

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CÂMPUS DOIS VIZINHOS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - LICENCIATURA

TAINÁ DOS SANTOS

**DEFORMIDADES MORFOLÓGICAS NA FASE EMBRIO-LARVAL DE  
*Rhamdia quelen* (TELEOSTEI) SUBMETIDOS AO HERBICIDA 2,4-D E  
AO EXTRATO BOTÂNICO DE MAMONA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS

2021

TAINÁ DOS SANTOS

**DEFORMIDADES MORFOLÓGICAS NA FASE EMBRIO-LARVAL DE  
*Rhamdia quelen* (TELEOSTEI) SUBMETIDOS AO HERBICIDA 2,4-D E  
AO EXTRATO BOTÂNICO DE MAMONA**

**Morphological deformities on the embryo-larval phase of *Rhamdia quelen*  
(Teleostei) submitted to 2,4-D herbicide and castor bean extract**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentada como requisito para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas – Licenciatura da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Elton Celton de Oliveira.  
Coorientadora: Mr. Ana Paula da Silva.



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

---

## TERMO DE APROVAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso nº \_\_

**Deformidades morfológicas na fase embrio-larval de *Rhamdia quelen* (Teleostei) submetidos ao herbicida 2,4-d e ao extrato botânico de mamona**

por

**TAINÁ DOS SANTOS**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado às 13 horas e 30 minutos do dia 24 de agosto de 2021, como requisito parcial para obtenção do título de biólogo (Curso Superior em Ciências Biológicas – Licenciatura, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos). O candidato foi arguido pela banca examinadora composta pelos membros abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho **APROVADO**.

---

Prof. Dra. Patrícia Franchi de Freitas  
UTFPR - DV

---

Prof. Dr. Elton Celton de Oliveira  
Orientador UTFPR - DV

---

M.e Thaís Maylin Sobjak  
UFMG

---

Prof. Dra. Daniela Aparecida Estevan  
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas  
UTFPR - DV

**“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”**

---

Dedico este trabalho a Deus.

## **AGRADECIMENTOS**

Faço um agradecimento especial para Deus, que com sua infinita bondade, sempre me deu o suporte necessário para que eu conseguisse atingir meus objetivos.

Agradeço a minha mãe Itchanara da Silva dos Santos, pelo companheirismo, pelo apoio inenarrável e pela grande segurança que me passou durante toda a minha vida, principalmente agora, pois isso faz com que eu lute para conseguir conquistar o que eu realmente quero. Sou grata ao meu pai Luiza Plácido dos Santos e ao meu irmão Lucas Plácido dos Santos por estarem sempre me incentivando.

Agradeço também ao Francisco Edvaldo de Oliveira Junior, pelas conversas e segurança que sempre me proporcionou pois isso foi de grande significância para mim, agradeço também a toda a sua família.

Sou grata ao meu orientador Elton Celton de Oliveira, por ter agregado tanto conhecimento, pelos puxões de orelha, pelas críticas construtivas e também por me permitir participar de um grupo de pesquisa (ECOTOXIGEN) onde as pessoas se esforçam e se dedicam tanto, pois neste grupo consegui adquirir muito conhecimento e tive contato com pessoas maravilhosas, não vou citar nomes porque são muitas pessoas, mais sou grata a todos.

Agradeço também a minha co-orientadora Ana Paula da Silva, principalmente pela paciência de estar sempre ali me ajudando quando necessário, e sou grata pelas suas correções e coorientação.

Sou grata as professoras Patrícia Franchi Freitas e a Thaís Maylin Sobjak, por aceitarem participar da minha banca do TCC, e também a Marina Wust Vasconcelos por aceitar ser minha suplente, sei que todas terão muito para agregar neste trabalho e possuem grande conhecimento da área.

Agradeço também a todas as pessoas, que diretamente ou indiretamente me ajudaram. Vocês realmente fizeram a diferença, como já havia comentado, não vou citar nomes, pois são muitas pessoas.

“Tudo posso naquele que me fortalece”

Felipenses 4:13

## RESUMO

SANTOS, Tainá dos. **DEFORMIDADES MORFOLÓGICAS NA FASE EMBRIO-LARVAL DE *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI) SUBMETIDOS AO HERBICIDA 2,4-D E AO EXTRATO BOTÂNICO DE MAMONA** 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2021.

A utilização indiscriminada de agrotóxicos para combater ervas-daninhas e outras pragas agrícolas elevou os impactos negativos ao meio ambiente e aos organismos não-alvos. Visando minimizar os efeitos causados, pesquisadores têm se dedicado ao estudo de produtos naturais como um método alternativo para o controle de pragas, com o desenvolvimento de extratos vegetais. Contudo, se faz necessário avaliar não apenas os produtos químicos sintéticos, mas também a biossegurança de produtos alternativos em organismos não-alvos, sendo as fases iniciais de desenvolvimento uma excelente estratégia. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as deformidades morfológicas na fase embrio-larval de *Rhamdia quelen* submetidas a baixas concentrações do herbicida sintético 2,4-D e de extrato botânico de mamona. Os ovos fertilizados foram adquiridos de uma piscicultura comercial e expostos às substâncias-testes por 48 e 96 hpf (horas pós fertilização). Para os bioensaios, o extrato botânico de mamona foi diluído em dimetilsulfóxido (1,0%) e posteriormente em água reconstituída, nas concentrações de 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3,12% da CL<sub>50</sub> (1,0 µg/L, 0,5µg/L, 0,25µg/L, 0,125 µg/L, 0,062 µg/L e 0,031 µg/L) determinada previamente para o organismo-alvo *Chrysodexis includens* (lagarta do soja) e controles negativo e veículo. O herbicida 2,4-D foi preparado nas concentrações de 0, 15, 30 e 60 µg/L em água reconstituída. Ambos os experimentos foram realizados em microplacas, com temperatura e pH controlados e com troca de água a cada 24 horas. Os animais foram anestesiados e submetidos a eutanásia com eugenol. Após cada tempo amostral foi realizada a análise quali e quantitativa das deformidades morfológicas nas larvas da espécie. As deformidades foram classificadas quanto à categoria e os tipos de danos axiais, nas nadadeiras, craniofaciais e torácico-abdominais e posteriormente analisada a frequência de indivíduos com e sem danos pelo teste do qui-quadrado. Com base nos resultados adquiridos foi possível verificar que o herbicida 2,4-D e o extrato botânico induziram alterações na morfologia das larvas, principalmente axiais e nas nadadeiras para o 2,4-D e craniofaciais para o extrato botânico. Sabe-se que estas alterações podem prejudicar a sobrevivência em longo prazo, e também na perpetuação da espécie.

**Palavras-chave:** inseticida natural, efeitos subletais, morfologia, bioensaio, peixes.

## ABSTRACT

SANTOS, Tainá dos. **MORPHOLOGICAL DEFORMITIES ON THE EMBRYO-LARVAL PHASE OF *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI) SUBMITTED TO 2,4-D HERBICIDE AND CASTOR BEAN EXTRACT.** 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2021.

The indiscriminate use of pesticides to combat weeds and other agricultural pests has increased negative impacts on the environment and non-target organisms. Aiming to minimize the effects caused, researchers have dedicated themselves to study natural products as an alternative method for pest control, with the development of plant extracts. However, it is necessary to evaluate not only synthetic chemical products but also the biosafety of alternative products in non-target organisms, being the initial stages of development an excellent strategy. Therefore, the objective of this work was to characterize the morphological deformities in the embryo-larval stage of *Rhamdia quelen* submitted to low concentrations of the synthetic herbicide 2,4-D and the botanical extract of castor bean. Fertilized eggs were purchased from a commercial fish farm and exposed to test substances for 48 and 96 hpf (hours after fertilization). For the bioassays, the botanical castor bean extract was diluted in dimethylsulfoxide (1.0%) and later in reconstituted water, at concentrations of 50%, 25%, 12.5%, 6.25% and 3.12% of the LC50 previously determined for the target organism *Chrysodexis includens* (soybean caterpillar) and negative and vehicle controls. The 2,4-D herbicide was prepared at concentrations of 0, 15, 30 and 60 µg/L in reconstituted water. Both experiments were carried out on microplates, with controlled temperature and pH and with water change every 24 hours. Animals were anesthetized and sacrificed with eugenol. After each sampling time, the qualitative and quantitative analysis of the morphological deformities in the larvae of the species was performed. Deformities were classified according to the category and types of axial, fin, craniofacial and thoracic-abdominal damage, and the frequency of individuals with and without damage was subsequently analyzed using the chi-square test. Based on the results obtained, it was possible to verify that the 2,4-D herbicide and the botanical extract induced changes in the morphology of the larvae, mainly axial and fin for 2,4-D and craniofacial for the botanical extract. It is known that these changes can impair long-term survival, and also the perpetuation of the species.

**Key-words:** natural insecticide, sublethal effects, morphology, bioassay, fish.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1– A) Exemplar adulto da espécie *Rhamdia quelen*; B) Ovos fertilizados obtidos na piscicultura comercial de Toledo-PR; C) Ovos viáveis, destacados no círculo azul, e ovos não fecundados no círculo vermelho. .... 20

Figura 2 – A) Microplacas de 24 poços e 96 poços; B) Troca de substâncias com o auxílio de microcicapetas monocanal de 100-1000 $\mu$ l; C) Troca de substâncias com o auxílio de microcicapetas multicanal de 200 $\mu$ l; D) Câmara BOD à 24°C ..... 21

Figura 3 – Esteromicroscópio trinocular acoplado ao sistema de armazenamento de dados. ...24

Figura 4– Fotomicrografias dos embriões/larvas de *R. quelen* expostos ao herbicida 2,4-D. (A) Indivíduo normal, exposição de 48 hpf; (B) Indivíduo normal, 96 hpf, (C) Indivíduo com dano axial – seta vermelha (escoliose – torção na coluna vertebral), exposição de 48 hpf; (D) Indivíduo com dano axial - seta vermelha (escoliose), exposição de 96 hpf. – (E) Indivíduo com nadadeira bifurcada – estrela vermelha em 48 hpf; (F) Indivíduo com dano na nadadeira – estrela vermelha, em 96 hpf; – (G) Indivíduo com ausência dos olhos e malformação facial – círculo vermelho, 48 hpf; (H) Indivíduo com redução dos barbilhões e edema pericárdico – círculo vermelho, 96 hpf; (I) Indivíduo com edema pericárdico – triângulo vermelho, em 48 hpf; (J) Indivíduo com edema pericárdico triângulo vermelho, em 96 hpf. .... 25

