

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CAMPUS DOIS VIZINHOS  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - LICENCIATURA

SAMARA CRISTINA DOSSENA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO HERBICIDA 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO  
SOBRE O SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO DE *Rhamdia quelen***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS - PR

2018

SAMARA CRISTINA DOSSENA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO HERBICIDA 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO  
SOBRE O SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO DE *Rhamdia quelen***

Trabalho de Conclusão de Curso Superior em Ciências Biológicas – Licenciatura, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos, como requisito parcial para aprovação da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos de Sousa

DOIS VIZINHOS - PR

2018



## TERMO DE APROVAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso nº \_\_\_\_

**AValiação DOS EFEITOS DO HERBICIDA 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO SOBRE  
O SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO DE *Rhamdia quelen***

por

**Samara Cristina Dossena**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado às **14** horas do dia **12 de novembro de 2018**, 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**.

---

Dra. Nédia de Castilhos Ghisi  
Professora UTFPR/DV

---

Dr. Fernando Carlos de Sousa  
Orientador  
Professor UTFPR/DV

---

Dra. Patrícia Franchi de Freitas  
Professora UTFPR/DV

---

Dra. Marciele Felippi  
Coordenador do Curso de Ciências  
Biológicas  
UTFPR – Dois Vizinhos

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

Dedico este trabalho aos meus pais, Dolores Dossena e Olmar José Dossena (em memória)  
pelos exemplos e conduta de vida.

## AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa acadêmica está chegando ao fim e com isso, gostaria de admitir que toda ajuda e apoio até o presente momento foram de essencial importância para que tudo ocorresse de tal maneira.

Agradeço primeiramente à Universidade Tecnológica Federal do Paraná– UTFPR, sua infraestrutura, corpo docente e técnico, por fornecer as condições essenciais para a elaboração deste projeto e por toda contribuição com o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Carlos de Sousa, por despertar em mim o interesse pela área, por todo incentivo, contribuições, compreensão e exigências para com a execução e escrita deste trabalho. Com certeza serão ensinamentos que levarei comigo em todos os próximos passos.

Aos membros da banca, Prof. Dra. Nédia de Castilhos Ghisi e Prof. Dra. Patrícia Franchi de Freitas por todas as correções e contribuições prestadas para com este trabalho.

A todos os participantes do projeto “Avaliação múltipla dos efeitos tóxicos do herbicida 2,4-D (Ácido Diclorofenoxiacético) sobre a espécie nativa *Rhamdia quelen* (Pisces: Siluriformes)”, em especial a Aliciane Roque de Almeida e Prof. Dra. Nédia de Castilhos Ghisi pelo convite em fazer parte desta equipe.

Agradeço a minha querida mãe, Dolores Dossena, que nunca mediu esforços para com a minha permanência na Universidade e que por mais difíceis que as condições pareçam ser, sempre encontra uma maneira de incentivar e prestar subsídio. Enfim, a toda a família.

Aos colegas e amigos, em especial a Lorena, Fábio, Isabella e Paola por saberem as palavras certas a serem usadas todas as vezes que o cansaço e o desânimo vieram à tona e também por estarem comigo diante de todas as conquistas, vocês são demais!

Agradeço a Prof. Dra. Mara e ao Prof. Ademar por todas as contribuições durante a realização do estágio de docência, pela forma com que veem a educação e como me fizeram tomar gosto por estar em sala de aula.

Por fim, sou grata ao Universo, por ter criado as condições necessárias para que tudo fosse possível e suportável.

## RESUMO

DOSSENA, S. C. **Avaliação dos efeitos do herbicida 2,4-Diclorofenoxiacético sobre o sistema nervoso entérico de *Rhamdia quelen***. 41f. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso - Ciências Biológicas Modalidade Licenciatura, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2018.

O Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um agrotóxico pertencente à classe dos herbicidas com ação voltada à eliminação de plantas daninhas ou indesejadas. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) este herbicida faz parte da Classe I de toxicidade, sendo considerado extremamente tóxico. Até o presente momento nenhum estudo avaliou os efeitos deste herbicida sobre o sistema nervoso entérico (SNE) de peixes da espécie *Rhamdia quelen*. Sendo esta uma espécie nativa da região sul do Brasil e altamente cultivada para fins comerciais. Objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos tóxicos da exposição aguda e subcrônica através da via hídrica ao herbicida 2,4-D sobre o SNE da espécie nativa *Rhamdia quelen* por tempos de 24 e 192 horas, nas concentrações de 0 e 60 µg/L, através de análises quantitativas e morfométricas dos neurônios mioentéricos do segmento cranial do intestino delgado. Para isso, foram expostos ao herbicida 60 animais machos, provenientes de piscicultura comercial, dos quais 20 foram utilizados para estudo neuronal através da evidenciação dos neurônios mioentéricos por azul de metileno. Em relação à organização morfológica, os neurônios mioentéricos foram encontrados na túnica muscular externa como já relatado para outras espécies. Observou-se que o plexo mioentérico destes peixes é formado por gânglios compostos por poucos neurônios e que ocorrem muitos neurônios isolados. Através da mensuração foi possível observar que os animais expostos há 192 horas apresentaram maior proporção de neurônios grandes. A análise quantitativa não revelou morte neuronal, mas sugeriu que o 2,4-D pode induzir ao aumento na síntese proteica neuronal. Os resultados sugerem que o 2,4-D afeta o plexo mioentérico levando a alterações manifestadas pela redução na proporção de neurônios pequenos, aumento na proporção de neurônios grandes e aumento na densidade de neurônios mioentéricos em alta atividade de síntese proteica.

**Palavras-chaves:** Neurônios mioentéricos. Toxicidade. Peixes.

## ABSTRACT

DOSSENA, S. C. **Evaluation of the effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide on the enteric nervous system of *Rhamdia quelen***. 41f. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso - Ciências Biológicas-Licenciatura, Federal University of Technology - Paraná. Dois Vizinhos, 2018.

The 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is a pesticide belonging to the class of herbicides and its action is directed to the elimination of weeds and unwanted plants. According to the Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA) this herbicide belongs to Class I of toxicity, therefore it is considered extremely toxic. Until the present moment no study has evaluated the effects of this herbicide on the enteric nervous system (SNE) of the fish species *Rhamdia quelen*. Being a native species of south Brazil and highly cultivated for commercial purpose. The objective of this study was to evaluate the toxic effects of acute and subchronic exposure through the water route to the herbicide 2,4-D on the SNE of *Rhamdia quelen*. The fishes were exposed to 2,4-D in concentrations of 0 or 60 µg/L during 24 or 192 hours. The effects on the SNE were assessed through quantitative and morphometric analyzes of the myenteric neurons of the cranial segment of the smooth intestine. Sixty male fishes were exposed to the herbicide of which 20 were used in the neuronal study. Animals were obtained from commercial fish farming. Neuronal staining was carried with metilene blue based dye. Regarding the morphological organization the neurons were found in the external muscular tunica as observed in other species. The myenteric plexus consists of ganglia composed by few neurons and also many isolated neurons occur as well. Through the measurement it was possible to observe that the animals exposed to 192 hours presented greater proportion of large neurons. The quantitative analyze didn't show signs of neuronal death but suggested that the 2,4-D can induce increasing in neuronal protein synthesis. The results suggest that 2,4-D affects the myenteric plexus leading to changes showed by the reduction in the proportion of small neurons, increase in the proportion of large neurons and in the density of myenteric neurons in high activity of protein synthesis.

**Key words:** Myenteric neurons. Toxicity. Fishes.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
ADAPAR	Agência de Defesa Agropecuária do Paraná
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina Trifosfato
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
MAO	Monoamina Oxidase
NPIC	National Pesticide Information Center
Siagro	Sistema de Controle do Comércio e Uso de Agrotóxicos
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
TGI	Trato Gastrointestinal



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>12</b>
3.1 MORFOLOGIA GASTROINTESTINAL.....	12
3.2 SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO.....	12
3.3 <i>Rhamdia quelen</i> sp.....	14
3.4 ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO.....	15
3.4.1 Exposição e ação neurotóxica do 2,4-D.....	18
3.4.2 Efeitos de herbicidas sobre peixes.....	19
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL.....	20
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	22
4.3 EUTANÁSIA E COLETA DAS AMOSTRAS.....	23
4.4 EVIDENCIAÇÃO NEURONAL.....	24
4.5 ESTUDO MORFOMÉTRICO.....	25
4.6 ESTUDO QUANTITATIVO.....	25
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	26
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>26</b>
5.1 DADOS CORPORAIS.....	26
5.2 ORGANIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	27
5.3 MORFOMETRIA NEURAL.....	28
5.4 QUANTIFICAÇÃO NEURAL.....	30
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>32</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos de várias classes são considerados essenciais para o desenvolvimento agrícola, por potencializarem a produção e manterem a integridade das plantações, além de reduzirem custos com mão de obra (VIEIRA et al., 2017). Entretanto, devido aos seus efeitos, alguns deles podem afetar os ecossistemas prejudicando o meio ambiente pela contaminação do solo e da água (CATTANEO et al., 2008).

Segundo estatísticas, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos no mundo e o grupo dos herbicidas é o mais comercializado mundialmente (FROEHNER; NETO; MACHADO, 2012). No Brasil, mais de 322 mil toneladas desse grupo foram comercializadas em 2016, sendo os ingredientes ativos glifosato e 2,4-D os mais comercializados oficialmente (IBAMA, 2016).

Os herbicidas são agrotóxicos utilizados na agricultura e no paisagismo, visto que promovem a eliminação de plantas daninhas ou indesejadas (PEREIRA, 2006). A este grupo pertence o 2,4-D, o qual vem se destacando devido à facilidade na sua aquisição e manipulação e também por atuar como complemento ao glifosato, que vem perdendo seu efeito de forma gradativa. Segundo a ANVISA (2015) este herbicida faz parte da Classe I de toxicidade, sendo considerado extremamente tóxico, podendo causar sérios danos à saúde animal e ao ambiente.

Na maioria das vezes os herbicidas possuem um longo tempo de atividade residual em solos e águas, permanecendo ativo por meses devido à dificuldade de degradação microbiológica (SANTOS et al., 2000). As características do 2,4-D permitem que ele possua uma meia-vida na água de cerca de duas a quatro semanas, sendo degradado a 2,4-diclorofenol (AMARANTE JUNIOR et al., 2002; ISLAM et al., 2018). Porém, antes da sua degradação, o 2,4-D pode acabar contaminando o sistema aquático e afetar peixes e conseqüentemente outros animais que se alimentam de peixes, causando assim uma contaminação indireta e comprometendo a qualidade dos produtos derivados dessas culturas.

*Rhamdia quelen*, ou jundiá cinza como é popularmente conhecido, é uma espécie de peixe nativa no Sul do Brasil, com distribuição Neotropical desde a Argentina até o Sul do México (SILFVERGRIP, 1996). Seu cultivo, para fins comerciais vem aumentando gradativamente no sul do Brasil (PAMPLONA, 2009) pelo fato de conseguir suportar os invernos rigorosos e apresentar rápido crescimento no verão (MONTANHA et al., 2011, BARCELLOS et al., 2001). De acordo com Carneiro, Schorer e Mikos (2005) é um peixe de rápido crescimento e que pode facilmente se desenvolver em cativeiro. Devido a estas

condições e por ser onipresente em rios e lagos do Sul do Brasil que se escolheu a espécie *R. quelen* para o presente estudo.

Os efeitos neurotóxicos do 2,4-D associados ao sistema nervoso central (SNC) incluem coma, convulsões, paralisia, fasciculação, alucinações, miose, ataxia, hipertonia, entre outros. Foram observados outros sintomas clínicos como: acidose metabólica, falência renal, febre, hiperventilação e aumento de atividade da aminotransferase (BRADBERRY et al., 2000). O mecanismo da neurotoxicidade específico do 2,4-D ainda não está completamente esclarecido (BORTOLOZZI et al., 2001).

