

## FITO-CITOGENOTOXICIDADE DE SOLO CONTAMINADO COM HERBICIDA A BASE DE 2,4-D EM DUAS PLANTAS-MODELO

Thalita Sousa Silva, Augusto César Santos Oliveira, Tatiana da Silva Souza

Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/N, Guararema, 29500-000, Alegre-ES, Brasil, talitassilva72@hotmail.com, augusto.acso@gmail.com, tatianas.souza@hotmail.com

### Resumo

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é uma substância amplamente utilizada na agricultura, porém há preocupações a respeito do uso excessivo dessa substância, como a contaminação de água, solo e de organismos não-alvo. Diante disso o objetivo do trabalho é verificar o potencial fitotóxico e citogenotóxico de solo contaminado com 2,4-D em concentrações de campo, acima e baixo dessas. Foram utilizados os modelos vegetais *Allium cepa* e *Zea mays*, espécies não-alvos para o 2,4-D. Foi avaliado o índice de germinação, crescimento radicular, a citotoxicidade através do índice mitótico e a genotoxicidade através de células aberrantes. Como resultado, o efeito fitotóxico mais pronunciado do herbicida 2,4-D para *A. cepa* foi na concentração mais alta utilizada em campo e nas concentrações que representam o pior cenário, já na citogenotoxicidade todas as concentrações causaram a diminuição do índice mitótico. Para *Z. mays* foi realizado o ensaio de fitotoxicidade onde foi constatado que apenas a maior concentração possuiu um efeito fitotóxico inibindo o crescimento radicular.

**Palavras-chave:** agrotóxico. aberrações cromossômicas. toxicidade genética

**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas - Biologia Geral

### Introdução

O uso de herbicidas permite o manejo de plantas consideradas nocivas às culturas de interesse, reduzindo os custos de produção agrícola ao mesmo tempo que aumenta a produtividade. No Brasil, que é um dos principais consumidores de agrotóxicos do mundo, os herbicidas representam 61,49% do total de agrotóxicos comercializados (IBAMA, 2022). Com isso, o ingrediente ativo comercializado que mais se destaca é o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), com mais de 65 mil toneladas vendidas em 2022 (IBAMA, 2022). Atualmente, há mais de 1500 formulações comerciais contendo o 2,4-D como ingrediente ativo, fazendo com que seja um dos herbicidas mais utilizados no mundo (Islam *et al.*, 2018).

Apesar de seu valor agrônomo, o uso intensivo e contínuo do 2,4-D tem sido associado com a incidência de efeitos adversos em organismos não-alvo (Gaaied *et al.*, 2019; Laborde *et al.*, 2020; Martins *et al.*, 2021). Entretanto, embora o solo seja a principal porta de entrada deste herbicida para outros compartimentos ambientais (como água, sedimento, microrganismos, plantas e animais), pouco ainda se sabe sobre os efeitos tóxicos do 2,4-D tendo o solo como via de exposição (Galon *et al.*, 2021; Triques *et al.*, 2021).

Considerando o uso intensivo do 2,4-D, o objetivo desse trabalho foi analisar o potencial tóxico de um solo contaminado com o herbicida U 46 BR (i.a 2,4-D) sobre *A. cepa* e *Z. mays*, ambas espécies monocotiledôneas e, portanto, não-alvo.

### Metodologia

A formulação comercial U 46 BR (Nufarm Indústria Química e Farmacêutica S/A), registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob o nº 01803, contendo 806 g/L (80,6 % m/v) de ácido 2,4 diclorofenoxiacético 2,4-D, 670 g/L (67,0 % m/v) de equivalente ácido e 380,9 g/L (38,09 % m/v) de ingredientes desconhecidos foi utilizada. As concentrações recomendadas estão entre a faixa 0,5 a 1,5 L/ha a depender da cultura. Diante disso, as concentrações testadas foram 0,1875; 0,375; 0,75; 1,5; 3; 6 e 12 L/ha. Abrangendo as doses recomendadas, concentrações residuais e acima. As concentrações de U 46 BR expressas em L/ha foram convertidas em mg e.a/kg de solo de acordo com Carniel e Segat (2018). Chegando nas seguintes concentrações 0,06; 0,12; 0,24; 0,48; 0,96; 1,92 e 3,68 mg e.a/kg de solo.

