

EFEITOS DOS HERBICIDAS PICLORAM E 2,4-D SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM DROSOPHILA MELANOGASTER

Gabriela Macedo Miranda¹

Mayara Bitencourt Leão²

Patrick Marques de Moraes³

Cristiane Lenz Dalla Corte⁴

Resumo:

Os pesticidas são substâncias químicas destinadas à erradicação de pragas e doenças que transmitem enfermidades às plantas cultivadas em sistemas agrícolas e florestais. Sua utilização tem sido uma atividade comum na agricultura global, com o objetivo de ampliação na produtividade das culturas. No entanto, quando esses compostos são empregados de maneira descontrolada, podem ocasionar impacto em organismos não-alvos, como os seres humanos. O estresse oxidativo, definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e sua remoção por sistemas antioxidantes, pode estar relacionado com muitas desordens neurológicas induzidas pela exposição à xenobióticos, como os pesticidas. Diante da crescente utilização de herbicidas na agricultura e do risco de contaminação da biota no ambiente, faz-se necessário o estudo da toxicidade destas substâncias. Considerando a escassez de estudos sobre a ação da associação entre o 2,4 - D e o Picloram sobre parâmetros de toxicidade, o presente estudo visa compreender a toxicologia desta associação, determinando os efeitos dos herbicidas sobre a geração de estresse oxidativo em *D. melanogaster*. Para a realização deste estudo, foi utilizado o herbicida Palace®, mistura comercial de picloram e 2,4-D. Este herbicida é composto por 114,76 g/L de picloram e 447,22 g/L de 2,4-D. As moscas adultas macho e fêmea foram expostas separadamente à diferentes concentrações do herbicida através da dieta durante 24h. Os tratamentos foram realizados utilizando as concentrações, para 2,4-D e picloram, respectivamente, de 1g/L e 0,256 g/L; 5 g/L e 1,28 g/L; 10 g/L e 2,56 g/L; 50 g/L e 12,8 g/L; 100 g/L e 25,6 g/L, além de um grupo controle, sem a adição de herbicidas. A produção de EROs foi determinada espectrofluorimetricamente, usando o marcador fluorescente permeável a membrana H2-DCFDA. Para a determinação dos níveis de tiol total, utilizou-se o método de Ellman (1959), assim como para os níveis de tiol não proteico. Os resultados obtidos demonstram que a associação dos herbicidas picloram e 2,4-D diminui a produção de EROs em cabeças de *D. melanogaster* para todas as concentrações testadas em machos, e para as três concentrações mais altas em fêmeas. Para os corpos de *D. melanogaster*, não houve resultados significativos estatisticamente em relação ao grupo controle. Para os níveis de tiol total, não houve resultados significativos para os indivíduos machos, quando comparados ao grupo controle.

Fêmeas tratadas com o herbicida apresentaram uma redução nos níveis de tiol total na cabeça nas concentrações de 2, 5 e 50 g/L. Já as fêmeas tratadas com 100 g/L apresentaram um aumento nos níveis de tiol na cabeça. A concentração de 10 g/L não apresentou diferença estatística em relação ao grupo sem adição de herbicidas. Quanto à análise dos corpos das fêmeas, foi observada uma redução significativa nos níveis de tióis na concentração de 1g/L, assim como para a avaliação dos níveis de tióis total e não proteico. Podemos concluir que a toxicidade da associação dos herbicidas 2,4-D e picloram não parece estar relacionada ao aumento no estresse oxidativo em *D. melanogaster*, e portanto, outros mecanismos de toxicidade devem ser estudados.

Palavras-chave: Tióis; Pesticidas; EROS.

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

EFETOS DOS HERBICIDAS PICLORAM E 2,4-D SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM DROSOPHILA MELANOGASTER

¹ Aluno de graduação. gabrielamirandageo@gmail.com. Autor principal

² Aluno de graduação. maybitencourtl@gmail.com. Co-autor

³ Aluno de graduação. pmmarques93@gmail.com. Co-autor

⁴ Docente. cristianecorte@unipampa.edu.br. Orientador



EFEITOS DOS HERBICIDAS PICLORAM E 2,4-D SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM *Drosophila melanogaster*

1. INTRODUÇÃO

Os pesticidas são substâncias químicas, naturais ou sintéticas, com ação tóxica, destinadas à prevenção ou erradicação, de maneira geralmente específica, de pragas e doenças que, de algum modo, lesam ou transmitem enfermidades às plantas cultivadas em sistemas agrícolas e florestais. Essa definição tem como referência insetos, fungos, bactérias, plantas infestantes ou qualquer outra forma de vida que comprometa a produtividade do sistema de cultivo. Seus efeitos vão além do organismo alvo podendo causar perturbações nas plantas, na biota da parte aérea e do solo (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006; ZAMBRONE, 1996).