Bradberry et al. (2000) revelam que entre os mecanismos propostos para a ação do 2,4-D no SNC há a ocorrência de alterações na membrana celular da célula neuronal com desacoplamento da fosforilação oxidativa e interrupção do metabolismo da acetil coenzima A. Em espécies não alvo, aquelas que possuem contaminação indireta pelo 2,4-D o seu mecanismo de toxicidade ainda é pouco entendido, embora existam estudos que indiquem riscos relacionados com o desenvolvimento de tumores malignos em pessoas expostas (ATEEQ; FARAH; AHMAD, 2005).

Segundo Kreutz et al. (2008) a contaminação da água com grandes quantidades de pesticidas leva à mortalidade de peixes, mas os efeitos de pequenas quantidades são praticamente desconhecidos. Em culturas de arroz irrigado, por exemplo, os herbicidas são aplicados diretamente na água e podem afetar a vida aquática. A toxicidade de herbicidas utilizados nessas culturas foi avaliada (MIRON et al., 2005) e alguns destes compostos foram considerados não-tóxicos para *R. quelen* em concentrações consideradas efetivas para plantas daninhas (KREUTZ et al., 2008). Demais estudos mostraram diferentes alterações histológicas em peixes e outros animais após a exposição a agroquímicos, alguns autores sugerem que as alterações podem resultar em mau funcionamento de vários sistemas ou órgãos de peixes (ATEEQ; FARAH; AHMAD, 2006; BENLI et al., 2007; CATTANEO et al., 2008).

O SNE é responsável pela inervação intrínseca do trato gastrointestinal (TGI), representando o principal sistema de controle das atividades motoras, da digestão e da absorção dos nutrientes. Por ser morfologicamente mais simples que o SNC e, ao mesmo tempo, apresentar alta complexidade bioquímica e por existirem diversos métodos de estudo o SNE tem sido utilizado como modelo experimental dos efeitos de diversas condições sobre o sistema nervoso. O SNE é formado por neurônios, células da glia entérica e pelas conexões entre essas células e outros tipos celulares. A maioria dos neurônios entéricos se organiza em dois plexos ganglionados, o plexo mioentérico e o plexo submucoso.

Pereira (2006) afirma que quando administrado por via oral em concentrações de 2,5 e 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  do peso corpóreo por um período de 15 dias o 2,4-D acaba influenciando os neurônios do plexo mioentérico do duodeno de ratos, resultando no aumento do número de neurônios grandes e aumento no número de neurônios pequenos. Corrêa (2010) observou que na dosagem de 5  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal durante 15 dias o 2,4-D não promove morte neuronal, mas induz hipertrofia os neurônios NADPH-diaforase positivos e redução da área do perfil do corpo celular na população geral de neurônios.

Apesar de sua grande importância funcional poucos trabalhos têm abordado os efeitos do 2,4-D sobre o sistema nervoso entérico. Neste sentido, este trabalho será realizado para avaliar os efeitos da exposição aguda e subcrônica através da via hídrica, nos tempos de 24 e 192 horas na concentração de 60  $\mu\text{g}$  de 2,4-D por litro de água sobre o sistema nervoso entérico da espécie nativa *R. quelen*.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos da exposição aguda e subcrônica ao herbicida 2,4-D por via hídrica sobre o SNE da espécie nativa *Rhamdia quelen* (Quoy; Gaimard, 1824).

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Avaliar os efeitos da exposição ao 2,4-D sobre o número de neurônios mioentéricos no intestino delgado de *R. quelen*.
- 2) Analisar os efeitos da exposição ao 2,4-D sobre o tamanho de neurônios mioentéricos no intestino delgado de *R. quelen*.
- 3) Produzir informações sobre os efeitos do herbicida 2,4-D sobre o sistema nervoso entérico de peixes.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 MORFOLOGIA GASTROINTESTINAL

O TGI se estende da boca ao ânus e é formado por órgãos ocos ou saculares por onde passa o alimento após ser ingerido (GRAAFF, 2003). A parede dos órgãos do TGI é composta por quatro camadas, ou túnicas, sendo elas: túnica mucosa, túnica submucosa, túnica muscular externa e túnica serosa (GRAAFF, 2003). Os processos envolvidos no mecanismo de digestão que ocorre no TGI são controlados pelo SNE, tendo neste uma atividade motora proveniente do plexo mioentérico (STERNINI, 1988), o qual está localizado entre as camadas longitudinal e circular da túnica muscular externa.

Em peixes a morfologia do TGI apresenta muitas variações, as quais podem estar relacionadas com a dieta, a filogenia, o hábito alimentar, a forma do corpo, além de outras características que refletem na diferenciação funcional (BECKER et al., 2010). Vários autores relatam que existem relações entre a morfologia do TGI com os hábitos alimentares dos peixes, ou seja, a partir de diferenças nas características estruturais, anatômicas e histológicas, torna-se possível diagnosticar o regime alimentar de uma espécie, cujas características são apontadas como adaptações e modificações (SEIXAS FILHO et al., 2001; SILVA; GURGEL; SANTANA, 2005). O intestino neste caso acaba variando em forma, arranjo e comprimento. Como relatam Fryer e Iles citados por Giora e Fialho (2003) o comprimento do intestino está diretamente relacionado à categoria trófica da espécie, sendo ordenados desta maneira: carnívoros < onívoros < herbívoros < detritívoros.

#### 3.2 SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO

O sistema nervoso autônomo (SNA) compõe a parte eferente do sistema nervoso visceral, porém alguns autores acreditam que o SNA possua também fibras aferentes viscerais (MACHADO, 2004). Para Hansen (2003), o sistema nervoso entérico faz parte do SNA e integra a motilidade, secreções, fluxo sanguíneo e respostas imunes em padrões de comportamento através de reflexos neurais. Oriá e Brito (2016) complementam citando que ele é encontrado ao longo de todo trato gastrointestinal, estendendo-se do esôfago ao reto, também presente no pâncreas e vesícula biliar.

Os órgãos do trato gastrointestinal, incluindo o intestino são os únicos órgãos internos que estão expostos a uma grande variedade de estímulos físico-químicos vindos da parte externa através do alimento ingerido (COSTA; BROOKES; HENNIG, 2000). Como

consequência, o intestino desenvolveu um rico repertório de movimentos coordenados de seu aparato muscular para assegurar a mistura apropriada e a propulsão dos conteúdos durante a digestão, absorção e excreção. O trânsito oro-anal do conteúdo intestinal pode ser considerado como uma forma de locomoção adaptativa que ocorre em uma ampla gama de domínios espaciais e temporais, esses movimentos são resultado da interação do aparato neural e do aparato muscular (COSTA; BROOKES; HENNIG, 2000).

Em humanos, a ontogenia dos intestinos começa em cerca de oito semanas no estômago e conclui-se no reto por cerca de treze semanas de gestação (HANSEN, 2003). Os neurônios do SNE têm origem embriológica a partir de células precursoras da crista neural, a partir de onde se deslocam para a parede dos órgãos do TGI, colonizando estes órgãos desde o esôfago até o ânus (FURNESS; COSTA, 1987; GABELLA, 1990). O comportamento celular e o controle molecular da formação do SNE são incrivelmente conservados em peixes, aves e mamíferos (GOLDSTEIN; HOFSTRA; BURNS, 2013).

Nas últimas décadas muito se tem estudado para obter uma descrição completa de todas as classes morfológicas e funcionais de neurônios entéricos nas diversas espécies animais. A estratégia inclui o desenvolvimento de diferentes métodos combinando técnicas como: histoquímicas, imuno-histoquímicas, impregnação por prata e coloração com azul de metileno para evidenciar neurônios (GABELLA, 1969; SANTER, 1994).

Os neurônios presentes no SNE estão organizados em dois grandes plexos ganglionados: o plexo mioentérico e o plexo submucoso (CHRISTENSEN, 2001). Estes plexos são formados por corpos de neurônios, fibras nervosas e por células da glia entérica (SOUSA; MIRANDA-NETO, 2009), tipos celulares estes que fazem parte de uma complexa rede que controla a motilidade gastrointestinal (ORIÁ; BRITO, 2016). Os plexos foram denominados de acordo com sua localização na parede dos órgãos do TGI. O plexo submucoso localiza-se entre o tecido conjuntivo da túnica submucosa e o plexo mioentérico localiza-se entre as camadas de músculo liso da túnica muscular externa (COSTA; BROOKES; HENNIG, 2000; GERSHON, 2000).

Os neurônios do SNE se organizam em gânglios revestidos por tecido conjuntivo, o qual separa os gânglios dos tecidos que os circundam. Essa organização é predominante em mamíferos, onde o tamanho e a forma das redes ganglionares podem variar em um mesmo plexo nas diferentes partes do trato gastrointestinal e em diferentes espécies. Nota-se também a presença de neurônios isolados em roedores (GABELLA, 1987). Estes gânglios mioentéricos de acordo com Furness e Costa (1987) variam significativamente em tamanho, forma e orientação de espécie para espécie e de uma parte do TGI para outra.

Os neurônios entéricos podem ser classificados em três tipos principais baseando-se em sua morfologia e fisiologia, sendo os neurônios sensitivos que funcionam de maneira a controlar a distensão da parede intestinal, os interneurônios que repassam as informações entre os próprios neurônios entéricos e os neurônios motores que controlam de fato todas as atividades do TGI (FURNESS; COSTA, 1987; HANSEN, 2003).

Estados alterados da função da mucosa e/ou motilidade gastrointestinal resultantes de disfunção nervosa podem levar a síndromes que, dependendo da região do intestino afetado, incluem disfagia, doença do refluxo gastro-esofágico, retardo do esvaziamento do estômago, dor abdominal e inchaço, diarreia, constipação e incontinência fecal (WADE; COWEN, 2004).

### 3.3 *Rhamdia quelen* sp.

*R. quelen*, ou jundiá cinza como é conhecido popularmente, é uma espécie de peixe com distribuição neotropical, sendo encontrado desde a Argentina até o sul do México. Seu cultivo, para fins comerciais vem aumentando gradativamente no sul do Brasil (SILFVERGRIP, 1996; PAMPLONA, 2009). De acordo com a Embrapa (2017), o jundiá está entre as três espécies mais comuns produzidas na região Sul. São comumente comercializados pelo fato de conseguirem suportar os invernos rigorosos e apresentarem rápido crescimento no verão (MONTANHA et al., 2011, BARCELLOS et al., 2001). Segundo Carneiro, Schorer e Mikos (2005) é um peixe de rápido crescimento e que pode facilmente se desenvolver em cativeiro.

É classificado taxonomicamente em: Classe *Osteichthyes*, Série *Teleostei*, Ordem *Siluriformes*, Família *Heptapteridae*, Gênero: *Rhamdia* e Espécie: *Rhamdia quelen* (GOMES et al., 2000; SILFVERGRIP, 1996). Vivem em lagos e rios e preferem locais com águas mais calmas, tendo fundo de areia e lama. Podem chegar a 50 centímetros de comprimento e três quilos, possuindo hábito noturno (PAMPLONA, 2009).

Os animais adultos dessa espécie são onívoros, ou seja, se alimentam preferencialmente de pequenos peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais, e detritos orgânicos (GUEDES, 1980; MEURER; ZAMBONI-FILHO, 1997). Entretanto, as características anatômicas de seu trato digestivo são semelhantes àquelas de peixes carnívoros/ictiófagos, como trato gastrointestinal simples e ausência de cecos pilóricos ou moela (BALDISSEROTTO et al., 2014). Os organismos encontrados no conteúdo

gastrointestinal indicam que essa espécie é generalista com relação à escolha de alimento (GUEDES, 1980).

