertilized eggs were used, distributed in six experimental groups, 20 eggs each, totaling 120 eggs for heart rate analysis. For the morphological analysis, there were only 10 eggs for each treatment, considering only the living ones, which were euthanized, collected and prepared by the total assembly technique. Heart rate analysis data showed $p > 5\%$, with standard normal distribution of data. Doses of 15 and 30 $\mu\text{g/L}^{-1}$ increased the heart rate of the embryos, and the means were very close to significance ($p = 0.05014$). Regarding morphological analysis, extensive malformations were observed at the three concentrations of 2,4-D. The closed and vehicle controls showed normality in embryo morphology, unlike the MMS, which presented gastroschisis embryos (failure of lateral body closure).

KEYWORDS: Morphology. Pesticides. Contaminants. Mutation.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

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



INTRODUÇÃO

A contaminação de ambientes aquáticos, nos últimos anos, vem sendo alvo de estudos intensivos na área de ecotoxicologia. Segundo Ghisi (2012) os ambientes aquáticos estão entre os principais alvos dos efeitos nocivos da antropização, e acabam se comportando como receptores finais de contaminantes liberados no ambiente, seja por via aérea, ou pela percolação no solo, provindo pelo escoamento da água das chuvas. O herbicida 2,4-D (Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) foi o primeiro herbicida seletivo bem-sucedido, sendo introduzido em 1946, transformando-se rapidamente no herbicida mais extensamente usado em todo o mundo (AMARANTE JUNIOR et al., 2002).

Segundo Friedrich (2014) a ANVISA classificava o 2,4-D como Classe I (ANVISA, 2014), ou seja, pertencente ao indicativo de cor vermelha, o que caracteriza os fitossanitários extremamente tóxicos. Esse critério baseia-se, unicamente, nos efeitos agudos, que a substância é capaz de produzir após a exposição única em animais de laboratório. No entanto, a reclassificação toxicológica dos agrotóxicos, publicada em 01/08/2019 pela ANVISA, alterou o 2,4-D da Classe I - Extremamente Tóxico para a Categoria 4 (Produto Pouco Tóxico) – faixa azul.

A legislação brasileira em torno deste herbicida é muito branda quando comparada com a da Europa. Segundo o Conselho da União Europeia (1998) a concentração permitida é de $0,1 \mu\text{g/L}^{-1}$ para qualquer pesticida nos ambientes aquáticos utilizados para captação de água potável. No Brasil, há permissão para $30 \mu\text{g/L}^{-1}$ apenas para o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (BRASIL, 2011), ou seja, $29,9 \mu\text{g/L}^{-1}$ a mais que na União Europeia, e isso apenas para um de vários outros fitossanitários sintéticos utilizados no Brasil.

Atualmente não se encontra na literatura dados acerca da toxicidade do 2,4-D, no desenvolvimento embrionário de espécies vertebradas. Sendo assim, há necessidade de estudos sobre os efeitos tóxicos do 2,4-D sobre o desenvolvimento embrionário de diferentes organismos, principalmente nas fases iniciais, quando os embriões estão mais susceptíveis a interação com agentes externos (XI; MALLAVARAPU; NAIDU, 2010).

Desta forma, em função ao uso ainda bastante difundido e crescente do 2,4-D, o presente estudo, utilizou embriões de galinha (*Gallus gallus domesticus* L. 1758) como modelo, devido às semelhanças observadas nos estágios iniciais com o desenvolvimento embrionário de humanos (IRIE; KURATANI, 2011), para avaliar os efeitos tóxicos em níveis moleculares e tecidual do herbicida 2,4-D, sobre o desenvolvimento embrionário, aplicando concentrações próximas ao limite permitido em água potável pela legislação brasileira.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização dos experimentos, foram utilizados ovos fertilizados de *Gallus gallus domesticus* L. 1758, obtidos em um incubatório comercial da região Sudoeste do Paraná. No laboratório, os ovos foram higienizados com papel toalha umedecido em álcool etílico 70%, identificados e divididos em seis grupos experimentais.

