

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CAMPUS DOIS VIZINHOS  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – LICENCIATURA**

**BRUNA GABRIELE DA SILVA PINTO**

**ANÁLISE DA TOXICIDADE DO HERBICIDA  
2,4-D (ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO) SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE EMBRIÕES DE AVE (*Gallus gallus  
domesticus* L. 1758)**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II**

**DOIS VIZINHOS  
2020**

**BRUNA GABRIELE DA SILVA PINTO**

**ANÁLISE DA TOXICIDADE DO HERBICIDA  
2,4-D (ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO) SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE EMBRIÕES DE AVE (*Gallus gallus  
domesticus* L. 1758)**

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado à Coordenação do Curso de em Ciências Biológicas – Licenciatura, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Franchi de Freitas

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nédia de Castilhos Ghisi

**DOIS VIZINHOS  
2020**

## TERMO DE APROVAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso nº \_\_

**Análise da toxicidade do herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenxiacético) sobre o desenvolvimento inicial de embriões de ave (*Gallus gallus domesticus* L. 1758)**

por

**BRUNA GABRIELE DA SILVA PINTO**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado às 19 horas do dia 10 de dezembro de 2020, 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**.

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maristela Azevedo Linhares  
Instituto de Tecnologia do Paraná  
(Tecpar)

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Patricia Franchi de Freitas  
Orientador  
UTFPR - DV

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Nédia de Castilhos Ghisi  
Coorientadora e Presidente da banca  
UTFPR - DV

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Joelma Nilza dos Santos Leão  
Buchir  
UFPR

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Gustavo Sene Silva  
Coordenador do Curso de Ciências Biológicas  
UTFPR - DV

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

## DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus, por ser tão generoso comigo.  
Aos meus pais Luiz e Ivanir por toda a dedicação na minha criação.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre me manter de pé em todas as situações, me fazendo acreditar em um dia após o outro. Pela oportunidade de ser a primeira da família a se formar através de uma universidade pública.

À minha família, em especial meus pais Luiz e Ivanir, e ao meu irmão Luiz Gustavo, que me apoiaram incansavelmente acreditando no meu potencial, os quais nunca me deixaram a mercê e sempre apoiaram meus estudos.

Agradeço a todos os professores que participaram de maneira direta ou indiretamente da minha trajetória acadêmica. Em especial minhas orientadoras Patrícia, a qual me ensinou a trabalhar com amor, não só dentro da área da pesquisa, mas em tudo na vida, e que só assim será satisfatório, e a Nédia por ter sido praticamente uma mãe comigo dentro da universidade, acreditando no meu potencial mais que eu mesma, me dando oportunidade de crescer como profissional e pessoa, e por todo o ensinamento, até porque sou muito curiosa e incansável nas objeções, e sempre com muita paciência sanou todas elas. Enfim a essas professoras maravilhosas deixo a minha gratidão.

Estendo os meus agradecimentos a todos que me ajudaram durante o desenvolvimento da pesquisa, desde de a coleta aos resultados finais, em especial a minha amiga Juliana, por todos os momentos durante a graduação e pelo apoio durante o desenvolvimento do estudo. A minha colega Ana por todo auxílio durante a pesquisa, principalmente na parte estatística, a qual me ajudou a desenvolver meus dados finais. Agradeço também ao suporte da professora Lilian.

Agradeço ao grupo de pesquisa Ecotoxigen da UTFPR-DV por toda a amizade e troca de ensinamentos. À turma 2016/1 a qual me adotou após a volta de São Paulo, pelas amizades, carinhos e alegrias que me proporcionaram, a todos gratidão e saudades. Aos meus amigos Caroline, Luana, Thaís, Francisco, Juliana e tantos outros, são muitos os que passaram pela minha vida através da universidade, e todos levo com muito carinho no coração. As minhas amigas da vida Ana, Andriele, Josiane e Cláudia, agradeço por toda amizade e carinho. As minhas companheiras e amigas de futsal do time Lobass, em especial Mariane, Luana, Cristiane e Natiele, gratidão por todos os momentos e por sempre me incentivarem a prosseguir em busca dos meus sonhos.

Agradeço ao meu companheiro Ariel, por sempre estar ao meu lado, sendo meu ponto de segurança em muitos momentos. Muito obrigada por toda a paciência e compreensão, por todas as viagens durante os experimentos, pelo companheirismo durante noites de finais de semanas na universidade, sou extremamente grata por todo amor e carinho.

Por fim agradeço à Capes pela concessão da bolsa através do programa de Residência Pedagógica que me propiciou poder me manter na universidade durante um longo período, assim como o auxílio estudantil da UTFPR. Agradeço a Universidade Tecnológica Federal do Paraná campus Dois Vizinhos, pelo auxílio financeiro o qual o projeto foi contemplado pelo edital SEI/UTFPR - 0738254/2019 de Apoio aos Trabalhos de Conclusão de Curso com foco em Inovação.

*“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes. ”*

Isaac Newton

## RESUMO

Pinto, Bruna Gabriele da Silva. **Análise da toxicidade do herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) sobre o desenvolvimento inicial de embriões de ave (*Gallus gallus domesticus* L. 1758).** 2020. 81 f. Trabalho de Conclusão de Curso II – Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2020.

Atualmente tem se falado muito sobre a contaminação ambiental causada pelo uso indiscriminado de fitossanitários, e os riscos que os mesmos podem apresentar à saúde humana. O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), é um herbicida muito utilizado na agricultura devido à sua eficácia na eliminação de plantas daninhas de folhas largas, porém o seu mecanismo de toxicidade em células animais ainda é pouco conhecido. Estudos revelam alterações no desenvolvimento de indivíduos frente à exposição ao contaminante, porém, são fracas as evidências dos efeitos em períodos pré-natal no desenvolvimento de diferentes espécies. O presente estudo buscou por meio de análises morfogênicas, e também genotóxicas, avaliar os efeitos do 2,4-D sobre o desenvolvimento embrionário de aves (*Gallus gallus domesticus* L. 1758) após 72 horas de incubação, em diferentes concentrações, tendo como base a concentração permitida pela legislação brasileira. Foram realizados, via ensaios laboratoriais, testes onde os embriões de *G. gallus* foram submetidos à exposição através de inoculação às concentrações 15, 30 e 60 µg de 2,4-D/L, além de um controle fechado, um controle veículo (H<sub>2</sub>O) e o controle positivo MMS. O embrião de ave é o modelo ideal para o experimento, pois apresenta semelhanças morfológicas com outros vertebrados, inclusive humanos, em determinados estádios de desenvolvimento (que incluem o 3º dia de incubação), além de ser um modelo experimental de fácil manipulação. Após 72 horas, os embriões submetidos às três concentrações do 2,4-D, evidenciaram uma alteração significativa na taxa de mortalidade, além de aumentar a incidência de malformações. Os embriões apresentaram alterações morfológicas na região encefálica, caracterizadas pela presença de atrofia e hipotrofia do mesencéfalo e falha no fechamento do tubo neural na região do crânio. Nas demais regiões foram encontradas malformações como falha no fechamento lateral e caudal do corpo, caracterizando gastrosquise, disgenesia caudal e atrofia caudal. Os embriões dos grupos expostos não apresentaram alteração significativa da frequência cardíaca, nem dos estágios encontrados. As análises realizadas através da técnica de ensaio cometa, revelaram efeitos genotóxicos significativos. Esses resultados demonstraram os efeitos nocivos do agente 2,4-D, tanto ao nível molecular como celular. Dessa forma, concluiu-se que os efeitos do 2,4-D sobre embriões de galinha, revelaram uma preocupação quanto à exposição pré-natal humana, principalmente na concentração de 30µg/L, a qual é a concentração máxima permitida e estabelecida pela legislação brasileira.

**Palavras-chave:** Morfologia, Ensaio cometa, Fitossanitário, Contaminantes, Mutação.



## ABSTRACT

Pinto, Bruna Gabriele da Silva. **Toxicity analysis of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the initial development of bird embryos (*Gallus gallus domesticus* L. 1758).** 2020. 81 f. Course Completion Work II - Bachelor's Degree in Biological Sciences, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2020.

Currently, much has been said about environmental contamination caused by the indiscriminate use of phytosanitary products, and the risks that they can present to human health. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is a herbicide widely used in agriculture due to its effectiveness in eliminating broadleaf weeds, but its mechanism of toxicity in animal cells is still poorly understood. Studies reveal changes in the development of desired ones due to exposure to the contaminant, however, they are not as evidence of the effects in prenatal periods on the development of different species. The present study sought, by means of morphogenic and genotoxic analyzes, to evaluate the effects of 2,4-D on the embryonic development of birds (*Gallus gallus domesticus* L. 1758) after 72 hours of incubation, under different requirements, as based on one permitted by Brazilian law. Tests were performed, through laboratory tests, where the embryos of *G. gallus* were exposed through inoculation to procedures 15, 30 and 60 µg of 2,4-D/L, in addition to a closed control, a vehicle control (H<sub>2</sub>O) and the positive MMS control. The bird embryo is the ideal model for the experiment, as it presents morphological similarities with other vertebrates, including humans, in certain stages of development (which includes the 3rd day of incubation), in addition to being an experimental model of easy manipulation. After 72 hours, the embryos after three exercises performed 2,4-D, showed a significant change in the mortality rate, in addition to increasing the increase in malformations. The embryos dissipated morphological in the brain region, characterized by the presence of atrophy and hypotrophy of the midbrain and failure to close the neural tube in the blood region. In the other regions, malformations such as failure in lateral and caudal closure of the body were found, characterizing gastroschisis, caudal dysgenesis and caudal atrophy. The embryos of the exposed groups did not have reduced heart rate dissipation, nor of the stages found. The analyzes carried out using the comet assay technique, revealed evaluated genotoxic effects. These results demonstrated the harmful effects of the 2,4-D agent, both at the molecular and cellular levels. Thus, we conclude that the effects of 2,4-D on chicken embryos, revealed a concern regarding human prenatal exposure, mainly in the concentration of 30µg/L, which is the maximum allowed and applied by legislation Brazilian.

**Keywords:** Morphology, Comet assay, Phytosanitary, Pollutants, Mutation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Processo de contaminação dos sistemas aquáticos por fitossanitários sintéticos .....	21
Figura 2 - Fenômeno de biomagnificação ao longo da cadeia alimentar.....	22
Figura 3 - Estrutura química da molécula do 2,4-D.....	27
Figura 4 - Semelhanças morfológicas entre embriões de aves com 3 a 5 dias de desenvolvimento e embriões humanos com 3 a 5 semanas de desenvolvimento.....	33
Figura 5 - Representação da sequência de respostas biológicas frente a exposição a poluentes.....	34
Figura 6 – Padrões típicos de migração de DNA: A - núcleos celulares não expostos a agentes genotóxicos com ausência de danos (dano 0); B - núcleos celulares expostos a agentes genotóxicos com danos do tipo 1; C - núcleos celulares com danos do tipo 2; D - núcleos celulares com danos do tipo 3; E - núcleos celulares com danos do tipo 4.....	35
Figura 7 - Desenho esquemático do ovo. A: Indicação de suas partes. B: Injeção do contaminante na câmara de ar.....	41
Figura 8 - A: Incubadora para ovos construída sob encomenda. B: Bandejas plásticas utilizadas para incubar os ovos posicionados com a câmara de ar voltada para cima.....	42
Figura 9 - A: Abertura da casca com auxílio de tesoura cirúrgica. B: Visualização do embrião in ovo. Área circulada: Janela aberta conforme o tamanho do embrião.....	42
Figura 10 - A: Embrião vivo com 72 horas de incubação. B: Embrião morto. C: Embrião morto. D: Embrião que não teve o desenvolvimento retomado durante a incubação. E: Embrião. AV: Artéria vitelínica. Área circulada: Embrião morto. Bt: Blastoderme.....	43
Figura 11 - Técnica de montagem total descrita por ORTOLANI-MACHADO et al., 2012.....	46
Figura 12 – Porcentagem de sobrevivência dos embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> do controle fechado (CF), controle veículo (CV, com H <sub>2</sub> OD), grupos expostos de 2,4-D nas concentrações de 15, 30 e 60 µg/L, e o controle positivo MMS, incubados por 3 dias, a	

37,5°C, com umidade e ventilação constantes. Barras verticais indicam o IC95% e o ponto central a média.....	49
Figura 13 – Frequência cardíaca (bpm) dos embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> do controle fechado (CF), controle veículo (CV, com H <sub>2</sub> OD), grupos expostos de 2,4-D nas concentrações de 15, 30 e 60 µg/L, e o controle positivo MMS, incubados por 3 dias, a 37,5°C, com umidade e ventilação constantes. Barras verticais e os boxes indicam os quartis e o ponto central a mediana.....	51
Figura 14 – Porcentagem de embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> normais do controle fechado (CF), controle veículo (CV, com H <sub>2</sub> OD), grupos expostos de 2,4-D nas concentrações de 15, 30 e 60 µg/L, e o controle positivo MMS, incubados por 3 dias, a 37,5°C, com umidade e ventilação constantes. Barras verticais e os boxes indicam os quartis e o ponto central a mediana.....	52
Figura 15 – Estereofotografia de embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> considerados normais. A) Embrião de <i>Gallus gallus domesticus</i> do controle fechado em estágio 19; B) Embrião de <i>Gallus gallus domesticus</i> do controle veículo em estágio 19; C) Embrião de <i>Gallus gallus domesticus</i> do controle positivo MMS em estágio 19; D) Embrião de <i>Gallus gallus domesticus</i> do grupo exposto a 2,4-D 15µg/L em estágio 18; E) Embrião de <i>Gallus gallus domesticus</i> do grupo exposto a 2,4-D 30µg/L em estágio 17; F) Embrião de <i>Gallus gallus domesticus</i> do grupo exposto a 2,4-D 60µg/L em estágio 19. Oclusiva de Aumento de 1x.....	53
Figura 16 – Porcentagem de embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> com malformações embrionárias do controle fechado (CF), controle veículo (CV, com H <sub>2</sub> OD), grupos expostos de 2,4-D nas concentrações de 15, 30 e 60 µg/L, e o controle positivo MMS, incubados por 3 dias, a 37,5°C, com umidade e ventilação constantes. Barras verticais e os boxes indicam os quartis e o ponto central a mediana.....	54
Figura 17 – Estereofotografia de embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> com malformações na região do encefálica. A) Embrião de <i>Gallus gallus domesticus</i> do controle positivo MMS no estágio 17, apresentando atrofia do mesencéfalo, além de atrofia caudal e gastrosquise; B) Embrião de <i>Gallus gallus domesticus</i> do grupo exposto a 2,4-D 30µg/L no estágio 18, apresentando hipotrofia do mesencéfalo; C) Embrião de	

<i>Gallus gallus domesticus</i> do grupo exposto a 2,4-D 30µg/L, no estágio 18, apresentando falha no fechamento do tubo neural; Oclusiva de Aumento de 1x.....	55
Figura 18 – Estereofotografia de embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> com malformações na região do encefálica. A) Embrião de <i>Gallus gallus domesticus</i> do grupo exposto 2,4-D 60µg/L, no estágio 19, apresentando falha no fechamento lateral do corpo; B) Embrião de <i>Gallus gallus domesticus</i> do controle positivo MMS no estágio 18, apresentando falha no fechamento lateral caudal; C) Embrião de <i>Gallus gallus domesticus</i> do controle positivo MMS no estágio 17, apresentando falha no fechamento abdominal; D) Embrião de <i>Gallus gallus domesticus</i> do controle veículo no estágio 18, apresentando disgenesia caudal; E) Embrião de <i>Gallus gallus domesticus</i> do grupo exposto 2,4-D 15µg/L, no estágio 18, atrofia caudal; As setas apontam para as malformações descritas acima, assim como o círculo. Oclusiva de Aumento de 1x.....	56
Figura 19 – Estereofotografia de embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> com malformações extensas. A) Embrião de <i>Gallus gallus domesticus</i> do grupo exposto a 2,4-D 60µg/L; B) Embrião de <i>Gallus gallus domesticus</i> do grupo exposto a 2,4-D 30µg/L; C) Embrião de <i>Gallus gallus domesticus</i> do grupo exposto a 2,4-D 15µg/L, círculos apontam os dois corpos ligados a uma única cabeça; Oclusiva de Aumento de 1x.....	57
Figura 20 – Análise estatística dos estágios embrionários de <i>Gallus gallus domesticus</i> sob efeito dos tratamentos com 2,4-D nas concentrações de 15, 30 3 60ug/L, controle fechado, controle veículo (H <sub>2</sub> OD) e o controle positivo MMS. Barras verticais e os boxes indicam os quartis e o ponto central a mediana.....	59
Figura 21 - Classes de danos observadas nas células dos embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> . A) Sem danos; B) Dano 1; C) Dano 2; D) Dano 3; E) Dano 4. Setas apontam a área dos círculos e triângulos demonstrando a diferença na circunferência dos nucleoides entre as classes danos.....	60
Figura 22 - Comparação de médias para os valores de danos verificados no ensaio cometa. Barras verticais indicam o IC95% e o ponto central a média.....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre valores máximos permitidos do herbicida 2,4-D em água potável em diferentes normatizações, em $\mu\text{g.L}^{-1}$ . .....	29
Tabela 2 - OS 10 ingredientes ativos mais vendidos no Brasil - 2014.....	30
Tabela 3 - Grupos Experimentais.....	38
Tabela 4 - Modelo Experimental.....	40
Tabela 5 - Características dos estádios embrionários 16 ao 19.....	46
Tabela 6 – Estágios embrionários de <i>Gallus gallus domesticus</i> sob efeito dos tratamentos com 2,4-D nas concentrações de 15, 30 3 60 $\mu\text{g/L}$ , controle fechado, controle veículo ( $\text{H}_2\text{OD}$ ) e o controle positivo MMS.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bpm	Batimentos por minuto
CL50	Concentração Letal
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONC	Concentração
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais em Pesquisa
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DF	Distrito Federal
DH2O	Água deionizada
DL50	Dose Letal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Ensaio Cometa
ECs	Contaminantes Emergentes
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
G	Gramas
GM	Plantas Transgênicas
GM	Gabinete do Ministro
GT	Grupo de Trabalho
H2O	Água
Ht	Tolerância a herbicida
IA	Ingredientes Ativos
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ICBP	International Council for Bird Preservation
Kg	KiloGramas
L	Litros
LCB	Laboratório de Controle Biológico (I, II)
mA	Miliampère
mg	Miligramas
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Massa Molecular
MMS	Metilmetanosulfonado
MS	Ministério da Saúde
NPIC	National Pesticide Information Center
NaOH	Hidróxido de sódio
OGMs	Organismos Geneticamente Modificados
OMS	Organização Mundial da Saúde
POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
PR	Procuradoria-Geral da República
SSD	Single Seed Descendent
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
V	Volts
USEPA	Agência de Proteção Ambiental Americana
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
µg	Micrograma
µL	Microlitro
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>20</b>
2.1 POLUIÇÃO DE ECOSISTEMAS PELO USO INDISCRIMINADO DE FITOSSANITÁRIOS	20
2.1.1 Poluentes Emergentes	24
2.2 ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D): SEU POSSÍVEL POTENCIAL TÓXICO PARA ORGANISMOS VERTEBRADOS	26
2.2.1 Mecanismo de ação e propriedades químicas do herbicida 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético)	27
2.2.2 Toxicidade do ácido 2,4-Diclorofenoxiacético e a legislação em torno deste herbicida	28
2.2.3 Utilização do 2,4-D no Brasil	29
2.3 EMBRIOTOXICOLOGIA	31
2.4 EMBRIÃO DE AVE COMO MODELO PARA EMBRIOTOXICOLOGIA	32
2.5 BIOMARCADORES DE GENOTOXIDADE	34
2.5.1 Ensaio Cometa	35
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>38</b>
4.1 MODELO BIOLÓGICO	38
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL	39
4.3 MÉTODO DE EXPOSIÇÃO	41
4.4 ABERTURA DOS OVOS	42
4.5 ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA	43
4.6 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA	44
4.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA	44
4.8 ANÁLISE DAS CÉLULAS ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA	47
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>49</b>
5.1 SOBREVIVÊNCIA	49
5.2 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA	50
5.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA	51



5.3.1 Taxa de Normalidade e Malformações	51
5.3.2 Estágio Morfológico	57
5.4 ANÁLISE DAS CÉLULAS ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA	59
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>62</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO 1 - Parecer aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais em Pesquisa (CEUA-UTFPR), sob protocolo de nº 2018-40</b>	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos de produtos químicos sobre os ecossistemas naturais, tendo como objetivo identificar e prever as consequências ambientais negativas causadas por essas substâncias (KMECICK, 2017). A contaminação de ambientes aquáticos, nos últimos anos, vem sendo um alvo de estudos intensivos na área de ecotoxicologia. Os ambientes aquáticos estão entre os principais alvos dos efeitos nocivos da antropização, sendo que estes ecossistemas se comportam como receptores finais de contaminantes liberados no ambiente, seja por via aérea, ou pela percolação no solo, provindo pelo escoamento da água das chuvas. (POLLACK; CUNNINGHAM; ROSENKRANZ, 2003; GHISI, 2012).

Atualmente, os meios de contaminação provêm de resíduos industriais, urbanos, e principalmente de atividades agrícolas, os quais liberam constantemente uma ampla variedade de químicos no ambiente comprometendo os solos e sistemas aquáticos (GOUVEIA, 2012). Este problema se agrava pela grande heterogeneidade física dos sistemas hídricos, que incluem de pequenos a grandes rios (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014), e é em virtude dessa intercomunicabilidade que qualquer contaminante inserido nestes sistemas poderia resultar na contaminação das áreas distantes em que foram originalmente aplicados (VEIGA et al., 2006), além do crescente uso de agroquímicos na produção agrícola.

A contaminação destes ecossistemas pode atingir toda a cadeia alimentar, através da biomagnificação. Segundo Gobbo (2016), a preocupação em torno deste fenômeno se dá porque ele ocorre através de pequenas concentrações dos produtos químicos, que vão se acumulando nos organismos ao longo da cadeia trófica, podendo chegar a comprometer a sobrevivência das espécies de topo da cadeia trófica.

Desde 1970, após a “Revolução Verde” e a liberação de uso de plantas transgênicas, houve a criação de novas tecnologias para assegurar a produtividade dessas plantas combatendo pragas e plantas daninhas com o uso de pesticidas. Porém, já no início deste processo, o uso incorreto e indiscriminado destes agrotóxicos acarretou no desenvolvimento de resistência dessas pragas, como, por exemplo, a resistência de plantas daninhas a certos herbicidas (CHRISTOFFOLETI, 1994).

