

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI
E DAS MISSÕES
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, EXTENSÃO E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA**

ALEX PINHEIRO VIZZOTTO

**Estudo da correlação entre estresse oxidativo e alterações
morfológicas induzidas por 2,4-D em *Artemia salina* (Leach, 1819)**

ERECHIM, SETEMBRO DE 2021.

ALEX PINHEIRO VIZZOTTO

Estudo da correlação entre estresse oxidativo e alterações morfológicas induzidas por 2,4-D em *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.
Linha de Pesquisa: Ecologia e Conservação da Biodiversidade
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Albanin Aparecida Mielniczki Pereira**

ERECHIM, SETEMBRO DE 2021.

V864e Vizzotto, Alex Pinheiro

Estudo da correlação entre estresse oxidativo e alterações morfológicas induzidas por 2,4-D em *Artemia salina* (Leach, 1819). – 2021.
48 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2021.

“Orientação: Prof^a. Dr^a Albanin Aparecida Mielniczki Pereira.”

1. Biomarcadores – estresse oxidativo 2. Diclorofenoxiacético 3. Organismos aquáticos I. Título

C.D.U.: 574.5

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

ALEX PINHEIRO VIZZOTTO

Estudo da correlação entre estresse oxidativo e alterações morfológicas induzidas por 2,4-D em *Artemia salina* (Leach, 1819)

BANCA EXAMINADORA

ALBANIN APARECIDA MIELNICZKI PEREIRA

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

ANNA MARIA SIEBEL

Universidade Comunitária da Região de Chapecó – Unochapecó

ROGÉRIO LUIS CANSIAN

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

ERECHIM, SETEMBRO DE 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Dr^a Albanin Aparecida Mielniczki Pereira, pela construção desse trabalho, aos colegas de laboratório, Monik Compagnoni Martins, Bruna Maria Saorin Puton, Mônica Demarco e aos meus colegas, amigos e professores do PPG Ecologia. Agradeço a Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI) Erechim, pela estrutura e desenvolvimento do trabalho e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES, pela disponibilidade e fomento da bolsa de mestrado.

Estudo da correlação entre estresse oxidativo e alterações morfológicas induzidas por 2,4-D em *Artemia salina* (Leach, 1819)

Discente: Alex Pinheiro Vizzotto

Orientadora: Dr^a Albanin Aparecida Mielniczki Pereira

Resumo - O ácido 2,4 diclorofenoxiacético é um dos herbicidas mais utilizados do mundo, possui ação sistêmica tornando-se eficaz para controle de plantas daninhas. Sua faixa de classificação é I oferecendo riscos extremos ao meio ambiente podendo ser extremamente prejudicial a fauna aquática. Por essa razão buscou-se compreender os efeitos do herbicida 2,4-D em *Artemia salina*, um microcrustáceo, eficiente para avaliação de substâncias tóxicas. O presente estudo investigou se existe correlação entre alterações nos biomarcadores de estresse oxidativo e alterações morfológicas em *A. salina*. Além disso a pesquisa avaliou se os biomarcadores de estresses oxidativo e as alterações morfológicas podem retornar aos padrões normais após retirada do contato com 2,4-D. Com base na nossa pesquisa observamos uma relação linear entre a concentração do herbicida e a morfologia de *A. salina*. Em relação aos biomarcadores de estresse oxidativo, o tratamento com 2,4-D não alterou significativamente os níveis de TBARS, porem para a atividade da catalase foi observada uma redução de atividade nos tratamentos de 2, 6 e 12 horas de tratamento. Nos mesmos tempos de tratamentos foi observada uma correlação negativa entre a morfologia e a atividade da catalase. Após a retirada do contato com 2,4-D período de recuperação, os organismos reduziram as alterações morfológicas além disso a Atividade da catalase apresentou um aumento visível para todos os grupos tratados. Estes resultados tem uma implicação ecológica importante, pois apontam para a possibilidade de recuperação biológica em ambientes recuperados após contaminação com 2,4-D.

Palavras-chave: Biomarcadores de estresse oxidativo, Diclorofenoxiacético, Mortalidade e Recuperação.

Study of the correlation between oxidative stress and 2,4-D-induced morphological changes in *Artemia salina* (Leach, 1819)

Student: Alex Pinheiro Vizzotto

Advisor: Dr. Albanin Aparecida Mielniczki Pereira

Abstract - 2,4-dichlorophenoxyacetic acid is one of the most used herbicides in the world, it has systemic action, making it effective for weed control. Its classification range is I, offering extreme risks to the environment and being extremely harmful to aquatic fauna. For this reason, we sought to understand the effects of the 2,4-D herbicide on *Artemia salina*, a microcrustacean, efficient for the evaluation of toxic substances. The present study investigated whether there is a correlation between alterations in oxidative stress biomarkers and morphological alterations in *A. salina*. In addition, the research evaluated whether oxidative stress biomarkers and morphological changes can return to normal patterns after removal of contact with 2,4-D. Based on our research, we observed a linear relationship between herbicide concentration and *A. salina* morphology. Regarding oxidative stress biomarkers, treatment with 2,4-D did not significantly change TBARS levels, but for catalase activity a reduction in activity was observed in treatments of 2, 6 and 12 hours of treatment. At the same times of treatments, a negative correlation was observed between morphology and catalase activity. After removal of contact with 2,4-D recovery period, organisms reduced morphological changes and catalase Activity showed a visible increase for all treated groups. These results have an important ecological implication, as they point to the possibility of biological recovery in environments recovered after contamination with 2,4-D.

Keywords: Oxidative stress biomarkers, Dichlorophenoxyacetic, Mortality and Recovery.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos.....	15
Quadro 2 - Alterações morfológicas avaliadas em A. salina.....	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases de desenvolvimento de <i>A. salina</i> : (A) Cistos em eclosão, (B) náuplios, (C) metanáuplio, (D) pré-adulto, (E) adulto.	20
Figura 2 - Características morfológicas de náuplios de <i>A. salina</i> em primeiro estágio larval (Vista dorsal). (A) Representação esquemática, (B) Imagem real.	21
Figura 3 - Armadilha luminosa para coleta dos náuplios de <i>A. salina</i>	25
Figura 4 - Mortalidade de <i>A. salina</i> após tratamento com herbicida 2,4-D em 24 horas. .	27
Figura 5 - Efeito do 2,4-D sobre a morfologia de <i>A. salina</i> em diferentes concentrações de tratamento, por 24 horas.	28
Figura 6 - Atividade da CAT (U) em náuplios de <i>A. salina</i> tratados com diferentes concentrações de 2,4-D tratadas durante 2, 6 e 12 horas (A) ou 18 e 24 horas (B) (média \pm erro padrão).	30
Figura 7 - Atividade da CAT (U) em náuplios de <i>A. salina</i> tratados com diferentes concentrações de 2,4-D por 6 horas, seguido de período de recuperação (retirada de 2,4-D) por mais 6 horas (média \pm erro padrão).	32
Figura 8 - Atividade da CAT (U) em náuplios de <i>A. salina</i> tratados com diferentes concentrações de 2,4-D por 12 horas, seguido de período de recuperação (retirada de 2,4-D) por mais 12 horas (média \pm erro padrão).	32
Figura 9 - Padrão de alterações morfológicas em náuplios de <i>A. salina</i> tratados com diferentes concentrações de 2,4-D por 12 horas, seguido de período de recuperação (retirada de 2,4-D) por mais 12 horas (número absoluto de organismos).....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Doses letais de herbicida 2,4-D para A. salina tratadas durante 24 horas.	27
Tabela 2 - Comparação estatística entre as alterações morfológica em náuplios de A. salina na ausência (controle) ou presença de diferentes concentrações de 2,4-D (CL10, CL25, CL50, CL75) após o tratamento de 24 horas.	28
Tabela 3 - Níveis de TBARS (nmol/MDA mg proteína ⁻¹) em náuplios de A. salina tratados com 2,4-D em diferentes tempos e concentrações de tratamento (média ± erro padrão).	29
Tabela 4 - Correlação entre atividade da catalase e alterações morfológicas em A. salina tratada com 2,4-D.	31
Tabela 5 - Correlação entre atividade da CAT (U) e alterações morfológicas em náuplios de A. salina tratados com 2,4-D por 12 horas, seguido de período de recuperação (retirada de 2,4-D) por mais 12 horas.	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 O herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) e seus efeitos biológicos .	16
2.2 Estresse oxidativo e alterações morfológicas.....	17
2.3 <i>Artemia salina</i> como modelo de estudos Ecotoxicológicos	19
3. METODOLOGIA	23
3.1 Cultivo e tratamento de <i>A. salina</i> para determinação de doses letais de 2,4-D .	23
3.2 Análise de alterações morfológicas em <i>A. salina</i>	23
3.3 Análise de biomarcadores de estresse oxidativo	24
3.4 Análise de recuperação dos náuplios de <i>A. salina</i> após retirada do herbicida 2,4-D	25
3.5 Análises estatísticas.....	26
4. RESULTADOS	27
4.1 Efeito do tratamento com 2,4-D sobre a mortalidade de <i>A. salina</i>	27
4.3 Efeito do herbicida 2,4-D sobre biomarcadores de estresse oxidativo em náuplios de <i>A. salina</i>	29
4.4 Correlação entre atividade da catalase e alterações morfológicas	30
4.5 Efeito da retirada do contato com 2,4-D sobre a atividade da catalase e alterações morfológicas em <i>A. salina</i> (análise de recuperação)	31
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÃO GERAL	39
7. PERSPECTIVAS	40
8. REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de agrotóxicos iniciou-se na década de 1950 nos Estados Unidos, durante a revolução verde, que teve o intuito de modernizar os sistemas de agricultura aumentando a produtividade diante da demanda pela população mundial (RIBEIRO e PEREIRA, 2016). O Brasil destaca-se com um dos maiores produtores agrícolas do mundo, essa expansão é assegurada por meio de aplicações de defensivos agrícolas, garantindo o controle de pragas indesejadas (RIGOTTO et al., 2014).

Os agrotóxicos são produtos químicos e biológicos, utilizados com finalidade controle de pragas, ervas daninhas, patógenos entre outros, (ISLAM et al., 2018), sendo aplicados tanto em culturas agrícolas quanto centros urbanos (BRASIL, 1989). Dentre os agrotóxicos mais utilizados estão os herbicidas, que representam 45% de toda comercialização feita no país (RIGOTTO et al., 2014). O herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) pertence ao grupo dos ácidos ariloxialcanóicos, com fórmula molecular $C_8H_6Cl_2O_3$. É um herbicida de ação sistêmica, podendo ser aplicado durante todo o período de plantio no controle de ervas daninhas (MARCATO et al., 2017). Além disso, é um dos herbicidas mais utilizados no Brasil (ISLAM et al., 2018). O 2,4-D oferece riscos extremos ao meio ambiente e pode ser extremamente prejudicial à biota mesmo em baixas concentrações (SILVA et al., 2017; IBAMA, 2021).

Embora o 2,4-D tenha sido desenvolvido para plantas daninhas, existem estudos mostrando que o herbicida pode ter efeitos negativos em organismos não alvo, incluindo indução de estresse oxidativo e alterações morfológicas (ATAMANIUK et al., 2013; PIASSÃO, 2018; BERNAT et al., 2018). Mais especificamente, o estudo de Atamaniuk et al. (2013) mostrou que o 2,4-D altera diferentes parâmetros de estresse oxidativo em peixes da espécie *Carassius auratus* e que tais alterações são reversíveis após um período de recuperação dos animais sem a presença do herbicida. Piassão (2018) demonstrou que o 2,4-D induz alterações morfológicas no organismo modelo *Artemia salina*, as quais também podem ser revertidas após a exposição do herbicida 2,4-D.

