

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS  
MISSÕES

URI – CAMPUS DE ERECHIM  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

JAQUILINI FÁTIMA GIAROLO PIASSÃO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO HERBICIDA 2,4-D SOBRE A MORFOLOGIA  
DE *Artemia salina* (Leach, 1819)

ERECHIM, JUNHO DE 2018

JAQUILINI FÁTIMA GIAROLO PIASSÃO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO HERBICIDA 2,4-D SOBRE A MORFOLOGIA  
DE *Artemia salina* (Leach, 1819)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ecologia (Área de Concentração: Gestão e Conservação Ambiental).

Linha de Pesquisa

Ambiente e Tecnologia

Orientadoras

Profa. Dra. Albanin Aparecida Mielniczki Pereira

Profa. Dra. Rozane M. Restello

ERECHIM, JUNHO DE 2018.

JAQUILINI FÁTIMA GIAROLO PIASSÃO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO HERBICIDA 2,4-D SOBRE A MORFOLOGIA  
DE *Artemia salina* (Leach, 1819)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ecologia. Área de Concentração: Gestão e Conservação Ambiental.

BANCA EXAMINADORA

---

ALBANIN APARECIDA MIELNICZKI PEREIRA (Orientadora)

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim

---

ROZANE MARIA RESTELLO (Orientadora)

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim

---

ANNA MARIA SIEBEL

Universidade Comunitária da Região de Chapecó – Unochapecó

---

SILVANE SOUZA ROMAN

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim

Erechim, junho de 2018

## AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas participaram direta ou indiretamente na realização desse trabalho. À elas meus mais sinceros agradecimentos.

Agradeço primeiramente a DEUS e a minha Santinha, pela força e sabedoria para chegar até aqui e por sempre estarem presentes na minha vida.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Albanin Aparecida Mielniczki Pereira, em primeiro lugar por sempre arrumar um tempinho para me orientar nestes 6 anos que trabalhamos juntas (4 de graduação e 2 de mestrado), pelo apoio, confiança, amizade, por pegar no meu pé inúmeras vezes e acreditar no meu potencial. Se tem uma coisa que eu aprendi nestes anos é que no final tudo vai dar certo e vou levar isso para minha vida.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rozane Maria Restello, por ter aceitado me orientar e me ajudar com as análises de morfologia. Acima disso, quero agradecer pela amizade, pela confiança e ensinamentos, afinal foram muitas dúvidas esclarecidas.

Aos meus companheiros de experimento, Bianca, Sabrina e Gabriel, que me ajudaram muito, sem vocês o trabalho não seria mesmo. Obrigada pela amizade e companheirismo, levarei vocês no meu coração. Aos que viraram as noites comigo fazendo experimentos, meu mais sincero agradecimento, em especial a Bruna, a Bianca e o Gabriel. Ao pessoal do laboratório 9.36, pela ajuda.

À minhas amigas Pri e Leidi, por sempre ouvirem os meus desabafos, me incentivar a seguir em frente, pelas conversas sinceras e brincadeiras no lab. Gratidão por nossos caminhos terem se cruzados, vou levar nossa amizade para a vida.

Aos meus pais Valentin e Santina, ao meu irmão Josimar e ao meu namorado Nicolás, por sempre acreditarem em mim e nunca medirem esforços para me auxiliar em tudo o que fosse preciso. Agradeço imensamente pelo incentivo, isto foi essencial para mim chegar até aqui. Vocês são maravilhosos!!!

*Assim como os pássaros, precisamos aprender a superar os desafios que nos são apresentados, para alcançarmos voos mais altos.*

(Dirk Wolter)

**Avaliação da toxicidade do herbicida 2,4-D sobre a morfologia de *Artemia salina*  
(Leach, 1819)**

**Discente:** Jaquilini Fátima Giarolo Piassão

**Orientadoras:** Albanin Aparecida Mielniczki Pereira e Rozane Maria Restello

**Resumo**

O herbicida 2,4-D é aplicado no controle de plantas daninhas, entretanto pode acabar atingindo o meio ambiente e conseqüentemente os organismos que ali habitam. *Artemia salina* é um microcrustáceo muito utilizado para avaliar a toxicidade de diferentes substâncias. Dessa forma, este trabalho teve como objetivos i) analisar o efeito ao longo do tempo e de diferentes concentrações do herbicida 2,4-D sobre a morfologia de *A. salina* e iii) se existe uma possível reversão nas alterações morfológicas. As avaliações morfológicas incluíram a análise de cor, olho, tubo digestivo, abdome e número total de indivíduos alterados. Estas análises foram realizadas nas concentrações de 1,60 mg L<sup>-1</sup> a 11,37 mg L<sup>-1</sup> e também com concentração fixa, em tempos variáveis entre 6 e 48 horas de tratamento. O 2,4-D causou alterações morfológicas nas características cor, olhos, tubo digestivo, abdome e n<sup>o</sup> total de organismos alterados. As alterações morfológicas foram mais expressivas nos tempos iniciais do desenvolvimento, quando comparadas ao controle. O herbicida 2,4-D alterou a morfologia de *A. salina* na concentração mais baixa testada, aumentando gradativamente nas outras concentrações. Foi observada reversão nas alterações morfológicas já nas primeiras 12 horas de retirada com o contato do herbicida. A partir destes dados é possível concluir que o herbicida 2,4-D afeta organismos não-alvo, neste caso alterou a morfologia dos náuplios de *A. salina* e que estes organismos são bons indicadores de toxicidade.

**Palavras-chave:** Reversão fenotípica, temperatura, morfologia, microcrustáceo.

**Evaluation of the toxicity of 2,4-D herbicide on the morphology of *Artemia salina*  
(Leach, 1819)**

**Abstract**

The herbicide 2,4-D is applied in the control of weeds, but ends up reaching the environment and consequently the organisms that live there. *Artemia salina* is a microcrustacean widely used to evaluate the toxicity of different substances. In this way, this work had as objectives. i) to evaluate the effect of temperature on hatching and on the homogeneity of stages of development of *A. salina*, ii) to analyze the effect of time and different concentrations of 2,4-D herbicide on the morphology of *A. salina* and iii) there is a possible reversal in morphological changes. A hatch was tested at temperatures 20, 22 and 24 °C. Morphological evaluations included analysis of color, eye, digestive tract, abdomen, and a total number of altered individuals. These analyzes were performed at concentrations of 1.60 mg L<sup>-1</sup> to 11.37 mg L<sup>-1</sup> and also with fixed concentration, in times varying between 6 and 48 hours of treatment. The temperature of 24 °C was the one that had the greatest hatching and homogeneity of development and was the one used in the a posteriori experiments. 2,4-D caused morphological alterations in color, eyes, digestive tract, abdomen and a total number of altered organisms. The morphological alterations were more expressive in the early stages of development when compared to the control. The herbicide 2,4-D altered the morphology of *A. salina* at the lowest concentration that tested, gradually increasing at the other concentrations. A reversal was observed in the morphological alterations already in the first 12 hours of withdrawal with the contact of the herbicide.

**Keywords:** Phenotypic reversion, temperature, morphology, microcrustacean

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Número de cistos de <i>A. salina</i> eclodidos/vivos em diferentes temperaturas de cultivo. ....	15
<b>Tabela 2.</b> Percentual de organismos com características morfológicas do estágio I e estágio II. ....	15
<b>Tabela 3.</b> Doses letais de 2,4-D para <i>A. salina</i> tratada durante 48 horas. ....	16
<b>Tabela 4.</b> Avaliação morfológica em náuplios de <i>A. salina</i> tratados com 2,4-D na concentração equivalente à DL25 (3,69 mg L <sup>-1</sup> ). ....	17
<b>Tabela 5.</b> Avaliação morfológica em náuplios de <i>A. salina</i> tratados com 2,4-D na concentração equivalente à DL50 (7,17 mg L <sup>-1</sup> ). ....	18
<b>Tabela 6.</b> Avaliação morfológica em náuplios de <i>A. salina</i> tratados com 2,4-D, no tempo de 24 horas, variando as concentrações. ....	20
<b>Tabela 7.</b> Valor total e percentual das alterações morfológicas em <i>A. salina</i> tratada com o herbicida 2,4-D, com 12 horas de tratamento. ....	23
<b>Tabela 8.</b> Valor total e percentual das alterações morfológicas em <i>A. salina</i> após a retirada do contato com o herbicida 2,4-D, (12 horas água salinizada). ....	23
<b>Tabela 9.</b> Valor total e percentual das alterações morfológicas em <i>A. salina</i> após a retirada do contato com o herbicida 2,4-D, (24 horas água salinizada). ....	24



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química do herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético.....	5
<b>Figura 2.</b> Características morfológicas de náuplios de <i>A. salina</i> em primeiro estágio larval (Vista dorsal). (A) Representação esquemática, (B) Imagem real. ....	7
<b>Figura 3.</b> Características morfológicas normais de <i>A. salina</i> . ....	12
<b>Figura 4.</b> Características morfológicas alteradas de <i>A. salina</i> .....	13
<b>Figura 5.</b> Fluxograma da metodologia de tratamentos com o herbicida 2,4-D. ....	14
<b>Figura 6.</b> Mortalidade de <i>A. salina</i> após tratamento (48 horas) com o agrotóxico 2,4-D. ....	16
<b>Figura 7.</b> Comparação do efeito de 2,4-D sobre a morfologia de <i>A. salina</i> ao longo do tempo em diferentes concentrações de tratamento. ....	19
<b>Figura 8.</b> Comparação do efeito de 2,4-D sobre a morfologia de <i>A. salina</i> em diferentes concentrações de tratamento.....	20
<b>Figura 9.</b> Reversão do efeito de 2,4-D sobre a morfologia de <i>A. salina</i> ao longo do tempo nas DL <sub>25</sub> e DL <sub>50</sub> . ....	22

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Classificação toxicológica dos agrotóxicos. ....	4
<b>Quadro 2.</b> Efeito das condições ambientais sobre a reprodução de <i>A. salina</i> . ....	8
<b>Quadro 3.</b> Características morfológicas normais e alteradas em <i>A. salina</i> . ....	12

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>2</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>2</b>
3.1. Objetivo Geral.....	2
3.2. Objetivos Específicos .....	2
<b>4. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
4.1. Uso dos agrotóxicos.....	3
4.2. Características e toxicidade do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).....	4
4.3. <i>Artemia salina</i> como organismo modelo de estudo.....	6
4.4. A importância da morfologia para o desempenho de organismos e populações ...	8
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
5.1. Cultivo de <i>A. salina</i> .....	10
5.2. Análise de mortalidade dos náuplios de <i>A. salina</i> .....	11
5.3. Análise da morfologia de <i>A. salina</i> .....	11
5.4. Tratamentos com o herbicida 2,4-D .....	13
5.5. Análise dos dados .....	14
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>15</b>
6.1. Efeito da temperatura sobre o desenvolvimento morfológico de <i>A. salina</i> .....	15
6.2. Efeitos do tratamento com 2,4-D sobre a mortalidade de <i>A. salina</i> .....	16
6.3. Efeito do 2,4-D sobre a morfologia de <i>A. salina</i> ao longo do tempo .....	16
6.4. Efeito da concentração de 2,4-D sobre a morfologia de <i>A. salina</i> .....	19
6.5. Reversão do efeito de 2,4-D sobre a morfologia de <i>A. salina</i> .....	21
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>8. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>27</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>28</b>
<b>10. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>28</b>
<b>10. ANEXO 1: DADOS BRUTOS RELATIVOS À AVALIAÇÃO DE MORFOLOGIA EM <i>A. SALINA</i> EXPOSTA AO TRATAMENTO COM 2,4-D..</b>	<b>34</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, houve um aumento na produção e qualidade dos alimentos, devido a demanda crescente da população mundial e como consequência, o uso de agrotóxicos tem aumentado consideravelmente (RIBEIRO e PEREIRA, 2016). Os agrotóxicos são substâncias tóxicas aplicadas intencionalmente afim de prevenir e eliminar os efeitos causados por pragas, doenças e ervas daninhas, no entanto, podem causar sérios prejuízos ao meio ambiente e a saúde humana (BOHNER, et al., 2013). Embora, a sua função seja direcionada, eles também podem causar danos fora do seu alvo, contaminando assim o solo e mananciais, oferecendo riscos para todos os organismos expostos (VEIGA et al., 2006; FRIEDRICH, 2013).

No que se refere a saúde humana os danos causados pelos agrotóxicos podem estar relacionados a desregulações endócrinas, mutagênese, alterações imunológicas, carcinogênese, entre outros (FOO e HAMEED, 2010). Já em organismos aquáticos os efeitos podem ser desde alterações na dinâmica bioquímica natural dos indivíduos até modificações na composição da população ou de todo o ecossistema (SPADOTTO, 2006).

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com o organismo alvo, em herbicidas, inseticidas, acaricidas, fungicidas, raticidas e bactericidas (RIBAS e MATSUMURA, 2009; SOARES et al., 2017). Dentre os grupos de agrotóxicos mais utilizado no Brasil, destacam-se os herbicidas, como por exemplo ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D). Este é altamente seletivo, sistêmico, pré ou pós-emergente. Pertencente ao grupo dos ácidos ariloxialcanóicos, utilizado normalmente, no controle de diversos tipos de ervas daninhas de folhas largas (ISLAM et al., 2018; MARCATO et al., 2017).

