

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

ANA PAULA DA SILVA

**RESPOSTAS TOXICOLÓGICAS DE ORGANISMOS NÃO-ALVOS EXPOSTOS AO
HERBICIDA 2,4-D: REVISÃO META-ANALÍTICA E EXPERIMENTAÇÃO COM
FASES INICIAIS DE *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI)**

DOIS VIZINHOS

2021

ANA PAULA DA SILVA

**RESPOSTAS TOXICOLÓGICAS DE ORGANISMOS NÃO-ALVOS EXPOSTOS AO
HERBICIDA 2,4-D: REVISÃO META-ANALÍTICA E EXPERIMENTAÇÃO COM
FASES INICIAIS DE *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI)**

**Toxicological responses of non-target organisms exposed to 2,4-D herbicide:
meta-analytic review and experimentation with early stages of *Rhamdia quelen*
(Teleostei)**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias
I/Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas
da Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Orientador: Dr. Elton Celton de Oliveira

Coorientadora: Dra. Nédia de Castilhos Ghisi

DOIS VIZINHOS

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Dois Vizinhos



ANA PAULA DA SILVA

**RESPOSTAS TOXICOLÓGICAS DE ORGANISMOS NÃO-ALVOS EXPOSTOS AO HERBICIDA 2,4-D:
REVISÃO META-ANALÍTICA E EXPERIMENTAÇÃO COM FASES INICIAIS DE RHAMDIA QUELEN
(TELEOSTEI)**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Ciências Agrárias da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Agroecossistemas.

Data de aprovação: 15 de Julho de 2021

Prof Elton Celton De Oliveira, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof Fernando Carlos De Sousa, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof.a Nedra De Castilhos Ghisi, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof Thomaz Mansini Carrenho Fabrin, Doutorado - Leibniz Institute For Neurobiology

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 12/08/2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido o dom da vida. A minha família que sempre me apoiou em todos os momentos da minha vida e principalmente durante os últimos anos. Um agradecimento especial a minha mãe que sempre fez de tudo por mim, tenho muito orgulho de chamá-la de mãe.

Ao meu orientador professor Dr. Elton Celton de Oliveira por ter aceitado me orientar, dividir parte de sua experiência comigo, por compreender as minhas dificuldades e sempre estar disposto a ajudar.

A minha coorientadora professora Dra. Nédia de Castilhos Ghisi que me encheu com os seus ensinamentos, que sempre esteve disposta a me ajudar, a chamar a atenção e fazer brincadeiras.

Aos meus amigos que sempre estavam ali do meu lado, para sorrir e para chorar junto, sempre nos ajudamos e batalhamos juntos. De uma forma especial a Natana, com quem possuo uma amizade linda, que sempre me apoiou e me deu forças para continuar e não desistir.

Aos colegas do grupo Ecotoxigen que ajudaram no desenvolvimento desse trabalho: Natana, Marina, Sandrieli, Tainá, Douglas, Camila, Claudinei, Gabriela, Indianara, Jaine e Elizete que sempre me ajudaram em tudo o que precisei, que passaram horas no laboratório comigo, até ficar tarde e nos finais de semana também.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo recurso do PROAP (Programa de Apoio à Pós Graduação), ao Programa de Pós-graduação em Agroecossistemas, a Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela bolsa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto (Processo: 406661/2016-2).

Agradeço a todos que de alguma forma ajudaram na minha vida acadêmica e neste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um herbicida auxínico que interfere no crescimento vegetal, sendo amplamente utilizado na agricultura. É aplicado diretamente no solo ou pulverizado nas lavouras e pode se acumular progressivamente nos compartimentos ambientais e afetar organismos não-alvos. Com o objetivo de verificar os efeitos tóxicos do 2,4-D em animais, este estudo contemplou uma meta-análise e um bioensaio. A meta-análise foi realizada com o objetivo de compilar resultados de diferentes estudos, sintetizando e formando uma conclusão estatisticamente confiável sobre o efeito letal do 2,4-D em diversas espécies de animais. A pesquisa foi realizada nos bancos de dados Web of Science e Scopus, selecionando apenas artigos que avaliaram o efeito letal do 2,4-D em animais a partir de concentrações ambientais. Após refinamento, foram selecionados 29 artigos, gerando 87 conjuntos de dados. As análises foram realizadas utilizando a diferença de risco para dados binários. A análise do efeito global do 2,4-D indicou um aumento significativo na mortalidade de animais expostos ao 2,4-D em relação ao controle. Os animais submetidos à formulação comercial apresentaram maior letalidade em relação ao 2,4-D puro. Ao dividir os animais em categorias taxonômicas verificou-se que apenas peixes e aves apresentaram maior mortalidade quando expostos ao 2,4-D. Dentre as fases de desenvolvimento ontogenético, apenas animais em fase larval foram suscetíveis ao 2,4-D. O 2,4-D pode, de fato, aumentar a letalidade, mas depende da sensibilidade do organismo, fase de vida e via de exposição. O objetivo da experimentação foi analisar se os efeitos toxicológicos em fases iniciais de desenvolvimento de *Rhamdia quelen* seriam maiores nos grupos expostos ao herbicida 2,4-D comercial, em concentrações permissivas. Ovos fertilizados foram submetidos ao 2,4-D comercial nas concentrações de 0, 15, 30 e 60 $\mu\text{g.L}^{-1}$ com período de exposição de 48, 96 e 168 hpf (horas após a fertilização). Foram analisados a taxa de eclosão, sobrevivência, anormalidades morfológicas, batimentos cardíacos, mobilidade e danos ao DNA. As concentrações de 2,4-D não afetaram significativamente a eclosão dos embriões e sobrevivência das larvas. O 2,4-D provocou um aumento na frequência de indivíduos com deformidades morfológicas em 96 hpf, principalmente nas categorias axial e nas nadadeiras em 30 e 60 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A mobilidade foi menor nas três concentrações testadas, mas sem diferença significativa. A biometria, a frequência cardíaca e os danos ao DNA das larvas não foram afetados pela exposição ao herbicida em relação ao controle. O 2,4-D possui efeito letal sobre diversas espécies animais, mas não para fases iniciais de *R. quelen*, o que sugere que as concentrações permissivas e realísticas aqui testadas possuem pouco efeito toxicológico.

Palavras-chave: meta-análise; letalidade; deformidades; peixes; agrotóxicos; embriotoxicidade.

ABSTRACT

2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is an auxinic herbicide harmful to plant growth and is widely used in agriculture. It is applied directly to the soil or sprayed onto crops and can progressively accumulate in environmental compartments and affect non-target organisms. Aiming to verify the toxic effects of 2,4-D in animals, this study included a meta-analysis and an bioassay. The meta-analysis was performed to summarize results from different studies, using reliable statistical methods to conclude on the lethal effect of 2,4-D in different animal species. The search was carried out in the Web of Science and Scopus databases, selecting only articles that evaluated the lethal effect of 2,4-D in animals from environmental concentrations. After the refinement, 29 articles were selected, generating 87 data sets. Analyzes were performed using the risk difference for binary data. The analysis of the global effect of 2,4-D indicated a significant increase in the mortality of animals exposed to 2,4-D compared to the control. The animals submitted to commercial formulation showed higher lethality compared to pure 2,4-D. We observed in the taxonomic categories that only fish and birds had higher mortality when exposed to 2,4-D. In categories of ontogenetic stages we verified an increase in mortality associated to 2,4-D only in the larval period. 2,4-D can increase lethality, but it depends on the species sensitivity, ontogenetic stages, and exposure route. The bioassay aimed to analyze whether the toxicological effects in early stages of development of *Rhamdia quelen* were greater in groups exposed to commercial 2,4-D herbicide at permissive concentrations. Fertilized eggs were subjected to commercial 2,4-D at concentrations of 0, 15, 30 and 60 $\mu\text{g.L}^{-1}$ with an exposure period of 48, 96 and 168 hpf (hours post-fertilization). Hatch rate, survival, morphological abnormalities, heartbeat, mobility and DNA damage were analyzed. 2,4-D concentrations did not significantly affect embryos hatching and larvae survival. 2,4-D caused an increase in the frequency of individuals with morphological deformities in 96 hpf, mainly in the axial and fins categories in 30 and 60 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Mobility was lower in the three concentrations tested, but no significant difference. Biometrics, cardiac output and DNA damage of larvae were not affected by herbicide exposure compared to control. 2,4-D has induced lethal effect on several animal species, but not in early development stages of *R. quelen*, which suggests a fewer toxicological effect of permissive and realistic concentrations..

Keywords: meta-analysis; lethality; deformities; fish; pesticides; embryotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fluxo de informações nas diferentes fases da revisão sistemática e seleção dos estudos incluídos. Fluxograma de acordo com a instrução PRISMA	26
Fotografia 1 – Fertilização artificial de ovos de <i>R. quelen</i>	49
Fotografia 2 – Seleção dos ovos de <i>R. quelen</i> para o bioensaio	50
Fotografia 3 – Alimentação das larvas de <i>R. quelen</i> expostos a formulação comercial do 2,4-D	51
Fotografia 4 – Deformidades morfológicas das larvas de <i>R. quelen</i> expostas a formulação comercial do 2,4-D em 48, 96 e 168 hpf.....	59
Fotografia 5 - Nucleoides das larvas de <i>R. quelen</i> expostos a formulação comercial do 2,4-D em 48, 96 e 168 hpf, nas diferentes classes de danos.....	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Gráfico de floresta dos tamanhos de efeito dos estudos da análise principal que avaliaram o efeito letal do 2,4-D em animais	34
Gráfico 2 – Categorização dos resultados sobre o efeito letal do 2,4-D por organismo	36
Gráfico 3 – Categorização dos resultados sobre o efeito letal do 2,4-D por grupo animal.....	37
Gráfico 4 – Categorização dos resultados sobre o efeito letal do 2,4-D de acordo com a fase de vida do animal.....	38
Gráfico 5 – Categorização dos resultados sobre o efeito letal do 2,4-D de acordo com a via de exposição	40
Gráfico 6 – Categorização dos resultados sobre o efeito letal do 2,4-D de acordo com a formulação.....	42
Gráfico 7 – Gráfico de funil com base nos 87 conjuntos de dados sobre o efeito letal do 2,4-D em animais	44
Gráfico 8 – Taxa de eclosão das larvas de <i>R. quelen</i> expostos a formulação comercial do 2,4-D em 28 hpf	56
Gráfico 9 – Frequência relativa da sobrevivência das larvas de <i>R. quelen</i> expostos a formulação comercial do 2,4-D.....	57
Gráfico 10 - Frequência de deformidades por categorias nas larvas de <i>R. quelen</i> expostos a formulação comercial do 2,4-D em 48, 96 e 168 hpf.....	61
Gráfico 11 – Índice de severidade de danos morfológicos observados em larvas de <i>R. quelen</i> expostos ao 2,4-D comercial ao longo de 48, 96 e 168 hpf ...	62
Gráfico 12 – Frequência das classes de mobilidade em larvas de <i>R. quelen</i> expostos ao 2,4-D comercial ao longo de 48, 96 e 168 hpf.....	64
Gráfico 13 – Índice de mobilidade em larvas de <i>R. quelen</i> expostos ao 2,4-D comercial ao longo de 48, 96 e 168 hpf	65
Gráfico 14 – Frequência cardíaca em larvas de <i>R. quelen</i> expostos ao 2,4-D comercial ao longo de 48, 96 e 168 hpf	66
Gráfico 15 – Índice de danos ao DNA pelo ensaio cometa em larvas de <i>R. quelen</i> expostos ao 2,4-D comercial ao longo de 48, 96 e 168 hpf	68

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Limite máximo permitido de 2,4-D em todo o mundo..... 17
- Tabela 2 – Dados sobre os estudos do efeito letal do 2,4-D em animais: número de identificação de cada estudo na meta-análise, citação de referência, grupo animal, espécie, fase de vida, via de exposição, formulação, concentração/dose utilizada e o tempo de exposição. Verde: estudos com resultado de tamanho de efeito positivo e significativo; Branco: estudos sem diferença significativa no tamanho de efeito; Rosa: estudos com resultado negativo e significativo.....27
- Tabela 3 - Classificação do grau de severidade das deformidades.....53
- Tabela 4 – Qui-quadrado (χ^2) para larvas de *R. quelen* deformadas e não deformadas por categorias de deformidades morfológicas entre os grupos experimentais (controle e expostos a formulação comercial do 2,4-D)60
- Tabela 5 - Média e desvio padrão do comprimento total e área corporal das larvas de *R. quelen* expostas a diferentes concentrações de 2,4-D comercial63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	Poluição aquática em agroecossistemas.....	13
2.2	Herbicida ácido diclorofenoxiacético (2,4-D).....	14
2.3	Interações do 2,4-D com organismos não-alvos.....	17
3	A EXPOSIÇÃO A CONCENTRAÇÕES REALÍSTICAS DE ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO AUMENTA A LETALIDADE EM ANIMAIS? UMA REVISÃO META-ANALÍTICA.....	21
3.1	Introdução.....	21
3.2	Material e métodos.....	22
3.2.1	Identificação e seleção de estudos.....	22
3.2.2	Análise de dados.....	23
3.3	Resultados e discussão.....	25
3.3.1	Resumo dos resultados de pesquisa.....	25
3.3.2	Análise do efeito letal do 2,4-D em animais.....	33
3.3.3	Categorização dos resultados.....	35
<u>3.3.3.1</u>	<u>Organismos.....</u>	<u>35</u>
<u>3.3.3.2</u>	<u>Fase de vida.....</u>	<u>38</u>
<u>3.3.3.3</u>	<u>Via de exposição.....</u>	<u>39</u>
<u>3.3.3.4</u>	<u>Formulação.....</u>	<u>41</u>
3.3.4	Viés de publicação.....	43
3.4	Conclusão.....	44
4	EXPOSIÇÃO DE FASES INICIAIS DE <i>Rhamdia quelen</i> (TELEOSTEI) A CONCENTRAÇÕES PERMISSÍVEIS DO HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO COMERCIAL.....	46
4.1	Introdução.....	46
4.2	Material e métodos.....	47
4.2.1	Produto e concentrações.....	47
4.2.2	Espécie modelo.....	48
4.2.3	Bioensaio.....	49
4.2.4	Eclosão, sobrevivência, frequência cardíaca e mobilidade.....	51
4.2.5	Deformidades morfológicas.....	52
4.2.6	Ensaio cometa.....	53
4.2.7	Análise estatística.....	54
4.3	Resultados e discussão.....	55
4.3.1	Taxa de eclosão e sobrevivência.....	55

4.3.2	Deformidades morfológicas e biometria	58
4.3.3	Mobilidade	63
4.3.4	Frequência cardíaca.....	65
4.3.5	Ensaio cometa.....	67
4.4	Conclusão	70
5	CONCLUSÃO GERAL.....	71
	REFERÊNCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os pesticidas são produtos químicos aplicados no meio ambiente com o objetivo de controlar organismos vivos indesejáveis, sendo biologicamente ativos e capazes de desencadear diferentes graus de toxicidade (MARCATO; DE SOUZA; FONTANETTI, 2017). Muitas vezes essa toxicidade não é específica aos organismos alvos e representa um risco as demais espécies não visadas, sendo prudente a investigação de suas respostas toxicológicas em ambientes contaminados ou com elevado risco de contaminação (BURNS; SWAEN, 2012).

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um herbicida com ação semelhante às auxinas naturais, atuando no controle de ervas daninhas de folha larga, vegetações em jardins, campos e plantas aquáticas invasoras (AQUINO *et al.*, 2007; ISLAM *et al.*, 2018). Seu mecanismo de ação é sistêmico, por meio da penetração pela folha, chega aos vasos condutores e se espalha pela planta para promover o crescimento excessivo e desordenado, que leva ao atrofiamento das folhas e caule e, conseqüentemente, causando a morte das plantas (GROSSMANN, 2010; SONG, 2014). Devido ao seu modo de ação, eficiência, seletividade e baixo custo, tornou-se um herbicida amplamente utilizado na agricultura e jardinagem em todo o mundo (DEHNERT *et al.*, 2018), com grande potencial de contaminação ambiental.

O 2,4-D vem sendo usado desde os anos de 1940 e, atualmente, ocupa o terceiro lugar dos herbicidas mais utilizados em escala global, ficando atrás apenas do glifosato e dos inibidores da acetolactato sintase (TODD *et al.*, 2020). Suas formulações incluem ésteres, ácidos e sais com diferentes propriedades químicas, gerando mais de 1500 herbicidas a base de 2,4-D. O sal de dimetilamina (DMA) e o éster 2- etilhexil (EHE) são as formulações mais comumente usadas em todo o mundo (ISLAM *et al.*, 2018) e que necessitam de investigações acerca do seu potencial risco ambiental.

Este herbicida é aplicado diretamente no solo ou pulverizado nas lavouras e pode se concentrar progressivamente nos compartimentos ambientais, afetando organismos não alvos (MARCATO; DE SOUZA; FONTANETTI, 2017). Devido a sua alta solubilidade na água, o 2,4-D tem sido frequentemente detectado em águas superficiais, subterrâneas e potáveis em todo o mundo e pode representar um risco para os organismos, desde bactérias até humanos (BROVINI *et al.*, 2021;

SYAFRUDIN *et al.*, 2021). Assim, estudos toxicológicos do herbicida 2,4-D são desenvolvidos a fim de identificar possíveis efeitos adversos nos organismos e no meio ambiente (GRISOLIA, 2005). Estudos com animais, por exemplo, fornecem dados para o estabelecimento de legislações e normativas de controle da presença do 2,4-D no ambiente e determinação de concentrações e doses limites e aceitáveis (HEALTH CANADA, 2020; USEPA, 2005; WHO, 2003).

Diante disso, este trabalho buscou abordar as respostas toxicológicas de organismos não-alvos expostos ao herbicida 2,4-D, por meio de uma revisão meta-analítica e uma experimentação. A partir da meta-análise buscou-se sintetizar os dados disponíveis na literatura sobre o efeito letal do 2,4-D em animais, abordando estudos com concentrações ambientais, a fim de apresentar um resultado baseado em condições ambientais realísticas, desde aquelas obtidas logo após a aplicação do herbicida até as mensuradas aleatoriamente no ambiente natural.

O bioensaio fez o uso de fases iniciais de desenvolvimento do peixe *Rhamdia quelen* (QUOY; GAIMARD, 1824) para avaliar efeitos letais e subletais de uma formulação comercial do 2,4-D, a base do sal dimetilamina (DMA). Foram abordados os efeitos genotóxicos, comportamentais e teratológicos das larvas após ensaio agudo com concentrações permissíveis e também realísticas de 2,4-D.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Poluição aquática em agroecossistemas

Em virtude das crescentes críticas que o sistema agrícola vigente vem recebendo, abordagens alternativas têm surgido e se difundido na sociedade ao longo dos últimos anos. Uma dessas alternativas são os agroecossistemas, definidos por alguns autores como um ecossistema mais sustentável que abrange a produção agrícola, com finalidade de produção de alimentos e outros produtos agropecuários, bem como busca manter elementos bióticos e abióticos (KAZEMI; KLUG; KAMKAR, 2018; KOZIOSKI; CIOCCA, 2006). Dentro deste ecossistema está o homem, tanto como produtor quanto consumidor, englobando as dimensões socioeconômicas, de saúde pública e ambiental (KOZIOSKI; CIOCCA, 2006).

O manejo inadequado dos agroecossistemas configura-se um perigo ao seu equilíbrio e diante das mudanças climáticas, do aumento populacional humano e da demanda por alimentos e combustível, induziram mudanças notáveis no uso da terra por práticas agrícolas altamente tecnificadas (EVANS *et al.*, 2019; ERNST *et al.*, 2018), inconsistentes com a ideia de sustentabilidade. A produção de alimento se intensificou com o emprego de sementes selecionadas e geneticamente modificadas, máquinas agrícolas, agrotóxicos, fertilizantes entre outras (BORSOI *et al.*, 2014). Em consequência da expansão e a intensificação da agricultura, a exploração dos recursos naturais se elevou, provocando degradação de habitats e poluição do solo, do ar e da água (EVANS *et al.*, 2019; VARGAS; HILLIG; NETTO, 2013).

Com a finalidade de maior produção o uso de agroquímicos aumentou, mesmo em agroecossistemas (DAAM *et al.*, 2019). Estas substâncias permitiram o aumento da produção agrícola, controlando vetores de doenças e pragas, mas seu uso desordenado e excessivo passou a provocar diversos impactos no ambiente (CASSAL *et al.*, 2014). O emprego inadequado de pesticidas tem como consequência o desaparecimento de algumas espécies de insetos com funções ecossistêmicas extremamente importantes e o surgimento de novas pragas (BREVIK *et al.*, 2018). Além disso, o uso contínuo de herbicidas levou a seleção de plantas daninhas resistentes, bem como a adoção de culturas transgênicas tolerantes a

herbicidas provocou mudanças significativas nos padrões de uso de herbicidas no mundo (PEROTTI *et al.*, 2020).

Um dos ambientes mais impactados é o aquático e dentro de um agroecossistema a água é um recurso essencial para a produtividade. Os ecossistemas aquáticos são o destino final de muitas substâncias, entre elas os resíduos agrícolas, que adentram os corpos hídricos diretamente pela água da chuva e irrigação e indiretamente pela percolação no solo, chegando aos lençóis freáticos, pela volatilização de compostos, pulverização e transporte por correntes de ar (ARIAS *et al.*, 2007; ISLAM *et al.*, 2018; TOMITA; BEYRUTH, 2002a; VRYZAS, 2018). Tal fato é preocupante, pois essas substâncias são persistentes no ambiente e, conseqüentemente, afetam organismos não-alvos, sendo tóxicas e acarretando no desequilíbrio da comunidade (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014; MATASIN *et al.*, 2011).

É perceptível, no atual cenário econômico, que a produção e liberação de pesticidas na natureza é cada vez maior e certamente trará conseqüências. Desde a publicação do livro Primavera Silenciosa, a população mundial começou a se preocupar cada vez mais com a poluição desencadeada pelos agrotóxicos (DINAR; TIEU; HUYNH, 2019). Estudos revelam a presença constante de xenobiontes na água, sendo necessário o estabelecimento de regras e leis de controle sobre a concentração destas substâncias nos corpos d'água (EVANS *et al.*, 2019; MALAJ *et al.*, 2014).

2.2 Herbicida ácido diclorofenoxiacético (2,4-D)

O 2,4-D é um herbicida com fórmula molecular $C_8H_6Cl_2O_3$ que atua principalmente no controle de dicotiledôneas de folha larga, sendo utilizado como herbicida sistêmico pré e pós-emergente (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002; AQUINO *et al.*, 2007; ISLAM *et al.*, 2018) e no controle de plantas aquáticas (USEPA, 2005). Este herbicida foi o primeiro a ser introduzido no mercado para o controle de plantas daninhas de folha larga em 1940 (USEPA, 2005; ISLAM *et al.*, 2018) e ocupa, atualmente, o terceiro lugar dos herbicidas mais utilizados em escala global (MARCHI; MARCHI; GUIMARÃES, 2008; TODD *et al.*, 2020). Juntamente com o ácido 2,4,5- triclorofenoxiacético (2,4,5- T) e o pentaclorofenol, o 2,4-D formou

o “Agente Laranja”, utilizado na Guerra do Vietnã, como um agente desfolhante (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002; ISLAM *et al.*, 2018).

Por ser um membro da família dos clorofenoxiacéticos, atua como um regulador de crescimento em plantas mimetizando o hormônio vegetal auxina, provocando a morte das plantas pelo excesso de estímulo na divisão celular (ISLAM *et al.*, 2018; SONG, 2014). Seu mecanismo de ação é sistêmico e penetra pela folha, alcançando os vasos condutores e se espalhando pela planta (SONG, 2014). O 2,4-D aumenta a plasticidade das paredes celulares, a síntese de proteínas e etileno (USEPA, 2005). A combinação dessas mudanças faz com que as células se dividam de forma descontrolada, danificando tecidos e provocando a morte da planta (WAFA; IKBAL; MOHAMED, 2011).

Devido ao seu modo de ação, o 2,4-D é usado com frequência nas lavouras, combatendo plantas daninhas perenes, bem como no controle de invasoras nos corpos da água (DEHNERT; KARASOV; WOLMAN, 2019; ISLAM *et al.*, 2018; SONG, 2014). As formulações comerciais são facilmente solúveis em água e outros solventes que resultam em rápida penetração através das folhas e raízes, tornando o herbicida mais eficaz (ISLAM *et al.*, 2018). Além da forma ácida, existem inúmeros sais e ésteres, sendo mais frequente: sal de sódio (Na), sal de dietanolamina (DEA), sal de dimetilamina (DMA), sal de isopropilamina (IPA), sal de triisopropanolamina (TIPA), éster 2-butoxietyl (BEE), 2-etilhexil éster (2-EHE) e éster isopropílico (IPE) (USEPA, 2005), compreendendo mais de 1,500 formulações comerciais (ISLAM *et al.*, 2018).

A comercialização do 2,4-D movimentou mais de 18 mil toneladas em 2012 nos Estados Unidos da América (ATWOOD, 2017). A China chegou a produzir 40.000 toneladas do herbicida em 2010 (LIU *et al.*, 2013). Além disso, países em desenvolvimento como a Índia, Argentina e Brasil, possuem um grande consumo de 2,4-D (MERINI *et al.*, 2007). O Brasil consumiu mais de 48.000 toneladas no ano de 2018 e no ano anterior obteve o maior consumo em 10 anos, com mais de 57.000 toneladas de 2,4-D (BROVINI *et al.*, 2021).