A aplicação de herbicidas para o controle de plantas daninhas tem sido uma atividade comum na agricultura global, sempre com o objetivo de ampliação na produtividade das culturas. No entanto, quando esses compostos são empregados de maneira descontrolada, podem ocasionar impacto em organismos não-alvos, como os que vivem no ambiente, incluindo os seres humanos (NWANI et al., 2011). O Picloram é um herbicida de propriedades auxínicas usado extensivamente no controle de plantas invasoras de folhas largas em pastagens e em campos de culturas tolerantes a sua ação (MANTOVANI, 2007). Este herbicida apresenta longa persistência no ambiente, com meia-vida entre 20 e 300 dias (SILVA et al., 2007), e pode ser encontrado no solo até três anos após sua aplicação (DEUBERT e CORTE-REAL, 1986). O 2,4 - D foi o primeiro herbicida seletivo bem-sucedido, sendo introduzido em 1946, transformando-se rapidamente no herbicida mais extensamente usado em todo o mundo (INDUSTRY TASK FORCE II, 2017).

A mosca da fruta, *Drosophila melanogaster* foi o primeiro organismo complexo a ter o seu genoma sequenciado (ADAMS et al., 2000). Com o sequenciamento do genoma humano, as correspondências observadas entre os dois genomas destacaram e estimularam seu papel como modelo para interpretar a biologia humana e os processos patológicos. A mosca continua sendo uma das primeiras opções na biologia, onde genes, técnicas genéticas e outras descobertas são muitas vezes resolvidas primeiro na mosca e depois traduzidas para sistemas de mamíferos (PANDEY e NICHOLS, 2011). A *D. melanogaster* tem sido utilizada como modelo biológico para testes de toxicidade de praguicidas (NARCISO e NAKAGAWA, 2009), na detecção de inseticidas por bioensaio (HIRATA et al., 2002) no potencial tóxico-genético de larvicidas (ACIOLE et al., 2014), entre muitos outros estudos.

Diante da crescente utilização de herbicidas na agricultura e do risco de contaminação da biota no ambiente, faz-se necessário o estudo da toxicidade destas substâncias. Considerando a escassez de estudos sobre a ação da associação entre o 2,4 - D e o Picloram sobre parâmetros de toxicidade, o presente estudo visa compreender a toxicologia desta associação, determinando os efeitos dos herbicidas sobre a geração de estresse oxidativo em *D. melanogaster*.

2. METODOLOGIA

Para a realização deste estudo, foi utilizado o herbicida Palace®, mistura comercial de picloram e 2,4-D. Este herbicida é composto por 114,76 g/L de picloram e 447,22 g/L de 2,4-D.

As *D. melanogaster* (linhagem Harwich) foram mantidas em incubadora à 25°C, ciclo claro/escuro de 12 h, umidade de 65% e alimentadas com dieta padrão. Moscas adultas macho e fêmeas foram expostas separadamente às diferentes concentrações do herbicida através da dieta durante 24h. Os tratamentos foram realizados utilizando as concentrações, para 2,4-D e picloram, respectivamente, de 1g/L e 0,256 g/L; 5 g/L e 1,28 g/L; 10 g/L e 2,56 g/L; 50 g/L e 12,8 g/L; 100 g/L e 25,6 g/L, além de um grupo controle, sem a adição de herbicidas. Para a realização do teste, as moscas já tratadas tiveram suas cabeças separadas do resto do tórax e abdômen para que fossem homogeneizadas.

A produção de espécies reativas de oxigênio foi determinada espectrofluorimetricamente, usando o marcador fluorescente permeável a membrana H₂-DCFDA de acordo com Lebel et al., 1992 e Garcia-Ruiz et al., 1997. Para os níveis de tiol total, utilizou-se o método de Ellman (1959), assim como para os níveis de tiol não proteico. No último, as amostras foram precipitadas em ácido tricloroacético antes da análise.

A quantificação do conteúdo de proteína das amostras foi realizada pelo método de Bradford (1976) utilizando-se albumina bovina como padrão.