O solo livre de 2,4-D foi coletado a 0-20 cm de profundidade, seco naturalmente e peneirado em malha de 2 mm. A capacidade máxima de retenção de água (CRA) do solo foi determinada de acordo com a ABNT NBR ISO 11269-2 (ABNT, 2014) e ajustada para 70% e 80% para os ensaios com *A. cepa* e *Z. mays*, respectivamente.

A contaminação do solo foi realizada de acordo com Carniel e Segat (2018). A partir da formulação comercial, uma solução estoque foi preparada. A quantidade total de solo necessária para a exposição das sementes, considerando todas as réplicas de uma determinada concentração, foi contaminada e homogeneizada. Para cada espécie vegetal, três placas de Petri por concentração foram preparadas. Cada placa (100 × 15 mm) utilizada para o ensaio com *A. cepa* foi preenchida com 40 g de solo. Para o ensaio com o milho, placas de 150 × 15 mm foram utilizadas; cada uma preenchida com 60 g de solo. O grupo controle consistiu em solo umedecido apenas com água destilada.

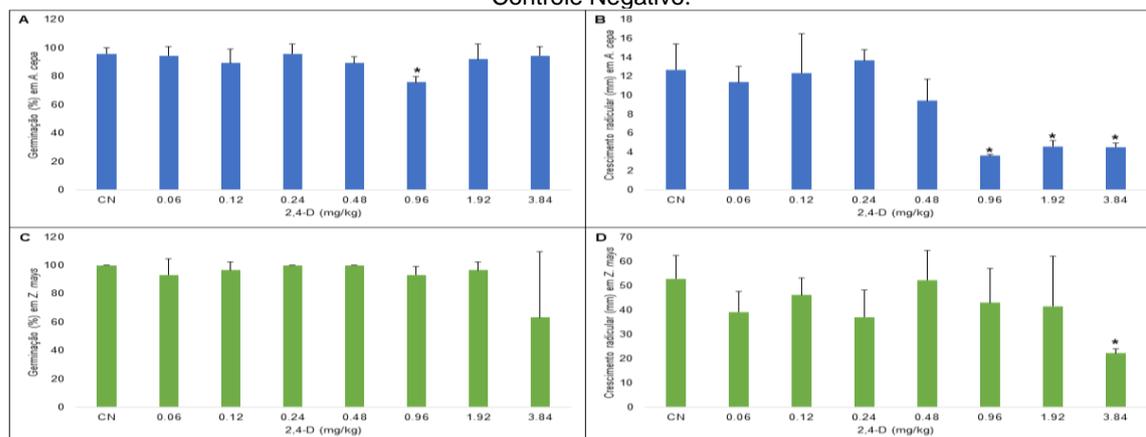
Sementes de *A. cepa* (variedade Baía Periforme) e de *Z. mays* CD 380 híbridos foram adquiridas junto a Isla® Sementes e o ensaio de germinação e de crescimento radicular foi realizado de acordo com o protocolo EPA OPPTS 850.4200 (USEPA, 1996). Dez sementes de *Z. mays* e 25 de *A. cepa* foram distribuídas em cada placa de Petri. Após 96 horas de exposição, a contagem das sementes germinadas foi realizada, obtendo-se então a porcentagem de germinação e realizado a medição das raízes com auxílio de paquímetro digital (mm).

Após a tomada do comprimento radicular, as raízes de *A. cepa* foram fixadas em etanol: ácido acético (3:1; v/v) por 72 h. E lâminas foram preparadas segundo Miranda *et al.* (2023). As lâminas foram observadas em microscópio óptico com o aumento de 400x. Foram analisadas 5000 células por tratamento. A atividade citotóxica dos tratamentos foi mensurada por meio do cálculo do índice mitótico enquanto o efeito genotóxico foi mensurado pela análise da frequência de células com alterações cromossômicas.