Em 2015, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) aprovou uma variedade de soja geneticamente modificada resistente ao herbicida 2,4-D no Brasil (CTNBIO, 2015). Cultivares resistentes ao 2,4-D já são comercializados nos Estados Unidos (ISLAM *et al.*, 2018) e se adotado amplamente aumentarão a

demanda no uso de 2,4-D, levantando a questão de como este produto químico afetará os ecossistemas (FREYDIER; LUNDGREN, 2016). O surgimento de plantas daninhas resistentes ao 2,4-D está ligado a frequência de aplicação nas lavouras e na taxa na qual o herbicida é aplicado, resultando na seleção rápida de populações resistentes (PETERSON *et al.*, 2016).

No ambiente aquático, as concentrações de agrotóxicos variam sazonalmente dependendo do tempo de aplicação e o mecanismo de transporte, aumentando principalmente durante as chuvas (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014). Após a aplicação, o 2,4-D é distribuído em vários compartimentos do ambiente, podendo adentrar os corpos da água por meio de fontes pontuais como equipamentos de pulverização defeituosos, lavagem de tanques, eliminação de resíduos e aplicação direta em lagoas, e por fontes difusas originárias da deriva, lixiviação e escoamento superficial (ISLAM *et al.*, 2018; WAFA; IKBAL; MOHAMED, 2011). Entretanto, o destino do 2,4-D no ambiente depende dos processos de hidrólise, fotólise, volatilização e degradação microbiana. Além disso, o destino do 2,4-D pode ainda ser modificado pela frequência e magnitude dos eventos de chuva, regime de irrigação e condições do vento durante aplicação, bem como composição geológica do solo (WAFA; IKBAL; MOHAMED, 2011).

A degradação do 2,4-D é um processo de extrema importância e é influenciado por processos abióticos e bióticos (ISLAM *et al.*, 2018). Na água irá biodegradar a uma taxa dependente do nível de nutrientes presentes, temperatura, disponibilidade de oxigênio e a presença de outros contaminantes (WAFA; IKBAL; MOHAMED, 2011). A degradação aeróbia e anaeróbia são possíveis na água, embora a degradação anaeróbica seja relativamente lenta, com meia-vida de 312 dias (WAFA; IKBAL; MOHAMED, 2011). As comunidades microbianas permitem a degradação do 2,4-D em 2,4-diclorofenol, mas antes da sua degradação, o 2,4-D pode desencadear alterações nas comunidades aquáticas (ISLAM *et al.*, 2018).

O 2,4-D possui uma meia vida de 15 dias em água com condições aeróbicas, mas pode chegar a 300 dias sob influência da qualidade da água (ISLAM *et al.*, 2018). Devido a sua alta solubilidade na água, o 2,4-D tem sido frequentemente detectado em águas superficiais e subterrâneas em todo o mundo e a persistência de formulações de herbicidas 2,4-D pode representar um risco para os organismos

aquáticos (BROVINI *et al.*, 2021; ISLAM *et al.*, 2018; PINHEIRO; SILVA; KRAISCH, 2010).

Com a Resolução-RE Nº 2.080/2019, o 2,4-D passou por uma reclassificação toxicológica no Brasil. Antes era classificado na categoria 1, sendo considerado extremamente tóxico, com a reclassificação passou para a categoria 4, indicando um produto pouco tóxico (BRASIL, 2019). A legislação brasileira estabelece a quantidade máxima deste herbicida dependendo da classificação das águas. Para águas doces superficiais de classe I e II, o limite é de $4 \mu\text{g.L}^{-1}$, para as de classe III é de $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ (CONAMA, 2005) e para a água potável o limite é de $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ (BRASIL, 2011). Na tabela 1 é possível verificar o limite deste herbicida em diferentes regiões no mundo.

Tabela 1 – Limite máximo permitido de 2,4-D em todo o mundo

País	Quantidade máxima permitida
União Europeia	$0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$
Argentina	$4 \mu\text{g.L}^{-1}$
Brasil	$30 \mu\text{g.L}^{-1}$
EUA	$70 \mu\text{g.L}^{-1}$
Canadá	$100 \mu\text{g.L}^{-1}$
Organização Mundial da Saúde	$30 \mu\text{g.L}^{-1}$

Fonte: Zuanazzi, Ghisi e Oliveira (2020)

O 2,4-D é detectado com certa frequência nas águas subterrâneas e superficiais em todo o mundo. As concentrações apresentam valores variados e vão desde 62 ng.L^{-1} na Espanha (RODIL *et al.*, 2012) a $12 \mu\text{g.L}^{-1}$ nos Estados Unidos (ENSMINGER *et al.*, 2013). No meio ambiente, as concentrações ambientais estimadas de 2,4-D em corpos de água variam de 4 a $24 \mu\text{g.L}^{-1}$, enquanto em campos agrícolas sua concentração chega a $4.000 \mu\text{g.L}^{-1}$ dependendo do regime de aplicação na lavoura (ATAMANIUK *et al.*, 2013), mas há relatos na literatura que apontam concentrações de até $636 \mu\text{g.L}^{-1}$ em água logo após a sua pulverização (ISLAM *et al.*, 2018). O 2,4-D também já foi detectado no ar e em alimentos (WILSON *et al.*, 2003).

2.3 Interações do 2,4-D com organismos não-alvos

Quando um herbicida entra em contato com o ambiente, ele interage com os organismos vivos e pode desencadear uma série de alterações em sua estrutura

biológica de forma dependente da toxicidade e do tempo de exposição ao herbicida (ARIAS *et al.*, 2007). Tanto invertebrados como vertebrados possuem a capacidade de acumular em seu organismo substâncias tóxicas e que podem apresentar efeitos letais e/ou subletais (MOHAMMED, 2013). Entre os efeitos subletais encontram-se alterações no desenvolvimento, na reprodução, na fisiologia, no comportamento e no desenvolvimento de patologias (TOMITA; BEYRUTH, 2002). Devido a capacidade de resposta a um agente estressor, estes organismos são utilizados na avaliação da toxicidade de produtos químicos e apresentam alterações nos diferentes níveis de organização biológica (SIDDIG *et al.*, 2016).

Segundo Tomita e Beyruth (2002), a resposta biológica a um agente estressor depende do tipo de exposição, da suscetibilidade do organismo e das características do agente. A duração e frequência de exposição também afetam as respostas biológicas. Durante a exposição aguda, os organismos ficam em contato com o agente durante poucos dias, resultando em uma rápida absorção e um efeito mais imediato, já na exposição crônica, os organismos ficam um longo período em contato com o agente, produzindo efeitos desenvolvimento mais lento (COSTA *et al.*, 2008).

Mohammed (2013) afirma que indivíduos mais jovens são mais suscetíveis do que adultos. Este fato é observado em decorrência dos mecanismos de detoxificação ainda se apresentarem em desenvolvimento. Neste sentido surge uma preocupação com as fases iniciais do desenvolvimento dos organismos aquáticos. A permanência de um fator de estresse por um período prolongado pode resultar em danos ao organismo, afetando a sua sobrevivência e reprodução (COLÓN-CRUZ *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2020).

Muitos trabalhos de toxicologia fazem uso de organismos jovens e/ou adultos, mas os xenobióticos afetam também a sobrevivência dos ovos e larvas e/ou prejudicam o organismo afetando o desenvolvimento de gerações futuras (COLÓN-CRUZ *et al.*, 2018). O efeito letal ou subletal a um indivíduo afeta sua população e, em longo prazo, altera a composição da comunidade, o que pode desestabilizar toda a cadeia ecológica e afetar a biodiversidade (BRITO *et al.*, 2018; SOBJAK *et al.*, 2017). O emprego de fases iniciais de desenvolvimento é uma alternativa nos testes toxicológicos e permite avaliar a influência do xenobionte nas diferentes fases ontogenéticas e compreender sua ação (CAPELA *et al.*, 2020).

Como já citado, a resposta aos poluentes pode se manifestar em vários níveis de organização biológica. Os níveis superiores compreendem as populações, comunidades e ecossistemas, observando nestes níveis alterações na taxa de natalidade e mortalidade, abundância, densidade e riqueza. Respostas em níveis superiores são observáveis após longos períodos de exposição a alguns contaminantes (ARIAS *et al.*, 2007; LIEBEL; TOMOTAKE; OLIVEIRA-RIBEIRO, 2013). Em níveis de organização inferiores as alterações atingem o indivíduo, seus órgãos, tecidos, células e a sua fisiologia a nível químico e molecular. Os efeitos de contaminantes neste nível são mais fáceis de detectar, de forma mais precoce, permitindo uma especificidade da resposta e uma compreensão da relação dos contaminantes com as mudanças biológicas (LIEBEL; TOMOTAKE; OLIVEIRA-RIBEIRO, 2013).

A avaliação de parâmetros em diferentes níveis de organização fornece informações complementares necessárias para análise de risco ecológico (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Quanto maior a concentração de pesticidas e mais longo o período de exposição, maiores as chances de impactos negativos atingirem níveis superiores de organização biológica (ARIAS *et al.*, 2007; LIEBEL; TOMOTAKE; OLIVEIRA-RIBEIRO, 2013).

Quando os animais são expostos a um produto químico, esta exposição pode ocorrer por inalação, ingestão ou a presença da substância no ambiente em que vive os organismos, como a água e o solo (MARCATO; DE SOUZA; FONTANETTI, 2017). O 2,4-D pode restringir o crescimento, induzir problemas reprodutivos e mudanças no comportamento, morfologia e fisiologia, além de provocar a morte de espécies não objetivadas como plantas, animais e microrganismos (ISLAM *et al.*, 2018).

Na literatura há registro de efeitos letais e subletais do 2,4-D em animais. Para *Daphnia magna* a CL₅₀ foi maior que 100 mg.L⁻¹ (HEGGSTROM, 2009) e para adultos da tilápia do Nilo foi de 86,90 mg.L⁻¹ (SARIKAYA; SELVI, 2005). Coelhos e ratos apresentaram uma DL₅₀ de 2.000 e 1.090 mg.kg⁻¹, respectivamente, após exposição oral ao 2,4-D (GORZINSKI *et al.* 1987). A sobrevivência de insetos foi reduzida pelo 2,4-D alterando o ciclo de vida (SIGMON, 1979) e ocorreu redução da população de joaninhas após serem expostas ao agrotóxico (FREYDIER; LUNDGREN, 2016).

Ratos submetidos a exposição via oral de 15, 75 e 150 mg.kg⁻¹ por peso corporal de 2,4-D, por quatro semanas, apresentaram um alto efeito tóxico sobre o fígado (WAFSA *et al.*, 2010). Peixes expostos a altas concentrações de 2,4-D apontaram estresse oxidativo (ATAMANIUK *et al.*, 2013) e danos no fígado e brânquias (BENLI *et al.*, 2016; CATTANEO *et al.*, 2008). A exposição ao 2,4-D produziu neurotoxicidade, estresse oxidativo, dano ao DNA em sapos (LAJMANOVICH *et al.*, 2015) e prejudicou a metamorfose (ARONZON *et al.*, 2011). Minhocas expostas ao 2,4-D apresentaram redução na aptidão (HATTAB *et al.*, 2015) e crustáceos tiveram a reprodução prejudicada (PINTO *et al.*, 2021a).

Considerando as preocupações apontadas e documentadas por diversos autores na literatura e a necessidade de sumarizar e ampliar o conhecimento sobre os efeitos toxicológicos do 2,4-D em animais, em especial em fases iniciais de desenvolvimento, é a principal motivação e justificativa para a realização do presente estudo, o qual foi concebido em duas etapas, as quais serão apresentadas a seguir.

3 A EXPOSIÇÃO A CONCENTRAÇÕES REALÍSTICAS DE ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO AUMENTA A LETALIDADE EM ANIMAIS? UMA REVISÃO META-ANALÍTICA

3.1 Introdução

Os estudos toxicológicos da letalidade do 2,4-D em animais são base para a determinação de limites de concentração para águas superficiais, subterrâneas e potáveis, bem como de doses aceitáveis da ingestão diária para humanos (HEALTH CANADA, 2020; USEPA, 2005; WHO, 2003). Muitos estudos avaliam o efeito letal desse herbicida em diferentes organismos e frequentemente apresentam resultados conflitantes ou contraditórios.

Estudos recentes demonstram que o 2,4-D possui efeitos tóxicos sobre vários animais, revelando em invertebrados uma diminuição da reprodução e alteração no comportamento de anfípodes (PINTO *et al.*, 2021a) e alterações no ciclo de vida de insetos (PINTO *et al.*, 2021b), por exemplo. Em vertebrados, foi constatada a redução da sobrevivência em seis espécies de peixes (DEHNERT *et al.*, 2021) e inibição do crescimento e danos teratológicos em girinos (VIRIATO *et al.*, 2021). Contudo, alguns trabalhos tem apontado resultados opostos. Estudos relatam que o 2,4-D não afetou a reprodução de microscrustáceo (KASHIAN; DODSON, 2002), não comprometeu a sobrevivência de insetos (DAVIS, 1968; REES; FAY, 1989), bivalves (LINDSAY *et al.*, 2010), girinos (RELYEA, 2005a) e peixes (DEHNERT *et al.*, 2018).

As doses e concentrações de 2,4-D utilizadas nos estudos são variadas, desde valores realísticos, encontrados nos ecossistemas naturais, até medidas elevadas em progressão exponencial, cuja finalidade é avaliar tolerância fisiológica de animais expostos. Além disso, há divergências evidentes no tempo de duração dos ensaios, na via de exposição, estágios de desenvolvimento destes animais, bem como nas diferentes formulações do herbicida.

Desta forma, a meta-análise é uma ferramenta útil para compilar resultados de diferentes estudos, sintetizando e formando uma conclusão estatisticamente confiável sobre o assunto (COOPER, 2010). Através de métodos estatísticos é possível combinar resultados quantitativos de vários estudos para produzir um

resumo geral sobre um determinado tópico (LITTELL; CORCORAN; PILLAI, 2008; COOPER, 2010).

A meta-análise é usada para analisar tendências centrais e variações nos resultados entre os estudos. Os resultados dos estudos originais geralmente são convertidos para uma ou mais métricas comuns, chamadas de tamanho do efeito, que são então combinadas entre os estudos, permitindo sintetizar os resultados de estudos que usam diferentes medidas ou relatar o resultado de maneiras diferentes (LITTELL; CORCORAN; PILLAI, 2008). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito letal do herbicida 2,4-D em diversas espécies de animais por meio de uma meta-análise.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Identificação e seleção de estudos

A busca foi inicialmente realizada nas bases de dados Web of Science (todas as bases de dados) e Scopus, pois representam as duas maiores bases da literatura científica mundial. Para o desenvolvimento da meta-análise, foram pesquisados artigos com dados do efeito letal do 2,4-D em animais. Para tanto, foram utilizados os seguintes scripts booleanos: #1 TS = “2,4-D” OR “2,4-dichlorophenoxyacetic” AND “toxicity” e #2 TS = “2,4-D OR 2,4-dichlorophenoxyacetic” AND “survival OR mortality”, para identificar artigos com dados sobre sobrevivência e mortalidade de organismos expostos ao 2,4-D. A pesquisa abrangeu as publicações de 1945 a abril de 2021.

Todos os títulos e resumos obtidos da busca inicial foram lidos a fim de identificar as publicações relevantes para esta pesquisa. Os critérios utilizados para selecionar essas publicações foram (i) os estudos que avaliaram o efeito tóxico do herbicida 2,4-D sobre animais e (ii) os artigos com dados numéricos de efeito letal. Apenas os trabalhos enquadrados nestes dois critérios de elegibilidade foram abertos e analisados na íntegra para a extração dos dados.

Em seguida, foram adotados critérios de refinamento para elaboração da matriz de dados, sendo excluídos estudos que: (1) Avaliaram o 2,4-D em mistura com outros pesticidas; (2) Não apresentaram o número amostral dos grupos

avaliados; (3) Não apresentaram dados de um grupo controle; (4) Determinaram apenas a CL_{50} e/ou DL_{50} ; (5) Utilizaram concentrações acima de $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$. Esse limite máximo de concentração de 2,4-D foi determinado após extensa verificação na literatura, na qual encontrou-se estudos que avaliam concentrações muito elevadas e improváveis de serem detectadas no ambiente. Desta forma, buscou-se apenas dados de letalidade correlacionados a concentrações realísticas, conforme dados apresentados por Islam *et al.* (2018) para ambientes aquáticos. Para dose não foi possível determinar um limite, em virtude de a literatura apresentar valores limites apenas para humanos.

Uma tabela foi estruturada com os dados dos artigos selecionados após o refinamento, com as seguintes informações: identificação do artigo, autor, ano de publicação, formulação do herbicida 2,4-D (puro ou comercial), organismo testado, estágio de vida, rota de exposição, concentração (mg.L^{-1}) ou dose (mg.kg^{-1}) de 2,4-D, tempo de exposição (dias), número de indivíduos vivos e mortos (no controle e no grupo experimental) e número amostral dos grupos. Para a inclusão neste estudo, o artigo deveria apresentar dados de pelo menos um grupo controle e um grupo experimental. Para os trabalhos que testaram mais de um tempo, concentração ou dose, mas apresentavam apenas um controle foi optado por: (1) Utilizar o maior tempo de exposição; (2) Considerar os dados do grupo experimental com a maior concentração de 2,4-D testada até o limite de $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ (critério explicado acima); (3) Para estudos envolvendo doses foram consideradas as doses médias utilizadas, para evitar uma superestimativa dos tamanhos dos efeitos.

Os tempos de exposição dos estudos foram convertidos em dias, as concentrações convertidas em mg.L^{-1} e as doses em mg.kg^{-1} de peso corporal do organismo. Os estudos que apresentavam seus resultados em percentual ou formato gráfico foram transformados em números reais (ROHATGI, 2020), de acordo com o número amostral descrito na metodologia. Os dados foram extraídos e avaliados por dois pesquisadores, independentemente.

3.2.2 Análise de dados

Após a obtenção dos dados, foi utilizado o software livre OpenMEE (WALLACE *et al.*, 2017) para a realização dos testes meta-analíticos. O tamanho do

efeito foi calculado individualmente para cada estudo e reflete a magnitude do efeito do tratamento (BORENSTEIN *et al.*, 2009). Neste estudo, foi avaliado o efeito letal exercido pelo 2,4-D sobre os organismos analisados.

A estimativa do efeito de cada variável foi calculada por meio do *Risk Difference* (equação 1), bem como foi obtido a variação e o erro padrão pelas equações 2 e 3, respectivamente. Onde A é o número de mortos no grupo tratado; B é o número de vivos no grupo tratado; C o número de mortos no grupo controle; D é o número de vivos no grupo controle; n_1 é o número amostral do grupo tratado; e n_2 o número amostral do grupo controle.

$$RiskDiff = \left(\frac{A}{n_1}\right) - \left(\frac{C}{n_2}\right) \quad (1)$$

$$V_{RiskDiff} = \frac{AB}{n_1^3} + \frac{CD}{n_2^3} \quad (2)$$

$$SE_{RiskDiff} = \sqrt{V_{RiskDiff}} \quad (3)$$

Os tamanhos dos efeitos adotados aqui variam de -1 a +1, onde zero é a ausência de diferença entre o grupo tratado e o grupo controle. Valores negativos indicam que o grupo controle teve um valor superior de mortalidade ao grupo experimental e valores positivos indicam que o grupo experimental apresentou valor superior de mortalidade em relação ao grupo controle (HEDGES, 1981). Em seguida, foi trabalhado com os tamanhos do efeito para avaliar a consistência do efeito entre os estudos e calcular um efeito sumário (E+) que é a média ponderada dos efeitos individuais de cada estudo, e representa a dimensão global do efeito de todos os estudos (BORENSTEIN *et al.*, 2009).

A heterogeneidade entre os estudos foi estimada pelo teste Cochran Q e pela estatística I^2 para determinar se os tamanhos de efeito entre os estudos são homogêneos. I^2 mostra a porcentagem de discrepância entre os estudos – varia de 0 a 100%. Segundo Cochran: 0-30%: heterogeneidade não importante; 31-50%: heterogeneidade moderada; 51-80%: heterogeneidade substancial; 81-100%: heterogeneidade alta (HIGGINS *et al.*, 2006).

As análises de subgrupos foram conduzidas para explorar a heterogeneidade potencial entre os estudos. Desta forma, o conjunto de dados em que foi avaliado o efeito letal em animais expostos ao 2,4-D, foi dividido nos subgrupos organismo (invertebrado e vertebrado) e grupo animal. Esses estudos também foram

subdivididos de acordo com as fases de vida, resultando em outros três subgrupos, compreendendo respectivamente os períodos de desenvolvimento larval, juvenil e adulto. Os estudos utilizados avaliaram tanto a formulação comercial quanto a pura. Desta forma, foram divididos nas duas categorias de formulação. As vias de exposição ao herbicida 2,4-D foram avaliadas com o intuito de identificar possíveis diferenças entre os meios de exposição dos animais.

O viés de publicação é a publicação seletiva de resultados estatisticamente significativos, que favorecem o grupo tratado. O viés de publicação foi explorado pelo gráfico de funil. O número a prova de falhas de Rosenthal, Orwin e Rosenberg foram calculados para este estudo.

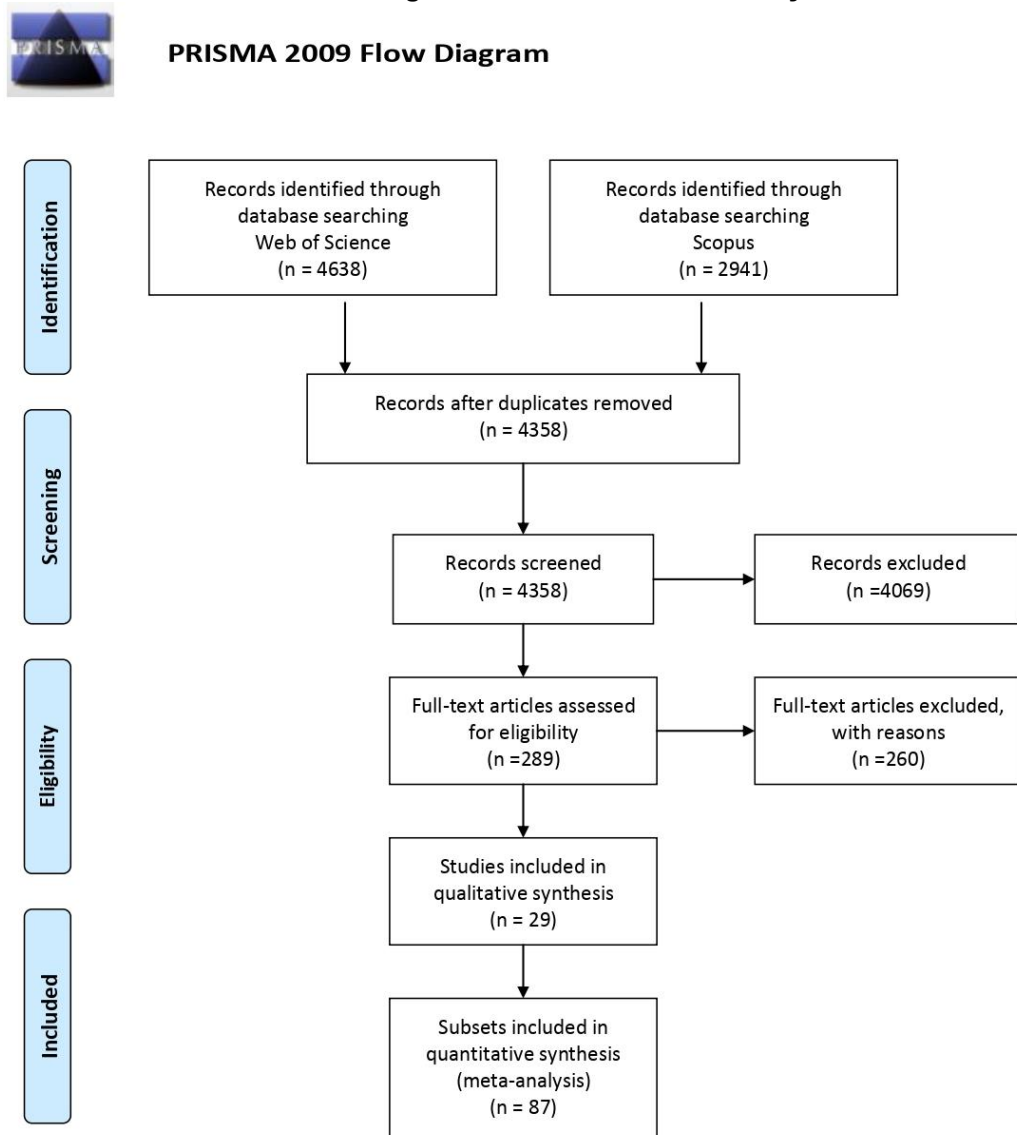
3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Resumo dos resultados de pesquisa

A pesquisa nas bases de dados resultou em 7.579 publicações, sendo 4.638 do Web of Science e 2.941 do Scopus. Estudos duplicados e que não atenderam os critérios de elegibilidade foram excluídos. Esta etapa representou a exclusão de boa parte dos resultados, principalmente de trabalhos que empregaram o 2,4-D como hormônio em cultura de células e tecidos vegetais, avaliaram o efeito tóxico em plantas daninhas, utilizaram bactérias, fungos e algas, não apresentavam dados de sobrevivência ou mortalidade, capítulos de livros e revisões. Posteriormente, cada artigo foi avaliado para verificar se apresentavam os dados necessários para a meta-análise. O fluxo completo que sumariza toda a pesquisa bibliográfica é apresentado na Figura 1.

Muitos artigos encontrados que avaliavam o efeito letal do 2,4-D em animais não puderam ser utilizados nesta análise, pois apresentavam dados de CL₅₀ e DL₅₀ dos organismos avaliados, que impossibilita a identificação do número de mortos e vivos no grupo tratado e controle. Além disso, muitos artigos utilizaram concentrações extremamente altas e fora do limite estabelecido neste estudo, e por este motivo, foram excluídos. Ao final do refinamento, 29 artigos foram selecionados, gerando 87 conjuntos de dados (Tabela 2).