Afim de avaliar os efeitos causados pelo herbicida 2,4-D, foi utilizado como modelo de estudo para este trabalho a *Artemia salina* Learch (1819), um microcrustáceo de água salgada. A espécie é muito utilizada para avaliar a toxicidade de diferentes substâncias químicas, pois apresenta facilidades no cultivo e baixo custo, sendo que seus ovos podem ser adquiridos comercialmente (DUMITRASCU, 2011).

Neste sentido, este trabalho teve como objetivos, i) analisar o efeito do herbicida 2,4-D sobre a morfologia de *A. salina* ao longo do tempo, ii) analisar o efeito de diferentes concentrações do herbicida 2,4-D sobre a morfologia de *A. salina*, iii) avaliar

a existência de uma possível reversão nas alterações morfológicas de *A. salina* tratadas com o herbicida 2,4-D.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Os herbicidas são muito utilizados no controle de plantas daninhas mas acabam, por sua vez, atingindo indiretamente diversos ambientes e influenciando de modo negativo nos organismos que habitam os locais nos quais estes compostos são aplicados. *A. salina* é um ótimo modelo para estudos toxicológicos, pois tem um curto período de vida e reflete o que acontece no ambiente em que está presente. Estudos que avaliam alterações morfológicas são de suma importância pois estes refletem as condições em que os organismos se encontram no ambiente permitindo prever dano em níveis biológicos superiores, que possam vir a afetar populações, comunidades ou mesmo ecossistemas. A prevalência de alterações morfológicas em uma população pode ser um sinal precoce de declínio ou extinção da mesma (MOORE et al., 2004). Com base no exposto, este trabalho se propôs a avaliar os efeitos do herbicida 2,4-D sobre a morfologia de *A. salina* e investigar se existe uma possível reversão para esta alteração. Não são encontrados na literatura estudos que avaliam a toxicidade do 2,4-D em *A. salina*.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos tóxicos do herbicida 2,4-D durante e pós tratamentos sobre a morfologia de *A. salina*.

### **3.2. Objetivos Específicos**

- Analisar o efeito do herbicida 2,4-D sobre a morfologia de *A. salina* ao longo do tempo.
- Analisar o efeito de diferentes concentrações do herbicida 2,4-D sobre a morfologia de *A. salina*.
- Avaliar a existência de uma possível reversão nas alterações morfológicas de *A. salina* tratadas com o 2,4-D.

## 4. REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1. Uso dos agrotóxicos

Os agrotóxicos são constituídos por diversas substâncias de natureza química, física ou biológica, aplicados intencionalmente no controle de pragas, doenças e ervas daninhas, no entanto, podem causar sérios danos à saúde humana e ao meio ambiente (INOUYE et al., 2014; PERES e MOREIRA, 2003).

De acordo com a Lei Federal nº 7802, de 11/07/89 e regulamentada pelo Decreto nº 4074, de 04/01/2002, definem-se agrotóxicos como:

“os produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”

O consumo de agrotóxicos aumentou de maneira significativa com o início da “Revolução Verde”, trazendo mudanças para o processo tradicional de trabalho agrícola, baseadas no uso intensivo de agentes químicos e mecanização da agricultura, gerando o crescimento da produtividade (PINGALI, 2012). O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos no mundo, com consumo estimado em 899 milhões de litros de pesticidas por ano, sendo que destes, são utilizados 134 milhões de litros no Rio Grande do Sul (PIGNATI et al., 2017). Entre os agrotóxicos mais utilizados no país, encontram-se os herbicidas, que representam 45% do total de agrotóxicos comercializados (RIGOTTO et al., 2014).

O uso de agrotóxicos tem sido o foco de estudos ecotoxicológicos, pois além de contaminarem o solo, a água e a atmosfera, apresentam alta persistência no meio ambiente, uma vez que entram nas cadeias tróficas e desenvolvem respostas tóxicas nos organismos, desde bactérias até os seres humanos. Isto porque estas substâncias atingem na maioria das vezes organismos não-alvo (MARCATO et al., 2017; GRISOLIA, 2005).

Os agrotóxicos podem ser classificados em quatro classes de acordo com a sua toxicidade, estas definidas pela DL<sub>50</sub> (dose letal de 50%), que significa a quantidade de

substância suficiente para causar a morte da metade dos organismos de uma amostra em análise (Quadro 1) (BRAIBANTE e ZAPPE, 2012).

**Quadro 1.** Classificação toxicológica dos agrotóxicos.

Classe toxicológica	DL50 (mg/kg)	Classificação	Faixa colorida
<b>I</b>	$\leq 5$	Extremamente tóxico	Vermelho
<b>II</b>	Entre 5 e 50	Altamente tóxico	Amarelo
<b>III</b>	Entre 50 e 500	Mediamente tóxico	Azul
<b>IV</b>	Entre 500 e 5.000	Pouco tóxico	Verde

Adaptado de BRAIBANTE e ZAPPE (2012).

Em relação a classificação do potencial de periculosidade ambiental (PPA) de um agrotóxico, são levados em consideração os parâmetros: bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade e os potenciais mutagênico, teratogênico e carcinogênico. A partir disso, os agrotóxicos podem ser distribuídos em classes que variam de I a IV: Classe I - Produto altamente perigoso; Classe II - Produto muito perigoso; Classe III - Produto perigoso e Classe IV - Produto pouco perigoso (RIBAS e MATSUMURA, 2009).

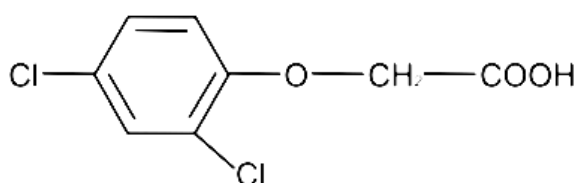
#### 4.2. Características e toxicidade do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

O herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), pertence ao grupo dos ácidos ariloxialcanóicos, um agroquímico seletivo, de ação sistêmica e que pode ser aplicado pré ou pós emergencialmente nas culturas de arroz, cana-de-açúcar, milho, pastagens, soja e trigo. Na classificação toxicológica, o 2,4-D pertence à Classe I, ou seja, é extremamente tóxico para os animais e quanto ao potencial de periculosidade ambiental, encontra-se na Classe III, sendo considerado perigoso ao meio ambiente (AGROFIT, 2017).

Historicamente, o 2,4-D foi utilizado pelas forças aéreas norte-americanas na guerra do Vietnã, juntamente com o ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), formando o “agente laranja”, que tinha como finalidade desfolhar formações florestais para localizar os inimigos. Em consequência de sua aplicação, acabou atingindo não somente as plantas, mas também grande parte da população, causando graves danos à saúde (STELLMAN et al., 2003).

O 2,4-D tem como formulação básica um ácido, mas pode ser produzido também como sal inorgânico, éster ou amina, sendo utilizado em formulações comerciais. A sua forma molecular é  $C_8H_6Cl_2O_3$  (Figura 1). A presença do herbicida 2,4-D em ambientes aquáticos e terrestres, mesmo em concentrações baixas pode prejudicar indiretamente os ecossistemas. Nas plantas possui ações genotóxicas, citotóxicas e mutagênicas e nos animais causa alterações fisiológicas, histológicas e comportamentais (MARCATO et al., 2017).

**Figura 1.** Estrutura química do herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético.



Há diversos estudos que avaliaram os efeitos e a toxicidade do 2,4-D em diferentes vertebrados como, por exemplo, camundongos, ratos, coelhos e peixes, mostrando que este herbicida pode causar desde alterações em nível celular e/ou molecular até mesmo alterações a nível metabólico (ZHANG et al., 2017; VIGÁRIO e SABÓIA-MORAIS, 2014; ALVES et al., 2013; CHARLES et al., 2001).

O efeito do 2,4-D também foi testado em insetos. Martínez et al. (2001), verificaram que a exposição ao 2,4-D causou o comprometimento da função reprodutiva no escaravelho, *Canthon cyanellus* (Scarabaeidae). Além disso, também apresenta efeito genotóxico as células somáticas e germinativas de *Drosophila* (TRIPATHY et al., 1993).

Harrahy e colaboradores (2014), realizaram um estudo para determinar a persistência do herbicida 2,4-D aplicados a dois lagos no controle da planta *Myriophyllum spicatum* (Haloragaceae), a fim de determinar o impacto causado em macroinvertebrados bentônicos, avaliados como organismos não-alvo. As concentrações de 2,4-D atingiram um pico de  $28\mu\text{g/L}$  após o tratamento e ficaram abaixo do limite de detecção após 10 dias de tratamento. Os resultados demonstraram que apesar da curta persistência e das baixas concentrações testadas, houve um declínio de alguns grupos de macroinvertebrados, corroborando a hipótese de que este herbicida apresenta potencial para atingir também organismos não-alvo.



Em 2010, Park et al. realizaram estudo com *Chironomus riparius* (Diptera) cuja fase jovem é aquática, expostos a diferentes concentrações do herbicida 2,4-D, afim de analisar as respostas biológicas e moleculares causadas por este herbicida. Os resultados indicaram um aumento da expressão de vários biomarcadores de estresse oxidativo, quando expostos ao 2,4-D. Também foram observadas alterações morfológicas no mento (aparelho bucal, “dentes”) desses organismos, demonstrando que estes parâmetros podem ser usados para monitorar a toxicidade de 2,4-D num ambiente aquático.

### **4.3. *Artemia salina* como organismo modelo de estudo**

O gênero *Artemia* pertence ao filo Arthropoda, classe Branquiopoda, ordem Anostraca e família Artemiidae (VEIGA e VITAL, 2002). *Artemia salina* Leach (1819) é um microcrustáceo de água salgada, cosmopolita e amplamente utilizado em ensaios laboratoriais para a determinação da toxicidade de diversas substâncias, devido ao seu fácil cultivo, tamanho pequeno, fácil manipulação, ciclo de vida curto e sua alta capacidade de adaptação. *A. salina* é muito importante na cadeia alimentar pois atua entre as comunidades planctônicas e as cadeias superiores (peixes) (NUNES et al., 2006).

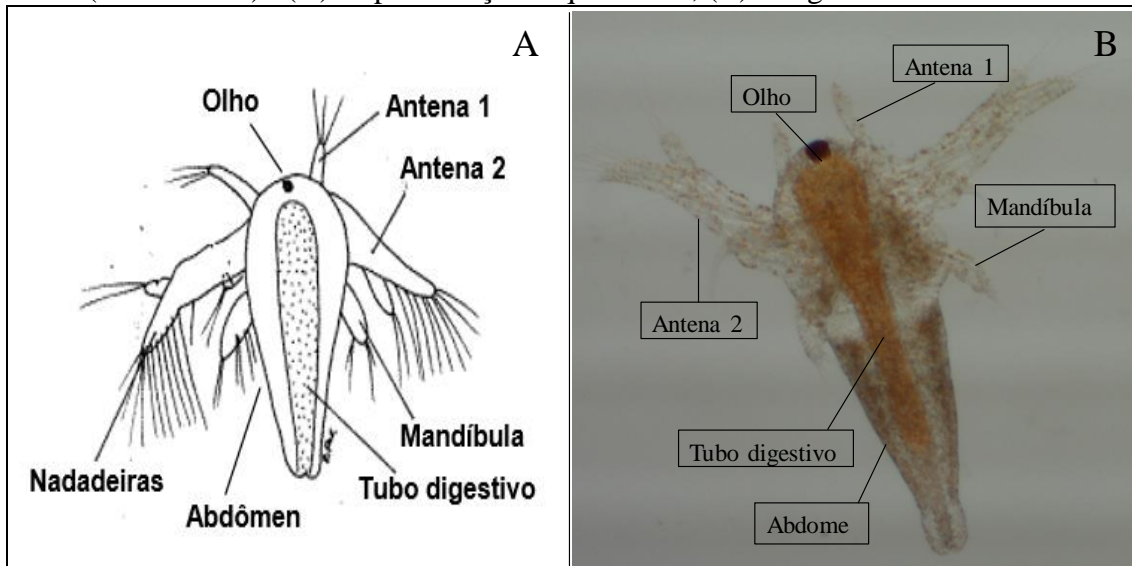
Os cistos de *Artemia* são constituídos por um embrião inerte, que não se desenvolve enquanto mantido a seco. Quando em contato com água salina, os cistos são hidratados, ativando assim o metabolismo do embrião. Após 20 horas, a membrana externa do cisto se rompe e o embrião aparece envolto por uma membrana de incubação. Enquanto o embrião paira sob a concha vazia (estágio guarda-chuva) os náuplios acabam de se desenvolver e após um período curto, a membrana de incubação se rompe e nasce o náuplio livre (VAN STAPPEN, 1996).

No primeiro estágio larval (estágio I), o embrião recebe o nome de náuplio, o seu tamanho varia de 400 a 500  $\mu\text{M}$ , possui uma cor marrom-laranja, um olho vermelho (fotorreceptor) encontrado na região da cabeça. Apresenta ainda três pares de apêndices, a saber: primeiro par de antenas (função sensorial), segundo par de antenas (função filtradora e locomotora) e terceiro par de antenas, que são as mandíbulas (função de absorção dos alimentos) (DUMITRASCU, 2011; VAN STAPPEN, 1996) (Figura 2).