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade de defesa do sistema antioxidante, o qual pode ser induzido nos organismos vivos em resposta a diferentes agentes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Estudos mostram que o estresse oxidativo pode ocorrer de forma simultânea e/ ou estar relacionado com alterações morfoestruturais em células ou organismos (JENNY et al., 2004; BERNAT et al., 2018; RAMIRES-QUIJAS et al., 2015; OH et al., 2015).

Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram (i) avaliar se existe correlação entre alterações em biomarcadores de estresse oxidativo e alterações morfológicas em *A. salina* induzidas por 2,4-D e (ii) avaliar se os níveis de biomarcadores de estresses oxidativo, assim como as alterações morfológicas, podem retornar aos padrões normais após retirada do contato com 2,4-D. A principal hipótese do trabalho é que o nível de biomarcadores de estresse oxidativo avaliado em tempos iniciais de contato de *A. salina* com 2,4-D, irão se correlacionar com alterações morfológicas observadas em tempos mais longos de contato como herbicida.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Segundo a ONU (2021) a agricultura é um dos principais setores que contribuem para as mudanças climáticas, essa demanda está crescendo para suprir a população mundial (RIBEIRO e PEREIRA, 2016), como consequência o atual sistema de produção agrícola tornou-se dependente de defensivos agrícolas (GUILHOTO et al., 2006). Neste sentido, embora a agricultura brasileira seja um setor importante para o desenvolvimento do país (ARAÚJO, 2007; CARDOSO et al., 2017), o uso intensivo de agrotóxicos pode ter consequências negativas para o meio ambiente e para a saúde dos organismos vivos (LOPES e ALBUQUERQUE, 2018). Segundo a lei nº 7.802/89 (Brasil, 1989) os agrotóxicos e afins são substâncias químicas definidas como:

- “a) os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;
- b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

Os agrotóxicos alteram a composição da fauna e flora, sendo utilizados para prevenir ou controlar ervas daninhas, pragas, vetores de doenças, ou fungos indesejados, desde a produção até o processamento dos produtos (PERES e MOREIRA, 2003). No entanto altas e frequentes dosagens ocasionam problemas adversos (CAMPOS, 2008). Além disso, os agrotóxicos sofrem processos de transformação químicos, físicos e biológicos que alteram seu comportamento (AMÉRICO et al., 2017).

Os agrotóxicos quimicamente transformados por contato com outras substâncias, podem se tornar extremamente persistentes no meio, pois além de contaminar solos, são transferidos por meio das teias tróficas (ISMAEL et al., 2015; MARCATO et al., 2017). Originalmente os agrotóxicos possuíam alto poder de adesão no solo (VEIGA et al., 2006), no entanto esses produtos tornaram-se mais solúveis e quando lixiviados para corpos d'água e/ou volatilizados para a

atmosfera contaminam e/ou podem intoxicar organismos não alvo (SPADOTTO et al., 2004).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os agrotóxicos são classificados em cinco classes de acordo com o grau de periculosidade (Quadro 1). Esta classificação leva em conta prioritariamente o risco toxicológico para a saúde humana (ANVISA, 2021).

Quadro 1 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos

Classe de Perigo	Categoria 1	Categoria 2	Categoria 3	Categoria 4	Categoria 5	Não classificado
	Extremamente Tóxico	Altamente Tóxico	Modestamente Tóxico	Pouco Tóxico	Improvável de causar dano agudo	Não classificado
Oral	Fetal se ingerido	Fetal se ingerido	Toxico se ingerido	Nocivo se ingerido	Pode ser perigoso se ingerido	-
Dérmica	Fetal em contato com a pele	Fetal em contato com a pele	Toxico em contato com a pele	Nocivo em contato com a pele	Pode ser perigoso em contato com a pele	-
Inalatória	Fatal se inalado	Fatal se inalado	Toxico se inalado	Nocivo se inalado	Pode ser perigoso se inalado	-
Pictograma					Sem símbolo	Sem símbolo
Cor da Faixa	VERMELHO	VERMELHO	AMARELO	AZUL	AZUL	VERDE

Fonte: Adaptado ANVISA (2019).

A proposta elaborada pelo Senado Federal (2019) que altera a lei dos agrotóxicos (1989) foi aprovada pela comissão de Constituição, Justiça e Cidadania (CCJ) e está em processo de tramitação no Congresso Nacional. A atual proposta elaborada pelo Ministério da Agricultura consiste em mudar a nomenclatura, o critério de avaliação e os riscos oferecidos. Segundo o senador Luiz Carlos Heinze é necessário que a lei dos agrotóxicos seja reavaliada, com a inclusão de conceitos e avaliação dos riscos, pois no Brasil há diversos agrotóxicos registrados sem que esteja claro os riscos que eles podem representar à saúde das pessoas e ao meio ambiente (ABDOLLAHI, 2004).

2.1 O herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) e seus efeitos biológicos

Segundo Domingues (2010) os herbicidas representam 45% dos agrotóxicos comercializados no Brasil, seguido de fungicidas e inseticidas que contabilizam 14% e 12%, respectivamente. O herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) pertence ao grupo dos ácidos ariloxialcanóicos, com fórmula molecular $C_8H_6Cl_2O_3$. Tem ação sistêmica, podendo ser aplicado durante todo o período de plantio nas culturas de arroz, cana-de-açúcar, milho, pastagens, soja e trigo (MARCATO et al., 2017). O 2,4-D é um herbicida seletivo que atua sobre plantas dicotiledôneas, mimetizando o efeito de auxinas em nível molecular. A resposta fisiológica desencadeada pelo 2,4-D nas espécies alvo inclui crescimento anormal, senescência e morte da planta (SONG, 2014).

O 2,4-D é um dos herbicidas mais comercializados segundo o relatório nacional de vigilância em saúde de populações expostas ao 2,4-D publicado em 2018, as principais culturas que utilizam o herbicida 2,4-D são soja, milho, trigo arroz, aveia e cana de açúcar (IBAMA 2020). A aplicação do mesmo segue uma série de protocolos disponíveis nos documentos da EMBRAPA.

O 2,4-D está incluído na faixa I de classificação de riscos ambientais, o que significa que oferece riscos extremos ao meio ambiente (SILVA et al., 2017; ANVISA, 2021). Mesmo em baixas concentrações pode ser extremamente prejudicial à biota (MARCATO et al., 2017). Os riscos ambientais do 2,4-D estão associados, entre outros fatores, à contaminação de solo e águas subterrâneas, podendo, dessa forma, atingir organismos não-alvo (LIMA, 2010; OLIVEIRA et al., 2013; FU et al., 2009). Também já foi demonstrado que o herbicida afeta as cadeias alimentares bentônicas e as características químicas da água (PERSCHBACHER et al., 2002).

Existem estudos mostrando que o herbicida pode ter efeitos negativos sobre organismos não alvo, incluindo diferentes grupos de animais (MOREIRA et al., 2020). O estudo realizado por Zhang et al. (2017) retrata a toxicidade do 2,4-D em camundongos machos a partir da análise testicular e possíveis mecanismos de ação do herbicida. Como resultado os autores observaram rupturas na linhagem espermatogênica e destruição no tecido seminífero, aumento da

peroxidação lipídica e a redução nas atividades enzimáticas antioxidante (catalase e superóxido dismutase). Mahmoudinia et al. (2019) examinaram os efeitos e danos do 2,4-D em hDPSCs (células-tronco da polpa dentária humana), o estudo conclui que o 2,4-D influenciou a viabilidade, taxa de crescimento, aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e redução da atividade enzima Fosfatase Alcanina (Alcaline Phosphatase – ALP) em células de hDPSCs.

Atamaniuk et al. (2013) propuseram que a toxicidade do 2,4-D pode estar relacionada à indução de estresse oxidativo. Neste trabalho, os autores observaram que a exposição de peixes *Carassius auratus* a 2,4-D resulta em aumento da atividade de enzimas envolvidas fundamentalmente com as defesas antioxidantes. De fato, sabe-se que o 2,4-D é capaz de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, a partir disso, desencadear processos patológicos como inflamação e defeitos do sistema nervoso (ISLAM et al., 2018). O estresse oxidativo também parece estar envolvido com alterações morfológicas induzidas por 2,4-D em espermatozoides (LERDA e RIZZI, 1991; ISLAM et al., 2018).

O tratamento do organismo modelo *Artemia salina* (*A. salina*) com 2,4-D resulta em mudanças de características morfológicas como alterações de coloração, ausência do olho, alterações no tubo digestório e no abdome (PIASSÃO, 2018). Esse mesmo estudo demonstrou que o aumento da mortalidade de *A. salina* é proporcional ao aumento da concentração do 2,4-D. Entretanto, no referido trabalho, não foi feita a avaliação de parâmetros de estresse oxidativo que pudessem ser correlacionados com os efeitos observados do 2,4-D.

2.2 Estresse oxidativo e alterações morfológicas

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo radicais livres, e a capacidade de defesa do sistema antioxidante (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). O metabolismo celular possui mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos para conter os efeitos negativos das EROs (REGOLI et al.,

1998). No entanto, em determinadas condições, o excesso de EROs pode superar a capacidade de desintoxicação dos sistemas de defesa e causar danos em biomoléculas essenciais, como DNA, proteínas e lipídios (YU e ANDERSON, 1997).

Os níveis de estado oxidativo de um organismo podem ser avaliados por meio de biomarcadores de defesa antioxidante ou de danos oxidativos. Os biomarcadores de defesa, em geral incluem enzimas antioxidantes tais como a catalase (CAT), a Superóxido Dismutase (SOD) e enzimas do sistema das glutations, como a Glutaciona Redutase (GR) e Glutaciona Peroxidase (GPx). Já os biomarcadores de danos, incluem avaliação proteínas oxidadas (proteínas carboniladas), bases oxidadas no DNA ou peroxidação de lipídios de membrana (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

A atividade da enzima CAT e o nível de peroxidação lipídica avaliado pelo método de TBARS (substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico), se constituem em biomarcadores robustos por serem biomarcadores de baixo custo, com metodologia de análise simples e que apresentam respostas robustas em estudos ecotoxicológicos (LOUREIRO, MARTINS e MIELNICZKI-PEREIRA, 2020; BORGES, et al., 2022 impress).

O estado de estresse oxidativo pode afetar o padrão morfológico normal em diferentes células e organismos. Oh et al. (2015) estudaram linhagens da bactéria *Campylobacter jejuni*, deficientes para os genes que codificam as enzimas CAT, SOD e Alquil Hidroperóxido Redutase, as quais são mais sensíveis ao estresse oxidativo. Segundo os autores, os resultados do trabalho demonstram que a resistência ao estresse oxidativo tem papel central tanto para a sobrevivência, quanto para o desenvolvimento morfológico de *C. jejuni*, em condições aeróbicas.

No estudo realizado Jenny et al. (2004) foi utilizada vitamina K para induzir o estresse oxidativo em células neurais da glia, que são importantes para nutrição dos neurônios indutores de doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer e derrame. Como resultado, os autores observaram que o aumento do estresse oxidativo pode causar danos subjacentes nestas células, incluindo alterações na morfologia.

O estudo realizado por Bernat et al. (2018) mostrou que o 2,4-D induz estresse oxidativo em fungos da espécie *Umbelopsis isabellina*, por meio do aumento da atividade da CAT e também aumento da peroxidação de lipídios de membrana. Mais especificamente, o tratamento com o herbicida alterou a estrutura da membrana celular de *U. isabellina*, tornando-a mais permeável e menos fluida.

No estudo realizado por Ramires-Quijas et al. (2015) foi observado que o estresse oxidativo está relacionado com alterações na morfologia de espécies de *Candida*. A exposição à H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$, além de afetar os níveis de CAT e proteínas carboniladas destas espécies, também resultou na transição de uma morfologia oval normal para formas aberrantes com endentações e saliências.