As soluções dos contaminantes utilizadas para a exposição foram preparadas a partir do 2,4-D puro (padrão analítico – Sigma Aldrich®) diluído em $100 \mu\text{l}$ de H_2O

destilada nas concentrações de 15, 30 e 60 $\mu\text{g}/\text{L}^{-1}$. Foram utilizados um grupo de controle fechado (sem manipulação) e um grupo de controle veículo (injetado com H_2O), para verificar se a injeção nos ovos iria interferir nos parâmetros a serem analisados, e um controle positivo (MetilMetanoSulfonado MMS – Padrão Analítico Sigma Aldrich® 99%, diluído 1g para 1 ml), cuja ação mutagênica em células animais já é conhecida. Para a injeção dos contaminantes utilizou-se uma agulha (1,60 x 40 mm) para perfurar a casca, e com seringa e agulha (0,3 x 8 mm) de insulina, injetado o volume de 100 μl das diferentes concentrações das soluções diretamente na câmara de ar, local que permite melhor dispersão dos agentes no embrião.

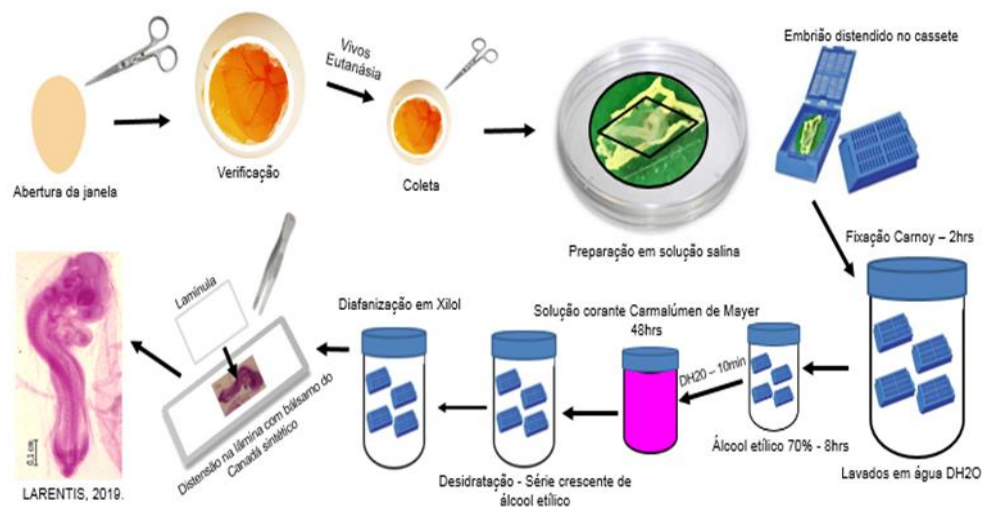
O experimento contou com um total de 120 ovos, divididos igualmente para cada grupo experimental, os quais receberam um total de 20 ovos previamente numerados de 1 a 20, tendo isso como forma de evitar análises tendenciosas. Apenas os 10 primeiros ovos foram destinados (1 ao 10) a análise morfologia, realizado através do método de Montagem Total. Os outros 10 ovos restantes numerados de 11 a 20, foram destinados para análise através do método de Ensaio Cometa, os quais os dados não serão apresentados neste trabalho. No total foram destinados 60 ovos para cada experimento. Após a injeção, os ovos foram selados com fita adesiva, posicionados com a câmara de ar voltada para cima e incubados por 72 horas em incubadora para ovos construída sob encomenda, sob temperatura controlada a 37,5°C e umidade e ventilação constante. Com 72 horas de incubação, os ovos foram abertos pelo método janela, o qual é realizado com o auxílio de tesoura cirúrgica uma abertura na casca, sendo de tamanho suficiente para observação e acesso ao embrião.

Após a abertura dos ovos, primeiramente foi-se analisada a taxa de mortalidade. Esta é realizada após a abertura do ovo através da verificação da viabilidade dos embriões. Posteriormente foi analisada a frequência cardíaca dos embriões vivos. Os batimentos cardíacos foram devidamente contabilizados, cronometrados por 15 segundos, e multiplicados por 4 para verificar o número de batimentos por minuto. Após esta análise, os embriões vivos foram submetidos à eutanásia, pelo método de congelamento, e então realizado a coleta através técnica de montagem total, assim como mostra a Figura 1.

Posteriormente, foram realizadas análises morfológicas com o auxílio do registro fotográfico de um estereoscópico (Zeiss, Stemi – 305). O mesmo possuía uma câmera acoplada (Axiocam ERc 5s), e o software ZEN 2.3 LITE, os quais possibilitaram analisar a morfologia dos embriões. Além desses mecanismos, as análises contaram com o auxílio dos estágios descritos por HAMBURGER e HAMILTON (1951).