No estágio I, as larvas alimentam-se apenas da reserva vitelínica, pois seu trato digestivo até então não está bem formado, permanecendo com a boca e ânus fechados.

Já no estágio II, as larvas se alimentam através da filtração de pequenas partículas (1 a 5  $\mu\text{M}$ ) de bactérias e detritos. A larva cresce e se diferencia, passando por cerca de 15 mudas, até chegar na fase adulta (VAN STAPPEN, 1996).

**Figura 2.** Características morfológicas de náuplios de *A. salina* em primeiro estágio larval (Vista dorsal). (A) Representação esquemática, (B) Imagem real.



Fonte: (A) Adaptado de FOX, 2006. (B) Autor.

A reprodução da *A. salina* depende das condições de vida em que se encontra, como por exemplo, a concentração de oxigênio, salinidade, alimento, etc. Sendo assim, a reprodução pode ser ovípara e ovovivípara (DUMITRASCU, 2011). Em condições ambientais inadequadas (alta salinidade, baixo teor de oxigênio dissolvido e escassez de alimento), as fêmeas geram cistos (reprodução ovípara), pois estes são mais resistentes no meio ambiente. Quando as condições ambientais são adequadas (salinidade moderada, alto teor de oxigênio dissolvido e abundância de alimento), as fêmeas geram náuplios (reprodução ovovivípara), já no primeiro estágio larval (Quadro 2) (DUMITRASCU, 2011).

**Quadro 2.** Efeito das condições ambientais sobre a reprodução de *A. salina*.

<b>Reprodução ovípara</b>	<b>Reprodução Ovovivípara</b>
Baixo teor de O <sub>2</sub> e alta salinidade	Alto teor de O <sub>2</sub> e baixa salinidade
Forte flutuação de O <sub>2</sub>	Menor flutuação de O <sub>2</sub>
Alimentos ricos em Fe (Por exemplo, algas verdes)	Alimentos pobres em Fe (Por exemplo, detritos orgânicos)

Adaptado de DUMITRASCU (2011).

Em 2010, Bustos-Obregon e Vargas, realizaram bioensaios de toxicidade em *A. salina* expostas ao organofosforado Diazinon, a fim de determinar se a espécie é uma indicadora de poluição em ambientes aquáticos contaminados por resíduos agrícolas. Os organismos foram expostos a diferentes concentrações da substância tóxica durante 24, 48 e 72 horas após a eclosão. Para cada tempo foi obtido a dose letal, considerando a imobilização das larvas de *A. salina* como o parâmetro de mortalidade. A DL50 nos diferentes tempos de exposição foi calculada a partir das mudanças morfológicas nas três etapas do desenvolvimento larval. Em conjunto, os dados deste trabalho indicam que a avaliação morfológica em *A. salina* pode ser um ótimo indicador para ambientes aquáticos poluídos com pesticidas.

Rao et al. (2007) testaram a toxicidade aguda e o sucesso de eclosão de *A. salina*, tratadas com quatro inseticidas organoclorados: acefato (ACEP), clorpirifos (CPP), monocrotofós (MCP) e profenofos (PF). Observaram alterações morfológicas em todos os parâmetros estudados e a ordem de toxicidade foi CPP >PF >MCP >ACEP. Em 2015, Shaala et al. realizaram um estudo para investigar os efeitos toxicológicos de Diuron, no estágio inicial de vida de *A. salina*. Este herbicida sistêmico usualmente aplicado no controle de plantas daninhas, afetou morfológicamente os náuplios de *A. salina*. Nestes dois estudos, foram avaliados parâmetros morfológicos, como alterações na eclosão/desenvolvimento, no tamanho e nos apêndices dos náuplios. Ainda não existe na literatura estudos que avaliem a toxicidade do herbicida 2,4-D sobre este organismo bioindicador.

#### **4.4. A importância da morfologia para o desempenho de organismos e populações**

O desenvolvimento animal acontece através de programas de expressão gênica espaço-temporal que conduzem eventos coordenados de proliferação, migração e diferenciação, em nível celular. A soma destes eventos resulta em mudanças

morfofuncionais em larga escala, que afetam o organismo como um todo (DONG e LIU, 2017). As transições do desenvolvimento são reguladas através dos genes, hormônios e controle ambiental. As condições ambientais são detectadas através de sensores, que produzem sinais hormonais que afetam as glândulas. Estas transformam os sinais ambientais em hormônios específicos liberados na circulação. A rede de genes heterocrônicos e os hormônios regulam a proliferação e diferenciação em momentos específicos durante o desenvolvimento (FAUNES e LARRAÍN, 2016).

Fatores que interfiram de forma negativa com a regulação dos processos de desenvolvimento, podem levar à ocorrência de malformações ou anormalidades morfológicas. Johnson et al. (2001), definem anormalidades como quaisquer desvios grosseiros na variação normal da morfologia, isto pode incluir malformações (desenvolvimento de estruturas anormais) e deformidades (alterações de estruturas normais). O reparo das anormalidades requer gasto de energia, que seria destinado a outras funções, como reprodução e alimentação. Este processo de reparo, embora muitas vezes necessário, causa desvantagem energética para os organismos.

A seleção natural pode atuar em diferentes características morfológicas, isto depende dos ambientes aonde os organismos se encontram e do seu desempenho, bem como a capacidade dos indivíduos em lidar com as mudanças que ocorrem no ambiente (SATHE e HUSAK, 2015). Existem dois processos que facilitam a sobrevivência de populações em ambientes com mudanças rápidas: plasticidade fenotípica adaptativa e adaptação genética.

A plasticidade fenotípica adaptativa permite que os indivíduos de uma população se acomodem a um ambiente em mudança, facilitando um melhor condicionamento físico, por meio de mudanças de uma característica e/ou alterações nas estruturas de variância/covariância genética e fenotípica (LATTA et al., 2007). Em casos extremos, mudanças plásticas podem fazer com que uma população melhore seu desempenho, sem que ocorra nenhuma adaptação genética. Caso não haja mudanças plásticas, ou estas sejam insuficientes para que a população migre para um estágio superior de desempenho, ela pode permitir que a população persista até que mudanças genéticas adaptativas ocorram. A taxa de adaptação genética pode ser determinada por vários fatores, que incluem a quantidade de variação genética presente nas características que estão sob seleção, a taxa de mutação que produz uma nova variação adaptativa e correlações genéticas entre as características (PRICE et al., 2003).

Em estudo realizado por Schaack et al. (2013) foi avaliado o efeito do acúmulo de mutações não letais na capacidade competitiva em *Daphnia pulicaria*, em relação à organismos da mesma espécie sem este acúmulo de mutações (controles). De forma geral, os resultados indicaram um declínio da aptidão das linhagens com mutações em relação aos controles, mas destacam a influência do genoma e do genótipo sobre esse efeito. Além disso, as linhagens com mutações acumuladas superaram os controles em alguns ensaios, fornecendo informações sobre a frequência das mutações benéficas.

Em 2017, Soto-Rojas e colaboradores, realizaram um estudo que avaliou se a qualidade do habitat afetava a incidência de anormalidades morfológicas na salamandra *Ambystoma ordinarium*. Os resultados mostraram uma associação negativa entre a qualidade do habitat e a prevalência de anormalidades morfológicas, indicando que as condições do habitat desempenham um papel importante para o aumento de anormalidades registradas em *A. ordinarium*.

Em conjunto, estes dados reforçam a importância da inter-relação entre ambiente (habitat), genótipo e morfologia, para o desempenho (*fitness*) dos organismos tanto em condições favoráveis à sua sobrevivência e reprodução, quanto em condições desfavoráveis, as quais podem ser induzidas, por exemplo, pelo contato com agentes estressores de origem antrópica.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Cultivo de *A. salina***

Os cistos de *A. salina* (100 mg), obtidos comercialmente, foram incubados dentro de Beckers, com água salinizada (10 g NaCl, 0,7 g NaHCO<sub>3</sub> e 1000 mL de água destilada), durante 24h em estufa BOD, com aeração e iluminação constante para eclosão dos náuplios. Para que se obtivesse uma população homogênea de náuplios, ou seja, uma população na qual a maioria dos organismos se apresentasse no mesmo estágio de desenvolvimento, ao longo de 24 e 48 horas de cultivo, foram testadas inicialmente diferentes temperaturas (20, 22 e 24 °C) de cultivo.

Para cada temperatura foi realizado um “teste piloto”, o qual consistiu na retirada aleatória de 20 mL de cultivo e destes foram retirados 30 náuplios. Estes foram avaliados conforme os estágios de desenvolvimento (homogeneidade) através da análise da morfologia conforme Bustos-Obregon e Vargas (2010).

## 5.2. Análise de mortalidade dos náuplios de *A. salina*

Após a eclosão, 150 náuplios foram transferidos para tubos Falcon (volume de 50 mL), contendo 30 mL de água salinizada, destinados ao tratamento com o herbicida 2,4-D (DMA\*806 BR), obtido comercialmente. Foram testadas concentrações entre 2,7 e 12 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D (670g/L) diluídas em água, além do controle sem o herbicida. Após 48 horas, foram determinados os níveis de sobrevivência com base na motilidade dos indivíduos, ou seja, na capacidade de movimentação dos náuplios. Os dados apresentados foram transformados em percentual de mortalidade em relação ao controle (sem herbicida). As doses letais médias de 10% (DL<sub>10</sub>), 25% (DL<sub>25</sub>), 50% (DL<sub>50</sub>) e 80% (DL<sub>80</sub>) para 48 horas, foram calculadas com base na equação da reta gerada a partir de três experimentos independentes.

## 5.3. Análise da morfologia de *A. salina*

Para avaliação morfológica, os náuplios foram tratados na ausência (controle) ou presença de 2,4-D (1,60 mg L<sup>-1</sup>, 3,69 mg L<sup>-1</sup>, 7,17 mg L<sup>-1</sup> e 11,34 mg L<sup>-1</sup>) e em diferentes tempos (6, 12, 18, 24, 36 e 48 horas). Após o tratamento, os náuplios foram retirados e fixados em lâminas com água do próprio cultivo. Posteriormente, com o auxílio de uma câmera fotográfica acoplada ao microscópio óptico, foram tiradas fotografias com o aumento de 40X, estas foram armazenadas para posterior avaliação da presença ou ausência de deformidades.

Após cada experimento foram avaliados 50 organismos. Os experimentos foram realizados em três repetições independentes, totalizando 150 organismos para cada tempo e concentração experimental testada.

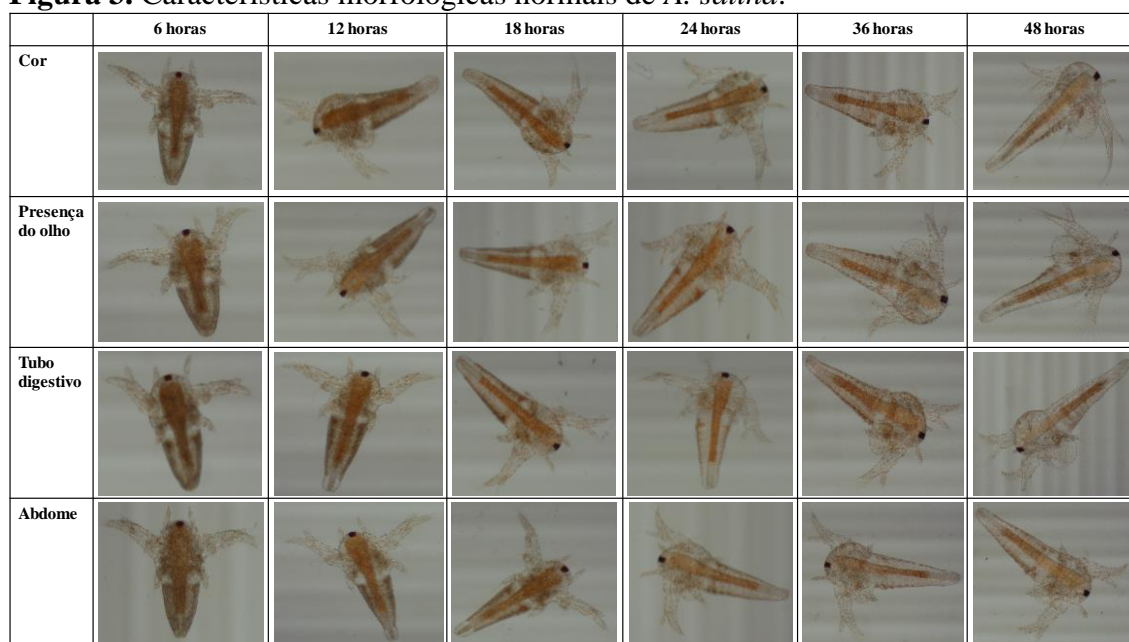
Todas as imagens e alterações morfológicas foram avaliadas pelo mesmo observador, sendo sempre avaliada uma característica por vez, para todos os 150 organismos experimentais.