2.3 *Artemia salina* como bioindicador ecotoxicológico

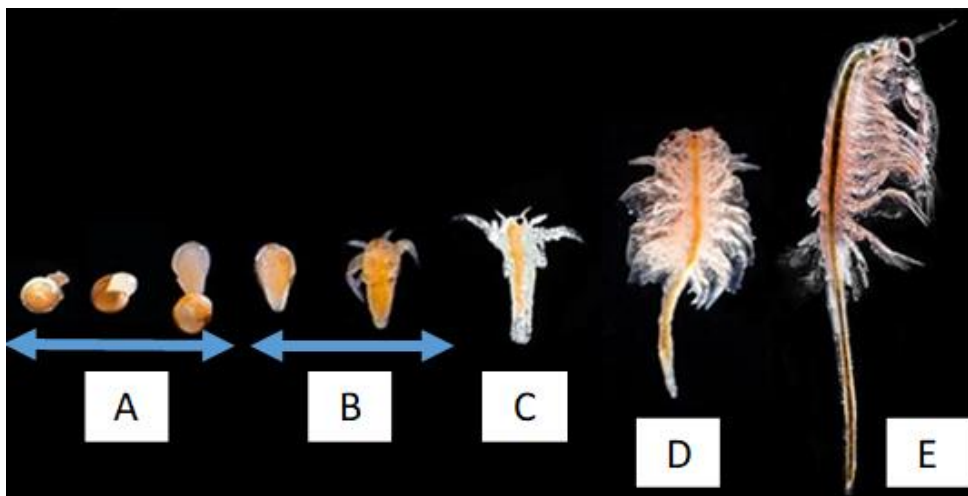
Para reduzir os danos biológicos que podem ser causados pelos defensivos agrícolas é importante conhecer as respostas morfológicas, fisiológicas e biológicas de organismos expostos a estes compostos tanto *in situ* quanto *ex situ* (LIMA et al., 2011; RUIZ et al., 2005). As avaliações realizadas *ex situ*, em condições experimentais controladas, permitem compreender de maneira mais específica os efeitos da exposição a xenobióticos individual ou simultaneamente. Este tipo de avaliação serve como base para propor medidas que minimizam o estresse em comunidade vulneráveis *in situ* (FARIA et al., 2014; DAMÁSIO et al., 2008), visto que os seres vivos distintos possuem processos bioquímicos similares entre si (SPADOTTO et al., 2006).

A ecotoxicologia investiga interações sinérgicas e antagônicas de substâncias sintéticas ou naturais em organismos vivos (COSTA e OLIVI 2008), sendo uma importante ferramenta fundamentada na resposta dos organismos a estresses químicos (MAGALHÃES e FILHO, 2008). Testes toxicológicos ou bioensaios são aprimorados desde 1975 pelo programa internacional de padronização de testes de toxicidade (ZAGATTO e BERTOLETTI 2006), realizados principalmente por ensaios laboratoriais, sob condições específicas e controladas, utilizando diferentes organismos como modelo de estudo (COSTA e OLIVI 2008).

Artemia salina é um organismo modelo que pertence ao filo Arthropoda, classe Branquiopoda, ordem Anostraca e família Artemiidae (ASEM, 2010). *A. salina* é um microcrustáceo muito utilizado para avaliar a toxicidade de diferentes substâncias (BEDNARCZUK et al., 2010). Possui distribuição cosmopolita, caráter eurialino, seus cistos quando desidratados ficam metabolicamente inativos e são de fácil cultivo e manipulação, além disso o organismo apresenta ciclo de vida curto (COITINHO et al., 2011). *A. salina* tem sido largamente utilizada em testes de toxicidade, pois são ferramentas eficientes e de baixo custo para esta finalidade. A simplicidade desse organismo resulta em resultados rápidos, que quantifica as concentrações e efeitos das substâncias tóxicas sobre a biota (COSTA et al., 2008).

Os cistos de *A. salina* possuem um diâmetro médio de 0,2 a 0,3 mm e só eclodem quando hidratados (Figura 1). Em seguida é liberado um náuplio com tamanho médio de 0,45 mm de comprimento e 0,1 mm de largura. Durante os próximos 7 a 10 dias passa para os estágios metanaúpio, que diferem um do outro no grau de segmentação do corpo, na transformação da 2ª antena e na aparência das pernas torácicas. Durante esse período o corpo aumenta para 2,5 a 4 mm. Quando adultos podem variar de 15 a 16 mm, podendo viver em média 21 dias (COITINHO et al., 2011).

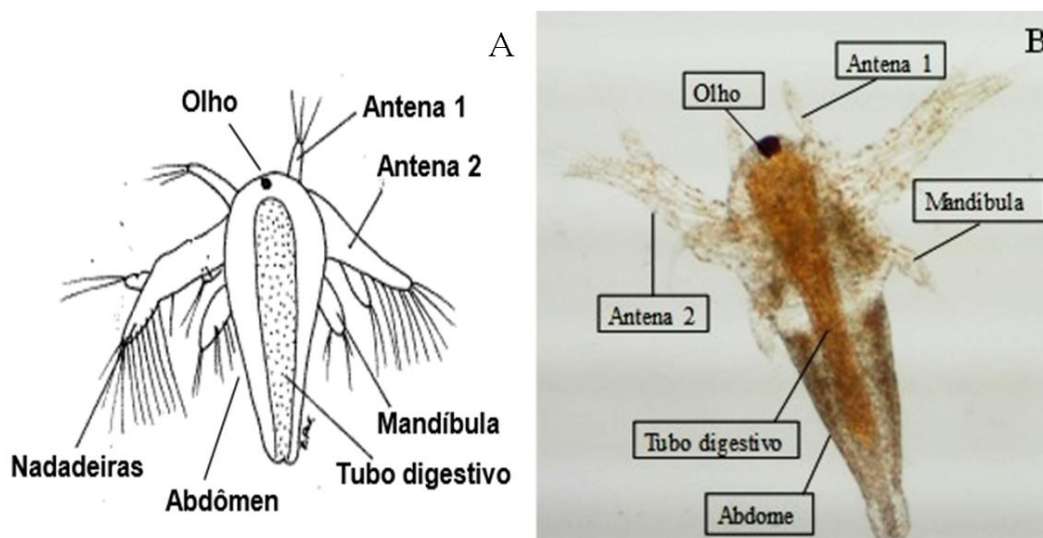
Figura 1 - Fases de desenvolvimento de *A. salina*: (A) Cistos em eclosão, (B) náuplios, (C) metanaúpio, (D) pré-adulto, (E) adulto.



Fonte: <https://www.zootecniadomestica.com/artemia-salina/>. Acesso: 10/08/2021

As características de *A. salina* no primeiro estágio larval (estágio I) incluem um tamanho que pode variar de 0,4 a 0,5 mm, cor marrom-laranja e presença de um olho (fotorreceptor) encontrado na região da cabeça. Apresenta ainda três pares de apêndices: primeiro par com função sensorial (primeiro par de antenas), segundo par com função filtradora e locomotora (segundo par de antenas) e terceiro par com função de absorção dos alimentos (mandíbula) (DUMITRASCU, 2011; VAN STAPPEN, 1996) (Figura 2).

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) Foto PIASSÃO, 2018.

Bustos-Obregon e Vargas (2010) realizaram ensaios de toxicidade em *A. salina* para determinar a eficiência da espécie como bioindicadora frente a resíduos agrícolas. Os organismos foram expostos durante 24, 48 e 72 horas a diferentes concentrações do organofosforado Diazinon. Nos resultados obtidos foi possível definir que *A. salina* responde de forma eficaz como indicadora da toxicidade do agrotóxico em questão, apresentando além de respostas em termos de redução de viabilidade, também alterações em sua morfologia (BUSTOS-OBREGON e VARGAS, 2010).

Outro estudo foi realizado com herbicidas do grupo do glifosato (Roundup Original, Glifosato AKB 480) em *A. salina*, expostas durante 72, 96 e 192 horas para avaliar parâmetros funcionais e bioquímicos. Os resultados obtidos mostraram que houve padrões de eclosão irregulares, além disso, muitas larvas morreram após a eclosão (GAMBARDELA et al., 2018; RODRIGUES et al., 2017).

No estudo realizado por Piassão (2018) mostra que náuplios de *A. salina* tratados com 2,4-D apresentam alterações nos padrões de morfologia mesmo quando expostos a baixas concentrações do herbicida (CL₁₀), com aumento progressivo destas alterações, conforme se aumenta a dose de tratamento. Neste mesmo trabalho, também foi observado que os efeitos do 2,4-D sobre a morfologia podem ser revertidos se a população for retirada do contato como herbicida. Estes resultados tem uma implicação ecológica importante, pois apontam para a possibilidade de recuperação biológica em ambientes recuperados após contaminação com 2,4-D.

3. METODOLOGIA

3.1 Cultivo e tratamento de *A. salina* para determinação de doses letais de 2,4-D

Para o cultivo de *A. salina*, foram incubados 100 mg de cistos em 500 mL de água destilada contendo 5 g de cloreto de sódio e 0,35 g bicarbonato de sódio (água salinizada). Estes foram mantidos por 24 horas em estufa BOD, a 30°C, com aeração e iluminação constante para eclosão uniforme dos náuplios. Após a eclosão, amostras de 100 náuplios foram transferidas para frascos individuais contendo água salinizada fresca e diferentes concentrações de 2,4-D (0 - 3,3 - 7,9 - 15,7 - 24,9 mg/L), com iluminação e aeração constante. Após 24 horas de tratamento, foi determinado o nível de sobrevivência com base na motilidade de *A. salina*. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes. Os dados obtidos foram transformados em percentuais de sobrevivência em relação ao controle (sem herbicida). Com base nestes valores foi obtida a equação da reta utilizada para calcular as doses letais de 2,4-D (CL₁₀ CL₂₅ CL₅₀ CL₇₅), para 24 horas.

3.2 Análise de alterações morfológicas em *A. salina*

Para avaliação morfológica, os náuplios foram tratados com o herbicida 2,4-D em concentrações equivalentes às doses letais de CL₁₀ CL₂₅ CL₅₀ CL₇₅. Após 24 horas, foram coletados e fixados em lâminas de vidro com água do próprio cultivo para observação em microscópio óptico (ampliação total de 40X) acoplado à câmera fotográfica. Imagens fotográficas foram confeccionadas para posterior avaliação das alterações morfológicas. Os dados de morfologia foram obtidos a partir de três experimentos independentes, com amostragem de 35 náuplios por tratamento, totalizando, no mínimo, 100 indivíduos avaliados por tratamento. As características avaliadas foram: alterações na cor, no tubo digestivo e na simetria do abdômen (Quadro 2). Além disso também foi determinado o número total de organismos com alterações morfológicas em cada tratamento, que corresponde aos náuplios que apresentaram no mínimo uma das alterações descritas acima. Todas as análises foram feitas pelo mesmo observador, sendo sempre avaliado uma característica de cada vez.

Quadro 2 - Alterações morfológicas avaliadas em *A. salina*.

Características	Normal	Alterado	Descrição das alterações
Cor	Marrom claro	Marrom escuro	Marrom escuro
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.

Fonte: Piassão (2015)

3.3 Análise de biomarcadores de estresse oxidativo

Para a avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo, os organismos foram tratados com concentrações de 2,4-D equivalentes às doses letais de CL₁₀ CL₂₅ CL₅₀ CL₇₅, nos tempos de 2, 6, 12, 18 e 24 horas. Para a preparação dos extratos biológicos, os náuplios foram coletados do cultivo com o auxílio de uma armadilha luminosa (Figura 3) e sedimentados por centrifugação (15 minutos, 4500 rpm, 4°C). Após descarte do sobrenadante, foram adicionados 200 µL de tampão fosfato contendo inibidor de protease (PMSF) e foi feita uma segunda centrifugação (5 minutos, 4500 rpm, 4°C). Os náuplios sedimentados receberam mais 200 µL de tampão e foram macerados dentro de um tubo de eppendorf, com auxílio de um bastão de vidro, em caixa de gelo. O material macerado foi novamente centrifugado (5 minutos, 4500 rpm, 4°C) e nesse caso foi coletado o sobrenadante para determinação das proteínas totais pelo método de BRADFORD (1976) e para a análise dos biomarcadores.