## Resultados

O efeito fitotóxico do solo contaminado com 2,4-D pode ser observado na Figura 1. A porcentagem de germinação da cebola foi ligeiramente inibida (18,67%) em relação ao solo controle somente após exposição a 0,92 mg/kg (Figura 1A). Em contrapartida, nenhuma das doses testadas teve efeito sobre a taxa de germinação das sementes de milho (Figura 1C). As maiores concentrações do herbicida a base de 2,4-D afetaram a taxa de crescimento das raízes de cebola. Raízes expostas a 0,92, 1,84 e 3,68 mg/kg tiveram seus comprimentos significativamente reduzidos em relação ao solo não tratado com o herbicida (Figura 1B). Cada uma dessas concentrações inibiu o crescimento radicular em 71,08%, 63,73% e 64,23% respectivamente. Entretanto, apenas a maior concentração testada, 3,68 mg/kg, reduziu o comprimento das raízes de *Z. mays* (57,90% de inibição) (Figura 1D).

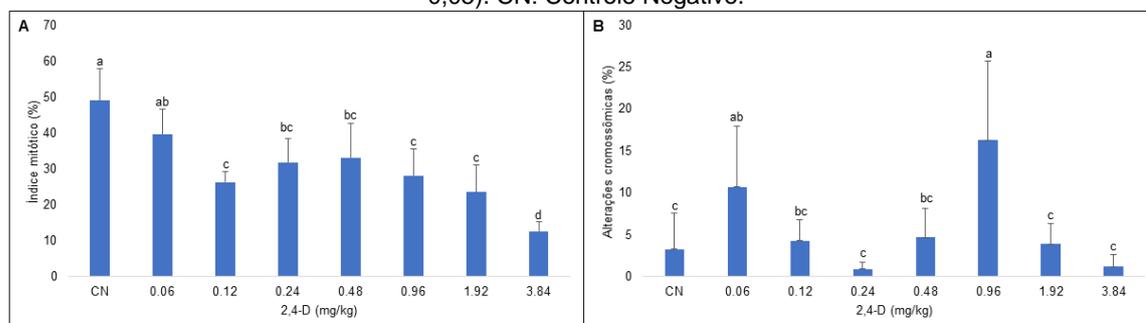
Figura 1 – Fitotoxicidade de solo contaminado com diferentes concentrações de 2,4-D, nos modelos vegetais *A. cepa* e *Z. mays*. (A-C) Porcentagem de germinação. (B-D) Comprimento radicular. Legenda: \* Indica diferença estatística em relação ao controle negativo pelo teste de Dunnet ( $p > 0,05$ ) em relação ao solo não tratado. CN: Controle Negativo.



Fonte: os autores

A ação do herbicida U46 BR sobre o ciclo celular de *A. cepa* e as alterações cromossômicas são apresentados na Figura 2. Considerando o índice mitótico (Figura 1A), com exceção da menor concentração, as demais inibiram a divisão celular em relação ao solo não contaminado. A maior concentração (3,68 mg/kg), foi a que induziu maior efeito citotóxico em relação ao controle e demais concentrações testadas.

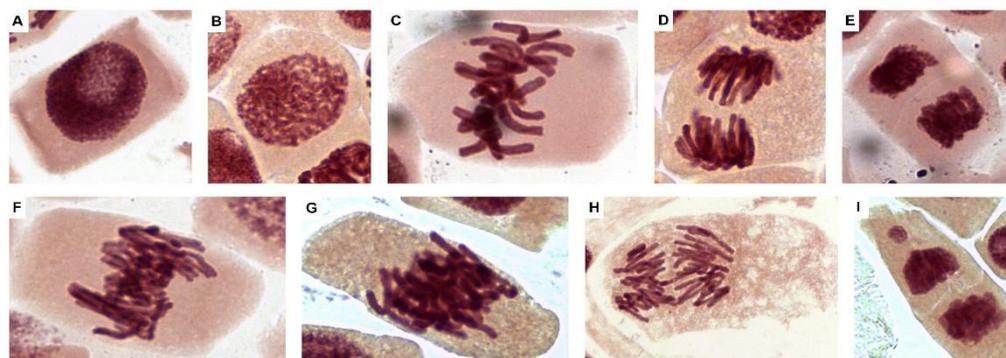
Figura 2 - Índice mitótico frequência de alterações cromossômicas de células meristemáticas de *A. cepa* em diferentes concentrações de 2,4-D. Legenda: Letras diferentes, diferem estatisticamente pelo teste de Dunn ( $p < 0,05$ ). CN: Controle Negativo.