Figura 1 – Fluxo de informações nas diferentes fases da revisão sistemática e seleção dos estudos incluídos. Fluxograma de acordo com a instrução PRISMA



Fonte: Adaptado de Moher *et al.* (2009, p. 3)

Tabela 2 – Dados sobre os estudos do efeito letal do 2,4-D em animais: número de identificação de cada estudo na meta-análise, citação de referência, grupo animal, espécie, fase de vida, via de exposição, formulação, concentração/dose utilizada e o tempo de exposição. Verde: estudos com resultado de tamanho de efeito positivo e significativo; Branco: estudos sem diferença significativa no tamanho de efeito; Rosa: estudos com resultado negativo e significativo.

									(continua)
Data set	Artigo	Grupo animal	Espécie	Fase de vida	Via de exposição	Formulação	Concentração ou dose	Tempo de exposição (dias)	
1	(DEQUATTRO; KARASOV, 2016)	peixe	<i>Pimephales promelas</i>	larva	imersão	comercial	0.05 mg.L ⁻¹	30	
2	(DEHNERT; KARASOV; WOLMAN, 2019)	peixe	<i>Danio rerio</i>	larva	imersão	puro	0.1 mg.L ⁻¹	21	
3	(DEHNERT; KARASOV; WOLMAN, 2019)	peixe	<i>Danio rerio</i>	larva	imersão	puro	0.1 mg.L ⁻¹	6	
4	(DEHNERT <i>et al.</i> , 2018)	peixe	<i>Pimephales promelas</i>	adulto	imersão	comercial	0.5 mg.L ⁻¹	28	
5	(DEHNERT <i>et al.</i> , 2018)	peixe	<i>Pimephales promelas</i>	larva	imersão	comercial	0.5 mg.L ⁻¹	30	
6	(DEHNERT <i>et al.</i> , 2018)	peixe	<i>Pimephales promelas</i>	larva	imersão	comercial	0.5 mg.L ⁻¹	30	
7	(DEHNERT <i>et al.</i> , 2018)	peixe	<i>Pimephales promelas</i>	larva	imersão	comercial	0.5 mg.L ⁻¹	30	
8	(DEHNERT <i>et al.</i> , 2018)	peixe	<i>Pimephales promelas</i>	larva	imersão	puro	0.5 mg.L ⁻¹	30	
9	(DEHNERT <i>et al.</i> , 2021)	peixe	<i>Acipenser fulvescens</i>	larva	imersão	comercial	0.5 mg.L ⁻¹	30	
10	(DEHNERT <i>et al.</i> , 2021)	peixe	<i>Sander vitreus</i>	larva	imersão	comercial	0.5 mg.L ⁻¹	30	
11	(DEHNERT <i>et al.</i> , 2021)	peixe	<i>Perca flavescens</i>	larva	imersão	comercial	0.5 mg.L ⁻¹	30	
12	(DEHNERT <i>et al.</i> , 2021)	peixe	<i>Esox lucius</i>	larva	imersão	comercial	0.5 mg.L ⁻¹	30	
13	(DEHNERT <i>et al.</i> , 2021)	peixe	<i>Esox masquinongy</i>	larva	imersão	comercial	0.5 mg.L ⁻¹	30	
14	(DEHNERT <i>et al.</i> , 2021)	peixe	<i>Catostomus commersonii</i>	larva	imersão	comercial	0.5 mg.L ⁻¹	30	
15	(DEHNERT <i>et al.</i> , 2021)	peixe	<i>Acipenser fulvescens</i>	juvenil	imersão	comercial	0.5 mg.L ⁻¹	90	
16	(DEHNERT <i>et al.</i> , 2021)	peixe	<i>Perca flavescens</i>	juvenil	imersão	comercial	0.5 mg.L ⁻¹	90	
17	(DEHNERT <i>et al.</i> , 2021)	peixe	<i>Sander vitreus</i>	juvenil	imersão	comercial	0.5 mg.L ⁻¹	90	
18	(DEHNERT <i>et al.</i> , 2021)	peixe	<i>Esox lucius</i>	juvenil	imersão	comercial	0.5 mg.L ⁻¹	90	
19	(DEHNERT <i>et al.</i> , 2021)	peixe	<i>Pimephales promelas</i>	juvenil	imersão	comercial	0.5 mg.L ⁻¹	90	
20	(PINTO <i>et al.</i> , 2021a)	crustáceo	<i>Hyalella meinerti</i>	adulto	imersão	comercial	0.447 mg.L ⁻¹	4	

Tabela 2 – Dados sobre os estudos do efeito letal do 2,4-D em animais: número de identificação de cada estudo na meta-análise, citação de referência, grupo animal, espécie, fase de vida, via de exposição, formulação, concentração/dose utilizada e o tempo de exposição. Verde: estudos com resultado de tamanho de efeito positivo e significativo; Branco: estudos sem diferença significativa no tamanho de efeito; Rosa: estudos com resultado negativo e significativo.

									(continua)
Data set	Artigo	Grupo animal	Espécie	Fase de vida	Via de exposição	Formulação	Concentração ou dose	Tempo de exposição (dias)	
21	(PINTO <i>et al.</i> , 2021a)	crustáceo	<i>Hyalella meinerti</i>	adulto	imersão	comercial	0.447 mg.L ⁻¹	7	
22	(PINTO <i>et al.</i> , 2021a)	crustáceo	<i>Hyalella meinerti</i>	adulto	imersão	comercial	0.447 mg.L ⁻¹	14	
23	(PINTO <i>et al.</i> , 2021a)	crustáceo	<i>Hyalella meinerti</i>	adulto	imersão	comercial	0.447 mg.L ⁻¹	14	
24	(PINTO <i>et al.</i> , 2021b)	inseto	<i>Chironomus sancticaroli</i>	larva	imersão	comercial	0.426 mg.L ⁻¹	8	
25	(TROUDI <i>et al.</i> , 2011)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	adulto	oral	puro	121 mg.kg ⁻¹	28	
26	(MORGULIS <i>et al.</i> , 1998)	ave	<i>Gallus gallus domesticus</i>	adulto	oral	comercial	375 mg.kg ⁻¹	7	
27	(PARK <i>et al.</i> , 2010)	inseto	<i>Chironomus riparius</i>	larva	imersão	puro	0.01 mg.L ⁻¹	32	
28	(CHARLES <i>et al.</i> , 1996a)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	adulto	oral	puro	76.67 mg.kg ⁻¹	365	
29	(CHARLES <i>et al.</i> , 1996a)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	adulto	oral	puro	76.67 mg.kg ⁻¹	365	
30	(CHARLES <i>et al.</i> , 1996a)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	adulto	oral	puro	76.67 mg.kg ⁻¹	730	
31	(CHARLES <i>et al.</i> , 1996a)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	adulto	oral	puro	76.67 mg.kg ⁻¹	730	
32	(HANSEN <i>et al.</i> , 1971)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	adulto	oral	puro	406 mg.kg ⁻¹	730	
33	(HANSEN <i>et al.</i> , 1971)	mamífero	<i>Canis lupus familiaris</i>	juvenil	oral	puro	500 mg.kg ⁻¹	730	
34	(CHARLES <i>et al.</i> , 1996b)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	juvenil	oral	puro	300 mg.kg ⁻¹	91	
35	(CHARLES <i>et al.</i> , 1996b)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	juvenil	oral	puro	300 mg.kg ⁻¹	91	

Tabela 2 – Dados sobre os estudos do efeito letal do 2,4-D em animais: número de identificação de cada estudo na meta-análise, citação de referência, grupo animal, espécie, fase de vida, via de exposição, formulação, concentração/dose utilizada e o tempo de exposição. Verde: estudos com resultado de tamanho de efeito positivo e significativo; Branco: estudos sem diferença significativa no tamanho de efeito; Rosa: estudos com resultado negativo e significativo.

									(continua)
Data set	Artigo	Grupo animal	Espécie	Fase de vida	Via de exposição	Formulação	Concentração ou dose	Tempo de exposição (dias)	
36	(CHARLES <i>et al.</i> , 1996b)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	juvenil	oral	comercial	300 mg.kg ⁻¹	91	
37	(CHARLES <i>et al.</i> , 1996b)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	juvenil	oral	comercial	300 mg.kg ⁻¹	91	
38	(WAFSA <i>et al.</i> , 2010)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	adulto	oral	comercial	80 mg.kg ⁻¹	28	
39	(TROUDI <i>et al.</i> , 2012)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	adulto	oral	puro	600 mg.kg ⁻¹	20	
40	(WAFSA <i>et al.</i> , 2011)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	adulto	oral	comercial	80 mg.kg ⁻¹	28	
41	(COOKE, 1972)	anfíbio	<i>Rana temporaria</i>	larva	imersão	puro	0.5 mg.L ⁻¹	7	
42	(LITTLE <i>et al.</i> , 1990)	peixe	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	juvenil	imersão	comercial	0.5 mg.L ⁻¹	4	
43	(RODRÍGUEZ; MONSERRAT; AMÍN, 1992)	crustáceo	<i>Uca uruguayensis</i>	adulto	imersão	puro	0.3 mg.L ⁻¹	28	
44	(RODRÍGUEZ; MONSERRAT; AMÍN, 1992)	crustáceo	<i>Chasmagnathus granulata</i>	juvenil	imersão	puro	0.5 mg.L ⁻¹	28	
45	(ORTIZ-SANTALIESTRA <i>et al.</i> , 2020)	ave	<i>Alectoris rufa</i>	juvenil	pulverização	puro	0.0017 mg.L ⁻¹	32	
46	(ORTIZ-SANTALIESTRA <i>et al.</i> , 2020)	ave	<i>Alectoris rufa</i>	juvenil	contato	puro	0.0017 mg.L ⁻¹	32	
47	(GERSICH; MILAZZO, 1990)	crustáceo	<i>Daphnia magna</i>	juvenil	imersão	puro	0.4 mg.L ⁻¹	14	
48	(GERSICH; MILAZZO, 1990)	crustáceo	<i>Daphnia magna</i>	juvenil	imersão	puro	0.4 mg.L ⁻¹	14	

Tabela 2 – Dados sobre os estudos do efeito letal do 2,4-D em animais: número de identificação de cada estudo na meta-análise, citação de referência, grupo animal, espécie, fase de vida, via de exposição, formulação, concentração/dose utilizada e o tempo de exposição. Verde: estudos com resultado de tamanho de efeito positivo e significativo; Branco: estudos sem diferença significativa no tamanho de efeito; Rosa: estudos com resultado negativo e significativo.

									(continua)
Data set	Artigo	Grupo animal	Espécie	Fase de vida	Via de exposição	Formulação	Concentração ou dose	Tempo de exposição (dias)	
49	(MOREIRA <i>et al.</i> , 2020)	crustáceo	<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	adulto	imersão	comercial	0.5 mg.L ⁻¹	8	
50	(FINLAYSON; VERRUE, 1985)	peixe	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	juvenil	imersão	comercial	0.124 mg.L ⁻¹	86	
51	(CHARLES <i>et al.</i> , 2001)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	adulto	oral	puro	36 mg.kg ⁻¹	9	
52	(CHARLES <i>et al.</i> , 2001)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	adulto	oral	comercial	54.2 mg.kg ⁻¹	9	
53	(CHARLES <i>et al.</i> , 2001)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	adulto	oral	comercial	54.17 mg.kg ⁻¹	9	
54	(CHARLES <i>et al.</i> , 2001)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	adulto	oral	comercial	72.67 mg.kg ⁻¹	9	
55	(CHARLES <i>et al.</i> , 2001)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	adulto	oral	comercial	81 mg.kg ⁻¹	9	
56	(CHARLES <i>et al.</i> , 2001)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	adulto	oral	comercial	64.33 mg.kg ⁻¹	9	
57	(CHARLES <i>et al.</i> , 2001)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	adulto	oral	comercial	43.33 mg.kg ⁻¹	9	
58	(CHARLES <i>et al.</i> , 2001)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	adulto	oral	comercial	46.67 mg.kg ⁻¹	9	
59	(CHARLES <i>et al.</i> , 2001)	mamífero	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	adulto	oral	puro	43.33 mg.kg ⁻¹	12	
60	(CHARLES <i>et al.</i> , 2001)	mamífero	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	adulto	oral	comercial	23.7 mg.kg ⁻¹	12	
61	(CHARLES <i>et al.</i> , 2001)	mamífero	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	adulto	oral	comercial	43.33 mg.kg ⁻¹	12	
62	(CHARLES <i>et al.</i> , 2001)	mamífero	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	adulto	oral	comercial	38.33 mg.kg ⁻¹	12	
63	(CHARLES <i>et al.</i> , 2001)	mamífero	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	adulto	oral	comercial	38.33 mg.kg ⁻¹	12	

Tabela 2 – Dados sobre os estudos do efeito letal do 2,4-D em animais: número de identificação de cada estudo na meta-análise, citação de referência, grupo animal, espécie, fase de vida, via de exposição, formulação, concentração/dose utilizada e o tempo de exposição. Verde: estudos com resultado de tamanho de efeito positivo e significativo; Branco: estudos sem diferença significativa no tamanho de efeito; Rosa: estudos com resultado negativo e significativo.

									(continua)
Data set	Artigo	Grupo animal	Espécie	Fase de vida	Via de exposição	Formulação	Concentração ou dose	Tempo de exposição (dias)	
64	(CHARLES <i>et al.</i> , 2001)	mamífero	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	adulto	oral	comercial	38.33 mg.kg ⁻¹	12	
65	(CHARLES <i>et al.</i> , 2001)	mamífero	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	adulto	oral	comercial	38.33 mg.kg ⁻¹	12	
66	(LINDSAY <i>et al.</i> , 2010)	molusco	<i>Mya arenaria</i>	juvenil	imersão	comercial	0.5 mg.L ⁻¹	630	
67	(RELYEA, 2009)	anfíbio	<i>Rana pipiens</i>	larva	imersão	puro	0.016 mg.L ⁻¹	57	
68	(RELYEA, 2009)	anfíbio	<i>Hyla versicolor</i>	larva	imersão	puro	0.016 mg.L ⁻¹	57	
69	(KAYA <i>et al.</i> , 2019)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	adulto	oral	comercial	80 mg.kg ⁻¹	28	
70	(DAVIS, 1968)	inseto	<i>Ctenicera destructor</i>	larva	oral	puro	14666.67 mg.kg ⁻¹	180	
71	(MAROUANI <i>et al.</i> , 2017)	mamífero	<i>Rattus norvegicus domestica</i>	adulto	oral	puro	150 mg.kg ⁻¹	30	
72	(RELYEA, 2005b)	inseto	<i>Anax junius</i>	larva	imersão	comercial	0.12 mg.L ⁻¹	14	
73	(RELYEA, 2005)	inseto	<i>Belostoma flumineum</i>	adulto	imersão	comercial	0.12 mg.L ⁻¹	14	
74	(RELYEA, 2005)	inseto	<i>Lestes sp.</i>	larva	imersão	comercial	0.12 mg.L ⁻¹	14	
75	(RELYEA, 2005)	inseto	<i>Dytiscus sp.</i>	larva	imersão	comercial	0.12 mg.L ⁻¹	14	
76	(RELYEA, 2005)	inseto	<i>Tramea sp.</i>	larva	imersão	comercial	0.12 mg.L ⁻¹	14	
77	(RELYEA, 2005)	inseto	<i>Notonecta undulata</i>	adulto	imersão	comercial	0.12 mg.L ⁻¹	14	
78	(RELYEA, 2005)	anfíbio	<i>Ambystoma maculatum</i>	larva	imersão	comercial	0.12 mg.L ⁻¹	14	
79	(RELYEA, 2005)	anfíbio	<i>Rana pipiens</i>	larva	imersão	comercial	0.12 mg.L ⁻¹	14	
80	(RELYEA, 2005)	anfíbio	<i>Hyla versicolor</i>	larva	imersão	comercial	0.12 mg.L ⁻¹	14	
81	(RELYEA, 2005)	anfíbio	<i>Rana sylvatica</i>	larva	imersão	comercial	0.12 mg.L ⁻¹	14	
82	(RELYEA, 2005)	anfíbio	<i>Pseudacris crucifer</i>	larva	imersão	comercial	0.12 mg.L ⁻¹	14	

Tabela 2 – Dados sobre os estudos do efeito letal do 2,4-D em animais: número de identificação de cada estudo na meta-análise, citação de referência, grupo animal, espécie, fase de vida, via de exposição, formulação, concentração/dose utilizada e o tempo de exposição. Verde: estudos com resultado de tamanho de efeito positivo e significativo; Branco: estudos sem diferença significativa no tamanho de efeito; Rosa: estudos com resultado negativo e significativo.

Data set	Artigo	Grupo animal	Espécie	Fase de vida	Via de exposição	Formulação	Concentração ou dose	(conclusão)
								Tempo de exposição (dias)
83	(RELYEA, 2005)	inseto	<i>Acilius semisulcatus</i>	larva	imersão	comercial	0.12 mg.L ⁻¹	14
84	(RELYEA, 2005)	anfíbio	<i>Bufo americanus</i>	larva	imersão	comercial	0.12 mg.L ⁻¹	14
85	(RELYEA, 2005)	molusco	<i>Physa integra</i>	adulto	imersão	comercial	0.12 mg.L ⁻¹	14
86	(RELYEA, 2005)	molusco	<i>Stagnicola elodes</i>	adulto	imersão	comercial	0.12 mg.L ⁻¹	14
87	(RELYEA, 2005)	molusco	<i>Helisoma trivolvis</i>	adulto	imersão	comercial	0.12 mg.L ⁻¹	14

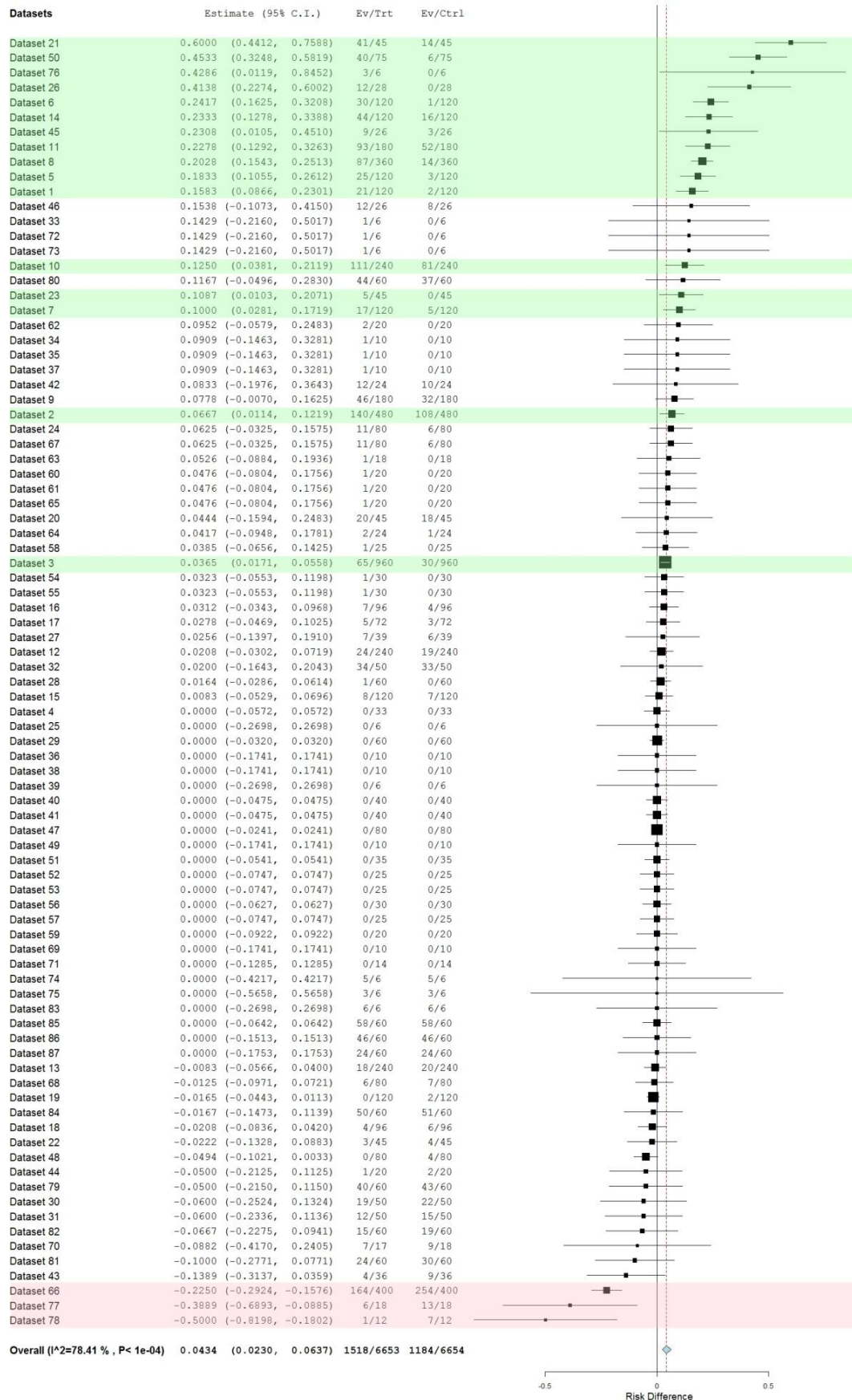
Fonte: Autoria própria (2021)

3.3.2 Análise do efeito letal do 2,4-D em animais

Dos 87 conjuntos de dados, 16 apresentaram efeito positivo, com aumento da mortalidade das espécies, principalmente peixes, expostos nos grupos tratados com o 2,4-D. Apenas três estudos indicaram maior número de eventos no grupo controle do que no grupo tratado. Estes estudos testaram formulações comerciais do 2,4-D, nas concentrações de 0.5 mg.L^{-1} em juvenis do molusco *Mya arenaria* (LINDSAY *et al.*, 2010) e 0.12 mg.L^{-1} em larvas do anfíbio *Ambystoma maculatum* e adultos do inseto *Notonecta undulata* (RELYEA, 2005b). Os demais estudos apresentaram tendências positivas ou negativas, porém com intervalos de confiança cruzando o zero e, portanto, sem efeito significativo.

O resultado geral da análise do efeito letal do 2,4-D em animais indicou diferença significativa entre o tratamento com 2,4-D e o controle ($E+ 0,043$; IC: $0,023-0,064$; $p < 0,001$). O intervalo de confiança não cruzou o zero, evidenciando que a exposição a este herbicida está relacionada ao aumento da letalidade em animais (Gráfico 1). Por outro lado, o teste de heterogeneidade mostra $Q (df = 86) = 398,243$ e $p < 0,001$, com I^2 de 78,41%, indicando que a heterogeneidade geral (I^2) também foi significativa. De acordo com a distribuição de Cochran, a heterogeneidade dos estudos foi substancial, apontando uma grande variabilidade entre os estudos. A heterogeneidade observada neste estudo deve-se ao fato de os conjuntos de dados abordarem animais invertebrados e vertebrados, de diferentes grupos e fases de desenvolvimento. Além disso, o tempo de duração da exposição, a formulação do 2,4-D e as vias de exposição foram diversificadas entre os estudos, o que resulta em dados não homogêneos. Desta forma, os dados foram subdivididos em grupos, a fim de compreender a elevada heterogeneidade.

Gráfico 1 – Gráfico de floresta dos tamanhos de efeito dos estudos da análise principal que avaliaram o efeito letal do 2,4-D em animais



Legenda: Datasets: identifica os conjuntos de dados, conforme tabela 1, incluindo o padrão de cores (verde: efeito positivo, rosa: efeito negativo, branco: sem efeito); Estimate (95% CI): representa o tamanho do efeito e o intervalo de confiança de 95%; Ev/Trt e Ev/Ctrl: número de eventos por tratamento ou pelo controle; Overall: I^2 indica o percentual e p a significância de heterogeneidade dos conjuntos de dados. Linha tracejada vermelha: grande média.

Fonte: A autoria própria (2021)

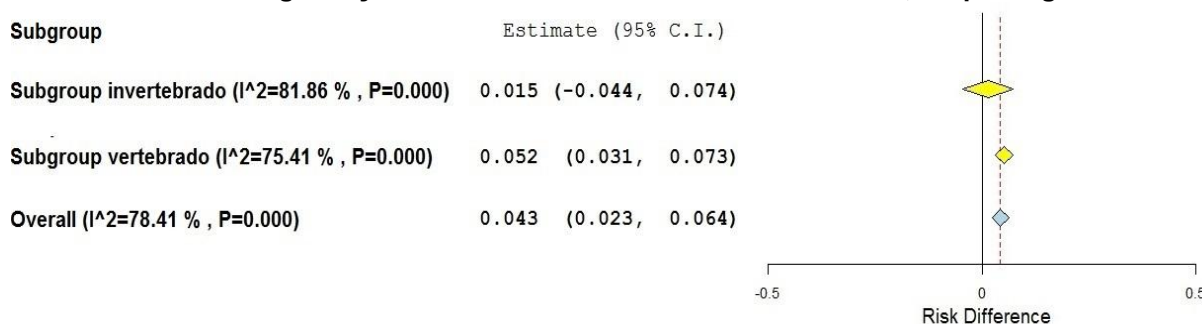
3.3.3 Categorização dos resultados

3.3.3.1 Organismos

Os organismos foram divididos em duas categorias: vertebrados e invertebrados. Dos 87 conjuntos de dados, 64 deles avaliaram vertebrados e 23 invertebrados. De acordo com os dados apresentados no gráfico 2, constata-se que a categoria “vertebrado” apresentou efeito sumário positivo e significativo ($E+0,052$; IC: $0,031-0,073$; $p<0,001$), ou seja, os organismos vertebrados que foram expostos ao 2,4-D apresentaram maiores índices de mortalidade do que os indivíduos do grupo controle. Esse subgrupo apresentou um pequeno intervalo de confiança.