Figura 5– Fotomicrografias dos embriões/larvas de *R. quelen* expostos ao extrato botânico de mamona. (A) Indivíduo normal, exposição de 48 hpf; (B) Indivíduo normal, 96 hpf, (C) Indivíduo com dano axial – seta vermelha (escoliose – torção na coluna vertebral), exposição de 48 hpf; (D) Indivíduo com dano axial - seta vermelha (escoliose), edema pericárdico - triângulo vermelho, redução dos olhos e malformação facial – círculo vermelho, exposição de 96 hpf. – (E) Indivíduo com dano axial - seta vermelha (coluna vertebral reduzida), exposição de 48 hpf; (F) Indivíduo com dano axial - seta vermelha (coluna vertebral reduzida), exposição de 96 hpf (G) Indivíduo com redução dos olhos– círculo vermelho, – círculo vermelho, em 48 hpf; (H) Indivíduo com redução dos barbilhões– círculo vermelho, e com dano na nadadeira – estrela vermelha, em 96 hpf. .... 29

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Frequência absoluta de embriões/larvas de *R. quelen* com e sem deformidades morfológicas após serem submetidos ao herbicida 2,4-D por 48 hpf. (A) Categoria axial; (B) Categoria danos nas nadadeiras; (C) Categoria craniofacial; (D) Categoria torácico-abdomem. ....26
- Gráfico 2– Frequência absoluta de embriões/larvas de *R. quelen* com e sem deformidades morfológicas após serem submetidos ao herbicida 2,4-D por 96 hpf. (A) Categoria axial; (B) Categoria danos nas nadadeiras; (C) Categoria craniofacial; (D) Categoria torácico-abdominal. ....27
- Gráfico 3– Frequência absoluta de embriões/larvas de *R. quelen* com e sem deformidades morfológicas após serem submetidos ao Extrato botânico de Mamona por 48 hpf. (A) Danos Axiais; (B) Danos nas Nadadeiras; (C) Danos Crânio-Facial; (D) Danos Tórácico-abdominal. ....30
- Gráfico 4– Frequência absoluta de embriões/larvas de *R. quelen* com e sem deformidades morfológicas após serem submetidos ao Extrato botânico de Mamona por 96 hpf. (A) Danos Axiais; (B) Danos nas Nadadeiras; (C) Danos Crânio-Facial; (D) Danos Tórácico-abdominal. ....32

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	14
2.1 OBJETIVO GERAL .....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
3.1 AGROQUÍMICOS E CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA .....	15
3.1.1 Herbicida ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) .....	16
3.1.2 Extrato vegetal .....	17
3.2 SUSTENTABILIDADE E BIOSSEGURANÇA .....	17
3.3 TESTES COM EMBRIÕES E LARVAS DE PEIXES .....	18
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	20
4.1 OBTENÇÃO DE OVOS E MANIPULAÇÃO EM LABORATÓRIO .....	20
4.2 EXPOSIÇÃO DOS EMBRIÕES ÀS SUBSTÂNCIAS TESTES .....	22
4.2.1 Herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) .....	22
4.2.2 Extrato botânico de mamona .....	22
4.3 PARÂMETROS DE ANÁLISE .....	23
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	25
5.1 Herbicida 2,4 -D .....	25
5.2 Extrato botânico .....	29
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	35
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	36
<b>ANEXO A</b> – .....	40
<b>ANEXO B</b> – .....	41

## 1. INTRODUÇÃO

Os primeiros agrotóxicos foram desenvolvidos logo após a primeira guerra mundial, mas sua comercialização em larga escala somente teve início após a segunda grande guerra, na década de 40 (TERRA, 2008). De lá para cá, uma série de princípios ativos com diferentes formulações foram desenvolvidos, de modo a subsidiar uma crescente produtividade nas lavouras, mediada pela diminuição da competitividade de plantas daninhas através do uso de herbicidas, do ataque de insetos-praga a partir da aplicação de inseticidas e redução no parasitismo de fungos via pulverização de fungicidas (MARTINS, 2013).

Este ciclo de utilização de produtos químicos sintéticos aliados a práticas adequadas de manejo de culturas e ao melhoramento de sementes levou o Brasil da década de 60 a chamada “Revolução Verde” (TAVELLA et al., 2011). Estas práticas permitiram um amplo aumento da agricultura no país, sendo essa uma das principais atividades econômicas até os dias atuais. Por outro lado, esse cenário elevou abruptamente a utilização de agrotóxicos nas lavouras, trazendo uma grande preocupação com os potenciais efeitos danosos à organismos não-alvos, visto que o Brasil é considerado por muitos o país detentor da maior biodiversidade mundial (LOPES, ALBUQUERQUE, 2018).

Atualmente, o Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos no mundo e, segundo Viero et al. (2016), a utilização desenfreada destes produtos está desencadeando diversos problemas ambientais e relacionados à saúde pública. Há diversos casos documentados na literatura sobre efeitos danosos de herbicidas, inseticidas e fungicidas à organismos não-alvos, potencializando o aumento da mortalidade (ROSA et al., 2010), as alterações de comportamento (BRASIL, 2018), danos geno e citotóxicos (CAVALCANTE, 2008, TUREK et al, 2000), entre outros. Nesse sentido, também há diversos relatos sobre o impacto desses produtos na saúde do homem, causando aumento na taxa de neoplasias (LOPES, ALBUQUERQUE, 2018), doenças motoras (POWERS et al., 2011), patologias em órgãos vitais e até a morte (LANGIANO, 2006).

A biota aquática é uma das mais afetadas pela contaminação, que pode ser direta ou indireta. A contaminação direta geralmente ocorre por pulverização acidental ou intencional em rios e riachos ou lagos. A contaminação indireta se dá pela chuva, com o transporte ocorrendo por escoamento superficial ou por percolação e infiltração através do solo, que pode alcançar os lençóis freáticos (COOPER, 1993). Um dos agentes contaminantes que será abordado neste trabalho é o herbicida 2,4-D (Ácido Diclorofenoxiacético).

O 2,4-D foi implantado no Brasil em meados do ano de 1946 (FARAH et al., 2004). Este herbicida possui ação hormonal que inibe o crescimento de ervas daninhas. É bastante utilizado em culturas como o milho, trigo e soja (ANVISA, 2019) e devido a pouca resistência das pragas agrícolas tem aumentado consideravelmente o seu uso, sendo o segundo produto agrônômico mais comercializado no Brasil (IPEA, 2019). Entretanto este composto não atinge somente as espécies-alvo, mas também atinge os organismos não-alvo e isso inclui diversas espécies de invertebrados e vertebrados. Com o intuito de minimizar os efeitos causados por estes agentes sintéticos, pesquisadores buscam controles alternativos.

Os extratos vegetais estão sendo utilizados como controles alternativos, devido ao seu maior potencial de sustentabilidade (LUZ, 2007). Estes extratos têm como objetivo diminuir os custos e serem menos agressivos em relação a meio ambiente, preservando também os alimentos e a saúde de animais e do homem (KÉITA et al, 2001; ROEL, 2001). Contudo, para tal, é necessário investigar a interação desses novos extratos com os organismos, para estabelecer os protocolos corretos e adequados de manejo, visando os melhores resultados com ganho na preservação.

Neste sentido, os bioensaios são ferramentas de grande importância para avaliar a relação de causa e efeito entre o organismo utilizado e a substância que será testada, com o intuito de mensurar os efeitos (BEEBY, 2001). Os peixes se enquadram como um dos grupos taxonômicos mais utilizados em bioensaios, devido a sua fácil adaptação ao ambiente controlado, grande abundância, identificação relativamente fácil e segura e devido ao padrão de respostas fisiológicas apresentar elevada similaridade aos demais vertebrados (IPEA, 2019).

A espécie utilizada neste trabalho foi o jundiá *Rhamdia quelen*, que pertence à família Heptapteridae e a ordem dos Siluriformes (GOMES et al., 2000). Trata-se de um peixe nativo do Brasil, encontrado principalmente em água doce, e são adaptados a regiões de baixa temperatura, encontrados no sul do Brasil (BARCELLOS et al, 2001). A maior sensibilidade de embriões/larvas de peixes está atrelada ao seu processo de desenvolvimento, apresentando um sistema imune inicial, metabolismo intenso com grande atividade mitótica, órgão detoxificador (fígado) em formação e outros sistemas precoces (FÉNERO, 2015), sendo considerado um importante indicador de efeito.

Com base neste cenário, pressupõe-se que produtos potencialmente tóxicos possam causar disfunções ou malformações morfológicas na fase embrio-larval destes peixes, causando-lhes deformidades (efeitos teratológicos) (BRITO et al., 2018). O objetivo desse trabalho foi caracterizar as deformidades morfológicas em embriões/larvas de *R. quelen*

submetidas à exposição a um produto sintético (herbicida 2,4-D) e a um produto natural (extrato botânico de mamona – potencial inseticida).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma caracterização das alterações morfológicas na fase embrio-larval de *R. quelen* submetidas à baixas concentrações do herbicida 2,4-D e do extrato botânico de mamona (*Ricinus communis*) para determinar os possíveis efeitos tóxicos

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as possíveis deformidades morfológicas na fase embrio-larval exposta aos dois produtos teste;
- Quantificar a frequência e a severidade das deformidades para ambos os produtos;
- Avaliar se há relação entre a frequência e o grau de severidade com as substâncias-teste e suas concentrações.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 AGROQUÍMICOS E CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA

A indústria agroquímica teve seu surgimento a partir da primeira guerra mundial, com isso algumas empresas resolveram utilizar moléculas químicas que supostamente foram desenvolvidas para fins bélicos na produção de substâncias que auxiliassem no desenvolvimento da produção agrícola, produtos por sua vez denominados agrotóxicos. Em meados de 1940, as primeiras empresas agroquímicas foram alocadas no Brasil (TERRA, 2008).

Estes agroquímicos são compostos agrícolas que tem como função eliminar pragas presentes na agricultura, sendo estes subdivididos em herbicidas (controle de plantas daninhas), inseticidas (controle de insetos invasores) e fungicidas (controlam os fungos), acaricidas (controle de ácaros) e formicidas (controle formigas) (EMBRAPA, 2018). Embora esses compostos tenham funções bastante específicas, acabam atingindo e interagindo não apenas com as espécies alvo, mas também com àquelas ditas não-alvo.

A partir da década de 60, os agrotóxicos ganharam força no Brasil ajudando a promover a chamada “Revolução Verde”. Desde então a utilização indiscriminada destes produtos só se intensificou (TAVELLA et al., 2011). A indústria agroquímica se apoia diretamente em novos princípios ativos ou formulações químicas ou cultivares resistentes para manter a produtividade. A título de exemplo, recentemente a indústria desenvolveu cultivares resistentes ao herbicida 2,4-D, intensificando a sua utilização no campo (MONQUERO, 2005). De acordo com Viero et al. (2016), esta utilização demasiada de agrotóxicos afeta não somente os agricultores que o manuseiam, mas também a biodiversidade que está exposta, incluindo principalmente a do ambiente aquático.