É considerada como uma espécie euritérmica, a qual resiste a grandes oscilações de temperatura, com seu ideal térmico esteja entre 22-28°C (BORGES, 2005). Segundo Gomes et al. (2000), os alevinos aclimatados a 31°C suportam temperaturas de 15 a 34 °C. Existem estudos apontando que o crescimento destes é rápido, pois alcançam aproximadamente cinco centímetros de comprimento com apenas 30 dias de idade em sistemas artificiais. O crescimento se torna acentuado em exemplares expostos à escuridão (GOMES et al., 2000).

O intestino de *R. quelen* é a parte mais longa do trato gastrointestinal, espalhando-se da região pilórica do estômago até o ânus e apresenta um diâmetro aproximadamente uniforme em todo o seu comprimento, com uma diminuição gradual em direção à porção terminal, tendo sua histologia semelhante a outros vertebrados, constituídos por quatro túnicas: mucosa, submucosa, muscular externa e serosa (HERNÁNDEZ; PÉREZ; DOMITROVIC, 2009). A túnica muscular externa do intestino consiste em uma ampla camada circular interna e longitudinal externa; entre essas duas camadas, os corpos neuronais pertencentes ao plexo mioentérico podem ser observados (HERNÁNDEZ; PÉREZ; DOMITROVIC, 2009). A túnica serosa é formada por mesotélio e tecido subseroso conectivo com vasos sanguíneos abundantes e a submucosa por uma camada fina de tecido conjuntivo denso sendo também muito vascularizada (HERNÁNDEZ; PÉREZ; DOMITROVIC, 2009).

É levado em consideração o crescimento, a sobrevivência e a reprodução dos indivíduos quando escolhidos para testes clássicos de laboratório (VAN DER OOST et al., 2003). Por ser de fácil aquisição, se adaptar facilmente a condições laboratoriais e por ser nativo e onipresente em rios e lagos do Sul do Brasil que se escolheu a espécie *R. quelen* para o presente estudo. Além disso, apresenta certa resistência a condições aquáticas adversas, sendo considerada uma espécie adequada para detecção precoce de contaminantes aquáticos por meio de biomarcadores histológicos (MUÑOZ et al., 2015).

### 3.4 ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO

Agrotóxicos de várias classes são considerados essenciais para o desenvolvimento agrícola, mas devido aos seus efeitos, alguns deles podem afetar os ecossistemas através da contaminação do solo e da água (CATTANEO et al., 2008). Para Miguel (1999), os herbicidas vêm apresentando um alto crescimento no mercado agrícola, devido à prática de monoculturas, nas quais os riscos de invasão por ervas daninhas é grande.



Os herbicidas ácidos fazem parte de uma importante classe de pesticidas usados no controle de ervas (SANCHEZ; BRUNETE et al., 1994), são frequentemente destinados a matar ou remover qualquer tipo de praga existente (QURRATU; REEHAN, 2016). O 2,4-D é um membro desta classe, sendo um composto altamente seletivo, sistêmico e pré ou pós-emergente (TOMLIN, 1994).

Os herbicidas podem possuir longo tempo de atividade residual permanecendo por meses em solos e águas, devido à dificuldade de degradação microbiológica (SANTOS et al., 2000). Sendo assim, podem acabar contaminando o sistema aquático e afetar peixes e consequentemente outros animais que se alimentam de peixes, causando uma contaminação indireta, acometendo também a qualidade dos produtos derivados dessas culturas. Na agricultura, o 2,4-D vem sendo muito utilizado em cereais, culturas de grãos e cana-de-açúcar para controle de plantas daninhas de folhas largas, também em pastagens, manejo florestal, jardinagem e controle da vegetação aquática (CATTANEO et al., 2008).

De acordo com o Parecer Técnico de Reavaliação nº 07, de 2015/GGTOX/ANVISA, o 2,4-D naquela época não estava proibido em nenhum país do mundo, mas passava por processo de reavaliação em alguns países, como: Austrália, China e Estados Unidos. No Canadá e Austrália, por exemplo, algumas formas de 2,4-D estão proibidas devido a riscos ao meio ambiente e à falta de dados para avaliação, como nos mostra o Quadro 01 (ANVISA, 2015).

Quadro 01: Situação internacional do 2,4-D em 2015 segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

País	Situação
Argentina	Permitido. O éster isobutílico de 2,4-D está proibido na Província de Santa Fé <sup>1</sup> .
Austrália	Permitido. Os ésteres altamente voláteis de 2,4-D estão proibidos (risco ao meio ambiente).
Canadá	Permitido <sup>2</sup> . Proibido somente na forma dietanolamina (DEA) de 2,4-D e para uso aquático. Em Quebec e Ontário é proibido o uso em gramados, jardins e parques. Reavaliação prevista.
China	Permitido. Em reavaliação.
Dinamarca	Restrito. Proibida a aplicação de mais de 100 g de ingrediente ativo/hectare/ano <sup>3</sup> .
Estados Unidos	Permitido. Em reavaliação.
Índia	Permitido.
Japão	Permitido.
Malásia	Permitido.
Noruega	Proibido, mas atualmente (julho de 2015) está em andamento avaliação de novo pedido de aprovação do 2,4-D.
Suécia	Proibido antes desse país se tornar membro da União Europeia. O uso de 2,4-D é autorizado na União Europeia, entretanto não há produtos à base desse ingrediente ativo aprovados na Suécia.
Suíça	Permitido.
União Europeia	Permitido. Reavaliação recentemente finalizada, registro válido até 2030.

Fonte: Parecer Técnico de Reavaliação Nº 07, de 2015/GGTOX/ANVISA. (Adaptado).

No Brasil, há atualmente 54 produtos formulados à base de 2,4-D registrados no Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), desses 54, há 23 à base de 2,4-D ácido; dois de

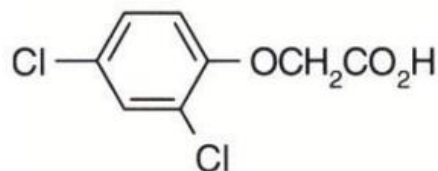
2,4-D amina; 15 de 2,4-D dimetilamina; 11 de 2,4-D trietanolamina e três de 2,4-D triisopropanolamina (ANVISA, 2015). De acordo com os dados mais recentes de comercialização do Ibama, o 2,4-D foi o segundo ingrediente ativo de agrotóxico mais vendido no Brasil em 2016, ficando atrás apenas do glifosato, outro herbicida (IBAMA, 2016). Segundo a ANVISA,

Esse ingrediente ativo está autorizado para aplicação em pré e pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de arroz, aveia, café, cana-de-açúcar, centeio, cevada, milho, pastagem, soja, sorgo e trigo. Sendo formalmente permitidas as seguintes modalidades de aplicação de 2,4-D: aérea e terrestre (costal e tratorizada). (ANVISA, 2015, p. 21).

Segundo informações do National Pesticide Information Center – NPIC (2000), o 2,4-D tem sido amplamente empregado como herbicida em empreendimentos agrícolas e não agrícolas, e é registrado para uso em ambientes terrestres e aquáticos. Pode causar baixas taxas de crescimento, problemas que afetam a mudanças de comportamento ou até a morte de algumas espécies (BUKOWSKA, 2006). Vale ressaltar que em 05 de março de 2015 a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) deferiu a liberação comercial de milho geneticamente modificado com tolerância ao herbicida 2,4-D (BRASIL, 2015).

O 2,4 D pertence ao grupo químico dos fenoxilacéticos e existe em formulações contendo sais de amina mais solúveis em água, ou derivados de éster solúveis em solventes orgânicos. Sua visão macroscópica caracteriza-se pela apresentação na forma de um pó branco de odor levemente fenólico (SCHVARTSMAN, 1991). Possui a fórmula molecular  $C_8H_6Cl_2O_3$  (Figura 01), peso molecular 221,04, ponto de fusão  $140,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ponto de ebulição  $130\text{ }^{\circ}\text{C}$  e solubilidade em água de 900 mg/litro a  $25^{\circ}\text{C}$  (KENNEPOHL; MUNRO, 2001).

Figura 01 - Estrutura química do 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)



Fonte: Índice Monográfico ANVISA, 2018 (Adaptado)

A ANVISA (2015) classifica o herbicida 2,4-D como pertencente à classe I (Quadro 2), sendo extremamente tóxico, podendo causar diversos danos ao ambiente e a saúde animal. De acordo com a Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992, a dose letal capaz de eliminar 50%

da população animal empregada no teste (DL<sub>50</sub>) com ratos, atribuída para este agente situa-se entre 0-50 mg/kg do peso corporal quando ingerido por via oral e 0-200 mg/kg através da via dérmica (BRASIL, 1992). Analizando a sua concentração letal (CL<sub>50</sub>) atribui ser mais contaminante quando inalado, tendo o valor máximo de até 0,2 mg/L (FROEHNER; NETO; MACHADO, 2012).

Quando 02 – Classe toxicológica dos agrotóxicos.

Classe toxicológica	Toxicidade	DL50 (mg/Kg)	Faixa colorida
I	Extremamente tóxico	≤ 5	Vermelha
II	Altamente tóxico	Entre 5 e 50	Amarela
III	Mediamente tóxico	Entre 50 e 500	Azul
IV	Pouco tóxico	Entre 500 e 5.000	Verde

Fonte: Peres e Moreira, 2003 (Adaptado).

O 2,4-D ficou especialmente conhecido por ser um dos ingredientes do Agente Laranja, uma mistura 1:1 de 2,4-D e ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5- T), que continha grandes quantidades de dioxinas contaminantes (HARDELL, 2008) e que foi amplamente utilizado nos anos 1960 e 1970 para controlar ervas daninhas e principalmente como desfolhante durante a Guerra do Vietnã (IARC, 2012).

A agricultura é uma das principais atividades econômicas no estado do Paraná e vem se destacando quando o assunto é produção. Dutra e Ferreira (2017) através de seus estudos coletaram dados a respeito do uso deste herbicida entre 2014/2015 e concluíram que o 2,4-D manteve-se entre os cinco princípios ativos mais consumidos no estado. No ano de 2016 o 2,4-D ocupou a sétima posição entre os agrotóxicos mais vendidos na região Sudoeste do Paraná e em 2017 saltou para a sexta posição, segundo as informações declaradas ao Sistema de Controle do Comércio e Uso de Agrotóxicos (Siagro) (ADAPAR, 2016, 2017).

#### 3.4.1 Exposição e ação neurotóxica do 2,4-D

Para Pereira (2006), quando se trata de humanos, a exposição ao 2,4-D pode ocorrer durante a manufatura, a formulação, o transporte, a mistura e a aplicação deste produto, ou ainda, pela ingestão de água ou alimentos contaminados. Friedrich (2014) complementa afirmando que em humanos pode ser absorvido através da inalação, por via dérmica e da ingestão de água ou de alimentos contaminados incluindo o leite materno ou através da placenta. Desta forma percebe-se que a exposição ao 2,4-D pode ocorrer em diferentes

momentos da vida, como intra-útero, lactação, infância, adolescência, fase adulta e senescência.

Os sintomas de inalação do 2,4-D no homem incluem sensação de queimação na nasofaringe e peito e também tontura (ABDOLLAHI, 2004). Já a ingestão inclui sensação de queimação na língua, faringe, esôfago, também vômito, dor abdominal, no peito, gastrite, diarreia, podendo levar até a uma hemorragia gastrointestinal (BERWICK, 1970; BRADBERRY et al., 2000; ABDOLLAHI, 2004). Segundo Schwartsman (1991) a dose tóxica para o ser humano, após ingestão, está em torno de três a quatro gramas e a dose letal é 28 gramas. Já, para ratos a dose letal é de 375 mg/kg de peso corpóreo (ALMEIDA; RODRIGUES, 1988). Os efeitos neurotóxicos associados ao SNC incluem coma, convulsões, paralisia, fasciculação, alucinações, miose, ataxia, hipertonia, entre outros. Foram observados outros sintomas clínicos como: acidose metabólica, falência renal, febre, hiperventilação e aumento de atividade da aminotransferase (BRADBERRY et al., 2000).