Fonte: os autores

Em relação à frequência de células aberrantes, somente duas concentrações promoveram maior dano do que o controle: 0,06 mg/kg e 0,92 mg/kg (Figura 1B). Na Figura 3A-E são mostradas as fases do ciclo celular de *A. cepa* e as principais alterações mitóticas e cromossômicas encontradas: aderência cromossômica (Figura 3F-G), ponte cromossômica (Figura 3H) e micronúcleo (Figura 3I).

Figura 3- Ciclo Celular de *A. cepa*. Legenda: a-e ciclo normal. a) interfase, b) prófase, c) metáfase, d) anáfase e) telófase, f) metáfase com aderência, g) metáfase com aderência, h) anáfase com ponte i) telófase com micronúcleo.



Fonte: os autores

## Discussão

Os herbicidas auxínicos, como é o caso do 2,4-D, podem desencadear sintomas visuais de fitotoxicidade mesmo em plantas não-alvo, como as monocotiledôneas (Galon *et al.*, 2021; Triques *et al.*, 2021), o que corrobora os resultados obtidos para *A. cepa* e *Z. mays*. A fitotoxicidade das plantas está associada a aplicações em condições ambientais desfavoráveis e/ou a práticas de manejo de ervas daninhas inadequadas com aplicações exacerbadas de pesticidas (Islam *et al.*, 2018). Considerando o ensaio de germinação e crescimento radicular, apenas a maior dose de 2,4-D (3,68 mg/kg, equivalente a 12 L/ha) inibiu o crescimento das raízes de milho, o que corrobora com Galon *et al.* (2021) que afirmaram que embora o 2,4-D apresente baixa seletividade para o milho, porém, em altas doses a probabilidade de absorção e ação em enzimas-alvo aumentam, causando toxicidade.

Já para a cebola, o 2,4-D a 0,92 mg/kg inibiu a porcentagem de germinação enquanto raízes expostas a 0,92, 1,84 e 3,68 mg/kg tiveram seus comprimentos significativamente reduzidos. A perda

da capacidade germinativa indica a morte do embrião (toxicidade aguda) (Delouche, 2002). Já o desenvolvimento das raízes depende da proliferação e do alongamento celular durante os processos de desenvolvimento e diferenciação (Harashima e Schnittger, 2010). Triques *et al.* (2021) também verificaram que *A. cepa* obteve um decréscimo na porcentagem de germinação e no crescimento radicular após exposição ao herbicida DMA 806 BR, que tem 2,4-D como princípio ativo.

Dentre os parâmetros fisiológicos, o comprimento radicular apresentou maior sensibilidade do que a germinação. Esse fato tem sido demonstrado para a atividade de herbicidas, incluindo os herbicidas auxínicos, sobre diferentes espécies de plantas (Alves *et al.*, 2021; Miranda *et al.*, 2023).

A inibição do índice mitótico causada pelo 2,4-D a 0,92, 1,84 e 3,68 mg/kg pode ser relacionada ao menor comprimento das raízes. Desse modo, as maiores concentrações de 2,4-D parecem ter comprometido tanto o processo de divisão celular quanto o alongamento das células, resultando num menor índice mitótico e comprimento radicular. A redução do índice mitótico é um indicador de citotoxicidade (Souza *et al.*, 2023). O efeito mitodepressivo causado por um agente químico indica dano funcional em enzimas fundamentais para a progressão do ciclo celular, como polimerases e quinases, a ativação de pontos de checagem em G1, S ou G2 em reposta a danos no DNA (Gosh *et al.*, 2016; Miranda *et al.*, 2023) ou a inibição da formação de microtúbulos (Türkoğlu, 2012).

A inibição do índice mitótico causada pelo 2,4-D a 0,92, 1,84 e 3,68 mg/kg pode ser relacionada ao menor comprimento das raízes. Desse modo, as maiores concentrações de 2,4-D parecem ter comprometido tanto o processo de divisão celular quanto o alongamento das células, resultando num menor índice mitótico e comprimento radicular.