No entanto, a categoria “invertebrado” não apresentou resultado significativo, pois ultrapassou o nulo com um intervalo de confiança mais amplo ($E+0,015$; IC: $-0,044-0,074$; $p=0,629$). Dessa forma, constata-se que dentre os organismos invertebrados, não houve diferença significativa no efeito letal do 2,4-D entre o grupo controle e o grupo tratado.

A heterogeneidade apresentou resultados distintos entre as categorias de organismos. De acordo com o padrão de Cochran, para invertebrados a heterogeneidade é considerada alta, pois apresentou I^2 de 81,86%, indicando portando, alta variância entre os estudos. A categoria “vertebrado” apresentou I^2 de 75,41%, indicando dessa forma uma menor heterogeneidade, mesmo assim, é considerada substancial. A heterogeneidade observada pode estar relacionada aos diferentes táxons presentes em cada subgrupo. Desta forma, os organismos foram separados de acordo com o grupo animal, a fim de compreender a elevada heterogeneidade.

Gráfico 2 – Categorização dos resultados sobre o efeito letal do 2,4-D por organismo

Legenda: Subgroup: identifica os as categorias dos conjuntos de dados; Estimate (95% CI): representa o tamanho do efeito e o intervalo de confiança de 95%; Overall: I² indica o percentual e p a significância de heterogeneidade dos conjuntos de dados. Linha tracejada vermelha: grande média.

Fonte: Autoria própria (2021)

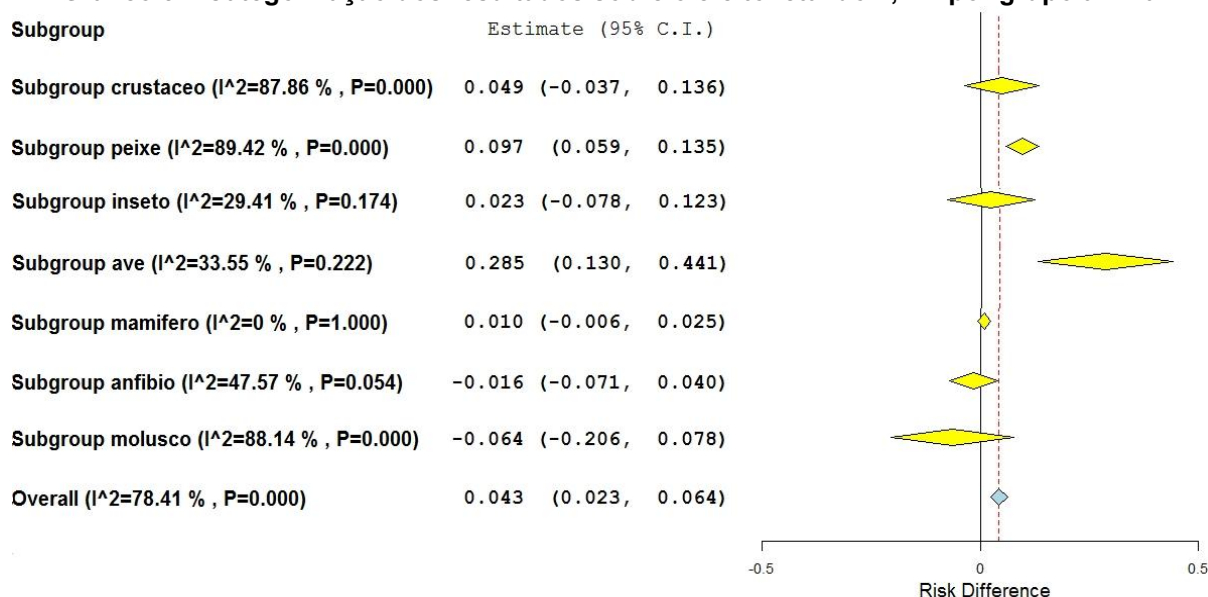
Para o conjunto de dados também foi estipulada a divisão em categorias de grupos de animais. Os estudos selecionados avaliaram a letalidade do 2,4-D em mamíferos (31), peixes (21), insetos (10), anfíbios (9), crustáceos (9), moluscos (4) e aves (3), cujos resultados para cada subgrupo são apresentados no gráfico 3. As categorias “peixe” e “ave” apresentaram diferenças em relação ao controle com E+ 0,097 (IC: 0,059–0,135; p<0,001) e E+ 0,285 (IC: 0,130–0,441; p<0,001), respectivamente. Estes dois grupos apresentaram aumento da mortalidade quando expostos ao 2,4-D, sendo mais susceptíveis ao efeito letal do herbicida.

Os grupos “crustáceo”, “inseto” e “mamífero” apresentaram valores positivos para o tamanho de efeito, porém o intervalo de confiança cruzou o nulo indicando que não há diferença entre o grupo controle e o grupo tratado com 2,4-D. “Anfíbio” e “molusco” foram as categorias com efeito negativo e cruzaram o nulo, não apresentando diferença entre os grupos avaliados para os estudos com estes animais. Desta forma, estudos com mamíferos, crustáceos, insetos, anfíbios e moluscos não evidenciaram redução significativa na sobrevivência dos organismos que são expostos ao herbicida.

De acordo com o padrão Cochrane, as categorias “crustáceo”, “peixe” e “molusco” apresentaram heterogeneidade alta, pois o I² apresentou valor acima de 80%. As categorias “ave” e “anfíbio” apresentaram heterogeneidade moderada, apresentando I² de 33,55% e 47,57% respectivamente. Já as categorias “inseto” e “mamífero” apresentaram heterogeneidade não importante, pois o I² não chegou a 30%, indicando, portanto, baixa variância entre os estudos que avaliaram o efeito

letal do 2,4-D nessas categorias.

Gráfico 3 – Categorização dos resultados sobre o efeito letal do 2,4-D por grupo animal



Legenda: Subgroup: identifica os as categorias dos conjuntos de dados; Estimate (95% CI): representa o tamanho do efeito e o intervalo de confiança de 95%; Overall: I^2 indica o percentual e p a significância de heterogeneidade dos conjuntos de dados. Linha tracejada vermelha: grande média.

Fonte: Autoria própria (2021)

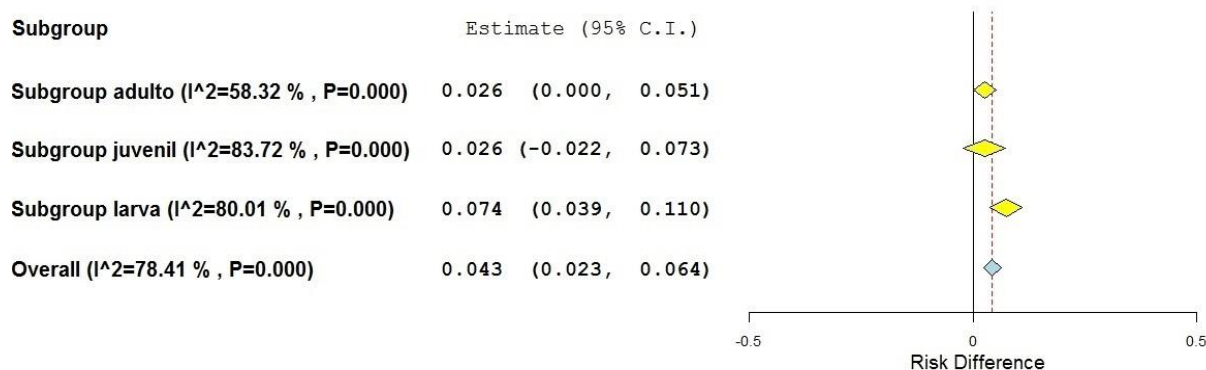
Grande parte dos estudos que compõe o conjunto de dados desta meta-análise avaliou a letalidade do 2,4-D em mamíferos e peixes. Do total de 87 conjuntos de dados, 52 compreendem essas duas categorias. Para mamíferos, essa predominância pode ser explicada pela maior proximidade evolutiva com os seres humanos, devido ao interesse nas suas respostas moleculares, celulares e fisiológicas. Os peixes, por sua vez, apresentam a maior riqueza taxonômica dentre os vertebrados (LINS *et al.*, 2010) e, além disso, são usados em teste de toxicidade há mais de 60 anos, por existir um conhecimento significativo da sua fisiologia, bioquímica, comportamento, reprodução, ciclo de vida e importância ecológica (MOHAMMED, 2013). O grupo “ave” apresentou resultado significativo, mas apenas 3 conjuntos de dados utilizaram estes animais para a avaliação do efeito letal do 2,4-D, apontando uma área a ser ainda explorada pelos pesquisadores.

3.3.3.2 Fase de vida

Do conjunto total de dados, 30 avaliaram a letalidade em larvas, 18 na fase juvenil e 39 em organismos adultos. De acordo com o gráfico 4, a exposição de organismos ao 2,4-D durante a fase larval e adulta resultou em um efeito letal significativo. Para as fases larvais e adultas o efeito sumário apresentou resultado positivo e significativo, sem cruzar o nulo ($E+ 0,074$; IC: $0,039-0,110$; $p=0,0001$ e $E+ 0,026$; IC: $0,0002-0,0513$; $p=0,0481$, respectivamente). Já a fase juvenil não apresentou diferença significativa quando exposta a concentrações de 2,4-D em relação ao controle.

Os subgrupos “larva” e “juvenil” apresentaram heterogeneidade alta, com I^2 acima de 80%, apontando considerável variância entre os estudos. E o subgrupo adulto, com heterogeneidade de 58,32%, indicou dessa forma uma menor heterogeneidade, mas ainda considerada substancial.

Gráfico 4 – Categorização dos resultados sobre o efeito letal do 2,4-D de acordo com a fase de vida do animal



Legenda: Subgroup: identifica os as categorias dos conjuntos de dados; Estimate (95% CI): representa o tamanho do efeito e o intervalo de confiança de 95%; Overall: I^2 indica o percentual e p a significância de heterogeneidade dos conjuntos de dados. Linha tracejada vermelha: grande média.

Fonte: Autoria própria (2021)

Com base nos dados apresentados no gráfico 4, pode-se constatar que a fase larval de desenvolvimento apresenta a maior taxa de letalidade quando há exposição ao 2,4-D. Esse resultado significativo do grupo tratado em relação ao grupo controle, pode ser justificado devido à imaturidade da pele e sistema imunológico e à elevada taxa metabólica das fases iniciais (AZEVEDO-LINHARES *et*

al., 2018; BARRETO *et al.*, 2020), fazendo com que sejam mais sensíveis e suscetíveis aos efeitos da substância testada. Além disso, características comportamentais, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas dos organismos em desenvolvimento podem contribuir para o aumento da sensibilidade desse estágio inicial em comparação aos adultos (MOHAMMED, 2013).

Estágios de vida mais sensíveis são selecionados para testes toxicológicos, fornecendo um teste rápido, relativamente fácil e sensível com a vantagem adicional de ter um baixo custo (MOHAMMED, 2013). Muitos protocolos de testes padronizados especificam a preferência do estágio de vida. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (US EPA) e a Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM) recomendam o uso de fases iniciais da vida, como primeiro instar de *Daphnia* sp., juvenis de misídeos, peixes juvenis ou embriões de moluscos para testes de toxicidade (MOHAMMED, 2013).

A fase adulta também apresentou resultado significativo, apontando elevada letalidade do 2,4-D aos animais adultos. Os adultos já possuem órgãos desenvolvidos e um sistema imune mais complexo, mas não impede de serem afetados com redução da sobrevivência, que pode acarretar em um decréscimo da população e um desequilíbrio ecológico (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014). A escolha de estágios mais susceptíveis a substâncias tóxicas parte da premissa de que os dados obtidos forneceriam proteção a todas as fases da vida no ambiente natural (MOHAMMED, 2013).

3.3.3.3 Via de exposição

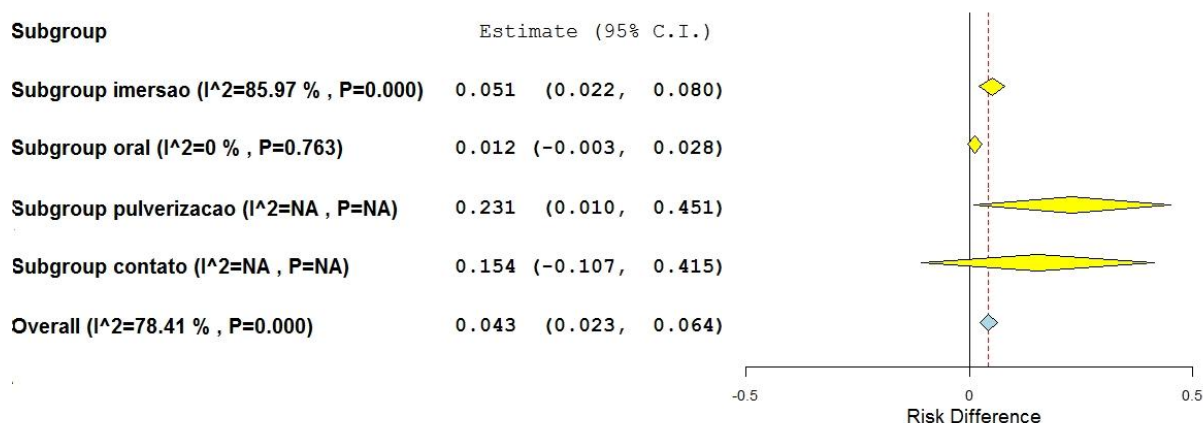
No que se refere às vias de exposição ao herbicida 2,4-D, houve 52 conjuntos de dados em que foi avaliada a exposição por imersão e 33 conjuntos por exposição oral. A exposição por pulverização e por contato foi avaliada somente por um estudo cada, portando não pode ser considerada um subgrupo com resultados confiáveis.

O subgrupo imersão apresentou resultado positivo e significativo, sem cruzar o nulo ($E+ 0,051$ IC: 0,022–0,080; $p < 0,001$) (Gráfico 5). Estes resultados evidenciam os riscos dessa forma de exposição para os animais que possuem pelo menos uma fase da vida no ambiente aquático. Este resultado valida o anterior que indica o grupo “peixes” como os organismos mais afetados pela exposição ao 2,4-D e a principal via de exposição é a imersão.

Esse subgrupo apresentou I^2 de 85,97%, indicando alta heterogeneidade. A elevada variância entre os estudos que avaliaram a exposição por imersão pode estar relacionada a outros fatores, como a fase de vida. Alguns insetos e anfíbios passam a fase larval no ambiente aquático, assim como os peixes, moluscos e crustáceos e as fases iniciais são mais sensíveis e mais suscetíveis aos efeitos da presença de contaminantes (MOHAMMED, 2013).

Para os indivíduos que foram expostos por via oral não foi identificado diferença significativa entre o grupo controle e o tratado com 2,4-D. Esse subgrupo apresentou heterogeneidade não importante, indicando pouca variância entre os estudos. A homogeneidade dos dados pode ser atribuída ao fato da exposição oral ter ocorrido principalmente em mamíferos, um grupo com baixa heterogeneidade.

Gráfico 5 – Categorização dos resultados sobre o efeito letal do 2,4-D de acordo com a via de exposição



Legenda: Subgroup: identifica os as categorias dos conjuntos de dados; Estimate (95% CI): representa o tamanho do efeito e o intervalo de confiança de 95%; Overall: I^2 indica o percentual e p a significância de heterogeneidade dos conjuntos de dados. Linha tracejada vermelha: grande média.

Fonte: Autoria própria (2021)

Animais expostos por imersão foram os mais afetados pelo 2,4-D. Este herbicida acaba adentrando os ecossistemas aquáticos pela ação das chuvas, irrigação das lavouras, pela percolação no solo, volatilização de compostos, pulverização e transporte por correntes de ar (ISLAM *et al.*, 2018; VRYZAS, 2018). O 2,4-D possui alta solubilidade em água (ISLAM *et al.*, 2018) e é encontrado nos ambientes aquáticos com frequência (BROVINI *et al.*, 2021). Desta forma, os organismos aquáticos estão sujeitos a exposição por imersão ao 2,4-D e os peixes

são susceptíveis a este herbicida de acordo com os resultados de grupo animal já apresentados.

A exposição por imersão deixa todo o corpo do animal submerso na água contaminada pelo 2,4-D, entrando em contato com a epiderme, mucosas e com as brânquias. As brânquias são fortemente afetadas pelos compostos contaminantes presentes na água, pois possuem papel fundamental na absorção e excreção substâncias do organismo (LIEBEL; TOMOTAKE; OLIVEIRA-RIBEIRO, 2013). A osmorregulação de peixes e outros organismos aquático ocorre nas brânquias, que permite a passagem de água para manter o equilíbrio osmótico do animal (WOOD; EOM, 2021) e pode favorecer a entrada de 2,4-D solubilizado para dentro do organismo.

A exposição por via oral ao 2,4-D não apresentou resultado significativo, concordando com os resultados encontrados por Ghisi, Oliveira e Prioli (2016) na meta-análise do glifosato. Diante disso, a ingestão de alimentos contaminados por 2,4-D pode não representar um risco letal para os animais, podendo incluir o ser humano.

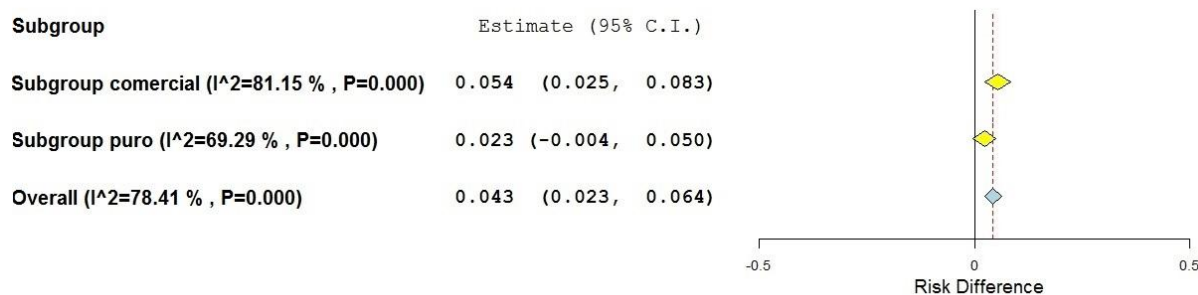
Pulverização e contato foram duas vias de exposição pouco abordadas nos estudos selecionados, visto que muitos animais podem se contaminar com o 2,4-D na hora da pulverização nas lavouras ou no contato com as plantas já tratadas com o herbicida. O número baixo de estudos com estas vias de exposição mostra um caminho para uma nova abordagem nos testes toxicológicos com o 2,4-D e outros pesticidas.

3.3.3.4 Formulação

A formulação comercial foi utilizada em 60 conjuntos de dados e a formulação pura de padrão analítico em 27 estudos. A formulação comercial apresentou resultado positivo e o intervalo de confiança do efeito sumário não ultrapassou o nulo ($E+ 0,054$; IC: 0,025-0,083; $p<0,001$) (Gráfico 6). A heterogeneidade desse subgrupo foi considerada alta, pois apresentou valor de I^2 de 81,15%, visto que existem inúmeros produtos comerciais com diferentes ingredientes. Com base nos dados, é possível constatar que ocorreu maior mortalidade nos grupos tratados com 2,4-D comercial, portanto, a exposição de organismos não alvos às formulações comerciais representa um risco, reduzindo a sobrevivência dos animais.

Para a formulação pura o resultado não foi significativo, pois o intervalo de confiança ultrapassou o nulo ($E+ 0,023$; IC: $- 0,004$ a $0,050$, $p=0,095$), não indicando diferença entre os grupos avaliados. Para essa formulação a heterogeneidade é considerada substancial (69,29%).

Gráfico 6 – Categorização dos resultados sobre o efeito letal do 2,4-D de acordo com a formulação



Legenda: Subgroup: identifica os as categorias dos conjuntos de dados; Estimate (95% CI): representa o tamanho do efeito e o intervalo de confiança de 95%; Overall: I^2 indica o percentual e p a significância de heterogeneidade dos conjuntos de dados. Linha tracejada vermelha: grande média.

Fonte: Autoria própria (2021)

Resultado semelhante foi obtido na meta-análise do herbicida glifosato em que os organismos expostos a formulação comercial Roundup[®] apresentaram maior frequência de micronúcleos que os expostos ao princípio ativo (GHISI; OLIVEIRA; PRIOLI, 2016). A meta-análise do efeito letal do glifosato em abelhas também apresentou maior letalidade nas abelhas expostas às formulações comerciais do glifosato (BATTISTI *et al.*, 2021). A maior letalidade, resultante da exposição à formulação comercial, pode ser justificada pela presença de substâncias inertes, as quais podem ser tóxicas ou potencializa os efeitos tóxicos do 2,4-D (DEHNERT; KARASOV; WOLMAN, 2019).

Tais substâncias consistem em fragrâncias, solventes, surfactantes e conservantes (NAGY *et al.*, 2020) e as diferentes formulações comerciais podem aumentar ou diminuir o efeito tóxico. Este fato pode ser observado no estudo realizado com a formulação Tordon75[®] que aumentou a toxicidade em comparação ao 2,4-D puro (MOSCOVA *et al.*, 2004) e no trabalho com a formulação DMA4 a toxicidade diminuiu em relação ao ingrediente ativo (DEHNERT; KARASOV; WOLMAN, 2019).

O efeito letal do 2,4-D comercial pode ser explicado por uma maior absorção da substância ativa, uma vez que o solvente pode aumentar sua mobilidade em ecossistemas aquáticos (STEVANOVIC *et al.*, 2017) ou por uma diminuição no oxigênio dissolvido na água levando à asfixia (PANDEY *et al.*, 2009). Além disso, estudos apontam que os próprios surfactantes, solventes e óleos podem ser letais a diversos animais (CARRASCHI *et al.*, 2011; NAGY *et al.*, 2020). A morte poderia ter ocorrido, portanto, por toxicidade direta ou indiretamente, tornando o meio desfavorável para o desenvolvimento dos organismos.

3.3.4 Viés de publicação

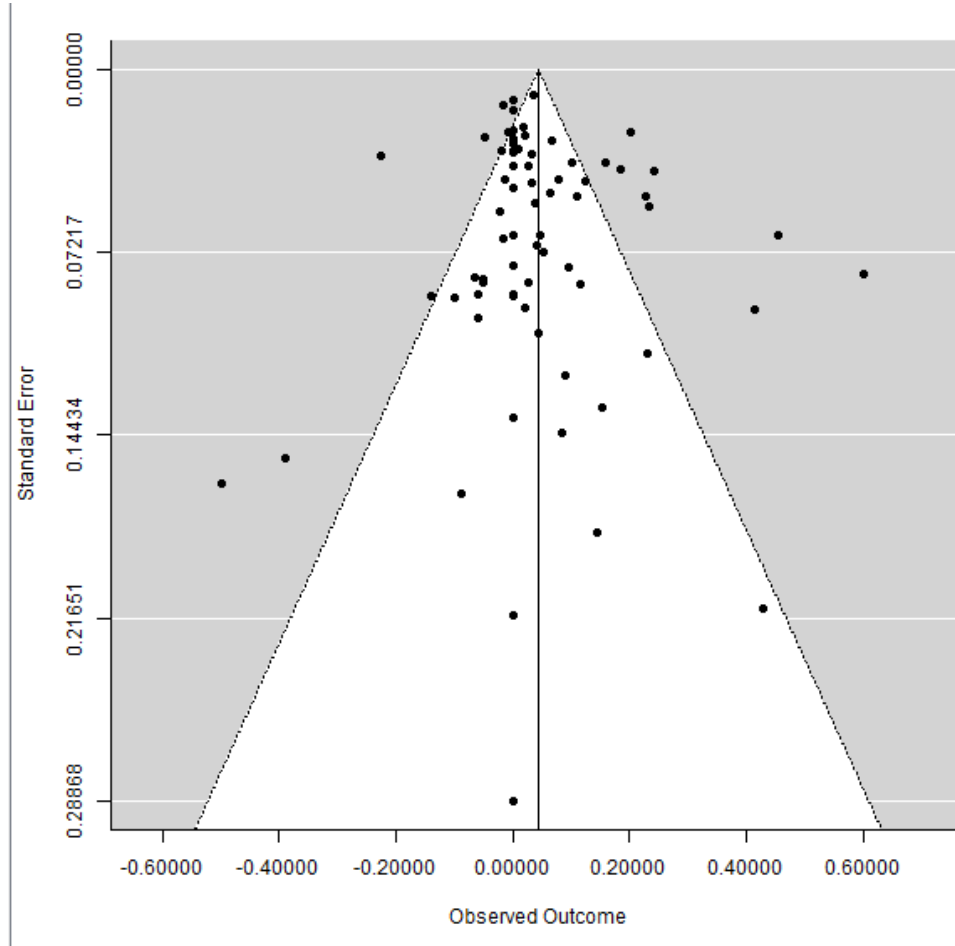
O gráfico 7 apresenta o *Funnel plot*, cujo gráfico indica se o conjunto de dados possui viés de publicação. De acordo com a figura e com os dados numéricos extraídos por meio do programa OpenMEE, o conjunto de dados possui viés de publicação, evidenciado pela assimetria na distribuição dos estudos ao longo do funil, com concentração dos estudos a esquerda no topo, resultando na falta de estudos a esquerda na base. O viés mostra uma tendência em publicar resultados significativos, com tamanho de efeito maior e descartar os não significativos, enviesando os dados (BORENSTEIN *et al.*, 2009).

Devido a limitações subjetivas enfrentadas na interpretação do gráfico de funil, análises numéricas são recomendadas também. Os dados numéricos apresentam um número a prova de falhas de 1.639 pelo método de Rosenthal e 87 pelo método de Orwin. Os números à prova de falhas referem-se ao número de estudos não significativos, não publicados ou ausentes que precisariam ser adicionados análise para alterar os resultados de significativos (GHISI; OLIVEIRA; PRIOLI, 2016).