Para a análise estatística dos valores obtidos, utilizou-se o software GraphPad Prism 5, versão 5.0. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida do teste pos hoc de Tukey, considerando-se estatisticamente significativos valores com $p < 0,05$.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

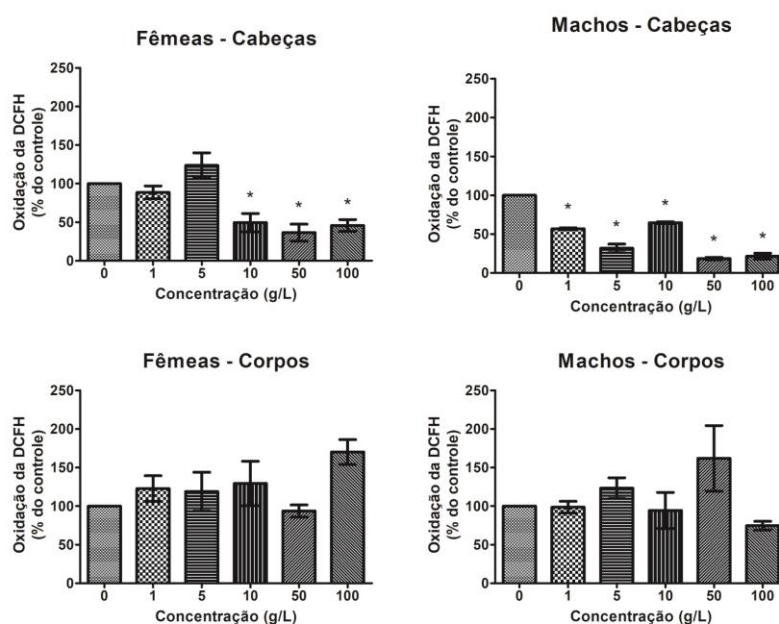


Figura 1. Efeito da exposição aos herbicidas 2,4-D e picloram sobre a oxidação da DCFH. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. * Diferença estatística em relação ao grupo controle por ANOVA de 1 via seguido de teste pos hoc de Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos demonstram que a associação dos herbicidas picloram e 2,4-D diminui a produção de EROs em cabeças de *D. melanogaster* para todas as concentrações testadas em machos, e para as concentrações de 10, 50 e 100 g/L

em fêmeas. Para os corpos de *D. melanogaster*, não houve resultados significativos estatisticamente em relação ao grupo controle (Figura 1).

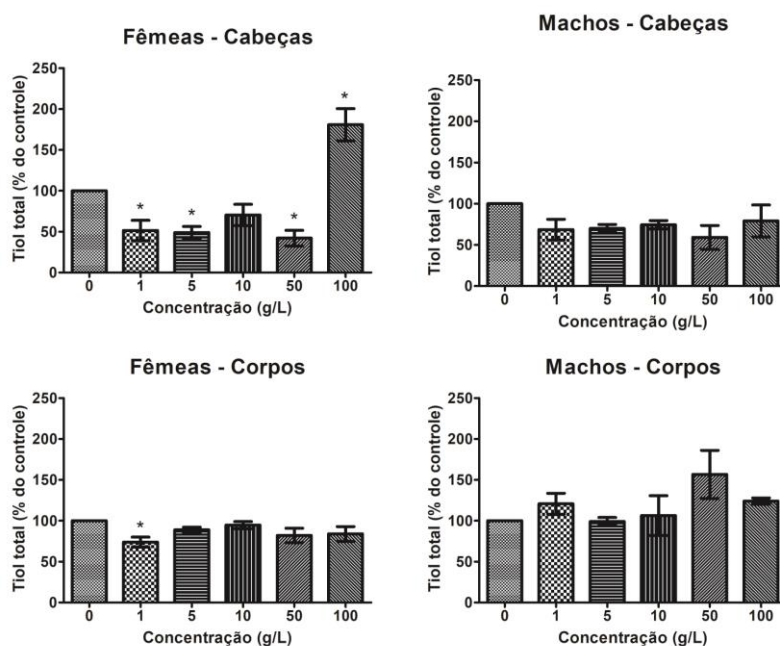


Figura 2. Efeito da exposição aos herbicidas 2,4-D e picloram sobre os níveis de tiol total. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. * Diferença estatística em relação ao grupo controle por ANOVA de 1 via seguido de teste pos hoc de Tukey ($p < 0,05$).