A frequência de células aberrantes expressa a habilidade de uma substância específica em causar danos ao DNA e/ou a componentes celulares que controlam a integridade do genoma como o fuso mitótico, topoisomerases, enzimas de reparo do DNA e polimerases (Han *et al.*, 2023). Apenas duas concentrações de 2,4-D aumentaram a frequência de células aberrantes, 0,06 mg/kg e 0,92 mg/kg. Ateeq *et al.* (2002), Özkul *et al.* (2016), Alves *et al.* (2021) e Miranda *et al.* (2023) reportaram o efeito genotóxico do 2,4-D, porém em contato direto com as plantas. Os nossos resultados mostram que o solo contaminado com a substância ainda apresenta efeitos tóxicos as plantas.

O comportamento dos herbicidas no solo depende tanto das propriedades físico-químicas do ingrediente ativo quanto das características físicas, químicas e mineralógicas do compartimento ambiental (principalmente pH, textura e matéria orgânica). Esses fatores são importantes na determinação da mobilidade do pesticida, de sua biodisponibilidade e toxicidade (Christofolletti e Lopes Ovejero, 2009). Apesar do solo ser a principal porta de entrada de pesticidas para outros compartimentos ambientais (água, sedimento, microrganismos, plantas e animais), poucos estudos focam nas concentrações residuais dessas substâncias em solos brasileiros (Fernandes *et al.*, 2020).

## Conclusão

Embora seja seletivo para dicotiledôneas, o 2,4-D causou efeitos adversos para *A. cepa* e *Z. mays*. Para ambas as espécies, as maiores concentrações do herbicida inibiram o crescimento das raízes. Todas as concentrações testadas apresentaram atividade citotóxica e/ou genotóxica para *A. cepa*. Esse resultado traz particular preocupação uma vez que não existe limite seguro de exposição para substâncias genotóxicas. As propriedades físico-químicas do herbicida e do solo integradas auxiliaram na compreensão da toxicidade do 2,4-D para as plantas-modelo. É importante avaliar os efeitos do 2,4-D, e de outros pesticidas, em diferentes tipos de solo, principalmente quanto ao potencial citogenotóxico, cujos dados são escassos na literatura.

## Referências

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR ISO 15537**: ecotoxicologia terrestre – Toxicidade aguda – Método de ensaio com minhocas (Lumbricidae). Rio de Janeiro: ABNT, 2014. 13.p.

Alvarenga, I. F. S.; Dos Santos, F. E.; Silveira, G. L.; Andrade-vieira, L. F.; Martins, G. C.; Guilherme, L. R. G. Investigating arsenic toxicity in tropical soils: A cell cycle and DNA fragmentation approach. **Science Total Environment**, v. 698:134272. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134272>. Acesso em: 23 de agosto de 2024.

Alves, T. A., Roberto, C. E. O., Pinheiro, P. F., Alves, T. A., Henrique, M. K. C., Ferreira, A., Clarindo, W. R.; Praça-fontes, M. M. Searching an auxinic herbicide to use as positive control in toxicity assays. **Anais Da Academia Brasileira De Ciências**, v. 93, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120181262>. Acesso em: 23 de agosto de 2024.

Ateeq, B.; Abul Farah, M.; Niamat Ali, M.; Ahmad W. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mutation Research**, v. 514, n.1-2, p.105-113. 2020. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(01\)00327-8](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(01)00327-8). Acesso em: 23 de agosto de 2024.

Carniel, L. S. C.; SEGAT, J. C. Aplicação da substância teste: agrotóxicos e matrizes orgânicas, **Ecotoxicologia terrestre – métodos e aplicações de ensaios com Collembola e Isopoda**. UDESC, Florianópolis, pp 81–110, 2018.

Delouche, J. Deterioração, germinação e vigor da semente. **SeedNews**, edição 4, 2002. Disponível em: <https://seednews.com.br/artigos/2018-germinacao-deterioracao-e-vigor-da-semente-edicao-novembro-2002>. Acesso em: 23 de agosto de 2024.

Christoffoleti, P. J. E LÓPES OVEJERO, R. F. **Comportamento dos herbicidas aplicados ao solo na cultura da cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP 2. 2009.

Fernandes, C. L. F.; Volcão, L. M.; Ramires, P. F.; De Moura, R. R.; Da Silva Junior, F. M. R. Distribution of pesticides in agricultural and urban soils of Brazil: a critical review. **Environmental Science. Processes & Impacts**, v. 22, n. 2, p. 256–270, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C9EM00433E>. Acesso em: 23 de agosto de 2024.