De acordo com o método de Rosenthal, seria necessário 1.639 estudos com efeito 0 para tornar o efeito sumário não significativo. Pelo método de Orwin seria necessário 87 estudos com tamanho de efeito 0 adicionado à análise antes que o efeito cumulativo se tornasse trivial. Dado que os autores da meta-análise foram capazes de identificar 87 estudos que analisaram a relação entre a mortalidade em animais após exposição ao 2,4-D, em todas as bases de dados pesquisadas, é improvável que cerca de 87 ou mesmo 1.639 tenham sido perdidos. Quanto ao viés encontrado, podemos até dizer que o tamanho do efeito sumário esteja

superestimado, no entanto é improvável que o risco real seja zero.

Gráfico 7 - Gráfico de funil com base nos 87 conjuntos de dados sobre o efeito letal do 2,4-D em animais



Fonte: Autoria própria (2021)

3.4 Conclusão

A exposição ao 2,4-D mesmo em concentrações realísticas aumentou a letalidade em animais, principalmente de vertebrados aquáticos, nas fases larval e adulta. A exposição por imersão destes animais ao herbicida desencadeou um efeito tóxico capaz de elevar a letalidade, tendo em vista que o 2,4-D é bastante solúvel e que os peixes (principal representante desta meta-análise) possuem áreas sensíveis, tais como mucosas e brânquias. Ademais, peixes de água doce (maioria) tendem a absorver água pela pele devido ao desequilíbrio de íons, sendo hiperosmóticos comparados ao meio. Essas características provavelmente funcionam como rotas de entrada para o 2,4-D, que depois interage com o

organismo provocando alterações bioquímicas e fisiológicas.

As concentrações utilizadas nos estudos selecionados são encontradas no meio ambiente e algumas na água potável. Este fato torna-se preocupante pelo motivo de terem afetado organismos não-alvos, diminuindo a sobrevivência dos animais, que pode estar acarretando um futuro desequilíbrio nas comunidades.

Apesar do efeito letal avaliado aqui, os efeitos subletais devem ser destacados, pois geralmente representam o cenário de exposição mais comum no meio ambiente. Além disso, efeitos bioquímicos, fisiológicos, comportamentais, morfológicos e reprodutivos alterados pelo 2,4-D não foram abordados nesta meta-análise, mas as consequências desses efeitos subletais podem ocasionar futuramente um efeito letal.

4 EXPOSIÇÃO DE FASES INICIAIS DE *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI) A CONCENTRAÇÕES PERMISSÍVEIS DO HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO COMERCIAL

4.1 Introdução

O desenvolvimento de cultivares transgênicos, resistentes ao herbicida ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), o seu baixo custo e ação superior ao glifosato no controle de ervas daninhas, ampliaram sua produção e uso nas práticas agropecuárias em diversos países (CTNBIO, 2015). Atualmente, esse herbicida figura entre os agrotóxicos mais comercializados do mundo (MAGGI *et al.*, 2019). Conseqüentemente, o 2,4-D é um dos herbicidas mais difusos no meio ambiente, interagindo com organismos não alvos, especialmente em ecossistemas aquáticos (FREITAS *et al.*, 2019; MARCATO; DE SOUZA; FONTANETTI, 2017).

Ademais, o 2,4-D possui cerca de 1.500 formulações, com a adição de ingredientes inertes, sendo também aplicado em consórcio com outros herbicidas, ampliando ainda mais o seu poder de contaminação (RUIZ DE ARCAUTE; SOLONESKI; LARRAMENDY, 2018). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), classifica o 2,4-D na categoria 4, sendo considerado pouco tóxico (BRASIL, 2019). Sendo assim, torna-se necessário o monitoramento de ambientes aquáticos (DEHNERT; KARASOV; WOLMAN, 2019) e a realização de ensaios ecotoxicológicos para determinar os limites de tolerância e os efeitos subletais do 2,4-D (OECD, 2013).

Neste sentido, estudos recentes demonstram que o 2,4-D possui efeitos tóxicos sobre várias espécies de peixes. Estes revelam danos cromossômicos e no DNA, caracterizando o efeito genotóxico do 2,4-D (RUIZ DE ARCAUTE; SOLONESKI; LARRAMENDY, 2016), efeitos neurotóxicos (DA FONSECA *et al.*, 2008; GAAIED *et al.*, 2020), oxidativos (ZHANG *et al.*, 2017), desregulação endócrina (COADY *et al.*, 2014), alterações histopatológicas (CATTANEO *et al.*, 2008), alteração na expressão de genes (GAAIED *et al.*, 2019) e efeitos adversos na reprodução, desenvolvimento e comportamento (DEHNERT *et al.*, 2018; DEHNERT; KARASOV; WOLMAN, 2019; DEQUATTRO; KARASOV, 2016). Assim, as espécies de peixes se tornaram bioindicadores promissores para entender o destino ambiental e a dinâmica deste agrotóxico em água doce (ERNST *et al.*, 2018).

Para avaliar os efeitos potenciais em organismos aquáticos não-alvos, os peixes são um componente indispensável das estratégias integradas de teste de toxicidade para o ambiente aquático (LAMMER *et al.*, 2009; SU *et al.*, 2021). Os testes avaliam a toxicidade aguda (OECD, 2019), crônica (OECD, 2009), estágio inicial de vida (OECD, 2013), estágios de embrião e alevinos (OCDE, 1998) e crescimento juvenil (OCDE 2000). Os testes de toxicidade em embriões de peixes (FET) é uma abordagem alternativa promissora para os testes clássicos de toxicologia aguda em peixes (LAMMER *et al.*, 2009), com padronização a nível internacional para embriões de peixe zebra (*Danio rerio*) (ISSO, 2007) e componente dos testes de rotina de efluentes na Alemanha (DIN, 2003).

Nas fases iniciais de desenvolvimento os organismos são mais susceptíveis aos efeitos deletérios de contaminantes ambientais devido à intensa atividade metabólica (alta proliferação celular), formação ainda precoce do sistema imune, órgãos e sistemas, sendo essa uma etapa fundamental no recrutamento e manutenção das populações naturais (MOHAMMED, 2013). Avaliação da toxicidade de pesticidas usando os estágios iniciais de desenvolvimento dos peixes é relevante para a segurança dos sistemas aquáticos (RIBEIRO *et al.*, 2020), pois a utilização de dados de toxicidade dos estágios iniciais fornece proteção a todas as fases da vida no ambiente natural (MOHAMMED, 2013).

Portanto, é essencial avaliar a influência deste herbicida no desenvolvimento, comportamento e sobrevivência dos peixes nas fases iniciais do desenvolvimento, envolvendo o período embrionário e larval (COLÓN-CRUZ *et al.*, 2018). Dessa forma, este estudo buscou analisar os efeitos letais, genotóxicos, comportamentais e teratogênicos da formulação comercial do herbicida 2,4-D sobre larvas da espécie nativa *Rhamdia quelen* (QUOY; GAIMARD, 1824) submetidas a exposição aguda com concentrações permitidas por legislações mundiais.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Produto e concentrações

Foi utilizada a formulação comercial do 2,4-D, DMA® 806 BR (2,4-D 806 g.L⁻¹) da Dow AgroSciences Industrial Ltda., a qual foi diluída em água reconstituída (0,0065 g.L⁻¹ CaCl₂; 0,1335 g.L⁻¹ MgSO₄; 0,0004 g.L⁻¹ KCl; 0,0105 g.L⁻¹ NaHCO₃)

nas concentrações de 15, 30 e 60 $\mu\text{g.L}^{-1}$ do princípio ativo. Um controle negativo foi preparado apenas com água reconstituída.

A delimitação das concentrações foi baseada no limite máximo recomendado pela Organização Mundial da Saúde (WHO) para a água potável, de 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (WHO, 2003). Esta concentração concorda com o máximo permitido pela Portaria nº 2914/11 do Ministério da Saúde do Brasil para água destinada ao consumo (BRASIL, 2011) e com a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente, que versa que a quantidade máxima de 2,4-D permitida em águas doces superficiais (BRASIL, 2005). A partir dessa concentração limítrofe recomendada, utilizamos o dobro do valor recomendado como concentração máxima para os experimentos, e a metade do valor permitido como concentração mínima.

4.2.2 Espécie modelo

A espécie *R. quelen* foi selecionada como modelo biológico para a realização do presente estudo por ser muito utilizada em bioensaios, por ser de fácil aquisição, se adaptar as condições laboratoriais, apresentando certa resistência a condições aquáticas adversas, sendo considerada uma espécie adequada para detecção precoce de contaminantes aquáticos. Além disso, possui anatomia, fisiologia, reprodução, desenvolvimento e procedimentos de manejo e criação muito bem descritos na literatura (PEREIRA *et al.*, 2006; RODRIGUES-GALDINO *et al.*, 2010; SANCHES *et al.*, 2011; SILVEIRA *et al.*, 2013).

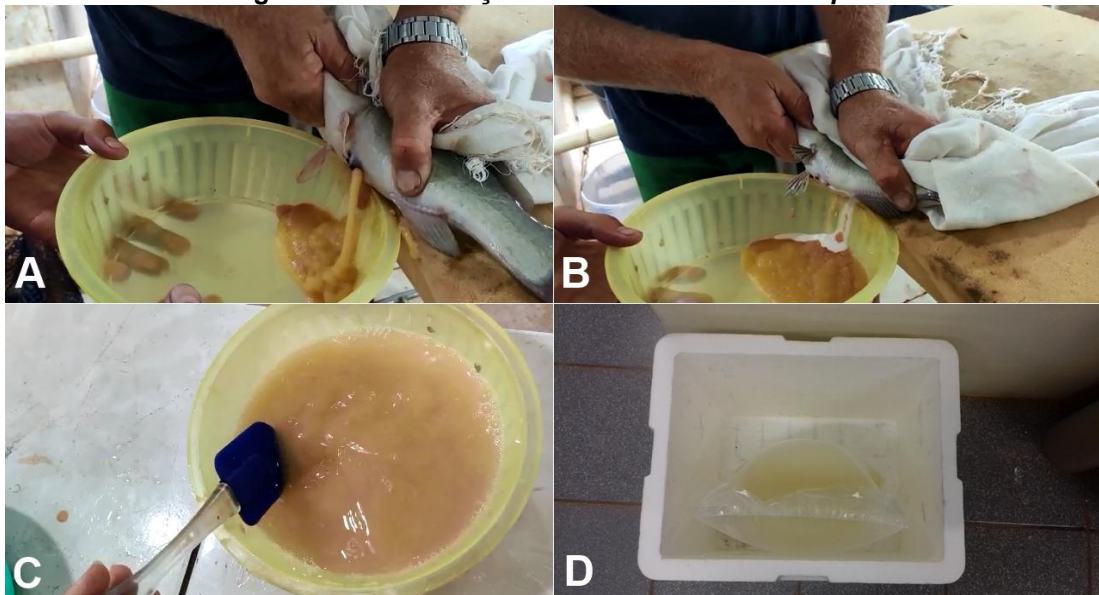
Ademais, é uma espécie nativa do Brasil, relativamente comum em rios e riachos das regiões sudeste e sul, cuja distribuição geográfica se estende desde o México até a Argentina (SILFVERGRIP, 1996). Trata-se de uma espécie bastante apreciada para a pesca recreativa e cultivada em pisciculturas e em reservatórios (tanques-rede) para a finalidade comercial. É também uma espécie importante para o meio ambiente por apresentar uma dieta omnívora com tendências a predação, de modo que exerce um controle *top-down* da cadeia trófica (GOMES *et al.*, 2000). Assim, suas características biológicas associadas à importância socioeconômica e ambiental justificam a utilização desta espécie no estudo.

4.2.3 Bioensaio

Todos os métodos e procedimentos utilizados neste estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – sediada no Câmpus Dois Vizinhos (UTFPR-DV), sob o parecer nº 30/2019.

Os ovos de *R. quelen* foram adquiridos da Empresa de Piscicultura Akna Alevinos de Toledo, Paraná e fertilizados artificialmente. A indução reprodutiva ocorreu mediante a aplicação de injeções intravenosas de extrato de hipófise de carpa. As fêmeas receberam uma dose de 5 mg.kg^{-1} e os machos de 1 mg.kg^{-1} na noite anterior a desova e permaneceram em um tanque com temperatura controlada (CARNEIRO *et al.*, 2002; BOMBARDELLI *et al.*, 2006). Na manhã seguinte, a extrusão foi realizada em um recipiente de plástico pressionando a região ventral dos indivíduos (Fotografia 1 A-C). Os gametas de uma fêmea e dois machos foram misturados e hidratados com a água do próprio tanque, cuja temperatura estava em $24 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 8, armazenados em sacos plástico, aerados com ar comprimido e deslocados até o Laboratório de Reprodução Animal da UTFPR-DV (Fotografia 1 D).

Fotografia 1 – Fertilização artificial de ovos de *R. quelen*



A) Desova da fêmea. B) Espermição do macho. C) Hidratação dos gametas. D) Ovos fertilizados e embalados para transporte.

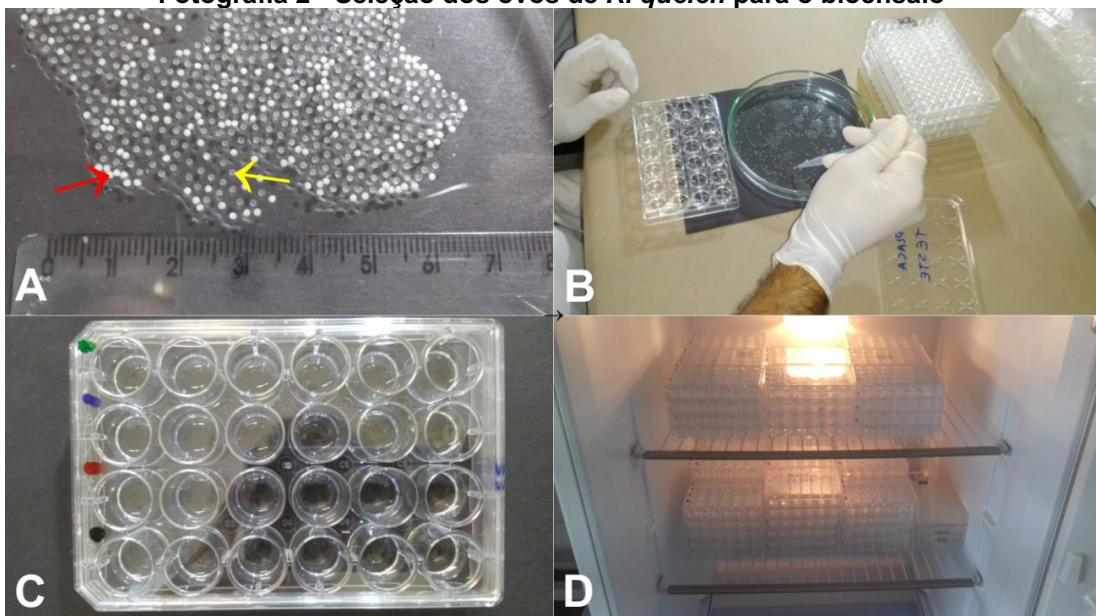
Fonte: Autoria própria (2021)

Os ovos foram avaliados 8 horas pós-fertilização (hpf) em estereomicroscópio e em escala macroscópica para analisar a sua viabilidade/fertilização, observando o

início da embriogênese e a sua coloração (Fotografia 2 A-B). Foram considerados ovos viáveis aqueles que estavam em divisão e com aspecto translúcido de acordo com Brito *et al.* (2018). Os demais ovos com características diferentes e opacos foram considerados não fecundados e descartados.

Somente momentos antes do início da exposição as soluções-testes de 2,4-D foram preparadas e pipetadas em placas de 24 poços (6 colunas e 4 linhas) no volume de 2 mL/poço, visando evitar a sua degradação. Cada tratamento ocupou uma linha da placa, de modo que cada placa apresentou todos os tratamentos (Fotografia 2 C). Os ovos viáveis foram alocados nas placas (um ovo por poço), com o auxílio de uma pipeta Pasteur de ponta afunilada e mantido em incubadora BOD com temperatura controlada em 24 °C, pH 8,0, fotoperíodo desligado e troca de metade do volume da solução a cada 24 horas (ensaio semiestático), com o objetivo de manter níveis adequados de oxigênio e amônia, retirar resíduos e repor as soluções-testes nas respectivas concentrações (Fotografia 2 D).

Fotografia 2 - Seleção dos ovos de *R. quelen* para o bioensaio



A) Ovos viáveis (translúcidos, seta amarela) e não viáveis (brancos, seta vermelha) sobre uma placa de Petri. B) Seleção e transferência dos ovos para a placa com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. C) Distribuição dos tratamentos na placa (verde: 0 µg.L⁻¹; azul: 15 µg.L⁻¹; vermelho: 30 µg.L⁻¹ e preto: 60µg.L⁻¹). D) Placas distribuídas no interior da incubadora tipo BOD.

Fonte: Autoria própria (2021)

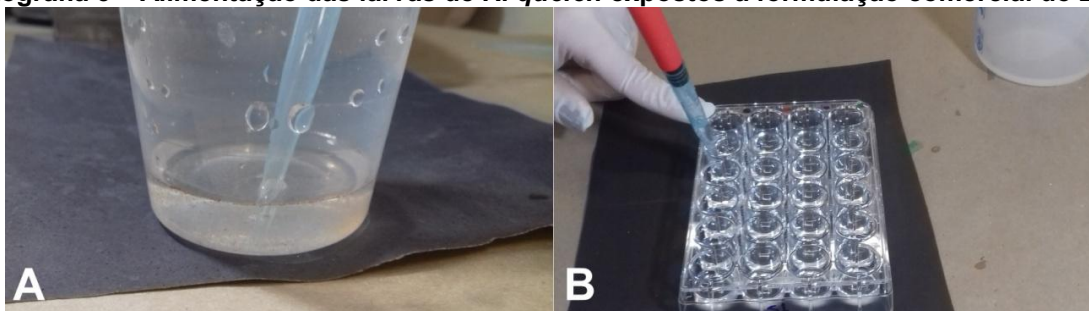
O delineamento experimental foi composto por dois fatores, sendo quatro concentrações (0, 15, 30 e 60 µg.L⁻¹ de 2,4-D) e três tempos experimentais (48, 96 e 168 hpf). Foram utilizadas 20 placas para cada tempo de exposição e 20 placas

adicionais somente para análise de eclosão e sobrevivência, contabilizando 80 placas e um total de 1.920 ovos viáveis, descartando-se o restante.

É conhecido que as larvas de *R. quelen* possuem reserva de nutrientes do saco vitelino até aproximadamente 96 hpf (PEREIRA *et al.*, 2006), sendo que após este período necessitam de alimentação externa. O alimento fornecido foi constituído por uma solução saturada com náuplios de *Artemia salina*, iniciando em 96 hpf e se estendendo até o final do experimento. A cultura de *A. salina* foi implantada no laboratório por meio de uma solução salina contendo 29 g.L⁻¹ de sal marinho, pH 8,5 e 27°C, com 0,22 g.L⁻¹ de ovos da espécie. A eclosão dos náuplios ocorreu sob luminosidade e aeração constantes após um período de aproximadamente 40 horas.

A solução saturada de náuplios de *A. salina* foi preparada removendo-se por pipetagem o máximo possível da parte líquida da solução, concentrando os náuplios no fundo do béquer, com auxílio da luz. A partir de testes prévios observou-se que, em média, 5 náuplios eram capturados a cada 100 µL da solução (Fotografia 3). A partir disso, 100 µL da solução saturada de náuplios foram pipetados em cada poço das placas. A alimentação ocorreu cinco vezes ao dia com intervalos de três horas, sendo ao final de cada dia fornecido, em média, 25 náuplios de *A. salina* em 500 µL de solução para cada poço. O volume da solução de alimentação foi considerado nos cálculos da reposição das soluções-testes nas trocas diárias, visando manter as concentrações de 2,4-D estabelecidas neste estudo.

Fotografia 3 – Alimentação das larvas de *R. quelen* expostos a formulação comercial do 2,4-D



**A) Solução concentrada de *A. salina*. B) Alimentação das larvas com os náuplios de *A. salina*.
Fonte: Autoria própria (2021)**

4.2.4 Eclosão, sobrevivência, frequência cardíaca e mobilidade

A taxa de eclosão foi avaliada em 28 hpf, tendo como base o tempo médio de

eclosão descrito pela literatura para a espécie (PEREIRA *et al.*, 2006; RODRIGUES-GALDINO *et al.*, 2009). A análise ocorreu em quintuplicatas, totalizando 20 microplacas. Com o auxílio de um estereomicroscópio considerou-se eclodida a larva que apresentou o rompimento do córion e movimento da cauda. Nas mesmas placas foi avaliada diariamente a sobrevivência, nos tempos de 48, 72, 96, 120, 144 e 168 hpf, contabilizando como vivas as larvas que apresentaram batimentos cardíacos.

A frequência cardíaca das larvas foi analisado em 48, 96 e 168 hpf, em quintuplicata. Foram selecionados aleatoriamente seis indivíduos por réplica, amostrando-se, no total, 30 indivíduos de cada tratamento. Os mesmos indivíduos analisados em 48 hpf foram novamente avaliados em 96 e 168 hpf. O batimento cardíaco de cada indivíduo foi contabilizado durante 15 segundos, tendo o valor multiplicado por quatro para computar um minuto.

A análise de mobilidade seguiu a mesma amostragem descrita para a frequência cardíaca e teve como base as alterações no comportamento natatório, a velocidade de reação e equilíbrio das larvas diante de um estímulo mecânico na nadadeira com uma ponteira de micropipeta, devidamente esterilizada. As reações foram classificadas nas seguintes categorias: 0 (sem reação); 1 (sem equilíbrio e movimentos trêmulos); 2 (baixa mobilidade e equilíbrio comprometido); 4 (mobilidade moderada); 6 (resposta rápida e mobilidade normal).

Para sumarizar os efeitos na capacidade natatória das larvas desenvolveu-se um índice de mobilidade por réplica (equação 4).

$$IM = \sum_{i=0}^6 (i \times n) \quad (4)$$

Onde o IM = índice de mobilidade, i = classe de comportamento natatório, a qual varia de 0 a 6 e n = número de indivíduos em cada classe.

4.2.5 Deformidades morfológicas

Para a análise de deformidades morfológicas foram amostrados indivíduos em 48, 96 e 168 hpf em quintuplicata. Foram selecionados aleatoriamente 6 indivíduos por réplica, amostrando-se ao total 30 indivíduos de cada tratamento. As larvas foram coletadas da placa com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, acondicionadas em cinco microtubos de 2 mL/tratamento/tempo, anestesiadas com

eugenol (100 mg.L⁻¹) e posteriormente submetidas a eutanásia por sobredosagem do anestésico (200 mg.L⁻¹). Em seguida, foram fixadas em formol à 10% e acondicionadas em geladeira a 4°C.

As deformidades morfológicas foram analisadas em estereomicroscópio e classificadas de acordo com o proposto por Powers *et al.* (2010). Dentro de cada categoria (axial, nadadeira, crânio/facial e tóraco/abdominal), as diferentes deformidades receberam uma pontuação conforme o seu grau de severidade (Tabela 3). O índice de severidade para cada indivíduo foi calculado pela somatória da pontuação obtida em cada categoria e posteriormente obtido o índice das réplicas através da média obtida dos índices individuais.

O comprimento total (cm) e a área corporal (cm²) foram mensurados em cada indivíduo coletado para as deformidades. As medidas foram realizadas através da captura de imagens com uma câmera acoplada ao estereomicroscópio Zeiss e com as ferramentas do programa Zen 2.3 lite.

Tabela 3 - Classificação do grau de severidade das deformidades

Categorias	Anormalidade	Grau de severidade
Axial	Crescimento esquelético atrofiado	4
	Escoliose	4
	Lordose	4
	Cifose	4
Nadadeira	Lesões	1
	Danos	4
Crânio/Facial	Edema ocular	4
	Ausência de olhos	4
	Deformidades faciais	3
	Deformidades na boca	4
	Barbilhões ausentes/reduzidos/retorcidos	4
Tórax/ Abdômen	Edema cardíaco	4
	Edema saco vitelino	4
	Distensão corporal (desnutrido)	2

Fonte: Autoria própria (2021)

4.2.6 Ensaio cometa

O ensaio cometa seguiu o protocolo proposto por Singh *et al.* (1988), modificado de acordo com Ferraro *et al.* (2004). Foram coletados 5 *pools* de 15 larvas de cada tratamento e tempo de exposição (48, 96 e 168 hpf), alocando-os separadamente em microtubos de 1,5 mL. As larvas foram coletadas dos poços com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e acondicionadas uma a uma nos microtubos com o mínimo de solução possível. Após, foram anestesiadas com eugenol (100

mg.L⁻¹) e posteriormente sacrificados com uma sobredosagem do anestésico e retirada do excesso de soluções. Em cada microtubo, foi adicionado 200 µL de soro bovino fetal e realizado a desagregação celular com o auxílio de um micro homogeneizador. Desta solução, foi retirada uma alíquota de 25 µL e misturada em 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5%. Esta mistura foi espalhada em uma lâmina previamente recoberta por agarose normal a 1,5%, sobreposto a lamínula e levadas a geladeira para a tonificação da agarose por 15 minutos.

Em seguida, as lamínulas foram retiradas e as lâminas alocadas em solução de lise (solução estoque: 2,5M NaCl; 100 mM EDTA; 10 mM Tris; NaOH 0,8%; N-lauril-sarcosinato 1%; solução de trabalho: 1 ml de Triton X100; 10 ml de DMSO; e 89 ml de solução estoque), a temperatura de 4°C para o rompimento das membranas biológicas. Após uma hora, as lâminas foram colocadas em cuba horizontal de eletroforese e recobertas com uma solução de 300 mM NaOH e 200 mM EDTA, pH>13, onde permaneceram em repouso por 25 minutos. A eletroforese foi conduzida por 30 minutos a 300 mA e 25V, com posterior neutralização em solução tampão de 0,4M TRIS, pH 7,5 por três banhos de cinco minutos e fixação em etanol 100% por dez minutos.