Pode-se citar o exemplo da *Conyza bonariensis* e *C. canadenses*, duas espécies de plantas daninhas pertencentes à família *Asteraceae* de ciclos anuais e propagação por sementes, nativas da América do Sul e América do Norte respectivamente (LAZAROTO et al., 2008), conhecidas popularmente como buva. Nos últimos anos, a buva tornou-se uma das plantas daninhas mais importantes do Brasil, devido à grande capacidade de dispersão e grande produção de sementes (DAUER et al., 2007). O real problema surgiu quando foram detectadas populações dessas espécies resistentes ao herbicida glifosato em lavouras de culturas perenes (pomares) e anuais (lavouras de soja) (LAMEGO; VIDAL, 2008; VARGAS et al., 2007). Segundo Moreira et al. (2007), a intensa utilização de glifosato favorece o aumento da pressão de seleção, que, aliado à boa adaptabilidade ecológica das espécies de buva (*C. canadensis* e *C. bonariensis*) a sistemas conservacionistas de manejo de solo, contribui para a seleção de biótipos resistentes dessas espécies em áreas onde seu uso é intenso, como áreas citrícolas e de SSD (método dos descendentes de uma única semente).

Para CHRISTOFFOLETI e LÓPEZ-OVEJERO (2003), devido ao intenso uso de muitos herbicidas em sistemas de produção, sendo aplicados inclusive de forma repetitiva, estes têm selecionado apenas algumas populações de plantas daninhas resistentes. Em 1957 nos EUA e Canadá, foi constatado o primeiro caso de resistência ao herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), biótipos de *Commelina difusa* (Trapoeiraba), nos Estados Unidos, e de *Daucus carota* (Cenoura-selvagem), no Canadá, espécies antes bem controladas pelo herbicida que criaram resistência com apenas 9 anos após a introdução do 2,4-D no mercado (1948) (KISSMANN, 1996).

Em relação ao 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), há vários estudos sobre este e seus possíveis efeitos sobre os organismos presentes nos ecossistemas, principalmente relacionado a pesquisas em torno da neurotoxicidade do sistema nervoso central (SNC). Experiências desenvolvidas com ratos em laboratório utilizando diferentes dosagens de 2,4-D administradas por via oral, exposição dérmica e, até mesmo, injeção direta no SNC, relataram alterações nos neurônios dopaminérgicos e serotoninérgicos, quando aplicadas doses mais altas, sugerindo que a toxicidade do 2,4-D é dependente das doses e seletiva para os neurônios (COPE et al., 1970).

No Brasil a utilização desta substância química vem crescendo de forma acelerada nas atividades agrícolas. A legislação brasileira em torno deste pesticida é muito branda quando comparada com a da Europa. Segundo o Conselho da União Europeia (1998) a concentração permitida é de 0,1µg/L para cada pesticida quantificado individualmente nos ambientes aquáticos, e apenas 0,5µg/L para a quantificação total dos pesticidas nos sistemas hídricos de captação de água para consumo humano. No Brasil, é permitido no máximo 30µg/L apenas para o herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), em águas de consumo humano (BRASIL, 2019), e diferente da Europa não há limite na quantificação da soma total para fitossanitários sintéticos utilizados na agricultura brasileira encontrados em água considerada potável. O Ministério Público Federal em 2014 moveu uma ação com o intuito da reavaliação destes valores pela legislação brasileira em relação ao 2,4-D, porém a mesma não foi validada e, no mesmo ano, o Brasil tinha esta substância química em segundo lugar no ranking dos mais vendidos (BRASIL, 2016).

A maioria desses pesticidas são considerados poluentes emergentes, ou seja, são compostos que têm sido detectados em diversos compartimentos ambientais, tanto os de origem antrópica como aqueles de ocorrência natural, que podem apresentar algum risco ao ecossistema e que não estão incluídos nos programas de monitoramento de rotina (RAIMUNDO, 2011).

Diante desta problemática contextualizada acima, o presente estudo avaliou os efeitos tóxicos e genotóxicos da concentração estabelecida pela Portaria de Consolidação nº 5 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017) para água potável (30µg/L), sobre o desenvolvimento inicial embrionário de aves da espécie *Gallus gallus domesticus* L. 1758. Esse modelo experimental foi escolhido devido às semelhanças observadas nos estágios iniciais com o desenvolvimento embrionário de humanos, permitindo uma associação em termos morfológicos e genotóxicos da interação do 2,4-D com células animais.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

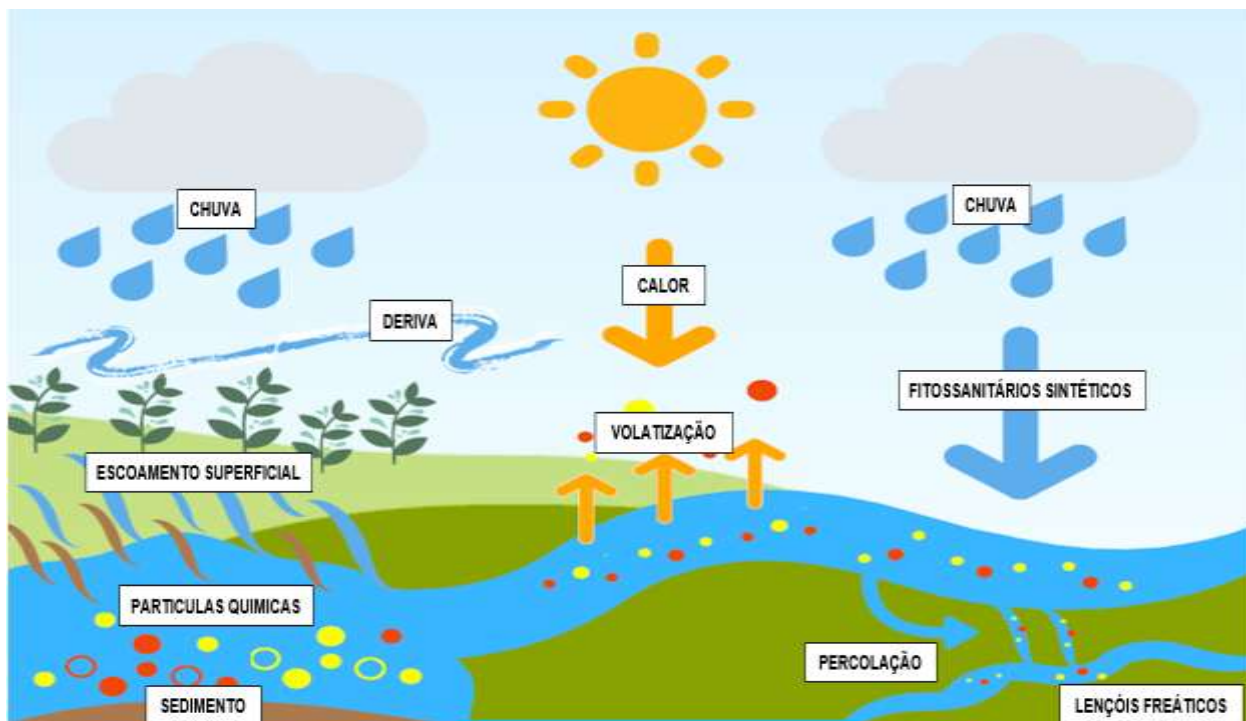
### 2.1 POLUIÇÃO DE ECOSISTEMAS PELO USO INDISCRIMINADO DE FITOSSANITÁRIOS

Atualmente a contaminação ambiental pelo uso indiscriminado de produtos fitossanitários sintéticos tem sido amplamente estudada, principalmente a contaminação de ambientes aquáticos, os quais podem apresentar riscos a saúde humana. Os principais contaminantes são de origem agrícola advindos de resíduos de fertilizantes e os agrotóxicos.

O processo de contaminação dos sistemas aquáticos (Figura 1) ocorre diretamente quando estes produtos são aplicados sobre os campos de cultivo e, através da água da chuva, são carregados juntamente com parte do solo para dentro dos sistemas aquáticos; este sedimento ocasiona o assoreamento desses ambientes diminuindo o fluxo comum de água. Ao se degradar, o sedimento libera partículas químicas desses resíduos de agrotóxicos novamente para os sistemas fluviais.

A contaminação indireta se dá através da percolação desses químicos no solo, chegando aos lençóis freáticos, e também pela ação do calor, o que resulta na volatilização desses químicos para a atmosfera, e ainda, por pulverização de fitossanitários sintéticos, que podem ser transportados por correntes aéreas (deriva) e se depositarem no solo, na água, e até mesmo em organismos vivos distantes das áreas onde foram originalmente usados (ARIAS et al., 2007)

**Figura 1 - Processo de contaminação dos sistemas aquáticos por fitossanitários sintéticos**



Fonte: A Autora (2020).

Para Dellamatrice e Monteiro (2014) os ecossistemas aquáticos de rios possuem grande heterogeneidade física, que incluem de pequenos a grandes rios, variação no regime de vazão e geomorfologia do canal, entre outras características do habitat. Por conta dessa comunicação em rede, os mesmos contaminantes que afetam a nascente do rio, afetarão o leito, bem como, os afluentes e subafluentes até chegar à foz desse trajeto. Segundo Ghisi (2013), o Brasil possui um extenso sistema fluvial, e a região sul do Brasil, em especial a região norte do estado do Paraná, se destaca por possuir cidades de pequeno porte concentradas em torno de corpos hídricos e, além disso, possui uma extensa produção agrícola. Este cenário é comum no território brasileiro, onde se pode assumir que as águas, tanto superficiais quanto subterrâneas, podem ser contaminadas pela percolação desses pesticidas. Esses problemas têm sido cada vez mais evidenciados por pesquisas na área de toxicologia.

Essa realidade se agrava a partir da degradação das terras e matas ciliares, que nos últimos anos vem sendo um dos principais problemas ambientais, além de um obstáculo ao aumento sustentável da produtividade do agronegócio brasileiro

(FERREIRA, 2017). As matas ciliares funcionam como filtros, retendo restos de agrotóxicos poluentes e sedimentos que seriam transportados para o curso de água afetando diretamente a quantidade e a qualidade da água e, conseqüentemente, a fauna aquática e a população humana (MARTINS, 2001).

Hoje se sabe que o uso indiscriminado de agrotóxicos pode resultar na bioacumulação desses químicos nos organismos vivos. É amplamente observado que organismos (plâncton, invertebrados e animais vertebrados) podem acumular altas concentrações de certos contaminantes orgânicos em relação às concentrações destas substâncias no ambiente que habitam (ar, água, solo e sedimento) (VOUTAS, 2002).

A preocupação em torno da bioacumulação se dá pelo fato de que, uma vez que esta ocorra, alguns dos princípios ativos de químicos bioacumulados possuirão um alto potencial de acumulação nos organismos ao longo da cadeia alimentar, chegando a grandes dosagens nos organismos do topo da cadeia (Figura 2), suficientes para causar problemas para a sobrevivência dessas espécies. Este fenômeno é caracterizado como efeito de biomagnificação (GOBBO, 2016).

**Figura 2 – Fenômeno de biomagnificação ao longo da cadeia alimentar**



\*[+] maior concentração, [-] menor concentração.

Fonte: A Autora (2020).

Nos anos 70, o Brasil adotou como modelo de produção agropecuária a chamada “revolução verde” (MIRANDA et al., 2008). Neste modelo, o aumento na produtividade é obtido por meio de plantas melhoradas geneticamente, e pelo uso de insumos como fertilizantes e agrotóxicos, exigindo uma estruturação de toda a sociedade para avaliar e gerenciar os riscos advindos da utilização destes produtos (GOMES et al., 2014).

Para Miranda et al. (2008), esta inovação tecnológica favoreceu a utilização de agrotóxicos pertencentes à classe dos organoclorados, no qual se enquadra o DDT (DicloroDifenilTricloroetano). Estes compostos organoclorados apresentam características como: simplicidade na sua composição química, além de serem considerados poluentes orgânicos persistentes (POPs). Em relação ao DDT, sua produção em grande escala iniciou-se em 1945, e foi muito utilizado na agricultura como pesticida (TORRES et al., 2002).

Em 1962, Rachel Carson, uma bióloga norte-americana publicou o livro "Primavera Silenciosa", abordando os efeitos danosos do uso de pesticidas na agricultura, em especial os efeitos do DDT no ambiente. Segundo Pereira (2012), Carson elaborou um rigoroso estudo, e comprovou que as aplicações deste pesticida atingiam todo o ecossistema, como solos, águas, fauna e flora, podendo chegar aos seres humanos pela cadeia alimentar. Além disso, a autora relata que o DDT não atingia apenas as pragas indesejadas, mas também, muitas outras espécies, inclusive os predadores naturais dessas pragas, causando assim um desequilíbrio ainda maior no ambiente.

Após comprovação de seus efeitos deletérios, a utilização do DDT na produção agrícola foi proibida em vários países, começando pela Hungria em 1970, seguida por outros, inclusive EUA que restringiu o uso do pesticida em 1972. Em 1971, ocorreram as primeiras medidas de restrição do DDT no Brasil proibindo a fabricação e comercialização do pesticida. Porém, a proibição ocorreu de fato com a lei nº 11.936 de 2009, onde os art. 1 e 2 relatam a proibição da fabricação, da importação, da exportação, da manutenção em estoque, da comercialização e uso do DDT (BRASIL, 2009).

Apesar da grande importância das atividades agrícolas, há pouco interesse no estudo de aspectos da saúde e segurança na agricultura. Existe grande interesse em desenvolver novas tecnologias para aumento da produção na agropecuária, sem levar



em consideração os impactos à saúde e à segurança do trabalhador e do meio ambiente a médio e longo prazo (CASSAL et al, 2014).

### 2.1.1 Poluentes Emergentes

Poluentes emergentes são substâncias potencialmente tóxicas, cujos efeitos ou a sua presença no ambiente ainda são pouco conhecidos. Estes compostos, que têm o potencial de causar efeitos adversos, conhecidos ou suspeitos, na saúde humana ou ecológica, são muitas vezes referidos coletivamente como contaminantes emergentes (CEs) (SORENSEN et al., 2015).

Segundo McCance (2018), os contaminantes emergentes (CEs) incluem alguns produtos farmacêuticos, produtos para cuidados pessoais e adoçantes artificiais, e compostos largamente relatados ou regulados, como os pesticidas. O autor relata que, devido aos impactos antropogênicos generalizados sobre a biosfera, os contaminantes emergentes (CEs) são agora observados em todos os ambientes terrestres e aquáticos em todo o mundo.

Os contaminantes emergentes são classificados em: compostos que foram introduzidos recentemente no meio ambiente, por exemplo, aditivos industriais ou compostos de substâncias químicas que estiveram presentes no ambiente por muitos anos, como alguns fitossanitários sintéticos, mas que apenas agora foram detectados seus possíveis efeitos nocivos ao organismo animal, atraindo o interesse da comunidade acadêmica; e em os compostos que já são conhecidos por seu potencial de impacto negativo em humanos e a todo ecossistema, porém, recentemente encontrados dispersos nos sistemas aquáticos como, por exemplo, os hormônios (STEFANAKIS et al., 2015).

De acordo com Stefanakis et al. (2015) a maioria destes poluentes eram há 15-20 anos atrás desconhecidos ou simplesmente não reconhecidos como contaminantes associados a riscos ambientais. Porém, a preocupação atual com esses CEs é que, ao mesmo tempo que trazem um potencial de impacto e riscos para a saúde humana, trazem também para todo o ecossistema, sendo geralmente bioacumulados e persistentes nos ambientes, como é o caso do pesticida DDT.

Esses contaminantes não estão incluídos em programas de monitoramento de rotina pelos órgãos de meio ambiente e saúde, e tampouco estão inseridos em normativas e legislações de controle ambiental (MOREIRA, 2011). Porém, os CEs, como os produtos fitossanitários sintéticos, vem sendo liberados nos ambientes desde a sua fabricação, e alguns em larga escala sem saber os efeitos que esses podem causar no ecossistema, seja agora ou nas futuras gerações.

Pode-se citar o caso do falcão das ilhas Maurício, o *Falco punctatus*, uma espécie endêmica das ilhas Maurício, que foi afetada pela colonização francesa. Após a colonização, houve a expansão populacional e início de atividades agrícolas no local. Aliado a isso, pesticidas organoclorados foram utilizados em massa em Maurício de 1948 a 1973 especialmente o DDT (FERNANDEZ, 2008).

Segundo este autor, o DDT foi banido de Maurício em 1973, deixando rastros de destruição. A contaminação dos alimentos do falcão pelo DDT acarretou em ovos inviáveis do mesmo. A interação dos compostos do pesticida com o organismo da ave impedia o desenvolvimento de cascas fortes para seus ovos, ou seja, estas se tornavam finas e quebradiças durante a incubação ou simplesmente não eclodiam. Com o banimento do DDT das ilhas Maurício, o ICBP (International Council for Bird Preservation) concluiu que havia restado apenas sete indivíduos da espécie. A ICBP tentou recuperar uma quantidade significativa desses indivíduos através da reprodução assistida em cativeiro, mas isso não aconteceu.

Carl Jones, biólogo, através da ICBP dedicou anos de sua vida na conservação e restauração dos falcões das ilhas Maurício. Após muita luta, experimentos e falhas, Carl conseguiu finalmente reproduzir proles viáveis desses indivíduos, e graças a ele hoje a espécie de *Falco punctatus* se encontra fora do perigo de extinção. Esta história foi contada por David Quammen em seu livro “The Song of the Dodo: Island Biogeography in an Age of Extinction”, no ano de 1997. A espécie de *Falco punctatus* foi recuperada a partir de quatro indivíduos em 1974 para 101 casais monitorados em 1998 (GROOMBRIDGE, 2001).

O DDT, assim como muitos pesticidas utilizados atualmente, foi subestimado quanto a suas ações no ambiente, custando a quase extinção de várias espécies. Para Gomes (2014), mesmo o Brasil sendo atualmente o líder mundial do uso de agrotóxicos,

não se tem informações suficientes sobre a contaminação dos diversos compartimentos ambientais brasileiros, causando incertezas em relação à qualidade de nosso ambiente e até mesmo da saúde pública.

## 2.2 ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D): SEU POSSÍVEL POTENCIAL TÓXICO PARA ORGANISMOS VERTEBRADOS

Após a “revolução verde”, novas tecnologias surgiram, bem como a transgenia, que se trata da modificação genética de organismos. Plantas transgênicas (GM) são aquelas que foram geneticamente modificadas usando tecnologia de DNA recombinante (KEY et al., 2008). As grandes preocupações com plantas transgênicas no ambiente se referem principalmente aos impactos das tecnologias Bt (*Bacillus thuringiensis* - resistência a insetos) e Ht (tolerância a herbicida) (ANDRADE, FALEIRO, 2009).

A autorização para o cultivo de transgênicos no Brasil veio com a soja transgênica tolerante ao glifosato, em outubro de 1998. Era a primeira liberação para plantio em escala comercial. Entretanto, na época, a CTNBio já havia aprovado dezenas de outras variedades para testes (CIB, 2019). A alta adesão mundial dos produtores ao plantio de soja resistente ao glifosato representou a maior adoção de uma tecnologia na história da agricultura (SANKULA et al., 2005). Esta tecnologia beneficiou os agricultores em relação ao aumento da produtividade nas lavouras, e no controle de plantas daninhas. Porém em poucos anos, ocorreu o desenvolvimento de plantas daninhas resistentes ao glifosato, ocasionado pelo uso inadequado, ou indiscriminado desta nova tecnologia (GAZZIERO et al., 2012).

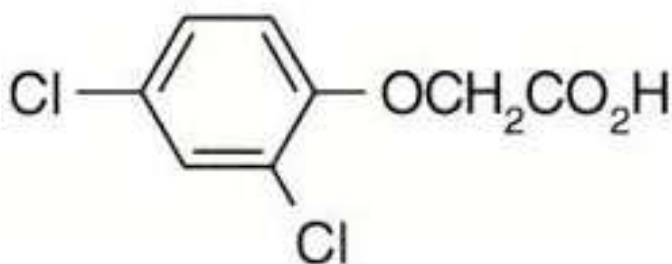
Devido ao seu potencial de indução a resistência, outros compostos começaram a ser testados para a substituição do glifosato, pois a resistência a herbicidas se tornava uma ameaça a produtividade das plantas transgênicas. Neste sentido, muito se trabalhou no desenvolvimento de cultivares transgênicas tolerantes ao 2,4-D (FRIEDRICH, 2014).

### 2.2.1 Mecanismo de ação e propriedades químicas do herbicida 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético)

O herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) foi o primeiro herbicida seletivo bem-sucedido, sendo introduzido em 1946 e se transformando rapidamente no herbicida mais extensamente usado em todo o mundo (AMARANTE JUNIOR et al., 2002). Após 50 anos da sua utilização em cultivares agrícolas, ainda é o terceiro mais usados no controle de ervas daninhas nos Estados Unidos e Canadá, sendo um dos mais usados em termos mundiais (INDUSTRY TASK FORCE II, 2000).

O 2,4-D é um herbicida altamente seletivo, sistêmico, pós-emergente e atua como um regulador de crescimento, possuindo efeito análogo ao hormônio auxina. De acordo com Guerra (2014), este produto é um químico agrícola, utilizado como herbicida na agricultura em culturas como: trigo, milho, soja, arroz (irrigado e de sequeiro), aveia, sorgo, cana-de-açúcar, café, além da silvicultura, e cuidados com gramados, devido a sua toxicidade aguda relativamente baixa e, devido à sua eficácia na eliminação de plantas consideradas daninhas de folha larga (ARIAS, 2002). Uma vez que a molécula do 2,4-D (Figura 3) é absorvida, é translocada dentro da planta, acumulando-se nos pontos crescentes das raízes e agindo pelo crescimento desordenado das células, impedindo o transporte de água e nutrientes através da planta (JERVAIS et al., 2008).

**Figura 3 – Estrutura química da molécula do 2,4-D**



Fonte: BRASIL (2020).

Segundo Brito et al. (2001), a adsorção da molécula do 2,4-D em solo é relativamente baixa, o que tende a uma alta lixiviação; assim, pode ser detectado tanto em águas superficiais quanto em águas subterrâneas.

### 2.2.2 Toxicidade do ácido 2,4-diclorofenoxiacético e a legislação em torno deste herbicida

Vários estudos foram realizados nos últimos anos com base neste herbicida para avaliar seu potencial tóxico principalmente em células animais. Segundo Friedrich (2014) a ANVISA classifica o 2,4-D como Classe I (ANVISA, 2014), ou seja, pertencente ao indicativo de cor vermelha, que caracteriza os fitossanitários extremamente tóxicos. Esse critério baseia-se unicamente nos efeitos agudos que a substância é capaz de produzir após a exposição única em animais de laboratório.