O mecanismo da neurotoxicidade em relação ao 2,4-D ainda não está esclarecido (BORTOLOZZI et al., 2001). Entre os mecanismos propostos para a ação do 2,4-D no SNC, Elo e MacDonald (1989) indicam que há inibição do transporte de ácidos orgânicos para fora do cérebro devido ao aumento nos níveis de metabólitos ácidos resultantes da biogênese das aminas. Bradberry et al. (2000) revelam a ocorrência de alterações na membrana celular da célula neuronal com desacoplamento da fosforilação oxidativa e interrupção do metabolismo da acetil coenzima A. Bortolozzi et al. (1998) acrescenta que ocorre aumento nos níveis de serotonina devido ao aumento de sua biossíntese, ou por inibição da recaptação desse neurotransmissor e disfunção da enzima monoamina oxidase. Alterações na integridade funcional e estrutural de proteínas nas membranas plasmáticas e das organelas podem desencadear alterações no metabolismo energético prejudicando as atividades biológicas da célula como a síntese de ATP, sinalização, regulação de reações de biossíntese e catabólica, transportes de metabólitos e de íons (PALMEIRA et al., 1997; BRADBERRY et al., 2000).

### 3.4.2 Efeitos de herbicidas sobre peixes

Segundo Kreutz et al. (2008) a contaminação da água com grandes quantidades de pesticidas leva à mortalidade de peixes, mas os efeitos de pequenas quantidades são praticamente desconhecidos. Em culturas de arroz irrigado, por exemplo, os herbicidas são aplicados diretamente na água e podem afetar a vida aquática. A toxicidade de herbicidas utilizados em culturas de arroz irrigado foi avaliada (MIRON et al., 2005) e alguns destes

compostos, incluindo o 2,4-D foram considerados não-tóxicos para *R. quelen* em concentrações consideradas efetivas para plantas daninhas (KREUTZ et al., 2008).

Demais estudos mostraram diferentes alterações histológicas em peixes e outros animais após a exposição a agroquímicos; alguns autores sugerem que as alterações podem resultar em mau funcionamento de vários sistemas ou órgãos de peixes (ATEEQ; FARAH; AHMAD, 2006; BENLI et al., 2007; CATTANEO et al., 2008). Perreira (2006) afirma em seus estudos com *Rattus norvegicus* que o 2,4-D quando administrado por via oral em concentrações de 2,5 e 5 µg/kg do peso corpóreo, por um período de 15 dias, leva ao aumento no número de neurônios grandes à custa da redução do número de neurônios pequenos, tanto quando evidenciados por Giemsa quanto quando evidenciados por NADH-diaforase. Corrêa (2010) utilizando a mesma espécie, conclui a partir de análises feitas utilizando dosagem de 5 mg/kg de peso corporal durante 15 dias que o 2,4-D não promove morte neuronal, mas induz a redução na área do perfil do corpo celular da população geral de neurônios evidenciados pela técnica de Giemsa e causa hipertrofia nos neurônios NADPH-diaforase positivos. Sarikaya e Yılmaz (2003) também descrevem o 2,4-D como sendo altamente tóxico para os peixes, tendo efeitos muito nocivos para os seres humanos e animais, uma vez que, se acumula nos tecidos e provoca envenenamento agudo.

Percebemos que poucos trabalhos têm abordado os efeitos tóxicos do 2,4-D sobre o SNE apesar de o trato gastrointestinal ser um dos primeiros a serem impactados pela ingestão do herbicida e de possuir grande importância funcional, sendo o SNE a porção mais complexa do sistema nervoso periférico, responsável pela inervação intrínseca do TGI. Devido a isso, percebe-se a necessidade de novos estudos sobre os efeitos do 2,4-D em diferentes organismos, visto que vem ganhando espaço do glifosato no mercado de agroquímicos, em decorrência da resistência já adquirida pelas plantas a este herbicida.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

Todos os procedimentos realizados neste projeto foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEUA-UTFPR), sob protocolo de nº 2016-18 (Anexo 01).

### **4.1 DESENHO EXPERIMENTAL**

Foram utilizados 60 exemplares machos da espécie nativa *R. quelen*, provenientes primeiramente de uma piscicultura comercial localizada em Toledo, Paraná. Infelizmente

houve alguns entraves que resultaram em uma elevada taxa de mortalidade dos animais, sendo assim para a realização do último ensaio os exemplares foram obtidos na cidade de Francisco Beltrão, Paraná.

Os animais foram transportados através de um veículo disponibilizado pela universidade e estiveram dentro de sacos plásticos aerados durante o percurso até a UNEPE de piscicultura da UTFPR - Dois Vizinhos. Ao chegarem ao setor, onde permaneceram até o momento da coleta, os animais foram primeiramente submetidos a um banho de permanganato de potássio ( $\text{KMnO}_4$ ) de no máximo cinco minutos, com concentrações de 0,5 g/L (Figura 2-A). De acordo com Floyd e Klinger (1999) o permanganato de potássio é um químico utilizado como profilático no controle de bactérias, parasitas e fungos que podem gerar infecções em peixes.

Posteriormente os animais foram colocados em caixas de 250 litros de água, onde permaneceram em aclimatação, com aeração constante e temperatura em torno de 28 °C, por um período de 15 dias (Figura 02-A). Durante esse período eram alimentados duas vezes ao dia com ração 16% de proteína bruta em quantidade equivalente a 10% do peso total.

Figura 02: A- Caixas nas quais os peixes foram aclimatados e banhados com permanganato de potássio ( $\text{KMnO}_4$ ). B- Caixas de polietileno de 50 litros onde foi aplicado o herbicida.



Fonte: Autoria própria.

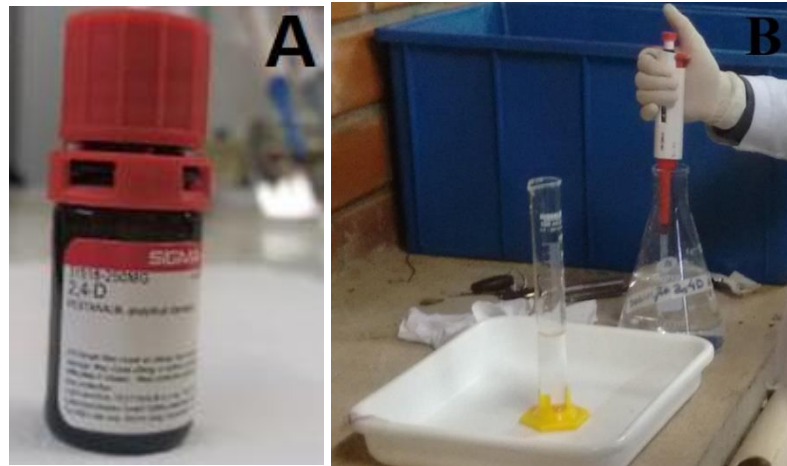
Para a exposição hídrica, os animais foram distribuídos em 12 caixas de polietileno de 50 litros (Figura 02-B), cada uma contendo cinco indivíduos. Destaca-se que foi tomado cuidado para que a distribuição entre as caixas fosse dada de maneira que a massa corporal média apresentada entre os indivíduos fosse equivalente.

Posteriormente ocorreu a adição do herbicida 2,4-D puro (padrão analítico – Sigma Aldrich®) (Figura 03), o qual foi diluído diretamente na água do experimento, na concentração de 60  $\mu\text{g/L}$ , sendo avaliados dois tempos de exposição de 24 e 192 horas. Para o último foi adotado o método de exposição semi-estático, o qual consistiu em troca a cada 48

horas de 30% do volume de água total contendo a concentração inicial da substância teste, sendo imediatamente repostas.

A concentração de 2,4-D de 60 µg/L utilizada neste experimento representa o dobro da dosagem permitida pelo CONAMA, conforme resolução nº 357 de 17 de março de 2005 que “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” (CONAMA, 2005) Para esta resolução a dosagem permitida de 2,4-D para águas da Classe III – águas doces é de 30 µg/L.

Figura 03: A - 2,4-D puro (padrão analítico – Sigma Aldrich®. B- Diluição do herbicida na água do experimento.



Fonte: A- Aliciane de Almeida Roque e B- Autoria própria.

#### 4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais (Tabela 01).

Tabela 01 - Dados dos grupos experimentais.

<b>GRUPOS EXPERIMENTAIS</b>	<b>NÚMERO DE ANIMAIS</b>	<b>TEMPO DE EXPOSIÇÃO (horas)</b>	<b>CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D (µg/L)</b>
C24	15	24	00
H24	15	24	60
C192	15	192	00
H192	15	192	60

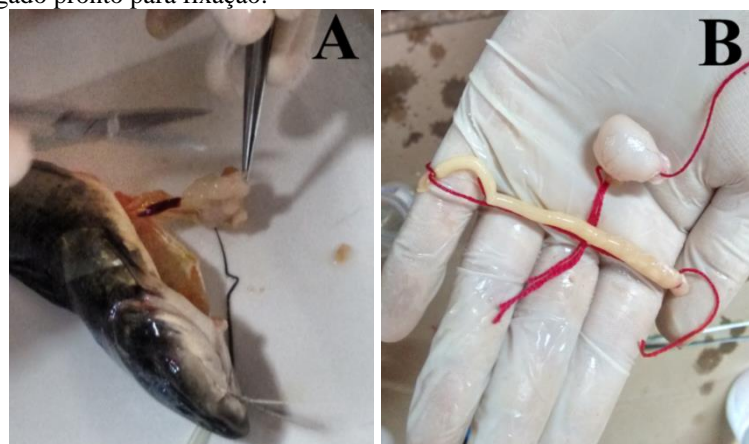
Fonte: Autoria própria.

### 4.3 EUTANÁSIA E COLETA DAS AMOSTRAS

Após o término dos períodos de exposição os animais foram anestesiados com cloridrato de benzocaína ( $C_9H_{11}NO_2$ ) com concentrações de 100 mg/L, segundo as Diretrizes da Prática de Eutanásia estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais (CONCEA, 2013).

Logo após a realização da eutanásia, cinco animais de cada grupo experimental foram selecionados para este estudo. Os animais foram pesados e mensurados e foi realizada a laparotomia e coleta da porção cranial do intestino delgado (Figura 04-A). A porção cranial do intestino delgado (BALDISSEROTTO et al., 2014) foi coletada, lavada com solução salina, pesada, fotografada para posterior mensuração da área intestinal e em seguida preparada para fixação. Foi utilizado o fixador de Giemsa de acordo com Barbosa (1978), o qual é composto de 30 mL de formaldeído 35% ( $CH_2O$ ), 15 mL de ácido acético glacial ( $CH_3COOH$ ), 9 g de cloreto de sódio (NaCl) e 1000 mL de água destilada (BARBOSA, 1978). Para fixação foi ligada a extremidade proximal do órgão com um fio de algodão, injetado fixador no segmento de forma a preencher gentilmente a amostra, ligada também a porção distal com fio de algodão dando ao seguimento aspecto de “bexiga” (Figura 04-B). Por fim as amostras foram imersas em fixador por 48 horas.

Figura 04 – A: Laparotomia e coleta da porção cranial do intestino delgado de *Rhamdia quelen* e B: Segmento cranial do intestino delgado pronto para fixação.



Fonte: Autoria própria.