Depois de secas, as lâminas foram coradas com 20 µL de brometo de etídio (0,02 g.mL⁻¹), recobertas com lamínula e analisadas em microscópio de fluorescência, sendo computadas 100 nucleoides por lâmina em teste cego. Os nucleoides foram analisados usando a classificação visual baseada na migração de fragmentos de DNA, seguindo as classes: 0 (sem dano aparente); 1 (dano pequeno); 2 (dano médio); 3 (dano grande) e 4 (dano máximo, apoptose). Para cada amostra, calculou-se um escore (taxa de dano) multiplicando o número de nucleoides encontrados em dada classe pelo número da classe de acordo com a metodologia descrita por Collins (2004).

4.2.7 Análise estatística

Todas as variáveis dependentes foram previamente submetidas às análises dos pressupostos de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias a partir do teste de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente (RUTHERFORD, 2011). A taxa de eclosão foi analisada por meio de uma ANOVA unifatorial, seguido do teste de Tukey. A sobrevivência foi analisada por uma ANOVA de medidas repetidas,

considerando os fatores concentração e tempo de exposição, seguido do teste de Tukey.

As deformidades morfológicas foram exploradas usando um teste de contingência (2x2) a fim de verificar uma possível associação entre a frequência de larvas (deformadas e não deformadas) e os grupos experimentais por tempo de exposição. O índice de severidade foi examinado por meio de uma ANOVA bifatorial (concentração x tempo), após a transformação dos dados ($\sqrt{X} + \sqrt{(X + 1)}$), seguido do teste de Tukey. O comprimento total, a área corporal, a mobilidade e a frequência cardíaca foram avaliados por uma ANOVA bifatorial, seguido do teste de Tukey.

O ensaio cometa foi explorado por uma ANOVA bifatorial, após a transformação dos dados ($\text{Log}(x + 1)$), seguido do teste de Tukey. Todos os testes assumiram uma significância de 5% e foram contemplados pelo programa Statistica (StatSoft versão 8.0).

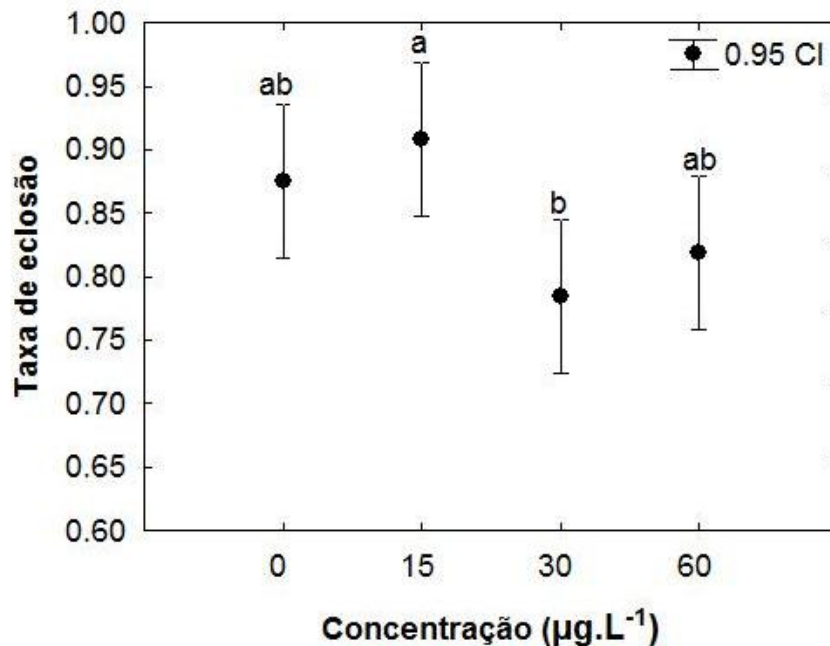
4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Taxa de eclosão e sobrevivência

A taxa de eclosão dos embriões de *R. quelen* apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($F_{3,20} = 3,787$; $p = 0,031$) e variou de 78 a 90%. Os embriões expostos à concentração de 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de 2,4-D exibiram uma taxa de eclosão (90%) significativamente maior que os de 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$, embora ambos não diferiram do controle. Nos demais grupos experimentais não se observaram diferenças estatísticas (Gráfico 8).

A taxa de eclosão permite observar efeitos de inibição, retardo ou redução no desenvolvimento. De acordo com Rodrigues-Galdino *et al.* (2010) a eclosão de *R. quelen* ocorre em 26 hpf com temperaturas próximas a 24°C. Desta forma, a avaliação da eclosão em 28 hpf foi apropriada para este trabalho.

Gráfico 8 – Taxa de eclosão das larvas de *R. quelen* expostos a formulação comercial do 2,4-D em 28 hpf



As letras indicam as diferenças ou semelhanças estatísticas pelo teste de Tukey.

Fonte: Autoria própria (2021)

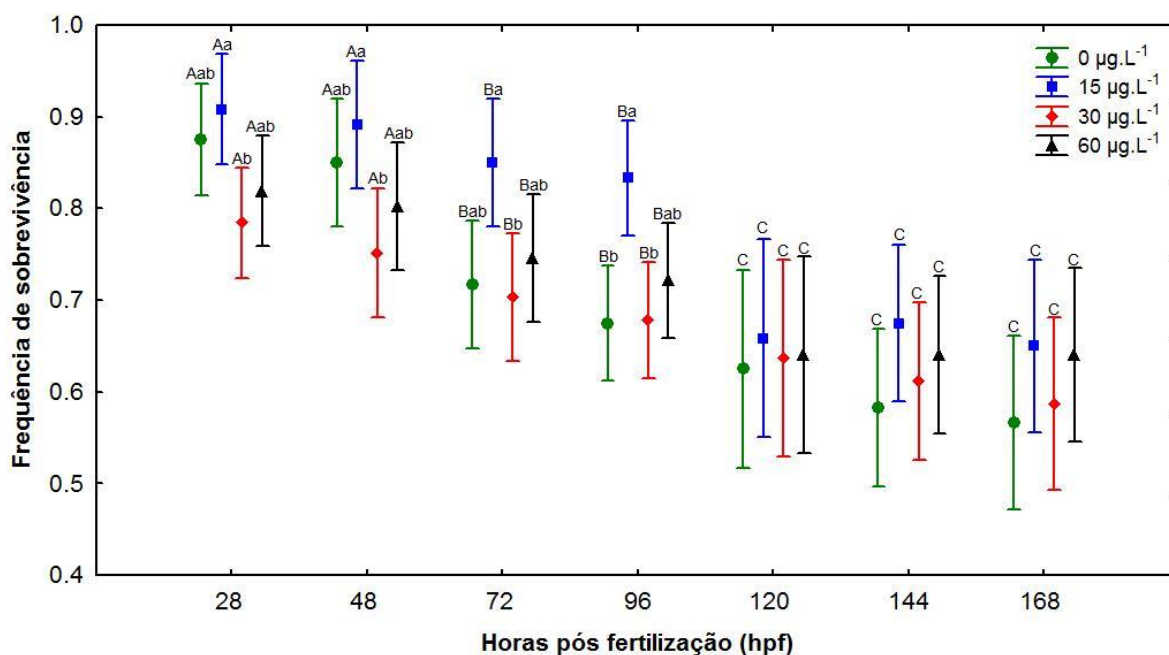
Neste estudo, a taxa de eclosão do grupo controle foi de 87,5% considerada adequada para a espécie e sugere condições favoráveis de saúde dos indivíduos (BRITO *et al.*, 2018). Em trabalho realizado com *Danio rerio*, a exposição a concentrações ambientalmente relevantes de uma formulação comercial de 2,4-D apresentou um aumento na eclosão dos embriões (GAAIED *et al.*, 2020), enquanto que em concentrações elevadas do produto ($>46.000 \mu\text{g.L}^{-1}$) a eclosão foi seriamente afetada pela exposição ao 2,4-D (LI *et al.*, 2017).

As diferenças de sensibilidade dos embriões ao 2,4-D podem ser baseadas em sua taxa de absorção do produto químico. Durante o desenvolvimento do embrião, ele é protegido por uma membrana lipofílica, o córion, que isola e protege o ovo maduro do ambiente externo, diferenças em suas estruturas podem alterar o efeito letal do 2,4-D, influenciando a absorção do herbicida (STEVANOVIC *et al.*, 2017). A concentração elevada rompeu essa defesa inicial e inibiu ou retardou a embriogênese de *R. quelen*. Em concentrações baixas, o 2,4-D pode diminuir o ataque de microrganismos prejudiciais ao desenvolvimento do embrião e ajudá-lo na eclosão.

Após a eclosão, a sobrevivência foi influenciada pela interação entre os dois fatores ($F_{18,140}=1,8$; $p=0,036$), principalmente pela maior sobrevivência dos

indivíduos tratados com $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ de 2,4-D após 72 e 96 hpf (Gráfico 9). Já os demais grupos se mantiveram similares ao controle nas primeiras 96 hpf do experimento. Após este período se observou uma queda geral na sobrevivência das larvas, em especial no grupo tratado com a menor concentração do herbicida, o qual se igualou aos demais. Assim, em 120, 144 e 168 hpf não se constatou diferença significativa na sobrevivência entre os tratamentos.

Gráfico 9 – Frequência relativa da sobrevivência das larvas de *R. quelen* expostos a formulação comercial do 2,4-D



As letras minúsculas indicam as diferenças ou semelhanças estatísticas pelo teste de Tukey para as concentrações. As letras maiúsculas indicam diferenças ou semelhanças estatísticas pelo teste de Tukey para os tempos de exposição

Fonte: Autoria própria (2021)

A frequência de sobrevivência é um indicador essencial para compreender o risco de exposição a produtos químicos, pois fornece uma ligação entre a toxicidade e a manutenção em longo prazo das populações naturais (AZEVEDO-LINHARES *et al.*, 2018). Neste estudo, após 96 hpf as larvas de *R. quelen* consumiram praticamente toda a reserva de nutrientes do saco vitelino e necessitam de alimentação exógena (PEREIRA *et al.*, 2006). Este parece ser um momento decisivo para a sobrevivência das larvas, visto que precisam buscar ativamente o alimento. A concentração de $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ de 2,4-D, não foi letal para as larvas até o momento em que possuíam reservas nutricionais, mas pode ter induzido efeitos subletais que

dificultaram a captura de alimento e redução da sobrevivência.

Em 120, 144 e 168 hpf não houve diferença significativa na sobrevivência entre os tratamentos, mas estes tempos de exposição diferiram dos demais apresentando uma menor sobrevivência, sendo relativamente constante até o final da exposição. No geral a exposição a concentrações permissíveis de 2,4-D comercial não afetaram significativamente a sobrevivência das larvas de *R. quelen*. Resultado semelhante foi encontrado na pesquisa realizada com juvenis de *R. quelen* expostos a outra formulação comercial do 2,4-D (MENEZES *et al.*, 2015).

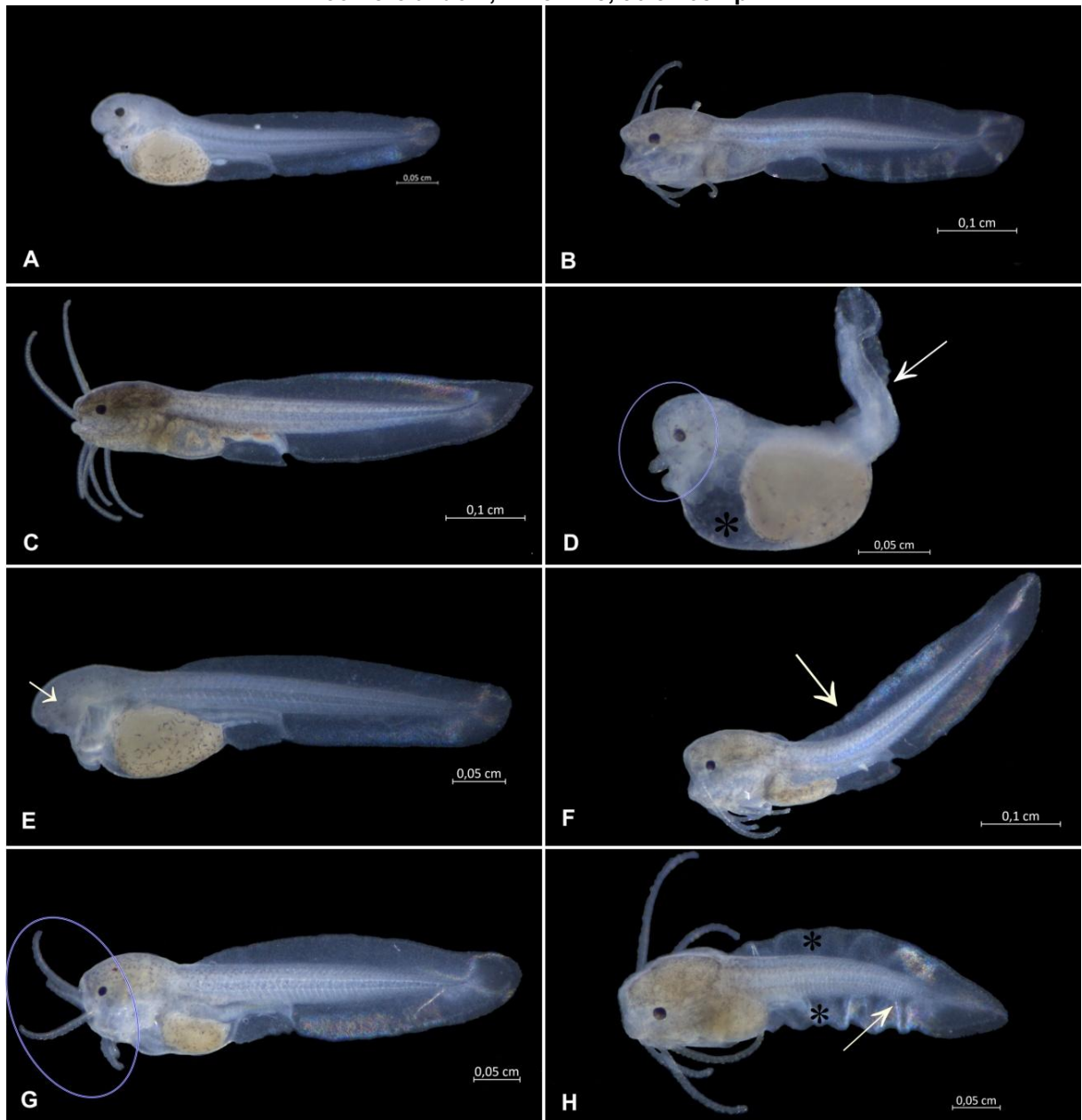
No trabalho realizado por Dehnert *et al.* (2021), a sobrevivência de nove espécies de peixes filogeneticamente próximas, em diferentes estágios de desenvolvimento (embrião, larva e juvenil), foi avaliada após exposição ao 2,4-D. Duas espécies não foram afetadas pelo herbicida e as outras sete apresentaram redução da sobrevivência em pelo menos um estágio de desenvolvimento (DEHNERT *et al.*, 2021), demonstrando a relevância da tolerância e capacidade de detoxificação de cada espécie.

A baixa mortalidade era esperada devido às baixas concentrações utilizadas, tendo em vista que as doses e concentrações letais de 2,4-D para diferentes espécies de peixes estão muito acima das utilizadas neste trabalho e das concentrações ambientais e permitidas por legislações (SARIKAYA; SELVI, 2005; SARIKAYA; YILMAZ, 2003).

4.3.2 Deformidades morfológicas e biometria

Os danos axiais (lordose e escoliose) e nas nadadeiras foram as principais deformidades observadas nesta pesquisa (Fotografia 4). Além destas, observou-se casos de atrofia corporal, ausência de olhos, barbilhões reduzidos, distensão corporal, edema cardíaco e do saco vitelino.

Fotografia 4 – Deformidades morfológicas das larvas de *R. quelen* expostas a formulação comercial do 2,4-D em 48, 96 e 168 hpf



A) Larva normal em 48 hpf. B) Larva normal em 96 hpf. C) Larva normal em 168 hpf. D) Larva com deformidades faciais (círculo), atrofia, edema cardíaco (*) e escoliose (seta) em 48 hpf. E) Larva com ausência de um olho (seta) em 48 hpf. F) Larva com lordose (seta) em 96 hpf. G) Larva com deformidades bucais e barbilhões reduzidos (círculo) em 96 hpf. H) Larva com atrofia, danos na nadadeira (*) e cifose (seta) em 96 hpf.

Fonte: Autoria própria (2021)

A frequência de indivíduos com deformidades morfológicas, independente do grupo experimental, foi maior em 96 hpf. Em 48 e 168 hpf a frequência de danos por categorias foram reduzidas (Tabela 4).

Tabela 4 – Qui-quadrado (χ^2) para larvas de *R. quelen* deformadas e não deformadas por categorias de deformidades morfológicas entre os grupos experimentais (controle e expostos a formulação comercial do 2,4-D)

Categorias de deformidades	χ^2 ; gl=3		
	48 hpf	96 hpf	168 hpf
Axial	2,24	15,92*	5,09
Nadadeira	1,16	13,68*	0,32
Crânio/facial	0,99	5,23	3,26
Torácico/Abdominal	1,05	3,41	2,95
Todas	0,42	13,71*	0,23

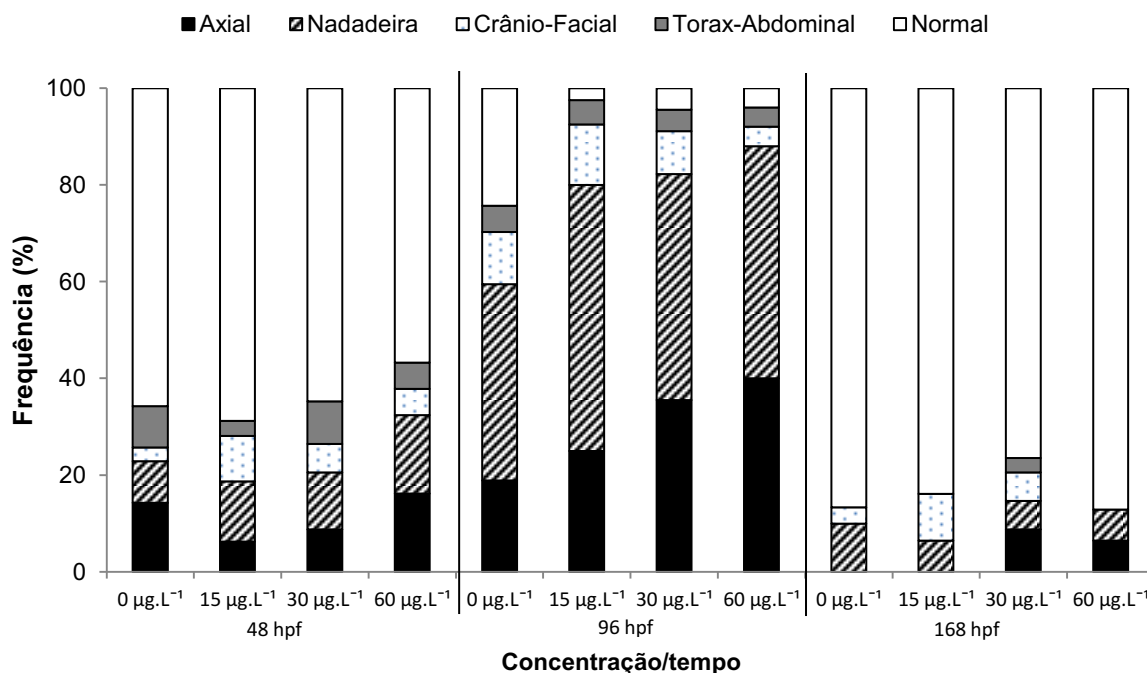
gl: graus de liberdade, χ^2 crítico: 7,82; * $p < 0,05$

Fonte: Autoria própria (2021)

Gaaied *et al.* (2020) também observou baixas frequências de deformidades em larvas de peixe zebra expostos a menos de $320 \mu\text{g.L}^{-1}$ de 2,4-D em 48 hpf. A redução de deformidades em 48 hpf pode estar relacionada com a proteção exercida pelo córion, impossibilitando a passagem de substância tóxicas que provocam alterações morfológicas significativas (PAMANJI *et al.*, 2015). A partir do esgotamento das reservas do saco vitelino, as larvas passaram a capturar o seu alimento e a presença de deformidades severas pode ter dificultado a locomoção para o forrageamento (AZEVEDO-LINHARES *et al.*, 2018), impedindo a captura de presas e levando a morte de animais, como observado entre 96 e 120 hpf. Este fato justifica a baixa frequência de danos nas larvas expostas ao 2,4-D em 168 hpf.

Distribuindo essas frequências de danos por categorias nos grupos experimentais verificou-se que apenas em 96 hpf ocorreram diferenças significativas, sendo mais frequente os danos nos indivíduos dos grupos tratados com o 2,4-D comercial ($15, 30$ e $60 \mu\text{g.L}^{-1}$), principalmente pelos danos axiais e nas nadadeiras (Gráfico 10). Essa condição *in natura* pode dificultar o organismo na captura de alimento e na fuga de predadores (AZEVEDO-LINHARES *et al.*, 2018; DEHNERT; KARASOV; WOLMAN, 2019).

Gráfico 10 - Frequência de deformidades por categorias nas larvas de *R. quelen* expostos a formulação comercial do 2,4-D em 48, 96 e 168 hpf



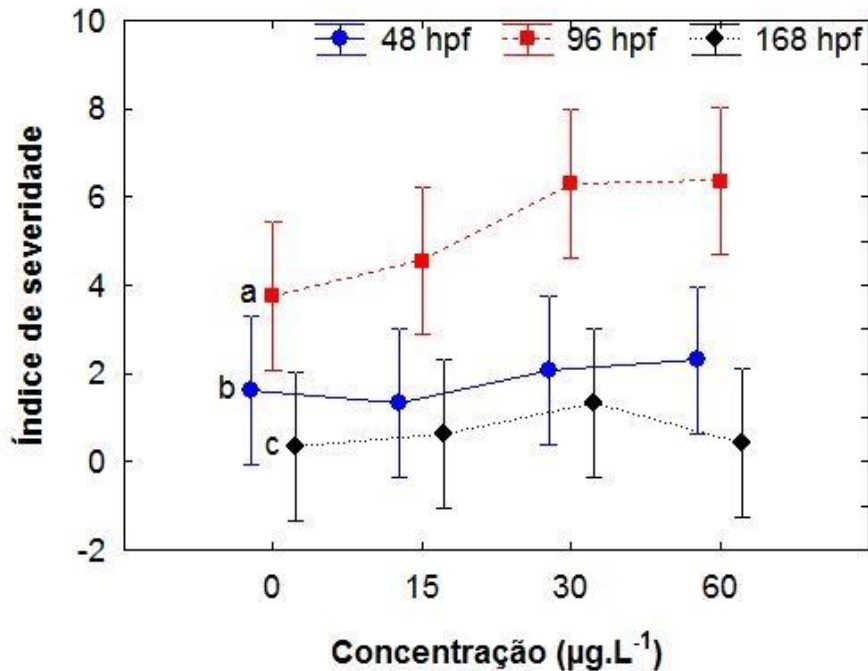
Fonte: Autoria própria (2021)

Apesar da concentração de 15 µg.L⁻¹ ter apresentado a maior taxa de sobrevivência, a baixa concentração promoveu um aumento na frequência dos efeitos teratológicos em 96 hpf. Esses resultados apontam que *R. quelen* é relativamente sensível a baixas concentrações de 2,4-D comercial comparado ao modelo experimental *Danio rerio*, que em um trabalho já publicado apresentou deformidades morfológicas significativas superiores a 320 µg.L⁻¹ de 2,4-D (GAAIED *et al.*, 2020).

Contudo, o índice que mede a severidade das deformidades morfológicas não se mostrou responsivo ao efeito conjunto das concentrações e do tempo de exposição ao 2,4-D ($F_{6,60}=0,545$; $p=0,77$). De forma isolada, o fator “concentração” também não influenciou estatisticamente o índice de severidade ($F_{3,60}=1,204$; $p=0,318$). Foi constatado diferença significativa apenas no tempo de exposição ($F_{2,60}=32,807$; $p<0,001$), sendo que o tempo de 96 hpf apresentou o maior índice de severidade, seguido de 48 hpf e 168 hpf, que apresentou o menor índice de severidade (Gráfico 11). A proposta de índice de severidade utilizada neste estudo, adaptada de Power *et al.* (2011), pode ter contribuído para a obtenção de resultados contraditórios com a frequência de indivíduos com danos. Neste estudo tivemos

principalmente em 96 hpf muitos indivíduos com danos considerados leves, de baixa pontuação, tais como lesões nas nadadeiras e distensão corporal.

Gráfico 11 – Índice de severidade de danos morfológicos observados em larvas de *R. quelen* expostos ao 2,4-D comercial ao longo de 48, 96 e 168 hpf



As letras indicam as diferenças ou semelhanças estatísticas pelo teste de Tukey.

Fonte: Autoria própria (2021)

As análises de comprimento total e a área corporal não demonstraram diferenças significativas na interação entre os dois fatores ($F_{6,60}=1,13$; $p=0,357$ e $F_{6,60}=1,05$; $p=0,406$, respectivamente). Ao analisar apenas o fator concentração não foi constatado diferença significativa entre o controle e os grupos expostos ao 2,4-D comercial em ambas as análises biométricas (Tabela 5). Somente o fator tempo apresentou diferença significativa no comprimento ($F_{2,60}= 263,78$; $p<0,001$) e na área ($F_{2,60}= 191,07$; $p<0,001$).