Neste sentido, Arias et al. (2007) ressaltaram que a biota aquática está bastante exposta a uma grande quantidade de substâncias tóxicas que são descartadas na água, tendo em vista que os principais contaminantes são de origem agrícola. A água por sua vez é um importante recurso que ocupa aproximadamente três quartos da superfície terrestre, onde apenas 2,87% são água doce, e apenas 0,63% desta está presente em rios e lagos (BENEDETTI, 2013).

Apesar da pequena porcentagem de água doce fluvio-lacustre, estes ambientes são bastante afetados por resíduos agrícolas, sendo principalmente fertilizantes (elevada carga de metais) ou agroquímicos (grande diversidade de produtos). Estes resíduos chegam a rios e lagos através de irrigações, chuvas, ou até mesmo lixiviações do solo podendo atingir os lençóis



freáticos (COOPER 1993). Neste sentido, existem os produtos sintéticos, como o 2,4-D, que são bastante utilizados nas lavouras, tornando-se grandes agentes poluidores das águas continentais e que precisam ser investigados sob o aspecto toxicológico.

### 3.1.1 Herbicida ácido diclorofenoxiacético (2,4-D)

O 2,4-D é um herbicida que foi alocado no comércio durante o ano de 1946, este tem como função destruir as plantas daninhas que prejudicam as plantações de trigo, milho e até mesmo plantas de ambientes aquáticos. Entretanto este herbicida não atinge somente as suas espécies alvo, mas acaba contaminando todo o meio ao qual esse herbicida tenha contato (FARAH et al., 2004; VIGÁRIO; SABÓIA-MORAES, 2014).

O 2,4-D possui a seguinte fórmula molecular  $C_8H_6Cl_2O_3$ , que está dentro do grupo dos fenoxiacéticos e sua aplicabilidade está relacionada ao controle de dicotiledôneas de folhas largas (ANVISA, 2019). Segundo Bovin et al. (2005), o 2,4-D possui ação hormonal semelhante as auxinas naturais das plantas, responsáveis pelo seu crescimento. No entanto, em doses mais altas pode causar diversas anomalias às plantas, fazendo com que não consigam se desenvolver adequadamente.

Além disso, estudos demonstram que o 2,4-D tem potencial tóxico aos organismos não-alvos, causando-lhes alterações de comportamento, danos genéticos (CAVALCANTE, 2008; TUREK et al, 2000) e neoplasias (LOPES, ALBUQUERQUE, 2018), doenças motoras, patologias em órgãos vitais, podendo levar o indivíduo a morte (LANGIANO, 2006). Particularmente, as neoplasias (tumores) são definidas como proliferações descontroladas de células em um dado tecido, em geral com crescimento progressivo que pode levar o organismo a um quadro irreversível de saúde (INCA, 2011).

Segundo Nortox S/A (2018), o 2,4-D faz parte da classe toxicológica 1, indicando que este herbicida é extremamente tóxico e nocivo a saúde, isso foi determinado a partir de estudos realizados com animais em laboratórios. No Brasil, o documento da Anvisa de 2019, que categoriza a periculosidade do 2,4 D, alterou a classificação toxicológica do produto, tirando-o da Classe I para a Classe IV (menor toxicidade), seguindo na contramão das informações publicadas.

Visando minimizar a utilização de agroquímicos, pesquisadores procuram formas alternativas de controle biológico para diminuir os impactos ambientais decorrentes dos produtos sintéticos. Um dos produtos gerados a partir destes estudos são os extratos vegetais.

### 3.1.2 Extrato vegetal

Os extratos vegetais estão sendo utilizados com mais frequência em práticas agrícolas alternativas. Como existe uma grande diversidade de plantas, existe também uma grande diversidade de compostos que podem ser prospectados. Nestes extratos também são encontradas substâncias que repelem os insetos e com ações inseticidas como flavanóides, alcanóides, óleos essenciais, dentre outros que provêm do metabolismo secundário dos vegetais (LUZ, 2007).

Desta maneira, extratos vegetais podem ser utilizados tanto no cultivo da agricultura biológica (produtos orgânicos, que não utilizam produtos sintéticos), quanto no manejo de pragas no cultivo convencional. Os óleos essenciais de origem vegetal podem ser utilizados como método de controle alternativo, que reduz os custos e tende a ser menos agressivo com relação a natureza, preservando o ambiente e os alimentos, para que não exista a contaminação química derivada de agroquímicos (KÉITA et al., 2001; ROEL, 2001). A autora Pereira et al. (2008), por exemplo, realizou testes com óleo de *Glycine max* (soja) e obteve êxito na redução da oviposição e a emergência de *Callosobruchus maculatus* em grãos-de-bico, tornando-se então eficaz no controle desta praga e se destacou como um controle alternativo em programas de manejo integrados.

Neste sentido, o extrato botânico hidroalcoólico extraído da *Ricinus communis* (mamona), foi testado sobre *Chrysodeixis includens* (lagarta do soja) para avaliar o seu potencial efeito no controle desta espécie, que é uma das principais pragas na cultura de soja (WARMLING, 2018). A autora observou que o extrato de mamona foi eficiente, principalmente na sua fração hexânica, com efeitos letais e subletais sobre a lagarta (espécie-alvo).

A despeito dos resultados promissores observados na literatura, se faz necessário implementar um próximo passo, no intuito de investigar se estas substâncias têm potenciais efeitos toxicológicos em organismos não-alvos, buscando trabalhar com as questões de risco à saúde e ao meio ambiente.

## 3.2 SUSTENTABILIDADE E BIOSSEGURANÇA

A utilização de extratos vegetais pode ser uma maneira mais natural de combater as pragas e, assim, realizar um controle natural de determinadas espécies-alvo (SANTOS et al, 2013). Por ser um inseticida natural, por exemplo, subentende-se de forma empírica que o

extrato de *Ricinus communis*, descrito anteriormente, não irá causar problemas para o ambiente, substituindo com naturalidade os produtos sintéticos, que por sua vez causam grande parte da poluição de todo o meio ambiente, sendo ele aquático, terrestre ou até mesmo o ar (SARTORI et al, 2014).

Esta prerrogativa está alinhada aos princípios de sustentabilidade que funciona como uma via de mudança intencional, a qual é baseada em 3 pilares, sendo estes o pilar ambiental, o econômico e o social (ELKINGTON, 1994). Com o intuito de sanar estes três pilares, a utilização dos óleos essenciais visa ter uma redução da poluição e danos ambientais causados por produtos sintéticos, que acarretaria então em uma redução de custos e melhora da qualidade ambiental. Deste modo este produto natural adentraria na sociedade, substituindo os agroquímicos.

Contudo é importante realizar análises para verificar se estes produtos podem ou não se tornarem tóxicos e prejudicarem outros organismos não-alvos, ou até mesmo verificar se o ambiente vai conseguir degradar este produto ou se este vai se alastrar por cadeias tróficas acarretando em problemas futuros (PEREIRA, 2018). Neste sentido, Penna et al. (2010) afirma que a ecotoxicologia se tornou uma ferramenta de biossegurança, na qual são realizados estudos para averiguar a extensão dos efeitos que determinados produtos e/ou substâncias podem promover nos organismos e no funcionamento dos ecossistemas.

### 3.3 TESTES COM EMBRIÕES E LARVAS DE PEIXES

Os testes com embriões e larvas de peixes são de suma importância, pois identificar os danos ainda nas fases iniciais de desenvolvimento pode evidenciar problemas futuros, que sejam prejudiciais à propagação da espécie, fazendo com que esta não consiga obter sucesso em sua perpetuação. Isso pode ocorrer quando uma espécie apresenta alguma reação a determinado composto, podendo então estar afetando as gerações futuras. Nesse sentido Brito et al. (2018) afirmaram que os testes com embriões têm sido amplamente utilizados em pesquisas de ecotoxicologia.

Neste contexto existem pesquisadores como LIU et al 2018, que analisou o farmacocinético (TBBPA) tetrabromobisfenos, no estágio inicial do peixe zebra (zebrafish *Danio rerio*), com o intuito de descobrir se este fármaco poderia ser prejudicial para estes animais. Com os resultados os pesquisadores observaram a presença de anomalias como a formação de edemas, desnutrição e má-formações na coluna vertebral foram encontradas, com isso puderam concluir que a bioacumulação desta substancia foi moderada, mas que a variação

de concentrações, estava relacionada com a formação inicial dos embriões e se estes apresentariam deformidades ou não.

Já a pesquisadora Bernardi (2021), analisou a exposição de gametas, embriões e larvas de *Rhamdia quelen* que foram expostas ao ácido diclorofenoxiacético (2,4 -D) com o intuito de descobrir se este produto, que é um herbicida, poderia ser prejudicial para a produção de gametas e também para as fases iniciais de desenvolvimento da espécie, utilizando como parâmetro as deformidades morfológicas. Com os resultados a pesquisadora observou que ainda que em concentrações baixas essa substância pode atravessar a barreira do córion e entrar em contato com o meio intracelular do embrião, e revelou que o 2,4-D promove uma indução da quebra na fita do DNA de larvas de jundiá podendo acarretar então, presença de anomalias, tendo em vista que esse desequilíbrio intracelular e no DNA, podem vir a causar problemas na produção celular, e também gerar problemas relacionados as alterações cromossômicas.

Assim, verificou-se que as deformidades morfológicas são parâmetros muito eficientes e confiáveis para avaliar o potencial toxicológico de substâncias como herbicidas, sendo prático, barato e muito responsivo. Os resultados observados com estes parâmetros pressupõem o potencial risco ambiental para as espécies não-alvos e para a manutenção das suas populações naturais. Com base nestes exemplos é possível observar a grande utilização de embriões em estudos de toxicidade. Desta forma evidencia-se que trabalhar com estádios iniciais de desenvolvimento de peixes apresenta grande vantagem para as análises de toxicidade, visto que possuem maior sensibilidade à contaminantes.