A atividade da catalase (CAT – EC 1.11.1.6) foi avaliada a partir da velocidade de degradação de H₂O₂ medida em 240 nm, conforme método de Bertholdo-Vargas et al. (2009). A atividade enzimática está expressa em unidades internacionais (U), que corresponde à quantidade de enzima que catalisa a degradação de 1µMol de H₂O₂/min/mg de proteína. Os níveis de peroxidação lipídica foram medidos com base na determinação de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme descrito por ESTERBAUER e CHEESEMAN (1990). Este método baseia-se na análise colorimétrica da presença de malondialdeído (532 nm), que é um dos produtos finais da peroxidação de lipídios. Os valores finais são expressos em nmol de MDA/mg de proteína.

Figura 3 - Armadilha luminosa para coleta dos náuplios de *A. salina*.



Fonte: (VIZZOTTO, A. P. 2021)

3.4 Análise de recuperação dos náuplios de *A. salina* após retirada do herbicida 2,4-D

Para análise de recuperação dos náuplios de *A. salina*, após a retirada do 2,4-D, os cistos foram cultivados conforme descrito no item 3.1. Após a eclosão dos náuplios (24 horas) os cultivos foram tratados com 2,4-D nas concentrações equivalentes às CL₁₀, CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅ e o controle sem a presença de 2,4-D. Após 12 horas de tratamento os cultivos foram homogeneizados e divididos em duas partes de volumes iguais, sendo uma destinada a avaliação imediata do efeito do 2,4-D na morfologia e parâmetros de estresse oxidativo e a outra

destinada para análise “de recuperação”. Para esta a análise, a amostra foram filtradas, transferida para água salinizada fresca (sem 2,4-D) e acondicionada na estufa B.O.D. por mais 12 horas (período de recuperação sem o herbicida) após esse período, os náuplios de recuperação foram coletados para avaliação de alterações morfológicas e estresse oxidativo. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes.

3.5 Análises estatísticas

Os dados referentes às alterações morfológicas foram avaliados por meio do teste do qui-quadrado (X^2), comparando o grupo controle com cada grupo de tratamento individualmente. Os valores do grupo controle foram considerados como valores esperados e os valores dos grupos tratados como observados.

Para analisar o efeito das diferentes concentrações de 2,4-D sobre o nível de biomarcadores de estresse oxidativo, foi aplicada uma análise de variância de um fator (one way ANOVA), seguida de teste de Tukey. Para a avaliação da correlação entre os níveis de biomarcadores de estresse oxidativo e alterações morfológicas foi utilizada a análise de correlação de Pearson.

As análises foram realizadas no programa Past 2.17 e os valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicadores de diferenças estatísticas significativas.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito do tratamento com 2,4-D sobre a mortalidade de *A. salina*

Foi observada uma relação linear entre a mortalidade dos náuplios de *A. salina* em relação ao aumento da concentração de 2,4-D. A partir da relação dose-efeito foi definido a equação da reta (Figura 4) e assim foram calculadas as concentrações de 2,4-D para os diferentes percentuais de doses letais, tratadas durante o período de 24 horas (Tabela 1).

Figura 4 - Mortalidade de *A. salina* após tratamento com herbicida 2,4-D em 24 horas.

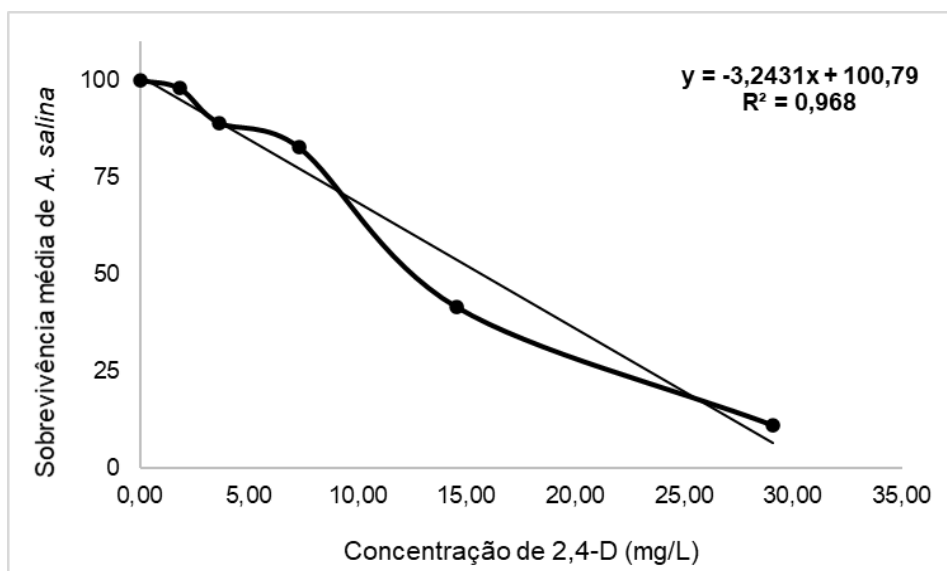


Tabela 1 - Doses letais de herbicida 2,4-D para *A. salina* tratadas durante 24 horas.

Valor de CLs	Concentração de 2,4-D (mg/L)
CL10	3,3
CL25	7,9
CL50	15,7
CL75	24,9

4.2 Efeito do herbicida 2,4-D sobre a morfologia de *A. salina*.

O tratamento com herbicida 2,4-D aumentou o número de alterações morfológicas em *A. salina* desde a CL10 até a CL75 (Tabela 2). As alterações na cor, tubo digestivo e abdômen foram todas significativamente maiores nos grupos tratados com 2,4-D por 24 horas. A exceção foi a assimetria do abdômen para CL25, que não diferiu estatisticamente do grupo controle (Tabela 2).

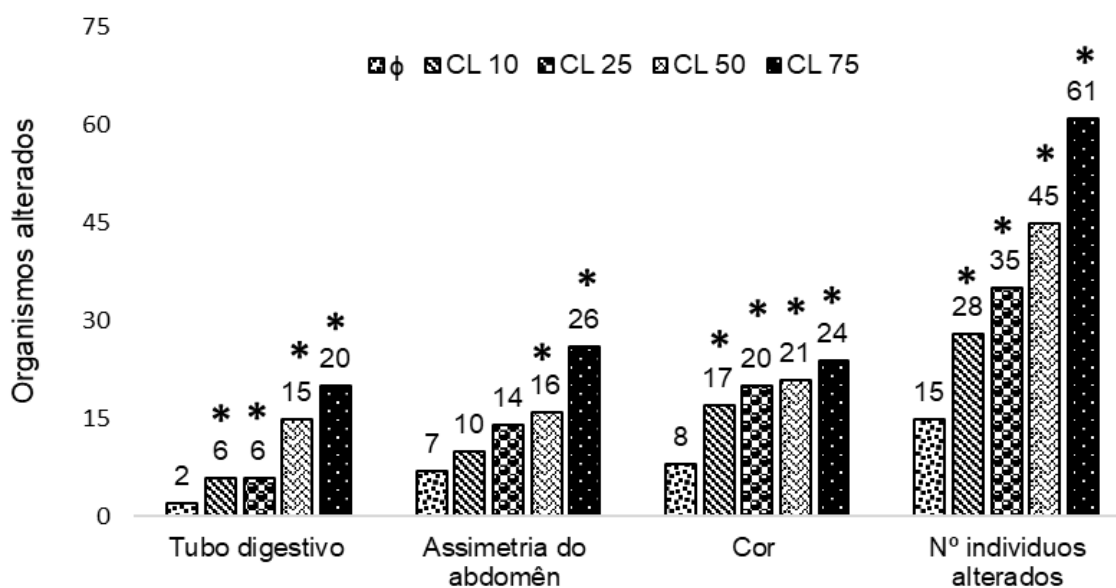
Tabela 2 - Comparação estatística entre as alterações morfológica em náuplios de *A. salina* na ausência (controle) ou presença de diferentes concentrações de 2,4-D (CL10, CL25, CL50, CL75) após o tratamento de 24 horas.

	Assimetria do abdômen	Cor	Tubo digestivo	Alterações totais
CL10	X ² = 2,8 p= 0,24	X ² =21,4 p= <0,01*	X ² =25,2 p= <0,01*	X ² =19,8 p= <0,01*
CL25	X ² =4,87 p= 0,08	X ² =14,71 p= <0,01*	X ² =8,16 p= <0,01*	X ² =22,7 p= <0,01*
CL50	X ² =17,7 p= <0,01*	X ² =39,8 p= <0,01*	X ² =197,9 p= <0,01*	X ² =89,9 p= <0,01*
CL75	X ² =43,8 p= <0,01*	X ² =27,3 p= <0,01*	X ² =165,2 p= <0,01*	X ² =135,9 p= <0,01*

X² valor de referência (tabelado) para duas classes = 3,84 (considerando-se o valor de p < 0,05). * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

Conforme pode ser observado na Figura 5, todas as características avaliadas na presença do herbicida 2,4-D foram maiores que no grupo controle. Para as características tubo digestivo e cor a CL₁₀ aumentou mais que o dobro de alterações na morfologia quando comparadas ao grupo controle, sem a presença do herbicida 2,4-D. Essas alterações aumentam progressivamente, de forma que na CL₇₅ foi observado um aumento de 10 vezes nas alterações de tubo digestivo (2 alterados no controle contra 20 alterados no grupo tratado) e mais de 3 vezes no número total de organismos com algum tipo de alteração (17 no controle contra 61 no grupo tratado).

Figura 5 - Efeito do 2,4-D sobre a morfologia de *A. salina* em diferentes concentrações de tratamento, por 24 horas.



