

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO INGREDIENTE ATIVO DO HERBICIDA 2,4-D NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE ANFÍBIOS

**CRISTINA BRIDI^{1,2*}, GUILHERME FERREIRA FELICIONI^{3,2}, JENIFER
EDUARDA LUTEREK³, INETE BAÚ^{4,2}, FLAVIA B. CHAGAS^{5,2}, ALINE
POMPERMAIER^{6,2}, PAULO AFONSO HARTMANN^{7,2}, MARILIA HARTMANN^{7,2}**

1 Introdução

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético foi descrito pela primeira vez em 1942 como uma auxina sintética (Matthews, 2018) e por muito tempo foi conhecido por seu uso como um composto (junto com o 2,4,5-T) do Agente Laranja na Guerra do Vietnã (Neumeister, 2014). Esse herbicida é dentre todas as classes de agroquímicos, o segundo mais vendido no Brasil, com aproximadamente 368 toneladas por ano (Brovini *et al.*, 2021). O herbicida 2,4-D muitas vezes chega às águas superficiais e sedimentos (Islam *et al.*, 2018).

O uso de agrotóxicos tem o potencial de afetar anfíbios não apenas em habitats que estão ocupados pela agricultura, mas também em ambientes remotos pelo transporte atmosférico de resíduos dos compostos (Hussain; Pandit, 2012). A Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (versão 2022-2) indica que quase 35% das 7.486 espécies avaliadas de anfíbios estão ameaçadas de extinção e 38 estão extintas (IUCN, 2023).

A biologia, com vida bifásica aquática e terrestre, distribuição global, habitat, capacidade de acumular poluentes, metais pesados e agroquímicos e facilidade de manutenção em laboratório fazem dos anfíbios bons bioindicadores ambientais (Pyastolova *et al.*, 1995). Anfíbios nativos vêm sendo utilizados em pesquisas como bioindicadores pela sua alta adaptabilidade ao habitat, podendo ser avaliado no indivíduo e refletido ao ambiente em que está presente (Ferrante; Fearnside, 2020). No presente estudo, a espécie escolhida para avaliação da toxicidade de 2,4-D foi *Physalaemus gracilis*, popularmente conhecida como “rã-chorora”. Esse pequeno anfíbio anuro é encontrado no sul do Brasil, Argentina e Uruguai

1 Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim, contato: crisbridi123@gmail.com

2 Grupo de Pesquisa: Biodiversidade e Conservação da Fauna.

3 Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim

4 Mestranda em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim.

5 Doutouranda em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim.

6 Pós-doutouranda em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim.

7 Doutor (a) em Ciências Biológicas, Professor(a) titular da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim.

e tem como habitats florestas, áreas abertas e corpos d'água, onde coloca as desovas espumosas em águas paradas, nas bordas de lagos (Silveira, 2018). A espécie está classificada como “Pouco preocupante” e sua população é estável de acordo com a IUCN (2023).

Com essa perspectiva em vista, é fundamental que discutamos os impactos desse herbicida em organismos não-alvos, como os anfíbios, principalmente nas suas fases iniciais de vida.

2 Objetivos

O trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade do ingrediente ativo do agrotóxico 2,4-D no início do desenvolvimento de embriões de *Physalaemus gracilis*.

3 Metodologia

As coletas de desovas de *P. gracilis* ocorreram em menos de 24 horas de oviposição em uma lagoa da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Erechim (Latitude: 27°43' 46,11" Sul; Longitude: 52°16' 54,40" Oeste). Logo após a coleta as desovas foram transferidas ao Laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade onde foram colocadas em aquários com solução FETAX, definida pelo protocolo ASTM 1439-12.

As concentrações utilizadas no ensaio foram definidas com base na Resolução CONAMA nº357 de 17/03/2005 (Brasil, 2005), que define o máximo permitido para 2,4-D em água doce classe III no Brasil é 30µ/L. Dessa forma, as concentrações testadas no experimento foram: 20, 25 e 30µ/L. O 2,4-D utilizado foi Pestanal, com pureza de 98%. O bioensaio foi realizado em teste estático, em triplicata, durando sete dias. Os embriões de *P. gracilis* foram colocados individualmente em placas celulares contendo 24 poços de 3ml cada. Nas placas, quatro poços foram separados para controle e 20 para o contaminante. Os organismos foram inseridos no bioensaio no estágio 16-20, de acordo com Gosner (1960). Antes de serem colocados nos poços cada ovo foi observado individualmente em estereomicroscópio para confirmar se estavam fecundados e tinham iniciado o desenvolvimento embrionário.