O 2,4-D não afetou o comprimento e a área corporal das larvas. Os resultados atuais contradizem os de Menezes *et al.* (2015) que em seu estudo com juvenis de *R. quelen* apresentaram diminuição no peso corporal e no comprimento após exposição a 500 e 2.000 µg.L⁻¹ de uma formulação comercial de 2,4-D. Para o estudo realizado com o peixe *Pimephales promelas*, as formulações comerciais avaliadas aumentaram o comprimento total e a massa das larvas em comparação ao controle (DEHNERT *et al.*, 2018).

Tabela 5 - Média e desvio padrão do comprimento total e área corporal das larvas de *R. quelen* expostas a diferentes concentrações de 2,4-D comercial

Tratamento/ tempo		48 hpf	96 hpf	168 hpf
Comprimento (cm)	0 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0.423 \pm 0.030 ^a	0.517 \pm 0.039 ^b	0.600 \pm 0.014 ^c
	15 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0.452 \pm 0.023 ^a	0.527 \pm 0.005 ^b	0.597 \pm 0.010 ^c
	30 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0.436 \pm 0.030 ^a	0.513 \pm 0.027 ^b	0.600 \pm 0.013 ^c
	60 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0.438 \pm 0.016 ^a	0.492 \pm 0.010 ^b	0.590 \pm 0.020 ^c
Área (cm ²)	0 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0.032 \pm 0.003 ^a	0.040 \pm 0.004 ^b	0.052 \pm 0.003 ^c
	15 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0.035 \pm 0.002 ^a	0.041 \pm 0.002 ^b	0.049 \pm 0.004 ^c
	30 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0.033 \pm 0.003 ^a	0.041 \pm 0.003 ^b	0.052 \pm 0.005 ^c
	60 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0.033 \pm 0.002 ^a	0.038 \pm 0.002 ^b	0.050 \pm 0.001 ^c

Média \pm Desvio padrão. As letras sobrescritas indicam as diferenças ou semelhanças estatísticas pelo teste de Tukey para os tempos de exposição.

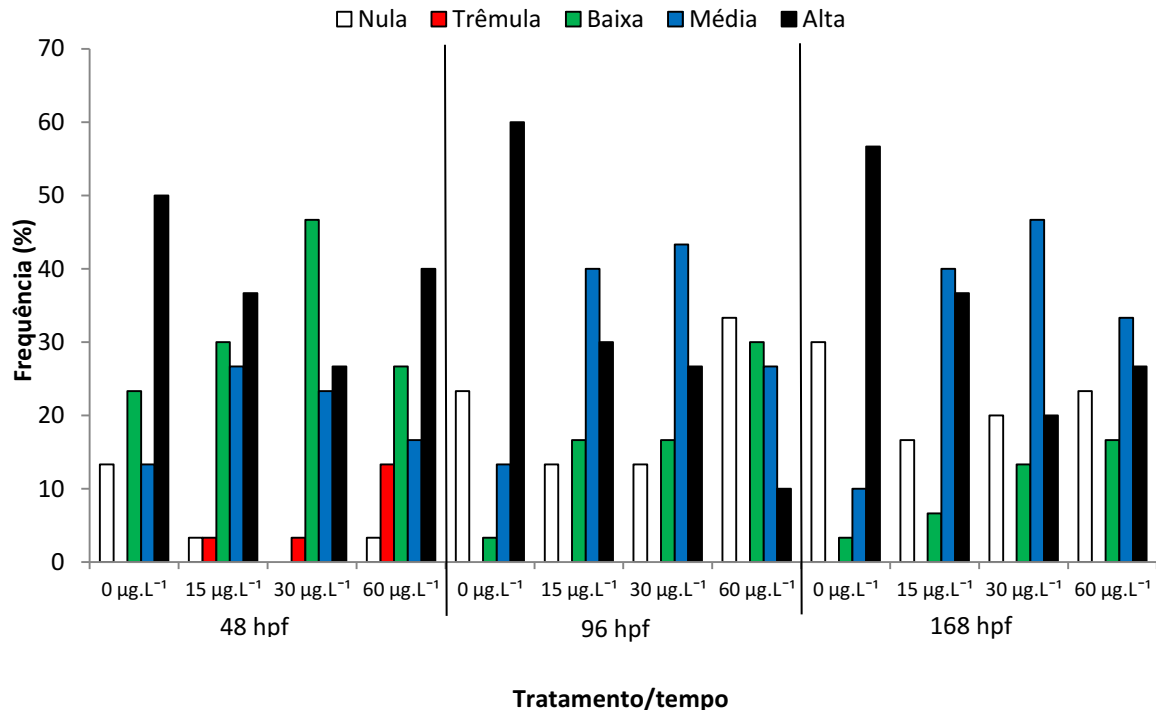
Fonte: Autoria própria (2021)

A disponibilidade de recursos e falta de competição por alimento podem ter auxiliado na manutenção das medidas corporais, bem como as baixas concentrações empregadas no trabalho, visto que na pesquisa de Li *et al.* (2017) foi observado redução no comprimento de embriões de *Danio rerio* expostos a 25.000 e 50.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de 2,4-D.

4.3.3 Mobilidade

Ao analisar a frequência de larvas nas classes de mobilidade foi possível constatar um predomínio do grupo controle na maior classe, com mobilidade alta, independentemente do tempo de exposição (Gráfico 12). Neste grupo, a classe trêmula não foi evidenciada e as demais classes tiveram, em geral, menor representatividade. Nos tempos de 96 e 168 hpf verificou-se uma tendência de menor mobilidade das larvas nos grupos tratados com o 2,4-D, visto que ocorreu uma diminuição na classe alta.

Gráfico 12 – Frequência das classes de mobilidade em larvas de *R. quelen* expostos ao 2,4-D comercial ao longo de 48, 96 e 168 hpf

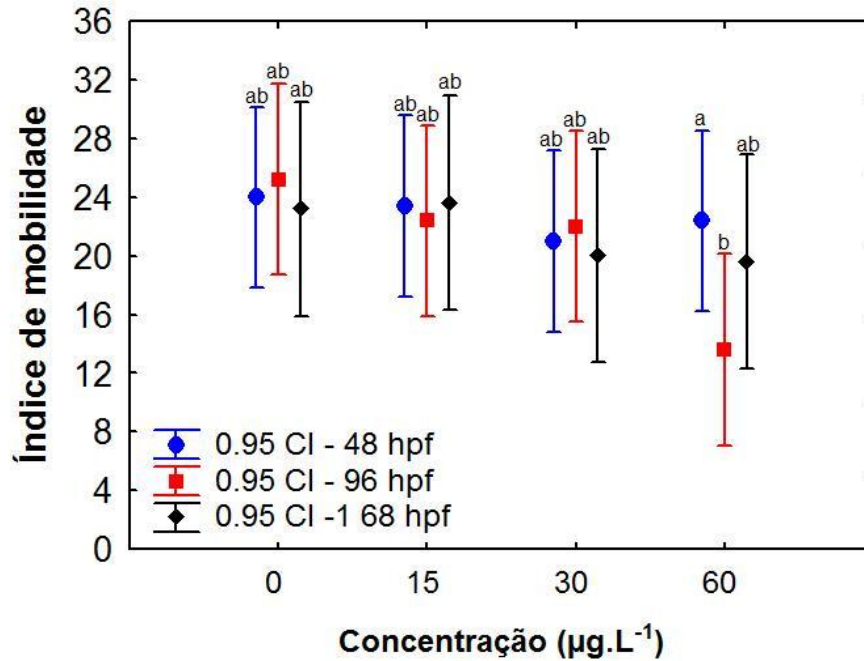


Fonte: Autoria própria (2021)

A partir do índice de mobilidade verificou-se que os fatores “concentração” e “tempo de exposição” interagiram e influenciaram a resposta ($F_{6,60} = 2,54$; $p = 0,0399$), principalmente pela significativa redução da mobilidade no grupo tratado com $60 \mu\text{g.L}^{-1}$ de 2,4-D após 96 hpf (Gráfico 13). Contudo, a mobilidade deste grupo voltou a subir e se igualou novamente com os demais após 168 hpf.

A velocidade de natação depende do impulso da cauda para criar fluxos de massa de água que auxiliam na propulsão das larvas. Para responder um estímulo e iniciar a natação são necessárias sinalizações bioquímicas dependentes de neurotransmissores (FOLLE *et al.*, 2020). O comprometimento na resposta e locomoção observada na maior concentração de 2,4-D em 96 hpf pode apontar um efeito neurotóxico transitório, que pode tornar as larvas temporariamente vulneráveis devido ao provável acúmulo de acetilcolina nas fendas sinápticas, produzindo excitabilidade excessiva do músculo, comportamento espasmático, com perda do controle de natação e dificuldade em controlar o movimento opercular (DOS SANTOS MIRON *et al.*, 2005; PERKINS; SCHLENK, 2000).

Gráfico 13 - Índice de mobilidade em larvas de *R. quelen* expostos ao 2,4-D comercial ao longo de 48, 96 e 168 hpf



As letras sobre as barras indicam as diferenças ou semelhanças estatísticas pelo teste de Tukey.

Fonte: Autoria própria (2021)

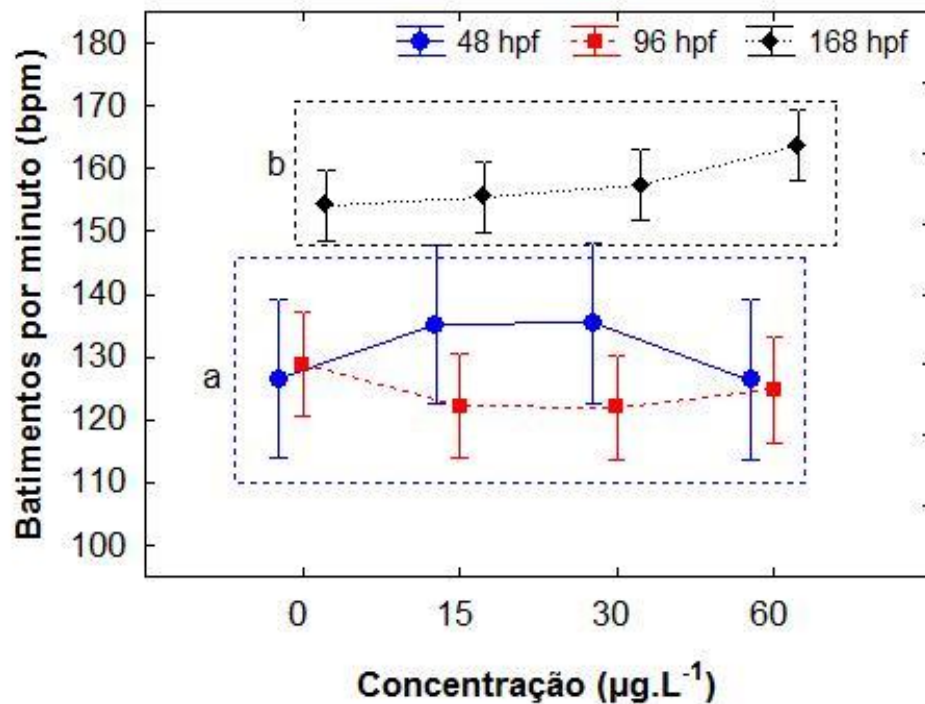
Larvas de *Danio rerio* expostas ao 2,4-D apresentaram inibição da atividade da colinesterase e alteração no comportamento locomotor das larvas (GAAIED *et al.*, 2020). Um estudo realizado com *R. quelen* apontou que 2,4-D inibiu a atividade da acetilcolinesterase em 1.000 µg.L⁻¹ em ensaio agudo (DA FONSECA *et al.*, 2008), porém não é possível apontar um efeito neurotóxico para a baixa mobilidade registrada em 60 µg.L⁻¹ sem uma análise bioquímica desta enzima. Além disso, a baixa frequência de mobilidade na classe alta em 96 hpf para os grupos tratados com 2,4-D pode estar relacionada com as maiores frequências de deformidades axiais e nas nadadeiras, dificultando a locomoção ao estímulo.

4.3.4 Frequência cardíaca

A ANOVA bifatorial revelou diferenças significativas na frequência cardíaca somente em função do tempo de exposição, sendo maior em 168 hpf independente do grupo experimental ($F_{2, 60} = 57,65; < 0,001$). As larvas dos tempos de 48 e 96 hpf apresentaram uma frequência cardíaca similar, não tendo influência dos tratamentos

(Gráfico 14).

Gráfico 14 - Frequência cardíaca em larvas de *R. quelen* expostos ao 2,4-D comercial ao longo de 48, 96 e 168 hpf



As letras indicam as diferenças ou semelhanças estatísticas pelo teste de Tukey.
Fonte: Autoria própria (2021)

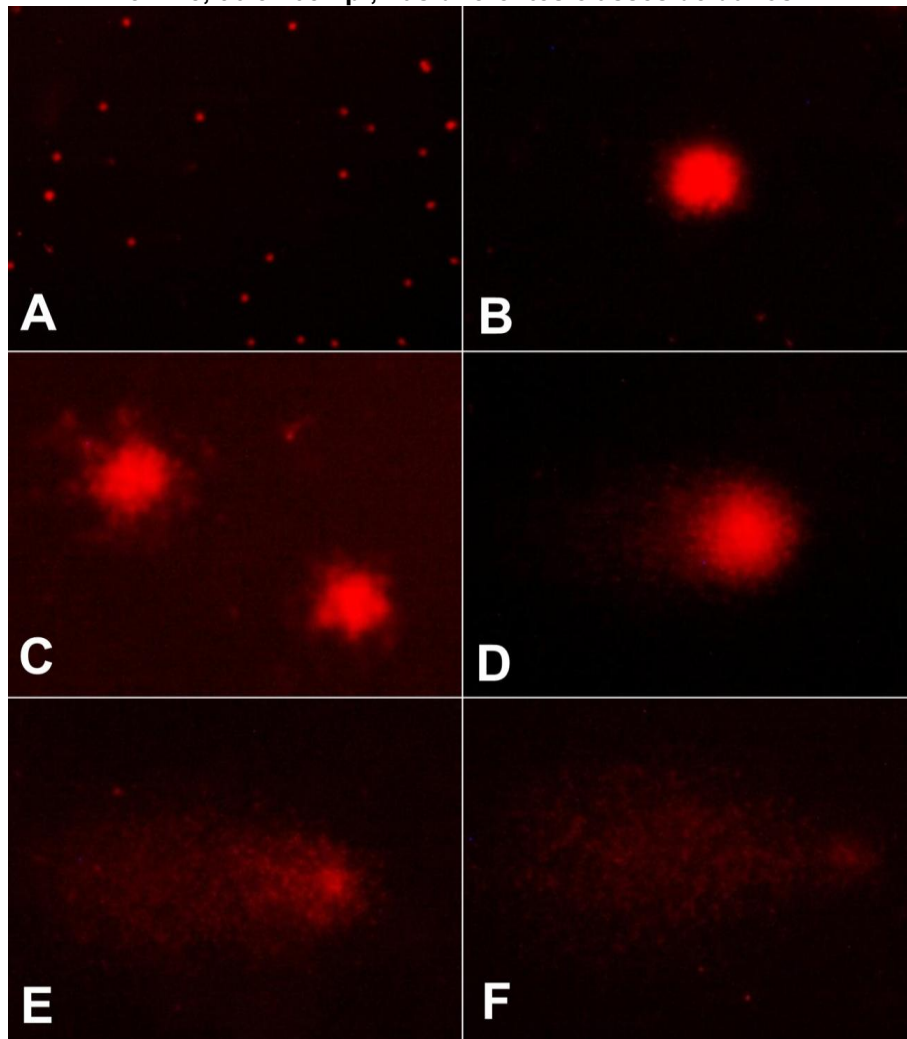
O 2,4-D não influenciou na frequência dos batimentos cardíacos e não foi registrada uma frequência alta de deformidades cardíacas nas larvas, que pode justificar os resultados. Resultado semelhante foi obtido após a exposição de larvas de peixe zebra a concentrações que variaram de 20 a 800 µg.L⁻¹ de 2,4-D, não apresentando diferenças no batimento cardíaco (GAAIED *et al.*, 2020). Foi verificada taquicardia em larvas de *Danio rerio* quando expostas a 25.000 µg.L⁻¹ de 2,4-D e batimentos irregulares em concentrações acima de 50.000 µg.L⁻¹ com insuficiência cardíaca (LI *et al.*, 2017).

As concentrações de 2,4-D utilizadas neste trabalho são muito inferiores às utilizadas no trabalho com peixe zebra, não sendo suficientes para afetar o ritmo cardíaco das larvas. A diferença observada está apenas nos tempos de exposição, com elevado batimento cardíaco em 168 hpf, independente do tratamento, possivelmente relacionado com a maior movimentação para a captura de alimento.

4.3.5 Ensaio cometa

Foram observados efeitos na taxa de quebra da fita de DNA por meio do ensaio cometa. As cinco classes de nucleoides propostas no ensaio cometa (normal e com danos) foram observadas e registradas no presente estudo, conforme pode ser observado na Fotografia 5.

Fotografia 5 - Nucleoides das larvas de *R. quelen* expostos a formulação comercial do 2,4-D em 48, 96 e 168 hpf, nas diferentes classes de danos



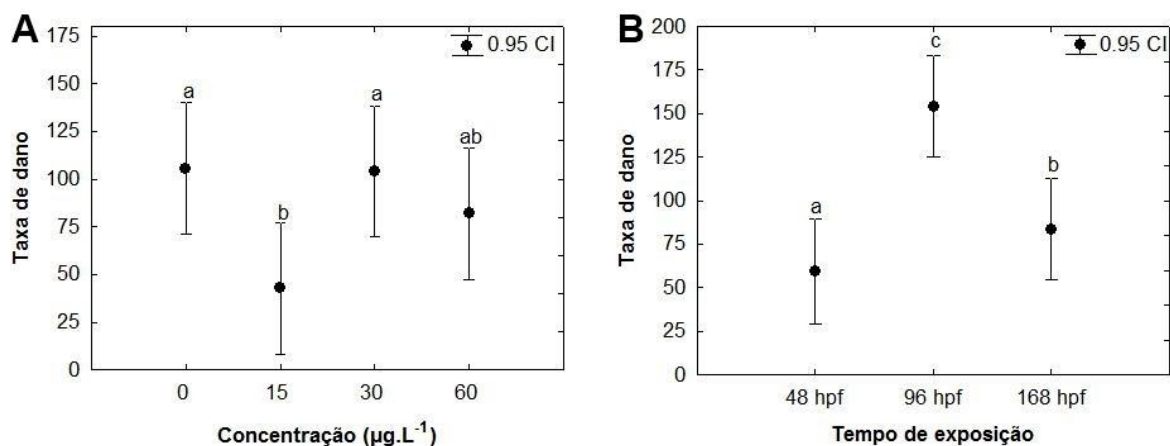
A) Nucleoides no aumento de 10X. B) Dano 0: sem dano aparente. C) Dano 1: dano pequeno. D) Dano 2: dano médio. E) Dano 3: dano grande. F) Dano 4: dano máximo, apoptose. B-F: aumento de 40X.

Fonte: Autoria própria (2021)

O índice de danos ao DNA pelo ensaio cometa não apresentou interação entre os fatores “concentração” e “tempo de exposição” ($F_{6,59}=1,807$; $p=0,118$). Ao analisar apenas o efeito da concentração verificou-se que o grupo tratado com 15

$\mu\text{g.L}^{-1}$ de 2,4-D apresentou uma significativa redução do índice em 168 hpf, enquanto os demais grupos foram similares ao controle ($F_{2,20}= 4,042$; $p= 0,025$), podendo estar relacionado a maior taxa de sobrevivência nesta concentração (Gráfico 15 A). Em relação ao tempo de exposição, verificou-se que os animais de 96 hpf tiveram um significativo incremento nos danos ao DNA, independente do grupo experimental ($F_{2,59}=14,604$; $p<0,001$). Valores intermediários do índice foram observados em 168 hpf (Gráfico 15 B).

Gráfico 15 - Índice de danos ao DNA pelo ensaio cometa em larvas de *R. quelen* expostos ao 2,4-D comercial ao longo de 48, 96 e 168 hpf



A) Índice de danos em 168 hpf. B) Índice de danos em relação aos tempos de exposição. As letras indicam as diferenças ou semelhanças estatísticas pelo teste de Tukey.

Fonte: Autoria própria (2021)

A diferença observada nos índices de danos ao DNA ao longo dos tempos de exposição pode estar relacionada aos diferentes estágios de desenvolvimento das larvas. Desde a eclosão até o final do tempo de exposição avaliado, grandes mudanças ocorreram nos indivíduos, passando por divisões celulares constantes, além da exposição a uma substância química, que pode desencadear um estresse que produza espécies reativas de oxigênio e provoque quebras no DNA (FERRARO *et al.*, 2004; ZAFRA-LEMOS *et al.*, 2021).

A menor concentração produziu significativamente menos danos ao DNA do que o controle e as demais concentrações e esta mesma concentração apresentou maior sobrevivência. A ausência de danos pode ter relação com a possibilidade do desenvolvimento de cross-link, em que a molécula de 2,4-D pode se ligar ao DNA e inibir o desenrolamento da fita DNA e impedir a fragmentação das moléculas de DNA e não produzir uma cauda de cometa (MIYAMAE *et al.*, 1997; VENTURA *et al.*,

2013).

Contrapondo estes resultados, trabalhos com *Astyanax lacustris* e *R. quelen* apresentaram altos índices de danos ao DNA quando expostos ao 2,4-D em concentrações superiores a $10.000 \mu\text{g.L}^{-1}$ (ATEEQ; FARAH; AHMAD, 2005; ZAFRA-LEMOES *et al.*, 2021). Os danos ao DNA compreendem a uma organização biológica baixa e as células possuem um sistema de reparo de DNA que pode ter atuado de forma rápida, não evidenciando danos provocados pelo 2,4-D (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A ausência de resultados significativos pode estar relacionada as baixíssimas concentrações utilizadas aqui e as condições ótimas fornecidas as larvas durante a exposição, sem a presença de predadores, patógenos, controle de temperatura e pH da água e fornecimento de alimento. Condições estas que no ambiente natural não se fazem presente, podendo modificar a resposta a exposição ao 2,4-D.

Contudo, essas concentrações estão dentro do limite previsto em legislações (WHO, 2003) e também dentro daquilo que é, de fato, mensurado nos corpos hídricos (ISLAM *et al.*, 2018). A ausência de efeitos significativos valida, pelo menos neste estudo, o limite estabelecido pelas legislações, que visam determinar um valor que não provoque danos ao meio ambiente e ao ser humano.

Os trabalhos aqui citados geralmente fizeram uso de concentrações muito superiores as encontradas no ambiente, que pode indicar uma tendência em atribuir efeito ao 2,4-D, sem dar chance ao produto se mostrar efetivo e ambientalmente compatível. Trabalhos recentes comentam da necessidade de se trabalhar com concentrações mais realísticas, mostrando tendências mais fidedignas ao que acontece no meio ambiente (DEHNERT *et al.*, 2018). O 2,4-D é amplamente comercializado e aplicado em lavouras e jardins e pode não trazer prejuízos ao meio ambiente caso não ultrapasse os limites estabelecidos, que pareceram adequados para o ambiente, segundo este estudo.

Restringir o uso ou até mesmo banir produtos que não apresentam efeitos adversos nos limites estabelecidos (permissivos e realísticos) pode indiretamente aumentar a demanda pelo lançamento de novos herbicidas, cujos efeitos toxicológicos são desconhecidos e potencialmente incompatíveis com o meio ambiente. Por isso, é necessário ampliar a avaliação de risco ecológico antes da tomada de decisão. Desta forma, o baixo efeito do 2,4-D aqui observado, diante de uma formulação comercial e em concentrações permissivas e realísticas, coloca as

práticas de manejo das culturas como um fator importantíssimo para o uso adequado e compatível, visto que este herbicida está a mais de 80 anos no mercado e possui efetividade no controle de ervas daninhas.

4.4 Conclusão

A exposição das larvas de *R. quelen* ao 2,4-D comercial em concentrações permitidas por legislações não afetou significativamente a eclosão dos embriões e a sobrevivência foi superior na menor concentração do herbicida até o esgotamento das reservas nutricionais. Após o início da alimentação exógena, a sobrevivência das larvas sofreu uma queda em todos os grupos experimentais. Portanto, efeito letal não foi constatado para fases iniciais de desenvolvimento de *R. quelen*, sugerindo que as concentrações permissivas e realísticas são adequadas para a espécie, ao menos em condições experimentais. A letalidade em organismos-teste é um parâmetro importante na legislação ambiental, pois geralmente baliza os limites máximos permitidos para compostos orgânicos e inorgânicos no ambiente.

Por outro lado, o 2,4-D comercial provocou um aumento significativo na frequência de larvas com deformidades morfológicas nos grupos tratados com o 2,4-D em 96 hpf, principalmente nas categorias axial e nas nadadeiras, demonstrando que tem potencial para prejudicar o desenvolvimento e recrutamento de espécies de peixes no ambiente natural. Além disso, a mobilidade foi reduzida nas três concentrações testadas, indicando uma certa sensibilidade das larvas de *R. quelen* a formulação comercial do 2,4-D. Vale ressaltar que a biometria, a frequência cardíaca e os danos ao DNA das larvas não foram afetados pela exposição ao herbicida em relação ao controle.

Assim, considerando os efeitos detectados no presente estudo e o princípio da precaução, verifica-se que a formulação comercial do 2,4-D tem efeitos tóxicos latentes sobre a espécie estudada, indicando que pode acarretar em um desequilíbrio futuro da população.

5 CONCLUSÃO GERAL

A meta-análise apontou que o 2,4-D possui efeito letal sobre diversas espécies animais mesmo em concentrações ambientais. Entretanto, a susceptibilidade dos animais depende do grupo taxonômico, sua fase de vida, via de exposição, duração da exposição, concentração e formulação do 2,4-D.