A toxicidade do 2,4-D em animais se refere à DL50 (dose letal que elimina 50% de uma população) por via oral entre 0-50 mg kg<sup>-1</sup>; por via dérmica entre 0 – 200 mg kg<sup>-1</sup>; CL50 (concentração letal que elimina 50% de uma população) por via respiratória entre 0-0,2 mg L<sup>-1</sup> e irritação para pele e olhos classificada como severa (KAMRIN, 1997; MACEDO NETO, et al., 2012). O 2,4-D é considerado persistente no ambiente (PINTO, 2002), e por causa dessa alta persistência, foi incluído na Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017 (Cap. 5. Seção I., Art. 129) a qual incluiu o anexo 7 da antiga portaria MS/GM 2914/2011. Está portaria define os padrões de potabilidade da água no Brasil para substâncias químicas que representam risco à saúde.

A legislação em torno do herbicida 2,4-D, varia conforme o que cada país adota, seguindo o que recomenda a OMS (Organização Mundial da Saúde). A Europa possui uma legislação extremamente rigorosa em relação à qualidade dos ecossistemas aquáticos quando comparada com a legislação brasileira. Segundo o Conselho da União Europeia (1998), a diretiva 98/83 estipula um limite máximo permitido para qualquer produto pesticida em água potável, valor paramétrico de 0,1µg/L para cada pesticida individualmente, sendo que a soma de todos os pesticidas detectados e quantificados no processo de controle está restrito num limite de 0,5µg/L no total. Quando comparada com outros países, esses valores são extremamente inferiores.

No Brasil, em dezembro de 2011, foi publicada a Portaria N° 2914 do Ministério da Saúde em substituição a de N° 518/2004, a qual foi incluída posteriormente na Portaria de Consolidação de nº 5 do MS em 2017, relacionada aos padrões de potabilidade da água para consumo humano, estabelecendo que o limite máximo da concentração de 2,4-D em água potável seja de 30µg/L, seguindo o valor recomendado pela Organização

Mundial da Saúde (OMS), baseados em estudos toxicológicos e epidemiológicos (BRASIL,2017).

A tabela 1 faz uma comparação entre os valores máximos permitidos em relação a concentração de 2,4-D em água potável no Brasil, regulamentado pela Portaria de Consolidação de nº 5 do Ministério da Saúde, com os órgãos responsáveis pelas diferentes normatizações internacionais como a da Organização Mundial da Saúde (OMS – WHO), a dos Estados Unidos (United States Environmental Protection – USEPA), a da Austrália (Australian Water Association - AWA) e do Canadá (Health Canada - HC).

**Tabela 1 - Comparação entre valores máximos permitidos do herbicida 2,4-D em água potável em diferentes normatizações, em  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .**

Parâmetro	PRC Nº5/2017 MS	WHO	USEPA	AWA	HC
2,4-D	30 $\mu\text{g.L}^{-1}$	30 $\mu\text{g.L}^{-1}$	70 $\mu\text{g.L}^{-1}$	30 $\mu\text{g.L}^{-1}$	100 $\mu\text{g.L}^{-1}$

Ministério da Saúde (MS); Organização Mundial da Saúde (OMS – WHO); United States Environmental Protection (USEPA); Australian Water Association (AWA); Health Canada (HC).

\*Dados: Brasil (2017); WHO (2011); USEPA (2011); HC (2010); AWA (2011).

**Fonte: Adaptado (GUERRA, 2014).**

### 2.2.3 Utilização do 2,4-D no Brasil

Segundo Brasil (2018), dados retirados dos relatórios de comercialização de agrotóxicos, emitidos pelo IBAMA, o boletim de 2017, publicado sobre produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos, componentes e afins no Brasil, que tem como base os dados contidos nos relatórios semestrais apresentados pelas empresas detentoras de registro desses produtos, conforme exigência do art. 41 do Decreto nº 4.074, de 2002, originou uma planilha referente aos dez agrotóxicos mais consumidos no Brasil por princípio ativo, no ano de 2017, onde os quais estão descritos na tabela 2.

Em 2014, esse mesmo relatório emitido pelo IBAMA, demonstrou que a comercialização do Glifosato foi de 194.877,84 toneladas de IA (ingredientes ativos), ocupando a primeira posição do ranking, enquanto o 2,4-D apareceu na segunda posição do ranking com 36.513,55 toneladas de IA (ingredientes ativos) (BRASIL, 2016). No

relatório de 2017, o boletim emitido pelo IBAMA, demonstrou que tanto Glifosato quanto o 2,4-D permaneceram nas mesmas posições, ocupando a primeira e segunda posição do ranking, respectivamente. O que chama a atenção é a diminuição da comercialização dos ingredientes ativos do Glifosato, o qual apresentou 173.150,75 de toneladas, tendo um acréscimo significativo da comercialização do 2,4-D com 57.389,35 toneladas de ingredientes ativos no ano de 2017 (BRASIL, 2018) muito mais que em 2014, demonstrando que a utilização deste herbicida vem crescendo a cada ano.

**Tabela 2 - Os 10 ingredientes ativos mais vendidos no Brasil - 2017**

<b>Ingrediente Ativo (IA)</b>	<b>Vendas (ton. IA)</b>	<b>Ranking</b>
Glifosato e seus sais	173.150,75	1º
2,4-D	57.389,35	2º
Mancozebe	30.815,09	3º
Acefato	27.057,66	4º
Óleo mineral	26.777,62	5º
Atrazina	24.730,90	6º
Óleo vegetal	13.479,17	7º
Dicloreto de paraquate	11.756,39	8º
Imidacloprido	9.364,57	9º
Oxicloreto de cobre	7.443,62	10º

\*Unidade de medida: toneladas de Ingrediente Ativo.

**Fonte: Adaptado. (Fonte: BRASIL - IBAMA / Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto nº 4.074/2002).**

**Dados atualizados: 25/06/2018.**

Em 2013, o relatório emitido pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, na sigla em inglês), o qual serve como referência para indústrias do setor agroquímico, especialistas da área e principalmente ambientalistas, apresentou os maiores investimentos em pesticidas nos 20 maiores mercados globais. O relatório evidenciou que em 2013 o Brasil foi o país que mais gastou com agrotóxicos no mundo, cerca de US\$ 10 bilhões de reais, ultrapassando Estados Unidos, China, Japão

e França, assumindo o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos (GRIGORI-CEE-Fiocruz, 2019).

Segundo a ata da sexta reunião do Grupo de Trabalho (GT) - agrotóxicos e transgênicos (2016), o Ministério Público Federal em face da ANVISA e da União, propôs uma Ação Civil pública ajuizada pela PR/DF em 2014 para reavaliação de oito ingredientes ativos, dentre os quais está incluído o 2,4-D, devido aos possíveis riscos desses químicos para a saúde humana. Porém, para os mesmos compostos químicos, já havia sido determinada em resolução de fevereiro de 2002 uma reavaliação, além do pedido de proibição de liberação do comércio de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) tolerantes ao 2,4-D, mas a mesma não foi concluída.

O processo de reavaliação deste herbicida com o intuito de aprimorar a qualidade regulatória em vigilância sanitária, e fortalecer as ações de controle, monitoramento e fiscalização de produtos e serviços foi reaberto em fevereiro de 2016 e deliberado em maio de 2019 com o relatório do processo regulatório nº 284, onde dispõe sobre a manutenção do ingrediente ativo ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em produtos agrotóxicos, no Brasil (BRASIL, 2020). Como conclusão final da reavaliação foi decidido manter este herbicida no mercado brasileiro, porém, com restrições em sua aplicação, sob a justificativa de que mesmo considerando os níveis máximos dos resíduos provindo do 2,4-D em alimentos e água potável, os riscos não são agravantes a população urbana, apenas foram alteradas as instruções da aplicação no campo, visto que os trabalhadores rurais estariam em perigo diante a exposição direta a este pesticida (ANVISA, 2019).

### 2.3 EMBRIOTOXICOLOGIA

O desenvolvimento embrionário na maioria dos vertebrados é bastante semelhante nas fases iniciais, sendo que posteriormente os processos tornam-se espécie-específicos, definindo padrões característicos de cada espécie (GILBERT, 2001).

Segundo KMECICK (2017) os estágios de pré-natal dos seres humanos podem ser considerados como o período mais sensível ao efeito de poluentes ambientais, pois nesse estágio há uma alta taxa de proliferação e diferenciação celulares, ao mesmo



tempo em que os sistemas de detoxificação ainda não estão completamente desenvolvidos. Para VIZCAINO et al. (2014), a exposição precoce a poluentes orgânicos persistentes (POPs) pode aumentar o risco de efeitos adversos à saúde durante a infância. Os mecanismos de transferência de POPs durante a gravidez ainda não são bem compreendidos.

Os xenobiontes são capazes de interagir com os organismos vivos causando múltiplas alterações que podem gerar graves consequências em indivíduos, populações, comunidades ou ecossistemas, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição (GHISI, 2013). Sabendo do possível potencial tóxico do 2,4-D e todo contexto em torno deste herbicida, é proeminente avaliar os seus efeitos sobre o desenvolvimento embrionário de vertebrados utilizando animais como modelos experimentais, pois, para testes como este, é inviabilizada a utilização de embriões humanos no mundo todo.

#### 2.4 EMBRIÃO DE AVE COMO MODELO PARA EMBRIOTOXICOLOGIA

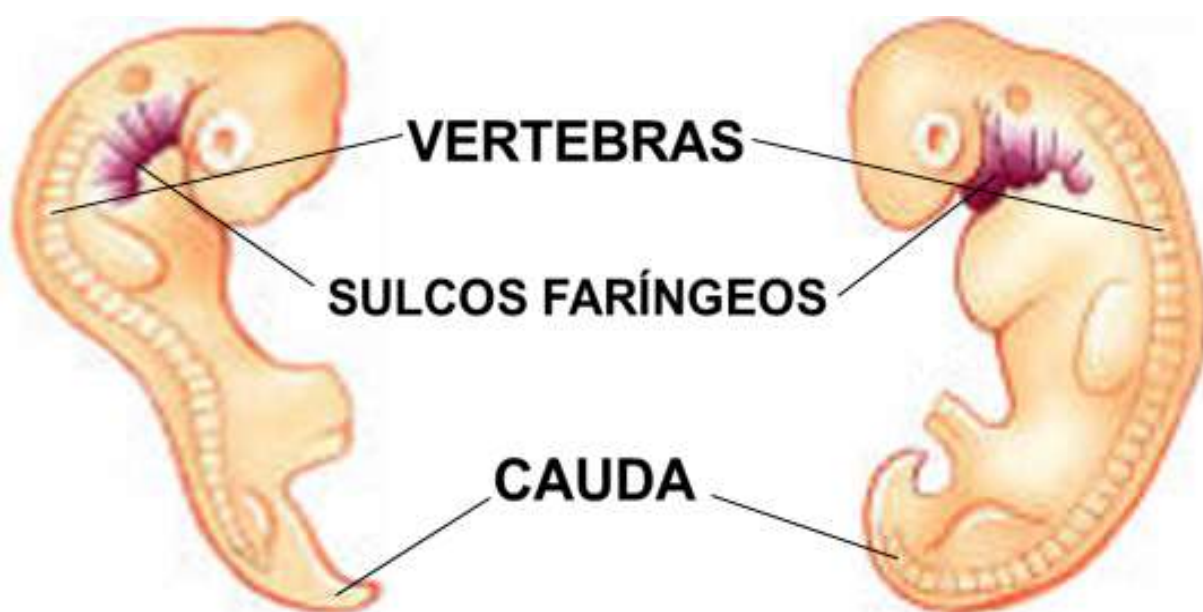
Alguns estágios do desenvolvimento do embrião de galinha são molecular e morfológicamente semelhantes aos de outros vertebrados, em um período do desenvolvimento denominado estágio filotípico, que acontece durante a organogênese (IRIE; KURATANI, 2011).

Além disso, existem vantagens que favorecem a utilização de embriões de ave como modelo para o estudo de embriotoxicologia e teratologia ao invés de embriões de mamíferos, incluindo sua fácil obtenção, baixo custo financeiro, todo processo de desenvolvimento já está bem descrito na literatura, não há necessidade de realizar a eutanásia da fêmea para se obter os embriões, e o desenvolvimento como um todo tem um total de três semanas, ou seja, um tempo curto de desenvolvimento quando comparados com a maioria dos mamíferos (BARBOSA, F.S., KAWANO, T., 1995). A eutanásia ocorre nos embriões através de congelamento, seguindo as normas do CONCEA (2018), diminuindo as chances de os indivíduos sentirem dor durante o procedimento.

Tais características fazem do embrião de ave um excelente modelo para avaliar os efeitos de agentes estranhos (químicos ou biológicos) sobre o desenvolvimento

embrionário, e dependendo dos estágios avaliados, importantes relações podem ser comparadas entre os grupos de vertebrados. Assim como está representado na figura 4, os embriões de aves de 3 a 5 dias se assemelham morfológicamente, e possuem estruturas análogas a embriões humanos de 3 a 5 semanas de desenvolvimento, como a formação das vértebras a partir da notocorda, a formação de sulcos faríngeos, e a formação de uma porção caudal.

**Figura 4 – Semelhanças morfológicas entre embriões de aves com 3 a 5 dias de desenvolvimento e embriões humanos com 3 a 5 semanas de desenvolvimento.**



Fonte: Adaptado (CIENTIC, 2019).

A espécie de ave mais utilizada em estudos de laboratório é a espécie de *Gallus domesticus*, L. 1758, sendo necessário incubar os ovos por um período de 21 dias, em temperatura de 37,5°C, com ventilação e umidade apropriadas para que a eclosão possa ocorrer (GONZALES, 1994; DIAS, 1996). A relação entre o aparecimento de estruturas embrionárias com o tempo de desenvolvimento está definida e organizada em estágios (HAMBURGER e HAMILTON, 1951), o que permite acompanhar as rápidas transformações embrionárias que não poderiam ser registradas apenas em função do dia de desenvolvimento. Assim, o conhecimento das etapas do desenvolvimento embrionário nos permite acompanhar a organização estrutural básica do embrião.

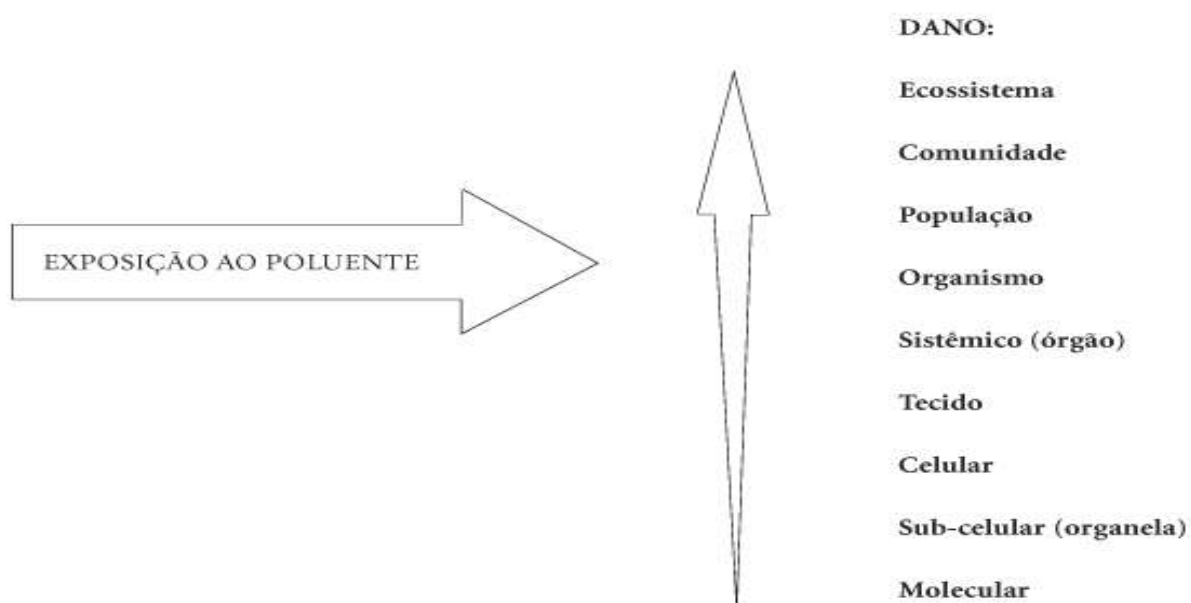
## 2.5 BIOMARCADORES DE GENOTOXIDADE

Devido as grandes descargas de fitossanitários no ambiente, os organismos vivos estão susceptíveis à interação com compostos químicos possivelmente tóxicos. Geralmente, as alterações bioquímicas são consideradas como uma fonte potencial de indicadores biológicos de efeito. Um biomarcador refere-se às alterações internas ocorridas nos organismos expostos aos compostos químicos presentes no ambiente, que podem causar modificações estruturais, desde tecidos até ao nível molecular (VAN GESTEL; VAN BRUMMELEN, 1996).

Segundo Ghisi (2012) efeitos deletérios em populações são difíceis de detectar nos organismos selvagens porque muitos desses compostos são bioacumulativos e, conseqüentemente, seus efeitos se manifestam somente após longos períodos de tempo; quando esses efeitos finalmente emergem podem haver danos irremediáveis.

A ampla utilização dos biomarcadores genéticos como ferramenta em estudos de biomonitoramento é dada em função de sua capacidade de fornecer respostas biológicas rápidas e investigar o impacto em maior nível de escala biológica (figura 5) (ARIAS, et al., 2007).

**Figura 5 – Representação da sequência de respostas biológicas frente à exposição a poluentes.**



Fonte: ARIAS et al., 2007.

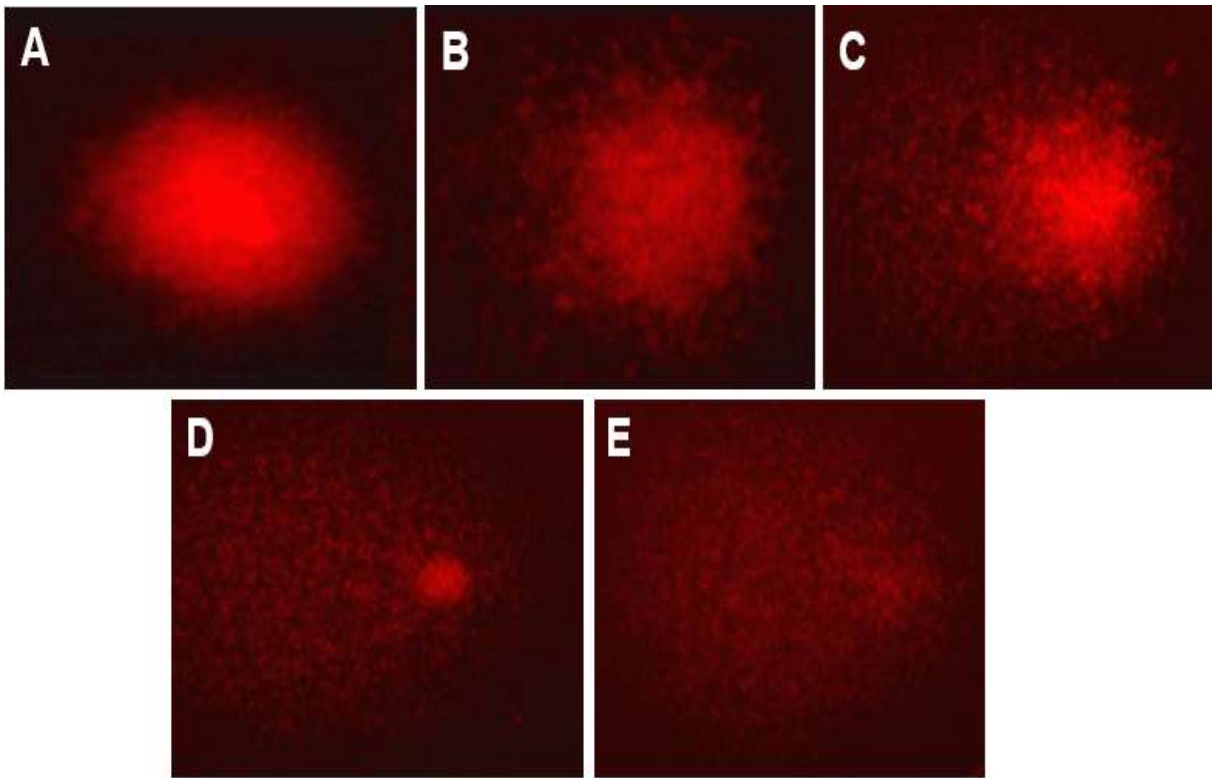
Se considerarmos que estas alterações precedem um dano estrutural desde o nível do DNA, a detecção destas alterações biológicas pelos biomarcadores genéticos permite a identificação precoce de uma exposição excessiva a esses compostos químicos, possibilitando tomar medidas de intervenção para prevenir efeitos irreversíveis para a saúde dos seres humanos, além de trazer respostas sobre a situação atual do planeta (AMORIM, 2003).

### 2.5.1 Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa, também conhecido como teste de gel de célula única (SCGE) (FERRARO et al., 2004), é muito útil e largamente empregado para avaliação de danos e reparos de DNA em células individuais. Quando vista ao microscópio, a célula migrada adquire a forma aparente de um cometa, com cabeça, a região nuclear e cauda, que contém fragmentos ou fitas de DNA que migram na direção ao polo positivo (BRIANEZI, 2009). O Ensaio Cometa é uma técnica fácil, rápida e de médio custo, onde os danos no DNA das células individuais podem ser analisados e quantificados (Figura 6).

Os danos celulares podem ser analisados visualmente pelo diâmetro do núcleo e o comprimento da cauda gerada pela migração dos fragmentos de DNA, onde os estágios de danos são representados por valores de 0 (dano ausente) a 4 (dano máximo) (KUMARAVEL; JHA, 2006). Danos do tipo 2 e 3 são considerados severos, enquanto danos do tipo 4 se caracterizam pela apoptose celular. Esses danos podem ser induzidos por contaminantes comumente usados e presentes nos ambientes.

**Figura 6 – Padrões típicos de migração de DNA: A - núcleos celulares não expostos a agentes genotóxicos com ausência de danos (dano 0); B - núcleos celulares expostos a agentes genotóxicos com danos do tipo 1; C - núcleos celulares com danos do tipo 2; D - núcleos celulares com danos do tipo 3; E - núcleos celulares com danos do tipo 4.**



Fonte: Adaptado – Cedido gentilmente por Nédia de Castilhos Ghisi de seu arquivo pessoal de 2016.

