

Avaliação do efeito mutagênico e citotóxico do Fusilade® em células de mamíferos e de anfíbios

Evaluation of the mutagenic and cytotoxic effect of Fusilade® on mammalian and amphibian cells

Iago Vinícios Lima¹, Anna Karolina Gomes Oliveira², Patricia Aline Bressiani³, Elisângela Dusman⁴, Eduardo Michel Vieira Gomes⁵

RESUMO

O herbicida Fusilade® é usado para o controle de plantas daninhas, no entanto, pouco se sabe sobre seus possíveis efeitos adversos em organismos não-alvo. Logo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade *in vitro*, pelo teste do MTT (24, 48 e 72 horas) com as células hepáticas humanas (HuH7.5), das concentrações de 0,05%, 0,025% e 0,01% do Fusilade®. E, avaliar a citotoxicidade e mutagenicidade pelo teste do micronúcleo (14 dias) com girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) das concentrações de 0,05%, 0,025%, 0,01% e 0,005% deste herbicida. Para as células HuH7.5, a viabilidade celular foi reduzida nas três concentrações testadas, nos tempos de 24 e 48 horas. Apenas a menor concentração não apresentou citotoxicidade no tempo de 72 horas. Nas células dos girinos, o Fusilade® provocou alterações nucleares nas três menores concentrações. A maior concentração não apresentou citotoxicidade, mas causou a morte de 80% dos girinos em 24 horas. O Fusilade® também apresentou efeitos mutagênicos nas células dos girinos, induzindo a formação de micronúcleos proporcionais à dose avaliada. Portanto, o Fusilade® pode causar danos ao DNA e comprometer a integridade celular de diferentes organismos, podendo representar um risco ambiental e à saúde humana.

PALAVRAS-CHAVE: Bioindicadores; HuH7.5; *Lithobates catesbeianus*; micronúcleo; MTT.

ABSTRACT

However, little is known about its possible adverse effects on non-target organisms. Therefore, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* cytotoxicity, by the MTT test (24, 48 and 72 hours) with human liver cells (HuH7.5), the concentrations of 0.05%, 0.025% and 0.01% of Fusilade. And, to evaluate the cytotoxicity and mutagenicity by micronucleus test (14 days) with tadpoles of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) of the concentrations of 0.05%, 0.025%, 0.01% and 0.005% of this herbicide. For HuH7.5 cells, cell viability was reduced in the three concentrations tested at 24 and 48 hours. Only the lowest concentration did not show cytotoxicity at 72 hours. In the tadpole cells, Fusilade caused nuclear changes in the three lowest concentrations. The highest concentration did not show cytotoxicity, but caused the death of 80% of tadpoles in 24 hours. Fusilade flights also showed mutagenic effects on tadpole cells, inducing the formation of micronuclei proportional to the dose evaluated. Therefore, Fusilade_o can cause damage to DNA and compromise the cellular integrity of different organisms, and may pose an environmental and human health risk.

KEYWORDS: Bioindicators; HuH7.5; *Lithobates catesbeianus*; micronucleus; MTT.

¹Voluntário. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: iagovinicioslima@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 6282988753061872.

²Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: annoli@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 2077709013393753.

³Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: pbressiani@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 6244294104014856.

⁴Docente no Departamento Acadêmico de Química e Biologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: edusman@utfpr.edu.br. ID Lattes: 08342282115894459.

⁵Docente no Departamento Acadêmico de Física, Estatística e Matemática. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: eduardogomes@utfpr.edu.br. ID Lattes: 7293677011271209.

INTRODUÇÃO

A maioria dos resíduos produzidos, inclusive os pesticidas, quando lançados na atmosfera ou no solo, acabam tendo como destino final os ecossistemas aquáticos através da chuva e do escoamento superficial. Esses contaminantes podem interagir com a biota, prejudicando a manutenção da vida aquática e o fornecimento de boa qualidade da água (CORDUK et al., 2018). Os pesticidas são amplamente utilizados nas práticas agrícolas atuais, porém, apenas 0,1% da quantidade de agroquímicos aplicados atinge os organismos alvo, enquanto mais de 95% afeta organismos não-alvo (MEENA et al., 2020).

O herbicida Fusilade é usado para controlar ervas daninhas, além disso, inibe a enzima acetil-CoA carboxilase (ACCase), provavelmente bloqueando a produção de fosfolipídios utilizados na construção de novas membranas necessárias para o crescimento celular (OSMAN et al., 2016).