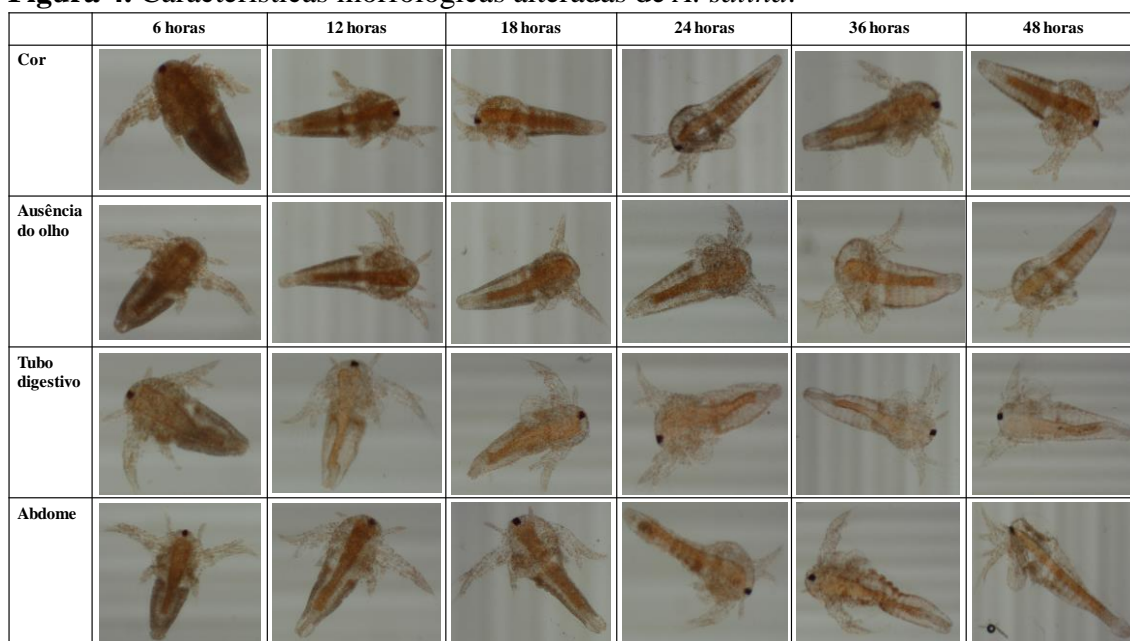
Foram selecionadas quatro características para distinção morfológica, conforme apresentado no Quadro 3. Além das características morfológicas, também foram considerados o número total de indivíduos alterados, que corresponde ao número total de náuplios que apresentaram pelo menos uma das quatro alterações descritas no Quadro 3 (Figuras 3 e 4).

**Quadro 3.** Características morfológicas normais e alteradas em *A. salina*.

Características morfológicas	Normal	Alterado	Descrição das alterações
Cor	Marrom claro	Marrom escuro	Marrom escuro
Olho	Presença	Ausência	Ausência do olho
Tubo digestivo	Simétrico	Assimétrico	Porção média do ápice mais largo ou mais estreito, ausência da porção apical, estrutura curvilínea.
Abdome	Simétrico	Assimétrico	Ausência da região apical do abdome, estrutura curvilínea.

Adaptado de BUSTOS-OBREGON e VARGAS (2010) e DUMITRASCU (2011).

**Figura 3.** Características morfológicas normais de *A. salina*.

**Figura 4.** Características morfológicas alteradas de *A. salina*.

#### 5.4. Tratamentos com o herbicida 2,4-D

O delineamento experimental dos tratamentos com 2,4-D é apresentado na Figura 5. Para avaliar o efeito do 2,4-D sobre a morfologia de *A. salina* ao longo do tempo (6, 12, 18, 24, 36 e 48), foram tratados 300 náuplios nas concentrações de 3,69 mg L<sup>-1</sup>, 7,17 mg L<sup>-1</sup> e controle (sem herbicida). O experimento foi dividido em duas etapas devido ao longo período experimental. Primeiro foram testados os tempos de 6, 12 e 18 horas e após foram testados os tempos restantes de 24, 36 e 48 horas (Figura 5). Em cada um dos tempos foi feita a avaliação morfológica de 50 náuplios por experimento conforme descrito no item 5.3.

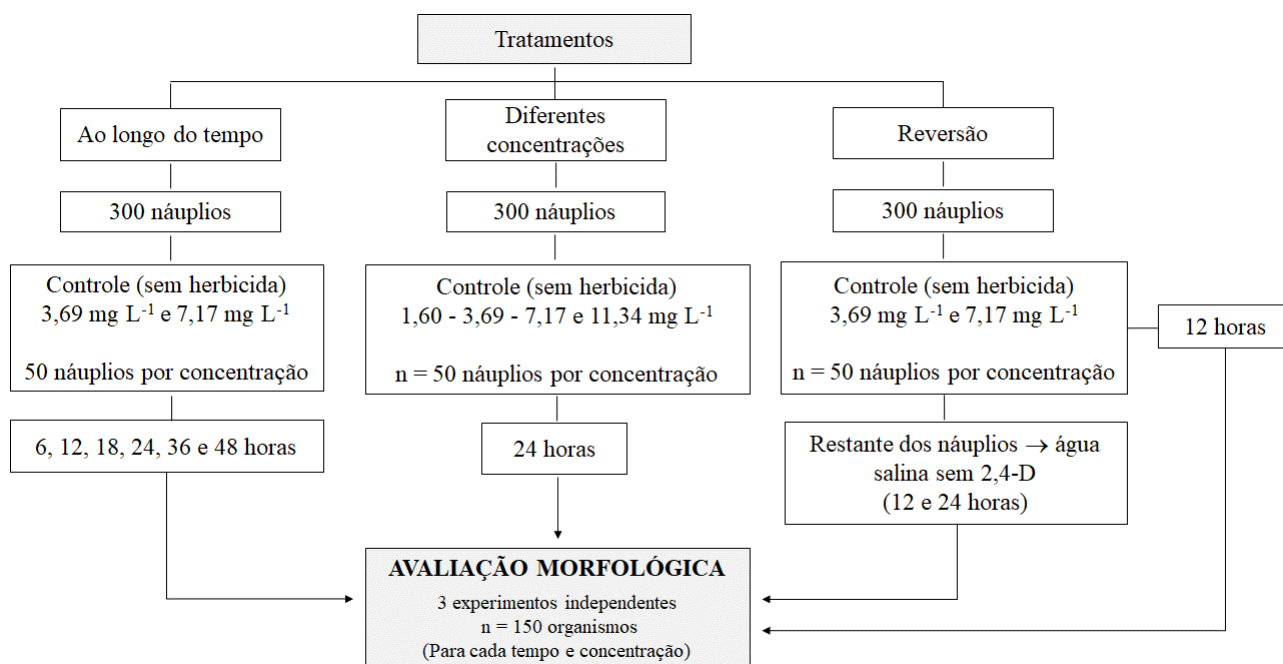
O efeito de diferentes concentrações (1,60 mg L<sup>-1</sup>, 3,69 mg L<sup>-1</sup>, 7,17 mg L<sup>-1</sup> e 11,34 mg L<sup>-1</sup>) sobre a morfologia de *A. salina* também foi avaliado, com um tempo fixo de 24 horas (Figura 5). Para cada concentração foi realizada a análise morfológica de 50 organismos por experimento (item 5.3).

Para avaliar se as alterações morfológicas da população de *A. salina* induzidas por 2,4-D poderiam ser revertidas, foi realizado um experimento no qual 300 náuplios foram tratados por 12 horas nas concentrações de 3,69 mg L<sup>-1</sup> e 7,17 mg L<sup>-1</sup>, mais o controle (sem herbicida). Este tempo foi escolhido por ter apresentado o maior aumento absoluto de indivíduos com alterações morfológicas em relação ao respectivo controle. Após estas 12 horas de contato com o 2,4-D, 50 náuplios de cada tratamento foram avaliados em relação à morfologia e o restante das populações (250 organismos) foram



transferidos para nova água salinizada, sem a presença do herbicida. Após 12 e 24 horas nesta condição (sem 2,4-D), foram retirados 50 organismos para nova avaliação morfológica (Figura 5). Avaliação morfológica conforme descrito no item 5.3.

**Figura 5.** Fluxograma da metodologia de tratamentos com o herbicida 2,4-D.



### 5.5. Análise dos dados

Os dados foram avaliados por meio do teste do qui-quadrado ( $X^2$ ), comparando o grupo controle com cada grupo de tratamento individualmente ( $1,60 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $3,69 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $7,17 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $11,34 \text{ mg L}^{-1}$ ). Cada um dos grupos avaliados foi dividido em duas classes, sendo estas: classe 1 - organismos normais e classe 2 - organismos com alterações morfológicas. Os valores da classe 1 do controle, foram considerados como valores esperados e os valores da classe 2 nos grupos tratados, foram considerados como observados. A análise  $X^2$  foi realizada no programa Past 2.17 com a opção “sample vs. expected” que permite definir os valores esperados para cada classe. Nos resultados são apresentados os valores de  $X^2$  e  $p$  obtidos, sendo considerados valores significados  $X^2$  acima de 3,84 e o valor de  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Efeito da temperatura sobre o desenvolvimento morfológico de *A. salina*

A quantidade de cistos de *A. salina* eclodidos/vivos em 24 h foi diferente entre as três temperaturas testadas (Tabela 1). A temperatura que obteve um maior número indivíduos eclodidos foi a de 24°C em 24 horas de cultivo, sendo 25 vezes maior que a temperatura de 20°C. Em 48 horas de cultivo o número de organismos vivos se assemelha para as três temperaturas estudadas.

**Tabela 1.** Número de cistos de *A. salina* eclodidos/vivos em diferentes temperaturas de cultivo.

Temperatura	24 horas	48 horas
20 °C	5	145
22 °C	58	133
24 °C	127	162

Em relação aos estágios de desenvolvimento para as diferentes temperaturas avaliadas, foi observado que com 24 horas todos os náuplios estavam no estágio I enquanto que em 48 horas, para as temperaturas de 20 e 22 °C apenas 50% da população em estágio II. Já a temperatura de 24 °C quase 100% da população atingiu o mesmo estágio de desenvolvimento no decorrer de 48 h, de acordo com a descrição de Bustos-Obregon e Vargas (2010) (Tabela 2).

Estes resultados foram importantes para os próximos testes, pois para avaliar as alterações morfológicas a maioria dos náuplios devem estar no mesmo estágio de desenvolvimento ao longo do tempo, minimizando assim, o efeito da eclosão tardia sobre a avaliação das alterações morfológicas.

**Tabela 2.** Percentual de organismos com características morfológicas do estágio I e estágio II.

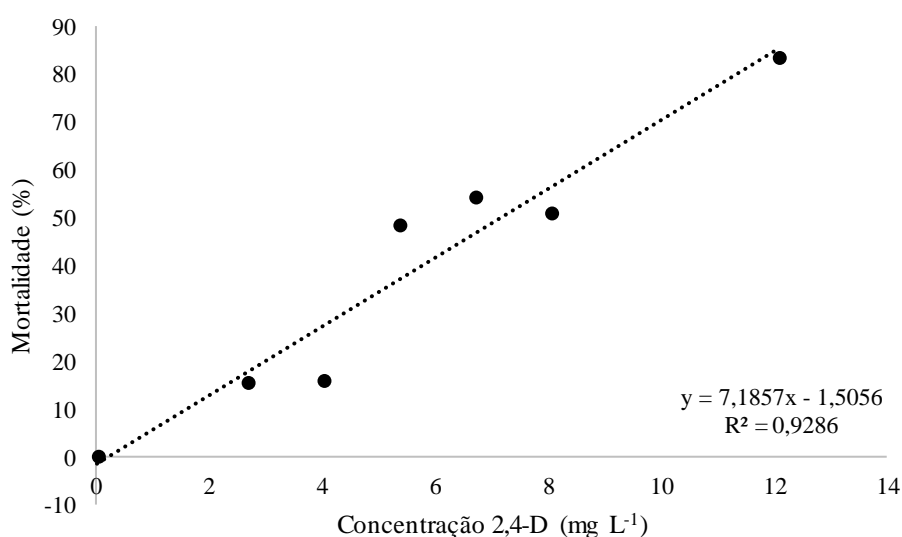
Temperatura	Morfologia estágio I (24h)	Morfologia estágio II (48h)
20 °C	100%	40%
22 °C	100%	50%
24 °C	100%	98%

Adaptado de BUSTOS-OBREGON e VARGAS (2010).

## 6.2. Efeitos do tratamento com 2,4-D sobre a mortalidade de *A. salina*

Foi observado que o aumento da mortalidade é proporcional ao aumento da concentração de 2,4-D, apresentando uma relação dose-efeito do agrotóxico, conforme pode ser observado na Figura 4. A partir da equação da reta, foram calculadas as concentrações de 2,4-D para diferentes percentuais de doses letais (DL) sobre os náuplios de *A. salina* tratada durante o período de 48 horas (Tabela 3).

**Figura 6.** Mortalidade de *A. salina* após tratamento (48 horas) com o agrotóxico 2,4-D.



**Tabela 3.** Doses letais de 2,4-D para *A. salina* tratada durante 48 horas.

Valor de DL	Concentração de 2,4 D (mg L <sup>-1</sup> )
DL <sub>10</sub>	1,60
DL <sub>25</sub>	3,69
DL <sub>50</sub>	7,17
DL <sub>80</sub>	11,34

## 6.3. Efeito do 2,4-D sobre a morfologia de *A. salina* ao longo do tempo

As concentrações de 3,69 mg L<sup>-1</sup> e 7,17 mg L<sup>-1</sup> para 48 horas (Tabela 3) foram utilizadas para a avaliação do efeito de 2,4-D sobre a morfologia de *A. salina* ao longo do tempo. Para ambas as concentrações, houve um aumento em relação ao controle para as características cor, olho, tubo digestivo e n° total de indivíduos alterados (Tabelas 4 e 5). Especificamente cor e n° total de indivíduos alterados, permaneceram aumentadas

em relação ao controle entre 6 e 36 horas de tratamento. As demais alterações foram pontuais, sendo observadas em tempos específicos.