Quanto maior o dano causado ao DNA, maior será o comprimento da cauda do cometa, ou seja, maior será a migração dos fragmentos do núcleo em direção ao ânodo. A visualização por microscópio se dá por corante fluorescente, o mais comumente usado é o brometo de etídeo, porém encontramos outros tipos de marcadores fluorescentes (YUNG-SHARP, D.; KUMAR, R., 1989).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial tóxico do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), sobre o desenvolvimento embrionário de ave (*Gallus gallus domesticus*, L. 1758) com 72 horas de incubação.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar às concentrações próximas ao permitido pela legislação brasileira de 2,4-D em água potável para a exposição aos embriões;
- Utilizar a frequência cardíaca como biomarcador fisiológico frente à exposição ao ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D);
- Avaliar se alterações morfológicas e mortalidade nos embriões de 3 dias são decorrentes da exposição ao 2,4-D;
- Investigar se a exposição dos embriões de 3 dias ao ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) causa alterações no crescimento;
- Analisar o efeito genotóxico do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) através do ensaio cometa, permitindo a detecção de rupturas no DNA de fita simples.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Salienta-se que o projeto, bem como todos os procedimentos realizados nesse estudo foram previamente submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEUA/UTFPR), sob o certificado de número 2018-40/2018- CEUA, processo 23064.046670/2018-61 (Anexo 1).

### 4.1 MODELO BIOLÓGICO

Ovos fertilizados de *Gallus gallus domesticus*, L. 1758 foram adquiridos através de recursos financeiros (contemplado pelo edital SEI/UTFPR - 0738254/2019) em um incubatório comercial da região, conforme cada bateria de experimento. No laboratório, os ovos foram higienizados com papel toalha umedecido em álcool etílico 70% e identificados de acordo com os grupos experimentais (Tabela 3). Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Controle Biológico II da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos.

**Tabela 3 – Grupos Experimentais**

<b>Grupos experimentais</b>	<b>Ovos</b>
(1) Grupo Controle fechado	Não injetados
(2) Grupo Controle veículo DH <sub>2</sub> O	Injetados com 100 µL de DH <sub>2</sub> O
(3) Grupo – 2,4-D I	Concentração 15µg/L em 100 µL de DH <sub>2</sub> O
(4) Grupo – 2,4-D II	Concentração 30µg/L em 100 µL de DH <sub>2</sub> O
(5) Grupo - 2,4-D III	Concentração 60µg/L em 100 µL de DH <sub>2</sub> O
(6) Grupo Positivo - MMS	Concentração 60µg/L em 100 µL de DH <sub>2</sub> O

\* Água destilada (DH<sub>2</sub>O), Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), MetilMetanoSulfonado (MMS).

**Fonte: A autora (2020).**

As concentrações de 2,4-D utilizadas foram determinadas a partir de estudos anteriores que utilizaram outros organismos animais, em especial peixes, como modelo para estudo dos efeitos do 2,4-D, os quais mostraram que essas concentrações podem vir a causar anormalidades no organismo.

Em uma pesquisa realizada por Roque (2018), foi possível identificar as classes de danos encontradas durante as análises de ensaio cometa, onde se percebeu um aumento na taxa de danos para os organismos submetidos a maior concentração do herbicida 2,4-D, dentre as diferentes concentrações (15, 30 e 60µg/L). Porém não houve diferença significativa do ponto de vista estatístico em relação ao potencial mutagênico do 2,4-D no estudo citado. Assim como outros estudos, a autora reforça a necessidade de mais pesquisas relacionadas ao tema, já que os experimentos são realizados em curto prazo, em relação à exposição natural nos ambientes aquáticos.

Ainda, é importante salientar que a concentração de 30µg/L corresponde àquela permitida pela legislação vigente para água potável, ou seja, para consumo humano e animal (BRASIL, 2004).

## 4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os embriões foram divididos em 6 grupos, como observado na Tabela 3. As soluções dos contaminantes utilizadas para a exposição foram preparadas a partir do 2,4-D puro (padrão analítico – Sigma Aldrich®) diluído em 100µl de H<sub>2</sub>O destilada nas concentrações de 15, 30 e 60 µg/L. Utilizou-se dois grupos controle negativo, um fechado (sem manipulação) e um veículo (injetado com H<sub>2</sub>OD), para verificar se a injeção nos ovos iria interferir nos parâmetros analisados, e um controle positivo (MetilMetanoSulfonato MMS – Padrão Analítico Sigma Aldrich 99%, diluído 1g para 1 mL), cuja ação mutagênica em células animais já é conhecida.

Cada grupo experimental recebeu um total de 20 ovos, divididos igualmente, realizado em 5 baterias experimentais independentes, cada uma contou com um total de 120 ovos. Desses 20 ovos, 10 ovos foram para análise morfológica através da Montagem Total e 10 ovos para análise através do método de Ensaio Cometa, os quais foram previamente divididos entre a numeração do 1 ao 20, sendo assumido do 1 ao 10 para análise morfológica, e do 11 ao 20 para a análise genotóxica, totalizando seiscentos (600) ovos no final de todo o experimento. A tabela 4 nos traz um resumo do modelo experimental utilizado.



A cada bateria de experimento foram analisadas a taxa de mortalidade, a frequência cardíaca de cada um dos embriões vivos, morfologia fazendo análise qualitativa e quantitativas das lâminas, e análise genotóxica através do Ensaio Cometa, onde foram analisados os danos causados no DNA das células individuais.

**Tabela 4 - Modelo experimental**

Grupos experimentais	Ovos	Nº de ovos
<b>Montagem total para análise morfológica</b>		
(1) Grupo Controle fechado	Não injetados	10x5
(2) Grupo Controle veículo (H <sub>2</sub> O destilada)	Injetados com 100µL de H <sub>2</sub> O destilada	10x5
(3) Grupo – 2,4-D I	Concentração 15µg/L em 100 µL de H <sub>2</sub> O destilada	10x5
(4) Grupo – 2,4-D II	Concentração 30µg/L em 100 µL de H <sub>2</sub> O destilada	10x5
(5) Grupo - 2,4-D III	Concentração 60µg/L em 100 µL de H <sub>2</sub> O destilada	10x5
(6) Grupo Positivo - MMS	Concentração 60µg/L em 100 µL de H <sub>2</sub> O destilada	10x5
<b>Total de ovos</b>		<b>300</b>
<b>Ensaio Cometa</b>		
(1) Grupo Controle fechado	Não injetados	10x5
(2) Grupo Controle veículo (H <sub>2</sub> O destilada)	Injetados com 100µL de H <sub>2</sub> O destilada	10x5
(3) Grupo – 2,4-D I	Concentração 15µg/L em 100 µL de H <sub>2</sub> O destilada	10x5
(4) Grupo – 2,4-D II	Concentração 30µg/L em 100 µL de H <sub>2</sub> O destilada	10x5
(5) Grupo - 2,4-D III	Concentração 60µg/L em 100 µL de H <sub>2</sub> O destilada	10x5
(6) Grupo Positivo - MMS	Concentração 60µg/L em 100 µL de H <sub>2</sub> O destilada	10x5
<b>Total de ovos</b>		<b>300</b>
<b>Cada tratamento em Quintuplicata</b>		<b>TOTAL</b>
		<b>600 ovos</b>

\*Cada bateria contou com 120 ovos, sendo destinados 60 ovos para Montagem Total e 60 ovos para análise de Ensaio Cometa

\* Água destilada (DH<sub>2</sub>O), Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), MetilMetanoSulfonado (MMS).

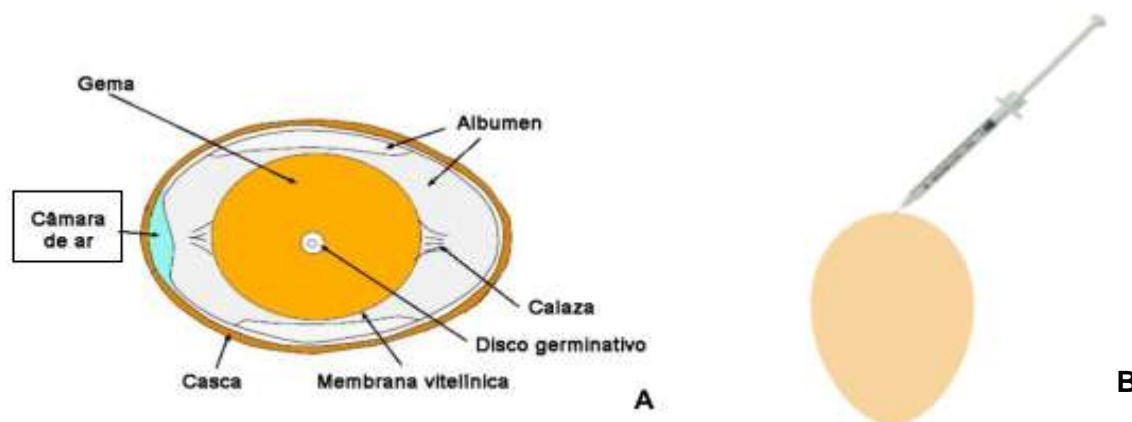
**Fonte: A autora (2020).**

### 4.3 MÉTODO DE EXPOSIÇÃO

Os embriões foram expostos às diferentes concentrações do herbicida 2,4-D (15, 30 e 60µg/L), ao veículo (DH<sub>2</sub>O), e ao MMS, no tempo E0 (para simular ao máximo a situação de exposição no ambiente natural). Para a injeção dos contaminantes foi utilizado uma agulha (1,60 x 40 mm) para perfurar a casca, e com seringa e agulha (0,3 x 8 mm) de insulina injetado o volume de 100 µL das soluções contaminantes diretamente na câmara de ar (Figura 7), permitindo uma melhor dispersão dos fluidos no embrião (YAMAMOTO et al., 2012). Todos esses procedimentos foram realizados na cabine de fluxo laminar.

A nomenclatura usual utilizada em estudos do desenvolvimento embrionário, considera como E0 o ovo que acabou de ser posto, antes da sua incubação, E1 o primeiro dia embrionário, E2 o segundo dia embrionário e assim sucessivamente, até E21, correspondente ao dia normal de eclosão (HOUENOU e OPPENHEIM, 1994; YAGINUMA et al., 2001).

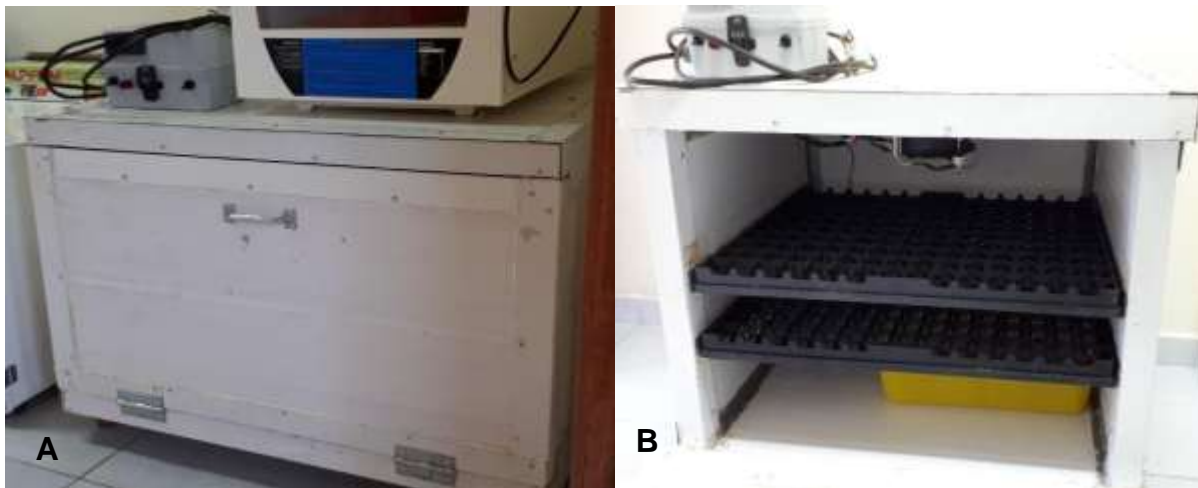
**Figura 7 - Desenho esquemático do ovo. A: Indicação de suas partes. B: Injeção do contaminante na câmara de ar.**



Fonte: A - Expedição Vida (2014). FONTE: B - A autora (2020).

Após a injeção, os ovos foram selados com fita adesiva, para evitar contaminação por microrganismos, posicionados com a câmara de ar voltada para cima e incubados por 72 horas em incubadora para ovos construída sob encomenda (Figura 8), sob temperatura controlada a 37,5°C, com umidade e ventilação constantes.

**Figura 8 - A: Incubadora para ovos construída sob encomenda. B: Bandejas plásticas utilizadas para incubar os ovos posicionados com a câmara de ar voltada para cima.**

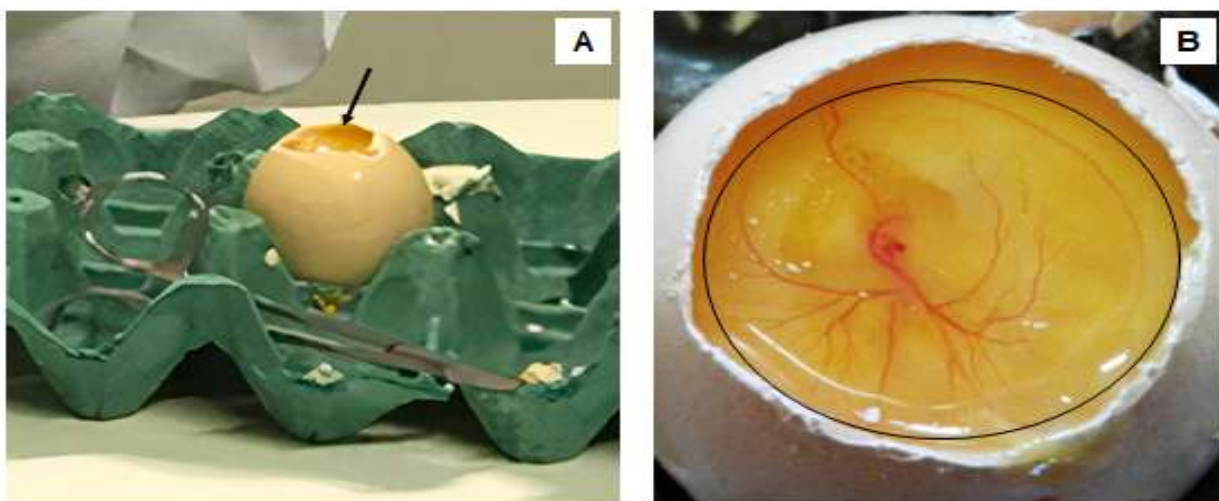


Fonte: A autora (2020).

#### 4.4 ABERTURA DOS OVOS

Após 72 horas de incubação, os ovos foram abertos pelo método da janela (KORN; CRAMER, 2007), com o auxílio de tesoura cirúrgica (Figura 9A), sendo de tamanho suficiente para observação e acesso ao embrião (Figura 9B).

**Figura 9 - A: Abertura da casca com auxílio de tesoura cirúrgica. Seta indicando a janela aberta. B: Visualização do embrião in ovo. Área circulada: Janela aberta conforme o tamanho do embrião.**



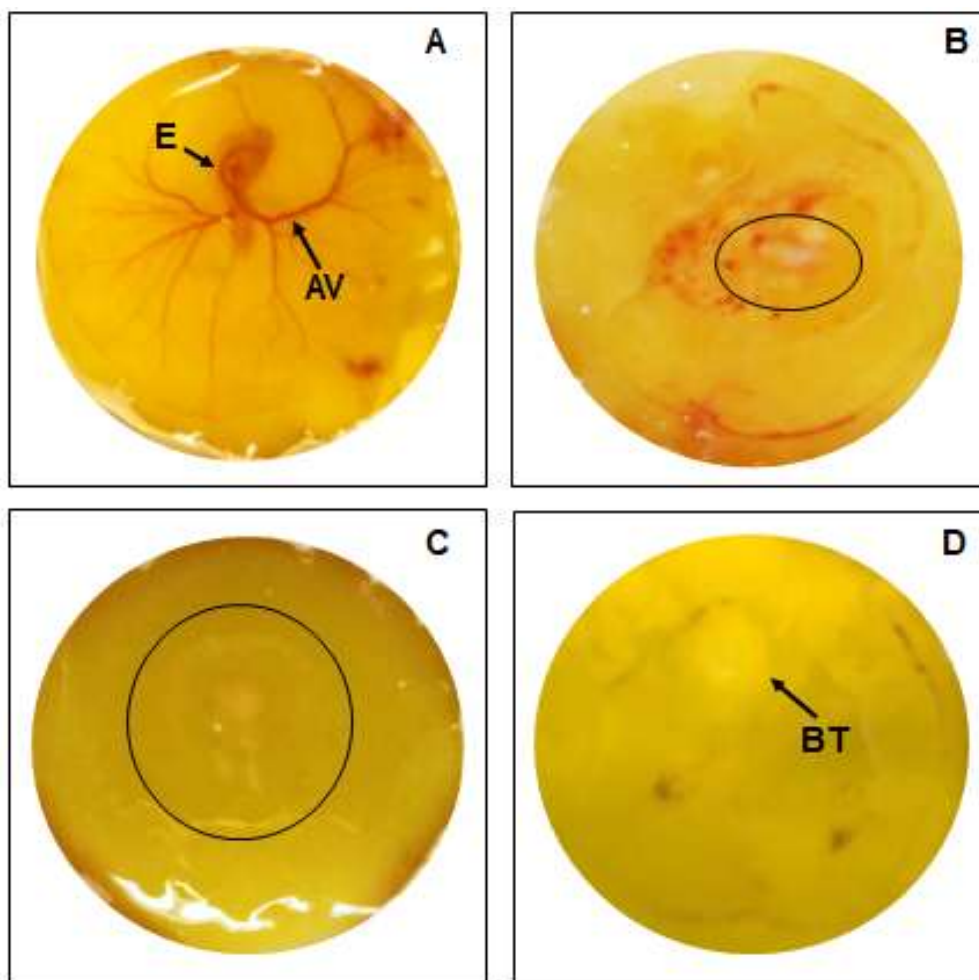
Fonte: A Autora (2020).

#### 4.5 ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA

Após a abertura do ovo foi determinada a viabilidade do embrião (Figura 10). Os embriões vivos foram contabilizados para a taxa de sobrevivência. Dentre os 10 ovos de cada tratamento direcionados ao ensaio cometa, todos os embriões (mortos e vivos) foram utilizados para análise de DNA. Porém, os embriões mortos encontrados dentre os ovos destinados para a análise morfológica, foram descartados.

Os embriões considerados vivos apresentaram batimentos cardíacos, coloração rósea, e vasos sanguíneos extraembrionários íntegros (Figura 10A). Os considerados mortos apresentaram: coloração esbranquiçada, ausência de batimentos cardíacos e vasos sanguíneos extraembrionários vazados (Figura 10B); ou evidência da retomada do desenvolvimento após a incubação, porém não concluindo as 72h (Figura 10C). Além disso, não foram considerados mortos aqueles embriões classificados como inviáveis, ou seja, que não retomaram seu desenvolvimento durante a incubação (Figura 10D), apresentando características de coalhado, impossibilitando determinar o evento que levou a esse tipo de ocorrência.

**Figura 10 - A: Embrião vivo com 72 horas de incubação. B: Embrião morto. C: Embrião morto. D: Embrião que não teve o desenvolvimento retomado durante a incubação. E: Embrião. AV: Artéria vitelínica. Área circulada: Embrião morto. Bt: Blastoderme.**



Fonte: A Autora (2020).

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

Após os três dias de incubação (72h), posteriormente à abertura do ovo e antes da eutanásia, avaliou-se a frequência cardíaca de todos os embriões vivos, sendo os batimentos cardíacos contabilizados durante 15 segundos, e multiplicados por 4, para obter o número de batimentos por minuto (bpm).

#### 4.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA

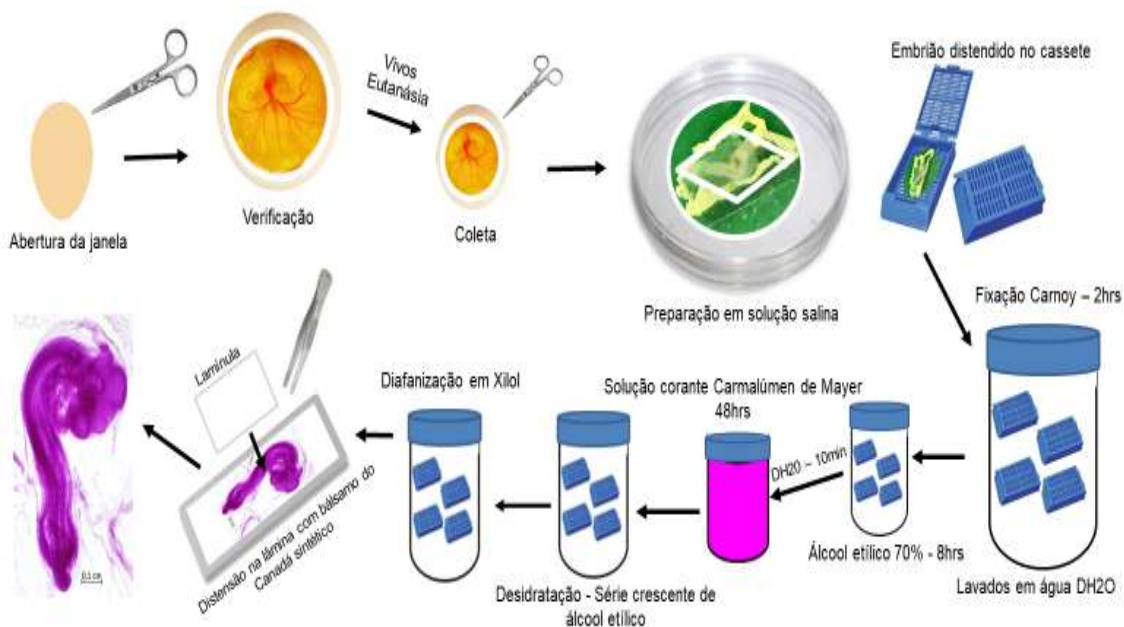
Dez (10) ovos de cada tratamento, totalizando 60 ovos de cada experimento realizado, foram destinados à análise morfológica. Dessa forma, os embriões vivos foram

destinados para análise morfológica através da técnica de montagem total (ORTOLANI-MACHADO et al., 2012) e os mortos descartados. Antes da coleta e após o registro da frequência cardíaca, os embriões foram submetidos à eutanásia, seguindo as normas do CONCEA (2018), visto que no 3º dia de incubação o sistema nervoso ainda não está desenvolvido, não estando completa a diferenciação de neurônios. Dessa forma, ainda não há sensibilidade à dor ou sofrimento por parte do embrião.

Logo após a eutanásia, os embriões foram retirados dos ovos com o auxílio de pinça e tesoura, e transferidos para uma placa de Petri contendo solução salina, para serem lavados, removendo o excesso de vitelo. Em seguida, os embriões foram distendidos em uma borda recortada de papel filtro, identificados conforme o tratamento utilizado e gotejada a solução fixadora Carnoy (100 mL de ácido acético glacial adicionado em 300 mL de etanol 100%) para endurecer o material e facilitar a sua transferência, a qual foi feita com o auxílio de pinça para caixas plásticas para biópsia do tipo cassete (material de processamento utilizado para inclusão de material histológico em soluções). Os embriões então foram fixados em Carnoy por 2 horas, à temperatura ambiente e em frasco de vidro fechado. Depois, foram lavados em água destilada e colocados em álcool etílico 70%, onde permaneceram por no mínimo 8 horas.

