

Efeitos teratológicos da exposição de embriões e larvas de *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI) em concentrações permissivas do herbicida 2,4-D

Teratological effects in *Rhamdia quelen* embryo and larvae submitted in permissive concentrations of the 2.4-D herbicide

RESUMO

A utilização de agrotóxicos tem exposto os organismos aquáticos, não-alvos, a um cenário de contaminação e alteração de *fitness*. O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um dos herbicidas mais difundidos no mundo e necessita de investigações. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos teratológicos em embriões/larvas de *Rhamdia quelen* submetidas às concentrações permissivas do herbicida 2,4-D, em condições controladas. A obtenção dos ovos foi realizada através de uma piscicultura comercial de Toledo-PR. Posteriormente, os ovos viáveis foram selecionados e alocados em microplacas de 24 poços (4 ovos/poço) contendo quatro tratamentos: grupo controle (água reconstituída), CC1 = 15µg/L, CC2 = 30µg/L e CC3 = 60µg/L de 2,4-D. As amostras foram coletadas em 48 e 96 horas pós-fertilização (hpf). As deformidades morfológicas foram analisadas em estereomicroscópio, contabilizando-as por categoria e tipo. Foi constatada uma elevada frequência de indivíduos anormais em todas as concentrações de 2,4-D após 96 hpf, o que sugere que a espécie *R. quelen* é suscetível ao 2,4-D mesmo em baixas concentrações.

PALAVRAS-CHAVE: Agrotóxicos, bioensaio, embriões, peixes, deformidades

ABSTRACT

The large-scale use of pesticides has exposed non-target aquatic organisms to contamination and fitness changes. 2.4-dichlorophenoxyacetic acid is one of the most widespread herbicides in the world and needs investigation. The objective of this study was to evaluate the teratological effects in embryos/larvae of *Rhamdia quelen* submitted to permissive concentrations of the 2.4-D, under controlled conditions. The eggs were obtained from a commercial fish farm in Toledo-PR. Viable eggs were selected and placed in 24-well microplates (4 eggs/well) containing four treatments: control group (reconstituted water), CC1 = 15µg/L, CC2 = 30µg/L, and CC3 = 60µg/L of 2.4-D. Two exposure times were considered: 48 and 96 hours post-fertilization (hpf). Morphological deformities were analyzed in a stereomicroscope to classify and quantify the damages. High frequency of abnormal individuals was found in all concentrations of 2.4-D after 96 hpf, suggesting high susceptibility of *R. quelen* to low concentrations of 2.4-D.

KEYWORDS: Pesticides, bioassay, embryos, fish, deformities.

Tainá dos Santos
taaiinnaa@hotmail.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

Elton Celton de Oliveira
eltonoliveira@utfpr.edu.br
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA
FEDERAL DO PARANÁ,
Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

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



INTRODUÇÃO

A “Revolução Verde” que ocorreu no Brasil, em meados de 1950, fez com que os agricultores utilizassem cada vez mais produtos químicos, como fertilizantes e produtos fitossanitários nas lavouras, visando aumentar a produtividade [1]. A utilização em larga escala destes produtos gerou uma série de impactos negativos para o meio ambiente e sua biota.

Neste contexto, todo o ecossistema acaba sendo prejudicado, principalmente no que se refere aos organismos do meio aquático, uma vez que os corpos hídricos acabam recebendo os contaminantes do entorno. Os agrotóxicos, por exemplo, alcançam o ambiente aquático através da pulverização direta, ou indiretamente através do escoamento superficial ou percolação e infiltração no solo [2]. Estes dois últimos podem contaminar águas subterrâneas, gerando mais adversidades e perigos a biota e à saúde humana.

Nesse sentido, o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) é um herbicida de amplo espectro, de ação hormonal, que tem como atributo inibir o crescimento de ervas daninhas, principalmente em culturas de soja, trigo e milho. Este herbicida é um dos agrotóxicos mais utilizados no Brasil e no mundo [3]. Entretanto pesquisas indicam que este herbicida não atinge apenas os organismos-alvo, mas também atinge os espécimes não-alvo, de importância ecológica, dentre os quais podem se destacar os vertebrados, tais como peixes, anfíbios, aves e mamíferos.