As análises de frequência cardíaca foram realizadas através do modo quantitativo. Os dados coletados foram primeiramente submetidos às análises de pressupostos de normalidade e homocedasticidade. Os mesmos atingiram os pressupostos, apresentando o $p > 5\%$, com distribuição de dados homogêneos e paramétricos. Com isso, a ANOVA foi usado para comparação dos dados.

Figura 1 – Etapas dos procedimentos realizados com os embriões pela técnica de Montagem Total



Fonte: Autoria própria (2019).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a realização deste trabalho foram utilizados dados obtidos de 54 embriões, dos 120 ovos incubados inicialmente, ou seja, dos ovos incubados, apenas 45% estavam viáveis para análise de frequência cardíaca, e dentre esses, estavam os ovos destinados para análise morfológica.

A Tabela 1 mostra os dados coletados na verificação da viabilidade dos embriões acerca das concentrações utilizadas, exibindo diferença na taxa de mortalidade, em relação as diferentes concentrações do contaminante 2,4-D, quando comparados aos grupos do controle fechado, do controle veículo, e do controle positivo (MMS). Esse fenômeno se repete na taxa de embriões inviáveis, que são embriões que não retomaram seu desenvolvimento após a incubação, ou que, retomaram seu desenvolvimento, porém, se apresentavam apenas como ilhotas sanguíneas.

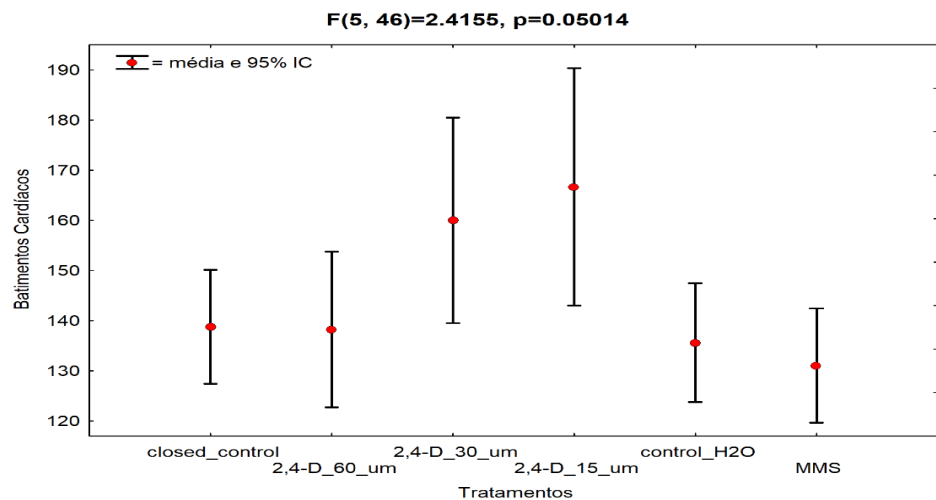
Tabela 1 – Dados retirados das análises de viabilidade dos embriões em relação aos diferentes tratamentos

Grupos Experimentais	Total	Vivos	%	Mortos	%	Inviáveis	%
Controle Fechado	20 (100%)	15	75%	4	20%	1	5%
Controle Veículo	20 (100%)	12	60%	7	35%	1	5%
2,4-D 60 µg/L-1	20 (100%)	7	35%	4	20%	9	45%
2,4-D 30 µg/L-1	20 (100%)	4	20%	8	40%	8	40%
2,4-D 15 µg/L-1	20 (100%)	3	15%	9	45%	8	40%
MMS	20 (100%)	13	65%	7	35%	0	0%

Fonte: Autoria própria (2019).

Para a análise da frequência cardíaca foi utilizado o total dos embriões vivos (54 embriões). Em termos de batimentos cardíacos, verificou-se que os valores estiveram muito próximos da significância, apresentando um $p = 0.05014$. Na Figura 2 observa-se as médias de batimentos cardíacos dos embriões apresentados pelos diferentes tratamentos.

Figura 2 – Comparação estatística dos batimentos cardíacos apresentados pelos diferentes tratamentos



Fonte: Autoria própria (2019).

