

AValiação da Toxicidade do Herbicida 2,4-D em Girinos de *Physalaemus*: A Formulação Comercial é Mais Tóxica que o Ingrediente Ativo?

**GUILHERME F. FERREIRA^{1,2*}, BRUNA CAPRINI^{1,2}, INETE C. BAÚ^{2,3},
ALEXANDRE FOLLADOR^{2,3}, MARILIA HARTMANN^{3,4}**

1 Introdução

O Brasil é o país com a maior biodiversidade de anfíbios anuros no mundo, com 1144 espécies descritas (SEGALLA, et al 2022). Eles são importantes organismos sentinela e não alvo e são amplamente estudados como animais modelo em ensaios ecotoxicológicos (DOS SANTOS, 2020; FORBES, NSIBANDE, 2016). Por sua alta vulnerabilidade a diversos agrotóxicos e estarem expostos aos contaminantes tanto na terra quanto na água (FREITAS, 2019).

Physalaemus cuvieri é um anfíbio anuro da família Leptodactylidae, possui grande distribuição na mata atlântica Brasileira, Uruguai, Argentina, Paraguai, Bolívia e Venezuela (FROST, 2023). A espécie não se encontra na listagem oficial de espécies ameaçadas do MMA (BRASIL, 2022), por conta disso, de sua ampla distribuição e sensibilidade da espécie ela é muito utilizada como espécie modelo em estudos com efeitos dos agrotóxicos (DOS SANTOS, 2020).

O agrotóxico 2,4-D é um herbicida registrado como ingrediente de aproximadamente 1500 herbicidas (ZUANAZZI, 2020). Ele aparece na lista dos agrotóxicos mais vendidos no Brasil, atrás apenas da atrazina (IBAMA, 2018). No ambiente o 2,4-D se aloca facilmente em ambientes aquáticos, sua molécula polar unida ao seu grupo carboxila ácido, auxiliam em sua mobilidade na água (ZUANAZZI, 2020). Nesses sistemas eles afetam de forma negativa os organismos (FREITAS, 2019). Podendo causar diversos problemas genéticos e morfológicos (ZUANAZZI, 2020, BROVINI, 2021), porém, os efeitos de doses subletais de 2,4-D ainda são pouco conhecidos (FREITAS, 2019), não sendo possível mensurar seus impactos nas espécies não alvo.

2 Objetivos

- 1 Graduando em ciências biológicas - bacharelado, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus Erechim* contato: guifelicioni@gmail.com, Bolsista.
- 2 Grupo de Pesquisa: Biodiversidade e conservação da fauna
- 3 Mestrando em ciência e tecnologia ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim
- 4 Biólogo, Docente na Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim **Orientador(a)**.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar e comparar a toxicidade do ingrediente ativo e da formulação comercial do herbicida 2,4-D em girinos de *Physalaemus cuvieri*

3 Metodologia

Foram coletadas desovas de *Physalaemus cuvieri* em um lago (Latitude: 27°43' 46,11" Sul; Longitude: 52°16' 54,40" Oeste), com menos de 24 horas de oviposição. Elas foram alocadas em sacos plásticos e levadas imediatamente para o laboratório de Ecologia e Conservação da UFFS - Campus Erechim, onde foram mantidas em aquários com capacidade para 15 litros, com solução FETAX, alimentação composta por alface orgânico e ração completa para peixe (Alcon Basic®), aeração constante e temperatura controlada. A criação dos girinos e ensaio ecotoxicológico foi realizada em solução FETAX, de acordo com protocolo laboratorial ASTM 1439-12 (Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus).

O ensaio toxicológico iniciou quando os girinos atingiram o estágio de desenvolvimento 25 (de acordo com GOSNER, 1960). Os girinos foram colocados em recipientes de vidro com capacidade para 500ml, aeração constante, temperatura controlada, alimentação com ração completa para peixe (Alcon Basic®) e um fotoperíodo de 12-12 claro escuro. Cada recipiente recebeu 10 girinos, e o ensaio foi realizado em triplicata, ou seja, com três recipientes por concentração. O ensaio teve a duração de 14 dias, semi-estático, com trocas de água a cada 3 dias.