Posteriormente, os embriões foram hidratados em água destilada por 10 minutos e corados com solução corante Carma Lúmen de Mayer por 48 horas. Após a coloração, estes sofreram desidratação em série crescente de álcool etílico e diafanização em xilol. Para a montagem das lâminas utilizou-se o bálsamo do Canadá sintético e lamínula. Todo o processo é possível ser observado na figura 11, onde está detalhadamente descrito.

**Figura 11 - Técnica de montagem total descrita por ORTOLANI-MACHADO et al., 2012**



Fonte: A Autora (2020).

A análise morfológica e registro fotográfico foram realizados em microscópio estereoscópico (Zeiss, Stemi – 305) acoplado em uma câmera (Axiocam ERc 5s) e utilizando o software ZEN 2.3 LITE, de acordo com os estágios descritos por HAMBURGER e HAMILTON (1951), dos quais, os mais comuns para esse tempo de incubação, estão apresentados na tabela 5.

**Tabela 5 - características dos estágios embrionários 16 ao 19**

Estágios	Características
16	Prega lateral do corpo se estende até os somitos 17-20. Todas as flexuras se apresentam mais acentuadas que em estágios anteriores. Rotação se estende até os somitos 14-15. Broto da cauda curto, em cone ereto.
17	Prega lateral do corpo se estende ao redor de toda a circunferência do corpo. Os brotos dos membros se elevam da blastoderme pelo dobramento das pregas do corpo. Flexura cranial semelhante ao estágio 16. Flexura cervical mais inclinada que nos estágios anteriores. Rotação se estende até os somitos 17-18. Broto da cauda se inclina ventralmente.

	Alantóide ainda não está formado.
	Somitos se estendem além dos brotos das pernas. Brotos das pernas levemente maiores que o broto das asas.
18	Na flexura cervical, o eixo da medula forma aproximadamente um ângulo reto com o eixo do tronco posterior. Broto da cauda se inclina para a direita.
	Somitos se estendem até a cauda.
19	Brotos dos membros simétricos. Broto da cauda curvado, com a extremidade apontando para frente. Na flexura cervical, o eixo da medula forma um ângulo agudo com o eixo do tronco posterior. A flexura do tronco praticamente ou inteiramente desaparece devido a rotação do corpo inteiro. Olhos não pigmentados

Fonte: Adaptado (HAMBURGER; HAMILTON, 1951).

#### 4.8 ANÁLISE DE DANOS AO DNA ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA

Para este procedimento foi previamente desenvolvido um método padrão para análises de embriões com três dias de incubação, pois nenhum protocolo com o procedimento de ensaio cometa utilizando embriões de três dias foi encontrado na literatura. Um único trabalho com procedimentos semelhantes foi encontrado, porém foram utilizados partes de embriões com 21 (vinte e um) dias de incubação (WILLIAMS et al., 2014).

Com isso, a metodologia adaptada do ensaio cometa utilizou o volume total do embrião. Embriões viáveis (mortos ou não) foram coletados e inseridos em 400µL de soro fetal bovino e posteriormente homogeneizado para a realização do ensaio cometa. Após homogeneização de 1 (um) embrião em soro fetal bovino, retirou-se uma amostra de 60µL dessa solução, misturada em 120µL de gel de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), sendo essa espalhada sobre uma lâmina previamente coberta com uma camada de agarose normal, recoberta com lamínula e levada a geladeira para que o gel endurecesse e se mantivesse fixado na lâmina.

Na sequência, a lamínula foi retirada, e as lâminas foram imersas em uma solução de lise durante 24 horas a 4°C. Este procedimento garante a degradação das membranas



celular e nuclear, restando somente o DNA solto em um formato de nucleoide. Após o período mínimo de 24h, as lâminas foram cuidadosamente transferidas para a cuba de eletroforese e recobertas com uma solução de NaOH (300mM), e EDTA (200 mM), em 1600mL de H<sub>2</sub>O deionizada gelada (4°C) com pH>13, onde se mantiveram em repouso por 25 minutos. Posteriormente, foram submetidas à eletroforese por 30 minutos, a 300mA e 25V. Transcorrida esta etapa, as lâminas foram dispostas sobre uma bandeja plástica, onde sofreram neutralização em solução de TRIS 0,4 M, pH 7,5 durante 5 minutos por três vezes.

Por fim, foi realizada a fixação em etanol 100% por 10 minutos. Depois de secas, as lâminas foram coradas com brometo de etídio diluído em água destilada na proporção de 1:200, utilizando 10µL dessa mistura por lâmina, sendo esta recoberta com lamínula após 10 minutos de descanso no escuro. As análises de danos das células individuais foram realizadas em microscópio de imunofluorescência.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises do delineamento experimental foram realizadas pelo programa Statistica (StatSoft versão 8.0). Os pressupostos de homocedasticidade foram submetidos pelo teste de Levene, e os de normalidade foram conduzidos através dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk.

Posteriormente aos testes de normalidade foram utilizados:

- a) Para dados com distribuição normal: Teste T de Student e ANOVA de uma via, com pós-teste de LSD Fisher, quando aplicáveis;
- b) Para dados que não apresentaram distribuição normal: Teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn, quando aplicável.

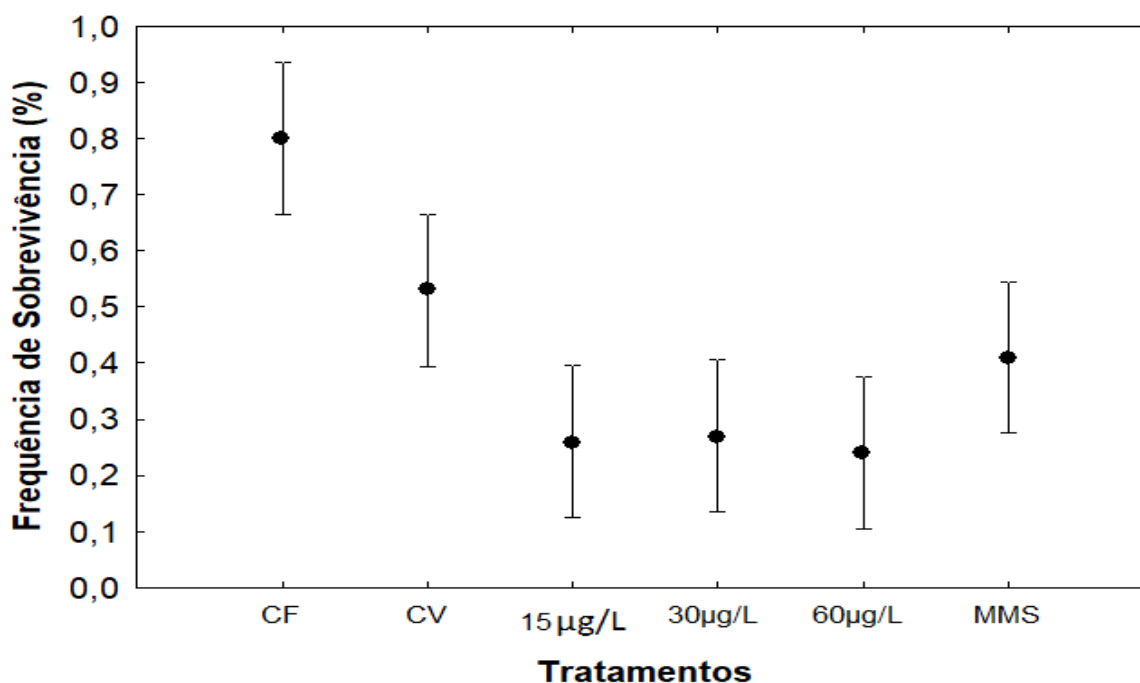
Para atender os pressupostos de normalidade e homocedasticidade dos dados de sobrevivência, e possibilitar o uso da ANOVA bifatorial, os dados de sobrevivência foram transformados usando a fórmula  $[(\sqrt{x}) + 1]$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 SOBREVIVÊNCIA

Os resultados demonstraram que a sobrevivência dos embriões foi afetada pela exposição ao contaminante 2,4-D, visto que houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais. O grupo controle fechado cuja taxa de sobrevivência dos embriões foi de 80% e o controle veículo, o qual exibiu 53% de sobrevivência, foram estatisticamente maior que nos grupos expostos. Nos grupos expostos ao 2,4-D nas concentrações de 15, 30 e 60  $\mu\text{g/L}$ , a taxa de sobrevivência dos embriões foi de 26%, 27% e 24%, respectivamente. A taxa de sobrevivência do controle positivo MMS foi de 41%, sendo maior que nos grupos expostos, e demonstrou diferença significativa entre eles. A concentração com menor taxa de sobrevivência foi no grupo exposto ao 2,4-D 60  $\mu\text{g/L}$ , seguido pelo de 15 e 30  $\mu\text{g/L}$  (Figura 12).

Figura 12 – Porcentagem de sobrevivência dos embriões de *Gallus gallus domesticus* do controle fechado (CF), controle veículo (CV, com  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), grupos expostos de 2,4-D nas concentrações de 15, 30 e 60  $\mu\text{g/L}$ , e o controle positivo MMS, incubados por 3 dias, a 37,5°C, com umidade e ventilação constantes. Barras verticais indicam o IC95% e o ponto central a média.



Fonte: A Autora (2020).

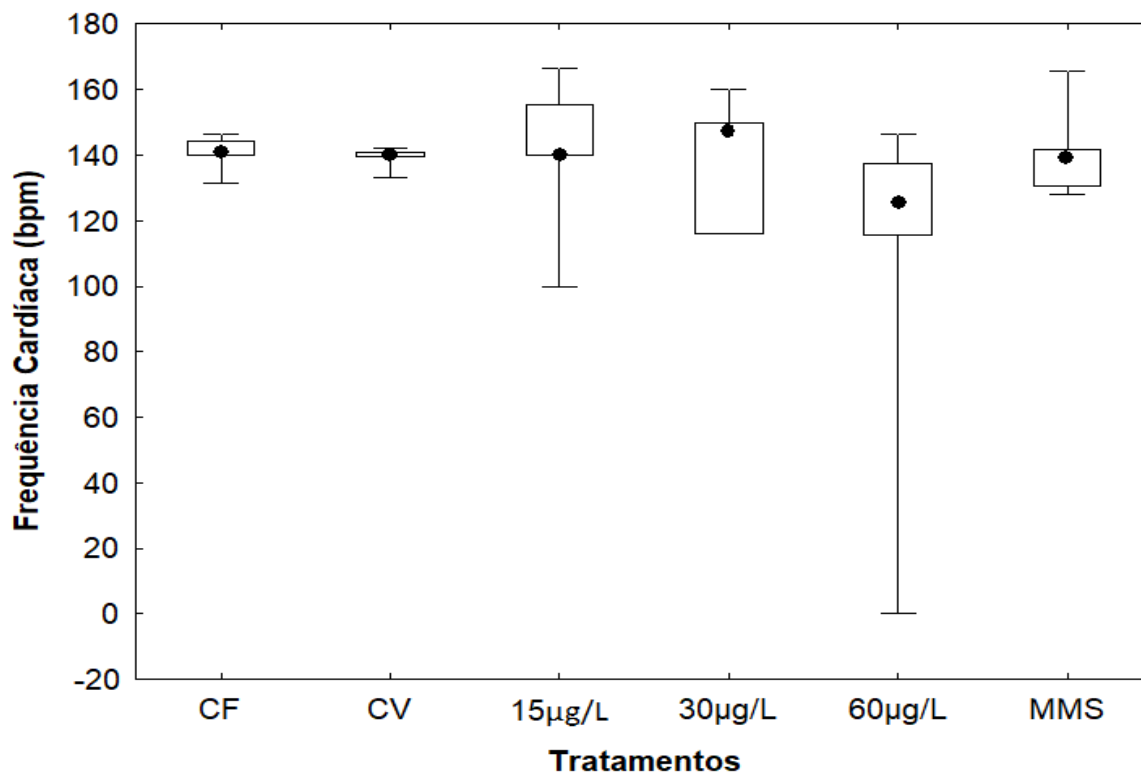
A homogeneidade das variâncias testada com o teste de Levene ( $p= 0,188569$ ) e a normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk obteve valores de  $W= 0,9756$ ,  $p= 0,6992$ . Após, foi empregada a ANOVA bifatorial seguida pelo teste LSD de Fisher para comparação entre os grupos.

## 5.2 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

Os dados não atenderam os pressupostos de normalidade e homocedasticidade, sendo assim, não-paramétrico e, por isso foram conduzidas as análises estatísticas ao teste de Kruskal-Walis, fazendo uma comparação múltipla entre grupos independentes. Esse resultado não-paramétrico já era esperado, visto que a frequência cardíaca (bpm), é uma distribuição de Poisson, que é frequentemente usada para modelar o número de ocorrências de um evento por um certo período de tempo, e conseqüentemente não apresenta normalidade (PRASTE, 2012).

Os resultados demonstraram que não houve diferença estatística significativa na frequência cardíaca entre os grupos controle fechado e veículo, revelando que a manipulação dos ovos também não interfere na frequência cardíaca. A mediana da frequência cardíaca nos embriões do grupo controle fechado foi de 140 bpm e no grupo veículo de 139 bpm. Não houve diferença significativa ( $p=0,5536$ ) na frequência cardíaca dos embriões em nenhum dos grupos experimentais (Figura 13). Os embriões expostos ao 2,4-D 15 $\mu\text{g/L}$  apresentaram uma frequência cardíaca de 140 bpm, assim como o tratamento com 2,4-D 30 $\mu\text{g/L}$ , com uma frequência cardíaca de 137 bpm, e o controle positivo MMS com uma frequência cardíaca de 141 bpm, estes se mantiveram na mesma linha que os controles fechado e veículo, sendo os batimentos cardíacos normais encontrados na literatura. O grupo exposto com 2,4-D 60 $\mu\text{g/L}$ , apresentou uma frequência cardíaca de 105 bpm, evidenciando uma diferença das mediana dos outros grupos, porém não estatisticamente significativa.

Figura 13 - Frequência cardíaca (bpm) dos embriões de *Gallus gallus domesticus* do controle fechado (CF), controle veículo (CV, com H<sub>2</sub>OD), grupos expostos de 2,4-D nas concentrações de 15, 30 e 60 µg/L, e o controle positivo MMS, incubados por 3 dias, a 37,5°C, com umidade e ventilação constantes. Barras verticais e os boxes indicam os quartis e o ponto central a mediana.



Fonte: A Autora (2020).

### 5.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA

A análise morfológica foi realizada de acordo com os estágios descritos por Hamburger e Hamilton (1951) após montagem total dos embriões (ORTOLANI-MACHADO et al., 2012). Para a análise morfológica foram desconsideradas 39 lâminas por não apresentarem uma boa visibilidade para o estudo da morfologia do embrião, evitando assim falsas conclusões sobre as lâminas e gerando dados confiáveis.

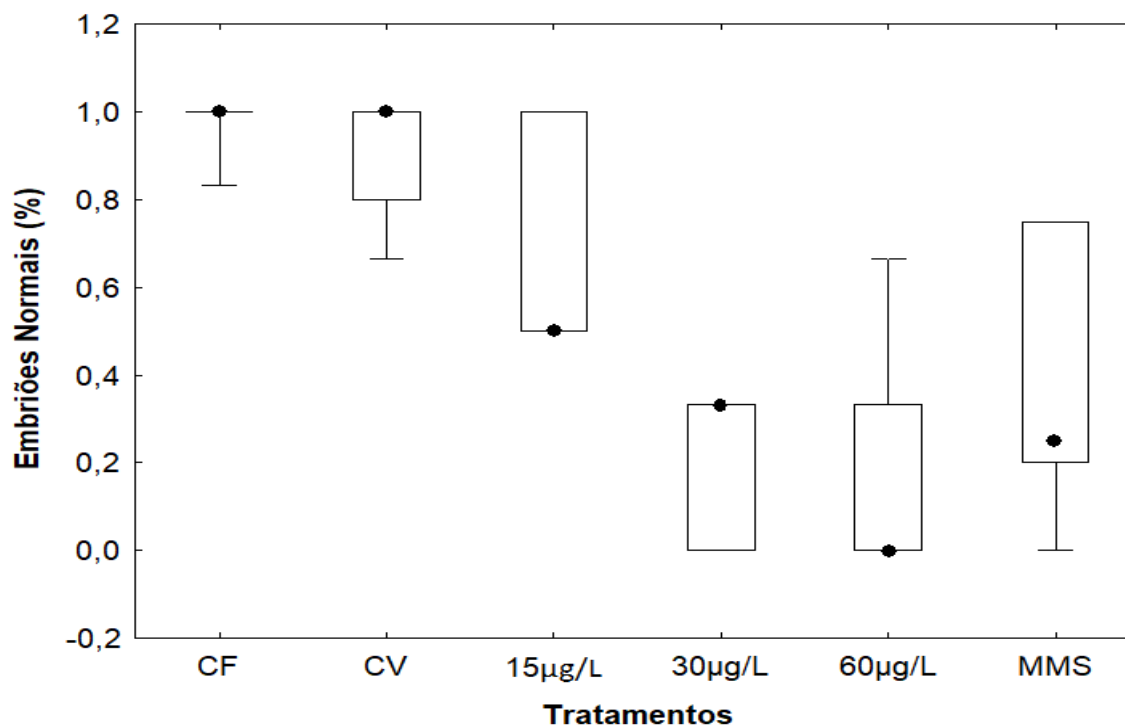
#### 5.3.1 Taxa de Normalidade e Malformações

Os dados de embriões normais e malformados, não atenderam os pressupostos de normalidade e homocedasticidade. Para essa variável aplicou-se o teste de Kruskal-

Wallis seguido de teste de Dunn por apresentar diferença estatística entre os grupos experimentais ( $p=0,0041$ ).

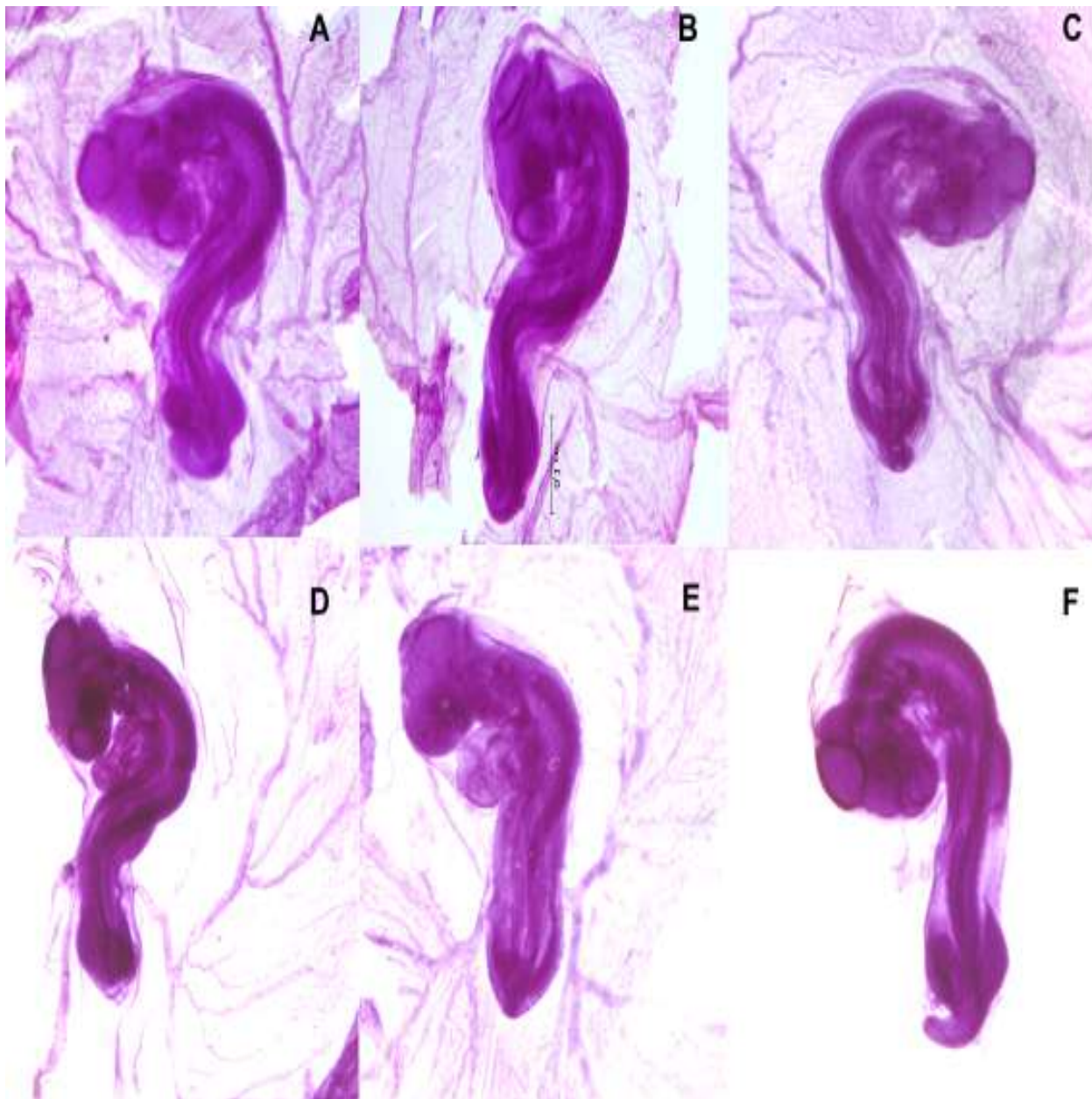
A Figura 14 apresenta a taxa de embriões normais encontrada em cada tratamento. Observou-se, ao nível de 5% de significância, diferença estatística entre as medianas percentuais dos tratamentos. A taxa do controle fechado foi de 96% de embriões normais, não diferindo estatisticamente do controle veículo que apresentou 85%. As porcentagens de ocorrência de embriões normais nos grupos expostos variaram entre si. O grupo exposto a 2,4-D 15 $\mu\text{g/L}$ , apresentou um percentual mais alto que os demais, com 67% de embriões normais. O controle positivo MMS, obteve 44% de embriões normais, sendo maior que nos grupos expostos de 2,4-D nas concentrações de 30 e 60  $\mu\text{g/L}$ , os quais apresentaram uma taxa menor de normalidade entre os embriões analisados (27% e 30% respectivamente). A Figura 15 apresenta imagens de embriões de *Gallus gallus domesticus* com desenvolvimento normal em diferentes tratamentos.