O bioensaio com fases iniciais de desenvolvimento de peixes entra em cena como uma ferramenta de grande significância, possibilitando o pesquisador avaliar as relações de causa e efeito entre a substância desejada e o organismo modelo, em uma fase de vida vulnerável, de modo a mensurar potenciais efeitos tóxicos com maior precisão [4]. A espécie de peixe *Rhamdia quelen*, pertence à família Heptapteridae e a ordem dos Siluriformes [5] e foi selecionada como modelo biológico neste estudo por ser um peixe nativo do Brasil, que pode ser encontrado principalmente em água doce, adaptados a regiões de baixa temperatura e encontrados em relativa abundância na região sul do Brasil [6]. Além disso, é classificado como omnívoro, com tendências a predação, podendo, portanto, bioacumular diversas substâncias tóxicas.

O objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização dos efeitos teratológicos em embriões/larvas de *R. quelen* submetidas à exposição em baixas concentrações do herbicida ácido diclorofenoxiacético (2,4-D).

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a obtenção dos ovos, foram utilizadas matrizes parentais da espécie *Rhamdia quelen* popularmente conhecido como Jundiá, os quais foram induzidos a maturação sexual, através de injeções intramusculares com extrato de hipófise de carpa, para posterior extrusão manual dos gametas, visando a fertilização assistida dos ovos. Todo esse processo de indução foi realizado em uma piscicultura comercial localizada na região de Toledo-PR.

Após este procedimento, o material reprodutivo coletado foi transportado até o Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Dois vizinhos, onde ocorreu a seleção criteriosa dos ovos fertilizados (viáveis). Os ovos foram classificados em viáveis, quando apresentavam aspecto translúcido, ou não fecundados, quando estavam esbranquiçados.

Os ovos viáveis foram alocados em microplacas de 24 poços, contendo os tratamentos descritos a seguir. Em todos os poços foram inseridos quatro ovos viáveis em um volume fixo de 2 ml/poço, configurado conforme o tratamento. Além do grupo controle negativo, mais três grupos tratados com o herbicida 2,4-D foram utilizados: CC1 = 15µg/L, CC2 = 30µg/L e CC3 = 60µg/L de 2,4-D. Neste experimento foi utilizada a formulação comercial do herbicida 2,4-D, conhecida como DMA 806 BR, a qual contempla 806 g/L do princípio ativo e pode ser diluído diretamente em água. Para o cálculo das concentrações considerou-se o valor ponderado de 2,4-D da formulação comercial. É importante destacar que 30µg/L é a concentração máxima de 2,4-D recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para águas de consumo humano [7]. A legislação brasileira segue essa mesma recomendação, tanto em águas de consumo humano, como a de mananciais superficiais. Desta forma, as concentrações utilizadas neste trabalho foram baseadas nestas recomendações, contemplando ainda um valor acima para fins de comparação.

A diluição do 2,4-D foi realizada em água reconstituída, composta de uma mistura de quatro sais (Cloreto de Cálcio, Sulfato de Magnésio, Cloreto de Potássio e Bicarbonato de sódio), dissolvidos em água destilada. O pH da água reconstituída foi calibrado em 8,5 e a temperatura regulada em 24°C na BOD. Vale ressaltar que o grupo controle negativo ficou exposto somente a essa água. Foram utilizadas 10 réplicas por concentração e tempo de exposição, sendo que a coleta para análise das deformidades morfológicas ocorreu em 48 e 96 horas pós-fecundação (hpf). O ensaio foi semiestático, realizando-se a troca de metade do volume dos poços a cada 24 horas. Para tal, utilizou-se um conjunto de micropipetas.

Transcorrido os períodos de 48 e 96 hpf, os indivíduos foram coletados, anestesiados e sacrificados por resfriamento, sendo alocados em tubos de *ependorf* de 1,5mL. Em seguida, os indivíduos foram fixados com uma solução de formalina a 10%, e armazenados em uma geladeira no laboratório de Biologia Molecular com temperatura de 4 à 8°C.

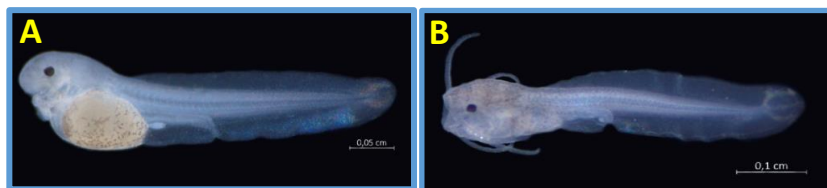
Para avaliar as deformidades morfológicas nas larvas seguiu-se a recomendação do artigo “Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior: Distinct roles for particle size, coating and composition” [8]. Neste artigo, os autores propõem dividir as anormalidades nas seguintes categorias: (1) Danos axiais: lordose, escoliose, cifose, torção na cauda e atrofia; (2) Danos às nadadeiras: lesões reversíveis ou permanentes e atrofias; (3) Danos crânio-faciais: edema ocular, redução ou ausência dos olhos, malformação da boca, redução ou ausência de barbilhões; (4) Danos torácico-abdominais: edema pericárdico, edema do saco vitelino e distensão abdominal e/ou emagrecimento.