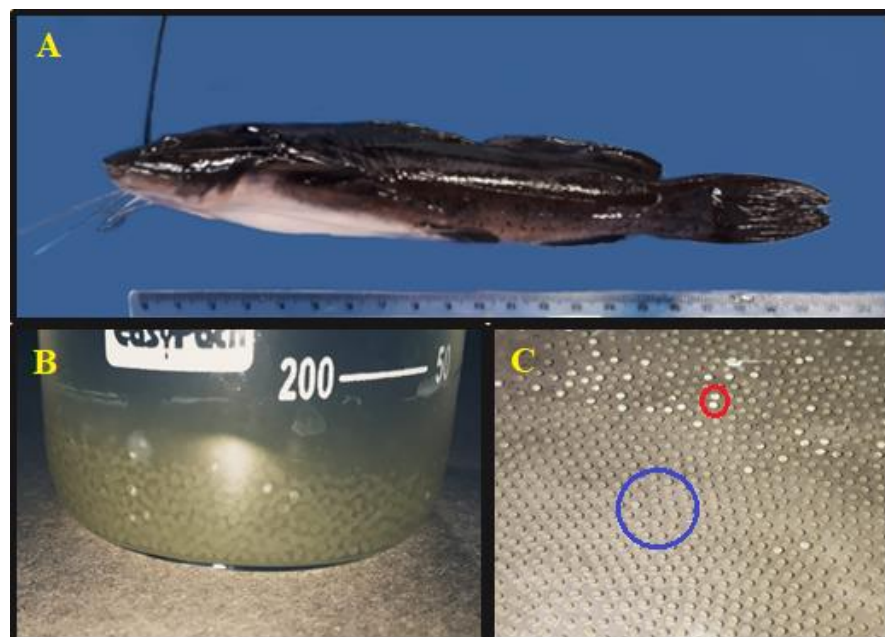
## 4. METODOLOGIA

### 4.1 OBTENÇÃO DE OVOS E MANIPULAÇÃO EM LABORATÓRIO

Os ovos da espécie *Rhamdia quelen* (Figura 1-A) foram obtidos da piscicultura da Universidade Estadual do Paraná, em União da Vitória-PR, para o experimento com o extrato botânico de mamona, e da piscicultura Akna de Toledo-PR para o experimento com o 2,4-D. Ambas pisciculturas realizaram inicialmente a indução da maturação das gônadas de matrizes parentais através de injeções intramusculares de extrato de hipófise de carpa.

Após este procedimento o material reprodutivo foi coletado e transportado até o Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, *campus* Dois vizinhos, onde foi realizada uma seleção criteriosa de ovos fertilizados e não fertilizado. Foi necessário utilizar um becker de 100ml (Figura 1-B) para apanhar os ovos e proceder a sua seleção, quanto a viabilidade. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, os ovos foram transferidos do recipiente e acomodados em placas de Petri. A classificação dos ovos viáveis ocorreu através do seu aspecto translúcido, que indica que está fertilizado e em embriogênese, enquanto que ovos com um aspecto esbranquiçado foram descartados (figura 1-C).

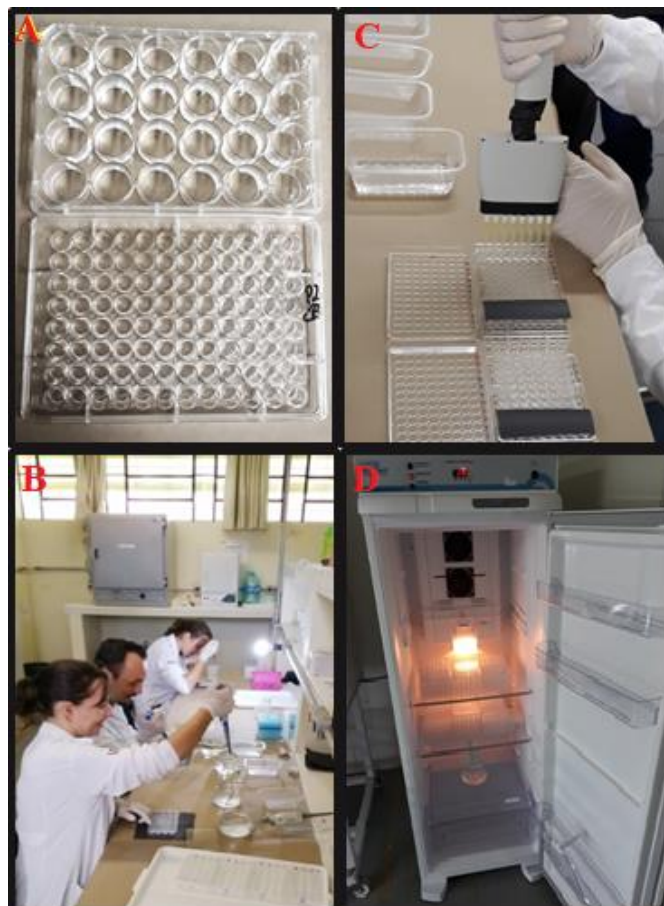
Figura 1– A) Exemplar adulto da espécie *Rhamdia quelen*; B) Ovos fertilizados obtidos na piscicultura comercial de Toledo-PR; C) Ovos viáveis, destacados no círculo azul, e ovos não fecundados no círculo vermelho.



Fonte: A autora (2020).

Após a seleção dos ovos, os fertilizados foram alocados nas microplacas de 24 ou 96 poços (Figura 2-A) contendo os tratamentos que serão descritos nas sessões posteriores. As soluções foram diluídas em água reconstituída, composta por uma mistura de Cloreto de Cálcio, Sulfato de Magnésio, Cloreto de Potássio e Bicarbonato de sódio, em água destilada. O pH da água reconstituída foi calibrado para 8,2 e a temperatura regulada em 24°C na BOD. É importante ressaltar que ocorreu renovação de 50% do líquido de cada tratamento a cada 24 horas, com o auxílio de uma micropipeta multicanal de 200µl (Experimento com extrato botânico de mamona – Figura 2-B) e micropipetas monocanal de 100-1000µl (Experimento com o herbicida 2,4-D – Figura 2-C). Após a renovação, as placas retornaram a câmara BOD a 24°C (Figura 2-D).

Figura 2 – A) Microplacas de 24 poços e 96 poços; B) Troca de substâncias com o auxílio de micropipetas monocanal de 100-1000µl; C) Troca de substâncias com o auxílio de micropipetas multicanal de 200µl; D) Câmara BOD à 24°C



Fonte: A autora (2020)

## 4.2 EXPOSIÇÃO DOS EMBRIÕES ÀS SUBSTÂNCIAS TESTES

### 4.2.1 Herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

A segunda etapa do trabalho também foi aprovada na Comissão de Ética no Uso de Animais da UTFPR, sob o protocolo é 2019-30 (Anexo B). Os ovos viáveis de *R. quelen* foram expostos ao herbicida 2,4-D, em sua formulação comercial. Neste experimento foi utilizada a formulação DMA 806 BR, a qual contempla 806 g/L do princípio ativo e pode ser diluído diretamente em água.

Para realização deste experimento foi realizado um cálculo para chegar ao valor desejado de 2,4-D, sendo utilizadas as concentrações de 15µg/L (CC1), 30µg/L (CC2) e 60µg/L de 2,4-D (CC3), tendo em vista que 30µg/L é a concentração máxima permitida na legislação para este herbicida na água para consumo humano (WHO, 2003; ICMBIO 2005) e em águas superficiais classe 3 (ICMBIO 2005). Um grupo controle negativo também foi implantado, sendo os embriões expostos somente a água reconstituída. Neste experimento com herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) foram utilizadas 10 réplicas por concentração e tempo de exposição, sendo que cada microplaca possuiu 24 poços e em cada poço foi alojado 1 ovo fecundado. O experimento foi conduzido ao longo de 96 hpf.

### 4.2.2 Extrato botânico de mamona

A primeira etapa deste trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UTFPR, cujo número do protocolo é 2019-05 (Anexo A). Para o experimento com a exposição dos ovos viáveis de jundiá (*Rhamdia quelen*) ao extrato vegetal de mamona, foi utilizada a água reconstituída acrescida do extrato vegetal de mamona diluído em solvente Dimetilsulfóxido (DMSO) a 1,0%.

As concentrações do extrato vegetal utilizadas neste experimento foram de 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3,12% da CL<sub>50</sub> determinada previamente para o organismo-alvo *Chrysodexis includens* (lagarta do soja) por Warmling (2018), que foi de 2% (v/v). Assim, a concentração nominal utilizada no experimento foi de 1,0 µg/L (CD1), 0,5µg/L (CD2), 0,25µg/L (CD3), 0,125 µg/L (CD4), 0,062 µg/L (CD5) e 0,031 µg/L (CD6) do extrato botânico bruto da mamona.

Além destas concentrações, foram utilizados dois grupos controles, sendo o primeiro apenas com água reconstituída e o segundo contendo a diluição de DMSO a 1,0% em água

reconstituída. Neste experimento com extrato de mamona foram utilizadas microplacas de 96 poços, as quais apresentam 12 colunas e 8 linhas de poços (1 ovo por poço). Cada tratamento ocupou três colunas de poços, sendo necessárias duas microplacas para compor uma réplica. Foram utilizadas cinco réplicas por grupo experimental para avaliar os efeitos teratológicos ao longo de um período de exposição de 96 horas pós-fertilização (hpf).

#### 4.3 PARÂMETROS DE ANÁLISE

O presente trabalho avaliou as deformidades morfológicas nas larvas de jundiá em 48 e 96 hpf (horas pós-fertilização). Os animais foram anestesiados e submetidos a eutanásia com eugenol e, em seguida, fixados com uma solução de formalina a 10%. A avaliação e categorização das deformidades foi baseada na metodologia descrita por Powers et al (2011). As anormalidades foram divididas nas seguintes categorias:

Categoria 1) Danos axiais: lordose, escoliose, cifose e torção na cauda;

Categoria 2) Danos às nadadeiras: lesões e atrofia;

Categoria 3) Crânio/facial: edema ocular, redução ou ausência dos olhos, malformação da boca, redução ou ausência de barbilhões, etc.;

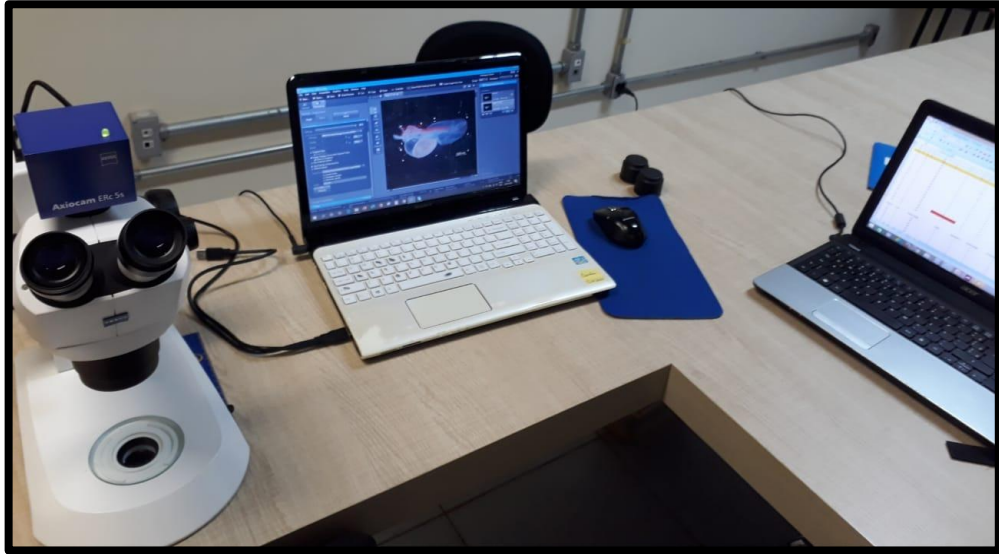
Categoria 4) Torácica/Abdominal: edema pericárdico, edema do saco vitelino e distensão abdominal e/ou emagrecimento.