**Figura 14 – Porcentagem de embriões de *Gallus gallus domesticus* normais do controle fechado (CF), controle veículo (CV, com H<sub>2</sub>OD), grupos expostos de 2,4-D nas concentrações de 15, 30 e 60  $\mu\text{g/L}$ , e o controle positivo MMS, incubados por 3 dias, a 37,5°C, com umidade e ventilação constantes. Barras verticais e os boxes indicam os quartis e o ponto central a mediana.**



Fonte: A Autora (2020).

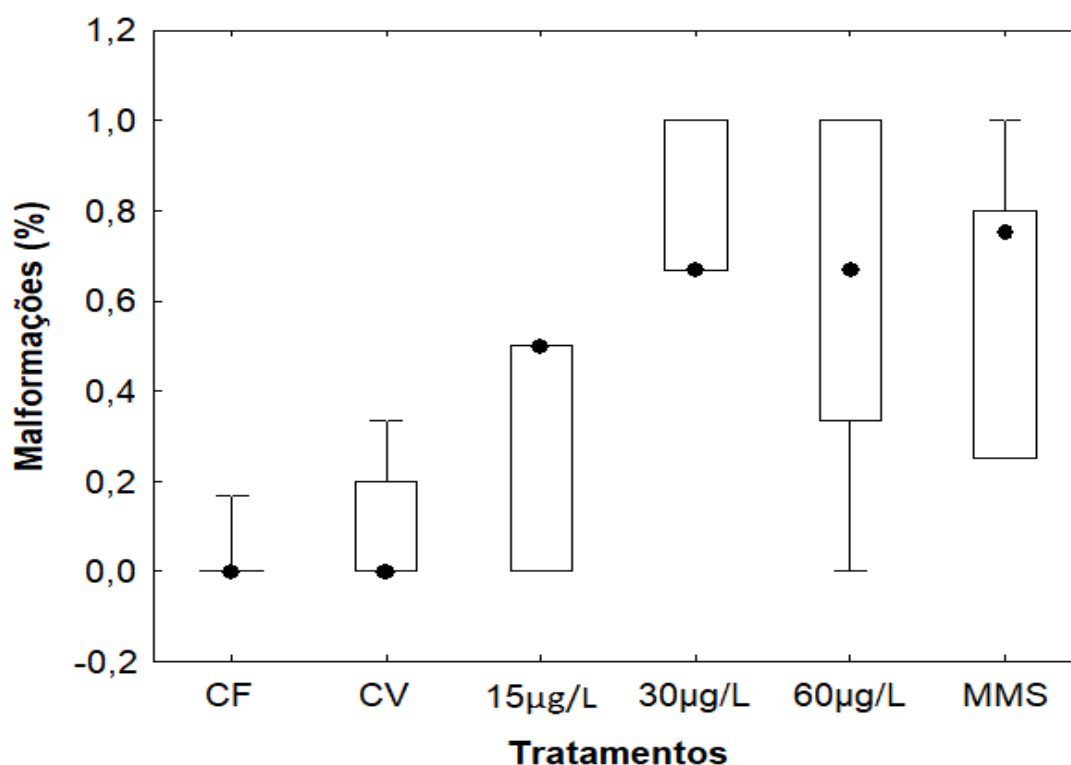
Figura 15 – Estereofotografia de embriões de *Gallus gallus domesticus* considerados normais. A) Embrião de *Gallus gallus domesticus* do controle fechado em estágio 19; B) Embrião de *Gallus gallus domesticus* do controle veículo em estágio 19; C) Embrião de *Gallus gallus domesticus* do controle positivo MMS em estágio 19; D) Embrião de *Gallus gallus domesticus* do grupo exposto a 2,4-D 15µg/L em estágio 18; E) Embrião de *Gallus gallus domesticus* do grupo exposto a 2,4-D 30µg/L em estágio 17; F) Embrião de *Gallus gallus domesticus* do grupo exposto a 2,4-D 60µg/L em estágio 19. Objetiva de Aumento de 1x.



Fonte: A Autora (2020).

As ocorrências de malformações encontradas durante o desenvolvimento embrionário de *G. gallus domesticus* foram significativamente diferentes entre os grupos experimentais ( $p=0,0083$ ). A taxa de malformação para os grupos fechado e veículo foram de 4% e 15%, respectivamente, sendo uma taxa percentual muito inferior quando comparada com as taxas dos grupos expostos. As incidências de malformações foram maiores no grupo exposto a concentração de 2,4-D 30 $\mu\text{g/L}$  com 73% de embriões malformados, seguida pelo grupo exposto a 60 $\mu\text{g/L}$ , com 70% e o controle positivo MMS, com 56% de malformações. O grupo exposto à concentração de 2,4-D 15 $\mu\text{g/L}$ , diferiu dos outros expostos apresentando um percentual de 33% de malformações embrionárias. Houve diferença estatística entre os grupos expostos, em relação ao grupo do controle fechado e veículo como observada na figura 16.

**Figura 16 –** Porcentagem de embriões de *Gallus gallus domesticus* com malformações embrionárias do controle fechado (CF), controle veículo (CV, com  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), grupos expostos de 2,4-D nas concentrações de 15, 30 e 60  $\mu\text{g/L}$ , e o controle positivo MMS, incubados por 3 dias, a 37,5°C, com umidade e ventilação constantes. Barras verticais e os boxes indicam os quartis e o ponto central a mediana.

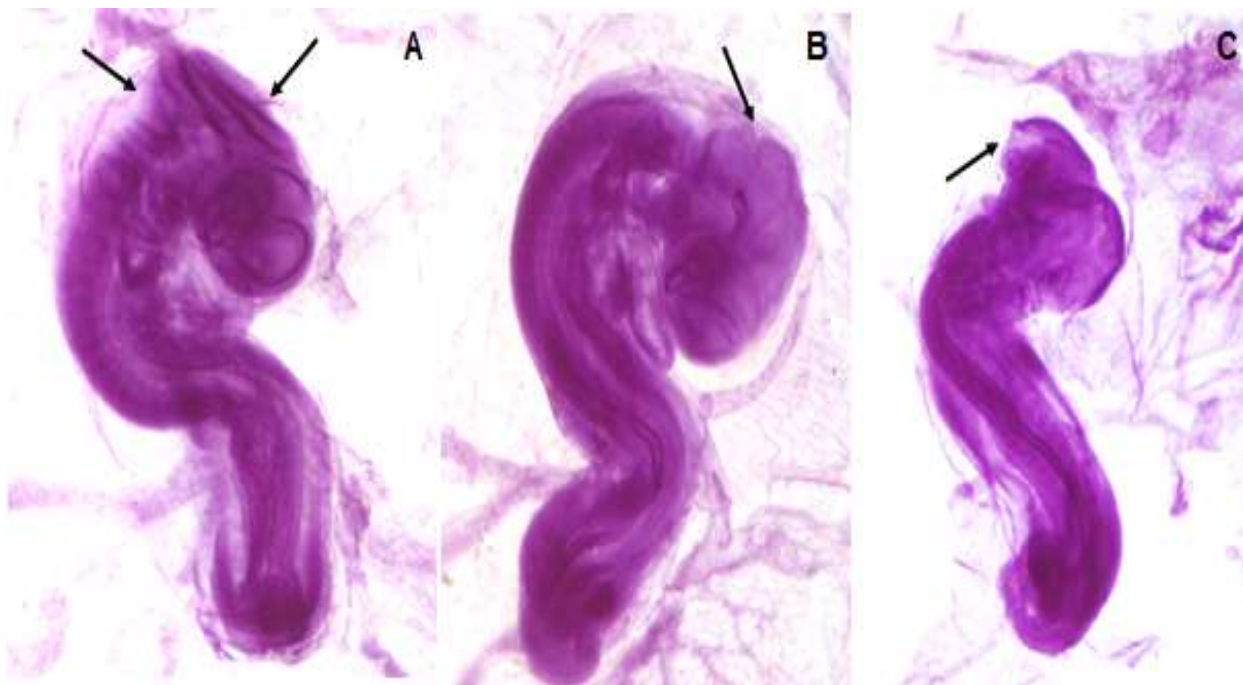


Fonte: A Autora (2020).



As malformações encontradas em todos os grupos foram relacionadas a região encefálica, caracterizada pela atrofia ou hipotrofia do mesencéfalo e falha no fechamento do tubo neural na região do crânio. Para essa última, caso os embriões continuassem seu desenvolvimento, o resultado final seria anencefalia com acrania. Nas demais regiões foram encontradas malformações como falha no fechamento lateral e caudal do corpo, caracterizando gastrosquise, disgenesia caudal e atrofia caudal. As Figuras 17 e 18 apresentam as malformações citadas acima, a que mais teve ocorrência foi a alteração morfológica do tipo gastrosquise, estando presente em todos os tratamentos.

**Figura 17 – Estereofotografia de embriões de *Gallus gallus domesticus* com malformações na região do encefálica. A) Embrião de *Gallus gallus domesticus* do controle positivo MMS no estágio 17, apresentando atrofia do mesencéfalo, além de atrofia caudal e gastrosquise; B) Embrião de *Gallus gallus domesticus* do grupo exposto a 2,4-D 30µg/L no estágio 18, apresentando hipotrofia do mesencéfalo; C) Embrião de *Gallus gallus domesticus* do grupo exposto a 2,4-D 30µg/L, no estágio 18, apresentando falha no fechamento do tubo neural ; Objetiva de Aumento de 1x.**

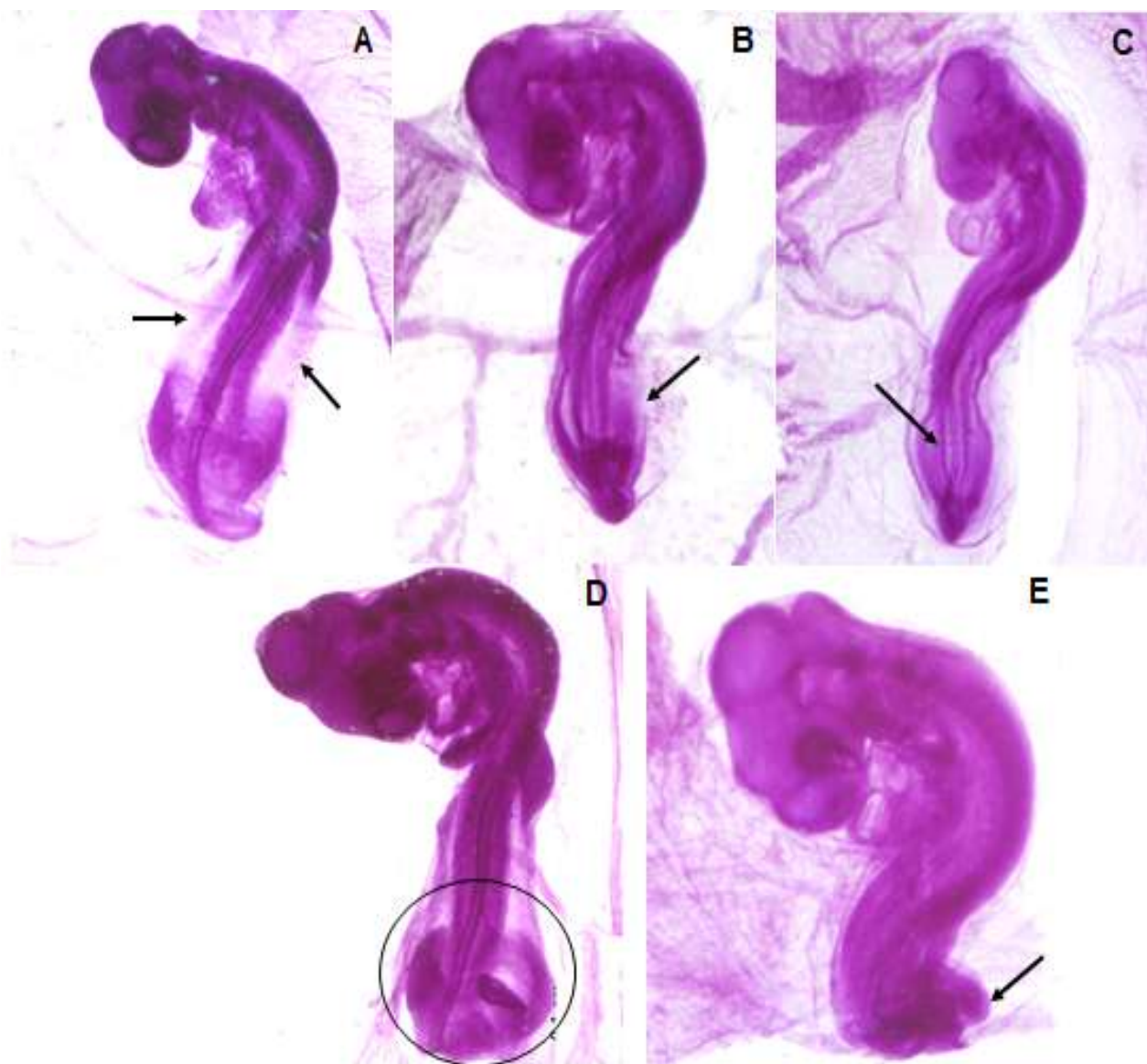


Fonte: A Autora (2020).

**Figura 18 – Estereofotografia de embriões de *Gallus gallus domesticus* com malformações na região corporal e caudal. A) Embrião de *Gallus gallus domesticus* do grupo exposto 2,4-D 60µg/L, no estágio 19, apresentando falha no fechamento lateral do corpo; B) Embrião de *Gallus gallus***



*domesticus* do controle positivo MMS no estágio 18, apresentando falha no fechamento lateral caudal; C) Embrião de *Gallus gallus domesticus* do controle positivo MMS no estágio 17, apresentando falha no fechamento abdominal; D) Embrião de *Gallus gallus domesticus* do controle veículo no estágio 18, apresentando disgenesia caudal; E) Embrião de *Gallus gallus domesticus* do grupo exposto 2,4-D 15µg/L, no estágio 18, atrofia caudal; As setas apontam para as malformações descritas acima, assim como o círculo. Objetiva de Aumento de 1x.

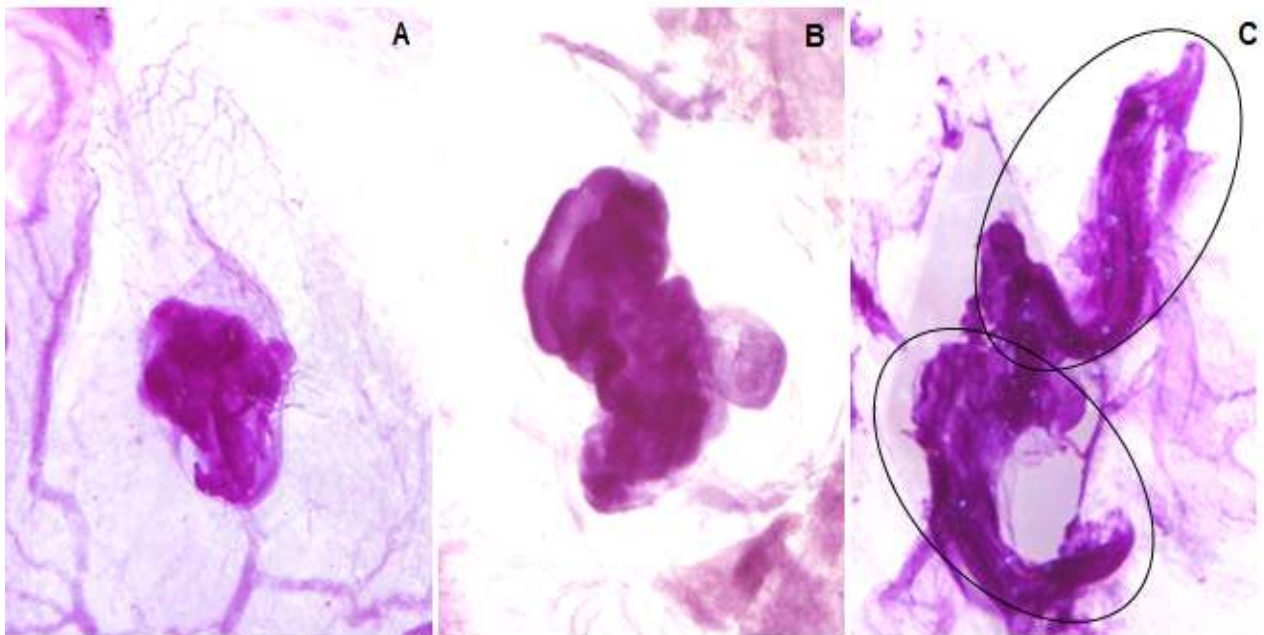


Fonte: A Autora (2020).

Foram encontrados embriões com malformações extensas, sendo impossível identificar suas estruturas ou determinar seu estágio embrionário, além de ter sido encontrado um embrião com o corpo em gama, ou seja, uma cabeça e dois corpos

(Figura 19). É importante salientar que dentre todas as malformações observadas na morfologia dos embriões, a grande maioria foi nos grupos expostos, se destacando os grupos expostos a concentração de 2,4-D 30µg/L e ao controle positivo MMS. O que se torna preocupante é que a dose de 2,4-D de 30µg/L, é a dose permitida pela legislação brasileira a ser encontrada em água potável, ou seja, para consumo humano, e o MMS é um mutagênico já conhecido pelos efeitos deletérios.

**Figura 19 – Estereofotografia de embriões de *Gallus gallus domesticus* com malformações extensas. A) Embrião de *Gallus gallus domesticus* do grupo exposto a 2,4-D 60µg/L; B) Embrião de *Gallus gallus domesticus* do grupo exposto a 2,4-D 30µg/L; C) Embrião de *Gallus gallus domesticus* do grupo exposto a 2,4-D 15µg/L, círculos apontam os dois corpos ligados a uma única cabeça; Objetiva de Aumento de 1x.**



Fonte: A Autora (2020).

### 5.3.2 Estágios Morfológicos

Segundo as descrições Hamburger e Hamilton (1951), os estágios embrionários comuns de serem encontrados em 72 horas de incubação são os 16, 17, 18 e 19. Os dados não atenderam os pressupostos, sendo assim conduzidas a análises estatísticas pelo teste de Kruskal-Wallis, não apresentando evidências para contrapor a hipótese nula

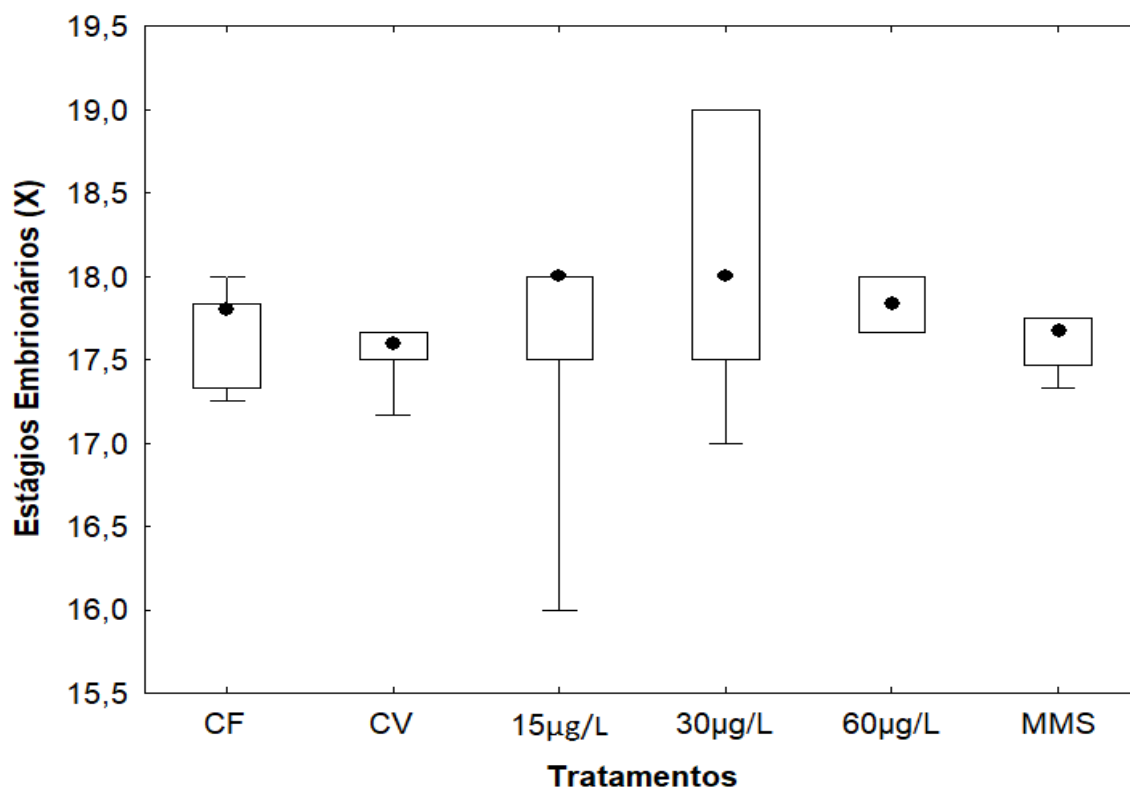
( $p=0,3603$ ). Os resultados estatísticos confirmaram o que é apresentado na Tabela 6, a qual mostra a taxa de embriões obtidos de acordo com seus estágios de desenvolvimento em todos os tratamentos, demonstrando que o estágio médio de desenvolvimento embrionário foi o 18 (Figura 20). Através da análise estatística e das características morfológicas comuns neste tempo de incubação, não foi observado alterações no tempo de desenvolvimento dos embriões expostos às concentrações de 2,4-D 30 $\mu\text{g/L}$ , 15 $\mu\text{g/L}$ , 60 $\mu\text{g/L}$  em relação ao controle fechado e veículo.

**Tabela 6 – Estágios embrionários de *Gallus gallus domesticus* sob efeito dos tratamentos com 2,4-D nas concentrações de 15, 30 e 60 $\mu\text{g/L}$ , controle fechado, controle veículo ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e o controle positivo MMS.**

Grupos experimentais	Estágios				
	15	16	17	18	19
Controle Fechado	0%	0%	48%	40%	11%
Controle veículo $\text{DH}_2\text{O}$	0%	9%	38%	47%	5%
2,4-D 15 $\mu\text{g/L}$	0%	14%	14%	71%	0%
2,4-D 30 $\mu\text{g/L}$	0%	11%	22%	33%	33%
2,4-D 60 $\mu\text{g/L}$	0%	0%	40%	40%	20%
Controle Positivo - MMS	0%	0%	44%	50%	6%

Fonte: A Autora (2020).