Após classificar os danos em categorias e tipos, fez-se apenas a contagem dos indivíduos com e sem deformidades, para viabilizar uma análise de frequência com o uso do qui-quadrado.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com base na análise do material realizada por meio do esteromicroscópio foi possível registrar a ocorrência de indivíduos normais, tanto no período de 48 hpf quanto no de 96 hpf, (figuras 1 A e B, respectivamente), e indivíduos com anormalidades morfológicas, os quais serão mostrados mais adiante

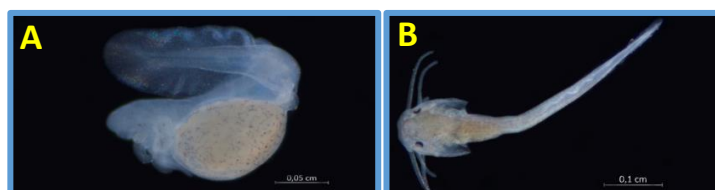
Figura 1 – A) Indivíduo normal, exposição de 48 hpf; B) Indivíduo normal, 96 hpf;



Fonte: O autor (2020)

Dos danos pertencentes à categoria 1 (danos axiais) foram encontrados indivíduos com lordose, escoliose, cifose e torção na cauda (figura 2)

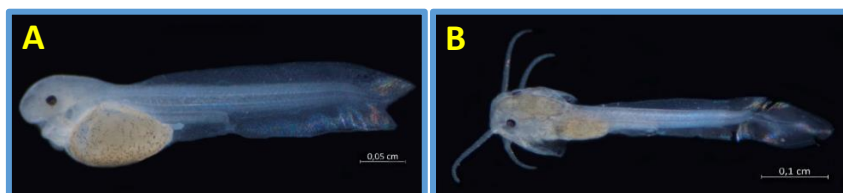
Figura 2 – A) Indivíduo com dano axial (escoliose – torção na coluna vertebral), exposição de 48 hpf; B) Indivíduo com dano axial (escoliose), exposição de 96 hpf.



Fonte: O autor (2020)

Dos danos pertencentes à categoria 2 (danos às nadadeiras) foram encontrados indivíduos com nadadeiras bifurcadas e lesionadas (figura 3).

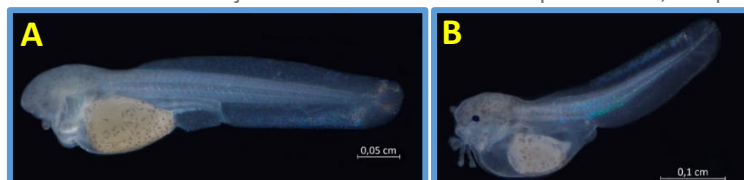
Figura 3 – A) Indivíduo com nadadeira bifurcada em 48 hpf; B) Indivíduo com dano na nadadeira, em 96 hpf;



Fonte: O autor (2020)

Na categoria 3 (crânio-facial) foi encontrado redução ou ausência dos olhos, malformação da boca e redução ou ausência de barbilhões, presente na figura 4)

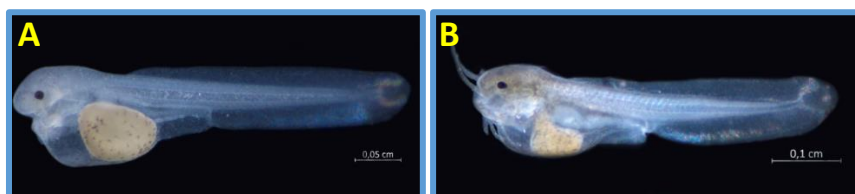
Figura 4 – A) Indivíduo com ausência dos olhos e malformação facial, 48 hpf; B) Indivíduo com redução dos barbilhões e edema pericárdico, 96 hpf.



Fonte: O autor (2020)

Por fim, na categoria 4 (torácica/abdominal) foram encontrados diversos indivíduos com edema pericárdico, edema do saco vitelino e emagrecimento (figura 5).

Figura 5 – A) Indivíduo com edema pericárdico no período de exposição de 48 hpf; B) Indivíduo com edema pericárdico no tempo de exposição de 96 hpf.