Gaaied, S.; Oliveira, M.; Le Bihanic, F.; Cachot, J.; Banni, M. Gene expression patterns and related enzymatic activities of detoxification and oxidative stress systems in zebrafish larvae exposed to the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide. **Chemosphere**, v. 224, p. 289-297. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.125>. Acesso em: 23 de agosto de 2024.

Galon L, Brunetto L, Loureiro da Silva AM, Soligo V, Cavaletti DC, da Silva AF, Gallina A, Franceschetti MB, Forte CT, Perin GF (2021) Tank mixture of glyphosate and 2,4-D applied on RR® maize crop. **J Environ Sci Health B56(11):948-953**. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03601234.2021.1981102>. Acesso em: 23 de agosto de 2024

Han, M.; Zhang, Z.; Liu, S.; Sheng, Y.; Waigi, M. G.; Hu, X.; Qin, C.; Ling, W. Genotoxicity of organic contaminants in the soil: A review based on bibliometric analysis and methodological progress. **Chemosphere**, v. 313:137318. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137318>. Acesso em: 23 de agosto de 2024.

Harashima, H.; Schnittger, A. The integration of cell division, growth and differentiation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 66-74, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.11.001>. Acesso em: 23 de agosto de 2024.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos: 2022**. Brasília, DF. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 23 de agosto de 2024.

Islam, F.; Wang, J.; Farooq, M. A. Khan, M. S. S.; Xu, L.; Zhu, J.; Zhao, M.; Muños, S.; Li, Q. X.; Zhou, W. Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. **Environment International**, v. 111, p. 332-351. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2017.10.020>. Acesso em: 23 de agosto de 2024.

Laborde, 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. 65:104783. 2020. Disponível em: <https://doi.org/doi:10.1016/j.tiv.2020.104783>. Acesso em: 23 de agosto de 2024

Martins, R. X.; Vieira, L.; Souza, J. A. C.R.; Silva, M. G. F.; Muniz, M. S.; Souza, T.; Queiroga, F. R.; MACHADO, M. R. F.; SILVA, P.; FARIAS, D. Exposure to 2,4-D herbicide induces hepatotoxicity in zebrafish larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 248:109110. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109110>. Acesso em: 23 de agosto de 2024.

Miranda, L.A.; De Souza, V.V.; Campos, R.A.; De Campos, J. M. S.; Da Silva Souza T. Phytotoxicity and cytogenotoxicity of pesticide mixtures: analysis of the effects of environmentally relevant concentrations on the aquatic environment. **Environmental Science Pollution Research**, v. 30, p. Disponível em: 112117–112131. 2023. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-30100-y>. Acesso em: 23 de agosto de 2024.

Souza, V. V.; Da Silva Souza T., Campos, J. M. S.; Oliveira, L. A.; Ribeiro, Y. M.; Melo Hoyos, D. C.; Lacerda, S. M. D. S. N. Ecogenotoxicity of environmentally relevant atrazine concentrations: A threat to aquatic bioindicators. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 189. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105297>. Acesso em: 25 de agosto de 2024.

Triques, M. C.; Oliveira, D.; Goulart, B. V.; Montagner, C. C.; Espíndola, E. L. G.; De Menezes-oliveira, V. B. Assessing single effects of sugarcane pesticides fipronil and 2,4-D on plants and soil organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208:111622. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111622>. Acesso em: 25 de agosto de 2024.

Türkoğlu, Ş. Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay. **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 103, p. 224–230. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.06.00>. Acesso em: 25 de agosto de 2024

EPA - Environmental Protection Agency. **EPA OPPTS 850.4200**: seed germination/root elongation toxicity test. Washington, DC: EPA, 1996. p. 6.

Özkul, M., Özel, Ç.A., Yüzbaşıoğlu, D.; Ünal, F. Does 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) induce genotoxic effects in tissue-cultured *Allium* roots? **Cytotechnology**, v. 68, n. 6, p. 2395–2405. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10616-016-9956-3>. Acesso em: 25 de agosto de 2024.

## Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo – (FAPES).