**Figura 20 – Análise estatística dos estágios embrionários de *Gallus gallus domesticus* sob efeito dos tratamentos com 2,4-D nas concentrações de 15, 30 e 60 $\mu\text{g/L}$ , controle fechado, controle veículo ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e o controle positivo MMS. Barras verticais e os boxes indicam os quartis e o ponto central a mediana.**



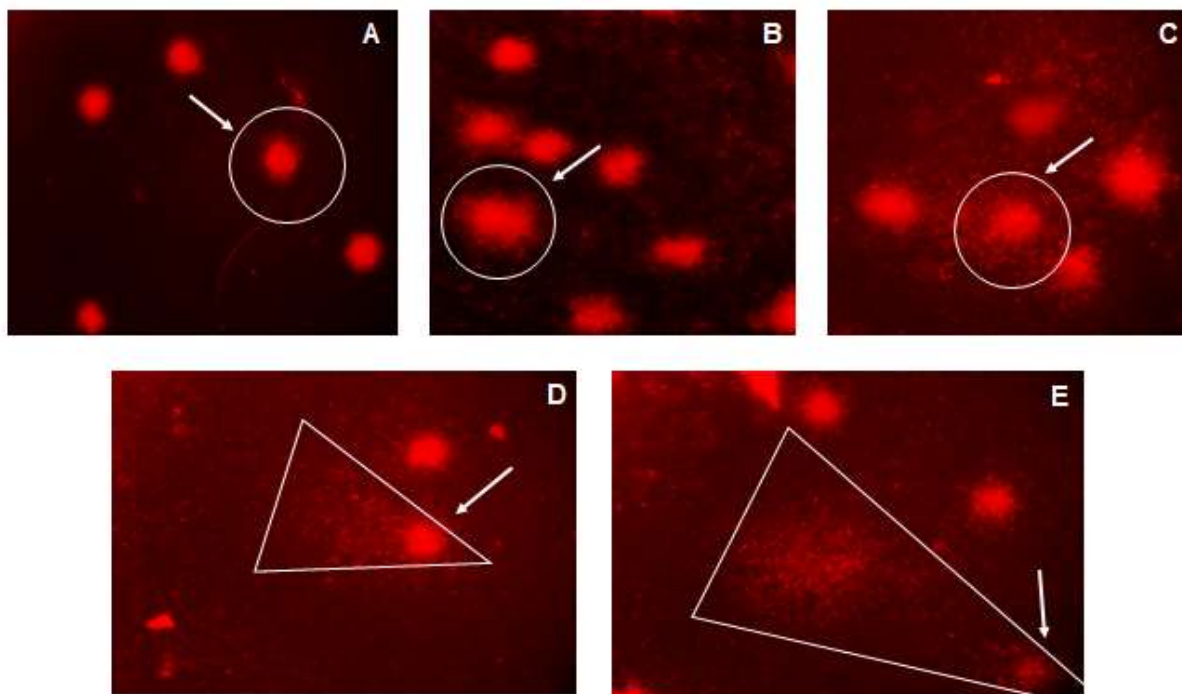
Fonte: A Autora (2020).

#### 5.4 ENSAIO COMETA

Os dados da taxa de dano a nível molecular encontrados em cada tratamento atenderam os pressupostos de normalidade e homocedasticidade. Para essa variável aplicou-se o teste ANOVA seguido pelo teste de LSD (Fisher) para identificar os grupos homogêneos. As análises evidenciaram a diferença estatística entre os grupos experimentais, com um p menor que 5% de significância.

Através da Figura 21 podem ser visualizadas as classes de danos encontradas na análise do cometa com embriões de *Gallus gallus domesticus*, ao passo que na Figura 22 se evidencia o resultado das comparações estatísticas entre os tratamentos do estudo.

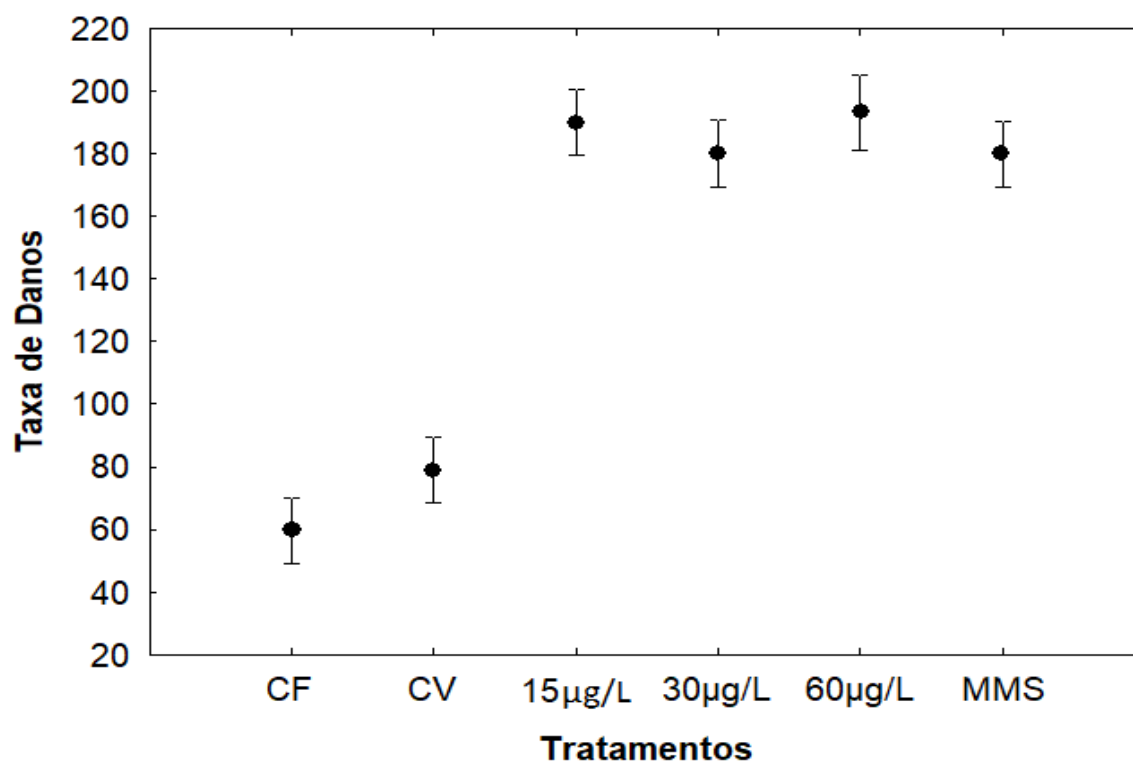
Figura 21 - Classes de danos observadas nas células dos embriões de *Gallus gallus domesticus*. A) Sem danos; B) Dano 1; C) Dano 2; D) Dano 3; E) Dano 4. Setas apontam a área dos círculos e triângulos demonstrando a diferença na circunferência dos nucleoides entre as classes danos.



Fonte: A Autora (2020).

A taxa de danos dos embriões não foi afetada pela manipulação dos ovos (injeção), visto que não houve diferença estatística significativa entre o grupo controle fechado e controle veículo. No gráfico supracitado observa-se que as concentrações utilizadas nos grupos expostos ao 2,4-D 15, 30 e 60 $\mu$ g/L e o controle positivo MMS diferiram dos grupos controles CF e CV, sendo que os danos reportados para o grupo exposto a 30 $\mu$ g/L se igualou aos danos encontrados no MMS. O grupo com a maior taxa de dano foi o 2,4-D na concentração de 60 $\mu$ g/L.

Figura 22 - Comparação de médias para os valores de danos verificados no ensaio cometa. Barras verticais indicam o IC95% e o ponto central a média.



Fonte: A autora (2020).

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo corroboraram com a hipótese proposta inicialmente, em relação ao potencial tóxico do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), sobre o desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus*, L. 1758, após 72 horas de incubação. Segundo Kmeciki (2018), esses indivíduos são mais sensíveis a ações de fatores externos potencialmente teratogênicos, tendo em vista que nos primeiros períodos ocorrem altas taxas de proliferação e diferenciação celulares, que como consequência, podem apresentar anomalias, e nos casos mais graves levar a morte do embrião. O embrião de galinha é altamente suscetível à toxicidade química até 4 dias de incubação (CLEGG, 1964). Essa interação entre o contaminante e as replicações celulares podem evidenciar seus principais efeitos no desenvolvimento embrionário. Estes são os primeiros resultados com embriões de aves da espécie *Gallus gallus domesticus*, L. 1758 com três dias de incubação expostos ao herbicida 2,4-D.

A sobrevivência diferiu entre os grupos experimentais, apresentando diferença significativa entre os grupos expostos e os controles. Esse resultado foi evidenciado nos estudos de Gomes (2017), onde foi demonstrado que a exposição ao 2,4-D é capaz de causar 50% de mortes de embriões de peixe-zebra durante o período embrionário, além de atrasar o processo de eclosão, afetando, conseqüentemente, a taxa de sobrevivência. Outro estudo que utilizou como análise a taxa de sobrevivência evidenciou que a exposição ao 2,4-D diminuiu significativamente a sobrevivência assim como a taxa de eclosão de embriões de peixe-zebra (KANG LI et al., 2017).

Não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais durante a análise de frequência cardíaca (bpm) do embrião de *G. gallus*. Estes são os primeiros resultados a respeito da taxa de bpm de embriões com 3 dias de incubação após exposição ao 2,4-D, uma vez que não há dados disponíveis na literatura. Segundo os autores KANG LI et al. (2017), as taxas de batimento cardíaco dos embriões de peixe-zebra aumentaram em relação a exposição ao 2,4-D, apresentando uma taxa de batimentos cardíacos de  $187,8 \pm 3,6$  bpm no grupo de controle, e de  $225,8 \pm 4,2$  e  $204,2 \pm 11,3$  bpm nos grupos expostos, afetando também a morfologia do coração.

A teratologia estuda as malformações congênitas exibidas ao nascimento ou após a ele. A maioria das malformações em humanos podem se originar até a oitava semana de gestação e, sabendo disso, podemos relacionar as alterações morfológicas encontradas neste estudo com a terceira/quinta semana do desenvolvimento do embrião humano (SADLER, 2016; HILL, 2017). As análises entre as taxas de embriões normais e malformados neste estudo se complementam, visto que são vias dependentes. Ambas demonstraram diferença significativa entre os grupos dos controles (fechado e veículo) e os grupos expostos. Na análise morfológica deste trabalho foram observadas alterações na região encefálica, caracterizada pela presença de atrofia e hipotrofia do mesencéfalo e falha no fechamento do tubo neural na região do crânio, falha no fechamento lateral e caudal do corpo, caracterizando gastrosquise, disgenesia caudal e atrofia caudal, por fim malformações extensas, as quais afetaram a estrutura do corpo. Essas malformações encontradas são consequências da exposição ao contaminante utilizado no estudo, visto que a quantidade de malformações foi maior nos grupos expostos ao 2,4-D.

Em um estudo realizado por Aronzon et. al., (2010) com embriões de *Rhinella arenarum* (Sapo-da-Areia) expostos a 2,4-D, demonstram malformações nas regiões encefálica, corporal e caudal, semelhantes às que foram encontradas neste estudo. Os autores relatam uma conexão entre a taxa de mortalidade/sobrevivência com as malformações, as quais teriam resultado na maioria dos casos em letalidade. Esses resultados mostram que os eventuais mecanismos de interação entre os ingredientes ativos do 2,4-D podem produzir alguns efeitos subletais diferentes. O resultado das malformações encontradas nos embriões de *G. gallus* deste estudo corrobora com outros trabalhos que utilizaram modelos biológicos e concentrações do 2,4-D diferentes, como peixe-zebra (GOMES, 2017; KANG LI et al. 2017), jundiá prata (MENEZES, 2014) e ratos (SCHWETZ et al, 1971; BUSLOVICH et al, 1976 apud IPCS, 1984).

A análise do desenvolvimento embrionário através dos estágios permite verificar se a exposição ao 2,4-D altera o padrão de crescimento embrionário, em relação ao padrão de organização corporal normal, considerando algumas estruturas embrionárias específicas (KMECIKI, 2018). Não foram observadas diferenças entre os estágios do controle fechado e veículo com os dos grupos expostos, os quais apresentaram o estágio 18 como o mais ocorrente. Outros estudos apontaram que o 2,4-D influenciou no



desenvolvimento do embrião de peixe-zebra, o qual causou dificuldades no desenvolvimento do animal com relação ao seu crescimento e desenvolvimento (GOMES, 2017). Segundo Aronzon et al. (2010), os efeitos de agentes nocivos são susceptíveis a diferentes estágios de desenvolvimento. Os autores evidenciam que embriões de *Rhinella arenarum* nas primeiras 24 horas expostos ao 2,4-D foram mais suscetíveis a alterações no desenvolvimento que no tratamento contínuo de blástula exposta por 168 horas. Os mesmos explicam que este resultado pode ser explicado pelo processo de adaptação nos embriões tratados continuamente, o que resultaria em um aumento da resistência por esses embriões em relação ao tempo de desenvolvimento.

Em relação ao ensaio cometa foram verificadas diferenças significativas entre os níveis de danos ocasionados pelas três concentrações de 2,4-D, quando comparadas aos controles fechado e veículo. Esses resultados são corroborados por uma série de referências, as quais relataram lesões de DNA estimadas pela técnica de ensaio cometa (SCGE) em diferentes modelos biológicos (MAIRE et al., 2007; ATEEQ et al., 2005; GONZÁLEZ et al., 2005; RUIZ DE ARCAUTE et. al., 2016).

No trabalho de Roque (2018), o autor utilizou as mesmas concentrações nos grupos expostos das utilizadas neste trabalho, com o modelo biológico *Rhamdia quelen*. Nesse trabalho evidenciou-se diferença estatística entre os grupos expostos e os controles, no tempo de exposição 24 horas, assumindo uma curva de taxa de dano ao DNA parecida com a encontrada no presente trabalho. Um estudo recente publicado por Laborde et al. (2020) utilizando vários biomarcadores moleculares para avaliações do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), destacam claramente que o 2,4-D aumenta a instabilidade genômica revelada pelo ensaio cometa (SCGE), e em outros testes do estudo também a nível molecular seguiram a mesma linha de resultado. Os autores citam que o uso extensivo de 2,4-D, e a sua capacidade de exercer dano ao DNA estimado pelo bioensaio SCGE não é completamente documentado.

A concentração de 30 µg/L permitida para consumo humano conforme resolução nº 357 do CONAMA, teve um efeito parecido com o encontrado no controle positivo MMS, sendo este conhecido pelos efeitos deletérios a nível molecular, ou seja, a concentração de 30 µg/L pode estar causando efeitos deletérios assim como o MMS. Se as alterações

não forem reparadas durante os processos de mitose e meiose, possivelmente mutações poderão causar problemas para a sobrevivência do organismo (ROQUE, 2018).

## 7 CONCLUSÃO

Após a análise dos resultados, concluiu-se que a exposição ao 2,4-D nas diferentes concentrações 15, 30 e 60 µg/L causam maior letalidade, interferindo na taxa de sobrevivência dos embriões nos grupos expostos, mas sem alterar a frequência cardíaca dos embriões incubados por 72 horas.

O composto se mostrou capaz de causar alterações morfológicas no desenvolvimento embrionário do *Gallus gallus domesticus*, levando a malformações extensas e inviáveis à vida. Porém, o contaminante não alterou o estágio de desenvolvimento normal para embriões após 3 dias de incubação.

A diferença entre os níveis de danos para o comprimento da cauda dos cometas observadas para o grupo controle e expostos, evidencia que o 2,4-D possui atividade genotóxica suficiente para atuar sobre o DNA de *G. gallus* demonstrando seu potencial em causar efeitos deletérios e mutagênicos.

Como perspectiva futura, verificou-se que se faz necessário a realização de mais estudos avaliando a segurança deste herbicida para organismos não-alvo e seres humanos, principalmente em relação a concentração de 30 µg/L regulamentada pela Portaria de Consolidação nº 5 de 2017 do Ministério da Saúde, a ponto de gerar dados para reavaliar a quantidade máxima de 2,4-D permitida em água potável pela legislação brasileira.

## REFERÊNCIAS

- AMARANTE JUNIOR, et al. Revisão das Propriedades, Usos e Legislação do Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D). **Caderno de Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão**. V. 13, n. 1, p. 60-70. Maranhão, 2002.
- AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 6, n. 2, p. 158-170, 2003.
- ANDRADE, S. R. M.; FALEIRO, F. G. Biotecnologia, transgênicos e biossegurança. **Embrapa Cerrados**. cap. 4. p.63-76. 2009.
- ARIAS, E. Sister chromatid exchange induction by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in chick embryos. **Ecotoxicologia e Ambiental Segurança**. Itália, 2002.
- 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**. Vol. 12 p.61-72. Rio de Janeiro, 2007.
- ARONZON, C. M. Stage-Dependent Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic on the Embryonic Development of a South American Toad, *Rhinella arenarum*. **Environmental Toxicology**. P-373-381, 2010.
- 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.
- AUSTRALIAN WATER ASSOCIATION - AWA. **Australian Drinking Water Guidelines**. 4ªEd, v.1, 2011. Disponível em: <http://www.esdat.net/Environmental%20Standards/Australia/ADW%202011/ADWG%202011.pdf>. Acessado em: 27 de novembro de 2020.
- BARBOSA, F. S., KAWANO, T. Embriologia. **Tópicos em malacologia médica [online] - SciELO Books**, p. 314. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1995.
- BELCHIOR, D. C. V. et al. Impactos de agrotóxicos sobre o meio ambiente e a saúde humana. **Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília**. v. 34, n. 1, p. 135-151, 2017.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Portaria nº 329. **Diário Oficial da União**. Brasília, 1985.

BRASIL. Lei no 11.936, 14 de maio de 2009. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2009.

BRASIL, Leis, Decretos. **Ministério da Saúde. Portaria 2914, de 12 de dezembro de 2011**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO PÚBLICO FEDERAL. 4ª Câmara de Coordenação e Revisão. Grupo de Trabalho (GT) de agrotóxicos e transgênicos. **Ata da sexta reunião do GT – agrotóxicos e transgênicos**. 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. **Agrotóxicos na ótica do Sistema Único de Saúde V.1**. Distrito Federal, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. **Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil (Boletim 2014)**. 2016.

BRASIL, Leis, Decretos. **Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação Nº 5, de 28 de setembro de 2017**. Anexo XX dispõe sobre o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Seção II. Art. 129. Brasília, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. **Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil (Boletim 2017)**. 2018.

BRASIL. Ato nº 29, de 29 de abril de 2019. **Diário Oficial da União**, ed. 82. Seção 1, p. 7. 2019.

BRASIL. ANVISA. **Reavaliação toxicológica – Agrotóxico 2-4-D passa a ter restrições na aplicação**. 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/agrotoxico-24-d-passa-a-ter-restricoes-na-aplicacao>. Acesso em: 12 de dezembro de 2020.

BRASIL, ANVISA. Ministério da Saúde. **Resolução – RDC Nº 284, de 21 de Maio de 2019**. Dispõe sobre a manutenção do ingrediente ativo ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em produtos agrotóxicos, no País. Brasília, 2020.

BRIANEZI, G. et al. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v.45 n.4 Rio de Janeiro. 2009.

BRITO, N. M. et al. Risco de contaminação de águas por pesticidas aplicados em plantações de eucaliptos e coqueiros: análise preliminar. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 11, p.93-104. Curitiba, 2001.

BRODEUR, J. C., et. al. Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: Non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. **Aquat Toxicol.** V.91, p.161–170. 2009.

BUSLOVICH, S. Y.; ALEKSASHINA, Z. A. & KOLOSOVSKAYA, V. M. Embryotoxic effects of herbicides: Chlorinated phenoxy acids. **Zdrav. Beloruss.** v.10, p.83-84 (in Russian). 1976.

CASTANGA, L. A., et al. Stage dependent teratogenic and lethal effects exerted by ultraviolet B radiation on *Rhinella* (*Bufo*) *arenarum* embryos. **Environ Toxicol Che.** V.28, p.427–433. 2009.

CARDOSO, M. C. M. C. **Avaliação da remoção do herbicida 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) e do seu principal metabólito 2,4 diclorofenol (2,4-DCP) no sistema convencional de tratamento de água associado à préoxidação.** 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 84p., 2009.

CARNEIRO, F. F. et al. Dossiê Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. **Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/ Fundação Oswaldo Cruz/ Editora Expressão Popular.** 2015.

CASSAL, V. B. et al. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental – REGET.** V. 18 p.437-445. Rio Grande do Sul, 2014.

CIB. Transgênicos no Brasil: conheça seus benefícios e sua trajetória. 2016. Disponível em: <https://cib.org.br/transgenicos-no-brasil/>. Acesso em: 03 de maio, 2019.

CHRISTOFFOLETI, P. J. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, v. 12, n. 1, 1994.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Principais aspectos da resistência de plantas daninhas ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha, Viçosa**, v.21, n.3, p.507-515, 2003.

CLEGG, D. J. The hen egg in toxicity and teratogenicity studies. **Food Cosmet. Toxicol.** 2, 717–727. 1964.

CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA. Diretiva 98/83/CE do Conselho de 3 de Novembro de 1998 relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, p. 332–354, 1998.

CONCEA - CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - Resolução Normativa nº37, de 15 de fevereiro de 2018 - Baixa as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA**. Seção I, Pág. 5. 2018.

COPE, O. B. et al. Some chronic effects of 2,4-D on the bluegill (*Lepomis macrochirus*). **Trans. Am. Fisheries Soc.**, v. 99, n. 1, p. 1-12, 1970.

DAUGHTON, C. G. Unregulated water pollutants: emerging research. *Environmental Impact Assessment Review*. v. 24, p. 711-732, 2004.

DAUER, J. T. et al. Temporal and spatial dynamics of long-distance *Conyza canadensis* seed dispersal. **Journal of Applied Ecology**, v. 44, n. 1, p. 105-114, 2007.

DELLAMATRICE, P. M., MONTEIRO, R. T. R. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**. V.18, n.12, p.1296–1301. Pernambuco. 2014.

DIAS, M. H. G. F. Saber docente: contingências culturais, experienciais, psicossociais e formação. **Caxambu. Anais. Resumos**. p.54-9. 1997.

DUARTE, E. C. C. Manejo de herbicidas no controle de plantas daninhas e sua influência no crescimento e produção do milho híbrido AG 1051. **Universidade Federal da Paraíba - Curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias**. Pernambuco, 2015.

DUFFARD, R. O. Biochemical alterations in skeletal muscle induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic butyl ester during chick embryonic development. **Biochemical Pharmacology**. Vol. 40, No. 11. pp. 2433-2440. Great Britain, 1990.

ENVIRONMENT, A.; COUNCIL, A. R. A **Summary of Pesticide Residue Data from the Alberta Treated Water Survey**, 1995-2003. 2004.

EXPEDIÇÃO VIDA. Como acontece a formação dos pintinhos nos ovos? **Expedição vida**, 2014. Disponível em: **Como acontece a formação dos pintinhos nos ovos? – Fotos chocantes! | Expedição Vida (expedicaovida.com.br)**. Acesso em: 27 de novembro, 2020.