O limite estabelecido na meta-análise de $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D foi dez vezes superior a maior concentração utilizada no bioensaio com *R. quelen*. Embora a experimentação com as larvas de *R. quelen* tenha abordado um dos subgrupos com maior efeito letal identificados na meta-análise, não foi observado efeito letal significativo, apenas efeitos tóxicos latentes (subletais).

Os resultados sugerem que as concentrações permissivas e realísticas, nas condições testadas, possuem pouco efeito toxicológico sobre *R. quelen*. Seguindo os limites estabelecidos na legislação, com técnicas adequadas de manejo das culturas, o uso do 2,4-D pode não representar um risco elevado ao meio ambiente e conseqüentemente ao ser humano, mas sugere-se ampliar as investigações com o uso de biomarcadores mais sensíveis e em diferentes grupos taxonômicos.

REFERÊNCIAS

- AMARANTE JUNIOR, O. P. *et al.* Revisão das propriedades, usos e legislação ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). **Cadernos de Pesquisa**, São Luís, v. 13, n. 1, p. 60–70, 2002.
- AQUINO, A. J. A. *et al.* Interaction of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide with soil organic matter moieties: A theoretical study. **European Journal of Soil Science**, v. 58, n. 4, p. 889–899, 2007.
- ARIAS, A. R. L. *et al.* Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 61–72, 2007.
- ARONZON, C.M. *et al.* Stage-dependent toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad, *Rhinella arenarum*. **Environ. Toxicol.** v. 26, p. 373–381, 2011.
- ATAMANIUK, T. M. *et al.* Oxidative stress as a mechanism for toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D): Studies with goldfish gills. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 10, p. 1498–1508, 2013.
- ATEEQ, B.; FARAH, M. A.; AHMAD, W. Detection of DNA damage by alkaline single cell gel electrophoresis in 2,4-dichlorophenoxyacetic-acid- and butachlor-exposed erythrocytes of *Clarias batrachus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, n. 3, p. 348–354, 2005.
- ATWOOD, D. Pesticides Industry Sales and Usage 2008-2012 Market Estimates. **U.S. Environmental Protection Agency**. Washington, DC 20460, 2017.
- AZEVEDO-LINHARES, M. *et al.* Microcystin and pyriproxyfen are toxic to early stages of development in *Rhamdia quelen*: An experimental and modelling study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 166, p. 311–319, 2018.
- BATTISTI, L. *et al.* Response to Letter to the Editor “Is glyphosate toxic to bees? A meta-analytical review”. **Science of the Total Environment**, n. xxxx, 2021.
- BENLI, A. Ç. K. *et al.* The sublethal effects of (2,4-Dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) on narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823). **Arhivza Higijenu Radai Toksikologiju**, v. 67, n. 4, p. 289–296, 2016.
- BOMBARDELLI, R. A. *et al.* Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1251–1257, 2006.
- BORENSTEIN, M. *et al.* **Introduction to Meta-Analysis**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2009.
- BORSOI, A. *et al.* Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente. **Acta Iguazu**,

Cascavel, v. 3, n. 1, p. 86–100, 2014.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução do CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Publicada no DOU nº 053, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria n.º 2.914, de 12 de Dezembro de 2011**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília: SVS, 2011.

BRASIL. **Resolução-RE nº 2.080, de 31 de julho de 2019**. Dispõe sobre a reclassificação toxicológica de agrotóxico. Publicado no Diário Oficial da União em:01/08/2019, Edição 147, Seção: 1, Página 94, 2019.

BREVIK, K. *et al.* Transgenerational effects of insecticides — implications for rapid pest evolution in agroecosystems. **Current Opinion in Insect Science**, v. 26, p. 34–40, 2018.

BRITO, I. DE A. *et al.* Embryo toxicity assay in the fish species *Rhamdia quelen* (Teleostei, Heptaridae) to assess water quality in the Upper Iguaçu basin (Parana, Brazil). **Chemosphere**, v. 208, p. 207–218, 2018.

BROVINI, E. M. *et al.* Three-bestseller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. **Science of the Total Environment**, v. 771, 2021.

BURNS, C. J.; SWAEN, G. M. H. Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) biomonitoring and epidemiology. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 42, n. 9, p. 768–786, 2012.

CAPELA, R. *et al.* Embryo bioassays with aquatic animals for toxicity testing and hazard assessment of emerging pollutants: A review. **Science of the Total Environment**, v. 705, p. 135740, 2020.

CARRASCHI, S. P. *et al.* Efeitos tóxicos de surfactantes fitossanitários para o peixe mato grosso (*Hyphessobrycon eques*). **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 33, n. 2, p. 191–196, 2011.

CASSAL, V. B. *et al.* Agrotóxicos: Uma Revisão De Suas Consequências Para a Saúde Pública. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 437–445, 2014.

CATTANEO, R. *et al.* Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 92, n. 3, p. 133–137, 2008.

CHARLES, J. M. *et al.* Chronic Dietary Toxicity / Oncogenicity Studies on 2 , 4-

Dichlorophenoxyacetic Acid in Rodents. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 33, p. 166–172, 1996a.

CHARLES, J. M. *et al.* Comparative subchronic studies on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, amine, and ester in rats. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 161–165, 1996b.

CHARLES, J. M. *et al.* Developmental toxicity studies in rats and rabbits on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its forms. **Toxicological Sciences**, v. 60, n. 1, p. 121–131, 2001.

COADY, K. K. *et al.* Evaluation of potential endocrine activity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using in vitro assays. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 5, p. 1018–1025, 2014.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249–261, 2004.

COLÓN-CRUZ, L. *et al.* Alterations of larval photo-dependent swimming responses (PDR): New endpoints for rapid and diagnostic screening of aquatic contamination. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, n. August 2017, p. 670–680, 2018.

COOKE, A. S. The effects of DDT, dieldrin and 2,4-D on amphibian spawn and tadpoles. **Environmental Pollution**, v. 3, n. 1, p. 51–68, 1972.

COOPER, H. **Research synthesis and meta-analysis: A step-by-step approach**. 3. ed. Thousand Oaks, CA: Sage, 2010.

COSTA, C. R. *et al.* A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Quimica Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

CTNBIO - COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. **Evento DAS-68416-4 - Soja geneticamente modificada tolerante ao 2,4D**. Disponível em: <<http://cib.org.br/biotecnologia/regulamentacao/ctnbio/eventos-aprovados/das-68416-4/>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

DA FONSECA, M. B. *et al.* 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.

DAAM, M. A. *et al.* Environmental risk assessment of pesticides in tropical terrestrial ecosystems: Test procedures, current status and future perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 181, p. 534–547, 2019.

DAVIS, G. R. F. Effects of 2,4-D, maleic acid hydrazide, and 2,4,5-T on survival and growth of the prairie grain wireworm, *Ctenicera destructor* Brown (Coleoptera: Elateridae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 46, n. 4, p. 747–750, 1968.

DEHNERT, G. K. *et al.* Effects of low, subchronic exposure of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and commercial 2,4-D formulations on early life stages of fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 10, p. 2550–2559, 2018.

DEHNERT, G. K. *et al.* Impacts of subchronic exposure to a commercial 2,4-D herbicide on developmental stages of multiple freshwater fish species. **Chemosphere**, v. 263, 2021.

DEHNERT, G. K.; KARASOV, W. H.; WOLMAN, M. A. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid containing herbicide impairs essential visually guided behaviors of larval fish. **Aquatic Toxicology**, v. 209, p. 1–12, 2019.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 12, p. 1296–1301, 2014.

DEQUATTRO, Z. A.; KARASOV, W. H. Impacts of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid aquatic herbicide formulations on reproduction and development of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 6, p. 1478–1488, 2016.

DIN. German standard methods for the examination of water, waste water and sludge – subanimal testing (group T) – Part 6: toxicity to fish. **Determination of the non-acute-poisonous effect of waste water to fish eggs by dilution limits (T 6)**. DIN 38415-6, German Standardization Organization, 2001.

DINAR, A.; TIEU, A.; HUYNH, H. Water scarcity impacts on global food production. **Global Food Security**, v. 23, p. 212–226, 2019.

DOS SANTOS MIRON, D. *et al.* Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, n. 3, p. 398–403, 2005.

ENSMINGER, M.P. *et al.* Pesticide occurrence and aquatic benchmark exceedances in urban surface waters and sediments in three urban áreas of California, USA, 2008–2011. **Environ. Monit. Assess.** v.185, p. 3697–3710, 2013.

ERNST, F. *et al.* Occurrence of pesticide residues in fish from south American rainfed agroecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 631–632, p. 169–179, 2018.

EVANS, A. E. *et al.* Agricultural water pollution: key knowledge gaps and research needs. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, v. 36, p. 20–27, 2019.

FERRARO, M. V. M. *et al.* Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 1, p. 103–107, 2004.

FINLAYSON, B. J.; VERRUE, K. M. Toxicities of Butoxyethanol Ester and Propylene Glycol Butyl Ether Ester Formulations of 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D) to Juvenile Salmonids. **Arch. Environ. Contam. Toxicol**, v. 14, p. 153–160, 1985.

FOLLE, N. M. *et al.* Low concentration of 2,4,6-tribromophenol (TBP) represents a risk to South American silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, 1824) population. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 187, 2020.

FREITAS, J. S. *et al.* Effects of 2,4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 182, 2019.

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.

GAAIED, S. *et al.* Gene expression patterns and related enzymatic activities of detoxification and oxidative stress systems in zebrafish larvae exposed to the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide. **Chemosphere**, v. 224, p. 289–297, 2019.

GAAIED, S. *et al.* 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid herbicide effects on zebrafish larvae: development, neurotransmission and behavior as sensitive endpoints. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 4, p. 3686–3696, 2020.

GERSICH, E. M.; MILAZZO, D. P. Evaluation of a 14-Day Static Renewal Toxicity Test with *Daphnia magna* Straus. **Arch. Environ. Contam. Toxicol**, v. 19, p. 72–76, 1990.

GHISI, N. DE C.; OLIVEIRA, E. C. DE; PRIOLI, A. J. Does exposure to glyphosate lead to an increase in the micronuclei frequency? A systematic and meta-analytic review. **Chemosphere**, v. 145, p. 42–54, 2016.

GOMES, L. C. *et al.* Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179–185, 2000.

GORZINSKI, S. J. *et al.* Acute, pharma- cokinetic, and subchronic toxicological studies of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.9,p.423–435, 1987.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: mutação, câncer e reprodução**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2005.

GROSSMANN, K. Auxin herbicides: Current status of mechanism and mode of action. **Pest Management Science**, v. 66, n. 2, p. 113–120, 2010.

HANSEN, W. H. *et al.* Chronic Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Rats and Dogs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 20, p. 122–129, 1971.

HATTAB, S. *et al.* 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.

HEALTH CANADA. **2,4- Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) in Drinking Water.** Guideline Technical Document for Public Consultation. Ottawa, 2020.

HEDGES, L. V. Distribution Theory for Glass's Estimator of Effect size and Related Estimators. **Journal of Educational Statistics**, v. 6, n. 2, p. 107–128, 1981.

HEGGSTROM, M. J. **The sublethal effects of 2,4-D dimethylamine on wood frog tadpoles in Saskatchewan.** Thesis Master of Science. University of Saskatchewan. Canada, 2009.

HIGGINS, J. P. T. *et al.* Measuring inconsistency in knowledgebases. **Journal of Intelligent Information Systems**, v. 27, n. 2, p. 159–184, 2006.

ISLAM, F. *et al.* Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. **Environment International**, v. 111, p. 332–351, 2018.

ISO. **Water quality – determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*).** ISO 15088:2007, 2007.

KASHIAN, D. R.; DODSON, S. I. Effects of common-use pesticides on developmental and reproductive processes in *Daphnia*. **Toxicology and Industrial Health**, v. 18, n. 5, p. 225–235, 2002.

KAYA, İ. *et al.* The effects of carbaryl and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on oxidative stress index in *Capoeta capoeta* (Guldensteadt 1773). **Pakistan Journal of Zoology**, v. 51, n. 1, p. 189–193, 2019.

KAZEMI, H.; KLUG, H.; KAMKAR, B. New services and roles of biodiversity in modern agroecosystems: A review. **Ecological Indicators**, v. 93, p. 1126–1135, 2018.

KOZIOSKI, G. V.; CIOCCA, M. DE L. S. Energia e sustentabilidade em agroecossistemas. **Ciência Rural**, v. 30, n. 4, p. 737–745, dez. 2006.

LAJMANOVICH, R.C. *et al.* Harmful effects of the dermal in- take of commercial formulations containing chlorpyrifos, 2, 4-D, and glyphosate on the common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). **Water Air Soil Pollut.** v.36, p.226–427, 2015.

LAMMER, E. *et al.* Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 149, n. 2, p. 196–209, 2009.

LI, K. *et al.* Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. **Chemosphere**, v. 171, p. 40–48, 1 mar. 2017.

LIEBEL, S.; TOMOTAKE, M. E. M.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A. Fish histopathology as biomarker to evaluate water quality. **Ecotoxicology and Environmental**

Contamination, v. 8, n. 2, p. 9–15, 2013.

LINDSAY, S. *et al.* Impacts of stage-specific acute pesticide exposure on predicted population structure of the soft-shell clam, *Mya arenaria*. **Aquatic Toxicology**, v. 98, n. 3, p. 265–274, 2010.

LINS, J. A. P. N. *et al.* Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica Ciência Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 469–484, 2010.

LITTEL, J. H.; CORCORAN, J.; PILLAI, V. **Systematic Reviews and Meta-Analysis**. Oxford University Press, USA, 2008.

LITTLE, E. E. *et al.* Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 19, n. 3, p. 380–385, 1990.

LIU, W. *et al.* Formation and contamination of PCDD/Fs, PCBs, PeCBz, HxCBz and polychlorophenols in the production of 2,4-D products. **Chemosphere**, v. 92, p.304-308, 2013.

MAGGI, F. *et al.* PEST-CHEMGRIDS, global gridded maps of the top 20 crop-specific pesticide application rates from 2015 to 2025. **Scientific Data**, v. 6, n. 1, p. 1–20, 2019.

MALAJ, E. *et al.* Organic chemicals jeopardize the health of freshwater ecosystems on the continental scale. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 26, p. 9549–9554, 2014.

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, and Soil Pollution**, v. 228, n. 3, 2017.

MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S.; GUIMARÃES, T. G. Herbicidas: mecanismos de ação e uso. **Documentos**, p. 36, 2008.

MAROUANI, N. *et al.* Effects of oral administration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on reproductive parameters in male Wistar rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 1, p. 519–526, 2017.

MATASIN, Z. Heavy metal concentrations in predator fish. **Journal of animal and veterinary advances**, v.10, p. 1214-1218, 2011.

MENEZES, C. *et al.* Commercial formulation containing 2,4-D affects biochemical parameters and morphological indices of silver catfish exposed for 90 days. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 323–330, 2015.

MERINI, L. J. *et al.* Dissipation of 2,4-D in soils of the Humid Pampa region, Argentina: A microcosm study. **Chemosphere**, v. 68, n. 2, p. 259–265, 2007.

MIYAMAE, Y. *et al.* Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 393, n. 1–2, p. 107–113, 1997.

MOHAMMED, A. Why are Early Life Stages of Aquatic Organisms more Sensitive to Toxicants than Adults? **New Insights into Toxicity and Drug Testing**, 2013.

MOHER, D. *et al.* Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. **PLoS Med**, v. 6, n. 7, 2009.

MOREIRA, R. A. *et al.* Life-History Traits Response to Effects of Fish Predation (Kairomones), Fipronil and 2,4-D on Neotropical Cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 79, n. 3, p. 298–309, 2020.

MORGULIS, M. S. F. A. *et al.* Acute 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Intoxication in Broiler Chicks. **Poultry Science**, v. 77, n. 4, p. 509–515, 1998.

MOSCOVA, M. *et al.* Effects of a desecant formulation, SR-51 ® and its individual components on the oxidative functions of mitochondria. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 18, n. 2, p. 181–184, 2004.

NAGY, K. *et al.* Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations. **Environmental Research**, v. 181, 2020.

OECD. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2**, OECD Publishing, Paris, 2019.

OECD. Test No. 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2**, OECD Publishing, Paris, 2013.

OECD. Test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2**, OECD Publishing, Paris, 1998.

OECD. Test No. 215: Fish, Juvenile Growth Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2**, OECD Publishing, Paris, 2000.

OECD. Test No. 230: 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2**, OECD Publishing, Paris, 2009.

ORTIZ-SANTALIESTRA, M. E. *et al.* Egg Overspray with Herbicides and Fungicides Reduces Survival of Red-Legged Partridge Chicks. **Environmental Science and Technology**, v. 54, n. 19, p. 12402–12411, 2020.

PAMANJI, R. *et al.* Developmental toxic effects of monocrotophos, an organophosphorous pesticide, on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Environmental**

Science and Pollution Research, v. 22, n. 10, p. 7744–7753, 2015.

PANDEY, R. K. *et al.* Acute toxicity bioassay of dimethoate on freshwater airbreathing catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Journal of Environmental Biology**, v. 30, n. 3, p. 437–440, 2009.

PARK, K. *et al.* Biological and molecular responses of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) to herbicide 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid). **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 151, n. 4, p. 439–446, 2010.

PEREIRA, C. R. *et al.* Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a South American catfish. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 4, p. 1057–1063, 2006.

PERKINS, E. J.; SCHLENK, D. In vivo acetylcholinesterase inhibition, metabolism, and toxicokinetics of aldicarb in channel catfish: Role of biotransformation in acute toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 53, n. 2, p. 308–315, 2000.

PEROTTI, V. E. *et al.* Herbicide resistant weeds: A call to integrate conventional agricultural practices, molecular biology knowledge and new technologies. **Plant Science**, v. 290, 2020.

PETERSON, M. A. *et al.* 2,4-D Past, Present, and Future: A Review. **Weed Technology**, v. 30, n. 2, p. 303–345, 2016.

PINHEIRO, A.; SILVA, M. R. DA; KRAISCH, R. Presença de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas na bacia do Itajaí, SC. **Rega**, v. 7, n. 2, p. 17–26, 2010.

PINTO, T. J. DA S. *et al.* Functional responses of *Hyaella meinerti* after exposure to environmentally realistic concentrations of 2,4-D, fipronil, and vinasse (individually and in mixture). **Aquatic Toxicology**, v. 231, n. December 2020, 2021a.

PINTO, T. J. DA S. *et al.* Impact of 2,4-D and fipronil on the tropical midge *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 209, 2021b.

POWERS, C. M. *et al.* Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior: Distinct roles for particle size, coating and composition. **Neurotoxicology and Teratology**, 33, 708–714, 2011.

QUOY, J. R. C.; GAIMARD, J. P. Description des Poissons. Chapter IX. In: Freycinet, L. (Ed.) **Voyage autour du Monde ...exécuté sur les corvettes de L. M. "L'Uranie" et "La Physicienne", pendant les années 1817, 1818, 1819 et 1820.** Chex Pillet aîné, Paris, 1824.

REES, N. E.; FAY, P. K. Survival of Leafy Spurge Hawk Moths (*Hyles euphorbiae*) When Larvae Are Exposed to 2,4-D or Picloram. **Weed Technology**, v. 3, n. 2, p. 429–431, 1989.

RELYEA, R. A. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. **Ecological Applications**, v. 15, n. 2, p. 618–627, 2005a.

RELYEA, R. A. The Impact of Insecticides and Herbicides on the Biodiversity and Productivity of Aquatic Communities Author (s): Rick A . Relyea Published by : Wiley on behalf of the Ecological Society of America Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/4543379> Wiley. **Ecological Applications**, v. 15, n. 2, p. 618–627, 2005b.

RELYEA, R. A. A cocktail of contaminants: How mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. **Oecologia**, v. 159, n. 2, p. 363–376, 2009.

RIBEIRO, R. X. *et al.* Ecotoxicological assessment of effluents from Brazilian wastewater treatment plants using zebrafish embryotoxicity test: A multi-biomarker approach. **Science of the Total Environment**, v. 735, 2020.

RODIL, R. *et al.* Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain). **Chemosphere**, v. 86, p. 1040–1049, 2010.

RODRIGUES-GALDINO, A. M. *et al.* Development of the neotropical catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) incubated in different temperature regimes. **Zygote**, v. 18, n. 2, p. 131–144, 2009.

RODRÍGUEZ, E. M.; MONSERRAT, J. M.; AMÍN, O. A. Chronic toxicity of ethyl parathion and isobutoxyethanol ester of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid to estuarine juvenile and adult crabs. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 22, n. 1, p. 140–145, 1992.

ROHATGI, A. **WebPlotDigitizer**. Version 4.4. Website: <https://automeris.io/WebPlotDigitizer>. Pacifica, California, USA, 2020.

RUIZ DE ARCAUTE, C.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 128, p. 222–229, 2016.

RUIZ DE ARCAUTE, C.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Synergism of mixtures of dicamba and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide formulations on the neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). **Environmental Pollution**, v. 236, p. 33–39, 2018.

RUTHERFORD, A. **ANOVA and ANCOVA**: a GLM approach. 2. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2011.

SARIKAYA, R.; SELVI, M. Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid (2,4-D) herbicide on larvae and adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 20, n. 2, p. 264–268, 2005.

SARIKAYA, R.; YILMAZ, M. Investigation of acute toxicity and the effect of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae). **Chemosphere**, v. 52, n. 1, p. 195–201, 2003.

SIDDIG, A. A. H. *et al.* How do ecologists select and use indicator species to monitor ecological change? Insights from 14 years of publication in Ecological Indicators. **Ecological Indicators**, v. 60, p. 223–230, 2016.

SIGMON, C. F. Influence of 2,4-D and 2,4,5-T on life history characteristics of *Chironomus* (Diptera: Chironomidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 596–599, 1979.

SILFVERGRIP, A. M. C. **A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. Stockholm, Sweden, 1996. 156p. (PhD Thesis) - Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, 1996.

SOBJAK, T. *et al.* Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of *Rhamdia quelen* fish. **Chemosphere**, v. 182 p. 267-275, 2018.

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, n. 2, p. 106–113, 2014.

STEVANOVIC, M. *et al.* Toxicity of clomazone and its formulations to zebrafish embryos (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 188, n. April, p. 54–63, 2017.

SU, T. *et al.* The feasibility of the zebrafish embryo as a promising alternative for acute toxicity test using various fish species: A critical review. **Science of The Total Environment**, v. 787, 2021.

SYAFRUDIN, M. *et al.* Pesticides in Drinking Water — A Review. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 18, n. 468, p. 1–15, 2021.

TODD, O. E. *et al.* Synthetic auxin herbicides: finding the lock and key to weed resistance. **Plant Science**, v. 300, n. July, 2020.

TOMITA, R. . Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**, v. 4, n. 2, p. 135–142, 2002a.

TROUDI, A. *et al.* 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid effects on nephrotoxicity in rats during late pregnancy and early postnatal periods. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 8, p. 2316–2323, 2011.

TROUDI, A. *et al.* Oxidative damage in bone and erythrocytes of suckling rats exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 104, n. 1, p. 19–27, 2012.

USEPA. Reregistration eligibility decision (RED) 2,4-D. **United States Environ. Prot.**

Agency. Doi:EPA738-R-98-010, 2005.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.

VARGAS, D. L.; HILLIG, C.; NETTO, T. A. Insustentabilidade socioambiental e a necessidade de agroecossistemas sustentáveis. **Revista Monografias Ambientais**, v. 10, n. 10, maio 2013.

VENTURA, L. *et al.* Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay with plants: Research on DNA repair and ecogenotoxicity testing. **Chemosphere**, v. 92, n. 1, p. 1–9, 2013.

VIRIATO, C. *et al.* Evaluation of the potential teratogenic and toxic effect of the herbicide 2,4-D (DMA® 806) in bullfrog embryos and tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). **Chemosphere**, v. 266, 2021.

VRYZAS, Z. Pesticide fate in soil-sediment-water environment in relation to contamination preventing actions. **Current Opinion in Environmental Science and Health**, v. 4, p. 5–9, 2018.

Wafa, T. *et al.* Hepatotoxicity induced by sub-acute exposure of rats to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid based herbicide “ Désormone lourde”. **Journal of Hazardous Materials**, v. 180, n. 1–3, p. 225–233, 2010.

Wafa, T. *et al.* Subacute effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide on antioxidant defense system and lipid peroxidation in rat erythrocytes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, n. 3, p. 256–264, 2011.

Wafa, T.; IKBAL, C.; MOHAMED, H. Environmental fate and effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide. In: PIOTROWSKI, K. D. (Ed.). **Herbicides: Properties, Crop Protection**. [s.l.] Nova Science Publishers, 2011. p. 161–187.

WALLACE, B. C. *et al.* OpenMEE: Intuitive, open-source software for meta-analysis in ecology and evolutionary biology. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 8, n. 8, p. 941–947, 2017.

WHO. 2,4-D in Drinking-water: Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. **WHO/SDE/WSH/03.04/70**, p. 1–13, 2003.

WILSON, N.K. *et al.* Aggregate exposures of nine preschool children to persistent organic pollutants at day care and at home. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* v. 13, p.187–202, 2003.

WOOD, C. M.; EOM, J. The osmorepiratory compromise in the fish gill. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology**, v. 254, 2021.

ZAFRA-LEMOS, L. *et al.* Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Astyanax lacustris*

(Pisces, Characidae) and the potential for its removal from contaminated water using a biosorbent. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 865, n. February, 2021.

ZHANG, D. *et al.* Exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces oxidative stress and apoptosis in mouse testis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 141, p. 18–22, 2017.

ZUANAZZI, N. R.; GHISI, N. DE C.; OLIVEIRA, E. C. Analysis of global trends and gaps for studies about 2,4-D herbicide toxicity: A scientometric review. **Chemosphere**, v. 241, 2020.