* Indica diferença significativa em relação ao controle 3:33,

4.3 Efeito do herbicida 2,4-D sobre biomarcadores de estresse oxidativo em náuplios de *A. salina*

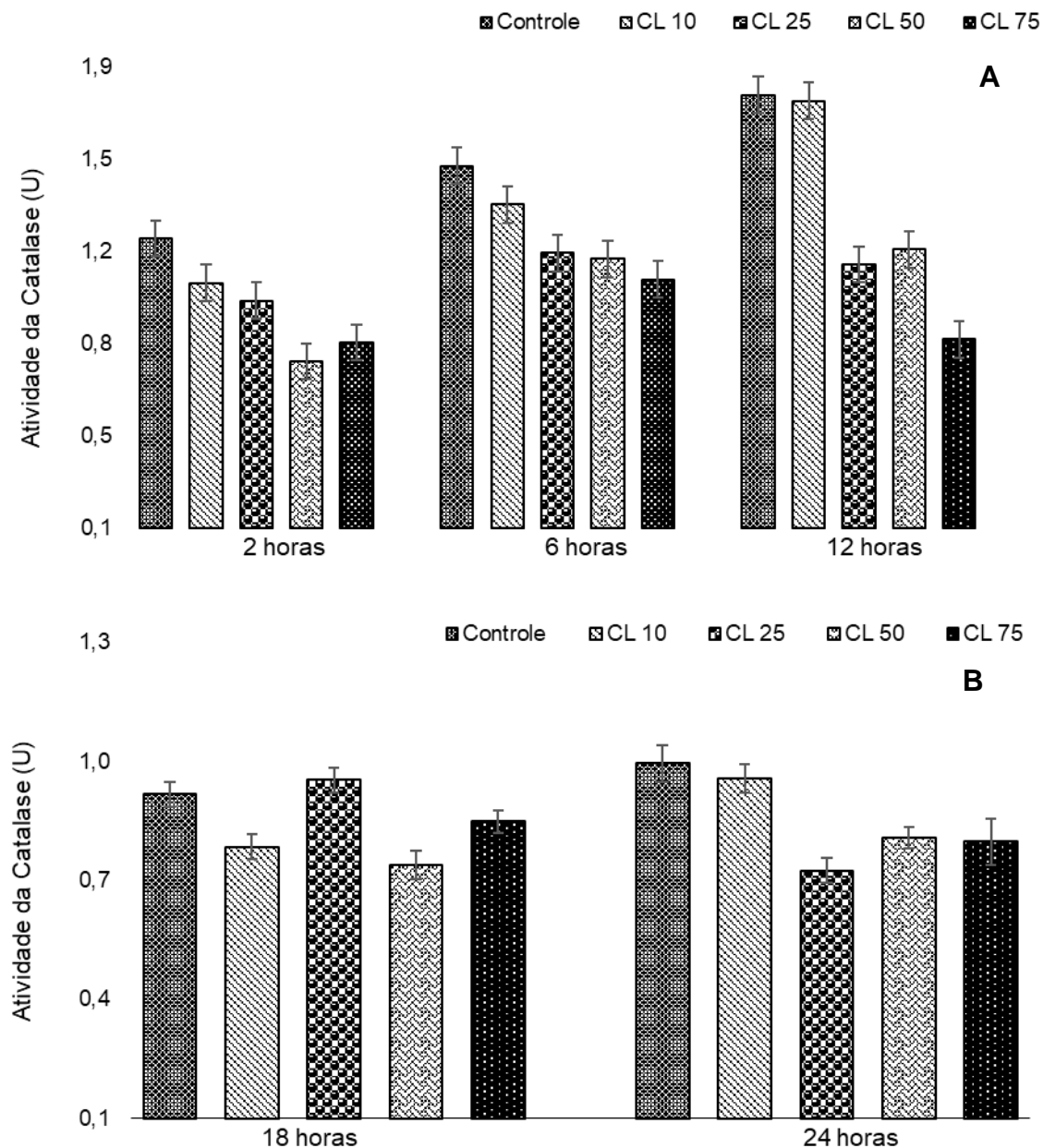
Em relação aos biomarcadores de estresse oxidativo, o tratamento com 2,4-D não alterou significativamente os níveis de TBARS em *A. salina* em nenhuma das concentrações testadas (Tabela 3).

Tabela 3 - Níveis de TBARS (nmol/MDA mg proteína⁻¹) em náuplios de *A. salina* tratados com 2,4-D em diferentes tempos e concentrações de tratamento (média ± erro padrão).

Tempo (h)	Controle	CL 10	CL 25	CL 50	CL 75
2	8,42 ± 0,91 ^a	10,54 ± 0,98 ^a	8,98 ± 0,58 ^a	8,48 ± 0,80 ^a	9,32 ± 1,11 ^a
6	7,61 ± 0,21 ^{abc}	6,93 ± 0,31 ^b	8,66 ± 0,52 ^c	6,71 ± 0,21 ^{ab}	6,83 ± 0,22 ^{ab}
12	8,44 ± 0,43 ^a	8,30 ± 0,31 ^a	10,02 ± 0,78 ^a	9,67 ± 1,19 ^a	9,93 ± 0,58 ^a
18	6,56 ± 0,59 ^a	7,78 ± 0,26 ^a	5,11 ± 1,05 ^a	5,81 ± 0,16 ^a	5,75 ± 1,65 ^a
24	1,76 ± 0,20 ^{ab}	1,17 ± 0,15 ^a	2,11 ± 0,27 ^b	1,45 ± 0,13 ^{ab}	1,50 ± 0,11 ^{ab}

Para atividade da catalase foi observado um padrão distinto entre os tempos iniciais e finais de tratamento com o herbicida. Nos tempos iniciais de tratamento (2, 6 e 12 horas) observa-se um padrão nítido de redução de atividade da enzima nos grupos tratados com 2,4-D em concentrações equivalentes às CL25, CL50 e CL75 (Figura 6-A). Essa redução de atividade variou aproximadamente entre 30 e 40% para 2 horas, 22 e 30% para 6 horas e, para 12 horas, entre 37 e 53% (Figura 6-A). Por outro lado, nos maiores tempos de tratamento essa redução aparece de forma pontual apenas para o grupo tratado com CL50 para 18h e CL25 para 24h (Figura 6-B).

Figura 6 - Atividade da CAT (U) em náuplios de *A. salina* tratados com diferentes concentrações de 2,4-D tratadas durante 2, 6 e 12 horas (A) ou 18 e 24 horas (B) (média \pm erro padrão).



* Indica diferença significativa em relação ao controle.

4.4 Correlação entre atividade da catalase e alterações morfológicas

As alterações morfológicas de *A. salina* após tratamento com 2,4-D por 24 horas, apresentaram correlação com atividade da catalase nos tempos iniciais de tratamento (2, 6, 12 horas). Para a cor, tubo digestivo e alterações totais essa correlação foi significativa em 2 e 6 horas de atividade da catalase. Para assimetria do abdômen não foi significativa em 2 horas, mas sim em 6 e 12 horas

(Tabela 4). Em 18 e 24 horas não foi observado nenhum valor de correlação entre a atividade da catalase e alterações morfológicas.

Tabela 4 - Correlação entre atividade da catalase e alterações morfológicas em *A. salina* tratada com 2,4-D.

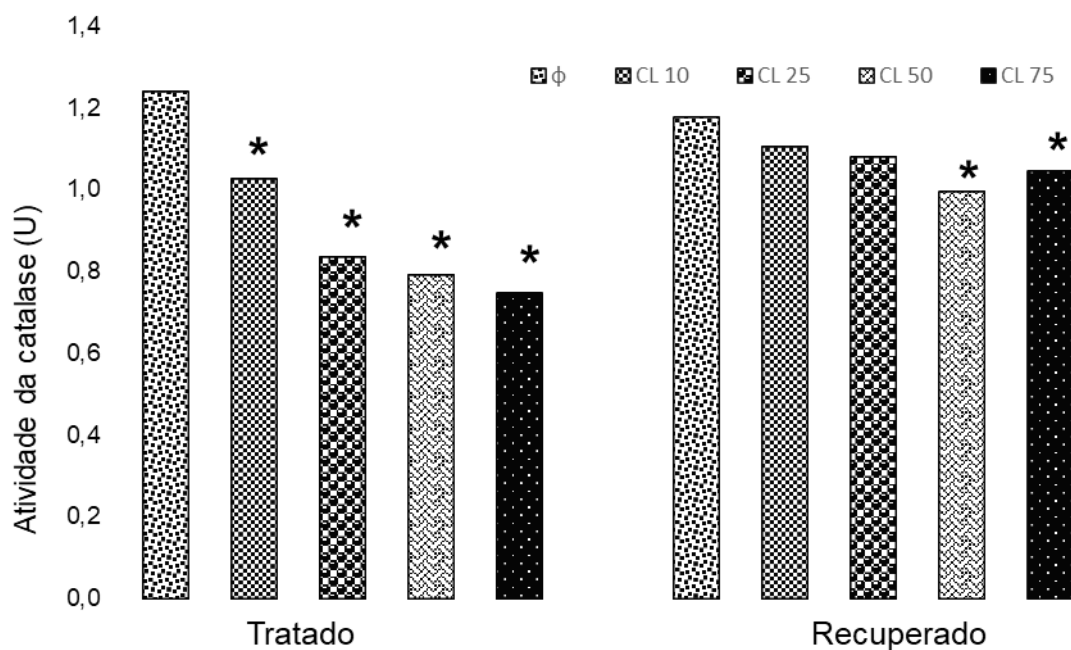
Determinação da atividade da CAT	Alterações morfológicas avaliadas no tempo de 24 horas			
	Assimetria do abdômen	Cor	Tubo Digestivo	Alterações totais
2 horas	p = 0,11 R = -0,79	p = 0,04 R = -0,89	p = 0,03 R = -0,90	p = 0,03 R = -0,91
6 horas	p = 0,02 R = -0,93	p = <0,01 R = -0,96	p = 0,04 R = -0,89	p = < 0,01 R = -0,98
12 horas	p = 0,03 R = -0,91	p = 0,09 R = -0,81	p = 0,09 R = -0,81	p = 0,05 R = -0,87
18 horas	p = 0,79 R = -0,16	p = 0,56 R = -0,37	p = 0,43 R = -0,46	p = 0,56 R = -0,35
24 horas	p = 0,22 R = -0,66	p = 0,09 R = -0,81	p = 0,34 R = -0,54	p = 0,16 R = -0,32

4.5 Efeito da retirada do contato com 2,4-D sobre a atividade da catalase e alterações morfológicas em *A. salina* (análise de recuperação)

Para avaliar uma possível recuperação dos efeitos do 2,4-D sobre a morfologia e níveis de catalase de *A. salina*, foi realizado um ensaio no qual os organismos foram avaliados imediatamente (i) imediatamente após tratamento com o herbicida ou (ii) após serem retirados do contato com o herbicida e permanecerem em recuperação de acordo com o tempo de exposição 6 ou 12 horas) em água salinizada fresca (período de recuperação *A. salina*).

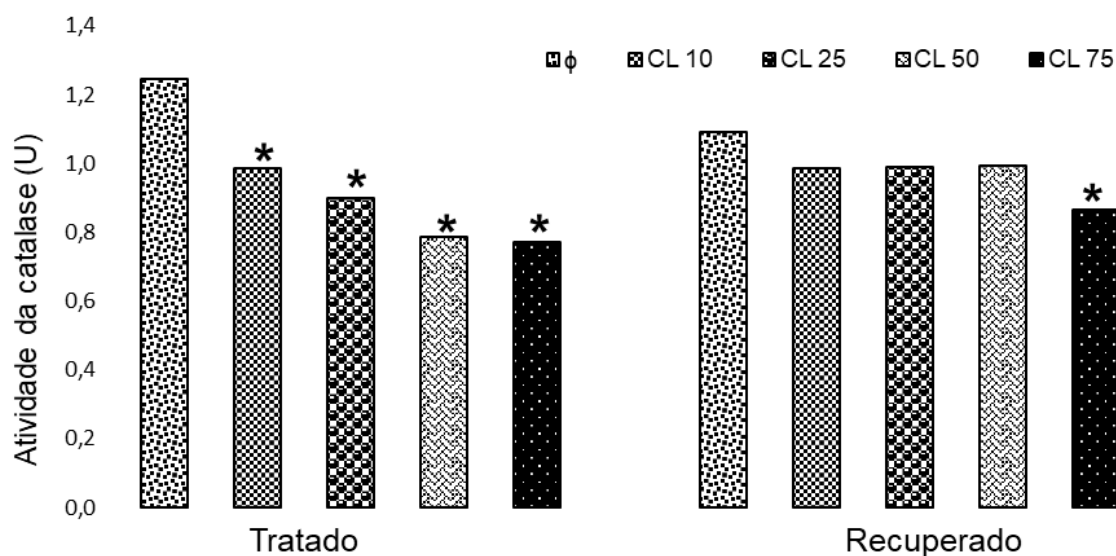
Conforme pode ser observado na Figura 7, os tratamentos com 2,4-D por 6 horas a atividade da catalase foi inibida em todas as concentrações testadas. Após à retirada do contato com 2,4-D esse efeito inibitório foi revertido para as concentrações mais baixas, de forma que apenas as CL50 e CL75 se mantiveram em níveis significativamente mais baixos do que o grupo controle. Vale destacar que mesmo nestes dois grupos, a atividade da catalase apresentou um aumento visível após a retirada do contato com 2,4-D (Figura 7).

Figura 7 -Atividade da CAT (U) em náuplios de *A. salina* tratados com diferentes concentrações de 2,4-D por 6 horas, seguido de período de recuperação (retirada de 2,4-D) por mais 6 horas (média \pm erro padrão).