As alterações morfológicas no grupo controle aumentam gradualmente ao longo do tempo. Desta forma, as diferenças na cor e n° total de indivíduos alterados em relação ao controle, foram mais expressivas nos tempos iniciais de tratamento do que nos tempos finais (Figura 7). Por exemplo, em 6 horas o tratamento com a menor concentração de 2,4-D aumenta a intensidade de cor quatro vezes em relação ao controle. Já com 24 horas, esta diferença cai para cerca de 1,7 vezes em relação ao controle.

**Tabela 4.** Avaliação morfológica em náuplios de *A. salina* tratados com 2,4-D na concentração equivalente à DL25 (3,69 mg L<sup>-1</sup>).

	<b>6h</b>	<b>12h</b>	<b>18h</b>	<b>24h</b>	<b>36h</b>	<b>48h</b>
<b>Cor</b>	X <sup>2</sup> = 97,36	X <sup>2</sup> = 137,77	X <sup>2</sup> = 43,84	X <sup>2</sup> = 8,31	X <sup>2</sup> = 30,2	X <sup>2</sup> = 1,79
	<i>p</i> < 0,001*	<i>p</i> < 0,001*	<i>p</i> < 0,001*	<i>p</i> = 0,02*	<i>p</i> < 0,01*	<i>p</i> = 0,41
<b>Olho</b>	X <sup>2</sup> = 3,86	X <sup>2</sup> = 1,19	X <sup>2</sup> = 1	X <sup>2</sup> = 6,38	X <sup>2</sup> = 4,83	X <sup>2</sup> = 1,74
	<i>p</i> = 0,14	<i>p</i> = 0,55	<i>p</i> = 1	<i>p</i> = 0,04*	<i>p</i> = 0,09	<i>p</i> = 0,42
<b>Tudo digestivo</b>	X <sup>2</sup> = 4,11	X <sup>2</sup> = 11,11	X <sup>2</sup> = 17,02	X <sup>2</sup> = 4,18	X <sup>2</sup> = 0,03	X <sup>2</sup> = 0,11
	<i>p</i> = 0,13	<i>p</i> < 0,01*	<i>p</i> < 0,001*	<i>p</i> = 0,12	<i>p</i> = 0,99	<i>p</i> = 0,94
<b>Abdome</b>	X <sup>2</sup> = 1	X <sup>2</sup> = 0,26	X <sup>2</sup> = 0,21	X <sup>2</sup> = 1,24	X <sup>2</sup> = 1,01	X <sup>2</sup> = 0,18
	<i>p</i> = 1	<i>p</i> = 0,88	<i>p</i> = 0,90	<i>p</i> = 0,54	<i>p</i> = 0,60	<i>p</i> = 0,91
<b>N° total de indivíduos alterados</b>	X <sup>2</sup> = 47,82	X <sup>2</sup> = 75,93	X <sup>2</sup> = 9,70	X <sup>2</sup> = 16,47	X <sup>2</sup> = 3,89	X <sup>2</sup> = 1,58
	<i>p</i> < 0,001*	<i>p</i> < 0,001*	<i>p</i> < 0,01*	<i>p</i> < 0,001*	<i>p</i> = 0,14	<i>p</i> = 0,45

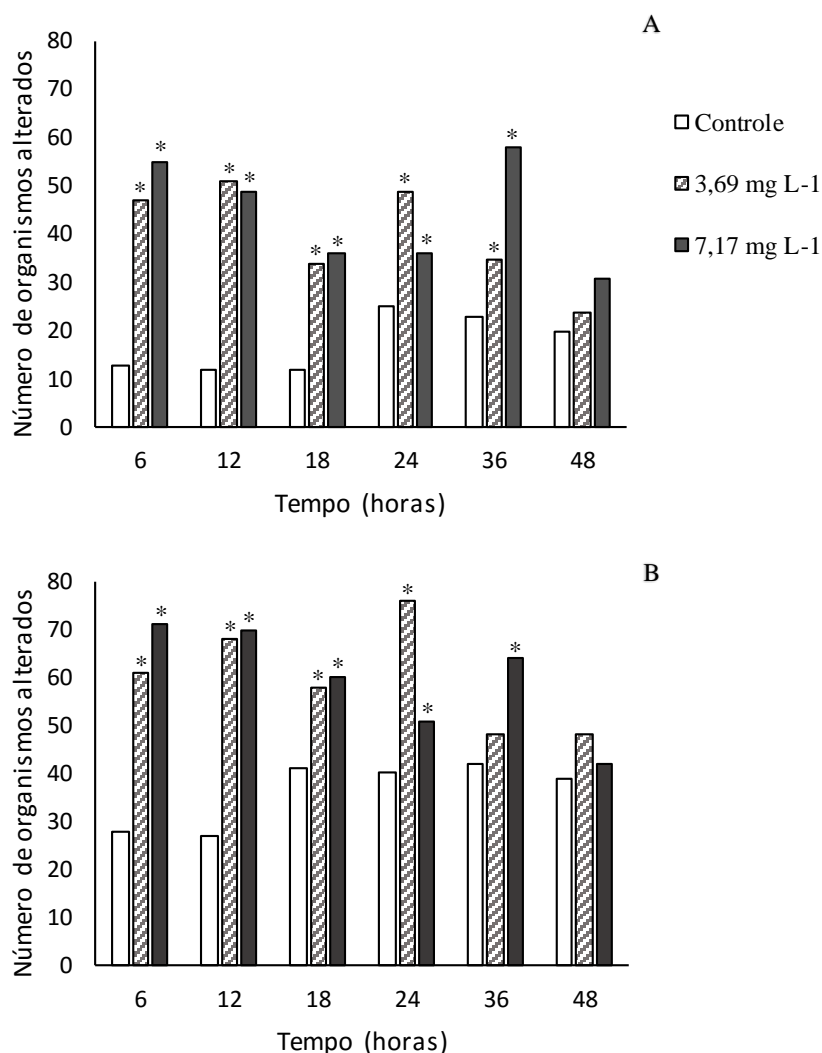
X<sup>2</sup> valor de referência (tabelado) para duas classes = 3,84 (considerando-se o valor de *p* < 0,05). \* indica diferença estatisticamente significativa, onde \**p* < 0,05.

**Tabela 5.** Avaliação morfológica em náuplios de *A. salina* tratados com 2,4-D na concentração equivalente à DL50 (7,17 mg L<sup>-1</sup>).

	<b>6h</b>	<b>12h</b>	<b>18h</b>	<b>24h</b>	<b>36h</b>	<b>48h</b>
<b>Cor</b>	X <sup>2</sup> = 148,57	X <sup>2</sup> = 124	X <sup>2</sup> = 52,17	X <sup>2</sup> = 7,43	X <sup>2</sup> = 17,31	X <sup>2</sup> = 5,26
	p < 0,001*	p < 0,001*	p < 0,001*	p = 0,02*	p < 0,001*	p = 0,07
<b>Olho</b>	X <sup>2</sup> = 3,86	X <sup>2</sup> = 0,13	X <sup>2</sup> = 5,77	X <sup>2</sup> = 5,92	X <sup>2</sup> = 0,15	X <sup>2</sup> = 0,21
	p = 0,14	p = 0,94	p = 0,06	p = 0,01*	p = 0,93	p = 0,90
<b>Tudo digestivo</b>	X <sup>2</sup> = 20,80	X <sup>2</sup> = 91,84	X <sup>2</sup> = 23,17	X <sup>2</sup> = 20,62	X <sup>2</sup> = 3,68	X <sup>2</sup> = 0,13
	p = 0,03*	p < 0,001*	p = 0,09	p < 0,001*	p = 0,16	p = 0,94
<b>Abdome</b>	X <sup>2</sup> = 1,01	X <sup>2</sup> = 2,31	X <sup>2</sup> = 1	X <sup>2</sup> = 1,91	X <sup>2</sup> = 1,01	X <sup>2</sup> = 0,17
	p = 0,60	p = 0,31	p = 1	p = 0,38	p = 0,60	p = 0,92
<b>Nº total de indivíduos alterados</b>	X <sup>2</sup> = 81,19	X <sup>2</sup> = 83,51	X <sup>2</sup> = 12,12	X <sup>2</sup> = 11,37	X <sup>2</sup> = 9,82	X <sup>2</sup> = 0,76
	p < 0,001*	p < 0,001*	p < 0,01*	p < 0,01*	p < 0,01*	p = 0,68

X<sup>2</sup> valor de referência (tabelado) para duas classes = 3,84 (considerando-se o valor de p < 0,05). \* indica diferença estatisticamente significativa, onde \*p < 0,05.

**Figura 7.** Comparação do efeito de 2,4-D sobre a morfologia de *A. salina* ao longo do tempo em diferentes concentrações de tratamento.



(A) Cor (B) N° total de indivíduos alterados. Os dados são apresentados com valores brutos de *A. salina* alteradas. \*indica diferença significativa em relação controle dentro do mesmo tempo de tratamento.

#### 6.4. Efeito da concentração de 2,4-D sobre a morfologia de *A. salina*

Avaliando o efeito de diferentes concentrações do 2,4-D sobre a morfologia de *A. salina*, é possível observar que existe alterações nas características estudadas (Tabela 6) desde a concentração mais baixa, que causa a mortalidade em apenas 10% da população em 48 horas, até a mais alta, que causa a mortalidade em 80% da população em 48 horas.

Para as características cor e olho, as alterações morfológicas foram aumentadas em relação ao controle, já em concentrações mais baixas. Por outro lado, tubo digestivo e abdome, apresentaram aumento de alterações após tratamento nas concentrações mais

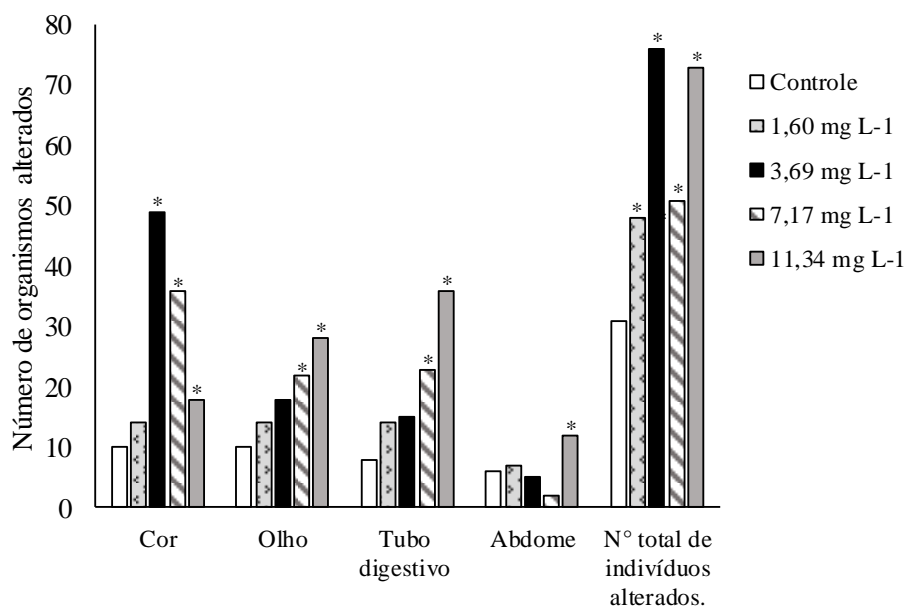
altas de 2,4-D. O nº total de indivíduos alterados, foram maiores nos grupos tratados com 2,4-D em todas as concentrações testadas (Tabela 6, Figura 8).

**Tabela 6.** Avaliação morfológica em náuplios de *A. salina* tratados com 2,4-D, no tempo de 24 horas, variando as concentrações.

	1,60 mg L <sup>-1</sup>	3,69 mg L <sup>-1</sup>	7,17 mg L <sup>-1</sup>	11,34 mg L <sup>-1</sup>
<b>Cor</b>	X <sup>2</sup> = 1,71 <i>p</i> = 0,42	X <sup>2</sup> = 8,31 <i>p</i> = 0,02*	X <sup>2</sup> = 7,43 <i>p</i> = 0,02*	X <sup>2</sup> = 6,86 <i>p</i> = 0,03*
<b>Olho</b>	X <sup>2</sup> = 1,71 <i>p</i> = 0,42	X <sup>2</sup> = 6,38 <i>p</i> = 0,04*	X <sup>2</sup> = 5,92 <i>p</i> = 0,01*	X <sup>2</sup> = 34,71 <i>p</i> < 0,001*
<b>Tudo digestivo</b>	X <sup>2</sup> = 4,75 <i>p</i> = 0,09	X <sup>2</sup> = 4,18 <i>p</i> = 0,12	X <sup>2</sup> = 20,62 <i>p</i> < 0,001*	X <sup>2</sup> = 103,52 <i>p</i> < 0,001*
<b>Abdome</b>	X <sup>2</sup> = 4,34 <i>p</i> = 0,11	X <sup>2</sup> = 1,24 <i>p</i> = 0,54	X <sup>2</sup> = 1,91 <i>p</i> = 0,38	X <sup>2</sup> = 6,25 <i>p</i> = 0,04*
<b>Nº total de indivíduos alterados</b>	X <sup>2</sup> = 11,75 <i>p</i> < 0,01*	X <sup>2</sup> = 16,47 <i>p</i> < 0,001*	X <sup>2</sup> = 11,37 <i>p</i> < 0,01*	X <sup>2</sup> = 71,73 <i>p</i> < 0,001*

X<sup>2</sup> valor de referência (tabelado) para duas classes = 3,84 (considerando-se o valor de *p* < 0,05). \* indica diferença estatisticamente significativa, onde \**p* < 0,05.