Após identificar e classificar os danos nas quatro categorias supra descritas foi estimada a frequência dos indivíduos com e sem deformidades por categoria de dano, buscando comparar os diferentes tratamentos pelo teste do qui-quadrado. A análise foi realizada para cada experimento em separado, buscando verificar uma possível associação das deformidades com os grupos experimentais em cada tempo de exposição. O nível de significância adotado foi de 5%.

Para analisar as deformidades nas larvas foi necessário manipula-las em placas de Petri, com auxílio de pinças, pincéis e um fragmento de cartolina preta (fundo preto), para se obter uma melhor visualização dos indivíduos. As amostras foram analisadas através do esteromicroscópio binocular para visualizar as larvas e estimar a frequência de danos. Posteriormente foram registradas imagens das larvas com equipamento fotográfico acoplado ao esteromicroscópio trinocular (Figura 3).



Figura 3 – Esteromicroscópio trinocular acoplado ao sistema de armazenamento de dados.



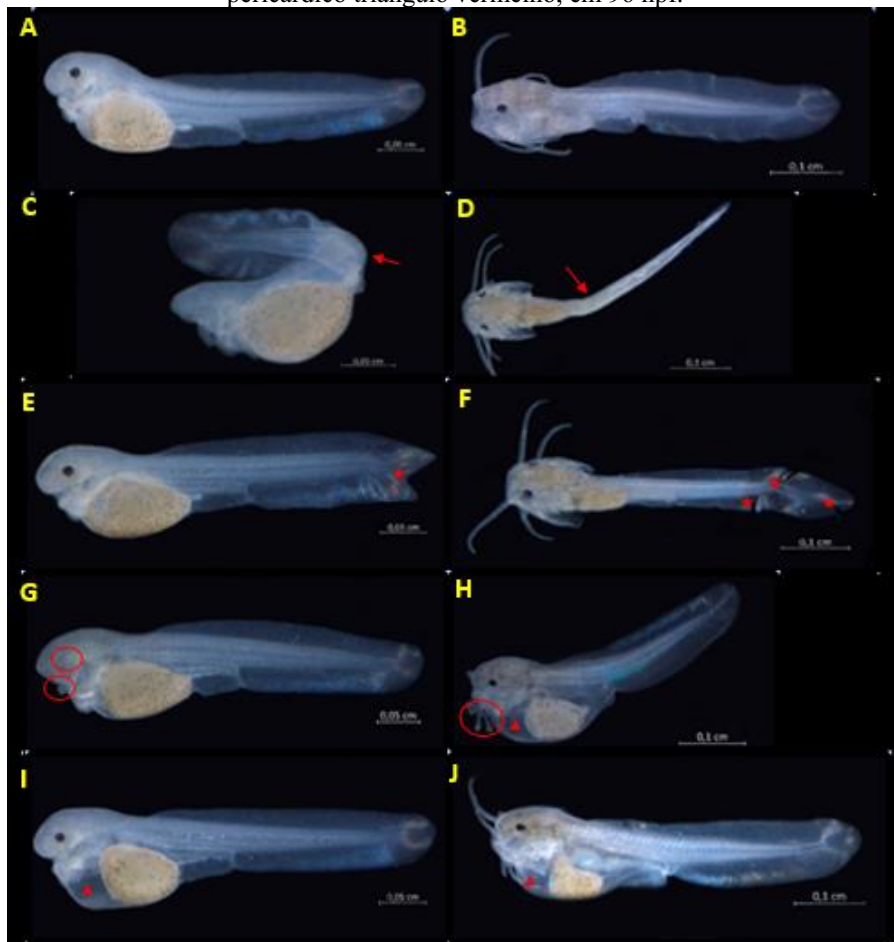
Fonte: A autora (2020)

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Herbicida 2,4 -D

Indivíduos sem deformidades morfológicas predominaram em 48 hpf, sendo observada apenas uma taxa basal de deformidades morfológicas nas quatro categorias propostas (axiais, nadadeiras, craniofaciais e torácico-abdominais). Os exemplares com 96 hpf tiveram um grande número de deformidades morfológicas pertencentes a todas as categorias de danos, sendo as principais: 1- Axiais: lordose, escoliose e torção da cauda; 2- Nadadeiras: bifurcadas e lesionadas; 3- Craniofaciais: ausência de olhos, malformação da boca ou dos barbilhões; 4- Torácico-abdominais: edema pericárdico e atrofia corporal (Figura 4).

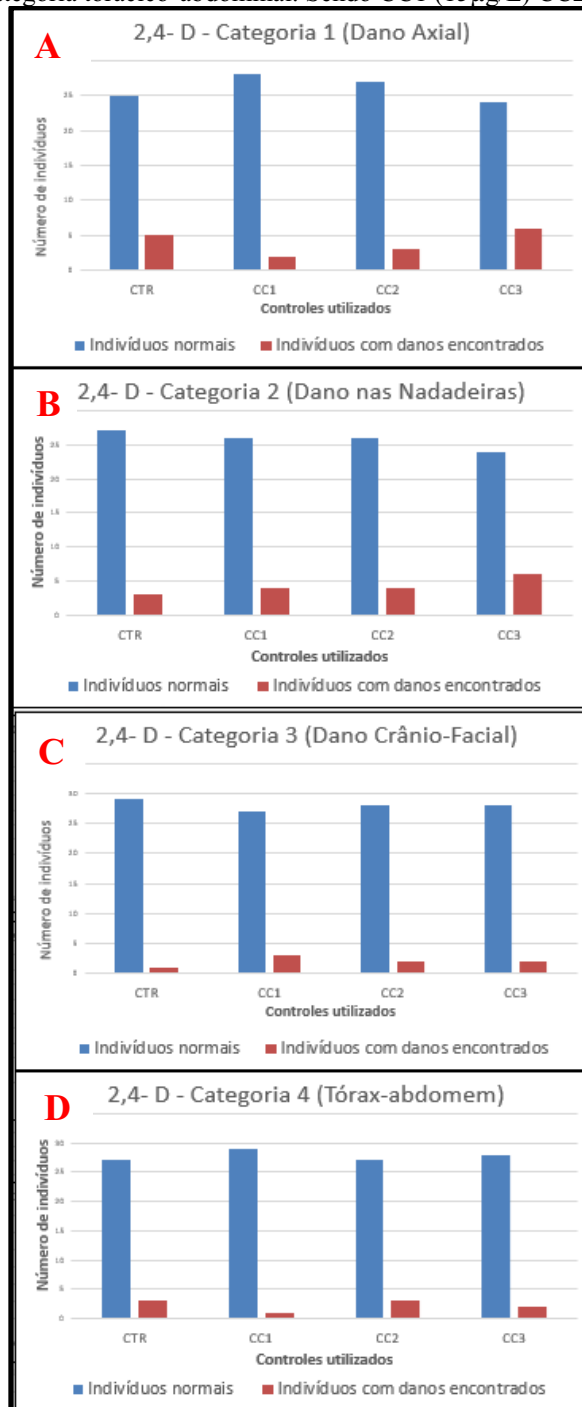
Figura 4– Fotomicrografias dos embriões/larvas de *R. quelen* expostos ao herbicida 2,4-D. (A) Indivíduo normal, exposição de 48 hpf; (B) Indivíduo normal, 96 hpf, (C) Indivíduo com dano axial – seta vermelha (escoliose – torção na coluna vertebral), exposição de 48 hpf; (D) Indivíduo com dano axial - seta vermelha (escoliose), exposição de 96 hpf. – (E) Indivíduo com nadadeira bifurcada – estrela vermelha em 48 hpf; (F) Indivíduo com dano na nadadeira – estrela vermelha, em 96 hpf; – (G) Indivíduo com ausência dos olhos e malformação facial – círculo vermelho, 48 hpf; (H) Indivíduo com redução dos barbilhões e edema pericárdico – círculo vermelho, 96 hpf; (I) Indivíduo com edema pericárdico – triângulo vermelho, em 48 hpf; (J) Indivíduo com edema pericárdico triângulo vermelho, em 96 hpf.



Fonte – A autora (2020).

A partir do teste estatístico do Qui-quadrado, verificou-se que a frequência de indivíduos com e sem danos foi similar entre os grupos tratados com o 2,4-D e o grupo controle no período de 48 hpf ( $\chi^2 = 6,31$ ;  $p > 0,05$ ) (Gráfico 1).

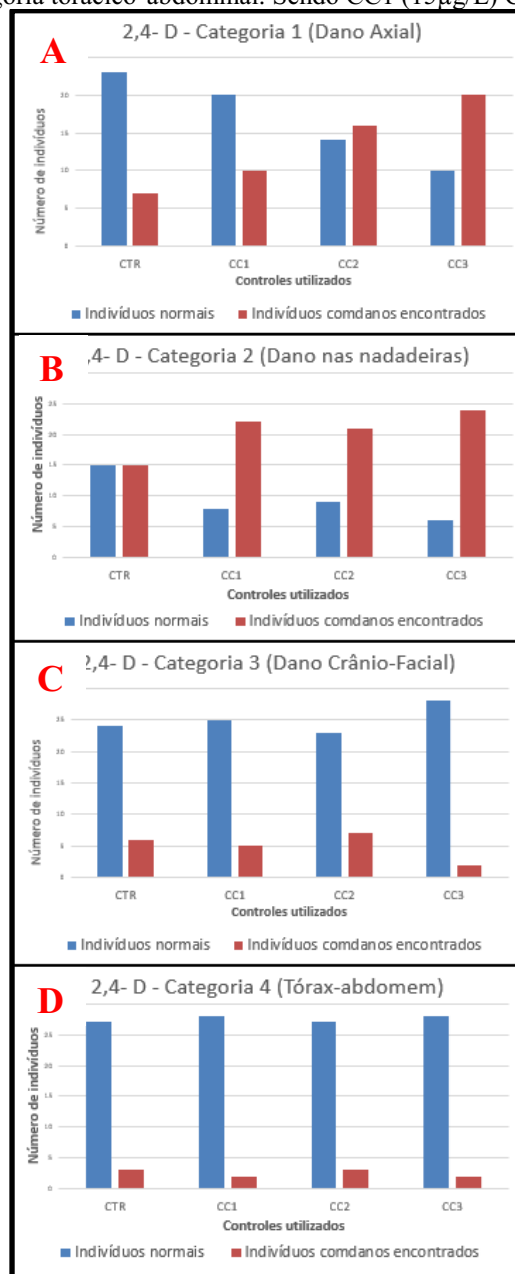
Gráfico 1 – Frequência absoluta de embriões/larvas de *R. quelen* com e sem deformidades morfológicas após serem submetidos ao herbicida 2,4-D por 48 hpf. (A) Categoria axial; (B) Categoria danos nas nadadeiras; (C) Categoria craniofacial; (D) Categoria torácico-abdominal. Sendo CC1 (15 $\mu$ g/L) CC2 (30 $\mu$ g/L) e CC3 (60 $\mu$ g/L).