Da mesma forma, em 12 horas todos os tratamentos com 2,4-D inibiram a atividade da catalase em relação ao controle. Após a retirada do contato com 2,4-D, apenas o grupo tratado com a concentração equivalente à CL75 se manteve mais baixo do que o controle (Figura 8).

Figura 8 - Atividade da CAT (U) em náuplios de *A. salina* tratados com diferentes concentrações de 2,4-D por 12 horas, seguido de período de recuperação (retirada de 2,4-D) por mais 12 horas (média \pm erro padrão).



Esse efeito de recuperação após retirada do contato com 2,4-D também foi observado para as alterações morfológicas de *A. salina*. De modo geral, é possível observar que tratamento a concentração equivalente à CL75, por 12 horas, causa aumento do número de indivíduos alterados para todos os parâmetros avaliados (Figura 9-A). No caso específico do número total de organismos com pelo menos uma alteração morfológica, esse aumento foi significativo para as CL25, CL50 e CL75 que apresentaram um aumento em relação ao controle de 83,33%, 116,67% e 200,00%, respectivamente.

Após a retirada do contato com 2,4-D e período de recuperação de 12 horas, as alterações morfológicas de *A. salina* foram semelhantes entre o grupo controle e os grupos tratados previamente com 2,4-D (Figura 9-B). A exceção foi apenas para tubo digestivo, na CL25, que apresentou número de organismos alterados estatisticamente inferior ao controle.

Novamente, foi observado que a atividade da catalase se correlaciona com as alterações morfológicas (cor, tubo digestivo, alterações totais) em *A. salina* exposta ao 2,4-D (Tabela 4). Entretanto, esta correlação não é mais observada após o período de recuperação sem 2,4-D, o que pode indicar que a atividade da enzima é um fenômeno ligado às alterações induzidas por 2,4-D somente na presença do herbicida.

Figura 9 - Padrão de alterações morfológicas em náuplios de *A. salina* tratados com diferentes concentrações de 2,4-D por 12 horas **A**. Seguindo de período de recuperação (retirada de 2,4-D) por mais 12 horas **B** (número absoluto de organismos).

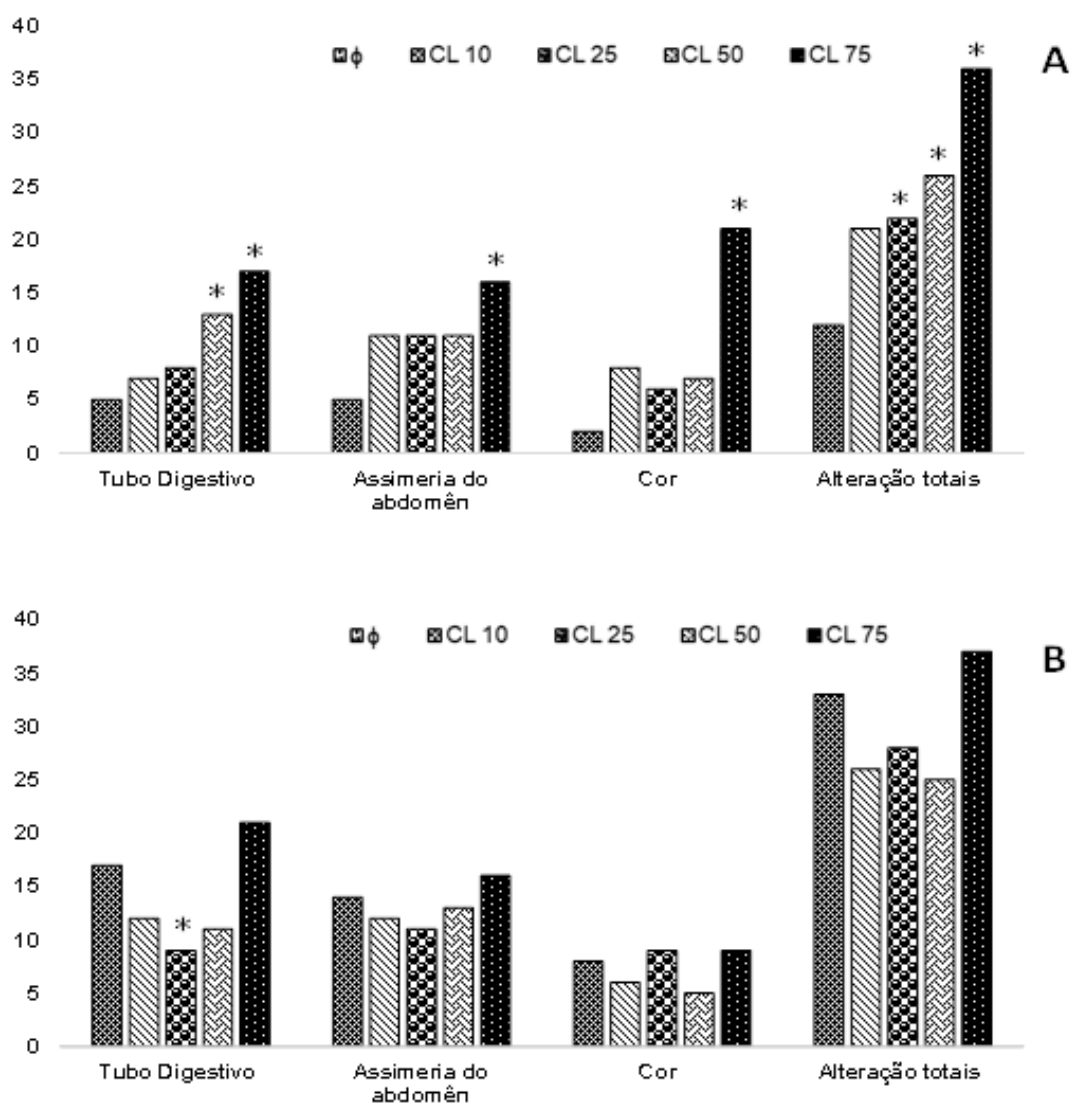


Tabela 5 - Correlação entre atividade da CAT (U) e alterações morfológicas em náuplios de *A. salina* tratados com 2,4-D por 12 horas, seguido de período de recuperação (retirada de 2,4-D) por mais 12 horas.

		Alterações morfológicas 12 horas de tratamento			
Atividade da CAT		Assimetria do abdômen	Cor	Tubo Digestivo	Alterações totais
12 horas de tratamento		$p = 0,04$ $R = -0,89$	$p = 0,20$ $R = -0,68$	$p = 0,01$ $R = -0,91$	$p = 0,03$ $R = -0,90$
		Alterações morfológicas 12 horas de recuperação			
Atividade da CAT		Assimetria do abdômen	Cor	Tubo Digestivo	Alterações totais
12 horas de recuperação		$p = 0,47$ $R = -0,43$	$p = 0,65$ $R = -0,27$	$p = 0,77$ $R = -0,15$	$p = 0,53$ $R = -0,37$

5. DISCUSSÃO

A relação linear entre a mortalidade de *A. salina* e a concentração do herbicida 2,4-D, é uma resposta do efeito do herbicida sobre a sobrevivência da *A. salina*. Isso deve-se a elevada toxicidade do herbicida, que possui subprodutos de síntese como as dioxinas (2,3,7,8-tetraclorodioxinas), um grupo de compostos tóxicos que está presente em muitos produtos carcinogênicos (GRISOLIA, 2005) podendo gerar efeitos indesejáveis em diversos organismos (MOREIRA et al., 2020).

A toxicidade do 2,4-D sobre *A. salina* está de acordo com o observado em outras espécies aquáticas. Santos (2020) observou alteração na atividade natatória, além disso observou-se malformações na boca e no intestino em girinos da espécie *P. cuvieri* expostos a 2,4-D. Outro estudo realizado por Lisbôa (2019) mostrou que, em peixes da espécie *C. macropomum*, o herbicida causa alterações significativas no comportamento e na histologia branquial e hepática.

A. salina é uma importante ferramenta para estudos ecotoxicológicos pois permite avaliar a toxicidade de diferentes compostos sintético e naturais. A forma mais comum de avaliar os danos causadas por uma substância nesse organismo é através da análise da eclosão e da sobrevivência, a partir do tratamento com uma dose pré-determinada de um composto de interesse (CL50). Além da determinação de doses letais, também é possível avaliar o efeito tóxico de determinados compostos sobre a morfologia de *A. salina* (GAMBARDELLA et al., 2018; RODRIGUES et al., 2017; SHAALA et al., 2015).

No presente estudo, foi observado que além da mortalidade, o tratamento com 2,4-D também alterou a morfologia da *A. salina*, o que está de acordo com o observado em estudos prévios. Piassão (2019) avaliou o efeito do 2,4-D sobre a morfologia de *A. salina* em tratamentos tempo e dose dependentes. O estudo constatou a ocorrência de alterações na cor, olho, tubo digestivo e abdômen, sendo que este efeito foi relacionado com a concentração e também foi mais expressivo nos tempos iniciais de tratamento, corroborando os dados obtidos no presente trabalho.

Além de alterar a morfologia de *A. salina*, o 2,4-D também tem efeito negativo sobre a morfologia de outras espécies de organismos aquáticos vertebrados e invertebrados. No estudo de Oliveira (2020) foram descritos efeitos do 2,4-D sobre as brânquias e parâmetros comportamentais em peixes-zebra, tendo como resultado alterações no comprimento e espessura das brânquias, além de modificações no padrão de comportamento da espécie.

Em *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) o 2,4-D isoladamente não altera a morfologia dos indivíduos. Entretanto, pode ter efeito sinérgico quando aplicado junto com altas concentrações do inseticida Fipronil, resultando em alteração da biomassa seca e também do comprimento do corpo dos indivíduos (PINTO et al., 2021). Em microcrustáceos da espécie *Ceriodaphnia silvestrii* (CLADOCERA, CRUSTACEA), o tratamento com 2,4-D faz com que as fêmeas tenham perda reprodutiva devido à formação e de ovos inviáveis em sua cavidade corporal (SILVA et al., 2020). Além de efeitos sobre animais, foi demonstrado efeito negativo do 2,4-D em *Raphidocelis subcapitata* (uma espécie de microalga verde). Esse efeito pode ser resumido em aumento do tamanho das células, alteração da composição lipídica e também da composição de clorofila (MOREIRA et al., 2020).

O 2,4-D é um herbicida destinado ao controle de ervas daninhas. Entretanto, os dados acima mostram que este composto pode afetar espécies aquáticas não alvo. Em termos ecológicos, isso indica o 2,4-D coloca em riscos ambientes aquáticos próximos aos locais onde é aplicado, tendo em vista seu longo tempo de atividade residual em solos e águas, assim como sua aplicação simultânea com outros agrotóxicos (SANCHEZ BRUNETE et al., 1994).

Um outro efeito já identificado do 2,4-D é a habilidade de induzir estresse oxidativo. Estudos relatam que o herbicida (i) interfere com a atividade de enzimas antioxidantes como a CAT, Glutathione-S Transferase (GST) e Superóxido Dismutase (SOD), (ii) pode alterar os níveis de peroxidação de lipídios de membrana e (iii) também induzir a geração radicais livres e espécies reativas de oxigênio (PINTO et al., 2021; BERNAT et al., 2018; BENLI et al., 2016).

Neste trabalho o tratamento com 2,4-D em doses variando entre a CL10 e a CL50 não teve efeito sobre os níveis de peroxidação lipídica de *A. salina*. Este

resultado, embora não fosse esperado, está de acordo com dados da literatura (ORUC e UNER, 2004; BENLI et al., 2016). Oruc e Uner (2004) observaram que o 2,4-D induz uma resposta tecido específica sobre os biomarcadores de estresse oxidativo dos peixes *Oreochromis niloticus* e *Cyprinus carpio*. Mais especificamente, os níveis de malondialdeído (MDA) nos rins, brânquias e cérebro se mantiveram estáveis após o tratamento com o herbicida, enquanto que a atividade das enzimas CAT, GST e GPx (Glutathione Peroxidase) aumentou nos rins, mas não nas brânquias e cérebro.