**Figura 8.** Comparação do efeito de 2,4-D sobre a morfologia de *A. salina* em diferentes concentrações de tratamento.



\*indica diferença significativa em relação controle dentro do mesmo tempo de tratamento.

### 6.5. Reversão do efeito de 2,4-D sobre a morfologia de *A. salina*

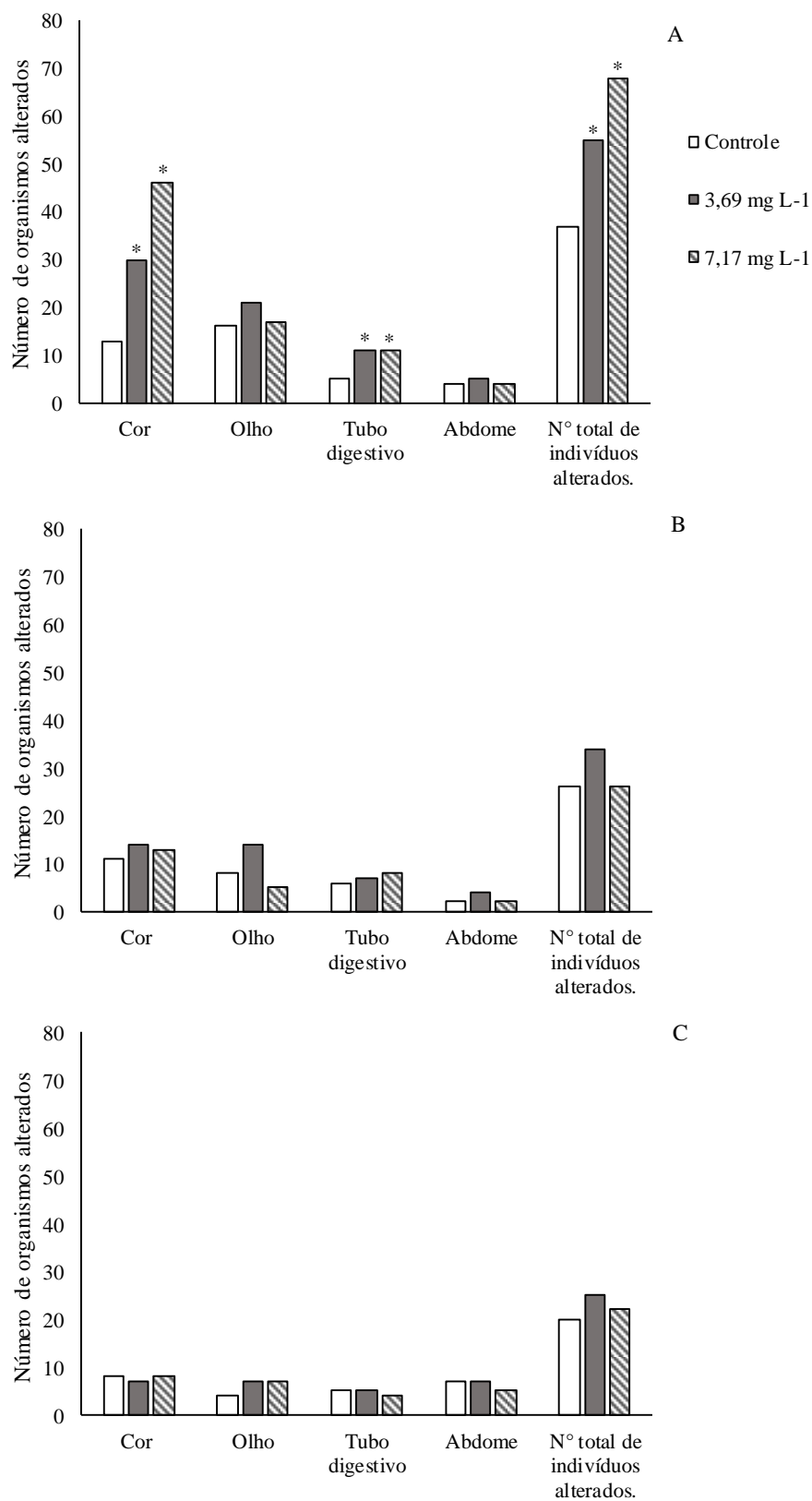
As alterações morfológicas presentes nas primeiras 12 horas de tratamento foram cor, tubo digestivo e nº total de indivíduos alterados, para as duas concentrações testadas (3,69 e 7,17 mg L<sup>-1</sup>) (Figura 9-A).

Com 12 horas de tratamento as concentrações de 3,69 mg L<sup>-1</sup> e 7,17 mg L<sup>-1</sup> apresentaram respectivamente, 20% e 30,7% de organismos alterados em relação à cor. Por outro lado, para o controle, este percentual foi de 8,7%, ou seja, houve uma diferença maior que 3 vezes no tratamento com a maior concentração em relação ao controle. Para a característica nº total de indivíduos alterados o controle teve 24,7% de organismos alterados nas primeiras 12 horas. Já para a concentração de 3,69 mg L<sup>-1</sup> o valor de organismos alterados foi de 36,7% e para 7,17 mg L<sup>-1</sup> este valor aumentou ainda mais foi para 45,3%. Para tubo digestivo o controle teve 3,3% de organismos alterados, enquanto que para as duas concentrações de tratamento foi 7,3%, tendo um aumento de 2 vezes em relação ao controle (Figura 9).

Entretanto, após a retirada do 2,4-D, o número de alterações morfológicas nas populações tratadas com 2,4-D reduziu já nas primeiras 12 horas sem o herbicida (Figura 9-B), voltando para os níveis próximos ao controle. Este padrão de reversão se manteve na avaliação de 24 horas (Figura 9-C).



**Figura 9.** Reversão do efeito de 2,4-D sobre a morfologia de *A. salina* ao longo do tempo nas DL<sub>25</sub> e DL<sub>50</sub>.



**(A)** 12 horas de tratamento com 2,4-D **(B)** 12 horas pós tratamento (reversão) sem 2,4-D **(C)** 24 horas pós tratamento (reversão) sem 2,4-D. \*indica diferença significativa em relação controle dentro do mesmo tempo de tratamento.

Nas 12 horas iniciais do tratamento com o herbicida, a concentração de 7,17 mg L<sup>-1</sup> apresentou cerca de 30,7% dos organismos alterados em relação a cor, nas 12 horas que se sucederam sem a presença do herbicida apenas 8,7% dos organismos estavam alterados, havendo uma diminuição de 3 vezes nos organismos alterados em relação a cor. Essa diminuição também foi observada para o número total de indivíduos alterados, onde na presença do herbicida 45,3% dos organismos apresentaram-se alterados, enquanto que na ausência do herbicida houve uma diminuição apenas 17,3% organismos alterados. Para tubo digestivo também foi observada uma diminuição. Na presença do herbicida cerca de 7,3% dos organismos apresentaram alterações e sem a presença do herbicida este número diminuiu para 5,3% (Tabelas 7 e 8). Para as 24 horas de reversão também foi possível observar uma leve diminuição dos valores para todas as características (Tabela 9).

**Tabela 7.** Valor total e percentual das alterações morfológicas em *A. salina* tratada com o herbicida 2,4-D, com 12 horas de tratamento.

	Controle		3,69 mg L <sup>-1</sup>		7,17 mg L <sup>-1</sup>	
	Nº de organismos	Valor %	Nº de organismos	Valor %	Nº de organismos	Valor %
<b>Cor</b>	13	8,7	30	20,0	46	30,7
<b>Tubo digestivo</b>	5	3,3	11	7,3	11	7,3
<b>Nº T. I. A.*</b>	37	24,7	55	36,7	68	45,3

\*Número total de indivíduos alterados.

**Tabela 8.** Valor total e percentual das alterações morfológicas em *A. salina* após a retirada do contato com o herbicida 2,4-D, (12 horas água salinizada).

	Controle		3,69 mg L <sup>-1</sup>		7,17 mg L <sup>-1</sup>	
	Nº de organismos	Valor %	Nº de organismos	Valor %	Nº de organismos	Valor %
<b>Cor</b>	11	7,3	14	9,3	13	8,7
<b>Tubo digestivo</b>	6	4,0	7	4,7	8	5,3
<b>Nº T. I. A.*</b>	26	17,3	34	22,7	26	17,3

\*Número total de indivíduos alterados.

**Tabela 9.** Valor total e percentual das alterações morfológicas em *A. salina* após a retirada do contato com o herbicida 2,4-D, (24 horas água salinizada).

	Controle		3,69 mg L <sup>-1</sup>		7,17 mg L <sup>-1</sup>	
	Nº de organismos	Valor %	Nº de organismos	Valor %	Nº de organismos	Valor %
<b>Cor</b>	8	5,3	7	4,7	8	5,3
<b>Tubo digestivo</b>	5	3,3	5	3,3	4	4,7
<b>Nº T. I. A.*</b>	20	13,3	25	16,7	22	14,7

\*Número total de indivíduos alterados.

## 7. DISCUSSÃO

Os náuplios de *A. salina* passam por vários estágios (troca de exoesqueleto) durante o seu desenvolvimento, até atingir a fase adulta, onde estão aptos a se reproduzir (VAN STAPPEN, 1996). Segundo Rocha et al. (2001), a temperatura pode influenciar nos ciclos biológicos dos organismos de maneiras distintas, podendo tanto acelerar quanto diminuir a velocidade de desenvolvimento, afetando assim a sobrevivência dos indivíduos. Neste estudo, foi observado que a temperatura influencia na eficiência de eclosão, viabilidade e homogeneidade das populações (ou seja, número de indivíduos que se encontram no mesmo estágio do desenvolvimento), sendo que temperaturas mais próximas a 24° C são mais adequadas ao cultivo de *A. salina* do que temperaturas inferiores.

Náuplios de *A. salina* vêm sendo muito utilizado na avaliação da toxicidade de diferentes compostos sintéticos e/ou naturais, como por exemplo, extrato de plantas (*Aloe vera* (L.) Burm. F. (Aloeaceae), *Citrus aurantium* L. (Rutaceae); *Cymbopogon citratus* (DC. Ex Nees) Stapf (Poaceae), *Datura stramonium* L. (Solanaceae), etc), inseticidas (Carbaril, Diazinon, Imidacloprido, Clorpirifós, Aldicarbe, Tebufenozida, Dimetoato, etc.), biocidas (Diuron) e herbicidas (Roundup Original, Glifosato AKB 480, etc). Os efeitos tóxicos causados por estas substâncias em *A. salina* são mais comumente avaliados através da eclosão e sobrevivência (dose letal = DL50), embora alguns poucos trabalhos também avaliem a morfologia e o estresse oxidativo (GAMBARDELLA et al., 2018; RODRIGUES et al., 2017; SHAALA et al., 2015; PARRA et al., 2001; SONG et al., 1997).

Especificamente em relação à avaliação de agrotóxicos, já foi observado que alguns deles, como por exemplo, Imidacloprido, Tebufenozida, Diuron, podem ter efeitos negativos sobre a sobrevivência e os níveis de estresse oxidativo em *A. salina*, bem como, alterar a morfologia da espécie, como é o caso do Diazinon (GAMBARDELLA et al., 2018; SHAALA et al., 2015; BUSTOS-OBREGON e VARGAS, 2010).

Neste estudo, foi demonstrado que o herbicida 2,4-D possui efeitos tóxicos sobre os náuplios de *A. salina*, afetando não somente a mortalidade dos indivíduos ( $DL_{50} = 7,17 \text{ mg L}^{-1}$ ), como também, causando alterações em sua morfologia.

Estudos toxicológicos mostram alguns efeitos adversos do herbicida 2,4-D sobre organismos não-alvos, como bactérias, invertebrados (insetos e minhocas) e vertebrados (roedores, anfíbios e peixes). Em bactérias, o 2,4-D afeta a perda da integridade das estruturas celulares e induz o estresse oxidativo (BHAT et al., 2015). Em invertebrados, afeta o desenvolvimento, a sobrevivência e causa estresse oxidativo (FREYDIER e LUNDGREN, 2016; HATTAB et al., 2015). Já em vertebrados, os seus efeitos são ainda mais amplos, podendo causar peroxidação lipídica, estresse oxidativo, danos no DNA, neurotoxicidade e genotoxicidade (LAJMANOVICH et al., 2015; MENEZES et al., 2015; BONGIOVANNI et al., 2011; PRETTO et al., 2011; FONSECA et al., 2008).