Para a comparação entre ingrediente ativo e formulação comercial de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) foi realizado um tratamento utilizando Pestanal® com 98,8% de pureza, dissolvido em Dimetilsulfóxido (DMSO), considerado IA e um tratamento com formulação U46 BR® com 670 g/L de equivalente ácido, 806 g/L de ácido 2,4- Diclorofenoxiacético (2,4-D) e 380,9 g/L de outros ingredientes (MAPA nº 01803), considerado FC. Para ambos os produtos foram testadas cinco concentrações de 2,4-D: 4, 30, 52,2, 75 e 100 µg/L. Também foram feitos dois controles, um apenas com solução FETAX e outro com a adição de 2 µg/L do solvente DMSO utilizado na preparação da solução estoque do ingrediente ativo.

A mortalidade dos girinos foi verificada e anotada diariamente, assim como a temperatura e oxigenação da água. No primeiro (dia 1) e último dia (dia 14) do ensaio todos os girinos foram medidos com relação ao comprimento total com a ajuda de um paquímetro digital (Jomarca) e pesados em balança analítica (UniBlock). A diferença entre os girinos do dia 1 e

dia 14 em cada ensaio foi considerado crescimento.

4 Resultados e Discussão

A mortalidade não foi significativa nos girinos expostos ao IA e FC. No tratamento IA ocorreu uma morte em 100 µg/L, e em FC, 14 mortes no total: 1 em 4 µg/L, 3 em 30 µg/L, 5 em 52,2 e 5 em 100 µg/L ($F(5,13) = 1,19$, $p = 0,32$). Não ocorreu mortalidade nos controles. Embora tenha sido baixa, 18 % dos expostos a FC não sobreviveram até o final do período de ensaio, o que leva a questionamentos sobre a formulação comercial e levanta a possibilidade de mais estudos sobre a sobrevivência desta espécie na exposição a 2,4-D.

As médias de comprimento total, massa e seus respectivos crescimentos em relação aos girinos do dia 1 e dia 14 estão apresentados na tabela 1. Os girinos expostos a IA e FC de 2,4-D não apresentaram diferenças entre comprimento e massa no dia 14. Apesar das medidas variarem entre o controle e girinos expostos, não foi suficiente para uma diferença estatística entre elas. Quando o crescimento dos 14 dias de ensaio foi analisado (diferença entre dia 1 e dia 14), foi possível verificar que os girinos em contato com concentrações entre 30 e 100 µg/L de FC cresceram menos que os em IA. Essa diminuição de tamanho pode ser uma resposta ao estresse causado pela substância química. Como foi demonstrado por Samojeden et al. (2022), *P. cuvieri* pode ter alteração de tamanho se exposto a agrotóxicos, como imidacloprido. O desenvolvimento reduzido dos girinos pode torná-los mais vulneráveis à predação em ambientes naturais, diminuindo taxas de sobrevivência (BEASLEY, 2020)

Tabela 1- Comprimento total(mm) e massa(g) dos girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações de 2,4-D: ingrediente ativo (IA) e formulação comercial (FC). A coluna crescimento considera a porcentagem de aumento do comprimento (mm) em relação aos girinos do primeiro dia do ensaio, que foi de $9,49 \pm 1,13$ mm, e aumento da massa (g), que no início foi de $0,017 \pm 0,01$ g (média \pm desvio padrão).

Tratamento	Concentração	Comprimento Total (CT)	Crescimento CT (%)	Massa g	Crescimento massa (%)
Controle	Controle	$16,95 \pm 1,52$	78,64	$0,054 \pm 0,02$	210,92
	Controle DMSO	$17,10 \pm 4,28$	80,22	$0,056 \pm 0,03$	222,99
	4	$18,92 \pm 2,32$	99,49	$0,069 \pm 0,03$	298,05
	30	$17,41 \pm 4,61$	83,54	$0,065 \pm 0,04$	270,69