Fonte – A autora (2020).

Já em 96 hpf, verificou-se um significativo aumento na frequência de indivíduos com danos axiais nas concentrações CC2 (30µg/L) e CC3 (60µg/L) ( $\chi^2 = 13,84$ ;  $p < 0,05$ ). Também, constatou-se um incremento significativo de indivíduos com danos às nadadeiras em todos os grupos tratados com o 2,4-D em comparação com o controle. A frequência de indivíduos com e sem deformidades nas categorias craniofacial e torácico-abdominal não diferiram entre os grupos tratados com o 2,4-D e o controle (Gráfico 2).

Gráfico 2– Frequência absoluta de embriões/larvas de *R. quelen* com e sem deformidades morfológicas após serem submetidos ao herbicida 2,4-D por 96 hpf. (A) Categoria axial; (B) Categoria danos nas nadadeiras; (C) Categoria craniofacial; (D) Categoria torácico-abdominal. Sendo CC1 (15µg/L) CC2 (30µg/L) e CC3 (60µg/L).



Fonte – A autora (2020).

Além disso, constatou-se 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 expressivo das deformidades morfológicas em 96 hpf, mas em menor frequência (cerca de 60%) e menos severas.

Esses resultados provavelmente não refletem com grande precisão o que se observaria em uma condição natural, visto que os animais foram alocados em microplacas e tiveram o seu desenvolvimento em condições ótimas, sem predadores ou parasitas, sem oscilações de temperatura e outros fatores abióticos que poderiam prejudica-los. Ademais, foram cultivados em concentrações muito baixas de 2,4-D, as quais inclusive são permissivas em diversas legislações ambientais. Mesmo assim, efeitos subletais foram observados no desenvolvimento dos exemplares, que podem acarretar em restrições para mobilidade, forrageamento e atividade reprodutiva, caso em ambiente natural.

Chingombe et al., 2006 afirmaram que este herbicida não é facilmente biodegradável e é possível encontra-lo com relativa frequência nos rios, córregos, lagos, no curso da água de forma geral. Afinal boa parte dos agricultores realizam o uso do 2,4-D nas lavouras. Quando vinculamos estas informações no presente trabalho, isso o torna mais preocupante, pois o número de indivíduos com anomalias encontradas foi bastante significativo, e isso pode acabar sendo bastante prejudicial para a espécie que está sendo estudada.

Os embriões de peixes possuem uma camada acelular, denominada córion, que é responsável por proteger o animal com relação a entrada e saída de substâncias, funcionando como uma barreira antes da sua eclosão (HENN, BRAUNBECK 2011; MANDLELL, et al 2012). O córion possui poros com diâmetros de 0,5 a 0,7  $\mu\text{m}$  (FERNANDES, PAUMGARTTEN, 2013) e pode ter reduzido o contato do 2,4-D nas primeiras 26 a 28 hpf, período em que a espécie *R. quelen* normalmente eclode, e minimizado as deformidades em 48 hpf, embora um trabalho recente com fases iniciais de peixes expostos ao 2,4-D tenha sugerido o contrário (BERNARDI, 2021).

O aumento da frequência de indivíduos com deformidades axiais e nas nadadeiras em 96 hpf sugere que com maior tempo de interação do animal com o herbicida 2,4-D promoveu disfunções biológicas importantes. Deste modo estas disfunções podem dificultar a sobrevivência destes animais, impossibilitando os mesmos de caçarem alimentos e também impossibilitando sua fuga dos predadores naturais devido à dificuldade que esses danos podem vir a acarretar em sua mobilidade.

Nesse sentido o presente trabalho mostrou que os efeitos teratológicos que foram observados, estão presentes até mesmo nas concentrações mais baixas do herbicida 2,4-D.

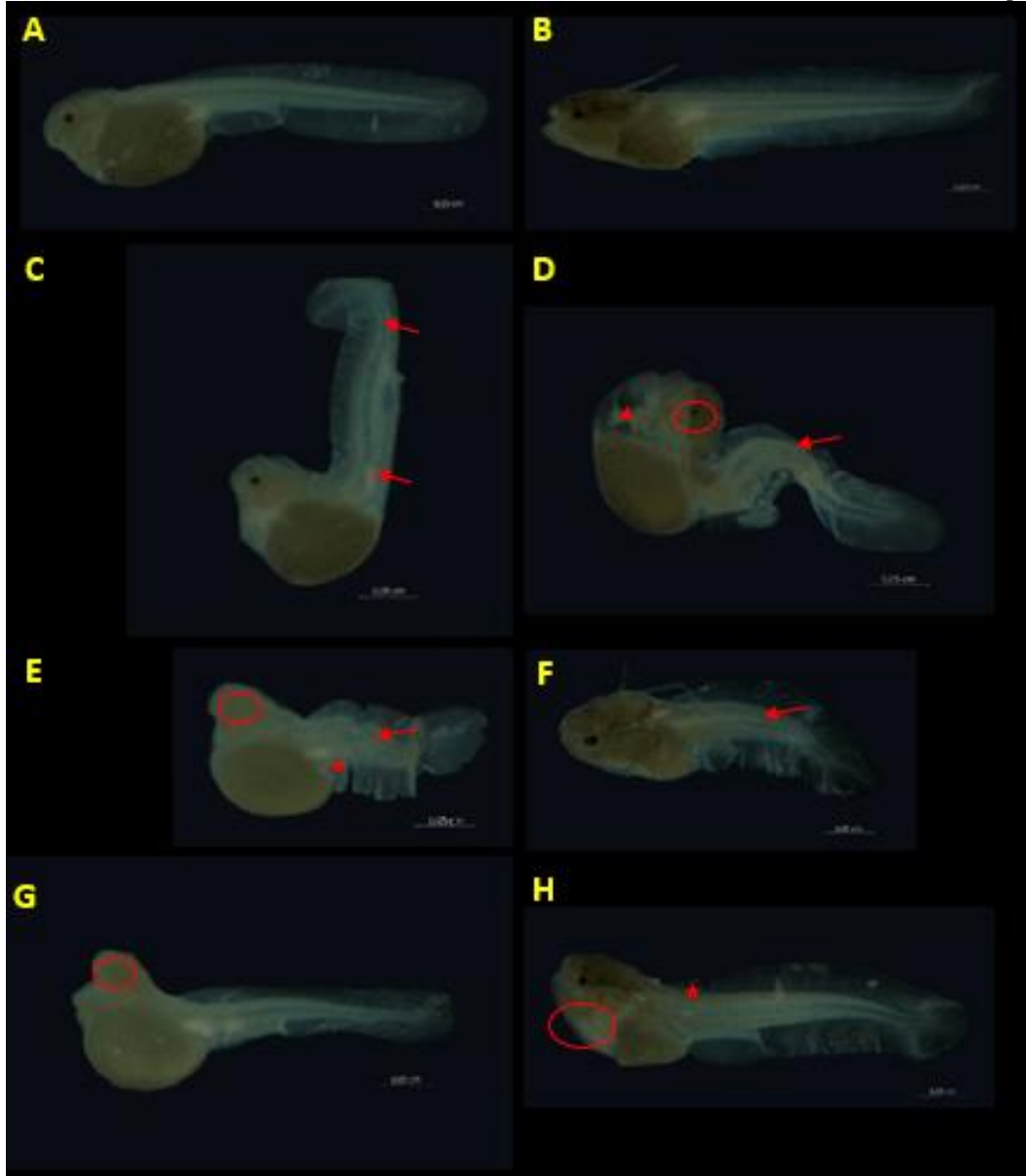
Nessa lógica os estudos que a pesquisadora Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira e sua equipe desenvolveram, ao realizarem diversas pesquisas na área de toxicologia ambiental, onde foi realizada a exposição de embriões/ larvas do peixe zebra (*Danio rerio*) à diversos tipos de produtos fitossanitários e com base nos resultados obtiveram a conclusão de que não existe dose segura para a utilização de agrotóxicos, visto que anormalidades sempre eram encontradas, o que gerou bastante polêmica em meados de outubro de 2019 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019)

## 5.2 Extrato botânico

Neste caso, em ambos os tempos de exposição foram encontrados indivíduos com grande número de deformidades morfológicas pertencentes a todas as categorias de danos, sendo as principais: 1- Axiais: lordose, escoliose e torção da cauda; 2- Nadadeiras: bifurcadas e lesionadas; 3- Craniofaciais: ausência de olhos, malformação da boca ou dos barbilhões; 4- Torácico-abdominais: edema pericárdico e atrofia corporal (Figura 5). Vale destacar que as concentrações CD1, CD2 e CD3 não apresentaram resultados para deformidades morfológicas, visto que todos os indivíduos destes grupos morreram em momento anterior as 48 hpf.