A ausência de efeito do 2,4-D sobre a peroxidação de lipídios de membrana em algumas espécies, pode estar relacionada com a ação do herbicida em outros elementos do sistema de defesa antioxidante. No macroinvertebrados aquático *C. riparius* o tratamento com 2,4-D eleva a expressão de GST - enzima que participa da eliminação de xenobióticos (PARK et al., 2010). Também foi proposto que a indução de GST está relacionada com a resistência da *Salvinia natans* (uma samambaia aquática) ao 2,4-D (DOLUI et al., 2021). Neste sentido, é possível inferir que, em determinadas espécies, a indução de GST contribua com a desintoxicação e/ ou eliminação do 2,4-D e minimize seus efeitos sobre a peroxidação de lipídios.

Em relação à CAT, os resultados obtidos neste estudo mostram que em tempos iniciais de exposição de *A. salina* ao 2,4-D (2 a 12 horas), se observa um padrão de redução na atividade da enzima. Por outro lado, nos maiores tempos de tratamento esse padrão fica mais difuso. Este perfil de inibição tempo-dependente, sugere que *A. salina* passa por um período de adaptação inicial seguido de ativação de defesas para conter os efeitos do 2,4-D. Uma destas defesas, como já mencionado, pode ser a própria ativação da GST ao longo do tempo de exposição (PARK et al., 2010). O efeito de inibição da CAT por 2,4-D já foi observado anteriormente no fungo *Umbelopsis isabelina* e também em testículos de ratos (BERNAT et al., 2018; ZHANG et al., 2017).

O estresse oxidativo é um fenômeno que, via de regra, não ocorre de forma isolada. Pelo contrário, em geral a ocorrência de desbalanceamento redox está associado a outros efeitos biológicos deletérios como a indução de danos mitocondriais, ocorrência de mutações, alterações teciduais e/ou morfológicas

(KLAUNIG, 2018; SINHA et al., 2013) (TAYEB et al., 2012; RAMIRES-QUIJAS et al., 2015). No presente estudo, a atividade da CAT, que é um biomarcador de estresse oxidativo bastante robusto, apresentou correlação negativa com a incidência de alterações morfológicas em *A. salina* após tratamento com 2,4-D por 2 a 4 horas. Ou seja, quando a atividade da CAT foi menor, as alterações morfológicas foram mais proeminentes.

Em acordo com os dados acima, já foi demonstrado que ratos tratados com concentrações sub-letais de 2,4-D apresentam inibição renal de enzimas antioxidantes como a CAT, SOD e Glutathione Peroxidase ao mesmo tempo que desenvolvem mudanças histopatológicas pronunciadas nos rins, as quais podem causar disfunção renal (TAYEB et al., 2012). Em larvas de peixe-zebra (*Danio rerio*) o tratamento com 2,4-D afeta a sobrevivência, altera a atividade de enzimas antioxidante e eleva os níveis de marcadores de danos hepáticos, além de induzir malformações larvais e alterações no fígado. Em conjunto, estes resultados são importantes pois mostram que a resposta histológica e morfológica dos organismos são consequências da exposição à uma substância inorgânica, no caso o 2,4-D, que de alguma forma tem a capacidade de lesar a fisiologia do organismo, com especial influência sobre o estresse oxidativo (DURANTE, 2020).

O efeito inibitório do 2,4-D sobre a atividade da CAT em *A. salina* pode ser revertido após retirada do contato com o herbicida. Interessantemente, no mesmo tratamento, também foi revertida a correlação entre atividade da CAT e indução de alterações morfológicas. Esse resultado confirma que a inibição da CAT é um evento relacionado com as alterações fisiológicas que resultam nas malformações de *A. salina* expostas ao 2,4-D. Em mamíferos, espermatozoides submetidos a estresse oxidativo apresentam danos no DNA e alterações no padrão de programação Epigenética, o que interfere com a contribuição paterna para o desenvolvimento do embrião (WYCK et al., 2018). Entretanto, esse padrão de alteração Epigenética é distinto entre zigotos de gatos e camundongos (WYCK et al., 2018). Segundo Hansen (2007) os mecanismos de sinalização dependentes do status redox são fundamentais para o processo normal de desenvolvimento. Desta forma, a indução de estresse oxidativo tem o potencial de induzir teratogênese por meio da desregulação destas vias, especialmente aquelas cuja sinalização é mediada por pares redox com grupamentos tiol (-SH) (HANSEN, 2007).

6. CONCLUSÃO GERAL

Em resumo, o presente estudo confirma o potencial toxicológico do 2,4-D para organismos aquáticos não alvo. Na espécie modelo *A. salina*, o herbicida inibe a atividade da CAT ao mesmo tempo que promove malformações morfológicas, especialmente nas primeiras horas do desenvolvimento das larvas. Estes resultados têm duas implicações importantes. Primeiro, o controle do uso de 2,4-D deve ser estritamente regulado para evitar contaminação dos ecossistemas aquáticos. Segundo, apesar de ter potencial tóxico e teratogênico mediado por estresse oxidativo, os efeitos do 2,4-D têm a possibilidade de serem revertidos caso a exposição cesse. Neste sentido, ações de monitoramento e recuperação de áreas contaminadas por este agrotóxico podem ser estratégias importantes para a restauração e/ou manutenção ambiental.

7. PERSPECTIVAS

- Avaliar o efeito do 2,4-D sobre biomarcadores de estresse oxidativo envolvidos com a manutenção dos níveis de glutathione. Por exemplo, as enzimas Glutathione Redutase e Glutathione Peroxidase.
- Avaliar o efeito de outros defensivos agrícolas sobre a morfologia e biomarcadores em *A. salina*, afim de observar se os outros grupos podem apresentar alguma relação com os dados encontrados em herbicida.
- Avaliar se o extrato de plantas fitoterápicas pode auxiliar na recuperação dos danos morfológicos e bioquímicos ocasionados pelo herbicida 2,4-D.
- Avaliar os efeitos do 2,4-D em organismos de água doce para verificar se esse fenômeno de mudanças morfológicas e bioquímicas acontecem nesses organismos.

8. REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, M.; RANJBAR, A.; SHADNIA, S.; NIKFAR, S.; REZAIEE, A. Pesticides and oxidative stress: a review. **Medical Science Monitor**. v. 10, p. 141-147, 2004.
- AMÉRICO, J. H. P. P.; ISAQUE, W. D.; TORRES, N. H.; MACHADO, A.A.; CARVALHO, S. L.; FILHO, W. V. V.; FERREIRA, L. F. R.; Ocorrência de diclofenaco e naproxeno em água superficial no município de Três Lagoas (MS) e a influência da temperatura da água na detecção desses anti-inflamatórios. **Eng Sanit Ambient**. v.22 p. 429-435, 2017.
- ANVISA, **Monografia do herbicida 2,4-D**, disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/D27%2B%2B24-.pdf/8548d5b3-f306-49df-ac49-4498bc5768d8>, acessada em 17/07/2021.
- ARAÚJO A. J. *et al.* Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.12, p.115-130, 2007.
- ASEM, A.; RASTEGAR-POUYANI, N.; RÍOS-ESCALANTE, P. L. The genus *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Branchiopoda). I. True and false taxonomical descriptions. **Latin American Journal of Aquatic Research**. v. 38, p.501-506, 2010.
- ATAMANIUK, T. M.; KUBRAK, O. I.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Oxidative stress as a mechanism for toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D): studies with goldfish gills. **Ecotoxicology**. v. 22 p. 1498-1508, 2013.
- BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; Miguel, M. D.; Miguel, O. G. Tests in vitro and in vivo used in the toxicological screening of natural products. **Toxicology**. v. 11, p. 43-50, 2010.
- BENLI, A.Ç.; ŞAHIN, D.; SARIKAYA, R.; MEMMI, B.K.; DINÇEL, A.S. The sublethal effects of (2,4-Dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) on narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823). **Arh Hig Rada Toksikol**. v. 67, p. 289-296, 2016.
- BERNAT, P.; NYKIEL-SZYMAŃSKA, J.; STOLAREK, P.; SŁABA, M.; SZEWCZYK, R.; RÓŻALSKA, S. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced oxidative stress: Metabolome and membrane modifications in *Umbelopsis isabellina*, a herbicide degrader. **PLoS One**. v.13, p. 1-18, 2018.
- BERTHOLDO-VARGAS, L.R.; MARTINS, J.N.; BORDIN, D.; SALVADOR, M.; SCHAFER, A.L.; DE BARROS, N.M.; BARBIERI, L.; STIRPE, F.; CARLINI, C.R. Type 1 ribosome-inactivating proteins - Entomotoxic, oxidative and genotoxic action on *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 51-58, 2009.

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.

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

BORGES, A. C. P.; PIASSÃO, J. F. G.; ALBANI, S. M.; ALBERTONI, E. F.; MARTINS, M. C.; CANSIAN, R. L.; VALDUGA, A. T.; HEPP, L. U.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A. Multiple metals and agricultural use affects oxidative stress biomarkers in freshwater *Aegla* crabs. **Brazilian Journal of Biology**. v. 82, p. 1-9, 2022.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. V.72, P.248–254. 1976.

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.

CAMPOS, V. D. **Dinâmica de uso e ocupação da terra na bacia hidrográfica do Arroio dos Pereiras em Irati – PR e sua influência na qualidade das águas superficiais**. 2008. 112 f. Dissertação (Mestrado em Gestão do Território) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

CARDOSO, F. D. P.; ALMEIDA, A.C.; RIBEIRO, R. O.; VIANA, S. F. R.; MARQUES, E. E.; SOUSA, L. B. Expansão recente da fronteira agrícola e o consumo de produtos agroquímicos: indicadores e possíveis impactos na saúde do trabalhador do campo em Porto Nacional – Tocantins. **Revista de Administração e Negócios da Amazônia**, v.9, p. 37-59. 2017.

COITINHO, L. B.; SILVA, H. X. SILVA, K. T. BARRETO, K. G. OLIVEIRA, M. M. Aplicação de testes ecotoxicológicos com microcrustáceo no laboratório de monitoramento das águas do rio paraíba do sul. **Pesca e Aquicultura** v.1, p. 1-7, 2011.

COSTA, A.; FREIRE, P.; CRUZ, J.V. Atlas hidrogeológico das águas minerais dos Açores. **Actas**. v. 1, p.192-199, 2008.

COSTA, C. R.; OLIVI, P. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quim. Nova**, v. 31, p.1820-1830, 2008.

DAMÁSIO, J.; TAULER, R.; TEIXIDÓ, E.; RIERADEVALL, M.; PRAT, N.; RIVA, M. C.; SOARES, A. M. V. M.; BARATA, C. Combined use of *Daphnia magna* in situ

bioassays, biomarkers and biological indices to diagnose and identify environmental pressures on invertebrate communities in two Mediterranean urbanized and industrialized rivers (NE Spain). **Aquatic Toxicology**, v. 87, p. 310-320, 2008.

DOLUI, D.; SAHA, I.; ADAK, M. K. 2, 4-D Removal efficiency of *Salvinia natans* L. and its tolerance to oxidative stresses through glutathione metabolism under induction of light and darkness. **Ecotoxicol Environ Saf.** v. 208, p. 1-12, 2021.

DOMINGUES, I., OLIVEIRA, R., LOURENÇO, J., GRISOLIA, C.K., MENDO, S., SOARES, A.M.V.M., Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.152, p.338-345, 2010.