Os testes de toxicologia *in vitro* avaliam as alterações presentes na célula feitas por agentes externos. Um teste de toxicologia *in vitro* comumente utilizado é o método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio), amplamente aplicado em células de mamíferos, sendo capaz de detectar degenerações celulares que resultam na morte celular (MOSMANN, 1983).

Um bioindicador aquático muito utilizado é o anfíbio, pois é vulnerável devido à sua morfologia respiratória e o ciclo de vida bifásico (RISSOLI et al., 2016). Um biomarcador que pode ser utilizado neste organismo é o teste de micronúcleo, que fornece resultados para o exame de danos genéticos causados pela presença de agentes químicos em determinado ambiente (POLLO et al., 2016).

Assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar a linhagem de células de fígado humano (HuH7.5) e os girinos de rã touro (*Lithobates catesbeianus*) para avaliar a citotoxicidade e a mutagenicidade do agroquímico Fusilade®, através do teste do MTT e do teste do micronúcleo.

METODOLOGIA

SOLUÇÃO TRATAMENTO

O agroquímico Fusilade® foi adquirido em comércio local. Foram preparadas suspensões nas concentrações de 0,005%, 0,01%, 0,025% e 0,05% de Fusilade® diluídas em água destilada estéril.

TESTE DE CITOTOXICIDADE COM CULTURA DE CÉLULAS

As células hepáticas (HuH7.5) foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² contendo 10 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA) e incubadas em estufa tipo BOD a 37 °C com 5% de CO₂.

Para realizar o teste da atividade citotóxica foi utilizado o ensaio MTT, de acordo com o protocolo sugerido por Mosmann (1983), com modificações. Foram utilizadas placas de cultivo de 96 poços onde, em cada poço, foram semeadas 1,0x10⁴ células HuH7.5. Após 24 horas, o meio de cultura de cada poço foi descartado e adicionou-se 100 µL de meio completo para os grupos: controle negativo (CO-) (meio de cultura), controle positivo (CO+) com o agente citotóxico metil metanossulfanato (MMS 500 µM) e os tratamentos com as

concentrações de 0,01%, 0,025% e 0,05% do agroquímico. Antes do tratamento, as soluções de Fusilade® foram filtradas em millipore 0,22 μm .

As células foram incubadas por 24, 48 e 72 horas e, após esse tempo, o meio de cultura foi substituído por 100 μL de meio de cultura não suplementado, acrescido de MTT (0,167 mg/mL). Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão das absorvâncias e submetidos à análise de variância (one way ANOVA), seguido do teste de Dunnet, com o uso do programa Action Stat. As diferenças foram consideradas sendo estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor que 0,05.

Os percentuais de viabilidade celular (VC) foram estimados pela razão da absorvância do tratamento pela absorvância do controle negativo.

TESTE DE CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE EM GIRINOS DE *Lithobates catesbeianus*

O teste do micronúcleo com sangue de girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) seguiu a metodologia descrita por Gauthier et al. (2004) e Gonçalves et al. (2015), com modificações. Os girinos foram obtidos de uma fonte comercial, todos provenientes da mesma desova e na mesma fase de desenvolvimento (entre fases 26 a 39 de Gosner). Eles foram aclimatados em aquários contendo 5 litros de água mineral por 7 dias. Em seguida, foram separados em grupos de 5 girinos por aquário, juntamente com 5 litros das amostras de cada concentração do Fusilade® (0,005%, 0,01%, 0,025% e 0,05%). O grupo controle negativo foi realizado com 5 litros de água mineral. O projeto tem aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Protocolo 20.594.198-3).

Os girinos permaneceram por 14 dias nestas soluções controle e tratamento, a temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, com aeração constante e foram alimentados com ração de peixe a cada 2 dias. Após os 14 dias, os girinos foram anestesiados e eutanasiados, sendo retirado seu sangue caudal. As lâminas com o sangue foram analisadas determinando a frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares em 1000 eritrócitos para cada girino. Calcularam-se o número médio e a porcentagem de micronúcleos e de alterações nucleares em cada grupo controle e das concentrações. A análise estatística foi realizada pelo teste de normalidade e da variância seguido pela aplicação do teste de Tukey ($\alpha=0,05$; $n=5$).