Pode-se observar que o 2,4-D nas doses de 15 e 30 $\mu\text{g/L}^{-1}$ aumentaram a frequência cardíaca média dos embriões (166,7 e 160,0 batimentos por minuto, BPM, respectivamente), apresentando anormalidade nos batimentos cardíacos, caracterizado como taquicardia. Considera-se que a frequência cardíaca ideal para os embriões de *Gallus gallus domesticus* L. 1758, seja de 140,0 BPM. Já na concentração de 2,4-D 60 $\mu\text{g/L}^{-1}$ e nos grupos do controle fechado e veículo, os valores médios dos batimentos cardíacos foram de: 138,2; 138,7; 135,7, respectivamente, demonstrando normalidade nos BPMs, ou seja, a média desses valores se aproximaram da frequência cardíaca ideal para a espécie. Ainda é possível observar que o controle positivo MMS, apresentou leve redução dos BPMs (131,1), caracterizado como bradicardia.

Dos 54 embriões vivos, 31 foram destinados a análise morfológica. A partir das análises visuais, observou-se que nos controles fechado e veículo, todos os embriões analisados apresentaram normalidade em suas morfologias, sem sofrerem alterações. Ao contrário do grupo contaminante, que apresentou alteração morfológica, nas diferentes concentrações (15, 30 e 60 $\mu\text{g/L}^{-1}$), além das concentrações 15 e 30 $\mu\text{g/L}^{-1}$, mais uma vez apresentarem as maiores taxas de mortalidade. Já o controle positivo (MMS), apresentou uma média entre as taxas de mortalidade do grupo, de normalidade e de alteração, tendo uma média de 40% em todos os dados. Na análise qualitativa, foram observados embriões com extensas malformações nas três concentrações de 2,4-D, sendo impossível determinar o estágio de desenvolvimento. Os controles fechado e veículo apresentaram normalidade na morfologia do embrião, com estágios entre 17 e 18. No grupo MMS, encontrou-se embriões nos mesmos estágios que os controles fechado e veículo, porém com malformação do tipo gastrosquise (falha no fechamento lateral do corpo).

CONCLUSÃO

A diferença significativa dos dados levantados, entre as diferentes concentrações do 2,4-D, e os controles fechado, veículo e o positivo, evidenciam os

potenciais efeitos do herbicida aos embriões de galinha. Sugere-se que sejam realizados mais estudos avaliando a segurança deste herbicida, tais como análises moleculares, já que as alterações se apresentam do nível molecular para o nível tecidual.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial ao CNPq, que através do financiamento de apoio as pesquisas da instituição, proporcionou a realização do experimento.

REFERÊNCIAS

AMARANTE JUNIOR, et al. **Revisão das Propriedades, Usos e Legislação do Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)**. Caderno de Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão. V. 13, n. 1, p. 60-70. Maranhão, 2002. Disponível em: [http://www.pppg.ufma.br/cadernosdepesquisa/uploads/files/Artigo%206\(14\).pdf](http://www.pppg.ufma.br/cadernosdepesquisa/uploads/files/Artigo%206(14).pdf). Acesso em: 19 set. 2019.

BRASIL, Leis, Decretos. **Ministério da Saúde. Portaria 2914, de 12 de dezembro de 2011**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília, 2011. Disponível em: http://site.sabesp.com.br/site/uploads/file/asabesp_doctos/PortariaMS29141212_2011.pdf. Acesso em: 19 set. 2019.

CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA. Diretiva 98/83/CE do Conselho de 3 de Novembro de 1998 relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, p. 332–354, 1998.

FRIEDRICH, K. Avaliação dos efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutivo hormonal e câncer para seres humanos após o uso do herbicida 2,4-D. **Departamento de Farmacologia e Toxicologia Núcleo Técnico de Saúde e Ambiente INCQS/FIOCRUZ**. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/28233/4918259_218117.pdf. Acesso em: 19 set. 2019.

GHISI, N. C. Relationship between biomarkers and pesticide exposure in fishes: a review. **Pesticides: advances in chemical and botanical pesticides**. p. 357–382. 2012.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, n.88, p. 49-92, 1951.

IRIE, N.; KURATANI, S. Comparative transcriptome analysis reveals vertebrate phylotypic period during organogenesis. **Nature Communications**, v. 2, n. 248, 2011. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms1248>. Acesso em: 19 set. 2019.

XI, Y.; MALLAVARAPU, M.; NAIDU, R. Adsorption of the herbicide 2,4-D on organo-palygorskite. **Applied Clay Science**, v. 49, p. 255-261, 2010.