O herbicida 2,4-D pode ser aplicado em sistemas convencionais e aquáticos, com a finalidade de controlar plantas daninhas. Porém, acaba atingindo organismos não-alvo, causando assim efeitos tóxicos adversos que irão ter sua intensidade determinada por fatores como concentração, frequência de exposição e aspectos biológicos individuais. A soma destes fatores irá influenciar a suscetibilidade e a sensibilidade de cada espécie (ISLAM et al., 2018).

Os resultados do presente estudo confirmam que os efeitos toxicológicos do herbicida 2,4-D estão relacionados a concentração e tempo de exposição, uma vez que a resposta de *A. salina* em termos de sobrevivência e morfologia, variou em função do tempo e dose de tratamento.

Em relação ao tempo de exposição ao herbicida 2,4-D, as duas características mais alteradas foram cor e nº total de indivíduos alterados. O número de alterações foi maior nas primeiras horas de exposição ao herbicida 2,4-D do que nos tempos finais e em relação ao controle estas alterações também foram maiores nos tempos iniciais. Com o passar do tempo a população dos náuplios sofre com a falta de nutrientes (fome) e

com pressões do ambiente artificial. Com a falta de comida os organismos ficam sem energia para efetivar os programas genéticos de desenvolvimento (MOHAMMED, 2013).

Quanto ao efeito de diferentes concentrações de 2,4-D sobre a morfologia de *A. salina*, foi verificado que existem alterações morfológicas, desde a concentração mais baixa ( $1,60 \text{ mg L}^{-1}$ ) até a mais alta ( $11,34 \text{ mg L}^{-1}$ ). À medida em que aumentam as concentrações de 2,4-D, ocorre aumento nos tipos de alterações morfológicas, como por exemplo, a concentração mais baixa possui apenas uma característica alterada enquanto na concentração mais alta todas as características avaliadas encontram-se alteradas. Estes dados estão de acordo como o estudo realizado por Shaala et al. (2015), no qual foi observado que o aumento das concentrações do Diuron, tem relação com aumento da mortalidade e influencia no desenvolvimento morfológico dos náuplios de *A. salina*.

De forma geral, os estudos de toxicologia se apoiam fortemente na determinação da DL50 (concentração de dada substância que causa morte de 50% de uma população) como indicativo de toxicidade. Neste trabalho foi demonstrado que mesmo em doses que afetem pouco a sobrevivência (DL10 e DL25) já existem alterações morfológicas. Isso indica que avaliações de sobrevivência devem ser complementadas com outros parâmetros como, avaliação no desenvolvimento, morfologia, estresse oxidativo, danos no DNA, entre outras, que possam indicar o estado de saúde de uma população.

Em estudo realizado por Bustos-Obregon e Vargas (2010) foi avaliado o efeito de um organofosforado (Diazinon) na morfologia de *A. salina* e dentre os parâmetros morfológicos avaliados, há um deles que se assemelha a este estudo que é a coloração mais escura dos náuplios, considerada uma alteração morfológica resultante do tratamento com este agrotóxico.

Não foram encontrados na literatura trabalhos sobre os efeitos do 2,4-D na morfologia de *A. salina* e nem se existe uma possível reversão para estas alterações na morfologia. Neste trabalho, com 12 horas de tratamento nas concentrações de  $3,69 \text{ mg L}^{-1}$  e  $7,17 \text{ mg L}^{-1}$  houve alterações nas características cor, tubo digestivo e n° total de indivíduos alterados. Após 12 e 24 horas em que as populações foram retiradas do contato com o 2,4-D, ocorreu a reversão de todas as alterações.

Quando a população se encontra em um ambiente com mudanças rápidas, existem dois processos que irão facilitar a sobrevivência destes indivíduos: a plasticidade fenotípica adaptativa e adaptação genética. A plasticidade fenotípica

adaptativa acontece quando os indivíduos de uma população são capazes de mudar as suas características físicas, químicas, fisiológicas e/ou morfológicas, em resposta as mudanças que ocorrem no ambiente, afim de melhorar a sua adaptação a estas condições, caso esta adaptação não seja suficiente, então, pode ocorrer a adaptação genética a qual é resultante de mutações (PRICE et al., 2003).

A capacidade de reverter as alterações induzidas por 2,4-D pode indicar prevalência de adaptação fenotípica (plasticidade) nas populações de *A. salina* mais do que efeito cumulativo de mutações. O curto período de exposição (12 horas) pode explicar porque não foi observado maior acúmulo de mutações negativas, uma vez que em tempos maiores é provável que isto ocorra, haja visto que após 48 horas de exposição nas mesmas concentrações ocorreu significativa mortalidade dos organismos (mostrando que neste caso não há atuação dos mesmos padrões de reversão antes observados).

Considerando que a reversão das alterações morfológicas ocorreu após a retirada com o contato do herbicida, é possível inferir que a população conseguiu se adaptar as condições que lhe foram impostas, através da mudança nos fenótipos (plasticidade fenotípica adaptativa). Estudos adicionais podem ser realizados para verificar o acúmulo de mutações ao longo do tempo e das concentrações e seu efeito sobre a capacidade de reversão de alterações morfológicas.

De forma geral, os resultados deste estudo mostraram que o herbicida 2,4-D causa alterações na morfologia dos náuplios de *A. salina*. Sendo que a população foi mais sensível nos tempos iniciais de exposição ao herbicida. Além disso, mesmo em baixas concentrações foi possível observar alterações na morfologia de *A. salina* e estas aumentam gradativamente conforme ocorre o aumento das concentrações.

## **8. CONCLUSÕES GERAIS**

De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir que:

- Do ponto de vista de efeito na “população”, as alterações na morfologia foram mais expressivas nos tempos iniciais de exposição do que nos tempos finais. Este fato pode ser observado pela diferença mais expressivas entre os grupos controle e tratados nas primeiras horas de avaliação do que nos tempos finais.

- O 2,4-D altera a morfologia dos náuplios de *A. salina* já em concentrações baixas que causam a mortalidade de apenas 10% da população em 48 horas, vinculando a importância da avaliação morfológica (inclusão destes parâmetros) nos estudos toxicológicos.
- Os efeitos do 2,4 D sobre a morfologia podem ser revertidos se a população for retirada do contato como herbicida. E isto indica que restaurando as condições naturais de um local afetado por agrotóxicos é possível que haja recuperação do local e dos organismos que ali habitam.

## 9. PERSPECTIVAS

- Com base nos resultados obtidos na reversão das alterações morfológicas em *A. salina*, é possível que futuramente se façam análises nas taxas de mutação ou estudos correlacionados entre avaliações morfológicas e bioquímicas, afim de saber quais são os processos envolvidos nesta reversão;
- Realizar testes em outros organismos de água doce, para verificar se o fenômeno de reversão é comum a outros organismos e em situações naturais.

## 10. REFERÊNCIAS

AGROFIT. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 2017. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em 18 abr., 2018.

ALVES, M.G.; NEUHAUS-OLIVEIRA, A.; MOREIRA, P.I.; SOCORRO, S.; OLIVEIRA, P.F. Exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid alters glucose metabolism in immature rat Sertoli cells. **Reproductive Toxicology**, v. 38, p. 81-88, 2013.

BHAT, S.V.; BOOTH, S.C.; VANTOMME, E.A.; AFROJ, S.; YOST, C.K.; DAHMS, T.E. Oxidative stress and metabolic perturbations in *Escherichia coli* exposed to sublethal levels of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Chemosphere**. v. 135, p. 453–461, 2015.

BOHNER, T.O.L.; ARAÚJO, L.E.B.; NISHIJIMA, T. O impacto ambiental do uso de agrotóxicos no meio ambiente e na saúde dos trabalhadores rurais. **Revista Eletrônica do Curso de Direito da UFSM**, v. 8, p. 329-341, 2013.

BONGIOVANNI, B.; FERRI, A.; BRUSCO, A.; RASSETTO, M.; LOPEZ, L.; DE DUFFARD, A.E.; DUFFARD, R. Adverse effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on rat cerebellar granule cell cultures were attenuated by amphetamine. **Neurotoxicity Research**. v. 19, n. 4, p. 544–555, 2011.

BRAIBANTE, M.E.F.; ZAPPE, J.A. A química dos agrotóxicos. *Química e Sociedade: Química Nova na Escola*, v. 34, n. 1, p. 10-15, 2012.

BRASIL. Decreto nº 4074 de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989. **Brasília: Ministério da Saúde**, 1989.

BUSTOS-OBREGON, E.; VARGAS, A. Chronic toxicity bioassay with populations of the crustacean *Artemia salina* exposed to the organophosphate diazinon. **Biological Research**, v. 43, p. 357-362, 2010.

CHARLES, J.M.; HANLEY JR, T.R.; WILSON, R.D.; VAN RAVENZWAAY, B.; BUS, J.S. Developmental toxicity studies in rats and rabbits on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its forms. **Toxicological Sciences**, v. 60, p. 121-131, 2001.

DONG, P.; LIU, Z. Shaping development by stochasticity and dynamics in gene regulation. **Open Biology**, v. 7, n. 5, p. 170030, 2017.

DUMITRASCU M. *Artemia salina*. **Balneo-Research Journal**, V.2. 2011.

FAUNES, F.; LARRAÍN, J. Conservation in the involvement of heterochronic genes and hormones during developmental transitions. **Developmental Biology**, v. 416, p. 3-17, 2016.

FONSECA, M.B.; GLUSCZAK, L.; MORAES, B.S.; MENEZES, C.C.; PRETTO, A.; TIerno, M.A.; ZANELLA, R.; GONÇALVES, F.F.; LORO, V.L. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 69, n. 3, p. 416–420, 2008.

FOO, K.Y.; HAMEED, B.H. Detoxification of pesticide waste via activated carbon adsorption process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 1-11, 2010.

FOX, R. *Artemia franciscana*. **Invertebrate Anatomy OnLine**, 2006.

FREYDIER, L.; LUNDGREN, J.G. Unintended effects of the herbicides 2,4-D and dicamba on lady beetles. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 6, p. 1270–1277, 2016.

FRIEDRICH, K. Desafios para a avaliação toxicológica de agrotóxicos no Brasil: desregulação endócrina e imunotoxicidade. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 1, n. 2, p. 2-15, 2013.

GAMBARDELLA, C.; NICHINO, D.; IACOMETTI, C.; FERRANDO, S.; FALUGI, C.; FAIMALI, M. Long term exposure to low dose neurotoxic pesticides affects hatching, viability and cholinesterase activity of *Artemia* sp. **Aquatic Toxicology**, v. 196, p. 79-89, 2018.

GRISOLIA, C.K. **Agrotóxicos mutações, câncer & reprodução**. Brasília: Universidade de Brasília, 2005.



HARRAHY, E.A.; EDWARDS, D.S.; HEDMAN, C.J. Persistence of 2,4-D and its effects on benthic macroinvertebrates following spring treatment of eurasian watermilfoil, *Myriophyllum spicatum* L. in two lakes in Southeastern Wisconsin, USA. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 92, n. 4, p. 404-409, 2014.

HATTAB, S.; BOUGHATTAS, I.; BOUSSETTA, H.; VIARENGO, A.; BANNI, M.; SFORZINI, S. Transcriptional expression levels and biochemical markers of oxidative stress in the earthworm *Eisenia andrei* after exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 76–82, 2015.

INOUYE, L.A.; FERNANDEZ, L.M.; CARNEIRO, L.F.S.; GERMANO, J.J.; CRISCI, A.R. Avaliação morfológica do fígado e do pulmão pós intoxicação por organofosforado, em ratos Wistar. **Uniciências**, v. 18, n. 2, p. 103-109, 2014.

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.

JOHNSON, P.T.J.; LUNDE, K.B.; RITCHIE, E.G.; REASER, J.K.; LAUNER, A.E. Morphological abnormalities patterns in a California amphibians community. **Herpetologica**, v. 57, p. 336–352, 2001.

LAJMANOVICH, R.C.; ATTADEMO, A.M.; SIMONIELLO, M.F.; POLETTA, G.L.; JUNGES, C.M.; PELTZER, P.M.; GRENON, P.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M.C. Harmful effects of the dermal intake of commercial formulations containing chlorpyrifos, 2,4-D, and glyphosate on the common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 12, p. 427, 2015.

LATTA, L.C.; BAKELAR, J.W.; KNAPP, R.A.; PFRENDER, M.E. Rapid evolution in response to introduced predators II: the contribution of adaptive plasticity. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, p. 21, 2007.

MARCATO, A.C.C.; DE SOUZA, C.P.; FONTANETTI, C.S. Herbicide 2,4-D: A review of toxicity on non-target organisms. **Water Air Soil Pollut**, v. 228, n. 120, 2017.

MARTÍNEZ, I.M.; LUMARET, J.P.; CRUZ, M.R. Suspected side effects of a herbicide on dung beetle populations (Coleoptera: Scarabaeidae). **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie**, v. 324, n. 11, p. 989-994, 2001.

MENEZES, C.; RUIZ-JARABO, I.; MARTOS-SITCHA, J.A.; TONI, C.; SALBEGO, J.; BECKER, A.; BALDISSEROTTO, B. The influence of stocking density and food deprivation in silver catfish (*Rhamdia quelen*): a metabolic and endocrine approach. **Aquaculture**, v. 435, p. 257–264, 2015.