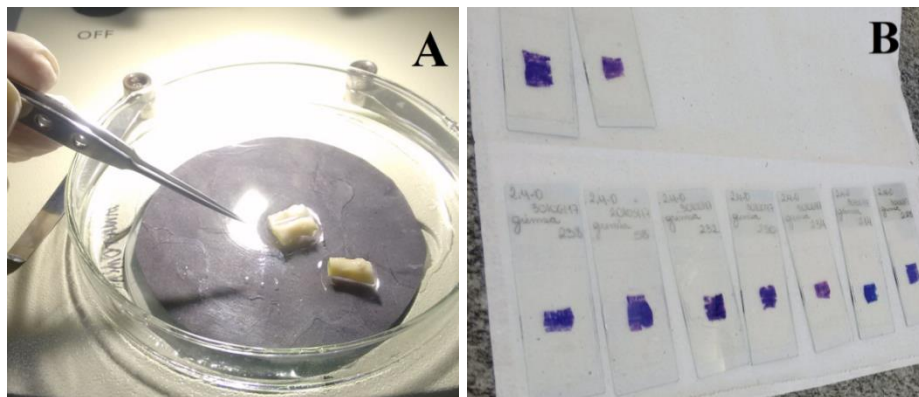


#### 4.4 EVIDENCIAÇÃO NEURONAL

Para a evidenciação neuronal os preparados totais foram corados de acordo com a técnica de Giemsa, modificada por Barbosa (1978). Esta técnica permite a obtenção de preparações diafanizadas, com células neuronais bem coradas e pouca coloração no tecido muscular, desta forma os neurônios ficaram evidenciados e contrastados, obtendo-se transparência na preparação e permitindo uma melhor análise do material.

Para tanto, após 48 horas de fixação das amostras em solução fixadora de Giemsa, preparada com 30 mL de formaldeído (35%), 15 mL de ácido acético glacial, 9 g de cloreto de sódio e 1000 mL de água destilada, foi removido um segmento de aproximadamente um centímetro de comprimento o qual foi aberto pela margem mesentérica sob estereomicroscópio (Figura 05-A). Com auxílio de pinças de ponta fina foram removidas as túnicas mucosa e submucosa para formar um preparado total, composto pela túnica muscular externa e túnica serosa, as quais contêm os neurônios mioentéricos. Esses preparados totais foram utilizados para evidenciação dos neurônios mioentéricos e montagem de lâminas histológicas permanentes (Figura 05-B).

Figura 05 – A: Segmento de 1 cm de comprimento da porção cranial do intestino delgado de *R. quelen* sendo preparado para microdissecção e B: Lâminas histológicas permanentes destes segmentos corados pelo método de Giemsa modificado por Barbosa (1978).

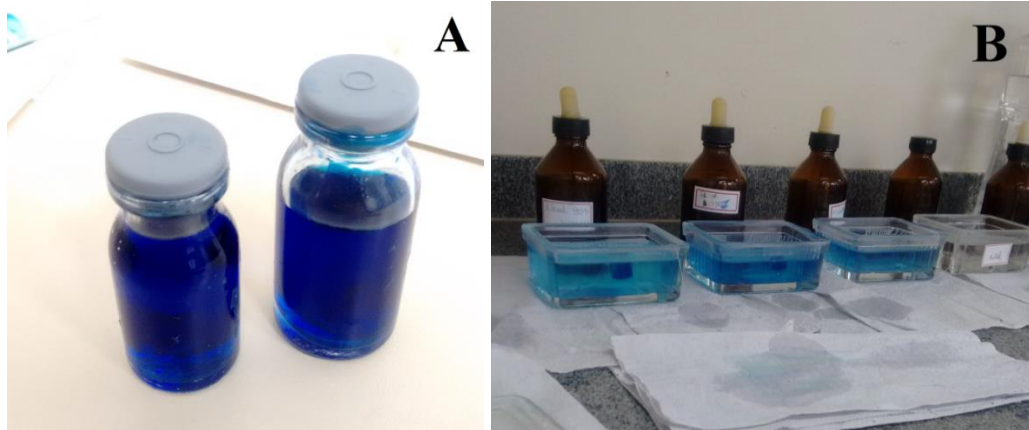


Fonte: Autoria própria.

A solução para evidenciação neuronal foi feita com 4 mL de solução A, contendo 9,780 g de monofosfato ácido de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a qual apresenta pH em torno de 4,60; 6 mL de solução B, contendo 9,465 g de fosfato ácido de sódio ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ), apresentando pH em torno de 9,23; 60 gotas de solução estoque Giemsa contendo 1 g de azul eosina e azul de metileno, 54 mL de glicerol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ), 84 mL de metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) em 90 mL de água

destilada. Os preparados totais permaneceram imersos no corante durante 48 horas em temperatura ambiente (Figura 06-A).

Figura 06 – A: Preparados totais de segmentos da porção cranial do intestino delgado de *R. quelen* imersos em solução corante de Giemsa segundo Barbosa (1978) e B: Processo de desidratação e diafanização destes preparados para confecção de lâminas permanentes.



Fonte: Autoria própria.

Para a confecção das lâminas permanentes os preparados totais de membranas, já dissecados e corados foram desidratados, seguindo uma ordem crescente de álcoois iniciando em 75% até 100% e diafanizados em xilol (Figura 06-B). O preparado total foi disposto entre lâmina e lamínula com resina sintética Permount®.

#### 4.5 ESTUDO MORFOMÉTRICO

As lâminas permanentes foram observadas através de um microscópio de luz acoplado a uma câmera para captura das imagens, utilizando-se lente objetiva com aumento de 40x. Foram capturadas imagens da parte intermediária de cada membrana, as quais foram posteriormente importadas no software Image J, onde foram mensuradas as áreas do corpo celular de 50 neurônios mioentérico para cada lâmina, totalizando 250 neurônios por grupo experimental. Os resultados foram expressos em micrômetros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ).

#### 4.6 ESTUDO QUANTITATIVO

As lâminas permanentes contendo os preparados de membrana corados foram visualizadas em microscópio de luz com lente objetiva no aumento de 40x. Os neurônios foram contados em 50 campos por lâmina, na porção intermediária da membrana. Para a padronização das regiões da circunferência intestinal, sendo o intestino delgado um órgão

tubular, considera-se a borda de inserção do mesentério no intestino como sendo o ponto 0° e, portanto, a região mesentérica se estendendo entre 0° a 60° e 300° a 360°, a região intermediária se estendendo entre 60° a 120° e 240° a 300° e a região antimesentérica representando o intervalo entre 120° a 240° (MIRANDA-NETO et al., 2001).

Em cada campo, todos os neurônios foram contados considerando-se os neurônios que aparecerem pela metade nas margens superior e direita do campo e desprezando-se os que aparecerem pela metade nas margens esquerda e inferior a fim de evitar a dupla contagem de uma mesma célula. Os resultados de contagem neuronal foram tabelados e utilizados para calcular a densidade neuronal – neurônios/cm<sup>2</sup>.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados correspondentes a todas as variáveis coletadas foram submetidos à análise estatística pelo uso do software Graph Pad Prism 6®. Para comparações entre os grupos foi utilizado o teste de ANOVA e Qui Quadrado. O valor de significância adotado foi de 5%.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DADOS CORPORAIS

A tabela 02 resume os parâmetros corporais dos animais ao final do período experimental.

Tabela 02 – Média de massa corporal, comprimento corporal e relação da massa corporal por centímetro corporal de exemplares de *R. quelen* expostos a 0 ou 60 µg de 2,4-D/L de água durante 24 horas, respectivamente, C24 e H24 ou 192 horas, respectivamente, C192 e H192. n = 5, \*= p<0,05 para H192 em relação a C192 segundo teste t de Student.

<b>GRUPOS EXPERIMENTAIS</b>	<b>Massa corporal (g)</b>	<b>Comprimento corporal (cm)</b>	<b>Massa corporal por centímetro corporal (g/cm)</b>
C24	60,38±19,82	18,84±1,88	3,15±0,72
H24	55,24±12,71	18,50±1,38	2,96±0,46
C192	57,25±9,68*	17,85±1,03	3,19±0,34*
H192	42,00±9,93*	16,26±1,16	2,56±0,41*

Fonte: Autoria própria.

Ao final do período experimental os animais dos grupos C192 e H192 apresentaram diferença significativa (p<0,05) em sua massa corporal, tanto quanto na relação entre a massa

corporal por centímetro corporal. Foi possível observar durante a exposição que os animais do H192 não consumiam o mesmo volume de ração que os animais C192, o que resultou na diminuição da sua massa corporal quando comparado ao grupo controle com o mesmo tempo de exposição.

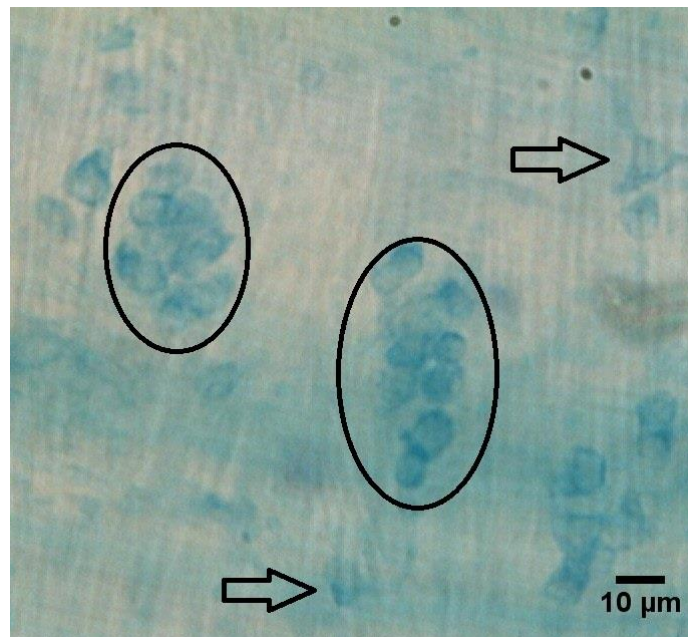
Resultados semelhantes de diminuição da massa corporal foram observados por Fonseca (2007), o qual expôs *R. quelen* a uma formulação comercial de 2,4-D em concentrações de 0,0, 0,5 ou 2,0 mg/L durante 90 dias, observando redução em alguns parâmetros do crescimento como média da massa final, com redução de 37% e 45%, respectivamente, para 0,5 ou 2,0 mg/L e comprimento total do corpo, com redução de 15% para a concentração 2,0 mg/L. Considerando que o 2,4-D é um potente contaminante da água, e que *R. quelen* pode absorver até 30% da quantidade deste herbicida presente na água em apenas 96 horas é provável que uma exposição prolongada afete o crescimento por alterar o metabolismo do peixe (FONSECA, 2007), influenciando a quantidade de alimento ingerido e resultando em perda da massa corporal.

## 5.2 ORGANIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A exposição ao 2,4-D nos tempos e doses utilizados neste trabalho não alterou a organização morfológica do plexo mioentérico da porção cranial do intestino delgado *R. quelen*. Neste segmento intestinal os neurônios mioentéricos foram encontrados na túnica muscular externa, como já observado para o intestino delgado de outros animais como: ratos (MIRANDA-NETO et al., 2001; HANSEN, 2006; CORRÊA, 2010; PEREIRA, 2006), patos (MOLINARI et al., 1994) e também para outras espécies de peixes como a carpa (*Cyprinus carpio*) (GERMANO et al., 2008) e o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (STABILLE et al., 2000).

Foi perceptível com a visualização das lâminas que o plexo mioentérico de *R. quelen* é formado por gânglios compostos por poucos neurônios e que também ocorrem muitos neurônios isolados, ou seja, sem uma organização específica (Figura 07). Germano (2008) e Stabille et al. (2000) observam algo parecido em seus trabalhos com as espécies de peixes citadas anteriormente, descrevendo que o plexo é constituído por neurônios isolados e, também, reunidos em gânglios de distribuição esparsa

Figura 07 – Fotomicroscopia do plexo mioentérico da porção cranial do intestino delgado de *R. quelen*. Gânglios mioentéricos (circulados) e neurônios isolados (setas). Lente objetiva de 40X. Coloração de Giemsa segundo Barbosa (1978).