IA	52,2	15,98±2,54	68,44	0,040±0,02	131,61
	75	17,51±3,62	84,56	0,050±0,03	189,66
	100	16,90±1,92	78,17	0,043±0,02	148,85
	4	17,65±1,42	86,08	0,060±0,02	244,25
	30	15,19±3,00	60,17	0,050±0,02	185,06
FC	4	17,65±1,42	86,08	0,060±0,02	244,25
	30	15,19±3,00	60,17	0,050±0,02	185,06
	52,2	15,99±3,76	68,57	0,043±0,03	147,70
FC	75	16,24±3,32	71,23	0,044±0,03	152,87
	100	16,13±2,69	70,02	0,045±0,03	159,20

Fonte: Autor, 2023

No estudo de Pavan et al. (2021) concentrações semelhantes de 2,4-D misturadas com glifosato também não causaram mortalidade, mas reduziram o comprimento e massa de girinos de *Leptodactylus latrans*.

5 Conclusão

O IA e FC testados no presente estudo não causaram mortalidade significativa, mas podem interferir no crescimento dos girinos de *P. cuvieri*. Ainda são necessários mais estudos para confirmar a diferença na toxicidade entre o IA e a FC de 2,4-D, mas existem indícios demonstrando maiores efeitos da substância formulada em relação ao produto puro. Recomendamos mais estudos com outras formulações comerciais e espécies para compreender melhor a toxicidade desse e de outros herbicidas na fauna silvestre.

Referências Bibliográficas

ASTM, **Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX)**, E 1439, 1991, disponível em: <https://semspub.epa.gov/work/01/464936.pdf>
BRASIL, Ministério do Meio Ambiente, **PORTARIA MMA Nº 148, DE 7 DE JUNHO DE 2022**. Disponível em: [P_mma_148_2022_altera_anexos_P_mma_443_444_445_2014_atualiza_especies_ameacadas_extincao.pdf](https://www.ambiente.gov.br/images/Portaria_MMA_148_2022_altera_anexos_P_mma_443_444_445_2014_atualiza_especies_ameacadas_extincao.pdf) (icmbio.gov.br) Acesso em: 27/08/2023

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, 2021.
DOS SANTOS, G, et al, **EFEITOS SUBLETAIS DA FORMULAÇÃO COMERCIAL DO HERBICIDA 2,4-D EM *Physalaemus cuvieri* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)**, 2020, Dissertação de mestrado - Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, RS, 2020

NSIBANDE, S. A.; FORBES, P. B. C. Fluorescence detection of pesticides using quantum dot materials—a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 945, p. 9-22, 2016.

FREITAS, S. et al. Effects of 2,4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 182, p. p. 109446, 2019.

FROST, D. R. 2023. Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 6.2 (Date of access). American Museum of Natural History, New York, USA. DOI: doi.org/10.5531/db.vz.0001.

Disponível em: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. Acesso em: 26 de agosto de 2023

GOSNER. KL, A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification, **Herpetológica**, V. 16, p. 183-190, 09/1960

IBAMA, IB do MA, **Os 10 ingredientes ativos mais vendidos - 2017 - Consolidação de dados fornecidos por empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins**, conforme art. 41 do Decreto nº 4.074/2002, disponível em: https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/arquivos/qualidadeambiental/relatorios/2020/Os_10_IAs_vendidos_2020.xls, acesso em: 27/08/2023, 2018

PAVAN, F. A. et al. Morphological, behavioral and genotoxic effects of glyphosate and 2,4-D mixture in tadpoles of two native species of South American amphibians. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 85, p. 1-11, 2021.

SAMOJEDEN, C. G. et al. Toxicity and genotoxicity of imidacloprid in the tadpoles of *Leptodactylus luctator* and *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae). **Scientific Reports**, v. 12, p. 11926, 2022.

SEGALLA, M.V. et al. List of Brazilian amphibians. **Herpetologia Brasileira**, v. 10, p. 121-216, 2021

ZUANAZZI. N. et al. Analysis of global trends and gaps for studies about 2,4-D herbicide toxicity: A scientometric review, **Chemosphere** v. 241 p. 2-11, 2020

Palavras-chave: Ecotoxicologia, sobrevivência, , herbicida

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2022-0319

Financiamento: FAPERGS