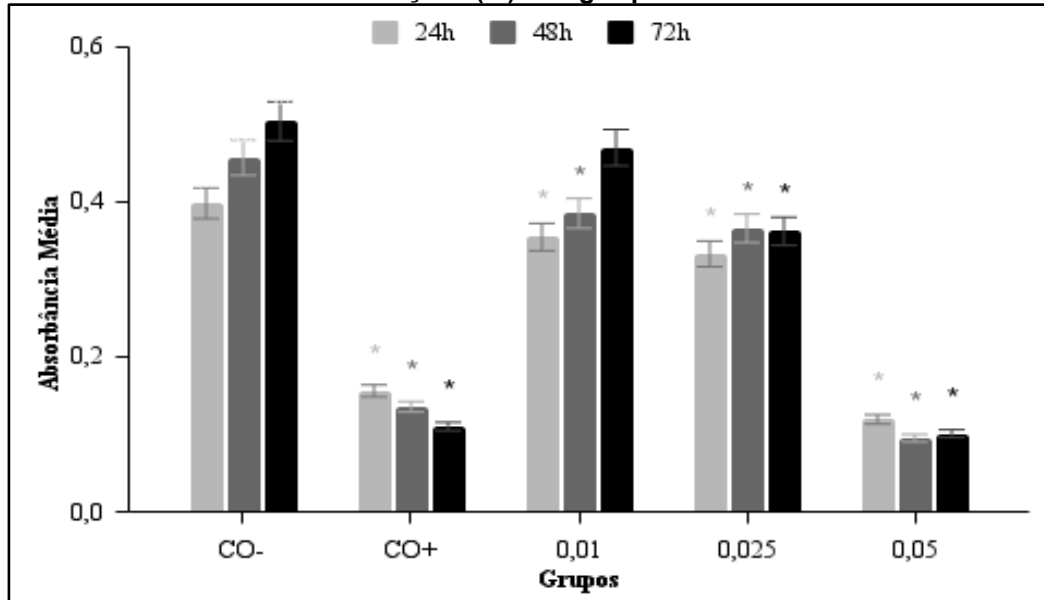
RESULTADOS E DISCUSSÃO

CÉLULAS HuH7.5

Os dados das absorvâncias médias das células HuH7.5 tratadas em diferentes concentrações do agroquímico Fusilade® estão representados na Figura 1. É possível observar que nos tempos de 24 e 48 horas as três concentrações avaliadas (0,01%, 0,025% e 0,05%) apresentaram absorvâncias estatisticamente menores que as do controle negativo e, efeito citotóxico. No tempo de 72 horas, a menor concentração avaliada (0,01%) não apresentou nenhuma alteração estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, inclusive, a viabilidade celular foi de 93,25% (Tabela 1). Já para o mesmo período de tempo, nas demais concentrações (0,025% e 0,05%), foi observada uma diminuição estatisticamente significativa das absorvâncias médias, com viabilidades celulares de 71,81% e 20% (Tabela 1), respectivamente, indicando citotoxicidade deste agroquímico. Este resultado sugere que as células HuH7.5 conseguiram se recuperar após a exposição

a menor concentração do Fusilade®, mas em doses maiores essa recuperação não foi possível.

Figura 1 - Absorbâncias médias de células tumorais hepáticas humanas tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações (%) do agroquímico Fusilade®.



CO-: Controle Negativo, CO+: Controle Positivo.

* Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (CO-).

Fonte: Autoria própria (2023).

Tabela 1 - Percentuais das viabilidades celulares de células tumorais hepáticas tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações (%) do agroquímico Fusilade®.

Grupos	HuH7.5		
	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00
CO+	39,20	29,67	21,84
0,01	89,01*	84,29*	93,25
0,025	83,61*	80,08*	71,81*
0,05	29,96*	20,80*	20,00*

CO-: Controle Negativo, CO+: Controle Positivo.

* Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (CO-).

Fonte: Autoria própria (2023).

Inclusive, pode-se observar redução da viabilidade celular com o aumento da concentração do agroquímico (de 0,01% para 0,05%) no mesmo tempo de avaliação. Assim como, observa-se uma evidente redução da viabilidade celular (Tabela 1), com o passar do tempo de exposição (de 24 para 72 horas), para as concentrações 0,025% e 0,05% do agroquímico Fusilade®.