A observação dos embriões foi feita diariamente, onde era anotada a mortalidade e o estágio de desenvolvimento. No sétimo dia de ensaio foi avaliada a atividade natatória de cada um dos indivíduos, classificando em normais, letárgicos ou hiperativos.

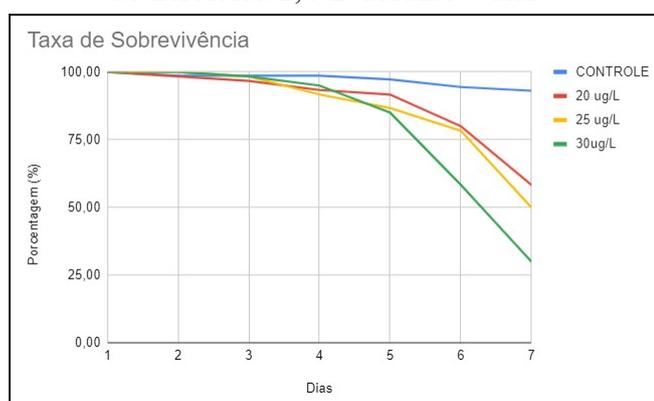
A análise estatística dos dados foi por ANOVA, no software GraphPad Prism,

4 Resultados e Discussão

A sobrevivência dos grupos teve diferença significativa em relação ao controle nas concentrações 20µ/L ($p = 0,0179$), 25µ/L ($p = 0,0112$) e 30µ/L ($p = 0,0028$). Essa

sobrevivência diminuiu com o aumento das concentrações de 2,4-D, pois em 20 μ /L, 58,33% dos indivíduos estavam vivos no último dia de ensaio, na concentração 30 μ /L apenas 30% dos organismos estavam vivos (Figura 1). No estudo de Santos *et al.* (2024) concentrações entre 4 e 30 μ g/L não afetaram a sobrevivência de outra espécie de *Physalaemus* (*P. cuvieri*), no entanto os autores utilizaram um produto comercial de 2,4-D e girinos a partir do estágio 25 de desenvolvimento. Na primeira fase da vida, quando existe a formação inicial dos órgãos, o ingrediente ativo matou mais de 50% dos expostos em 25 e, 30 μ /L o que é bastante preocupante, considerando que a mortalidade embrionária afeta diretamente o aumento populacional desse grupo (Davidson *et al.*, 2020).

Figura 1 – Sobrevivência de embriões de *Physalaemus gracilis* expostos ao ingrediente ativo do herbicida 2,4-D durante 7 dias.

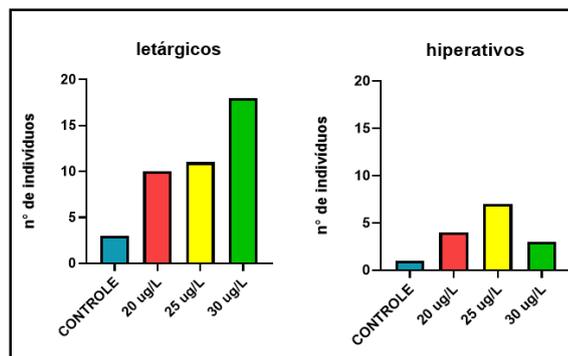


Fonte: Cristina Bridi, 2024.

Nas concentrações entre 20 e 30 μ g/L o herbicida 2,4-D não afetou o desenvolvimento no início do desenvolvimento dos girinos ($F = 3,24 = 0,3196$; $p = 0,8111$), possivelmente relacionado as baixas concentrações do composto usada nesse estudo.

A atividade natatória teve alterações em todas as concentrações de 2,4-D (20 μ /L - $p = 0,0039$; 25 μ /L - $p = 0,0001$; 30 μ /L - $p = 0,0037$), comparadas ao controle. A letargia foi mais comum do que hiperatividade e aumentou a medida em que as concentrações aumentaram (Figura 2). Na concentração de 30 μ /L mais de 50% dos organismos apresentaram atividade natatória letárgica.

Figura 2 – Letargia e hiperatividade apresentada na atividade natatória de *Physalaemus gracilis* expostos a 2,4-D durante sete dias.