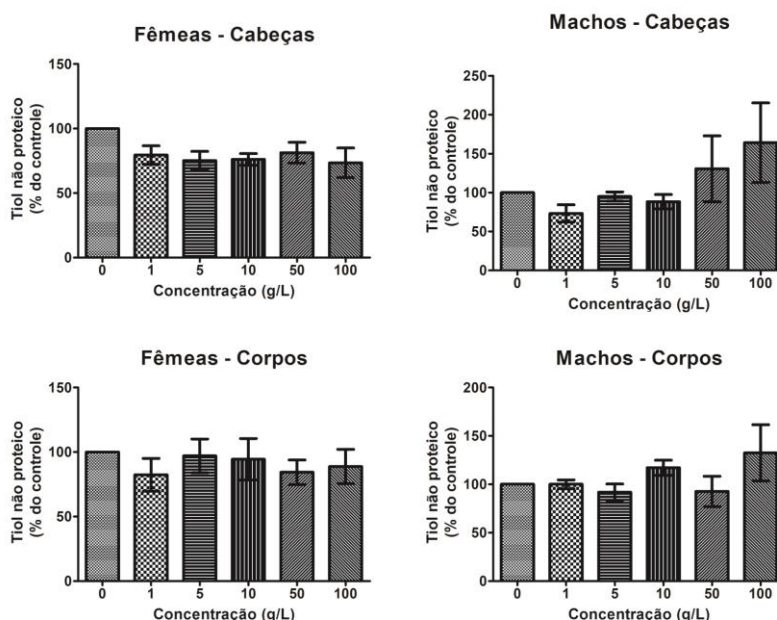


Figura 3. Efeito da exposição aos herbicidas 2,4-D e picloram sobre os níveis de tiol não proteico. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. * Diferença estatística em relação ao grupo controle por ANOVA de 1 via seguido de teste pos hoc de Tukey ($p < 0,05$).

Para os níveis de tiol total (Figura 2), não houve resultados significativos para os indivíduos machos, quando comparados ao grupo controle. Fêmeas tratadas com o herbicida apresentaram uma redução nos níveis de tiol total na cabeça nas concentrações de 2, 5 e 50 g/L. Já as fêmeas tratadas com 100 g/L apresentaram um aumento nos níveis de tiol na cabeça. A concentração de 10 g/L não apresentou diferença estatística em relação ao grupo sem adição de herbicidas. Quanto à análise dos corpos das fêmeas, foi observada uma redução significativa nos níveis de tióis na concentração de 1g/L.

Na Figura 3 são apresentados os resultados obtidos para os níveis de tiol não proteico. Nos tratamentos realizados, nenhum grupo apresentou resultados significativos quando comparados ao grupo controle.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Podemos concluir, a partir dos resultados obtidos, que a toxicidade da associação dos herbicidas 2,4-D e picloram não parece estar relacionada ao aumento no estresse oxidativo em *D. melanogaster*. Desta forma, em estudos futuros, outros mecanismos de toxicidade devem ser estudados.

5. REFERÊNCIAS

ACIOLE, E. E. P. et al. Genetic toxicity of dillapiol and spinosad larvicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Pest management science, v. 70, n. 4, p. 559-565, 2014.

ADAMS M. D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science, v. 287, n. 5461, p. 2185-2195, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

DEUBERT, K. H.; CORTE-REAL, I. Soil residues of picloram and triclopyr after selective foliar application on utility rights-of-way. Journal of arboriculture, v. 12, n. 11, p. 269-272, 1986.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. Archives of biochemistry and biophysics, v. 82, n. 1, p. 70-77, 1959.

GARCÍA-RUIZ, C. et al. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species Role of mitochondrial glutathione. Journal of Biological Chemistry, v. 272, n. 17, p. 11369-11377, 1997.

HIRATA, R. et al. Detecção de inseticidas por bioensaio com *Drosophila melanogaster*. Arquivos do Instituto Biológico, v. 69, n. 3, p. 97-102, 2002.

INDUSTRY Task Force II on Research Data. 2,4-D [acesso em 11 jun 2017]. Disponível em <http://24d.org/>.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical research in toxicology*, v. 5, n. 2, p. 227-231, 1992.

MANTOVANI, E. C. et al. Modelagem de lixiviação do herbicida picloram através de lisímetro de drenagem sob vegetação de *Brachiaria decumbens*. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola, Campinas, SP. 141p. 2007.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. 2.ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras. 729p, 2006.

NARCISO, L. E.; NAKAGAWA, E. S. Análise de praguicidas por bioensaio com mosca *Drosophila melanogaster* e cromatografia em camada delgada. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 76, n. 2, p. 313-316, 2009.

NWANI, C. D. et al. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 31, n. 2, p. 314-322, 2011.

PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological reviews*, v. 63, n. 2, p. 411-436, 2011.

SILVA, A. A.; SILVA, J. F. Tópicos em manejo de plantas daninhas. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p. 189-248, 2007.

ZAMBRONE, F. A. D. Defensivos agrícolas ou agrotóxicos? Descrição: perigosa família. *Revista Ciência Hoje*, v. 4, n. 22, p.44-47, 1996.