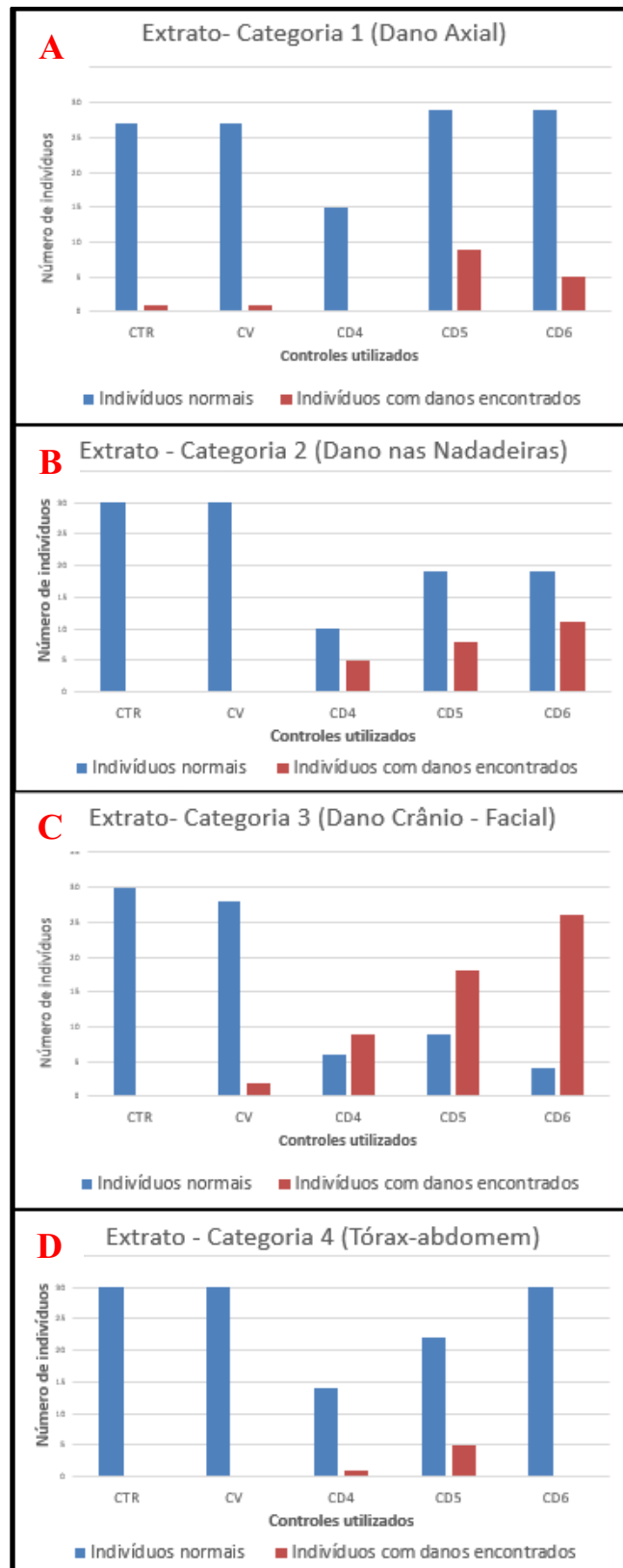
O teste do Qui-quadrado permitiu evidenciar que a frequência dos indivíduos com e sem danos foi significativamente maior nos grupos tratados com o extrato botânico de mamona em relação ao grupo controle e ao controle veículo no período de 48 hpf ( $\chi^2 = 90,68$ ;  $p < 0,000001$ ), em especial nas categorias craniofacial ( $\chi^2 = 70,56$ ;  $p < 0,00001$ ) e nas nadadeiras ( $\chi^2 = 24,91$ ;  $p < 0,0005$ ) (Gráfico 3). Vale ressaltar as elevadas frequências de indivíduos deformados nas menores concentrações de extrato botânico.

Figura 5– Fotomicrografias dos embriões/larvas de *R. quelen* expostos ao extrato botânico de mamona. (A) Indivíduo normal, exposição de 48 hpf; (B) Indivíduo normal, 96 hpf, (C) Indivíduo com dano axial – seta vermelha (escoliose – torção na coluna vertebral), exposição de 48 hpf; (D) Indivíduo com dano axial - seta vermelha (escoliose), edema pericárdico - triângulo vermelho, redução dos olhos e malformação facial – círculo vermelho, exposição de 96 hpf. – (E) Indivíduo com dano axial - seta vermelha (coluna vertebral reduzida), exposição de 48 hpf; (F) Indivíduo com dano axial - seta vermelha (coluna vertebral reduzida), exposição de 96 hpf (G) Indivíduo com redução dos olhos– círculo vermelho, – círculo vermelho, em 48 hpf; (H) Indivíduo com redução dos barbilhões– círculo vermelho, e com dano na nadadeira – estrela vermelha, em 96 hpf.



Fonte: A autora (2020).

Gráfico 3– Frequência absoluta de embriões/larvas de *R. quelen* com e sem deformidades morfológicas após serem submetidos ao Extrato botânico de Mamona por 48 hpf. (A) Danos Axiais; (B) Danos nas Nadadeiras; (C) Danos Crânio-Facial; (D) Danos Tórácico-abdominais. Sendo CD4 (0,125%) CD5 (0,062%) e CD6 (0,031%).

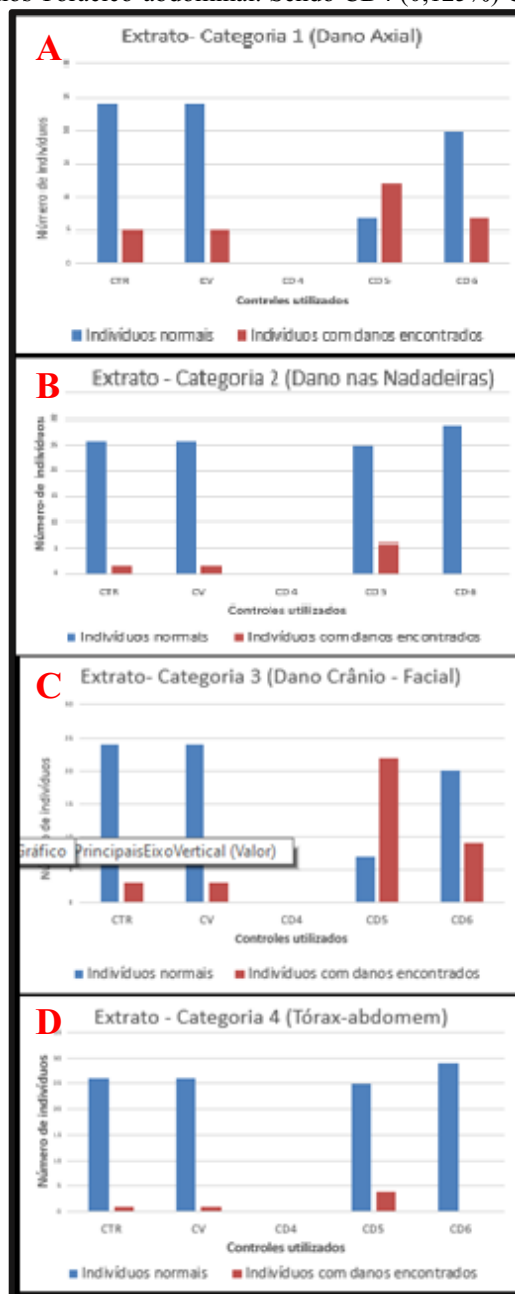


Fonte: A autora (2021)



No período de exposição de 96 hpf verificou-se que os resultados foram significativos ( $\chi^2 = 40,98$ ;  $p < 0,0001$ ), sendo observado que a quantidade de indivíduos afetados (com deformidades) também foi mais elevado na categoria 3 (crânio-facial) ( $\chi^2 = 35,82$ ;  $p < 0,001$ ), seguida da categoria 1 (axial). Já os outros danos foram encontrados em menores frequências como pode-se observar no Gráfico 4. Contudo neste período ocorreu a morte e todos os indivíduos do tratamento CD4 (0,125% de extrato botânico) e a CD5 (0,062%) apresentou uma elevada frequência de indivíduos deformados.

Gráfico 4– Frequência absoluta de embriões/larvas de *R. quelen* com e sem deformidades morfológicas após serem submetidos ao Extrato botânico de Mamona por 96 hpf. (A) Danos Axiais; (B) Danos nas Nadadeiras; (C) Danos Crânio-Facial; (D) Danos Tóraxico-abdominal. Sendo CD4 (0,125%) CD5 (0,062%) e CD6 (0,031%).



Fonte: A autora (2021)

Com base na toxicidade investigativa utilizada no presente trabalho, demonstrou-se que o extrato botânico de mamona tem efeito letal nas maiores concentrações, de 1,0 a 0,125% (v/v), e também um potencial indutor de deformidades morfológicas embriões/larvas de *Rhamdia quelen* nas menores concentrações (efeitos subletais). Corroborando com esses resultados, Macphail et al. (2009) ao realizarem testes com embriões de zebrafish (*Danio rerio*), afirmam que os organismos de origem aquática quando entram em contato ou são submetidos a determinadas substâncias, consideravelmente tóxicas, essas podem acarretar na inviabilidade da eclosão de embriões ou causar deformidades na morfologia dos mesmos.

No caso do extrato botânico de mamona, testes prévios já demonstraram a eficiência do produto no controle da lagarta-da-soja, espécie-alvo (WARMLING, 2018), mas sem correlacionar com biossegurança em organismos não-alvos. A citada autora realizou seus testes com o mesmo extrato botânico, em fração hexânica, extraído da *Ricinus communis* (mamona) e testado sobre *Chrysodeixis includens* (lagarta da soja), e revelou que a concentração letal foi de 2% (v/v), a qual é considerada muito elevada para organismos aquáticos, tais como *R. quelen*, que não sobreviveram nem com metade deste valor.

Com base nos efeitos subletais aqui observados, apenas concentrações de 30 a 60 vezes menores que a efetiva para a espécie-alvo, ou seja, de 0,062 e 0,031% não promoveram letalidade e, por isso parecem oferecer algum nível de segurança para o desenvolvimento de um produto fitossanitário. Contudo, vale destacar que mesmo estas concentrações foram capazes de gerar um aumento significativo das deformidades morfológicas em *R. quelen* e podem prejudicar a manutenção da espécie em condição natural. Desta forma, é necessário investigar mais espécies, concentrações, novas formulações e distintos tempos de exposição.

O extrato botânico de mamona apresenta compostos fenólicos que podem ser classificados em flavonoides, taninos e fenólicos totais, na sua composição (PIVETTA, 2014), podendo assim causar danos ao desenvolvimento dos animais e até levar a morte como resposta toxicológica a esses compostos. Segundo Taiz & Zeiger; (2013), os compostos fenólicos que pertencem aos grupos dos vegetais são derivados da cumarina e, deste modo, podem atuar no metabolismo de radicais livres.

Muitos destes anéis fenólicos interagem com proteínas, o tanino por exemplo, interage com proteínas e enzimas, fazendo com que as mesmas não consigam realizar as funções desejadas (SINGH et al 2001) Dessa forma a despeito da proteção inicial oferecida pelo córion, os organismos interagem com essas substâncias, explicando então na relação com os danos morfológicos encontrados no experimento, pois sabe-se que o córion é composto por uma

barreira glicoproteica, ou seja composta por proteínas, contudo acaba sendo propício que essas substâncias entrem em contato com esta camada, fazendo com que a mesma sofra alterações e colocando então a vida e do desenvolvimento dos embriões em risco.