MOHAMMED, A. Why are early life stages of aquatic organisms more sensitive to toxicants than adults. In: **New insights into toxicity and drug testing**. InTech, 2013.

MOORE, M.N.; DEPLEDGE, M.H.; READMANA, J.W.; LEONARDC, D.R.P. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management, **Mutation Research**, v. 552, p. 247-268, 2004.

NUNES, B.S.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**, v. 144, p. 453-462, 2006.

PARK, K.; PARK, J.; KIM, J.; KWAK, I.S. Biological and molecular responses of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) to herbicide 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 151, p. 439-446, 2010.

PARRA, A.L.; YHEBRA, R.S.; SARDIÑA, I.G.; BUELA, L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

PERES, F.; MOREIRA, J.C. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.

PINGALI, P.L. Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 31, p. 12302-12308, 2012.

PINGATI, W.A.; LIMA, F.A.N.S.; LARA, S.S.; CORREA, M.L.M.; BARBOSA, J.R.; LEÃO, L.H.C.; PIGNATTI, M.G. Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for Health Surveillance. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3281-3293, 2017.

PRETTO, A.; LORO, V.L.; MENEZES, C.; MORAES, B.S.; REIMCHE, G.; ZANELLA, R.; AVILA, L.A. Commercial formulation containing quinclorac and metsulfuron-methyl herbicides inhibit acetylcholinesterase and induce biochemical alterations in tissues of *Leporinus obtusidens*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 3, p. 336-341, 2011.

PRICE, T.D.; QVARNSTRÖM, A.; IRWIN, D.E. The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1523, p. 1433-1440, 2003.

RAO, J.V.; KAVITHA, P.; JAKKA, N.M.; SRIDHAR, V.; USMAN, P.K. Toxicity of organophosphates on morphology and locomotor behavior in brine shrimp, *Artemia salina*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, p. 227-232, 2007.

RIBAS, P.P.; MATSUMURA, A.T.S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 149-158, 2009.

RIBEIRO, D.S.; PEREIRA, T.S. O agrotóxico nosso de cada dia. **Vittale – Revista de Ciências da Saúde**, v. 28, p. 14-26, 2016.

RIGOTTO, R.M.; VASCONCELOS, D.P.; ROCHA, M.M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública, Pesticide use in Brazil and problems for public health, Uso de pesticidas en Brasil y los problemas para salud pública. **Caderno de Saúde Pública**, v. 30, n. 7, p. 1-3, 2014.

ROCHA, D.S.; JURBERG, J.; CARCAVALLO, R.U.; PRESGRAVE, O.A.F.; CUNHA, V.; GALVÃO, C. Influência da temperatura e umidade no desenvolvimento ninfal de *Rhodnius robustus*. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 4, p. 400-406, 2001.

RODRIGUES, L.B.; OLIVEIRA, R.; ABE, F.R.; BRITO, L.B.; MOURA, D.S.; VALADARES, M.C.; GRISOLIA, C.K.; OLIVEIRA, D.P.; OLIVEIRA, G.A.R. Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides: Effects on different organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 7, p. 1755-1763, 2017.

SATHE, E.A.; HUSAK, J.F. Sprint sensitivity and locomotor trade-offs in green anole (*Anolis carolinensis*) lizards. **The Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 14, p. 2174-2179, 2015.

SCHAACK, S.; ALLEN, D.E.; LATTA, L.C.; MORGAN, K.K.; LYNCH, M. The effect of spontaneous mutations on competitive ability. **Journal of evolutionary biology**, v. 26, n. 2, p. 451-456, 2013.

SHAALA, N.M.A.; ZULKIFLI, S.Z.; ISMAIL, A.; AZMAI, M.N.A.; MOHAMAT-YUSUFF, F. Lethal concentration 50 (LC<sub>50</sub>) and effects of Diuron on morphology of brine shrimp *Artemia salina* (Branchiopoda: Anostraca) Nauplii. **Procedia Environmental Sciences**, v. 30, p. 279-284, 2015.

SOARES, D.F.; FARIA, A.M.; ROSA, A.H. Análise de risco de contaminação de águas subterrâneas por resíduos de agrotóxicos no município de Campo Novo do Parecis (MT), Brasil. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 22, n. 2, p. 277-284, 2017.

SONG, M.Y.; STARK, J.D.; BROWN, J.J. Comparative toxicity of four insecticides, including imidacloprid and tebufenozide, to four aquatic arthropods. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 12, p. 2494-2500, 1997.

SOTO-ROJAS, C.; SUAZO-ORTUÑO, I.; LAOS, J.A.M.; ALVARADO-DÍAZ, J. Habitat quality affects the incidence of morphological abnormalities in the endangered salamander *Ambystoma ordinarium*. **PloS One**, v. 12, n. 8, 2017.

SPADOTTO, C.A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. In: **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em Anais de Congresso (ALICE)**. In: JORNADA JURÍDICA DA FACULDADE MARECHAL RONDON, 4. **Revista do Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar**, São Manuel, SP. p. 1-9, 2006

STELLMAN, J.M.; STELLMAN, S.D.; CHRISTIAN, R.; WEBER, T.; TOMASALLO, C. The extent and patterns of usage of Agent Orange and other herbicides in Vietnam. **Nature**, v. 422, n. 6933, p. 681, 2003.

TRIPATHY, N.K.; ROUTRAY, P.K.; SAHU, G.P.; KUMAR, A.A. Genotoxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid tested in somatic and germ-line cells of *Drosophila*. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 319, n. 3, p. 237-242, 1993.

VAN STAPPEN, G. Introduction, biology and ecology of *Artemia*. In: LAVENS, P.; SORGELOOS, P. (Eds). Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. **FAO Fisheries Technical Paper**, p. 295, 1996.

VEIGA, L. F.; VITAL, N. Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp. In: I.A. Nascimento, E.C.P.M., Sousa e M. Nipper (ed.), **Métodos em ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil**. Artes Gráficas e Indústria, São Paulo, p. 111-122, 2002.

VEIGA, M.M.; SILVA, D.M.; VEIGA, L.B.E.; FARIA, M.V.C. 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.

VIGÁRIO, A.F.; SABÓIA-MORAIS, S.M.T. Effects of the 2,4-D herbicide on gills epithelia and liver of the fish *Poecilia vivipara*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 6, p. 523-528, 2014.

ZHANG, D.; WU, Y.; YUAN, Y.; LIU, W.; KUANG, H.; YANG, J.; YANG, B.; WU, L.; ZOU, W.; XU, C. Exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces oxidative stress and apoptosis in mouse testis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 141, p. 18-22, 2017.

## 10. ANEXO 1: Dados brutos relativos à avaliação de morfologia em *A. salina* exposta ao tratamento com 2,4-D

### Efeito do 2,4-D sobre a morfologia de *A. salina* ao longo do tempo

**Tabela 1.** Número de indivíduos que apresentam ou não alterações morfológicas em 6 horas de cultivo, nas concentrações de 3,69 e 7,17 mg L<sup>-1</sup>.

	Controle		3,69 mg L <sup>-1</sup>		7,17 mg L <sup>-1</sup>	
	Normal	Alterado	Normal	Alterado	Normal	Alterado
Cor	137	13	103	47	95	55
Olho	136	14	143	7	143	7
Tubo digestivo	146	4	142	8	137	13
Abdome	149	1	149	1	150	0
N° T. I. A.*	122	28	89	61	79	71

\*Número total de indivíduos alterados.

**Tabela 2.** Número de indivíduos que apresentam ou não alterações morfológicas em 12 horas de cultivo, nas concentrações de 3,69 e 7,17 mg L<sup>-1</sup>.

	Controle		3,69 mg L <sup>-1</sup>		7,17 mg L <sup>-1</sup>	
	Normal	Alterado	Normal	Alterado	Normal	Alterado
Cor	138	12	99	51	101	49
Olho	142	8	139	11	143	7
Tubo digestivo	144	6	136	14	121	29
Abdome	146	4	145	5	143	7
N° T. I. A.*	123	27	82	68	80	70

\*Número total de indivíduos alterados.

**Tabela 3.** Número de indivíduos que apresentam ou não alterações morfológicas em 18 horas de cultivo, nas concentrações de 3,69 e 7,17 mg L<sup>-1</sup>.

	Controle		3,69 mg L <sup>-1</sup>		7,17 mg L <sup>-1</sup>	
	Normal	Alterado	Normal	Alterado	Normal	Alterado
Cor	138	12	116	34	114	36
Olho	130	20	141	9	140	10
Tubo digestivo	141	9	129	21	127	23
Abdome	145	5	144	6	145	5
N° T. I. A.*	109	41	92	58	90	60

\*Número total de indivíduos alterados.

**Tabela 4.** Número de indivíduos que apresentam ou não alterações morfológicas em 24 horas de cultivo, nas concentrações de 3,69 e 7,17 mg L<sup>-1</sup>.

	<b>Controle</b>		<b>3,69 mg L<sup>-1</sup></b>		<b>7,17 mg L<sup>-1</sup></b>	
	Normal	Alterado	Normal	Alterado	Normal	Alterado
Cor	122	28	101	49	115	35
Olho	142	8	135	15	138	12
Tubo digestivo	141	9	135	15	141	9
Abdome	142	8	145	5	148	2
N° T. I. A.*	126	24	118	32	100	50

\*Número total de indivíduos alterados.

**Tabela 5.** Número de indivíduos que apresentam ou não alterações morfológicas em 36 horas de cultivo, nas concentrações de 3,69 e 7,17 mg L<sup>-1</sup>.

	<b>Controle</b>		<b>3,69 mg L<sup>-1</sup></b>		<b>7,17 mg L<sup>-1</sup></b>	
	Normal	Alterado	Normal	Alterado	Normal	Alterado
Cor	125	25	115	35	93	57
Olho	140	10	144	6	143	7
Tubo digestivo	144	6	143	7	139	11
Abdome	144	6	144	6	144	6
N° T. I. A.*	113	37	134	16	87	63

\*Número total de indivíduos alterados.

**Tabela 6.** Número de indivíduos que apresentam ou não alterações morfológicas em 48 horas de cultivo, nas concentrações de 3,69 e 7,17 mg L<sup>-1</sup>.

	<b>Controle</b>		<b>3,69 mg L<sup>-1</sup></b>		<b>7,17 mg L<sup>-1</sup></b>	
	Normal	Alterado	Normal	Alterado	Normal	Alterado
Cor	130	20	126	24	119	31
Olho	144	6	141	9	144	6
Tubo digestivo	141	9	139	11	141	9
Abdome	139	11	134	16	142	8
N° T. I. A.*	116	34	119	31	109	41

\*Número total de indivíduos alterados.

### Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D sobre a morfologia de *A. salina*

**Tabela 7.** Número de indivíduos que apresentam ou não alterações morfológicas em 24 horas de cultivo, em diferentes concentrações.

	Controle		1,60 mg L <sup>-1</sup>		3,69 mg L <sup>-1</sup>		7,17 mg L <sup>-1</sup>		11,34 mg L <sup>-1</sup>	
	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A
Cor	140	10	136	14	101	49	115	35	132	18
Olho	140	10	136	14	135	15	138	12	122	28
Tubo digestivo	142	8	136	14	135	15	141	9	114	36
Abdome	144	6	139	11	145	5	148	2	138	12
N° T. I. A.*	119	31	102	48	118	32	100	50	77	73

\*Número total de indivíduos alterados. N: Organismos normais. A: Organismos alterados

### Reversão do efeito de 2,4-D sobre a morfologia de *A. salina*

**Tabela 8.** Número de indivíduos que apresentam ou não alterações morfológicas em 12 horas de tratamento com o 2,4-D, nas concentrações de 3,69 e 7,17 mg L<sup>-1</sup>.

	Controle		3,69 mg L <sup>-1</sup>		7,17 mg L <sup>-1</sup>	
	Normal	Alterado	Normal	Alterado	Normal	Alterado
Cor	137	13	120	30	104	46
Olho	134	16	129	21	133	17
Tubo digestivo	145	5	139	11	139	11
Abdome	146	4	145	5	146	4
N° T. I. A.*	113	37	95	55	82	68

\*Número total de indivíduos alterados.

**Tabela 9.** Número de indivíduos que apresentam ou não alterações morfológicas em 12 horas após a retirada do tratamento.

	Controle		3,69 mg L <sup>-1</sup>		7,17 mg L <sup>-1</sup>	
	Normal	Alterado	Normal	Alterado	Normal	Alterado
Cor	139	11	136	14	137	13
Olho	142	8	136	14	145	5
Tubo digestivo	144	6	143	7	142	8
Abdome	148	2	146	4	148	2
N° T. I. A.*	124	26	116	34	124	26

\*Número total de indivíduos alterados.

**Tabela 10.** Número de indivíduos que apresentam ou não alterações morfológicas em 24 horas após a retirada do tratamento.

	<b>Controle</b>		<b>3,69 mg L<sup>-1</sup></b>		<b>7,17 mg L<sup>-1</sup></b>	
	Normal	Alterado	Normal	Alterado	Normal	Alterado
Cor	142	8	143	7	142	8
Olho	146	4	143	7	143	7
Tubo digestivo	145	5	145	5	146	4
Abdome	143	7	143	7	145	5
N° T. I. A.*	130	20	125	25	128	22

\*Número total de indivíduos alterados.