Fonte: Autoria própria.

Já para ratos, segundo Pereira (2006) os neurônios corados pela técnica de Giemsa foram observados em seus aspectos típicos em gânglios interligados em arranjos semelhantes a uma rede. Corrêa (2010) também cita que os neurônios foram visualizados no interior de gânglios interconectados por feixes de fibras nervosas.

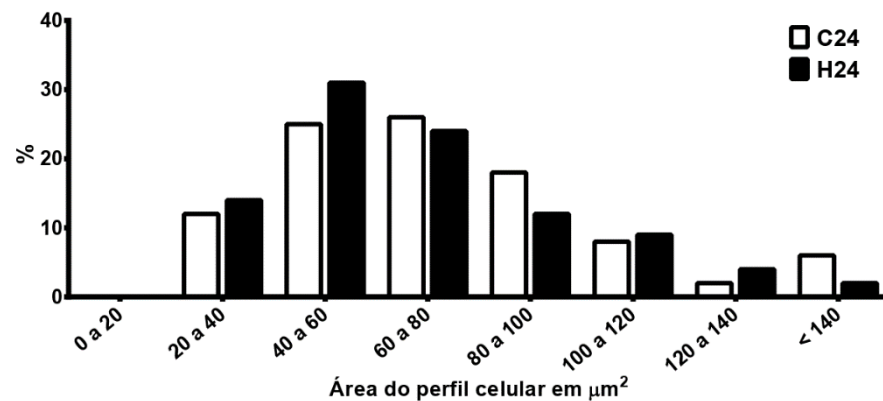
### 5.3 MORFOMETRIA NEURAL

A mensuração foi feita através da área total do perfil celular de 50 neurônios por animal totalizando 250 neurônios por grupo experimental. Os resultados foram distribuídos em forma de frequência de classes, tendo intervalos arbitrários de  $20 \mu\text{m}^2$ . Desta forma foi possível avaliar as proporções de tamanhos de neurônios em cada categoria, de acordo com os grupos experimentais.

Segundo Sousa (2013) os neurônios mioentéricos exibem grande variabilidade de tamanho e forma e o uso de média não expressa todo o leque de variação nos tamanhos desses neurônios. Devido a isso, os dados para mensuração neuronal foram convertidos em distribuições de frequência com intervalos de classes arbitrários de  $20 \mu\text{m}^2$  os quais foram representados como histogramas nas Figuras 08 e 09.

Podemos observar através da Figura 08 que os animais expostos há 24 horas ao herbicida não apresentaram diferença significativa quanto ao tamanho do perfil do corpo celular comparado aos animais controle, esse resultado se deu segundo o teste de qui quadrado, tendo  $p > 0,05$ .

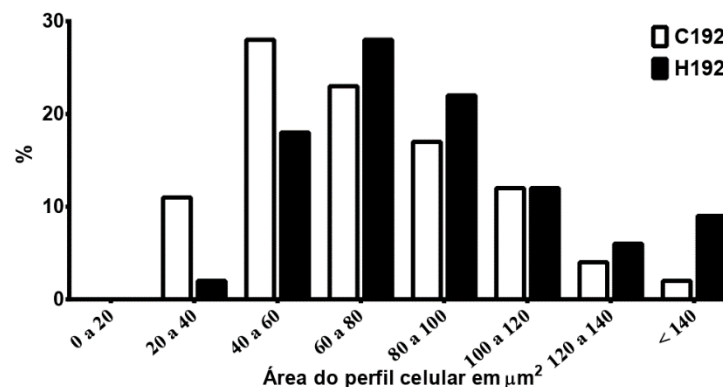
Figura 08 – Histograma de distribuição de frequência em função do tamanho de neurônios mioentéricos na porção cranial do intestino delgado de *R. quelen*, expostos durante 24 horas a concentrações de 2,4-D de 0 (C24) ou de 60  $\mu\text{g/L}$  de água (H24). As diferenças entre as distribuições não são estatisticamente significantes ( $p > 0,05$ ) pelo teste de qui quadrado,  $n=5$ .



Fonte: Autoria própria.

Já em relação aos animais exposto há 192 horas a diferença entre as distribuições são estatisticamente significantes,  $p < 0,05$  segundo teste de qui quadrado, como podemos observar na Figura 09. A exposição ao herbicida nessas condições deslocou para a direita a distribuição de frequência dos neurônios de acordo com seu tamanho revelando que houve uma redução no número de neurônios pequenos e aumento no número de neurônios grandes.

Figura 09 – Histograma de distribuição de frequência em função do tamanho de neurônios mioentéricos na porção cranial do intestino delgado de *R. quelen*, expostos durante 192 horas a concentrações de 2,4-D de 0 (C192) ou de 60  $\mu\text{g/L}$  de água (H192). As diferenças entre as distribuições são estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) pelo teste de qui quadrado,  $n=5$ .



Fonte: Autoria própria.

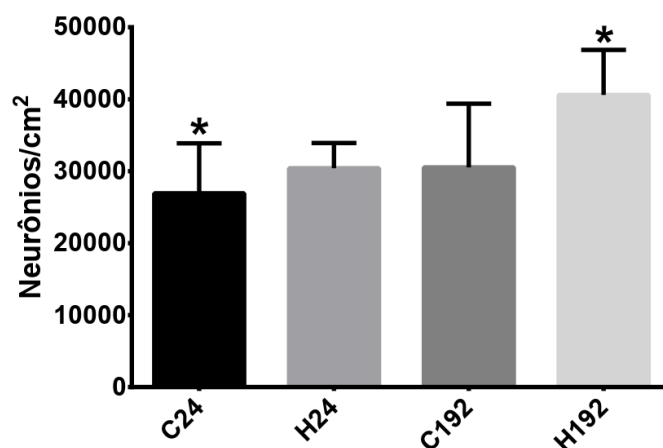
Resultados semelhantes foram observados em trabalhos nas doses de 2,5 e 5 mg/Kg/peso de 2,4-D em experimentos conduzidos por um período de 15 dias sobre o duodeno e o jejuno de ratos (PEREIRA, 2006; CORRÊA, 2010; NANNI, 2010; PEREIRA et al., 2013).

#### 5.4 QUANTIFICAÇÃO NEURAL

Não foram observadas diferenças significativas na área do segmento cranial do intestino delgado entre os grupos experimentais, portanto não foi necessário corrigir os dados de quantificação neuronal para alterações na área intestinal.

Para a quantificação, foram contados os neurônios presentes em 50 campos microscópicos por animal, totalizando 250 campos por grupo experimental. Esses 50 campos correspondem a uma área de 9,8125 mm<sup>2</sup>. Esses resultados foram extrapolados de forma a representar a densidade neuronal, isto é, o número de neurônios por centímetro quadrado, como uma forma mais conveniente de análise e demonstração dos dados, mas sem alterar suas características básicas. Os resultados obtidos estão representados na Figura 10.

Figura 10 – Densidade média de neurônios mioentéricos na porção cranial do intestino delgado de *Rhamdia quelen*, expostos a concentrações de 2,4-D de 0 ou 60 µg/L de água por 24 horas, respectivamente, C24 e H24 ou por 192 horas, respectivamente, C192 e H192. Barras representam o desvio padrão, \* = p<0,05 segundo ANOVA com pós-teste de Tukey, n=5.



Fonte: Autoria própria.

Observou-se que a exposição ao 2,4-D não leva a morte neuronal. Quando analisados pelo teste da ANOVA com comparação múltipla entre os grupos, os dados demonstram que houve diferença significativa (p<0,05) apenas entre os grupos C24 e H192, ou seja, entre o grupo controle avaliado em 24 horas e o grupo exposto ao 2,4-D na concentração de 60 µg/L

por 192 horas. Entre os demais percebe-se que há uma tendência ao aumento do número de neurônios nos grupos expostos ao herbicida, porém sem alcançar significância estatística.

Corrêa (2010) registrou um aumento, apesar de não significativo ( $p > 0,05$ ), no tamanho da subpopulação de neurônios reativos para NADPH-diaforase no jejuno de ratos do grupo experimental, em experimento conduzido por um período de 15 dias e na dosagem de 5mg/kg/dia de 2,4-D. Resultados parecidos foram descritos por Pereira et al. (2013) para o duodeno em condições experimentais semelhantes. Os resultados mostram que, embora por mecanismos ainda desconhecidos, o 2,4-D interfere no plexo mioentérico, alterando o número de neurônios e também propiciando uma maior incidência de neurônios com área de perfil celular grande.

Segundo Jessel (1991) uma das formas dos neurônios responderem a agressão exposta é aumentar seus polirribossomos, RNA e a síntese proteica para tentar compensar a lesão inicial, condição esta que pode levar o pericárdio a aumentar seu tamanho. Portanto, no caso dos animais que foram expostos ao 2,4-D, os neurônios poderiam inicialmente aumentar de tamanho e, depois evoluir para morte celular como apontado por Jessel (1991) enquanto outros neurônios poderiam ainda diminuir o tamanho de sua área celular caracterizando hipotrofia, que pode também ser esperado como um mecanismo básico de resposta a situações de agressão celular, como por exemplo, na redução de nutrientes ou de estímulos necessários para o bom funcionamento da célula. Aumento da expressão de neurotransmissores seguido de injúria neuronal indica que particulares neurotransmissores tomam parte de uma resposta protetora com objetivo de recuperar os neurônios afetados (KRISTENSSON; THEMNER-PERSSON; EKBLAD, 2007).

Um fator importante a ser citado é que a técnica de evidenciação neuronal utilizada neste trabalho marca os neurônios através da interação entre o azul de metileno presente no corante com os polirribossomos nos neurônios. Esta característica do método permite fazer uma relação entre a condição experimental testada e seus efeitos sobre a síntese proteica neuronal. Com esta técnica, nos neurônios que estiverem em maior atividade de síntese proteica a coloração será mais intensa, propiciando sua visualização e contagem e nos que estiverem em baixa atividade de síntese proteica os neurônios não serão corados ou apresentarão coloração pálida, não sendo visualizados e contados. Nestas condições os grupos experimentais que apresentarem mais neurônios em alta atividade de síntese proteica exibirão maior densidade neuronal. Desta forma, os resultados de quantificação neural nos permitem observar que nos animais expostos por 192 horas ao 2,4-D as células neuronais



tendem a aparecer em maior quantidade, ou seja, são mais bem evidenciadas pela técnica de Giemsa por estarem em maior atividade de síntese proteica.

Visto que os neurônios após sua diferenciação não são capazes de proliferação celular e que não houve alteração na área do segmento intestinal analisado, de forma a causar agrupamento ou dispersão dos neurônios e assim afetar a densidade neuronal, não é possível afirmar que a exposição ao 2,4-D leva a um aumento no número de neurônios.

Considerando o que foi dito sobre os prováveis efeitos deste herbicida sobre a síntese proteica é possível afirmar que a exposição ao herbicida tende a promover o aumento na síntese proteica dos neurônios mioentéricos e que esse aumento pode estar ligado a mecanismos endógenos de proteção dos neurônios contra efeitos estressantes da exposição ao herbicida. Entretanto, os mecanismos de ação do 2,4-D sobre o sistema nervoso ainda não são totalmente compreendidos (BONGIOVANNI et al., 2007).

Associado a isso temos o aumento no uso extensivo deste herbicida nas últimas décadas (AMARANTE-JUNIOR et al., 2002) e a baixa disponibilidade de informações sobre seus efeitos sobre peixes, em especial sobre espécies nativas do Brasil. Desta forma fica evidente que mais pesquisas são necessárias para melhor compreender os efeitos do 2,4-D sobre peixes.