Por isso é de suma importância que novos experimentos sejam realizados, pois os extratos botânicos tendem a ser o meio mais natural de eliminar as pragas, entretanto depende de fatores como concentração, tempo de exposição, tempo de meia vida, solubilidade, biotransformação, entre tantos outros. Assim, apenas acreditar que estes produtos extraídos de plantas serão mais compatíveis e amigáveis com os princípios da sustentabilidade pode induzir a mais problemas ambientais.

## 6. CONCLUSÃO

A elevada frequência de indivíduos com deformidades após 96 hpf de exposição ao herbicida 2,4-D, sugere que as fases iniciais de desenvolvimento da espécie *R. quelen* (não-alvo) são suscetíveis a este agrotóxico, desde suas concentrações mais baixas; inclusive inferiores ao permitido pela legislação mundial. E, com isso, entende-se que se essas concentrações acabarem se extrapolado ao ambiente natural, isso poderia indicar um elevado risco a viabilidade desta população e talvez a de muitas outras espécies.

Já nos testes realizados com extrato botânico observou-se, que tanto no tempo de exposição de 48 hpf, quanto no tempo de 96 hpf, foram encontrados diversos indivíduos contendo danos morfológicos, que podem colocar em risco o desenvolvimento da espécie. Por fim, este trabalho não visa realizar uma comparação entre o 2,4-D e o extrato botânico de Mamona, entretanto, foi possível observar que mesmo o extrato botânico sendo um método natural, o mesmo acarretou em um índice de maior número de indivíduos com anomalias. Sabendo disso compreende-se que é de suma importância realizar mais estudos para compreender as composições de ambas as substâncias e o mal que as mesmas podem causar com relação a espécies não alvo.

Este trabalho de conclusão de curso está vinculado a dois projetos maiores de mestrado acadêmico, os quais contemplam muitos outros parâmetros de análise nestes mesmos organismos, permitindo uma visão mais apurada das respostas e da relação causa-efeito.

## REFERÊNCIAS

- ANVISA. **Parecer após reunião da Comissão de Reavaliação**. 2019. Disponível em: [portal.anvisa.gov.br/analise-de-impacto-regulatorio](http://portal.anvisa.gov.br/analise-de-impacto-regulatorio). Acesso em 12 de setembro de 2019
- ARIAS, A. R. L. et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S.l.], v. 12, n. 1, p. 61–72, 2007.
- 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.
- BEEBY, A. What do sentinels stand for? **Environmental Pollution**, 112: p. 285-298, 2001.
- BENEDETTI, E. Água- Fonte da vida- Considerações. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 18, n. 1, p. 1-5, jan./jun. 2013.
- BERNARDI, Fernanda. **Exposição de gametas, embriões e larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) ao 2,4-d e glifosato: efeitos sobre indicadores do equilíbrio redox e sobre a viabilidade da prole**. 2021. 95 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2021.
- BOIVIN, A. et al. Diclorophenoxyacetic acid (2,4-D) sorption and degradation dynamics in three agricultural soils, **Environmental Pollution**, n 138, p 92 -99, USA, 2005..
- BRASIL. Governo do estado de secretaria de saúde. **Intoxicações agudas por agrotóxicos**. 2018.
- BRITO, I. A, et al. Embryo toxicity assay in the fish species *Rhamdia quelen* (Teleostei, Heptaridae) to assess water quality in the Upper Iguazu basin (Parana, Brazil). **Chemosphere** 208 (2018).
- CAVALCANTE, D. G. S. M. **Avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos do Roundup® em peixe *Prochilodus lineatus***. UEL, Londrina-PR, 2008
- CHINGOMBE, P.; SAHA, B.; WAKEMAN, R. J. Effect of surface modification of activated carbon on the sorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and benazolin from water. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 297, p. 44-442, 2006.
- 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
- ELKINGTON, J. Towards the sustainable corporation: Win-win-win business strategies for sustainable development. **California management review**, v.36, n.2, p.90-100, 1994.

EMBRAPA. **Controle De Plantas Daninhas: Métodos, Físico, Mecânico, Cultural, Biológico E Alelopatia**. Brasília, DF, 2018.

FARAH, M.A. et al. Studies on lethal concentrations and toxicity stress of some xenobiotics on aquatic organisms. **Chemosphere**.v.55(2): p.257-65. 2004

FERNANDES, D. I; PAUMGARTTEN, F. J. R. Desafios atuais da pesquisa em toxicologia: Avaliação da toxicidade de nanomateriais manufaturados para o desenvolvimento Vigilância Sanitária em Debate: **Sociedade, Ciência & Tecnologia**, vol. 1, núm. 4, nov, 2013, pp. 11-24

FÉNERO, C. I. M. **Estudo do modelo de inflamação intestinal induzida por tnbs em larvas de zebrafish (*Danio rerio*)**. USP. SP. 2015.

FERREIRA, A.L.A, MATSUBARA, L.S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo** Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, SP.1997.

GOMES, L. C. et al. Biologia do jundia *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**. V.30, p.179 e185, 2000.

HENN, K, BRAUNBECK T. Dechorionation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. 153(1): 91-98. 2011

ICMBIO. **RESOLUÇÃO CONAMA N° 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências: ICMBIO, 2005. (II - Padrões de qualidade de água)

INCA. Ministério da saúde. **A B C DO CÂNCER, ABORDAGENS BÁSICAS PARA O CONRTOLE DO CANCER**. Unidade I o que é o câncer: INCA. 2011, 2005.

IPEA. **AGROTÓXICOS NO BRASIL: PADRÕES DE USO, POLÍTICA DA REGULAÇÃO E PREVENÇÃO DA CAPTURA REGULATÓRIA**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada.- Ipea , Brasília, n. 21, p. 35, 30 jan. 2017 Seção 1.

KÉITA, S.M. et al. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v.37: p.339-349. 2001

LANGEANO. V. C. **Toxicidade do Roundup® e seus efeitos para o peixe neotropical *Prochilodus lineatus***. UEL, LONDRINA-PR, 2006

LIU, H et al. Pharmacokinetics and effects of tetrabromobisphenol a (TBBPA) to early life stages of zebrafish (*Danio rerio*), **Chemosphere** v.190, p. 243e252. 2018

LOPES, C. V. A, ALBUQUERQUE, G. S. C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde Debate**, RJ, v. 42, n. 117, p. 518-534, 2018.

- LUZ, F.J.F. **Caracterização morfológica e molecular de acessos de pimenta (*Capsicum chinense* Jacq.)**. 2007. 70p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.
- MACPHAIL, R.C, Brooks J, Hunter DL, Padnos B, Irons TD, Padilla S. Locomotion in larval zebrafish: influence of time of day, lighting and ethanol. **Neurotoxicology**; v. 30:52–8. 2009.
- MANDRELL D, TRUONG L, JEPHSON C, SARKER MR, MOORE A, LANG C, SIMONICH MT, TANGUAY RL. Automated zebrafish chorion removal and single embryo placement: optimizing throughput of zebrafish developmental toxicity screens. **J Lab Autom.** 2012;17(1):66-74.
- MARTINS, T. Herbicida Paraquat: conceitos, modo de ação e doenças relacionadas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 175-186, 2013.
- 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
- MONQUERO, P. A. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas. **Bragantia**, v.64, n.4, p.517-531, Campinas, 2005.
- NORTOX. **Intoxicações por 2,4-d nortox informações médicas**. 2018 Disponível em: < <http://www.nortox.com.br/wp-content/uploads/2018/12/24-D-Nortox-Bula-VER-12-08.11.2018.pdf> > Acesso em 21 de agosto de 2019.
- PENNA, P. M. M, et al. Biossegurança: Uma Revisão. **Arq. Inst. Bio**, v.77, n.3, p.555-465, São Paulo, 2010.
- PEREIRA, A. C. R. L. et al. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos... DE ÓLEOS ESSENCIAIS E FIXOS SOBRE 717 *Callosobruchus maculatus* (FABR., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) EM GRÃOS DE CAUPI [*Vigna unguiculata*( L). WALP.], **Ciênc. agrotec.**v.32, n.3, p.717-724, Lavras, 2008.
- PEREIRA, P. C. G, **Efeitos ecotoxicológicos do fungicida imazalil e seus subprodutos de fotocatalise em *Eisenia andrei***. UNIRIO, PPGBIO, Rio de Janeiro, 2018.
- PIVETTA, L.G. **Aspectos fisiológicos e produtividade de genótipo de mamona de porte baixo influenciados por densidades de plantas**. 2014. 77 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu, 2014.
- 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

- ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v.1, n.2: p.43-50, 2001
- ROSA, B. M. et al. **Efeito de herbicidas sobre agentes fitopatogênicos**. MARINGÁ, v. 32, n. 3, p. 379-383, 2010.
- SANTOS, P. L. et al. Utilização de Extratos Vegetais em Proteção de PlantaS. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.17; p.2563 Centro Científico Conhecer - Goiânia 2013.
- SARTORI, S, LATÔNICO. F, CAMPOS, L. M. S. Sustentabilidade sustentável: Uma taxonomia no campo da literatura. **Ambiente & Sociedade**, v.XVII, n.1, p.1-22, São Paulo, 2014
- SINGH, B.; BHAT, T. K.; SHARMA, O. P.; **Livestok Production Science**, 68, p.259. 2001
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 5.ed. Porto Alegre:Artemed, 2013. 954p.
- 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.
- TERRA, F. H. B. **A indústria de agrotóxicos no Brasil**. 44 f. Dissertação de mestrado,UFPR, 2008.
- TUREK, J. A. et al. Efeitos citotóxicos de um herbicida a base de glifosato no peixe *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000, **Luminária**, v, 19, n. 02, p. 06-12, União da Vitória
- VIERO, C. M. t al. Sociedade de risco: o uso dos agrotóxicos e implicações na saúde do trabalhador rural. **Esc Anna Nery**; 20(1):99-105, 2016
- VIGÁRIO, Ana. F, SABÓIA-MORAIS, Simone M.T. Effects of the 2,4-D herbicide on gills epithelia and liver of the fish *Poecilia vivipara*. **Pesquisa Vet. Brasil**. v.34, n.6: p.523-528, junho, 2014
- WARMLING, J,V. **Efeitos letais e subletais de extratos vegetais alcoólicos sobre *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae)**. Dissertação de mestrado, PPGA, p. 17, UTFPR, 2018
- 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.