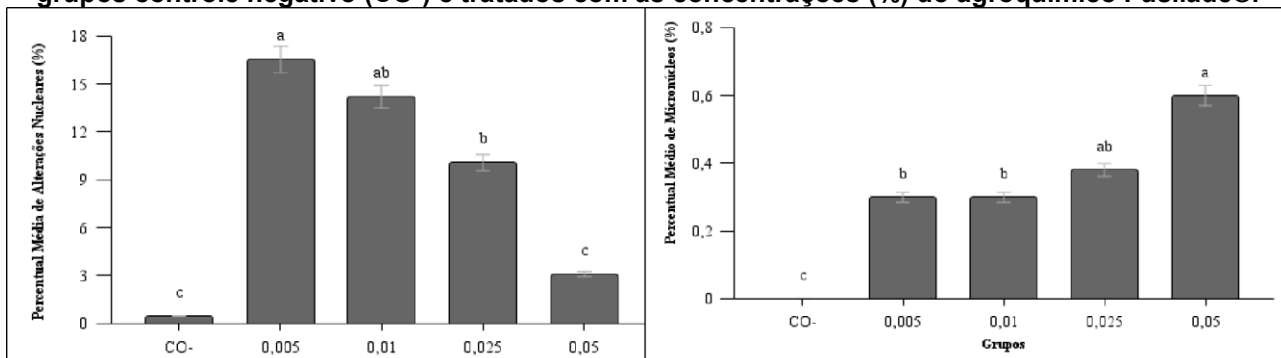
Lithobates catesbeianus

Foi observada a mortalidade dos anfíbios ao longo do experimento. Para as concentrações de 0,005%, 0,01% e 0,025% a mortalidade final foi de 0% e na maior

concentração do Fusilade® (0,05%) os anfíbios tiveram taxa de mortalidade de 80% ao completar somente 24h em exposição.

Dos animais sobreviventes foi possível observar as alterações nucleares (Figura 2 - A), onde os grupos 0,005%, 0,01% e 0,025%, tratados com o agroquímico se mostraram citotóxicos. A citotoxicidade se mostrou inversamente proporcional à dose avaliada. Com relação ao percentual de micronúcleos (MN) (Figura 2 - B), pode-se observar que todas as concentrações se apresentaram mutagênicas. Entretanto, ao contrário da citotoxicidade, a mutagenicidade foi proporcional à dose avaliada. Este resultado mostra que, apesar de serem menos citotóxicas, as maiores doses do Fusilade® agem mais especificamente sobre a formação de alterações no material genético das células dos girinos, resultando em mutações (formação de micronúcleos).

Figura 2 - Porcentagem média de alterações nucleares (A) e de micronúcleos (B) encontradas nos grupos controle negativo (CO-) e tratados com as concentrações (%) do agroquímico Fusilade®.



CO-: Controle Negativo, CO+: Controle Positivo.

*Colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Fonte: Autoria própria (2023)

CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que as diferentes concentrações do herbicida Fusilade® apresentaram efeito nocivo para as células hepáticas (HuH7.5) *in vitro* e para os girinos de rã-touro *in vivo*. Estes resultados indicam que o Fusilade® pode causar danos ao DNA e comprometer a integridade celular de diferentes organismos, podendo representar um risco ambiental e à saúde humana.

Agradecimentos

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) pela infraestrutura e estímulo à produção científica e tecnológica de qualidade.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

CORDUK, N. et al. Monitoring of micronuclei and nuclear abnormalities in *Pelophylax ridibundus* erythrocytes from the Biga Stream (Canakkale, Turkey). **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 27, n. 1, p. 147-153, 2018.

GAUTHIER L. et al. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the River Dadou (France), using the amphibian *Xenopus laevis*. **Science of Total Environment**, v. 323, p. 47–61, 2004.

GONÇALVES, M.W. et al. Detecting genomic damages in the frog *Dendropsophus minutus*: preserved versus perturbed areas. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 5, p. 3947–3954, 2015.

MEENA, R. S. et al. Impact of agrochemicals on soil microbiota and management: A review. **Land**, v. 9, n. 2, p. 34, 2020.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

OSMAN, M.E.H. et al. Cyanobacterial *Arthrospira (Spirulina platensis)* as safener against harmful effects of fusilade herbicide on faba bean plant. **Rendiconti Lincei**, v. 27, p. 455-462, 2016.

POLLO, F.E. et al. Assessment in situ of genotoxicity in tadpoles and adults of frog *Hypsiboas cordobae* (Barrio 1965) inhabiting aquatic ecosystems associated to fluorite mine. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 133, p. 466-474, 2016.

RISSOLI, R.Z. et al. Efeitos do glifosato e dos herbicidas à base de glifosato Roundup Original® e Roundup Transorb® na morfofisiologia respiratória de girinos de rã-touro. **Quimiosfera**, v. 156, p. 37-44, 2016.