Fonte: O autor (2020)

A partir da análise de frequência dos indivíduos com e sem danos não foi possível evidenciar diferença estatística entre os grupos tratados com o 2,4-D e o grupo controle no período de 48 hpf ($\chi^2 = 6,31$; $p > 0,05$). Já em 96 hpf, verificou-se que os resultados foram significativos ($\chi^2 = 13,84$; $p < 0,05$), pois a quantidade de indivíduos afetados (com deformidades) foi mais elevada nos grupos tratados com o 2,4-D.

Com base nos resultados do qui-quadrado pôde-se constatar que no período de 96 hpf quase todos os indivíduos apresentaram malformações (cerca de 95%) nos grupos tratados com o 2,4-D, independente da concentração. O grupo controle também apresentou um aumento de anormalidades morfológicas, mas em menor frequência (cerca de 60%) e menos severas.

Os efeitos teratológicos observados neste estudo, mesmo em concentrações muito baixas do herbicida 2,4-D, são consistentes com os argumentos da pesquisadora Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira e sua equipe. Esse grupo de trabalho desenvolveu diversas pesquisas na área de toxicologia ambiental, expondo embriões/ larvas do peixe zebra (*Danio rerio*) à diversos tipos de produtos fitossanitários. Como resultado, concluíram que não há dose segura para agrotóxicos, visto que anormalidades sempre eram observadas. Isso gerou bastante polêmica em meados de outubro de 2019 [9].

CONCLUSÃO

A elevada frequência de indivíduos anormais após 96 hpf de contato com o herbicida 2,4-D, sugere que as fases iniciais de desenvolvimento da espécie *R. quelen* (não-alvo) são bastante suscetíveis a este agrotóxico, desde suas concentrações mais baixas; inclusive inferiores ao permitido pela legislação mundial. Se extrapolado ao ambiente natural, isso poderia indicar um elevado risco a viabilidade desta população e talvez a de muitas outras espécies. Por fim, este projeto de iniciação científica esteve vinculado a um projeto maior de mestrado acadêmico, o qual contempla muitos outros parâmetros de análise nestes mesmos organismos, permitindo uma visão mais acurada das respostas e da relação causa-efeito.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a bolça de Pesquisa a Iniciação Científica da Fundação Araucária (PIBIC-Af), e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

REFERÊNCIAS

- [1] TAVELLA, L.B. et al. Consórcio agroecológico entre alface, cenoura e rabanete cultivado nas condições de Rolim de Moura – RO. **Revista Verde**, v.6, n.2, p.143–148, 2011.
- [2] COOPER, C, M. Biological effects of agriculturally derived surface-water pollutants on aquatic systems – a review. **J Environ Qual**. v.22: p. 402-408. 1993.
- [3] ANVISA. **Parecer após reunião da Comissão de Reavaliação**. 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3426553/Nota+T%C3%A9cnica+Final.pdf/741bc5aa-e223-4853-90db-a3df268022ff> Acesso em: 12 jun. 2020
- [4] BEEBY, A. What do sentinels stand for? **Environmental Pollution**, 112: p. 285-298, 2001
- [5] MALABARBA, Luiz Roberto; MALABARBA, Márcia Claudia de S. L. Filogenia e classificação dos peixes neotropicais. In: BALDISSEROTTO, Bernardo; CYRINO, José E. P.; URBINATI, Elisabeth C. (Org.). **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce. Jaboticabal**: FUNEP; UNESP, 2014.p. 1-12
- [6] BARCELLOS, L. J.; WASSERMANN, G. F.; SCOTT, A P.; et al. **Steroid profiles in cultured female jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* uoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the first reproductive cycle. General and comparative endocrinology**, v. 121, p. 325–332, 2001
- [7] WHO. 2,4-D in Drinking-water: Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. **WHO/SDE/WSH/03.04/70**, p. 1–13, 2003
- [8] POWERS, C, M. et al. Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior: Distinct roles for particle size, coating and composition. **Neurotoxicology and Teratology ELSEVIER**, 2011. Disponível em: <https://ceint.duke.edu/publications/silver-nanoparticles-alter-zebrafish-development-and-larval-behavior-distinct-roles> Acesso em: 18 maio. 2020
- [9] MINISTÉRIO PÚBLICO DE SANTA CATARINA (MPSC). **Estudo que aponta má formação em embriões de peixes é divulgado em reunião do Fórum de Combate aos Impactos dos Agrotóxicos e Transgênicos**. 2019. Disponível em: <https://www.mpsc.mp.br/noticias/estudo-que-aponta-ma-formacao-em-embrioes-de-peixes-e-divulgado-em-reuniao-do-forum-de-combate-aos-impactos-dos-agrotoxicos-e-transgenicos> Acesso em: 20 mai. 2020.