FERNANDEZ, F. Estudo de um caso perdido: o falcão de Maurício e a Biologia da Conservação. **((o)eco / Jornalismo Ambiental**. 2008.

FERRARO, M. V. M. et al. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 1, p. 103–107, 2004.

FERREIRA, S. S. MENEGUELLI, A. Z. Diagnóstico ambiental de um fragmento de mata ciliar do rio urupá no município de Urupá- RO. **Revista Saberes UNIJIPA**, v. 5 n. 1, p. 13-27, 2017.

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

GAMA, A. F. O impacto de herbicidas utilizados nas atividades agrícolas – Rio Jaguaribe - Ceará. **Universidade Federal do Ceará - Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Marinha**. Fortaleza, 2012.

GAZZIERO, D. L. P., et al. A warning about the glyphosate weed resistance. **VI Congresso brasileiro de soja**. Cuiabá, Mato Grosso. 2012.

GILBERT, S. F. *Developmental Biology*. **Massachusetts: Sinauer, 2000**; p. 749. 2001.

GHISI, N. C. Relationship between biomarkers and pesticide exposure in fishes: a review. **Pesticides: advances in chemical and botanical pesticides**. p. 357–382. 2012.

GHISI, N.C. Aplicação de múltiplos biomarcadores em peixe neotropical para avaliação da contaminação aquática em áreas de influência agrícola e urbana. **Universidade Estadual de Maringá - Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia**. Maringá, 2013a.



GHISI, N. C.; CESTARI, M. M. Genotoxic effects of the herbicide Roundup® in the fish *Corydoras paleatus* (Jenyns 1842) after short-term, environmentally low concentration exposure. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 4, p. 3201–3207, 2013b.

GLASSMEYER, S. T. The cycle of emerging contaminants. **Water resources impact**, v. 9, n.3, p. 5-7, 2007.

GOBBO, S. R. Uso do DDT: um perigo eminente para a saúde humana. **FACIS/UNIMEP / Projeto Qualidade da Água**. São Paulo, 2016.

GOMES, M. A. F.; BARIZON, R. R. M. Panorama da Contaminação Ambiental por Agrotóxicos e Nitrato de origem Agrícola no Brasil: cenário 1992/2011. **Embrapa Meio Ambiente**. São Paulo. 2014.

GOMES, D. S. F. **Efeitos do ácido 2,4-diclorofenoxiacético e do Tordon® no desenvolvimento embrionário e no metabolismo energético do peixe-zebra (*danio rerio*)**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Produtos Bioativos e Biociências. Macaé - RJ, 2017.

GONZALES, E. Embriologia e Desenvolvimento Embrionário. In: **APINCO. Manejo da Incubação**. São Paulo, 1994.

GONZALEZ, M., et al. Genotoxicity of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and a commercial formulation, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine salt. I. Evaluation of DNA damage and cytogenetic endpoints in Chinese hamster ovary (CHO) cells. **Toxicol. in Vitro**. V.19, p.289–297. 2005.

GORZA, N. L. **Remoção de agrotóxicos em uma instalação piloto com tratamento de águas de abastecimento em ciclo completo, associado à préoxidação e adsorção em carvão ativado granular**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2012.

GOUVEIA, N. Resíduos sólidos urbanos: impactos socioambientais e perspectiva de manejo sustentável com inclusão social. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 6, p. 1503-1510, 2012.

GRIGORI, P. Agência Pública: **Afinal, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxico do mundo?** Centro de Estudos Estratégicos da Fiocruz- CEE-Fiocruz. 2019. Disponível em: <https://cee.fiocruz.br/?q=node/1002>. Acesso em: 12 de dezembro de 2020.

GROOMBRIDGE, J. J. et al. Blackwell Science, Ltd Evaluating the severity of the population bottleneck in the Mauritius kestrel *Falco punctatus* from ringing records using MCMC estimation. **Journal of Animal Ecology**, n. 70, p. 401–409, 2001.

GUERRA, J. F. **Remoção do herbicida 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-d) no tratamento convencional de água e associado à adsorção em carvão ativado em pó (CAP) em escala piloto**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Centro Tecnológico, Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, n.88, p. 49-92, 1951.

HEALTH CANADA - HC. **Guidelines for Canadian Drinking Water Quality**. 4ªEd., v.1, 2010. Disponível em: [http://www.hc-sc.gc.ca/ewhsemt/alt\\_formats/hecssesc/pdf/pubs/water-eau/2010sum\\_guideres\\_recom/sum\\_guide-res\\_recomeng.pdf](http://www.hc-sc.gc.ca/ewhsemt/alt_formats/hecssesc/pdf/pubs/water-eau/2010sum_guideres_recom/sum_guide-res_recomeng.pdf). Acesso em: 27 de novembro, 2020.

HERKOVITS, J.; PÉREZ-COOL, C.; HERKOVITS, F. Ecotoxicity in the Reconquista River, province of Buenos Aires. Argentina: A preliminary study. **Environ. Health Perspect.** V.104, p.186–189. 1996.

HILL, M. A. Embryology Carnegie Stage Comparison. Disponível em [https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Carnegie\\_Stage\\_Comparison](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Carnegie_Stage_Comparison). Acesso em: 20 de novembro, 2020.

HOUENOU, L. J.; OPPENHEIM, R. W. Motoneuron death during developmental, following injury and in neurological disease. **The Neuroscience**, n. 6, p. 283-289, 1994.

INDUSTRY TASK FORCE II ON 2,4-D RESEARCH DATA. 2000. Disponível em: <https://www.24d.org/>. Acesso em: 14 de fevereiro, 2019.

IPCS - **ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA**. 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID (2,4-D). Disponível em: <http://www.bvsde.ops-oms.org/bvsacg/e/cdcagua/guias/b.parametos/4.BasTox/IPCS/035.24D-JMPR/02.24D-EHC29.pdf>, 1984. Acesso em: 20 de novembro, 2020.

IRIE, N.; KURATANI, S. Comparative transcriptome analysis reveals vertebrate phylotypic period during organogenesis. **Nature Communications**, v. 2, n. 248, 2011.

JERVAIS, G. et al. 2008. 2,4-D General Fact Sheet; National Pesticide Information Center, **Oregon State University Extension Services**. Disponível em: <http://npic.orst.edu/factsheets/24Dgen.html>. Acesso em: 25 de maio, 2019.

KANG LI et al. Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. **Chemosphere**. V.171. p.40-48, 2017.

KAMRIN, M. A. **Pesticides profile**: toxicity, environmental impact, and fate. Nova Iorque: Lewis, 1999.

KEY, S.; MA, J. K. C.; DRAKE, P. MW. Genetically modified plants and human health. **JR Soc Med**, v. 101, p. 290-298, 2008.

KISSMANN, K. G. **Resistência de plantas a herbicidas**. São Paulo: Basf Brasileira S.A., p. 33, 1996.

KMECICK, M. Avaliação dos efeitos do cádmio e ácido perfluorooctanóico nos estágios iniciais de desenvolvimento de embriões de ave (*Gallus gallus*). **Universidade Federal do Paraná - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**. Curitiba, 2017.

KORN, M. J.; CRAMER, K. S. Windowing Chicken Eggs for Developmental Studies. **Journal of Visualized Experiments**, n. 8, e306, 2007.

KUMARAVEL, T. S.; JHA, A. N. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 605, n. 1–2, p. 7–16, 2006.

LABORDEA, M. R. R., LARRAMENDY, M. L., SOLONESKI, S. Cytotoxic and genotoxic assessments of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) in in vitro mammalian cells. **Toxicology in Vitro**. V. 104783, p. 65. 2020.

LAMEGO, F. P.; VIDAL, R. A. Resistência ao glyphosate em biótipos de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Planta Daninha**, v. 26, n. 2, p. 467-471, 2008.

LAZAROTO, C. A. et al. Biologia e ecofisiologia de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*). **Ciência Rural**, vol. 38, n. 3, p. 852-860, 2008.

LEAL, W. P. **Remoção do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) por adsorção em carvão ativado pulverizado associado ao tratamento convencional de água para consumo humano**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.

MACEDO NETO, D.; FROEHNER, S.; 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.

MARTINS, S.V. **Recuperação de matas ciliares**. 1ed. Viçosa. Aprenda Fácil. 2001.

MAIRE, M. A., et al. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid: effects on Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation, c-Myc expression, DNA damage and apoptosis. **Mutat. Res.** V.631, p.124–136. 2007.

MENEZES, C. et al. Commercial formulation containing 2,4-D affects biochemical parameters and morphological indices of silver cat sh exposed for 90 days. **Fish Physiol Biochem.** v. 41, p. 323-330. 2014.

MCCANCE, W. et al. Contaminants of emerging concern as new groundwater tracers to delineate wastewater impacts in urban and peri-urban areas. **Water Research.** v. 146, p. 118-133, 2018.

MIRANDA, A. L. et al. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings. **Environment International**, v. 34, p. 939–949, 2008.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no brasil. **Embrapa Meio Ambiente.** cap. 1, p. 7-14. 2009.

MOREIRA, M.S. et al. Resistência de *Conyza canadensis* e *C. bonariensis* ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha, Viçosa**, v. 25, n. 1, p. 157-164, 2007.

MOREIRA, J. C. et al. Contaminantes emergentes. **RQI**, n. 733, p. 8. 2011.

OSUNA, M. D.; DE PRADO, R. *Conyza albida*: a new biotype with ALS inhibitor resistance. **Weed Research, Oxford**, v. 43, p. 221-226, 2003.

ORTIZ, F. Um terço dos alimentos consumidos pelos brasileiros está contaminado por agrotóxicos. Disponível em: <https://noticias.uol.com.br/saude/ultimas-noticias/redacao/2012/05/01/um-terco-dos-alimentos-consumidos-pelos-brasileiros-esta-contaminado-por-agrotoxicos.htm>. Acesso em: 29 de outubro, 2018.

ORTOLANI-MACHADO, C. F. et al. Métodos para a manipulação e o preparo de embriões e larvas. In: OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; REIS FILHO, H. S.; GROTZNER, S. R. **Técnicas e métodos para a utilização prática em microscopia**, p. 237–294, 2012.

PAULA. JUNIOR, T.J. et al. Controle alternativo de doenças de plantas - histórico. **Repositório Alice - Embrapa.** v. 17, cap. 7, p. 136-162. 2005.

PELAEZ, V.; TERRA, F. H. B.; SILVA, L. R. da. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. **Revista de Economia**, v.36, n. 1, p. 27-48, 2010.

PÉREZ-COLL, C. S & HERKOVITS, J. Stage dependent susceptibility to lead in *Bufo arenarum* embryos. **Environ Pollut.** V.63, p.239-245. 1990.

PINTO, G. M. F. **Desenvolvimento de metodologia para determinação de multirresíduos de herbicidas e seus metabólitos em água e em solo por cromatografia líquida de alta eficiência.** Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

POLLACK, N.; CUNNINGHAM A. R.; ROSENKRANZ, H. S. Environmental persistence of chemicals and their carcinogenic risks to humans. **Mutation Research.** 528:81–91, 2003.

PRATES, M. O. Variáveis Aleatórias Discretas e Distribuição de Probabilidades - parte IV. 2012. Disponível em: [http://www.est.ufmg.br/~marcosop/est031/aulas/Capitulo\\_3\\_4.pdf](http://www.est.ufmg.br/~marcosop/est031/aulas/Capitulo_3_4.pdf). Acesso em: 20 de novembro, 2020.

PROSAB. **Remoção de microorganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano/Valter Lucio de Pádua (coordenador).** Rio de Janeiro: ABES, 2009.

RAIMUNDOS, C. C. M. **Contaminantes Emergentes em água tratada e seus mananciais: Sazonalidade, remoção e atividade estrogênica.** Universidade Estadual de Campinas - Programa de Pós-Graduação em Química. Campinas-SP, 2011.

ROQUE, A. A. **Biomarcadores genéticos para avaliação dos efeitos do herbicida 2,4-D (Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) sobre o peixe nativo *Rhamdia quelen*.** Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. Dois Vizinhos - PR, 2018.

ROZÁRIO, A. **Avaliação da remoção do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em águas através do uso de carvão ativado granular (CAG) em pequenas colunas (escala experimental).** Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal do Espírito Santo, 2012.

RUIZ DE ARCAUTE, C.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 128, p. 222–229, 2016.

SADLER, T. W. **Langman Embriologia Médica.** 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

SANKULA, S. et al. Biotechnology derived crops planted in 2004: impacts on US Agriculture. **National Center for Food and Agricultural Policy**. Washington, 2005.

SAMPAIO, C. **Governo Bolsonaro bate novo recorde e chega a 166 agrotóxicos liberados em 2019**. Disponível em: <https://www.brasildefato.com.br/2019/05/07/governo-bolsonaro-bate-novo-recorde-e-chega-a-166-agrotoxicos-liberados-em-2019/>. Acesso em: 27 de maio, 2019.

SCHATZ, J.C. Caracterização morfológica de embriões de *Gallus domesticus*, expostos ao acetato de chumbo, com ênfase na sua ação em nível tecidual e celular na medula. **Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina**. Florianópolis, 2003.

SCHOENWOLF, G. C. The avian embryo: a model for descriptive and experimental embryology. In: MOODY, S. A. **Cell lineage and fate determination**. San Diego: Academic Press, p.644, 1999.

SCHWETZ, B. A. et al. The Effect of Purified and Commercial Grade Pentachlorophenol on Rat Embryonal and Fetal Development. **TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY**. V.28,p.151-161, 1974.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.

SORENSEN, J. P. R.; LAPWORTH, D. J.; NKHUWA, D. C. W.; STUART, M. E.; GOODDY, D. C.; BELL, R. A.; CHIRWA, M.; KABIKA, J.; LIEMISA, M.; CHIBESA, M.; PEDLEY, S. Emerging contaminants in urban groundwater sources in Africa. **Water research**, v. 72, p. 51-63, 2015.

STEFANAKIS, A. I., BECKER J. A. A review of emerging contaminants in water: Classification, sources and potential risks. **Impact of Water Pollution on Human Health and Environmental Sustainability**. Edi. 1, cap. 3. p.57-82, 2015.

TORRES, J. P. M. et al. DDT (diclorodifeniltricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental: uma revisão. **Química Nova**. v. 25 n. 6. São Paulo. 2002.

USEPA. Unites States Environment Protection Agency; The Incorporation of Water Treatment Effects on Pesticide Removal and Transformations in Food Quality Protection Act (FQPA). **Drinking Water Assessments - Office of Pesticide Programs**. Washington, 2011.

VAN GESTEL, C. A.; VAN BRUMMELEN, T. C. **Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms**. **Ecotoxicology**. n. 5(4), p. 217-25. 1996.

VARGAS, L. et al. Buva (*Conyza bonariensis*) resistente ao glyphosate na região sul do Brasil. **Planta Daninha**, v. 25, n. 3, p. 573-578, 2007.

VEIGA, M. M. et al. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do sudeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.22, p.2391-2399, 2006.

VENZON, M. et al. Potencial de defensivos alternativos para o controle do ácarobranco em pimenta “Malagueta”. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 224-227, 2006.

VIZCAINO, E.; GRIMALT, J. O.; SOMOANO-FERNÁNDEZ, A.; TARDON, A. Transport of persistent organic pollutants across the human placenta. **Environmental International**, v. 65, p. 107-115, 2014.

VOUTAS, E. et al. Prediction of bioaccumulation of persistent organic pollutants in aquatic food chain. **Chemosphere**. v. 48, n. 7, p. 645-651, 2002.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking-water quality**. 4<sup>o</sup>Ed., v. 1, 2011. Disponível em: < [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151_eng.pdf)>. Acessado em: 10 de junho de 2019.

WILLIAMS. G. M. et al. Chicken Fetal Liver DNA Damage and Adduct Formation by Activation-Dependent DNA-Reactive Carcinogens and Related Compounds of Several Structural Classes. **Oxford Journals, Society of Toxicology - Toxicological Sciences**. nº 141, v.1, p. 18–28, 2014.

XI, Y., MALLAVARAPU, M., NAIDU, R. Adsorption of the herbicide 2,4-D on organopalygorskite. **Applied Clay Science**, v. 49, p. 255–261, 2010.

YAGINUMA H. et al. Caspase activity is involved in, but is dispensable for early motoneuron death in chick embryo cervical spinal cord. **Molecular and Cellular Neuroscience**, 18: 168-182, 2001.

YAMAMOTO, F. O. et al.. Cadmium effects on early development of chick embryos. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 548–555, 2012.

YUNG-SHARP, D.; KUMAR, R. Protocols for the visualisation of DNA in electrophoretic gels by a safe and inexpensive alternative to ethidium bromide. **Technique**, v. 1, n 3, p. 183-187, 1989.

## ANEXO 1 - Parecer aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais em Pesquisa (CEUA-UTFPR), sob protocolo de nº 2018-40

12/12/2018

SEI/UTFPR - 0566350 - Parecer



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS



PARECER: 2018-40/2018 - CEUA  
PROCESSO Nº: 23064.046670/2018-61  
INTERESSADO: PATRICIA FRANCHI DE FREITAS

### PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA

DADOS DO PROJETO	Protocolo nº 2018-40
<b>Título:</b> AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE E TERATOGÊNESE DO HERBICIDA 2,4-D (ÁCIDO 2,4- DICLOROFENOXIACÉTICO) SOBRE EMBRIÕES DE GALINHA	
<b>Pesquisador / Professor:</b> Prof. Patrícia Franchi de Freitas	
<b>Área temática:</b> Toxicologia	
<b>Instituição:</b> UTFPR/ Dois Vizinhos	
<b>Financiamento:</b> não	
DADOS DO PARECER	Versão: 01
<b>Apresentação do Projeto:</b>	
<p>Atualmente tem se falado muito sobre a contaminação de ambientes aquáticos e os riscos que apresentam à saúde humana. Os principais contaminantes de origem agrícola são os resíduos de fertilizantes e os agrotóxicos. Esses produtos, quando aplicados sobre os campos de cultivo, podem atingir os corpos d'água diretamente através da água da chuva e da irrigação, ou indiretamente através da percolação no solo, chegando aos lençóis freáticos, até mesmo por pulverização de pesticidas, que podem ser transportados por correntes aéreas e se depositarem no solo e na água, distantes das áreas onde foram originalmente usados (Arias, A. R. L. et al., 2007).</p> <p>A avaliação dos efeitos que o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) pode ter sobre o desenvolvimento embrionário de ave contribuirá, de maneira significativa, na geração de conhecimento sobre a segurança na utilização desse herbicida.</p>	
<b>Objetivo:</b>	
<p>Investigar o potencial tóxico do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) sobre o desenvolvimento embrionário de ave (<i>Gallus gallus</i>), bem como, a análise genotóxica do mesmo, para avaliar o risco de exposição na fase inicial do desenvolvimento, num total de três dias de incubação.</p>	
<b>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</b>	
<p>Durante a execução do presente projeto de pesquisa poderão surgir as seguintes dificuldades e riscos:</p> <p>Falhas na manipulação dos embriões e de equipamentos e instrumentos do laboratório.</p> <p>Desligamento da energia elétrica, que poderá levar à morte dos embriões por desligamento da incubadora, impossibilitando a realização das análises.</p> <p>Falta de recursos para a aquisição de equipamentos e materiais de consumo.</p> <p>Falta de meio de transporte para buscar os ovos férteis que serão adquiridos em incubatório comercial da região.</p> <p>Para superar ou contornar essas dificuldades e riscos, serão adotadas como medidas preventivas:</p> <p>Para o desenvolvimento do presente projeto será dado o devido treinamento, tanto para a manipulação dos embriões, como para o uso dos equipamentos e instrumentos do laboratório.</p> <p>Realizar a programação dos experimentos com antecedência, sempre com atenção em relação aos informes sobre os desligamentos de energia elétrica programados.</p> <p>Além disto, será providenciado um equipamento do tipo no-break para o caso de falhas de energia não programadas.</p> <p>Caso não haja fomento para aquisição de novos equipamentos e materiais de consumo, a responsável pelo projeto irá arcar com as custas que são imprescindíveis através de recursos próprios.</p> <p>Caso não haja meio de transporte para buscar os ovos férteis que serão adquiridos em incubatório comercial da região, a responsável do projeto utilizará carro próprio para essa finalidade.</p>	
<b>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:</b>	
<p>Pesquisa de interesse da instituição.</p>	
<b>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</b>	
<p>Foram apresentados os seguintes termos e documentos:</p>	



12/12/2018

SEI/UTFPR - 0566350 - Parecer

1) Requerimento preenchido por completo e assinado pelo pesquisador responsável pelo projeto;	
2) formulário unificado de encaminhamento do CEUA/UTFPR/DV;	
3) projeto de pesquisa completo no modelo da PROPPG-CEUA;	
4) declaração de não início do projeto (com assinatura e data).	
5) registro de projeto junto a Diretoria responsável (anuência da DIRPPG ).	
6) Médico Veterinário	
Vigência do projeto:	15/01/19 – 30/11/19
Espécie/linhagem:	<i>Gallus gallus</i>
Número de animais:	200 ovos embrionados
Peso/Idade:	60 a 65 g
Sexo:	machos e fêmeas
Origem:	incubatório em Dois Vizinhos
<b>Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:</b>	
Não há.	
<b>Situação do Parecer: APROVADO</b>	
<b>Considerações Finais a Critério da CEUA:</b>	
Todos os procedimentos devem seguir a lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008.	

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "VALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE E TERATOGENESE DO HERBICIDA 2,4-D (ÁCIDO 2,4- DICLOROFENOXIACÉTICO) SOBRE EMBRIÕES DE GALINHA", protocolo nº 2018/40, sob a responsabilidade de **Patrícia Franchi de Freitas**, 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 11/12/2018.

**CERTIFICATION**

The Ethics Commission on Animal Use (CEUA) of Federal University of Technology – Paraná (UTFPR), CERTIFIES that the request herein identified by the protocol number 2018/ 40, coordinated and under the responsibility of **Patrícia Franchi de Freitas**, which involves the production, maintenance and / or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub-phylum Vertebrata (except human species), for the purposes of scientific research (or teaching), is in accordance with provisions of the Brazilian Law no. 11794 (October 8th, 2008), the Decree nº 6.899 (July 15th, 2009) and with further regulations published by the Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).



Documento assinado eletronicamente por **GUSTAVO SENE SILVA, VICE-PRESIDENTE**, em 12/12/2018, às 20:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539 de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://se1.utfpr.edu.br/se1/controlador.externo.php?acao=documento\\_confirma&id\\_documento\\_esterno=0](http://se1.utfpr.edu.br/se1/controlador.externo.php?acao=documento_confirma&id_documento_esterno=0), informando o código verificador **0566350** e o código CRC **3298A417**.