Fonte: Cristina Bridi, 2024.

O estudo de Santos *et al.* (2024) também registrou a letargia como principal comportamento em girinos de *Physalaemus* expostos a 2,4-D (*P. cuvieri*), corroborando com os resultados aqui apresentados. No trabalho de Folador (2024) não foram observadas alterações na atividade natatória em *P. cuvieri* expostos a outra formulação do herbicida. Ambos os estudos foram a partir do estágio 25 e com produtos formulados, demonstrando a diferença na toxicidade entre os compostos baseados em 2,4-D, e chamando a atenção para a necessidade de estudos comparativos.

5 Conclusão

O ingrediente ativo de 2,4-D diminuiu a sobrevivência e causou alterações na atividade natatória em embriões de *P. gracilis*, em concentrações entre 20 e 30 μ /L. A mortalidade dos embriões expostos foi maior que 50% em 25 e 30 μ /L de 2,4-D, e os sobreviventes apresentaram principalmente letargia ao final do ensaio. Os resultados são preocupantes pois os anfíbios representam um papel ecológico importante nos ecossistemas e os estudos demonstram que as populações desse grupo de animais estão constantemente ameaçadas, contribuindo para o declínio de espécies.

Referências Bibliográficas

BERTOMEU-SÁNCHEZ, J. R. Introduction. Pesticides: Past and Present. **HoST - Journal of History of Science and Technology**, v. 13, n. 1, p. 1–27, 1 jun. 2019.

BRASIL, **Resolução CONAMA nº357**, de 17 de março de 2005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional.

BROVINI, E. M. *et al.* Three-bestseller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. **Science of The Total Environment**, v. 771, p. 144754, jun. 2021.

DAVIDSON, M. *et al.* Embryo mortality in a captive-bred, Critically Endangered amphibian. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 152, p. 73–83, 1 dez. 2022.

DE CASTRO MARCATO, A. C.; DE SOUZA, C. P.; FONTANETTI, C. S. Herbicide 2,4-D: A Review of Toxicity on Non-Target Organisms. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 228, n. 3, mar. 2017.

FERRANTE, L.; FEARNSTIDE, P. M. Evidence of mutagenic and lethal effects of herbicides on Amazonian frogs. **Acta Amazonica**, v. 50, n. 4, p. 363–366, dez. 2020.

FOLADOR, A. **Efeitos tóxicos de concentrações ambientalmente relevantes dos herbicidas 2,4-D e Imazetapir em girinos de *Physalaemus cuvieri***. Universidade Federal da Fronteira Sul, 2024.

GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v. 16, n. 3, p. 183–190, 1960. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/3890061>. Acesso em: 30 jul. 2024.

HUSSAIN, Q. A.; PANDIT, A. K. Global amphibian declines: A review. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 4, n. 10, p. 348–357, 2012.

ISLAM, F. *et al.* Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. **Environment International**, v. 111, n. 0160-4120, p. 332–351, fev. 2018.

IUCN. **IUCN Red List of Threatened Species: *Physalaemus gracilis***. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/species/134816339/101431709>. Acesso em: 10 ago. 2024.

MATTHEWS, G. A. **A History of Pesticides**. Wallingford, Oxfordshire, Uk ; Boston, Ma: Cabi, 2018.

NEUMEISTER, L. **The risks of the herbicide 2,4-D**. [s.l.] Pesticides Action Network (PAN) Europe, 2014.

PYASTOLOVA, O. A. *et al.* Utilization of Amphibians in Bioindication Research on Territories of the Eastern Urals Radioactive Trace. **Russian Journal of Ecology**, v. 27, n. 5, p. 378–382, 1995.

SANTOS, G. DOS *et al.* 2,4-D-based herbicide underdoses cause mortality, malformations, and nuclear abnormalities in *Physalaemus cuvieri* tadpoles. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 277, n. 109840, p. 109840, 2024.

SILVEIRA, F. F. Fauna Digital do Rio Grande do Sul, 2018. **Bird and Mammal Evolution, Systematics and Ecology Lab - UFRGS**. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/faunadigitalrs/ra-chorona-physalaemus-gracilis/>. Acesso em: 10/08/2024.

Palavras-chave: Anura; Ecotoxicologia; Agrotóxicos; *Physaleamus*.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2023-0391.

Financiamento FAPERGS.