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

DURANTE, L. S. Toxicidade do herbicida roundup durante o desenvolvimento embrionário e larval do peixe-zebra *danio rerio*. 2020. Dissertação (Biologia Celular e do Desenvolvimento). Universidade Federal de Santa Catarina. 2020.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymology**. v. 186, p. 407-421, 1990.

FARIA, M.; NAVAS, J. M.; SOARES, A. M. V. M.; BARATA, C. Oxidative stress effects of titanium dioxide nanoparticle aggregates in zebrafish embryos. **Science of the Total Environment**, v. 470, p. 379-389, 2014.

FONSECA, M. B. Crescimento e parâmetros toxicológicos em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a uma formulação comercial do herbicida 2,4-d. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

FONTANETTI, C. S.; SOUZA, T. S.; CHRISTOFOLETTI, C. A. The role of biomonitoring in the quality assessment of water resources. **Sustainable water management in the tropics and subtropics**. v. 3, p. 975-1005, 2012.

FU, F.; XIAO, L.; WANG, W.; XU, X.; XU, L.; QI, G. Study on the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic sodium (MCPA sodium) in natura agriculture soils of fuzhou China using using capillary electrophoresis. **Science Total Environment**, v. 6 p. 1998-2003, 2009.

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: mutação, câncer e reprodução**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 392p, 2005.

GUILHOTO, J. J. M.; SILVEIRA, F. G.; ICHIHARA, S. M.; AZZONI, C. R. A importância do agronegócio familiar no Brasil. **RER Rio de Janeiro**, v. 44 p. 555-582. 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 5ª ed, Oxford: Oxford University Press, 2015.

HANSEN, J. M. Oxidative stress as a mechanism of teratogenesis. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**. v. 78, p. 293-307, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. Os 10 ingredientes ativos mais vendidos em 2019. 2020. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 22 de agosto de 2021.

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.

ISMAEL, L. L.; ROCHA, E. M. R.; FILHO, L. A. L.; LIMD, R. P. A. Resíduos de agrotóxico em alimento: preocupação ambiental e de saúde para a população paraibana. **Revista verde**, v. 10, p. 24-29, 2015.

JENNY, M.; XIAOLIN, Z. GRACE-Y, S. Oxidative stress alters cell morphology and cell death índices in immortalized astrocytes **Ecotoxicologi**, v. 26 p. 189-197, 2004.

KLAUNIG, J. E. Oxidative Stress and Cancer. **Current Pharmaceutical Design**. v. 24, p. 4771-4778, 2018.

LEÃO, Mayara Bitencourt. Avaliação dos efeitos da associação dos herbicidas 2,4-D e picloram sobre parâmetros de toxicidade em *Drosophila melanogaster*. Trabalho de Conclusão de Curso – **Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal do Pampa**. 2017.

LERDA D., RIZZI R. Study of reproductive function in persons occupationally exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4D). **Mutation Research**, v.262, p.47-53. 1991.

LIMA, C. P.; CUNICO, M. M.; TREVISAN, R. R.; PHILIPPSEN, A. F.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Efeitos alopatóico e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach dos extratos do fruto *Euterpe Edulis* Martius. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, p. 331-336, 2011.

LIMA, N. C. **Avaliação do impacto da contaminação do colo de áreas agrícolas de bom repouso (MG) por meio de ensaios ecotoxicológicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental), São Paulo, p. 130, 2010.

LISBÔA, J. D. B. Avaliação dos efeitos toxicológicos da associação dos herbicidas 2,4-D e Picloram em peixes da espécie *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818). 2019. Dissertação (Mestrado em Sociedade, Ambiente e Qualidade de Vida). Universidade Federal do Oeste do Pará. 2019.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde Debate**, v.42 p. 518-534, 2018.

LOUREIRO, R. C.; MARTINS, M. C.; Mielniczki-Pereira, A. A. **Contaminação de riachos por metais e seus efeitos sobre macroinvertebrados bentônicos na Região Alto Uruguai Gaúcho**. Ecologia de Riachos no Alto Uruguai Gaúcho. v. 1, p. 100-123, 2020.

MAGALHÃES, D. P.; FILHO, A. S. A Ecotoxicologia como Ferramenta no Biomonitoramento de Ecossistemas Aquáticos. **Oecol. Brasil** v. 12 p. 355-381, 2008.

MAHMOUDINIA, S.; NIAPOUR, A.; GHASEMI-HAMIDABADI, H.; MAZANI, M. 2,4-D causes oxidative stress induction and apoptosis in human dental pulp stem cells (hDPSCs). **Environ Sci Pollut V.** 26, p. 26170–26183, 2019.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. RELATÓRIO NACIONAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DE POPULAÇÕES EXPOSTAS A AGROTÓXICOS (VSPEA), v.1, tomo 2. 2018. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_nacional_vigilancia_populacoes_expostas_agrotoxicos.pdf. Acesso em 19 de agosto de 2021.

MOREIRA, R. A.; ROCHA, G.S.; DA SILVA, L.C.M.; GOULART, B.V.; MONTAGNER, C.C.; MELÃO, M.D.G.G.; ESPINDOLA, E.L.G. Exposure to environmental concentrations of fipronil and 2,4-D mixtures causes physiological, morphological and biochemical changes in *Raphidocelis subcapitata*. **Ecotoxicol Environ Saf.** v. 206. p.1-11 2020.

MOREIRA, R. A.; ROCHA, O.; PINTO, T. J. S.; Life-History Traits Response to Effects of Fish Predation (Kairomones), Fipronil and 2,4-D on Neotropical Cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii* **Arch Environ Contam Toxicol.** v.79, p. 298-309, 2020.

NOGAROL, L. R.; BROSSI-GARCIA, A. L.; FONTANETTI, C. S. Surface morphology of *Diplodon expansus* (Kuster, 1856; Mollusca, Bivalvia, Hyriidae) gill filaments after exposure to environmentally relevant concentrations of atrazine herbicide. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 807-813, 2012.

OH, E.; MCMULLEN, L.; JEON, B. Impact of oxidative stress defense on bacterial survival and morphological change in *Campylobacter jejuni* under aerobic conditions. **Frontiers in Microbiology**. v. 6 p. 295-302, 2015.

OLIVEIRA, B. R. F. Efeitos do herbicida ácido 2,4-Diclorofenoxiacético sobre a morfologia das brânquias e parâmetros comportamentais em peixes-zebra *Danio rerio* adultos. Dissertação (Biologia Celular e do Desenvolvimento) Universidade Federal de Santa Catarina- Florianópolis. 2020.

OLIVEIRA, T. G., FAVARETO, A. P. A., ANTUNES, P. A. Agrotóxicos: Levantamento dos mais Utilizados no Oeste Paulista e seus Efeitos como Desreguladores Endócrinos. **Saneamento e Meio Ambiente**. V.9, p. 375- 390, 2013.

ONU disponível em <https://www.unep.org/pt-br/noticias-e-reportagens/comunicado-de-imprensa/relatorio-da-onu-pede-nova-destinacao-para-us-470> acessado, novembro de 2021.

ORUC, E.; OZCAN-SEVGILER, Y.; UNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* v. 137, p. 43-51, 2004.

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.

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

PERSCHBACHER, P.W.; LUDWIG, G.M.; SLATON, N. Effects of common aerially applied rice herbicides on the plankton communities of aquaculture ponds. **Aquac.**, v. 214, p. 241-246, 2002.

PIASSÃO, J. F. G. Avaliação da toxicidade do herbicida 2,4-d sobre a morfologia de *Artemia salina* (Leach, 1819) – 2018. Dissertação (Mestrado em Ecologia) Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões- Erechim. 2018.

PINTO, T. J. D. S.; MOREIRA, R. A.; SILVA, L. C. M. D.; YOSHII, M. P. C.; GOULART, B. V.; FRAGA, P. D.; MONTAGNER, C. C.; DAAM, M. A.; ESPINDOLA, E. L. G. Impact of 2,4-D and fipronil on the tropical midge *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 209, p. 1-12, 2021.

RAMÍREZ-QUIJAS M. D.; ZAZUETA-SANDOVAL, R.; OBREGÓN-HERRERA, A.; LÓPEZ-ROMERO, E.; CUÉLLAR-CRUZ, M. Effect of oxidative stress on cell wall morphology in four pathogenic *Candida* species **Springer Link**. v. 14, p.2-15, 2015.

REGOLI, F.; NIGRO, M.; ORLANDO, E. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. **Aquatic Toxicology**, v. 40, p. 375-392, 1998.

- 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, ROCHA, M.M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 7, p. 1-3, 2014.
- 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.
- RUIZ, A. L. G. T.; MAGALHÃES, E. G.; MAGALHÃES, A. F.; FARIA, A. D.; AMARAL, M. C. E.; SERRANO, D. R.; ZANOTTI- MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 15, p. 98-102, 2005.
- SANCHEZ-BRUNETE, C.; GARCIA-VALCARCEL, A. I.; TADEO, J. L. Determination of residues of phenoxi acid herbicides in soil and cereals by gas chromatography-ion trap detection. **Journal of Chromatography A**, v. 675, p. 213- 218, 1994.
- SANTOS, G. Efeitos subletais da formulação comercial do herbicida 2,4-D em *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) – 2020 Dissertação (Mestrado em em Ciência e Tecnologia Ambiental) Universidade Federal da Fronteira Sul. 2020.
- SHAALA, N. M. A.; ZULKIFLI, S. Z.; ISMAIL, A.; AZMAI, M. N. A.; MOHAMAT YUSUFF, F. Lethal concentration 50 (LC50) and effects of Diuron on morphology of brine shrimp *Artemia salina* (Branchiopoda: Anostraca) Nauplii. **Procedia Environmental Sciences**, v. 30, p. 279-284, 2015.
- SILVA, L. A.; SOARES, M. A.; FERREIRA, C. C.; VIEIRA, E. R. D.; SANTOS, J. B. Aspectos biológicos de *Tetranychus ludeni* Zacher, 1913 (Acari: Tetranychidae) alimentados com folhas de batata-doce pulverizadas com o 2,4-D. **Arq. Inst. Biol.**, v.84, p. 1-5, 2017.
- SILVA, L.C.M.; MOREIRA, R.A.; PINTO, T.J.S. et al. Toxicidade aguda e crônica de formulações de 2,4-D e fipronil (individualmente e em mistura) para o cladóceros Neotropical *Ceriodaphnia silvestrii*. **Ecotoxicology** v. 29, p. 1462-1475 2020.
- SINHA, K.; DAS, J.; PAL, P. B.; SIL, P. C. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. **Archives of Toxicology**. v. 87, p. 1157-1180, 2013.
- SONG, Y. Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. **Journal of Integrative Plant Biology**. v. 56, p.106-113, 2014.

SPADOTTO, C. A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. In: Embrapa Meio Ambiente-Artigo em Anais de Congresso. **Revista do Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar**, v.4 p. 1-9, 2006.

SPADOTTO, C.A.; HORNSBY, A.G.; GOMES, M.A.F. Sorption and leaching potential of acidic herbicides in Brazilian soils. **Journal of Environmental Science and Health**. v. 40, p. 29-37, 2004.

TAYEB, W.; NAKBI, A.; TRABELSI, M.; MILED, A.; HAMMAMI, M. Biochemical and histological evaluation of kidney damage after sub-acute exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide in rats: involvement of oxidative stress. **Toxicol Mech Methods**. v. 22, p. 696-704, 2012.

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, 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.

WYCK, S.; HERRERA, C.; REQUENA, C. E.; BITTNER, L.; HAJKOVA, P.; BOLLWEIN, H.; SANTORO, R. Oxidative stress in sperm affects the epigenetic reprogramming in early embryonic development. **Epigenetics Chromatin**. v. 11, p. 1-17, 2018.

YU, T. W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: A chemical investigation. **Mutation Research**, v. 379, p. 201-210, 1997.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. **Editores Rima**. p. 478-486 2006.

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.