## CONCLUSÃO

Nas condições em que o experimento foi conduzido pode-se concluir que o 2,4-D quando aplicado por via hídrica na dose de 60 µg/L por um período de 192 horas tem efeitos sobre o plexo mioentérico de *R. quelen*, levando a alterações manifestadas pela redução na proporção de neurônios pequenos, aumento na proporção de neurônios grandes e aumento na densidade de neurônios mioentéricos em alta atividade de síntese proteica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHI, M. et al. Pesticides and oxidative stress: a review. **Medical Science Monitor**, v. 10, n. 6, p. 141-147, 2004.

ADAPAR. AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ. **Dados Siagro**. 2016. Disponível em:

www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GSV/Agrotoxicos/RESULTADOS\_PUBLICADOS/dados\_siagro.xls Acesso em: 06 Abr 2018.

ADAPAR. AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ. **Dados Siagro**. 2017. Disponível em: www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GSV/Agrotoxicos/RESULTADOS\_PUBLICADOS/dados\_siagro.xls Acesso em: 15 Nov 2018.

ALMEIDA, F. S.; RODRIGUES, B. N. **Guia de herbicidas**. 2. ed. Londrina: Autores, 1988.

AMARANTE JUNIOR, O. P. et al. Revisão das propriedades, usos e legislação ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). **Cadernos de Pesquisa**, São Luís, v. 13, n. 1, p. 60–70, 2002.

ANVISA-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Índice monográfico 2,4-D**. 2015 Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/D27%2B%2B24-D.pdf/8548d5b3-f306-49df-ac49-4498bc5768d8> Acesso em: 27 Mar 2018.

ANVISA-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **PARECER TÉCNICO DE REAVALIAÇÃO Nº 07, de 2015/GGTOX/ANVISA**, 2015. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2541353/CP%2B94-2015%2B-%2BNT.pdf/50fb348f-3c2a-4992-a3a2-ca89fd4d2127> Acesso em: 02 Jun. 2018.

ATEEQ, B.; FARAH, M. A.; AHMAD, W. Detection of DNA damage by alkaline single cell gel electrophoresis in 2,4-dichlorophenoxyacetic-acid- and butachlor-exposed erythrocytes of *Clarias batrachus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, n. 3, p. 348–354, 2005.

ATEEQ, B.; FARAH, M. A.; AHMAD, W. Evidence of apoptotic effects of 2,4-D and butachlor on walking catfish, *Clarias batrachus*, by transmission electron microscopy and DNA degradation studies. **Life sciences**, v. 78, n. 9, p. 977–86, 2006.

BALDISSEROTTO, B. et al. **Biologia e fisiologia e peixes neotropicais de água doce**. Jaboticabal: FUNEP; UNESP, São Paulo, 2014.

BARBOSA, A.J.A. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. **Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica**. v.11, n. 2, p. 95-97, 1978.

BARCELLOS, L. J. et al. Steroid profiles in cultured female jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the first reproductive cycle. **General and comparative endocrinology**, v. 121, p. 325–332, 2001.

BECKER, A. G., et al. Morphometric parameters comparisons of the digestive tract of teleosts with different feeding habits. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, p.862-866, 2010.

BENLI, A.Ç.K., et al. Investigation of acute toxicity of (2, 4-dichlorophenoxy) acetic acid (2, 4-D) herbicide on crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 296– 299, 2007.

BERWICK, P. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid poisoning in man. **JAMA**, v. 214, n. 6, p. 1114-1117, 1970.

BONGIOVANNI, B. et al. Melatonin decreases the oxidative stress produced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rat cerebellar granule cells. **Neurotoxicology Research**, Little Rock, v. 11, p. 93-99, 2007.

BORGES, A. **Valores hematológicos e bioquímicos séricos, efeitos de doses subletais da cipermetrina e características físico-químicas do sêmem do Jundiá *Rhamdia quelen***. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

BORTOLOZZI, A. et al. Regionally specific changes in central brain monoamine levels by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in acute treated rats. **Neurotoxicology**. v. 19, n. 6, p. 839-852, 1998.

BORTOLOZZI, A. et al. Intracerebral administration of 2,4-ciclorophenoxyacetic acid induces behavioral and neurochemical alterations in the rat brain. **Neurotoxicology**, v. 22 n. 2, p. 221-232, 2001.

BRADBERRY, S. M. et al. Mechanisms of toxicity, clinical features, and management os acute chlorophenoxy herbicide poisoning: a review. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**. v. 38, p. 111-122, 2000.

BRASIL. **PORTARIA Nº 03/MS/SNVS, DE 16 DE JANEIRO DE 1992**. Disponível em: <http://www.aenda.org.br/wp-content/uploads/2018/02/portaria-anvisa-03-1992-avaliacao-toxicologica.pdf> Acesso em 20 Jul. 2018

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Extrato de Parecer Técnico nº 4.406/2015. **Diário Oficial da União**, nº 56, p. 8, 24 de março de 2015.

BUKOWSKA, B. Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid – Molecular Mechanisms. Poland, **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 3, 2006.

CARNEIRO, P. C. F.; SCHORER, M.; MIKOS, J. D. Tratamentos terapêuticos convencionais no controle do ectoparasita *Ichthyophthirius multifiliis* em jundiá (*Rhamdia quelen*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.1, p.99-102, 2005.

CATTANEO, R. et al. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. Elsevier **Journal Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 92, n. 3, p. 133-137, 2008.

CHRISTENSEN, M. D. J. **The motility of the gastrointestinal tract**. The University of Iowa College of Medicine Iowa City, Iowa, 2001.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Disponível em:

<<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> Acesso em: 14 mar 2018.

CONCEA. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Resolução Normativa nº 13, 20 de setembro de 2013. **Diário Oficial da União**, p. 5–12, 2013.

CORRÊA, O. P. **Efeitos da ingestão de ácido 2,4 diclorofenoxiacético sobre os neurônios mioentéricos do jejuno de ratos – Análises quantitativas e morfométrica**. Dissertação mestrado em ciência animal. Universidade paranaense. p. 69, 2010.

COSTA, M.; BROOKES, S.J.H.; HENNING, G.W. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. **Gut BMJ Journals**, v. 47, n. 90004, p.15-19, 2000. Disponível em:

<[http://gut.bmj.com/content/gutjnl/47/suppl\\_4/iv15.full.pdf](http://gut.bmj.com/content/gutjnl/47/suppl_4/iv15.full.pdf)> Acesso em: 26 Mar 2018.

DUTRA, L. S.; FERREIRA, A. P. Associação entre malformações congênitas e a utilização de agrotóxicos em monoculturas no Paraná, Brasil. **Saúde em Debate**, v. 41, n. spe2, p. 241–253, 2017.

ELO, H.A.; MACDONALD, E. Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on biogenic amines and their acidic metabolites in brain and cerebrospinal fluid of rats. **Archives of Toxicology**, v. 63, p. 127-130, 1989.

EMBRAPA. **Pesca e aquicultura**. Palmas: Embrapa, 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-pesca-e-aquicultura/>>. Acesso em: 25 Mai. 2018.

FLOYD, F.R.; KLINGER, R.E. **Use of permanganate to control external infections of ornamental fish**. University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences. p.1-5, 1999.

FONSECA, M. B. **Crescimento e parâmetros toxicológicos em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a uma formulação comercial do herbicida 2,4-D**. Dissertação de mestrado na Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2007.

FRIEDRICH, K. **Avaliação dos efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutivo, hormonal e câncer para seres humanos após o uso do herbicida 2,4-D**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2014.

FROEHNER, S., NETO, D.M., MACHADO, K.S. Avaliação do transporte do ácido 2,4-diclorofenoxiacético através de um lisímetro. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p.1809-1813, 2012

FURNESS, J.B.; COSTA, M. **The enteric nervous system**. Department of Anatomy and Cell Biology. University of Melbourne, Victoria, Australia, p. 29, 1987.

GABELLA, G. Detection of nerve cells by a histochemical technique. **Experientia**, v. 25, p. 218-219, 1969.

GABELLA, G. On the plasticity of form and structure of enteric ganglia. **Journal of The Autonomic Nervous System**, Netherlands: Elsevier BV, v. 30, p. 59-66, 1990.

GABELLA, G. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. **Neuroscience**. v. 22, n. 2, p. 737-752, 1987.

GERMANO, M.R. et al. Análise morfométrica de neurônios mientéricos NADH-Diaforase positivos do bulbo intestinal de *Cyprinus carpio* (Linnaeus 1758) (Osteichthyes, Cyprinidae). **Revista Saúde e Pesquisa**. v. 1, n. 1, p. 07-13, 2008.

GERSHON, M.D. **O segundo cérebro**. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, p. 350, 2000.

GIORA, J.; FIALHO, C. B. Biologia alimentar de *Steindachnerina brevipinna* (Characiformes, Curimatidae), do rio Ibicuí-Mirim, Rio Grande do Norte, Brasil. *Iheringia, Série Zoologia*, v. 93, n. 3, p. 277-281, 2003.

GOLDSTEIN, A. M.; HOFSTRA, R. M. W.; BURNS, A. J. Building a brain in the gut: development of the enteric nervous system. *Clinical Genetics*, v. 83, n. 4, p. 307-316, 2013.

GOMES, L. C. et al. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Ciência Rural*, v. 30, n. 1, p. 179 – 185, 2000.

GRAAFF V. G., KENT, M. **Anatomia Humana**. 6. ed. Barueri, São Paulo: Manole, 2003.

GUEDES, D.S. **Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia spp.*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae)**. Santa Maria – RS, 1980. 99p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1980.

HANSEN, M. B. **The Enteric Nervous System I: Organisation and Classification** Department of Gastrointestinal Surgery K, Bispebjerg University Hospital of Copenhagen, DK-2400 Copenhagen NV, Denmark, 2003.

HANSEN, M. B. The enteric Nervous System II: Gastrointestinal. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, New York, v. 92, p. 105-113, 2006.

HARDELL, L. Pesticides, soft-tissue sarcoma and non-Hodgkin lymphoma - historical aspects on the precautionary principle in cancer prevention. **Acta Oncologica**, v. 47, p. 347-354, 2008.

HERNÁNDEZ, D. R.; PÉREZ, M. G.; DOMITROVIC, H. A. Morphology, Histology and Histochemistry of the Digestive System of South American Catfish (*Rhamdia quelen*). **Journal Morphology**, v.27 n.1, Temuco, 2009.

IARC-International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. **A review of human carcinogens**. Part F: Chemical agents and related occupations. 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-*para*-dioxin, 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran, and 3,3,4,4,5- pentachlorobiphenyl. v. 100, Lyon/França, 2012.

IBAMA – Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatório de comercialização de agrotóxicos**, 2016. Disponível em: <

<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios>> Acesso em: 16 jun. 2018.

IBAMA – Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Os 10 ingredientes ativos mais vendidos**, 2016. Disponível em: <  
<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios>> Acesso em: 16 jun. 2018.

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

JESSEL, T. M. **Reactions of neurons to injury**. In: KANDEL, E. R; SCHWARTZ, J. H; JESSELL, T. M. Principles of neural science. Norwalk: Appleton & Langue, 1991.

KENNEPOHL, E.; MUNRO, I. C. **Phenoxy Herbicides (2,4-D)** In: KRIEGER, R. Handbook of Pesticide Toxicology: Principles, c.72, v.2, 2001.

KREUTZ, L. C. et al. Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, Santa Maria, 2008.

KRISTENSSON, E. A.; THEMNER-PERSSON, A.; EKBLAD, E. Survival and neurotransmitter plasticity in cultured rat colonic myenteric neurons. **Regulatory peptides**. v. 140, p. 109-116, 2007.

MACHADO, A. **Neuroanatomia Funcional**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2. ed, p. 129-150, 2004.

MEURER, S., ZANIBONI FILHO, E. Hábito alimentar do jundiá *Rhamdia quelen* (Pisces, *Siluriformes*, *Pimelodidae*), na região do alto rio Uruguai. In: XII ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA. **Anais**. São Paulo: SBI, p. 29, 1997.

MIGUEL, M. G.; SOUSA, S. I. G.; CARDOSO, J. C.R. Efeitos tóxicos dos pesticidas. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v. 49. n. 3 p. 105-119, 1999.

MIRANDA-NETO, M.H. et al. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v. 59, n. 1, p. 54-59, 2001.

MIRON, D.S. et al. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.61, p. 398-403, 2005.

MOLINARI, S. L. et al. Estudo morfológico do plexo mioentérico do estômago do pato (*Anas sp.*) **Unimar**, v. 16, p. 419-426, 1994.

MONTANHA, F. P. et al. Características fisiológicas e reprodutivas do *Rhamdia quelen*. **Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 17, p. 8, 2011.

MUÑOZ, L. et al. Histopathological biomarkers in juvenile silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to a sublethal lead concentration. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 241–247, 2015.

NANNI, W. **Avaliação morfoquantitativa de neurônios mientéricos do cólon proximal de ratos tratados com o herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Paranaense - UNIPAR, Umuarama, 2010.

NPIC-NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER. **2,4-D Technical Fact Sheet**. USA, 2000. Disponível em: <<http://npic.orst.edu/factsheets/archive/2,4-DTech.html>> Acesso em: 14 Mai. 2018.

ORIÁ, B. R., BRITO, G. **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**. São Paulo: Blucher, 2016. Disponível em: <<http://openaccess.blucher.com.br/article-list/sistema-digestorio-317/list#articles>> Acesso em: 26 Mar 2018.

PALMEIRA, C.M. et al. Structural alterations in isolated hepatocytes induced by the herbicides paraquat, dinoseb, and 2,4-D. **Medical Science Research**, v. 25, p. 339-342, 1997.

PAMPLONA, J. H. **Avaliação dos efeitos tóxicos da dipirona sódica em peixe *Rhamdia quelen*: estudo bioquímico, hematológico e histopatológico**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PEREIRA, A. P. C. **Efeitos da ingestão do ácido 2,4-diclorofenoxiacético sobre neurônios mioentéricos do duodeno de ratos (*Rattus norvegicus*)**. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo, 2006.



- PEREIRA, J. N. B. et al. Alterations in the duodenum myenteric neurons of Wistar rats after ingesting of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid. **Journal of Morphological Science**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 28-32. 2013.
- PERES, F; MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.
- QURRATU, A.; REEHAN, A. A Review of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) Derivatives: 2,4-D Dimethylamine Salt and 2,4-D Butyl Ester. **Journal of Applied Engineering Research**, v. 11, n. 19, 2016.
- SANCHEZ-BRUNETE, C. GARCIA, V. A. I. TADEO, I. L. Determination of residues of phenoxyacid herbicides in soil and cereals by gas chromatography-ion trap detection. **Journal of Chromatography A**, v. 675, p.213- 218, 1994.
- SANTER, R. M. Survival of the population of NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of aged rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**, 1994.
- SANTOS, J.C. et al. Determination of rice herbicides, their transformation products and clofibric acid using on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography with diode array and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 879, p. 3- 12, 2000.
- SARIKAYA, R.; YILMAZ, M. Investigation of acute toxicity and the effect of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae). **Elsevier**, v. 52, p. 195-201, 2003.
- SCHVARTSMAN, S. **Intoxicações agudas**. São Paulo: Ed. Sarvier, 4. ed, p. 266-267, 1991.
- SEIXAS FILHO, J. T. et al. Anatomia funcional e morfometria do intestino do Teleostei (Pisces) de água doce surubim. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.6, p. 1670-1680, 2001.
- SILFVERGRIP, A.M.C. **A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. Stockholm, Sweden, 1996. 156p. (PhD Thesis) - Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, 1996.
- SILVA, N. B.; GURGEL, H. C. B.; SANTANA, M. D. Histologia do sistema digestório de saguiri, *Steindachnerina notonota* (Miranda Ribeiro, 1937) (Pisces, Curimatidae), do rio

Ceará Mirim, Rio Grande do Norte, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Pulo, v. 31, n. 1, p. 1-8, 2005.

SOUSA, F.C.; MIRANDA-NETO, M.H. Morphometric and quantitative study of the myenteric neurons of the stomach of malnourished aging rats. **Nutritional Neuroscience**, England, v. 12, n. 4, p.167-174, 2009.

SOUSA, F. C. **Fumonisin e seus efeitos sobre o sistema nervoso entérico de Ratos wistar**. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração – Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, 2013.

STABILLE, S.R. et al. Considerações morfológicas e quantitativas sobre os neurônios do plexo mientérico do segmento intestinal médio da carpa *Cyprinus carpio* (Linnaeus 1758). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**. v. 4, 2000.

STERNINI, C. Structural and chemical organization of the myenteric plexus. **Reviews Physiology**, v. 50, p. 81-93, 1988.

TOMLIN, C. The pesticide manual: incorporating the agrochemicals handbook. Cambridge: British Crop Protection Council, the **Royal Society of Chemistry**, p. 1341, 1994.

VAN DER OOST, R. et al. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Journal of Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.13, p.57-149, 2003.

VIEIRA, M. G. et al. Avaliação da Contaminação por Agrotóxicos em Mananciais de Municípios da Região Sudoeste do Paraná. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 5, 2017. Disponível em: <http://rvq.sbq.org.br/imagebank/pdf/MarcosNoPrelo.pdf> Acesso em: 08 Mai. 2018.

WADE, P. R.; COWEN, T. Neurodegeneration: a key factor in the ageing gut. **Neurogastroenterology Motil**, v. 16, p. 19–23, 2004.

## Anexo 01



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
Câmpus Dois Vizinhos  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



## PROJETO DE PESQUISA / AULA PRÁTICA

<b>Título:</b>	Avaliação múltipla dos efeitos tóxicos do herbicida 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) sobre a espécie nativa <i>Rhamdia quelen</i> (Pisces: Siluriformes)
<b>Área Temática:</b>	Ciências Ambientais
<b>Pesquisador / Professor:</b>	Profa. Dra. Nédia de Castilhos Ghisi
<b>Instituição:</b>	UTFPR/ Dois Vizinhos
<b>Financiamento:</b>	Não há
<b>Versão:</b>	02

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA	Protocolo nº 2016-18
<p><b>Apresentação do Projeto:</b> O projeto em apreciação visa avaliar os possíveis efeitos do herbicida 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) em <i>Rhamdia quelen</i> (Pisces: Siluriformes).</p>	
<p><b>Objetivo:</b> A presente proposta tem como objetivo avaliar os efeitos tóxicos da exposição aguda e subcrônica pelas vias hídrica e trófica ao herbicida 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) sobre a espécie nativa <i>Rhamdia quelen</i>, através da avaliação de diferentes biomarcadores. Os objetivos específicos dessa proposta são: 1- Avaliar a exposição por via hídrica do potencial tóxico do herbicida 2,4-D, por tempos de 24, 48, 96 e 192 horas, nas concentrações de 15, 30 e 60 µL, através de biomarcadores de genotoxicidade, mutagenicidade, citotoxicidade, análises morfológicas, análises bioquímicas e análise de desregulação endócrina; 2- Avaliar a exposição por via trófica do potencial tóxico do herbicida 2,4-D, por tempos de 24, 48, 96 e 192 horas, nas concentrações posteriormente definidas, através de biomarcadores de genotoxicidade, mutagenicidade, citotoxicidade, análises morfológicas, análises bioquímicas e análise de desregulação endócrina; 3- Oferecer oportunidade e estrutura para realização de trabalhos de conclusão de curso, iniciação científica e dissertações de mestrado no campus Dois Vizinhos da UTFPR e parceiras, contribuindo para formação de recursos humanos capacitados para realizar várias técnicas de análise e com senso crítico quanto aos problemas ambientais.</p>	
<p><b>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</b> Os organismos-alvo desta proposta, os peixes <i>Rhamdia quelen</i>, serão submetidos a exposições hídrica e trófica do herbicida 2,4-D em concentrações que próximas àquelas que encontrariam em seu ambiente natural contaminado pelo mesmo. Embora esta exposição intencional vise observar os prováveis malefícios causados pelo produto nestes animais, a proposta central do trabalho muito relevante, uma vez que o 2,4-D é um produto com história curta e, conseqüentemente, seus efeitos de longo prazo no ambiente e também nas comunidades humanas são desconhecidos. Assim, os efeitos tóxicos que sejam eventualmente detectados nestes peixes deverão servir de parâmetro para medidas de melhor controle no uso do herbicida.</p>	



**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A metodologia a ser aplicada é compatível com os objetivos da proposta, inclusive é semelhante ao que tem sido feito na área de pesquisa, demonstrado através de citações de publicações atualizadas (ano de 2016).

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram anexados à presente solicitação os seguintes termos e documentos: 1) o requerimento preenchido e assinado pelo pesquisador responsável pelo projeto; 2) o formulário unificado de encaminhamento ao CEUA-UTFPR, com os ajustes solicitados no parecer anterior (versão 01); 3) projeto de pesquisa completo no modelo da PROPPG-CEUA; 4) a declaração de não início do projeto (com assinatura e data); 5) Declaração de médico veterinário, datado e assinado, como responsável técnico pelo bem estar dos animais utilizados durante a execução do projeto; 6) o registro de projeto junto à DIRPPG-DV.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Todos os documentos exigidos foram apresentados e em ordem e, como já comentado, os riscos inerentes aos peixes do experimentos são compensados pelos benefícios que os futuros resultados deverão trazer.

No parecer anterior (versão 1) deste mesmo protocolo foram exigidos ajustes ou justificativas para os seguintes três itens da proposta:

- 1) Correção nas tabelas do item 10.11 que indicam somente tratamentos com concentrações de 15 µg/L, enquanto o declarado no restante do documento seriam 15, 30 e 45 µg/L;
- 2) Ainda no item 10.11, solicitou-se maiores explicações que fundamentassem e justificasse o uso de tantos animais extras como controle para cada tratamento;
- 3) Para a segunda fase do experimento, que seria da exposição em via trófica, definir as concentrações do herbicida a serem experimentadas (e não serem decididas *a posteriori*), ou apresentar justificativa plausível para tal indefinição.

A proponente fez todos os ajustes e explicações solicitadas. Particularmente quanto à questão do uso de triplicatas dos grupos controle, demonstrou, através de publicações atualizadas em periódicos científicos renomados, que esta é uma prática corrente em termos de delineamento amostral para o tipo de experimentação científica da área. Quanto à definição das concentrações do herbicida no experimento via trófica, a proponente seguiu as recomendações da instrução OECD 420 (da *Organisation for Economic Co-operation and Development*) que indica parâmetros de experimentação quanto a testes de toxicidade aguda em animais não-humanos. O fato de apelar-se em parâmetros respeitados internacionalmente indicaram a esta CEUA a concordância com o procedimento.

**Situação do Parecer:**

APROVADO

**Considerações Finais a Critério da CEUA:**

Todos os procedimentos devem seguir a lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Todos os membros presentes na reunião de 13 de setembro de 2016 acompanharam a decisão do parecerista.



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
Câmpus Dois Vizinhos  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação múltipla dos efeitos tóxicos do herbicida 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) sobre a espécie nativa *Rhamdia quelen* (Pisces: Siluriformes)", protocolo nº 2016/018, sob a responsabilidade de Nédia de Castilhos Ghisi - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UTFPR) da UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, em reunião de 13/09/2016.

Vigência do projeto:	De 16/10/2016 a 10/01/2019
Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Espécie/linhagem:	<i>Rhamdia quelen</i> (Pisces: Siluriformes)
Número de animais:	576
Peso/Idade:	50 g
Sexo:	Masculino
Origem:	Piscicultura comercial

Dois Vizinhos, 14 de setembro de 2016.

Assinado por:

Gustavo Sene Silva

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná