

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO DE PESCA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

ESTUDO *IN VIVO* DA TOXICIDADE DO HERBICIDA 2,4-D (DMA® 806) SOBRE  
EMBRIÕES E GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)

Cristina Viriato de Freitas

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério

Coorientadora: Dra. Fernanda Menezes França

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca**

São Paulo

Abril-2020

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO DE PESCA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

ESTUDO *IN VIVO* DA TOXICIDADE DO HERBICIDA 2,4-D (DMA® 806) SOBRE  
EMBRIÕES E GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)

Cristina Viriato de Freitas

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério

Coorientadora: Dra. Fernanda Menezes França

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca**

São Paulo

Abril-2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

F936 Freitas, Cristina Viriato  
Estudo in vivo da toxicidade do herbicida 2,4-D (DMA® 806) sobre embriões e girinos de rã-touro  
(*Lithobates catesbeianus*) / Cristina Viriato Freitas – São Paulo, 2020  
v; 55f.; fig.; tab.; graf.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Aqüicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e  
Abastecimento.

Orientador: Cláudia Maris Ferreira Mostério

1. Agrotóxico. 2. Pesticida. 3. Sal de dimetilamina. 4. Anfíbio. 5. Anuro. 6. Larvas.  
I. Mostério, Cláudia Maris Ferreira. II. Título.

CDD 597.87

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
**INSTITUTO DE PESCA**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**Estudo *in vivo* da toxicidade do herbicida 2,4-D (DMA® 806)  
sobre embriões e girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)**

**AUTOR: CRISTINA VIRIATO DE FREITAS**

**ORIENTADORA: Profª. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério  
COORIENTADOR: Profª. Dra. Fernanda Menezes França**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de  
MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em  
Aquicultura, pela Comissão Examinadora:

*Cláudia M. F. Mostério*

Profª. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério

*Marília Hartmann*

Profª. Dra. Marília Hartmann

*Adriana Sacoto Marcantônio*

Profª. Dra. Adriana Sacoto Marcantônio

Data da realização: 20 de maio de 2020

Presidente da Comissão Examinadora  
Profª. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério

**Aos meus pais Airton e Marina**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

À minha querida orientadora e grande amiga, Profa. Dra. Cláudia Maris Ferreira por me passar seus conhecimentos de uma forma muito profissional, que sempre tomarei como exemplo. Obrigada por sempre me aconselhar, não só em relação ao trabalho, mas na vida, e por sempre acreditar em mim. Tive muito prazer em ter você como minha orientadora.

À minha querida coorientadora e grande amiga, Dra. Fernanda Menezes França, por todo apoio que me deu durante esses dois anos, por me passar seus conhecimentos de forma profissional e pela amizade que criamos. Tive muito prazer em ter você como minha coorientadora. Agradeço também à Isa, que veio junto no pacote de presente do meu mestrado. Sem dúvidas, continuaremos o contato.

Aos pesquisadores: Dra. Adriana Saciotto, Dra. Maria José Ranzani-Paiva, Dr. Said Ben Hamed, Dr. Marcio Hipollito, Dra. Patricia Teixeira, Dr. Sergio Shalch e Dra. Ana Maria Cristina Martins.

Ao querido Ocimar, pelo grande apoio sempre durante esses dois anos.

Aos meus amigos do programa de mestrado: Mariana Landucci, Fernanda Ikari, Diego Sales, Débora, Vanderson, Nathalia, Laila, Carol, Rodrigo, Dani Castor, Vinicius, Julia, Tainá, Junior, Kléper, Midiã, Anderson, Jessica, Pérola, Bruno. Vocês foram muito importantes durante esses dois anos.

Ao meu grande amigo e hoje, namorado, Nicolas Ripari, por estar sempre me apoiando, me incentivando e me aconselhando. Você foi muito importante nessa fase final do meu mestrado e é muito importante na minha vida.

À minha família: Airton Viriato de Freitas, Marina Ines Avanti Viriato de Freitas, Viviany Viriato de Freitas, Roberta Spinola Santos, Roseli Avanti, Luiz Antonio Avanti, Rubens Avanti (*in memoriam*), Arlindo Avanti, Mariza Lourenço Victor Santos (Vó) e Ivete Furlan pelo apoio e incentivo, vocês foram muito importantes e essenciais para a conclusão do meu mestrado.

Aos meus amigos: Larissa Sposito, Larissa Malise Marques, Danielle Aguiar, Isabella Toledo, Julia Silveira, Juliana Silva, Eduardo May, Gabriel Neri, Carlos Roberto Coutinho (Apogeu), Bruno Neves, Tatiana, Vitoria, pela amizade e incentivo.

---

## SUMÁRIO

---

Agradecimentos.....	i
Abreviaturas.....	iii
Resumo Geral.....	iv
Abstract.....	v
1. Introdução Geral.....	1
1.2. 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético).....	1
1.3. Testes de toxicidade.....	3
1.4. Rã-touro ( <i>Lithobates catesbeianus</i> ).....	5
1.5. Referências Bibliográficas.....	6

### CAPÍTULO 1:

#### Avaliação do potencial efeito teratogênico e tóxico do herbicida 2,4-D (DMA® 806) em embriões e girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)

Resumo.....	13
<b>1. Introdução</b> .....	13
<b>2. Material e métodos</b> .....	16
2.1. FETAX ( <i>Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus</i> ).....	16
2.2. Testes de toxicidade: girinos.....	19
2.2.1. Toxicidade aguda – Determinação da CL <sub>50</sub> .....	20
2.2.2. Toxicidade crônica.....	20
2.2.2.1. Saudabilidade, perfil hematológico e análise histopatológica.....	21
2.3. Análise estatística.....	22
<b>3. Resultados</b> .....	23
3.1. FETAX ( <i>Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus</i> ).....	23
3.2. Testes de toxicidade: girinos.....	25
3.2.1. Toxicidade aguda – Determinação da CL <sub>50</sub> .....	25
3.2.2. Toxicidade crônica.....	25
3.2.2.1. Saudabilidade.....	26
3.2.2.2. Perfil hematológico.....	27
3.2.2.3. Análise histopatológica.....	29
<b>4. Discussão</b> .....	32
<b>5. Referências</b> .....	40

---

## ABREVIATURAS

DMA	Sal de Dimetilmina
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal Mediana
CE <sub>50</sub>	Concentração Efetiva Mediana
IHS	Índice hepato-somático
IES	Índice espleno-somático
CTL	Contagem Total de Leucócitos
CDL	Contagem Diferencial de Leucócitos
RBC	<i>Red Blood Cells</i> (Contagem de Eritrócitos)
Hb	Taxa de Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média



## RESUMO GERAL

### ESTUDO *IN VIVO* DA TOXICIDADE DO HERBICIDA 2,4-D (DMA® 806) SOBRE EMBRIÕES E GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)

A crescente população humana exige uma demanda expansiva por áreas agrícolas, aumentando o uso de fertilizantes e pesticidas. O uso descontrolado desses produtos químicos induz a contaminação da água e do solo devido às suas características refratárias e tóxicas e têm gerado impactos ambientais que comprometem a sustentabilidade dos ecossistemas, principalmente os aquáticos. Sabe-se que impactos da exposição a pesticidas no desenvolvimento precoce de anfíbios pode perturbar a reprodução e afetar a dinâmica da população desses animais. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos tóxicos do herbicida 2,4-D (DMA® 806) sobre embriões e girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). Utilizamos como ferramentas o ensaio FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus) para embriões e testes de toxicidade aguda (96 h) e crônica (49 dias) para girinos. No teste crônico avaliamos a saudabilidade (Ganho de peso, Índices Hepato e Espleno-somáticos), perfil hematológico (Contagem Diferencial de Leucócitos, Contagem Total de Leucócitos e Trombócitos, Taxa de Hemoglobina, Contagem de Eritrócitos e Hemoglobina Corpuscular Média) e histopatologia (análise histopatológica das brânquias, pele e rim) dos girinos sobreviventes. A CL<sub>50-144h</sub> (Concentração Letal Mediana), CE<sub>50-144h</sub> (Concentração Efetiva) e o IT (Índice Teratogênico) do desenvolvimento embrionário, foram respectivamente 791,91 mg/L, 592,62 mg/L e 1,34 de 2,4-D (DMA). Para girinos, a CL<sub>50-96h</sub> foi de 700,01 mg/L de 2,4-D (DMA). Nossos resultados indicam que esse pesticida, em curto prazo, é pouco teratogênico e pouco tóxico para embriões e girinos de *L. catesbeianus*. Entretanto, a exposição prolongada em baixas concentrações indicou um possível processo inflamatório e policitemia nos girinos com conseqüente diminuição do baço, evidenciando estresse fisiológico. A histopatologia das brânquias e pele revelou aumento da espessura epitelial que foi dose dependente das concentrações, justificando a elevação dos eritrócitos e conseqüentemente a falta de oxigênio. O 2,4-D (DMA) pode ser um alérgeno respiratório para anuros, por isso, recomendamos medidas de cautela para exposição prolongada de organismos aquáticos a este pesticida.

**Palavras chave:** Agrotóxico, pesticida, sal de dimetilamina, anfíbio, anuro, larvas.

## ABSTRACT

### IN VIVO STUDY OF THE TOXICITY OF HERBICIDE 2,4-D (DMA® 806) ON BULLFROG (*Lithobates catesbeianus*) EMBRYOS AND TADPOLES

The growing human population demands an expansive agricultural area, increasing the use of fertilizers and pesticides. The uncontrolled use of these chemicals induces water and soil contamination due to their refractory and toxic characteristics and has generated environmental impacts that compromise the sustainability of ecosystems, especially aquatic ones. It is known that impacts of pesticide exposure on the early development of amphibians can disturb reproduction and affect the population dynamics of these animals. The aim of this work was to evaluate the toxic effects of the herbicide 2,4-D (DMA® 806) on bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) embryos and tadpoles. We used the FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus) assay for embryos and acute (96 h) and chronic (49 days) toxicity tests for tadpoles as tools. In the chronic test, we evaluated healthiness (weight gain, hepato and spleen-somatic Indexes), hematological profile (Total Leukocyte Count, Differential Leukocyte Count, and thrombocyte, Hemoglobin rate, Erythrocyte Count and Mean Corpuscular Hemoglobin) and histopathology (histopathological analysis of gills, skin and kidney) of surviving tadpoles. The LC<sub>50-144h</sub> (Median Lethal Concentration), EC<sub>50-144h</sub> (Effective Concentration) and the TI (Teratogenic Index) of embryonic development were 791.91 mg/L, 592.62 mg/L and 1.34 of 2,4-D (DMA), respectively. For tadpoles, the LC<sub>50-96h</sub> was 700.01 mg/L of 2,4-D (DMA). Our results indicate that this pesticide, in the short term, is low teratogenic and low toxic for embryos and tadpoles of *L. catesbeianus*. However, prolonged exposure in low concentrations indicated a possible inflammatory process and polycythemia in tadpoles with a consequent decrease in the spleen, showing physiological stress. Histopathology of the gills and skin revealed an increase in epithelial thickness that was dose dependent on concentrations, justifying the elevation of erythrocytes and consequently the lack of oxygen. 2,4-D (DMA) can be a respiratory allergen for frogs, so we recommend precautionary measures for prolonged exposure of aquatic organisms to this pesticide.

**Keywords:** Pesticide, agrochemical, dimethylamine salt, amphibian, anuran, larvae

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A crescente população humana exige uma demanda expansiva em terras e recursos, inclusive a área agrícola, que quase quadruplicou devido à intensificação de práticas agrícolas, principalmente o uso de fertilizantes e pesticidas (FAOSTAT, 2017; Green et al., 2005). Segundo previsões, a natureza será tão degradada, devido ao aumento da produção de alimentos, que haverá alterações na qualidade do ar e da água e na propagação de doenças, o que induz um aumento na taxa de mortalidade (Cazalis et al., 2018).

O uso de pesticidas induz a contaminação da água e do solo devido às suas características refratárias e tóxicas (Cai et al., 2018). Em algumas águas residuais agrícolas, a concentração de pesticidas pode chegar a 500 mg/L. Os herbicidas são a classe de pesticidas mais utilizados no mundo (Huy et al., 2017; Jaafarzadeh et al., 2017; Li et al., 2017), dentre eles, o 2,4-D é uma das principais substâncias utilizadas no controle de ervas daninhas (Jia et al., 2017).

### 1.2. 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)

Peterson et al. (2018) relatam que cada vez mais haverá a utilização de herbicidas em quase todos os continentes. O 2,4-D começou a ser utilizado na década de 1940 e teve uso crescente nas décadas seguintes. Na década de 1960, era um dos ingredientes ativos de herbicidas mais amplamente utilizados. Esse defensivo agrícola é utilizado principalmente em cultivo de grãos, como soja, milho e arroz, e, no futuro, a tendência é cada vez mais sua utilização, devido ao seu baixo custo e bom desempenho (LeClere et al., 2018; Malaj et al., 2019; U.S. EPA Report 2017).

Na Guerra do Vietnã, no século XX, o herbicida 2,4-D unido com o 2,4,5-triclorofenoxiatético foi chamado de Agente Laranja. Este agrotóxico foi utilizado pelos americanos que o pulverizavam por aviões para desfolhar o esconderijo dos soldados vietnamitas, causando problemas crônicos de saúde em milhões de pessoas (Munro et al., 1992). Atualmente, o Agente Laranja é proibido, porém o 2,4-D ainda é muito utilizado na agricultura mundial. Existem variações nas formulações do 2,4-D. A fórmula 2,4-D (DMA), ou sal de dimetilamina, é derivada da sua forma ácida e foi classificado como extremamente tóxico e perigoso ao meio ambiente (EPA, 2005; Walters, 2011). Vários ésteres e sais de 2,4-D

com várias propriedades foram fabricados e utilizados em produtos herbicidas e sofrem hidrólise do ácido em meios ambientais em taxas diferentes, dependendo das condições específicas de pH, umidade e outros fatores (NPIC, 2008).

Existem diferentes nomes comerciais para o 2,4-D, como: Hedonal; 2,4-D; Estone; Agrotect; Fernesta; Fernimine; Netagrone; Tributon; Vergemaster; Amoxone; Dicopur; Dormone; Ipaner; Moxone; Phenox; Pielik; Rhodia; Weedone; B-Selektionon. Recentemente foram aprovadas misturas de 2,4-D e outros ingredientes ativos, incluindo o glifosato, para combater ervas daninhas resistentes a outros herbicidas (NCBI, 2015).

A principal via para a absorção do 2,4-D, é a pele (NPIC, 2008). Em 2018, a Agência Internacional para a pesquisa em Câncer (IARC) classificou esse herbicida como possivelmente carcinogênico para humanos, pois não existiam dados suficientes para comprovar sua carcinogenicidade. Quando lançado no ambiente, esse agrotóxico pode atingir ambientes aquáticos por meio da lixiviação e, dependendo das condições ambientais, seu tempo de meia-vida pode variar de uma a várias semanas em condições aeróbicas e pode exceder 120 dias em condições anaeróbicas. Por outro lado o 2,4-D pode ser degradado por fotólise em poucos dias, se encontrado na superfície da água. Esse pesticida já foi detectado em abastecimentos de água potável em diversos países, como no Canadá e Estados Unidos, onde o monitoramento de pesticidas na água é mais constante (IARC 2018).

Foi verificado por Loos et al. (2010) que o 2,4-D encontrado na água de superfície estava associado ao uso agrícola e, em alguns casos, foi encontrado em áreas urbanas provavelmente como resultado do uso desse pesticida para grama. Nesse estudo foram analisadas amostras de águas subterrâneas de 23 países europeus, o 2,4-D foi detectado em apenas 3,7% das amostras. De acordo com o Programa Nacional de Avaliação da Qualidade da Água do Inquérito Geológico dos Estados Unidos em 1992-2001, o 2,4-D foi detectado com uma frequência de 13% em 1465 amostras coletadas em 62 locais de águas superficiais agrícolas e 13% em 523 amostras coletadas de 19 locais urbanos de águas superficiais, com base em um limite de detecção de 0,08 µg / L (USGS, 2006). A quarta edição de Diretrizes para Qualidade da Água Potável (Guidelines for Drinking-water Quality), atribuem um valor de 0,03 mg/L para 2,4-D e já foram detectados valores maiores que o permitido (WHO, 2011). A necessidade do monitoramento do 2,4-D nas águas é necessária tanto na área urbana quanto no ambiente próximo aos cultivos que utilizam esse herbicida. Em muitos países

ainda não há o controle da quantificação do 2,4-D ou as análises são dificilmente divulgadas, como no Brasil, por exemplo. O Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (SISAGUA) quantifica esse herbicida em algumas regiões do Brasil e já relataram a frequência do 2,4-D em muitas análises e já foram detectados valores maiores aos permitidos, porém os mesmos não são divulgados (ANVISA, 2020). Esses valores são necessários para que testes toxicológicos sejam comparados às concentrações ambientalmente reais.

Testes ecotoxicológicos de produtos químicos, como os pesticidas, são de grande importância, pois avaliam sua toxicidade em organismos. Foram realizadas pesquisas visando avaliar os efeitos tóxicos do 2,4-D, por meio desses testes (agudos – curta duração e crônicos – longa duração) em diversos organismos, como em plantas não alvo, ratos, células humanas, microalgas, caramujos aquáticos, tecidos de peixe e embriões de anuros (Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo, 2018; Morgan et al., 1996). Em larvas de anfíbios, testes crônicos indicaram efeitos mutagênicos, alterações prejudiciais aos aspectos bioquímicos, fisiológicos, comportamentais e anormalidades morfológicas (Curi et al., 2019; Freitas et al., 2019; Mesak et al., 2018).

### **1.3. Testes de toxicidade**

No estudo de Grisolia (2005), é relatado que muitos agrotóxicos em uso apresentam risco de mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade. Os organismos jovens na maioria das vezes, são mais sensíveis que os adultos e por este motivo, é importante ressaltar que os testes de toxicidade devem ser realizados com indivíduos nos primeiros estágios de desenvolvimento, respeitando-se o princípio dos 3 R's (*Replace, Reduction and Refinement*). Esse princípio tem o objetivo de substituir por exemplo, animais maiores por menores, como a substituição de mamíferos como os roedores, reduzir o número de animais possíveis para a realização dos testes e sempre tentar diminuir cada vez mais a dor, estresse e sofrimento dos animais como, por exemplo, por meio de anestésicos e analgésicos (CONCEA, 2016). Neste sentido, o ensaio com ovos e girinos de *Lithobates catesbeianus* é considerado uma alternativa à utilização de organismos adultos.

Foi proposto e validado por Bantle et al. (1994) um teste para embriões chamado FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus), que é um teste de toxicidade aguda feita para embriões da espécie africana *Xenopus laevis*. Esse teste constitui de uma água reconstituída

(diversos sais) chamada FETAX, onde seria perfeito o desenvolvimento dos embriões. Portanto, o teste tem um tratamento controle constituído somente dessa água reconstituída FETAX e tratamentos com essa água reconstituída mais as diferentes concentrações do químico testado. Esse teste determina letalidade, alterações morfológicas e concentração inibitória mínima do crescimento dos embriões. Foi utilizado em diversos estudos focados na avaliação de substâncias, produtos químicos, misturas e amostras ambientais de água e solo. Este ensaio utiliza o *X. laevis* devido às suas características biológicas adequadas para reprodução em cativeiro (ciclo reprodutivo curto e habitat totalmente aquático) e ao fato de ser um excelente modelo experimental e pode ser adaptado para outras espécies como a rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) (Bruner et al., 2002; Cardoso-Vera et al., 2017; Fort et al., 2006; Hu et al., 2016; Sacerdote e King, 2014).

A American Society for Testing and Materials – ASTM E 1439 – 98 (2012) é um guia de procedimentos para a condução do teste FETAX. Essas normas abordam os procedimentos empregados desde a aquisição e manutenção dos reprodutores, alimentação, métodos de indução hormonal para a reprodução, qualidade da água, até procedimentos empregados na condução do teste.

Para animais maiores, como girinos, podem ser realizados testes de toxicidade aguda e crônica e podem ser avaliados outros tipos de análises para determinar os efeitos sub-letais expostos aos produtos tóxicos, como por exemplo, o perfil hematológico, índices hepato e espleno-somáticos e análise histológica (Carvalho et al., 2017; Zhu et al., 2019). O perfil hematológico, se alterado, pode indicar resposta fisiológica contra o estresse ambiental, podendo ser um biomarcador (Vosyliene, 1996). Os índices hepato e espleno-somáticos (IHS e IES) também são importantes biomarcadores fisiológicos, que podem fornecer informações sobre reservas de energia e saúde geral do organismo. Esses índices podem aumentar ou diminuir significativamente, podendo indicar informações sobre possíveis impactos de poluição (Van der Oost et al., 2003).

As alterações histopatológicas podem ser causadas por estressores ambientais e são também ferramentas úteis para avaliar o impacto da toxicidade dos xenobióticos nas funções vitais de um organismo vivo (Teh et al., 1997). Alguns órgãos são mais sensíveis de acordo com a substância química testada. A pele e a brânquia dos girinos, por exemplo, são responsáveis por sua respiração e controle homeostático. Constituem uma vasta superfície

epitelial e uma importante interface entre os tecidos internos e o ambiente externo. Estes tecidos representam alvos preferenciais e são extremamente suscetíveis a xenobióticos. Classicamente, os poluentes aquáticos e agrotóxicos promovem respostas epiteliais adaptativas em peixes, caracterizadas por hiperplasia e hipersecreção de muco (Vigário e Sbóia-Morais, 2014). Pesticidas podem produzir sérias alterações histopatológicas em anuros, como por exemplo, a degeneração das células da epiderme (Bernabò et al., 2013).

#### **1.4. Rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)**

O uso de pesticidas é um dos fatores determinantes para o declínio de anfíbios (Agostini et al., 2020; Grant et al., 2019). Segundo a revisão bibliográfica de Slaby et al. (2019), impactos da exposição a pesticidas nos parâmetros reprodutivos e no desenvolvimento precoce de anfíbios, podem perturbar a reprodução e podem afetar, conseqüentemente, a dinâmica da população desses animais.

O anfíbio *Lithobates catesbeianus* (Frost et al., 2006), conhecida como rã-touro, é uma espécie norte-americana de grande potencial econômico. Por esse motivo, foi introduzido em mais de 40 países (Ficetola et al., 2007; Giovanelli et al., 2008). No Brasil, a ranicultura é uma atividade comercial popular e em 2006 chegou a ser o maior produtor das Américas (Freitas et al., 2017). A rã-touro (*L. catesbeianus*), por reproduzir-se com facilidade em cativeiro e ser rústica é uma espécie de anfíbio que se tornou um bom modelo experimental para ser usado em testes toxicológicos. Muitos estudos em relação a testes de toxicidade e estresse animal foram realizados no Brasil (França et al., 2015; Rocha et al., 2010; Teixeira et al., 2012; Santana et al., 2015). Por esses motivos, essa espécie de anfíbio foi escolhida para a realização desse trabalho.

Este estudo objetivou avaliar os efeitos tóxicos causados pelo herbicida 2,4-D (DMA® 806) em embriões e girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) e contribuir para melhor compreensão sobre os danos desse pesticida em ambientes aquáticos. A dissertação é apresentada na forma de capítulos, onde o “Capítulo 1” intitulado “Avaliação do potencial efeito teratogênico e tóxico do herbicida 2,4-D (DMA® 806) em embriões e girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)”, será submetido à revista de nível A2 na área de aquicultura e recursos pesqueiros.

#### **1.5. Referências bibliográficas**

- Agostini, M.G.; Roesler, I.; Bonetto, C.; Ronco, A.E.; Bilenca, D. 2020. Pesticides in the real world: The consequences of GMO-based intensive agriculture on native amphibians. *Biological Conservation*, 241: 108355. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108355>.
- ANVISA, 2020. Reavaliação Toxicológica. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/agrotoxico-2-4-d-passa-a-ter-restricoes-na-aplicacao-219201/pop\\_up?\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_viewMode=print&\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_languageId=pt\\_BR](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/agrotoxico-2-4-d-passa-a-ter-restricoes-na-aplicacao-219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=pt_BR)>. Acesso em: 30 mai. 2020.
- ASTM (American Society for Testing and Materials) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX), ASTM E1439-98, Reapproved 2012. 16p. Disponível em: <<https://www.astm.org/Standards/E1439.htm>>.
- Bantle, J.A.; Burton, D.T.; Dawson, D.A.; Dumont, J.N.; Finch, R.A.; Fort, D.J.; Linder, G.; Rayburn, J.R.; Buchwalter, D.; Maurice, M.A. 1994. Initial interlaboratory validation study of FETAX: phase I testing. *Journal of Applied Toxicology*, 14(3): 213-223. <https://doi.org/10.1002/jat.2550140312>.
- Bernarbò, I.; Guardia, A.; La Russa, D.; Madeo, G.; Tripepi, S.; Brunelli, E. 2013. Exposure and post-exposure effects of endosulfan on *Bufo bufo* tadpoles: Morpho-histological and ultrastructural study on epidermis and iNOS localization. *Aquatic Toxicology*, 142-143: 164-175. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.08.002>.
- Bruner, M.A.; Shipman, P.A.; Rao, M.; Bantle, J.A. 2002. Developmental effects of ambient UV-B light and landfill leachate in *Rana blairi* and *Hyla chrysoscelis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53(1): 73-80. <https://doi.org/10.1006/eesa.2002.2248>.
- Cai, J.; Zhou, M.; Yang, W.; Pan, Y.; Lu, X.; Serrano, K.G. 2018. Degradation and mechanism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) by thermally activated persulfate oxidation. *Chemosphere*, 212: 784-793. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.127>.
- Cardoso-Vera, J.D.; Islas-Flores, H.; SanJuan-Reyes, N.; Montero-Castro, E.I.; Galar-Martínez, M.; García-Medina S.; Elizalde-Velázquez, A.; Dublán-García, O.; Gómez-Oliván, L.M. 2017. Comparative study of diclofenac-induced embryotoxicity and teratogenesis in *Xenopus laevis* and *Lithobates catesbeianus*, using the frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus* (FETAX). *Science of the Total Environment*, 574: 467-475. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.095>.



- Carvalho, C.S.; Utsunomiya, H.S.M.; Pasquoto, T.; Lima, R.; Costa, M.J.; Fernandes, M.N. 2017. Blood cell responses and metallothionein in the liver, kidney and muscles of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, following exposure to different metals. *Environmental Pollution*, 221: 445–452. <https://doi:10.1016/j.envpol.2016.12.012>.
- Cazalis, V.; Loreau, M.; Henderson, K. 2018. Do we have to choose between feeding the human population and conserving nature? Modelling the global dependence of people on ecosystem services. *Science of the Total Environment*, 634: 1463–1474. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.360>.
- CONCEA, 2016. Resolução Normativa (26/09/2016). Dispõe sobre o reconhecimento no país de métodos alternativos validados que tenham por finalidade a redução, a substituição ou o refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa. Disponível em: <<http://www.invitare.com.br/arq/ceua/Arquivo-3-normativas-concea-2016.pdf>>. Acesso em: 30 mai. 2020.
- Curi, L.; Peltzer, P.; Sandoval, M.; Lajmanovich, R. 2019. Acute Toxicity and Sublethal Effects Caused by a Commercial Herbicide Formulated with 2,4-D on *Physalaemus albonotatus* Tadpoles. *Water, Air, & Soil Pollution*, 230(1): 1-15. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-4073-x>.
- EPA - United States Environmental Protection Agency. 2005. Reregistration Eligibility Decision for 2,4-D. Disponível em: <[https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/24d\\_red.pdf](https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/24d_red.pdf)>.
- FAOSTAT, 2017. World Food and Agriculture Data, From the Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat>>. Acesso em: 30 mai. 2020.
- Ficetola, G.F.; Thuiller, W.; Miaud, C. 2007. Prediction and validation of the potential global distribution of a problematic alien invasive species the American Bullfrog. *Diversity and Distribution*, 13: 476-485. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2007.00377.x>.
- Fort, D.J.; Rogers, R.L.; Thomas, J.H.; Hopkins, W.A.; Schlekot, C. 2006. Comparative Developmental Toxicity of Nickel to *Gastrophryne carolinensis*, *Bufo terrestris*, and *Xenopus laevis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(4): 703–710. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-0217-2>.
- França, F.M.; Brazil De Paiva, T.C.; Marcantônio, A.S.; Teixeira, P.C.; Ferreira, C.M. 2015. Acute toxicity and ecotoxicological risk assessment of rice pesticides to *Lithobates*

- catesbeianus* tadpoles. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 50(6): 406–410. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1011950>.
- Freitas, J.J.G.; Viau, P.; Oliviera, C.A.; Teixeira, P.C.; Tachibana, L.; de Carla Dias, D.; Ferreira, C.M. 2017. Effect of dietary supplements in American bullfrogs reared in low and high stocking densities. Aquaculture Reports, 8: 45–48. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.09.003>.
- Freitas, J.S.; Giroto, L.; Goulart, B.V.; Alho, L. de O.G.; Gebara, R.C.; Montagner, C.C.; Schiesari, L.; Espíndola, E.L.G. 2019. Effects of 2,4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. Ecotoxicology and Environmental Safety, 182: 109446. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109446>.
- Giovanelli, J.G.R.; Haddad, C.F.B.; Alexandrino, J. 2008. Predicting the potential distribution of the alien invasive American Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in Brazil. Biological Invasions, 10: 585-590. <https://doi.org/10.1007/s10530-007-9154-5>.
- Grant, E.H.C.; Muths, E.; Schmidt, B.R.; Petrovan, S.O. 2019. Amphibian conservation in the Anthropocene. Biological Conservation, 236: 543-547. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.03.003>.
- Green, R.E.; Cornell, S.J.; Scharlemann, J.P.W.; Balmford, A. 2005. Farming and the fate of wild nature. Science, 307(5709): 550–555. <https://doi.org/10.1126/science.1106049>.
- Grisolia, C.K. 2005. Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução. Brasília: Editora da Universidade de Brasília, 388 p.
- Hu, L.; Wu, L.; Xue, Y.; Zhu, J.; Shi, H. 2016. An assay to determine the sensitive window of embryos to chemical exposure using *Xenopus tropicalis*. Journal of Applied Toxicology, 36: 685-691. <https://doi.org/10.1002/jat.3200>.
- Huy, B.T.; Jung, D.S.; Kim Phuong, N.T.; Lee, Y.I. 2017. Enhanced photodegradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using a novel TiO<sub>2</sub>@MgFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> core@shell structure. Chemosphere, 184: 849-856. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.069>.
- IARC, 2018. DDT, Lindane, and 2,4-D / International Agency for Research on Cancer Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Vol 113. Lyon, France. Disponível em: <[https://publications.iarc.fr/\\_publications/media/download/5170/308b6654a2abecf64f2d8856fc4a85bbd97f00e8.pdf](https://publications.iarc.fr/_publications/media/download/5170/308b6654a2abecf64f2d8856fc4a85bbd97f00e8.pdf)>. Acesso em: 30 mai. 2020.
- Jaafarzadeh, N.; Ghanbari, F.; Ahmadi, M. 2017. Catalytic degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) by nano-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> activated peroxymonosulfate:

- Influential factors and mechanism determination. *Chemosphere*, 169: 568-576. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.038>.
- Jia, M.; Zhang, Z.; Li, J.; Shao, H.; Chen, L.; Yang, X. 2017. A molecular imprinting fluorescence sensor based on quantum dots and a mesoporous structure for selective and sensitive detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 252: 934-943. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.06.090>.
- LeClere, S.; Wu, C.; Westra, P.; Sammons, R.D. 2018. Cross-resistance to dicamba, 2,4-D, and fluroxypyr in *Kochia scoparia* is endowed by a mutation in na AUX/IAA gene. *PNAS* [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1712372115//DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1712372115//DCSupplemental).
- Li, K.; Wu, J.Q.; Jiang, L.L.; Shen, L.Z.; Li, J.Y.; He, Z.H.; Wei, P.; Lv, Z.; He, M.F. 2017. Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. *Chemosphere*, 171: 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.032>.
- Loos, R.; Locoro, G.; Comero, S.; Contini, S.; Schwesig, D.; Werres, F. 2010. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Research*, 44(14): 4115-26. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.05.032>.
- Malaj, E.; Liber, K.; Morrissey, C.A. 2019. Spatial distribution of agricultural pesticide use and predicted wetland exposure in the Canadian Prairie Pothole Region. *Science of The Total Environment*, 134765. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134765>.
- Martínez-Ruiz, E.B.; Martínez-Jerónimo, F. 2018. Exposure to the herbicide 2,4-D produces different toxic effects in two different phytoplankters: A green microalga (*Ankistrodesmus falcatus*) and a toxigenic cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*). *Science of the Total Environment*, 619-620: 1566-1578. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.145>.
- Mesak, C.; Mendes, B.O.; Ferreira, R.O.; Malafaia, G. 2018. Mutagenic assessment of *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to the 2,4-D herbicide in a simulated realistic scenario. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(15): 15235-15244. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1979-1>.
- Morgan, M.K.; Scheuerman, P.R.; Bishop, C.S.; Pyles, R.A. 1996. Teratogenic potential of atrazine and 2,4-D using FETAX. *Journal of Toxicology Environmental Health*, 48(2): 151-168. <https://doi.org/10.1080/009841096161401>.
- Munro, I.C.; Carlo, G.L.; Orr, J.C.; Sund, K.G.; Wilson, R.M.; Kennepohl, E.; Lynch, B.S.; Jablinske, M.; Lee, N.L. 1992. A Comprehensive, Integrated Review and Evaluation of the Scientific Evidence Relating to the Safety of the Herbicide 2,4-D. *Journal of the American College of Toxicology*, 11(5): 559-664. <https://doi.org/10.3109%2F10915819209141893>.

- NCBI, 2015. Compound summary for CID 1486. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. PubChem Open Chemistry Database. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1486#section=3D-Conformer>>. Acesso em 30 mai. 2020.
- NPIC, 2008. 2,4-D Technical Fact Sheet. National Pesticide Information Center, Oregon State University. Disponível em: <<http://npic.orst.edu/factsheets/archive/2,4-DTech.html>>. Acesso em: 30 mai. 2020.
- Peterson, M.A.; Collavo, A.; Ovejero, R.; Shivrain, V.; JWalsh, M.I. 2018. The challenge of herbicide resistance around the world: a current summary. *Pest Management Science*, 74: 2246–2259. <https://doi.org/10.1002/ps.4821>.
- Rocha, G.C.; Ferreira, C.M.; Teixeira, P.C.; Dias, D.C.; França, F.M.; Antonucci, A.M.; Marcantonio, A.S.; Lauretto, M. 2010. Physiological response of American bullfrog tadpoles to stressor conditions of capture and hypoxia. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30: 10. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010001000014>.
- Sacerdote, A.B.; King, R.B. 2014. Direct Effects of an Invasive European Buckthorn Metabolite on Embryo Survival and Development in *Xenopus laevis* and *Pseudacris triseriata*. *Journal of Herpetology*, 48(1): 51–58. <https://doi.org/10.1670/12-066>.
- Santana, J.M.; Dos Reis, A.; Teixeira, P.C.; Ferreira, F.C.; Ferreira, C.M. 2015. Median lethal concentration of formaldehyde and its genotoxic potential in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 50(12): 896–900. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1067095>.
- Slaby, S.; Marin, M.; Marchand, G.; Lemiere, S. 2019. Exposures to chemical contaminants: What can we learn from reproduction and development endpoints in the amphibian toxicology literature? *Environmental Pollution*, 248: 478–495. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.014>.
- Teixeira, P.C.; Dias, D.C.; Rocha, G.C.; Antonucci, A.M.; França, F.M.; Marcantonio, A.S.; Ranzani-Paiva, M.J.T.; Ferreira, C.M. 2012. Profile of cortisol, glycaemia, and blood parameters of American Bullfrog tadpoles *Lithobates catesbeianus* exposed to density and hypoxia stressors. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(Supl.1): 91–98. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012001300016>
- U.S. Environmental Protection Agency. 2017. Pesticides Industry Sales and Usage. 2008–2012 Market Estimates. Washington. Disponível em:

- <[https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-01/documents/pesticides-industry-sales-usage-2016\\_0.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-01/documents/pesticides-industry-sales-usage-2016_0.pdf)>.
- USGS, 2006. Appendix 7A. Statistical summaries of pesticide compounds in stream water, 1992–2001. In: Pesticides in the nation's streams and ground water, 1992–2001. USGS Circular 1291. United States Geological Survey. Disponível em: <<http://water.usgs.gov/nawqa/pnsp/pubs/circ1291/appendix7/7a.html>>.
- Van der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N.P. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149. [https://doi.org/10.1016/s1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/s1382-6689(02)00126-6).
- Vigário, A.F.; Sabóia-Morais, S.M.T. 2014. Effects of the 2,4-D herbicide on gills epithelia and liver of the fish *Poecilia vivipara*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34(6): 523–528. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000600005>.
- Vosyliene, M.Z. 1996. Hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during short-term exposure to copper. *Ecology*, 3: 12–18.
- Walters, J. 2011. Environmental Fate of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. Environmental Monitoring and Pest Management, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA, USA.
- WHO, 2011. Guidelines for drinking water quality. Geneva: Global Malaria Programme, World Health Organization. Disponível em: <[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44584/9789241548151\\_eng.pdf;jsessionid=E66BD3423C80BC2CF385C30ACF1D3317?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44584/9789241548151_eng.pdf;jsessionid=E66BD3423C80BC2CF385C30ACF1D3317?sequence=1)>.
- Zhu, W.; Zhang, M.; Chang, L.; Zhu, W.; Li, C.; Xie, F.; Zhang, H.; Zhao, T.; Jiang, J. 2019. Characterizing the composition, metabolism and physiological functions of the fatty liver in *Rana omeimontis* tadpoles. *Frontiers in Zoology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12983-019-0341-x>.

## **CAPÍTULO 1**

### **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO TERATOGENICO E TÓXICO DO HERBICIDA 2,4-D (DMA® 806) EM EMBRIÕES E GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)**

## **Avaliação do potencial efeito teratogênico e tóxico do herbicida 2,4-D (DMA® 806) em embriões e girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial efeito teratogênico e tóxico do herbicida 2,4-D (DMA® 806) sobre embriões e girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). Utilizamos como ferramentas o ensaio FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus), testes de toxicidade aguda (96 h) e crônica (49 dias) para girinos, e avaliamos aspectos de saudabilidade, hematologia e histopatologia. A CL<sub>50-144h</sub> (Concentração Letal Mediana), CE<sub>50-144h</sub> (Concentração Efetiva), a CMIC (Concentração Mínima de Inibição de Crescimento) e o IT (Índice Teratogênico) sobre o desenvolvimento embrionário, foram respectivamente 792 mg/L, 593 mg/L, 150 mg/L de 2,4-D (DMA) e 1,34. Para girinos, a CL<sub>50-96h</sub> foi de 700,01 mg/L de 2,4-D (DMA). Nossos resultados indicam que esse pesticida, em curto prazo, é pouco teratogênico e pouco tóxico para embriões e girinos de *L. catesbeianus*, porém pode inibir seu crescimento embrionário em concentrações menores às testadas. Entretanto, a exposição prolongada dos girinos mesmo em concentrações subletais indicou processo inflamatório e eritrocitose (com possível policitemia), com consequente diminuição do baço, evidenciando estresse fisiológico provavelmente por desidratação, que pode ser comprovada pela vacuolização e fusão lamelar das brânquias mesmo. Constatamos também injúrias nos rins e na pele dos animais. Nós hipotetizamos que o herbicida 2,4-D (DMA) pode ser um alérgeno respiratório para girinos de *L. catesbeianus* e recomendamos medidas de cautela para exposição prolongada de organismos aquáticos a este pesticida.

Palavras chave: Agrotóxico, pesticida, sal de dimetilamina, anfíbio, anuro, larvas.

### **1. Introdução**

O crescimento da população humana induz a demanda expansiva em terras e recursos naturais para a produção de alimentos. Devido à ênfase nesta situação, a humanidade enfrenta ameaças relacionadas à sua dependência da natureza, que estará cada vez mais degradada e

por alterações do meio aquático e atmosférico, haverá transmissões de doenças e aumento na taxa de mortalidade como relatado nas previsões de Cazalis et al. (2018). A produção de alimentos muitas vezes exige o uso de praguicidas. Entre estes, os herbicidas estão entre os mais utilizados (Maggi et al., 2019). Estes agrotóxicos, se mal utilizados, podem contaminar a água e o solo devido às suas características de solubilidade, adsorção, entre outras. As características tóxicas causam efeitos em organismos (Cai et al., 2018).

Estudos recentes (LeClere et al., 2018; Peterson et al., 2018) mostram o aumento da dependência dos herbicidas na Ásia, Oceania, Europa, América do Sul e América do Norte. Atualmente, o herbicida fenóxi mais utilizado no mundo é o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), devido ao seu baixo custo e bom desempenho (Amiri et al., 2018; Wagner et al., 2018). Esse praguicida foi classificado como extremamente tóxico e perigoso ao meio ambiente (EPA, 2005; Walters, 2011). É utilizado em cultivo de cana de açúcar e de grãos, como soja, milho e arroz, para o controle de ervas daninhas de folhas largas e, no futuro, a tendência é cada vez mais sua utilização (U.S. EPA Report 2017; Malaj et al., 2019).

O ácido 2,4-D unido com o 2,4,5-triclorofenoxiatético foi chamado de Agente Laranja quando utilizado na Guerra do Vietnã, pelos americanos, para desfolhar o esconderijo dos soldados vietnamitas e causou problemas crônicos de saúde em milhões de pessoas (Munro et al., 1992). A exposição cutânea é a principal via para a absorção do 2,4-D, e, em 2018, a Agência Internacional para a pesquisa em Câncer (IARC) classificou esse herbicida como possivelmente carcinogênico para humanos (IARC, 2018).

A meia-vida na água desse praguicida varia de uma a várias semanas em condições aeróbicas e podem exceder 120 dias em condições anaeróbicas. Por outro lado, o 2,4-D pode ser degradado por fotólise em poucos dias, se encontrado na superfície da água (WHO, 2003; Su et al., 2018). Esse pesticida já foi detectado em abastecimentos de água potável em



diversos países como no Canadá, México e Brasil. (Félix-Cañedo, et al., 2013; Munira et al., 2018; ANVISA, 2020).

A revisão bibliográfica de De Castro Marcatto et al. (2017) alerta de que os pesticidas, embora importantes para a agricultura, precisam ser usados com mais cautela, aplicados apenas nas quantidades indicadas e, na medida do possível, substituídos por outros métodos menos prejudiciais ao meio ambiente e à biodiversidade, pois mesmo em baixas concentrações, esse praguicida pode ter efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos nas plantas, além de alterações histológicas, fisiológicas e comportamentais em animais.

Estudos toxicológicos vem sendo realizados utilizando o herbicida 2,4-D e mostrando seus efeitos em diversos organismos como ratos, insetos, peixes e anfíbios (Rocha et al., 2020; Leão et al., 2019; Es Ruiz de Arcaute et al., 2019; Moutinho et al., 2020). Em larvas de anfíbios, testes crônicos indicaram efeitos mutagênicos, alterações prejudiciais aos aspectos bioquímicos, fisiológicos, comportamentais e anormalidades morfológicas (Curi et al., 2019; Freitas et al., 2019; Mesak et al., 2018). O uso de praguicidas é um dos fatores determinantes para o declínio de anfíbios (Agostini et al., 2020; Grant et al., 2019). A revisão bibliográfica de Slaby et al. (2019) mostra a importância de testes toxicológicos em anfíbios e os impactos da exposição a praguicidas nos parâmetros reprodutivos e no desenvolvimento precoce desses animais, que podem perturbar a reprodução e podem afetar, conseqüentemente, a dinâmica da população.

Testes toxicológicos vem cada vez mais empregando o princípio dos 3 R's (Replace, Reduction and Refinement), que tem o objetivo de substituir animais adultos pelos mais jovens, sendo os organismos jovens frequentemente mais sensíveis que os adultos, também tem o objetivo de reduzir o mínimo de organismos possíveis para a realização dos testes e reduzir a dor e sofrimento dos animais através de por exemplo, anestésicos e analgésicos

(Hampshire et al., 2018). Neste sentido, o ensaio com ovos e girinos de *Lithobates catesbeianus* é considerado uma alternativa à utilização de organismos adultos.

O teste FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus) é um teste de toxicidade aguda que utiliza embriões da espécie africana *Xenopus laevis* e determina letalidade, alterações morfológicas e concentração inibitória mínima de crescimento (ASTM, 2012). Basicamente, consiste na exposição dos organismos em uma solução onde o desenvolvimento dos embriões seria perfeito. Essa solução (*i. e.* FETAX), também é a base para a diluição do xenobiótico a ser testado. Este teste foi proposto por Bantle et al. (1994) e através dele já foram avaliadas diversas substâncias, produtos químicos, misturas e amostras ambientais de água e solo (Cardoso-Vera et al., 2017). Esse teste aborda os procedimentos empregados desde a aquisição e manutenção dos reprodutores, alimentação, métodos de indução hormonal para a reprodução, qualidade da água, até procedimentos empregados na condução do teste FETAX propriamente dito. Entretanto, algumas pesquisas adaptam o teste e seus protocolos para outras espécies (Bruner et al., 2002; Fort et al., 2006; Hu et al., 2016; Sacerdote e King, 2014).

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial efeito teratogênico e tóxico do herbicida 2,4-D (DMA® 806) em embriões e girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*), sendo o primeiro a reportar o efeito teratogênico desse herbicida em embriões dessa espécie de anuro.

## **2. Material e Métodos**

Este estudo foi desenvolvido em condições éticas e de acordo com diretrizes institucionais, nacionais e internacionais sobre o uso de animais na pesquisa e com a permissão do Comitê de Ética e Experimentação Animal do Instituto de Pesca/SP/Brasil (Protocolo nº 06/2019).

Para todos os testes de toxicidade, as diluições foram feitas diretamente da fórmula comercial do herbicida 2,4-D (DMA® 806 BR; 806 mg/L - ácido 2,4-diclorofenoxiacético – CAS 2008-39-1). Para a quantificação do 2,4-D (DMA) foi utilizado como base o estudo de Freitas et al. (2019) que encontrou os Limites de Quantificação (LQ) e de Detecção (LD), obtidos pelo método do sinal, comparando o sinal analítico das amostras em baixas concentrações do 2,4-D (DMA) com o ruído na linha de base. A concentração na qual a relação sinal/ruído foi observada na proporção de 10:1 e 3:1 para LQ e LD, respectivamente. Foi determinado que o LQ do método era de 1,0 µg/L e o LD era de 0,2 µg/L.

Os exemplares de *L. catesbeianus* (rã-touro) foram adquiridos em um Ranário Experimental na cidade de Pindamonhangaba/SP/Brasil.

### **2.1.FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus)**

Casais adultos de *L. catesbeianus* foram selecionados de acordo com suas características fenotípicas adequadas à reprodução, mantidos em laboratório, em temperatura controlada e induzidos artificialmente à reprodução, utilizando o hormônio Sincroforte® (acetato de buserelina = 0,04 mg), na concentração de 0,0042 g/L, de acordo com a metodologia de Agostinho et al. (2000). Após a obtenção das desovas, os testes foram realizados com os ovos logo após a fertilização (estágio 12; Gosner, 1960).

O desenvolvimento embrionário foi acompanhado seguindo as técnicas recomendadas pela American Society for Testing and Materials – ASTM E 1439 – 98 (2012) e FETAX (Bantle et al., 1994) e adaptadas de acordo com o tempo de desenvolvimento da espécie para as condições subtropicais (Cribb et al., 2013). De acordo com estas recomendações a solução FETAX foi composta por: 0,625 g de cloreto de sódio - NaCl, 0,096 g de bicarbonato de sódio - NaHCO<sub>3</sub>, 0,030 g de cloreto de potássio - KCl, 0,075 g de sulfato de magnésio - MgSO<sub>4</sub>, 0,015 g de cloreto de cálcio – CaCl<sub>2</sub> e, 0,060 g de sulfato de cálcio - CaSO<sub>4</sub> para cada litro de água destilada. Os testes foram conduzidos até que os embriões de *L. catesbeianus* do

grupo controle negativo atingissem o estágio 24 de Gosner (1960), equivalente ao estágio 46 de Nieuwkoop e Faber (1975), estabelecido para *X. laevis*. Foram realizadas algumas outras adaptações ao teste original, tais como a utilização de mais um controle negativo composto pela água onde os animais eram cultivados, e a ciclofosfamida como controle positivo, devido ao seu baixo custo-benefício e também responder positivamente à toxicidade e teratogenicidade dos embriões (Vismara e Caloni, 2007).

Os testes preliminares foram feitos de acordo com Morgan et al. (1996) que trabalhou com 2,4-D e embriões e larvas de *X. laevis*. Os testes definitivos foram conduzidos em laboratório climatizado, com controle de temperatura ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Foram colocados 25 ovos por réplica em placas de Petri acrescidas de 40 mL da solução FETAX. Cada tratamento foi constituído por duas réplicas simultâneas, mais Controle negativo (apenas a solução FETAX) com quatro réplicas, Controle negativo (água natural de cultivo local) e Controle positivo (ciclofosfamida diluída em solução FETAX) (Fort et al., 1998). Os valores da Concentração Letal Mediana ( $CL_{50-144h}$ ) e Concentração Efetiva Mediana ( $CE_{50-144h}$ ) utilizados para a ciclofosfamida foram 5,27 e 0,13 g/L, respectivamente. As placas foram cobertas com plástico preto para evitar a incidência de luz e conseqüente degradação do herbicida por fotólise.

Os resultados dos testes preliminares foram utilizados para a realização do teste definitivo com as seguintes concentrações: Controle negativo com a solução FETAX; Controle Negativo com água Natural; Controle positivo com Ciclofosfamida ( $CL_{50}$ ); Controle positivo com ciclofosfamida ( $CE_{50}$ ); T150 (150 mg/L); T300 (300 mg/L); T450 (450 mg/L); T600 (600 mg/L); T750 (750 mg/L); T900 (900 mg/L); T1050 (1050 mg/L) e T1200 (1200 mg/L), conforme a Figura 1.

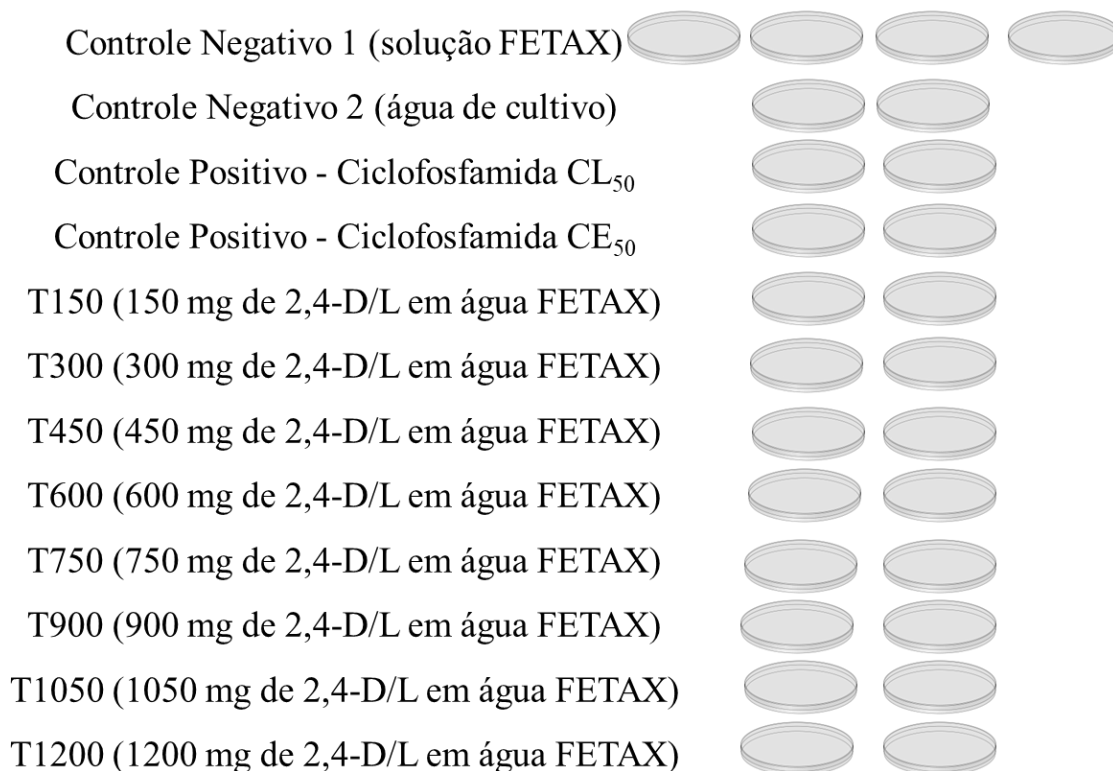


Figura 1. Representação esquemática do teste FETAX em embriões de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) expostos ao herbicida 2,4-D (DMA). Controle Negativo 1 (contém apenas a solução FETAX); Controle Negativo 2 (contém apenas a água de cultivo originária da represa local); Controle Positivo CL<sub>50</sub> (5,27 g de ciclofosfamida/L de solução FETAX); Controle Positivo CE<sub>50</sub> (0,13 g de ciclofosfamida/L de solução FETAX); T150 = 150 mg de 2,4-D (DMA)/L; T300 = 300 mg de 2,4-D (DMA)/L; T450 = 450 mg de 2,4-D (DMA)/L; T600 = 600 mg de 2,4-D (DMA)/L; T750 = 750 mg de 2,4-D (DMA)/L; T900 = 900 mg de 2,4-D (DMA)/L; T1050 = 1050 mg de 2,4-D (DMA)/L; T1200 = 1200 mg de 2,4-D (DMA)/L.

A avaliação da mortalidade foi diária e os embriões mortos foram registrados, retirados dos recipientes e descartados. Ao final do teste, os embriões sobreviventes foram fixados em solução de formaldeído a 3% para análise das malformações e de crescimento. As malformações, em cada categoria, foram registradas em formato padrão, e comparadas ao “Atlas de anormalidades” desenvolvido por Bantle et al. (1991). Foram determinados a CL<sub>50</sub> (embrioletalidade), CE<sub>50</sub> (para malformação) o Índice Teratogênico (IT) e concentração mínima para inibição do crescimento (CMIC). O Índice Teratogênico ou IT é uma medida de

risco de desenvolvimento. O ensaio FETAX emprega índice IT para dimensionar o potencial teratogênico das substâncias. Este índice é obtido dividindo a  $CL_{50}$  pela  $CE_{50}$ . Um ponto de corte de  $IT = 1,5$  é empregado para classificar as substâncias embriotóxicas em claramente teratogênicas ( $IT \geq 1,5$ ), pouco ou não teratogênicas ( $IT \leq 1,5$ ). A concentração mínima para inibição do crescimento (CMIC) também é determinada no ensaio, pela mensuração do comprimento de cada embrião (cabeça-cauda) e determinando se uma concentração em particular é diferente do controle (ASTM, 2012).

### ***2.2. Testes de toxicidade: girinos***

Os girinos foram selecionados e coletados entre os estágios 31 e 36 da tabela de Gosner (1960). As técnicas para condução dos testes de toxicidade aguda e crônica seguiram as recomendações feitas pelas técnicas internacionais da American Society for Testing Materials - ASTM E729 - 96 (2014).

Para a aclimatação, os animais foram mantidos em condições laboratoriais cujas instalações permitiram o controle e manutenção da temperatura ambiente e fotoperíodo, por um período de sete dias. Durante os testes, foram aferidos os parâmetros físicos e químicos da água: temperatura e oxigênio dissolvido (OD) utilizando-se o oxímetro digital Lutron DO-5519 e, pH, dureza, alcalinidade, amônia tóxica e amônio utilizando-se a metodologia do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater – 20th Edition (APHA 2005).

#### ***2.2.1. Toxicidade aguda – Determinação da $CL_{50}$***

Os testes tiveram duração de 96 horas e foram conduzidos em sistema estático, sendo realizados em aquários preenchidos por 6 L com água de abastecimento urbano, declorada por pernoite. Os aquários foram dotados de aeração individual e cobertos por filme plástico transparente para evitar perdas por evaporação. Foram utilizados 168 girinos (6 animais/aquário) distribuídos em 4 réplicas para cada tratamento nas concentrações de 0, 450,

550, 650, 750, 850 e 950 mg de 2,4-D (DMA)/L. Os parâmetros físicos e químicos da água foram mensurados 24 e 96 horas após o início do teste. Durante o teste os organismos não foram alimentados. A densidade inicial utilizada foi de 1 animal/L. A temperatura ambiente no laboratório de bioensaios foi mantida através de condicionador de ar regulado em  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ . O fotoperíodo foi de 24h escuro, pois os aquários foram revestidos externamente com sacos plásticos pretos para evitar a degradação por fotólise do produto químico 2,4-D (DMA). A toxicidade  $CL_{50-96h}$  observada foi comparada de acordo com a classificação do Globally Harmonized System o-96hf Classification and Labeling of Chemicals (GHS, 2011), onde está estabelecido que os compostos podem ser classificados em três categorias após exposição por 96 h: alta toxicidade ( $CL_{50} < 1 \text{ mg/L}$ ), toxicidade moderada ( $CL_{50}$  entre 1 e 10 mg/L) e baixa toxicidade ( $CL_{50} > 10 \text{ mg/L}$ ). Após os testes de toxicidade aguda, e uma vez determinada a  $CL_{50-96h}$ , foi iniciado o teste de toxicidade crônica.

### *2.2.2. Toxicidade crônica*

Os testes de toxicidade crônica tiveram duração de 49 dias, com renovação das soluções ( $\text{H}_2\text{O} + 2,4\text{-D (DMA)}$ ) a cada 7 dias, ou seja, 7 re-intoxicações, caracterizando um teste semi-estático (com renovação da água). Foram distribuídos 160 girinos em 4 tratamentos, com 4 réplicas cada um, sendo intoxicados com 3 doses:  $CL_{50-96h}/2$ ,  $CL_{50-96h}/10$  e  $CL_{50-96h}/100$  e um controle negativo (sem adição do produto). Os parâmetros físicos e químicos da água foram mensurados antes e depois da renovação das soluções. A densidade foi de 1 animal/L, com o total de 10 girinos por aquário, também preenchidos por água declorada por pernoite. O fotoperíodo foi 12:12h (claro/escuro). Os aquários e a água utilizada no experimento seguiram os mesmos padrões do teste de toxicidade aguda.

Os animais foram alimentados todos os dias no período da tarde com ração (Guabi) de 38% PB, 7,5% EE, 4,5% FB e 13% MM com 1% da massa média dos girinos em cada aquário. No último dia de experimento do teste crônico, 12 animais de cada tratamento (3 de cada unidade

experimental) foram coletados aleatoriamente, anestesiados para a coleta de sangue e eutanasiados para a coleta de órgãos, como descrito a seguir.

#### *2.2.2.1. Saudabilidade, perfil hematológico e análise histopatológica*

Foram registradas as mortalidades diariamente, do início até o final da experimentação do teste crônico. A massa dos animais foi mensurada em balança digital com precisão de 1g, no primeiro e no último dia do teste, somando os 10 girinos de cada unidade experimental por tratamento.

As coletas de sangue foram realizadas a partir da punção do sangue do vaso caudal com auxílio de ponteiros heparinizados de 48 animais expostos (3 de cada unidade experimental, ou seja, 12 por tratamento) depois de aplicar a lidocaína (50 mg/g) utilizada como anestésico local de acordo com a resolução normativa do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2016). A contagem de eritrócitos (RBC) foi feita com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico (400x), utilizando-se a solução de Hayem como diluente. A taxa de hemoglobina (Hb) foi mensurada por espectrofotômetro, através do método da cianometahemoglobina. Com os resultados da RBC e Hb, foi determinado o índice hematimétrico Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) que resulta na quantidade de hemoglobina existente em cada eritrócito. Esse índice é utilizado para a classificação de anemias. Foram realizadas a Contagem Total de Leucócitos (CTL - 2000 células por lâmina) pelo método indireto segundo Hrubec e Smith (1998) e Contagem Diferencial de Leucócitos (CDL - 200 leucócitos por lamina) das células sanguíneas. As extensões sanguíneas foram realizadas em duplicada. As lâminas foram coradas com coloração de Romanowsky, mascaradas, codificadas e examinadas sob microscopia de luz comum, com objetiva de imersão (1000x). As células foram classificadas conforme sua morfologia e visualização ao microscópio (eritrócitos, linfócitos, neutrófilos, basófilos,



eosinófilos, monócitos e trombócitos), tomando-se por base os critérios adotados por Turner (1988).

Após a retirada do sangue os animais não retornaram aos aquários sendo anestesiados com eugenol (7 mL/L) em gelo, e eutanasiados para a retirada do fígado e baço para a realização dos cálculos dos índices hepato e espleno-somáticos (IHS e IES) que foram obtidos através da pesagem desses órgãos e de cada girino em balança analítica de precisão de 0,0001 g, através da metodologia proposta por Quentel e Obach (1992), cujo cálculo divide a massa hepática/esplênica (g) pela massa do animal (g) e multiplica-se por 100. Também foram retiradas e armazenadas, em formol tamponado 10%, as brânquias, pele e rim para a realização da análise histológica.

A análise histológica seguiu o protocolo padronizado por Michalany (1990) na qual a fixação em formaldeído foi substituída pelo processo de desidratação em série crescente de etanol. A emblocagem foi feita em parafina seguida de cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espessura com o auxílio de micrótomo Hyrax Zeiss®. Por fim coloração de Hematoxilina/Eosina (H&E). A observação e registro das imagens foram feitas sob microscópio de luz CarlZeissAxioScope A1® e software de captura de imagem ZEN®.

### ***2.3. Análise estatística***

As Concentrações Letais Medianas e Concentração Efetiva Mediana do agrotóxico foram estimadas através do Software GW-Basic 3,0, de acordo com o método estatístico “Trimmed Spearman Karber” (Hamilton et al., 1977). A CMIC foi determinada através do teste t de Student. Os dados de ganho de peso, IHS, IES, CTL, CDL, RBC, Hb e HCM, obtidos nesse estudo foram submetidos a análise de variância (ONE-WAY ANOVA). Os assuntos de normalidade e homogeneidade das variâncias dos resíduos foram respectivamente verificados pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene. A transformação  $\log_{10}(x+1)$  foi aplicada

em caso de não satisfação dos assuntos. Quando diferenças significativas entre os tratamentos foram detectadas ( $p < 0,05$ ) o teste *a posteriori* de Tukey foi utilizado. Em caso de dados não-paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e como teste *a posteriori* o Multiple Comparison test (Zar, 1999).

### 3. Resultados

#### 3.1. FETAX (*Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus*)

A  $CL_{50-144h}$ , a  $CE_{50-144h}$  e o IT para embriões de rã-touro (*L. catesbeianus*) foram respectivamente 791,91 mg/L; 592,62 mg/L de 2,4-D (DMA) e 1,34. A CMIC resultou em 150 mg/L, havendo diferença significativa em todos os tratamentos em que o herbicida era presente em relação ao controle ( $p < 0,001$ ). Na Figura 2 são apresentados os resultados da mortalidade acumulada (%) dos animais durante o ensaio FETAX. Pode-se observar aumento gradativo da mortalidade dos embriões de acordo com o aumento das concentrações do herbicida. A mortalidade foi evidenciada nas concentrações maiores que 600 mg/L, sendo que para os tratamentos T1050 e T1200 a mortalidade foi de 100%.

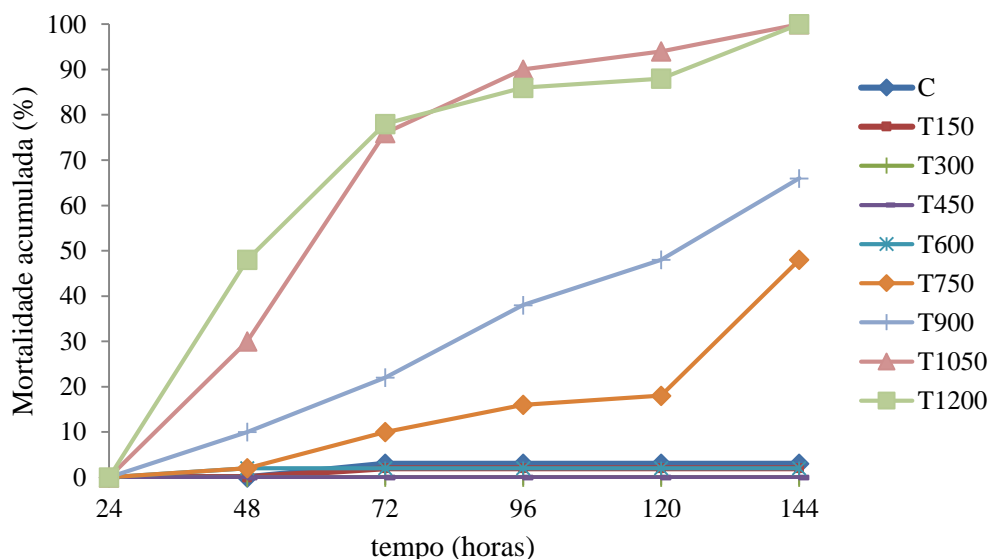


Figura 2. Porcentagem de mortalidade acumulada de embriões de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) expostos ao herbicida 2,4-D (DMA) durante o ensaio FETAX. C = controle; T150 = 150 mg 2,4-D (DMA)/L; T300 = 300 mg 2,4-D (DMA)/L; T450 = 450 mg 2,4-D (DMA)/L; T600 = 600 mg 2,4-D (DMA)/L; T750 = 750 mg 2,4-D

(DMA)/L; T900 = 900 mg 2,4-D (DMA)/L; T1050 = 1050 mg 2,4-D (DMA)/L; T1200 = 1200 mg 2,4-D (DMA)/L.

A Figura 3 representa imagens de exemplos de embriões malformados de *L. catesbeianus* após exposição a algumas concentrações do 2,4-D (DMA). Os pontos finais de toxicidade para o desenvolvimento avaliado incluem malformações (por exemplo, externas, viscerais, esqueléticas), variações (por exemplo, hipopigmentação) e crescimento (por exemplo, corpo atrofiado). Foram encontradas malformações axiais na cauda, edema abdominal e deformação do intestino.



Figura 3. Imagens da fase larval de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) expostos ao herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (DMA). A - Girino normal do controle. B seta indicando deformação da cauda e do abdômen – 900 mg de 2,4-D (DMA)/L. C seta indicando deformação do intestino – 750 mg de 2,4-D (DMA)/L. D seta indicando edema abdominal e deformações na cauda – 600 mg de 2,4-D (DMA)/L. Lupa (Nikon SMZ 745T). Aumento 10x.

### 3.2. Testes de toxicidade: girinos

#### 3.2.1. Toxicidade aguda – Determinação da $CL_{50}$

Os valores médios dos parâmetros físicos e químicos da água foram: temperatura:  $23,8 \pm 0,7$  ° C; OD:  $6,0 \pm 1,6$  mg/L; pH:  $7,6 \pm 0,4$ ; dureza:  $56,31 \pm 5,01$  mg/L; amônia tóxica ( $NH_3$ ):  $1,02 \pm 0,53$  % e alcalinidade  $30,04 \pm 2,72$  mg/L. A  $CL_{50-96h}$  foi de 700,01 mg de 2,4-D (DMA)/L. O amônio ( $NH_4^+$ ) foi de 0,5 mg/L aumentando gradativamente conforme as concentrações e o tempo de exposição ao 2,4-D (DMA). Na Figura 4 são apresentados os resultados da mortalidade acumulada (%) dos animais durante o ensaio com duração de 96h.

Não foi observada mortalidade no grupo controle.

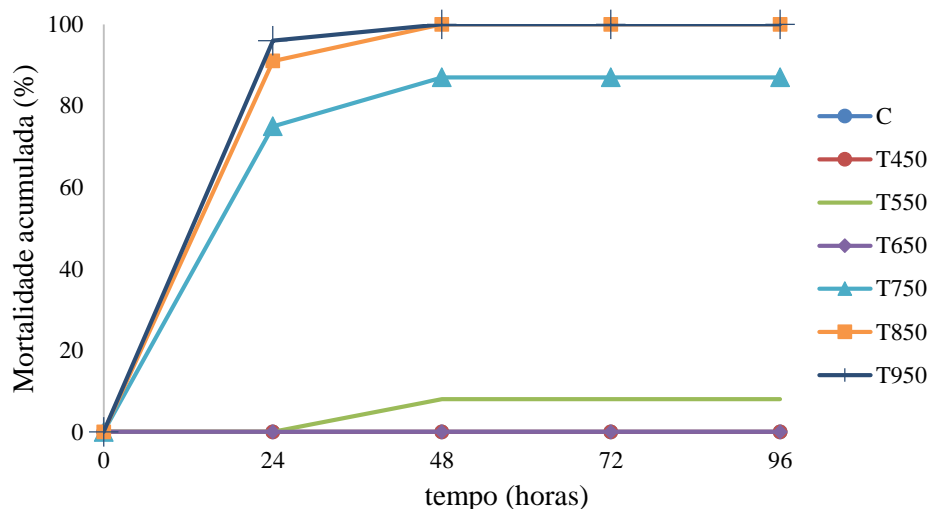


Figura 4. Gráfico da porcentagem de mortalidade acumulada de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) expostos ao herbicida 2,4-D (DMA). C = controle; T450 = 450 mg/L; T550 = 550 mg/L; T650 = 650 mg/L; T750 = 750 mg/L; T850 = 850 mg/L; T950 = 950 mg/L.

### 3.2.2. Toxicidade crônica

Os valores médios dos parâmetros físicos e químicos da água antes e depois da renovação das soluções foram respectivamente: temperatura:  $23,1 \pm 0,9$  e  $23,1 \pm 1,2$  °C; OD:  $6,9 \pm 0,6$  e  $6,5 \pm 0,7$  mg/L; pH:  $7,0 \pm 0,1$  e  $7,2 \pm 0,3$ ; dureza:  $27,05 \pm 2,00$  e  $39,89 \pm 2,32$  mg/L; amônia tóxica:  $0,63 \pm 0,47$  e  $1,04 \pm 0,58$  %; alcalinidade:  $23,30 \pm 2,44$  e  $49,35 \pm 3,89$  mg/L. O íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) teve valor médio inicial (antes das renovações das soluções) de  $1,04 \pm 0,36$  mg/L aumentando gradativamente conforme o tempo e as concentrações de 2,4-D (DMA) até o valor máximo médio (após a renovação das soluções) de  $16,95 \pm 0,72$  mg/L na concentração de 350 mg/L.

#### 3.2.2.1. Saudabilidade

Após determinação do  $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  foram utilizadas para o teste crônico as seguintes concentrações: C – controle (sem adição do produto), T7 (7 mg/L), T70 (70 mg/L) e T350 (350 mg/L), nas condições já descritas na metodologia. Não houve mortalidade de girinos

durante o teste crônico no intervalo de concentrações de 7 a 350 mg de 2,4-D (DMA)/L, exposto por 49 dias, mesmo com a renovação das soluções a cada 7 dias. A massa média dos girinos no início experimento foi de  $27,8 \pm 1,5$  g. Ao final de 49 dias houve perda de peso, estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ), no tratamento T350.

O valor médio de IHS foi de  $3,61 \pm 0,93$  %, não havendo diferença significativa entre os tratamentos. Os resultados de IES demonstraram diferenças altamente significativas ( $p < 0,001$ ) entre os tratamentos onde o 2,4-D (DMA) era presente, que foram menores em relação ao controle (Figura 5).

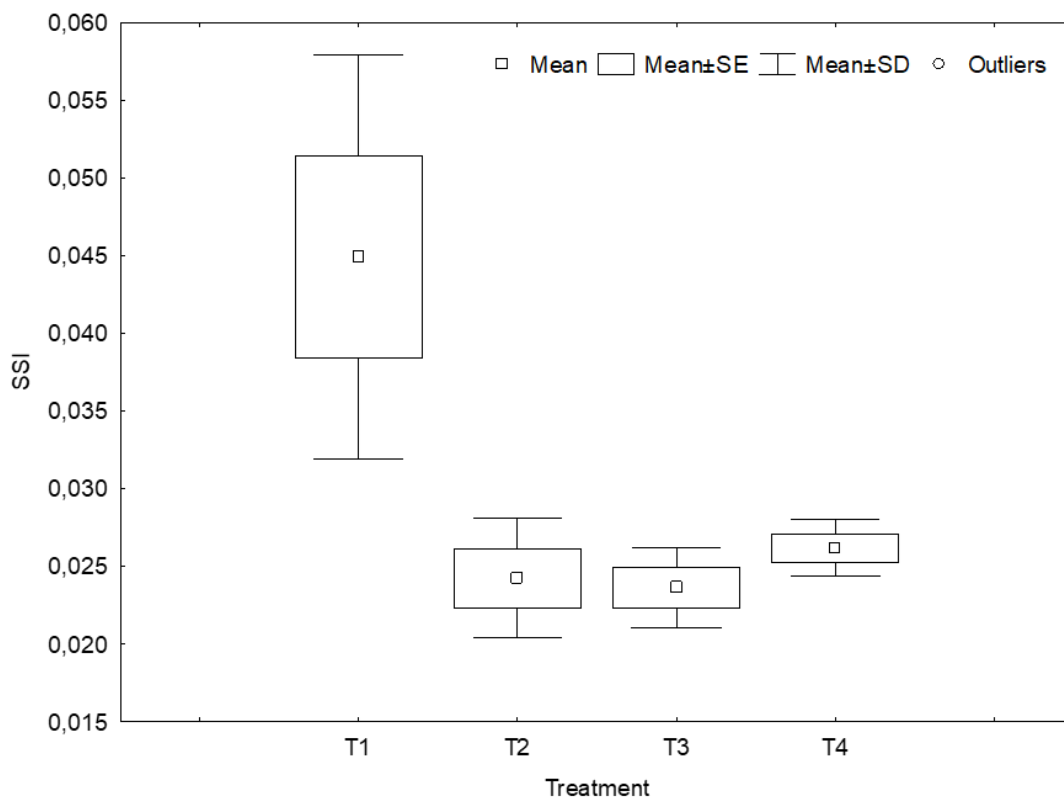


Figura 5. Índice Espleno-Somático (IES) (%) de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) expostos por 49 dias ao herbicida 2,4-D (DMA). C = controle; T7 = 7 mg 2,4-D (DMA)/L; T70 = 70 mg 2,4-D (DMA)/L; T350 = 350 mg 2,4-D (DMA)/L.

### 3.2.2.2. Perfil hematológico

Os resultados da Contagem Total de Leucócitos (CTL) e Contagem Diferencial de Leucócitos (CDL) e Contagem Total de Trombócitos são apresentados na Tabela 1. Houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no número absoluto de linfócitos e neutrófilos e consequentemente de leucócitos no tratamento de maior concentração (T350) em relação aos demais. Não houve alterações relevantes entre os tratamentos em relação aos basófilos, eosinófilos, monócitos e trombócitos dos girinos após 49 dias de exposição (Tabela 1).

Tabela 1. Média e erro padrão do número absoluto da Contagem Total de Leucócitos, Contagem Diferencial de Leucócitos e trombócitos de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) expostos por 49 dias ao herbicida 2,4-D (DMA) em diferentes concentrações.

	<b>Lc</b>	<b>Lf</b>	<b>Nt</b>	<b>Bs</b>	<b>Es</b>	<b>Mn</b>	<b>Tb</b>
<b>C</b>	6693,87 ± 1214,71 <sup>a</sup>	6415,96 ± 1140,94 <sup>a</sup>	199,44 ± 70,73 <sup>a</sup>	40,45 ± 13,41	31,07 ± 15,57	6,94 ± 6,94	559,45 ± 325,04
<b>T7</b>	8167,67 ± 591,20 <sup>a</sup>	7675,65 ± 544,86 <sup>a</sup>	395,47 ± 136,71 <sup>a</sup>	57,12 ± 34,22	14,45 ± 8,83	24,98 ± 19,04	741,17 ± 546,37
<b>T70</b>	7186,70 ± 684,63 <sup>a</sup>	6758,28 ± 613,59 <sup>a</sup>	350,45 ± 128,05 <sup>a</sup>	42,88 ± 16,03	18,26 ± 8,82	16,83 ± 6,27	518,33 ± 304,24
<b>T350</b>	11103,27 ± 1249,25 <sup>b</sup>	10422,42 ± 1200,32 <sup>b</sup>	551,17 ± 90,65 <sup>b</sup>	69,65 ± 14,95	34,68 ± 13,28	25,34 ± 14,53	423,57 ± 185,75

Lc (leucócitos totais/ $\mu\text{L}^3$ ); Lf (linfócitos/ $\mu\text{L}^3$ ); Nt (neutrófilos/ $\mu\text{L}^3$ ); Bs (basófilos/ $\mu\text{L}^3$ ); Es (eosinófilos/ $\mu\text{L}^3$ ); Mn (monócitos/ $\mu\text{L}^3$ ) e Tb (trombócitos/ $\mu\text{L}^3$ ). C = controle; T7 = 7 mg/L; T70 = 70 mg/L; T350 = 350 mg/L. (n= 48). Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos.

Os resultados da contagem de eritrócitos (RBC), taxa de hemoglobina (Hb) e Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) estão presentes na Tabela 3. Houve aumento de RBC em todos os tratamentos com a presença do herbicida. A estatística evidenciou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) somente entre o controle e os tratamentos T7 e T350. Também houve aumento gradativo da Hb com as concentrações crescentes do herbicida, mas neste caso, o tratamento T350 foi significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle e o T7. Não houve diferença significativa do índice HCM entre os tratamentos, apesar de ter ocorrido aumento gradativo dos valores em T70 e T350.

Tabela 3. Média e erro padrão do número de eritrócitos (RBC), taxa de hemoglobina (Hb) e Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) dos girinos (*Lithobates catesbeianus*) expostos por 49 dias ao 2,4-D (DMA) em diferentes concentrações.

	<b>RBC</b>	<b>Hb</b>	<b>HCM</b>
<b>C</b>	12,46 ± 1,09 <sup>a</sup>	2,34 ± 0,29 <sup>a</sup>	2,02 ± 0,32 <sup>a</sup>
<b>T7</b>	18,42 ± 1,78 <sup>b</sup>	2,47 ± 0,26 <sup>a</sup>	1,47 ± 0,17 <sup>ab</sup>
<b>T70</b>	14,37 ± 0,98 <sup>ab</sup>	3,34 ± 0,30 <sup>ab</sup>	2,37 ± 0,25 <sup>ac</sup>
<b>T350</b>	17,54 ± 1,06 <sup>b</sup>	4,23 ± 0,21 <sup>b</sup>	2,49 ± 0,17 <sup>ac</sup>

RBC ( $10^4$  células/ $\mu$ L); Hb (g/dL); HCM (pg). C = controle negativo; T7 = 7 mg/L; T70 = 70 mg/L; T350 = 350 mg/L. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos.

### 3.2.2.3. Análise histopatológica

A análise histopatológica das brânquias, rins e pele dos girinos de *L. catesbeianus* evidenciou injúrias que tiveram relação direta com o aumento das concentrações do herbicida 2,4-D (DMA) mesmo em dosagens subletais. Isso foi demonstrado em todas as amostras analisadas. Nas Figuras 6, 7 e 8 descrevemos as principais alterações.



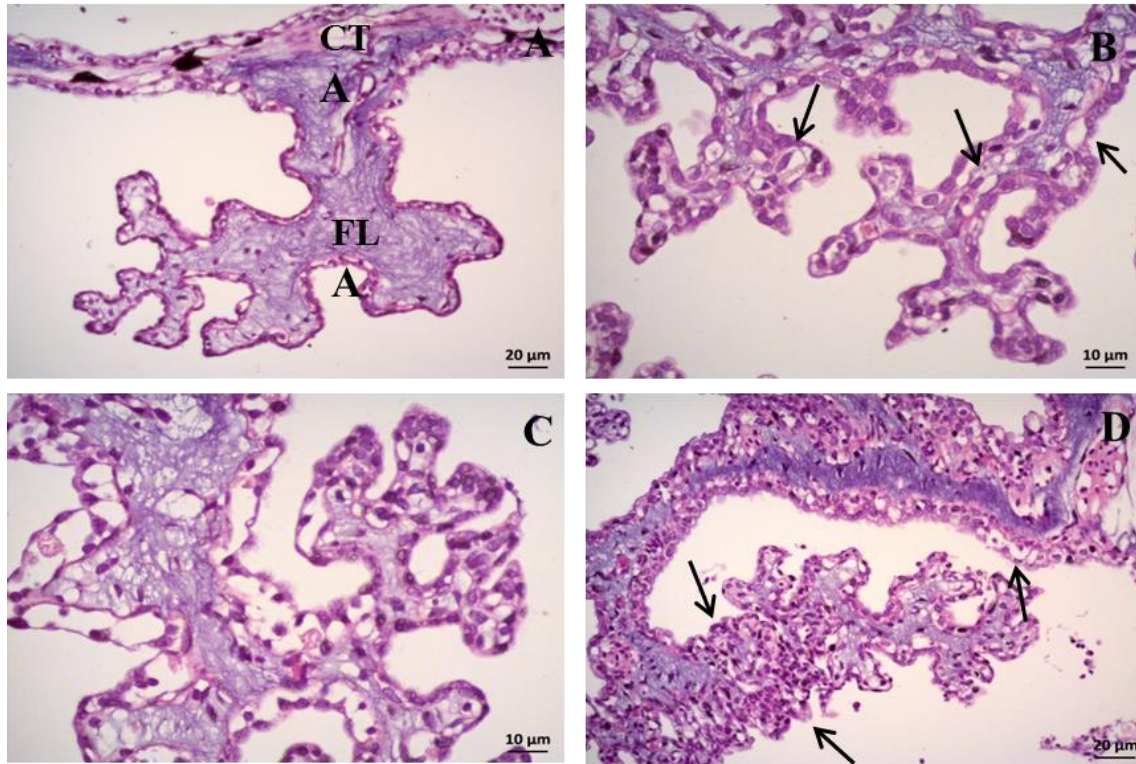


Figura 6. Fotomicrografia comparativa de brânquias de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) expostos por 49 dias ao herbicida 2,4-D (DMA). A – Filamento do arco branquial com ramificações secundárias, CT – cartilagem, FL – Filamento (Controle negativo) aumento 200x. B - Vacuolização citoplasmática (T7 = 7 mg/L) aumento 400x. C – Vacuolização citoplasmática intensa (T70 = 70 mg/L) aumento 400x. D – Vacuolização, hiperplasia e fusão lamelar (T350 = 350 mg/L). Aumento 200x. Coloração H&E.

Nas brânquias das larvas de rã-touro do presente estudo, houve injúrias como a vacuolização citoplasmática nos tratamentos em que o herbicida era presente. E no tratamento de maior concentração (T350) houve fusão lamelar.

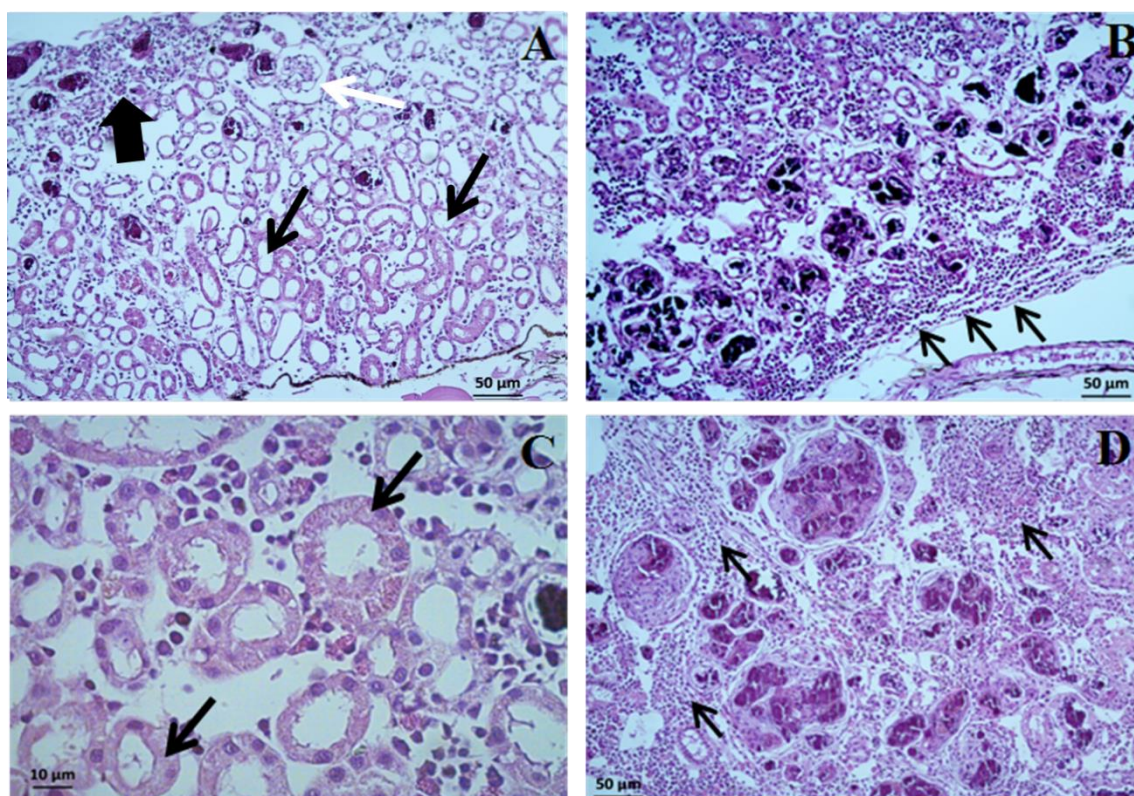


Figura 7. Fotomicrografia comparativa de rins de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) expostos por 49 dias ao herbicida 2,4-D (DMA). A – (Controle negativo) aumento 100x. Túbulos renais (setas pretas), células da linhagem hematopoiética (seta preta e larga), glomérulo e Cápsula de Bowman (seta branca) B – Desorganização tecidual e infiltração linfocitária (seta) (T7 = 7 mg/L) aumento 100x. C – Hipertrofia dos túbulos renais e células com perda do núcleo (setas) (T70 = 70 mg/L) aumento 400x. D – Intensa desorganização tecidual com perda das estruturas celulares, infiltração linfocitária (seta) e áreas de necrose tecidual (T350 = 350 mg/L). Aumento 100x. Coloração H&E.

Houveram alterações prejudiciais nos rins dos girinos como a desorganização tecidual, infiltração linfocitária, hipertrofia dos túbulos renais, células com perda do núcleo e áreas de necrose tecidual nos tratamentos em que o herbicida era presente.

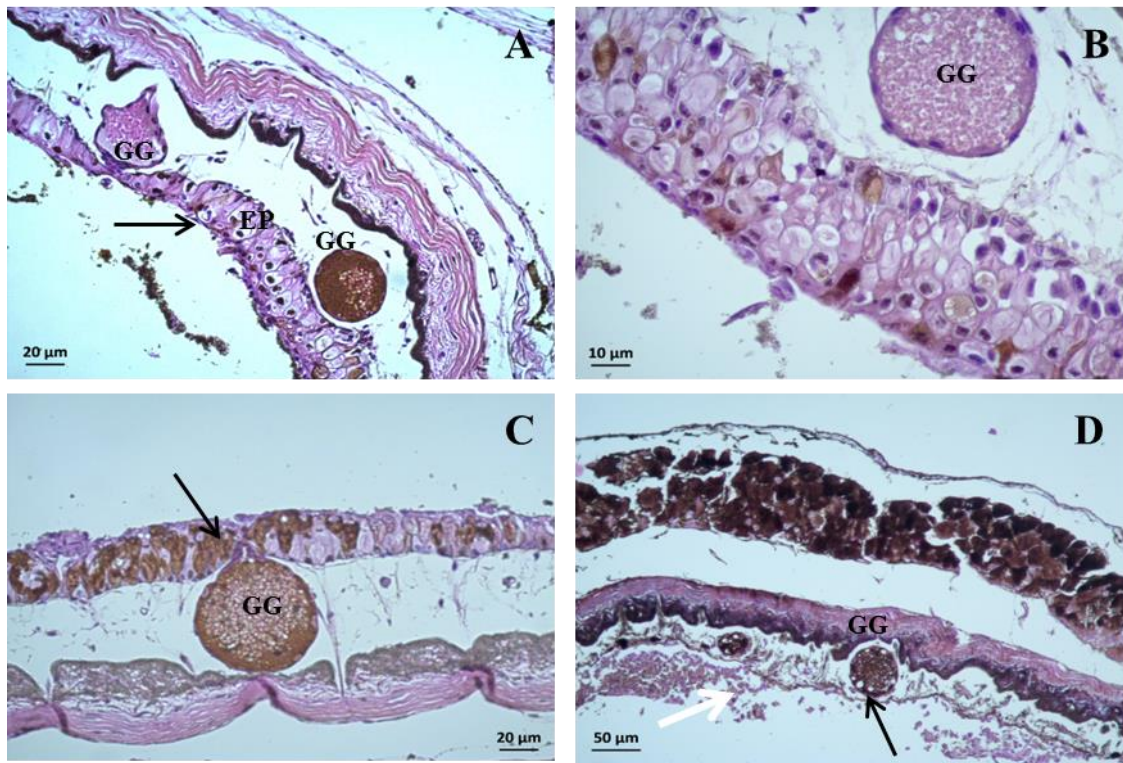


Figura 8. Fotomicrografia comparativa de pele de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) expostos por 49 dias ao herbicida 2,4-D (DMA). A – EP – Epiderme normal (seta), GG – Glândula Granulosa (Controle negativo) aumento 200x. B - Hiperplasia epitelial, (T7 = 7 mg/L) aumento 400x. C – GG - Glândula Granulosa - células da epiderme com pigmentos (seta) (T70 = 70 mg/L) aumento 200x. D – Destrução da camada epitelial (estrato germinativo – seta branca), GG – Glândula Granulosa (vacuolização da glândula – seta preta) (T350 = 350 mg/L) aumento 100x. Coloração H&E.

Houveram alterações prejudiciais na pele dos girinos como a hiperplasia epitelial observada nos tratamentos T7 E T70 e a degeneração da camada epitelial pela maior concentração do herbicida testado (T350).

#### 4. Discussão

Os resultados de  $CL_{50-144h}$ ,  $CE_{50-144h}$  e IT comprovam que esse agrotóxico, em curto prazo, para embriões de *L. catesbeianus*, é pouco tóxico ( $CL_{50} > 10$  mg/L) de acordo com o GHS (2011) e pouco teratogênico ( $IT \leq 1,5$ ) de acordo com a ASTM (2012). Morgan et al. (1996) encontraram valores para  $CL_{50-96h}$ ,  $CE_{50-96h}$  e IT menores a esse estudo, expondo embriões de *Xenopus laevis* ao 2,4-D, demonstrando maior

sensibilidade desses anuros ao pesticida testado, ratificando a baixa classificação toxicológica e teratogênica do 2,4-D, porém em nosso estudo, malformações nos embriões foram observadas e consistiram em deformações do intestino, edemas e deformação da cauda. Malformações foram relatadas em diversos estudos como os trabalhos de Aronzon et al. (2010) e Curi et al. (2019), que também observaram deformações no intestino e na cauda causadas pelo 2,4-D em diversas espécies de girinos e também no peixe-zebra (*Danio rerio*) em sua fase larval (Gaaied et al., 2019). Da mesma forma, Lenkowski et al. (2010b) reportaram diferença significativa da malformação do intestino e edemas de *X. laevis* na fase larval, porém, a partir de 60 mg de 2,4-D/L em 48 h de exposição com apenas uma renovação das soluções. Isso pode ser devido à interrupção de uma via de sinalização específica da morfogênese visceral, como demonstrado para a atrazina em girinos de *X. laevis* nos trabalhos de Lenkowski and McLaughlin (2010a). Avaliando a toxicidade do diclofenaco, Cardoso-Vera et al. (2017) comparam as respostas entre *X. laevis* e *L. catesbeianus* durante o desenvolvimento embrionário, observando semelhanças em ambas espécies em relação a inibição do crescimento e diversas malformações, incluindo principalmente malformações axiais na cauda e na notocorda, edema e hipopigmentação. A CMIC obtida no presente estudo foi a menor concentração entre os tratamentos do experimento. Lembrando que, no tratamento T150 não houve deformidades nos girinos, evidenciando que a CMIC ainda pode ser menor do que as testadas. Existem poucos trabalhos sobre a CMIC em relação à exposição do 2,4-D em animais e recomendamos mais testes em concentrações menores para o cálculo da CMIC.

A  $CL_{50-96h}$  do 2,4-D (DMA) para girinos condiz com trabalhos que relatam que esse herbicida não é agudamente tóxico para diversas espécies de anuros (Cooke, 1972; Curi et al., 2019; Morgan et al., 1996). Freitas et al. (2019) trabalhando com girinos de

*L. catesbeianus* no estágio 25 de Gosner (1960) encontraram valores de  $CL_{50-96h}$  bem semelhantes ao presente estudo (574,52 mg de 2,4-D (DMA)/L). Esse valor é menor ao encontrado no presente estudo, porém utilizamos girinos em estágios de Gosner (1960) mais avançados (31 a 36) ao realizar o teste de toxicidade. Esses mesmos autores reportaram também que os girinos de *L. catesbeianus* são mais resistentes quando comparado com outras espécies nativas do Brasil: *Leptodactylus fuscus* (28,81 mg de 2,4-D (DMA)/L) e *Physalaemus nattereri* (143,08 mg de 2,4-D (DMA)/L). Testes realizados em peixes também mostram baixa toxicidade aguda (96h) para esse herbicida. Cattaneo et al. (2008) encontraram valores de  $CL_{50}$  semelhantes (745 mg de 2,4-D/L) para jundiá (*Rhamdia quelen*) e Ruiz de Arcaute et al. (2016) encontraram valores de  $CL_{50}$  de 1008 mg de 2,4-D (DMA)/L para o barrigudinho (*Cnesterodon decemmaculatus*). Mas concentrações bem acima da média (2780 mg de 2,4-D/L) foram encontradas por Holcombe et al. (1995) para larvas de medaka (*Oryzias latipes*). Todos esses valores de  $CL_{50}$  citados, incluindo o encontrado no presente estudo, mostram que o 2,4-D, para a maioria dos anfíbios e peixes, não é agudamente tóxico. Por outro lado, o 2,4-D possui diversas formulações e, sua estabilidade bioquímica e reações fisiológicas dos organismos aquáticos expostos a este pesticida podem ser distintas. Por exemplo, no trabalho de Benli et al. (2007), foi reportado que o 2,4-D na forma ácida, é altamente tóxico para a lagosta (*Astacus leptodactylus*) com o valor de  $CL_{50-96h}=32,6$  mg/L. Portanto, recomendamos testes toxicológicos específicos para cada local e entorno onde o mesmo será utilizado para assegurar a baixa toxicidade aguda desse herbicida em ambientes aquáticos.

Neste estudo, durante o teste de toxicidade crônica, houve uma correlação positiva dos íons amônio com o aumento das quantidades de 2,4-D (DMA). Isso pode ser explicado pelo intenso processo de detoxificação durante cada um dos sete dias de

exposição. Entretanto, mesmo sob intenso estresse fisiológico não houve mortalidade durante os 49 dias de exposição. No teste de toxicidade crônica conduzido por Coady et al. (2013), utilizando esse herbicida em sua forma ácida, houve apenas uma incidência de mortalidade de girino de *X. laevis* no tratamento de máxima concentração testada (113 mg/L). No trabalho de Curi et al. (2019) houve mortalidade de girinos (*Physalaemus albonotatus*) a partir do dia 13 numa faixa de concentração de 43,7 a 262,5 mg de 2,4-D Amina Zamba/L (também em forma de sal), porém a renovação das soluções ocorria a cada 48 h.

Vários autores (Coady et al., 2013; Curi et al., 2019; Freitas et al., 2019; Mesak et al., 2018) trabalhando com girinos expostos cronicamente ao 2,4-D em concentrações de até 262 mg/L não observaram diferenças significativas na biomassa. No presente estudo identificamos perda de peso significativo somente no tratamento de maior concentração (T350).

Os resultados obtidos em nossa experimentação para o IHS foram semelhantes aos trabalhos de Sai et al. (2016a; 2016b), que também não obtiveram diferença significativa de IHS para girinos expostos aos herbicidas atrazina e simazina. Em relação a esse biomarcador há estudos em que esse índice aumenta ou diminui significativamente conforme o xenobiótico testado, como por exemplo, o estudo de Chai et al. (2017), onde houve aumento significativo do IHS em girinos de sapo *Bufo gargarizans* expostos ao triclosan, e o estudo de Li et al. (2017), onde esse índice foi significativamente menor em *X. laevis* adultos expostos ao azocyclotin. Em relação IES o estudo de Chesnokova et al. (2016) reportou diminuição significativa deste índice em ratos expostos ao 2,4-D. Nossos resultados ratificados pelos reportados anteriormente nos levam a questionar se o IHS seria um biomarcador adequado para o 2,4-D e outros pesticidas em anuros. Por outro lado, existem poucos estudos relacionando agrotóxicos

e os índices IHS e IES, principalmente em animais aquáticos. Sugerimos que estas análises de baixo custo e determinação sejam incluídas em estudos toxicológicos de rotina. Cabe ressaltar que existem diversas espécies de anuros mais sensíveis e mais testes tem de ser feitos em concentrações mais baixas, para que possa encontrar a concentração em que o IES começa a diminuir com diferença significativa do tratamento controle.

Na análise hematológica, encontramos trabalhos com resultados semelhantes aos nossos como o de Lajmanovich et al. (2015), que ao realizarem teste toxicológico em sapos adultos (*Rhinella arenarum*) expostos ao 2,4-D (DMA), também encontraram aumento significativo na quantidade de linfócitos em relação ao controle afetando os parâmetros hematológicos e imunológicos dos animais. Kubrak et al. (2013), encontraram diferença significativa no número de linfócitos de peixes (*Carassius auratus*) após 96h de exposição do 2,4-D, que foi significativamente menor apenas no tratamento de maior concentração do herbicida (100 mg/L), porém, 96h após a exposição (período de recuperação) a análise foi refeita e os animais desse tratamento voltaram a possuir o número inicial de linfócitos, o que é um aspecto positivo em relação a este herbicida. Fukuyama et al. (2009) relataram aumento do número total de leucócitos, linfócitos e neutrófilos de ratos expostos ao 2,4-D (via dérmica) e concluíram que esse herbicida é um alérgeno respiratório, o que também é plausível para nossos resultados.

Sob condições de estresse, o conteúdo de hemoglobina pode ser elevado para aumentar a capacidade de transporte e suprimento de oxigênio aos principais órgãos em resposta a demandas metabólicas mais altas (Rutten et al., 1992). Carvalho et al. (2017) ao expor girinos de *L. catesbeianus* à diferentes metais (zinco, cobre e cádmio) relataram o aumento significativo de RBC e Hb, aumentando a capacidade sanguínea de

transportar oxigênio para atender à crescente demanda metabólica decorrente do estresse causado pelos metais. O RBC, Hb e HCM revelaram a resposta do organismo para manter o metabolismo aeróbico. Nesse trabalho, também relataram o aumento de linfócitos dos animais, indicando a mobilização celular para proteger o corpo contra infecções em tecidos danificados. Da mesma forma, Lal et al. (1986) encontraram resultados muito semelhantes a este estudo em relação ao aumento anormal de RBC e Hb e a simultânea diminuição significativa do IES, ao realizar teste toxicológico utilizando o inseticida Malation em bagres (*Heteropneustes fossilis*). O RBC e a Hb aumentaram após 4 dias de tratamento, mas seus níveis voltaram ao normal após 8 e 16 dias de exposição. O índice espleno-somático (IES) diminuiu após 4 e 8 dias de exposição ao inseticida, mas após 16 dias retornou ao seu nível normal.

O aumento anormal de RBC (eritrocitose) acompanhado do aumento da Hb pode ser classificado como policitemia (DeGruchy, 1989; Ranzani-Paiva, 2013). A forma mais comum de eritrocitose encontrada na prática clínica é a eritrocitose relativa (hemoconcentração); uma elevação no hematócrito como resultado da desidratação ou contração esplênica devido a um estímulo simpático em resposta a excitação, dor ou medo (Jain, 1993). O aumento da CTL reforça essa hipótese. O motivo da policitemia pode ser devido à hemoconcentração e perda de água. A perda de água aumenta a contagem de RBC por volume sanguíneo e reduz o tamanho dos eritrócitos devido ao choque osmótico (Clauss et al., 2008). Singh e Srivastava (2010) já haviam relatado policitemia em peixes-gato (*Heteropneustes fossilis* e *Ictalurus punctatus*), após tratamento agudo e crônico com inseticidas. Este comportamento sugere aumento do metabolismo dos animais, que conseqüentemente determina aumento da excreção, podendo explicar o incremento da quantidade de íons amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) encontrada na água dos aquários do presente estudo, ao aumentar das concentrações de 2,4-D (DMA).



Essa injúria provocada pelo 2,4-D (DMA) aos girinos indicou alteração hematológica e é plausível supor que os girinos tentaram compensar a diminuição do consumo de oxigênio pela liberação de eritrócitos do baço. Esse estado de estresse pode estar associado a aumento da secreção de catecolaminas, que causa policitemia devido a contração e esvaziamento parcial dos eritrócitos do baço, como relatado por Larsson (1973), Nakana e Tomlinson (1967) e Nikinmaa (2019). Neste caso o IES funcionou como um indicador indireto de contração do baço e conseqüentemente liberação de eritrócitos. Douxfils et al. (2014) relataram que após estressores como exercícios intensos ou hipóxia ambiental, o baço de peixe pode contrair para suprir o sangue com eritrócitos adicionais e que isso acontece muito rapidamente (em poucos minutos). De acordo com o estudo desse grupo de pesquisa, houve a contração do baço e o aumento do número de eritrócitos após o estresse de emersão em *Perca fluviatilis*. Esse processo faz parte dos mecanismos que objetivam melhorar a capacidade de carga de oxigênio no sangue para enfrentar o aumento da demanda de energia associada à exposição ao estressor, além de fornecer células sanguíneas para a preparação da resposta imune.

Honrubia et al. (1993) observaram degeneração do epitélio em brânquias de girinos de rã (*Rana perezi*) à exposição do inseticida ZZ-Aphox<sup>®</sup>, que cobre a seção basal das brânquias e se recuperam rapidamente. Gürkan et al. (2014) relataram deformações e fusões lamelares nas brânquias de girinos de sapo (*Pseudepidalea variabilis*) expostos ao cádmio. A causa mais importante da fusão lamelar branquial devido à exposição a poluentes é sua função como barreira para impedir a entrada de poluentes no organismo (Mallat, 1985). A vacuolização e a fusão lamelar encontradas neste estudo podem justificar a elevação do número de eritrócitos (RBC) e elevação da taxa de hemoglobina (Hb) pela falta de oxigênio e desidratação.

Rins de anfíbios desempenham funções importantes relacionadas ao metabolismo e excreção de substâncias. Lesões nesses órgãos causadas por poluentes químicos podem ter consequências negativas na desintoxicação e homeostase do animal. As fotomicrografias mostram a ação prejudicial do 2,4-D (DMA) nos rins de *L. catesbeianus* em todos os tratamentos, como no trabalho de Monteiro et al. (2018), que encontraram resultados semelhantes ao presente estudo ao expor girinos de *L. catesbeianus* ao cromo, como hipertrofia dos túbulos renais e áreas de necrose tecidual e confirmam a suscetibilidade desses animais à poluição ambiental.

A epiderme anfíbia larval desempenha várias funções cruciais, como proteção física e mecânica, defesa química, respiração e osmorregulação (Duellman e Trueb, 1994; Katz e Gabbay, 2010). Os efeitos dessas funções são refletidos nos detalhes estruturais da epiderme, que é um órgão muito dinâmico e complexo, diretamente exposto a ameaças ambientais, incluindo a exposição a xenobióticos. Um estudo das respostas epidérmicas dos anfíbios a esses fatores pode, portanto, ser considerado como uma maneira apropriada de avaliar os efeitos dos pesticidas e, assim, servir como um indicador das condições ambientais gerais. Bernarbò et al. (2013) avaliaram a epiderme de anfíbios quando expostos a pesticidas. No estudo foi observado na pele de girinos de sapo (*Bufo bufo*) maior nível de secreção mucosa, aumento dos espaços intercelulares e extensa degeneração das células epiteliais em resposta à exposição do inseticida endossulfan, mostrando claramente a ação prejudicial do praguicida na pele, o que também ocorreu em nossa experimentação nos tratamentos em que o herbicida era presente.

Concluindo, evidenciamos que o herbicida 2,4-D (DMA) não é agudamente tóxico para embriões e girinos de *L. catesbeianus*, porém há a inibição de crescimento embrionário. Entretanto, a exposição prolongada mesmo em baixas concentrações

indicou eritrocitose com possível policitemia nos girinos e consequente diminuição do baço, evidenciando estresse fisiológico e desidratação, que pode estar associado à vacuolização e fusão lamelar das brânquias. O aumento de leucócitos totais, linfócitos e neutrófilos apresentou alteração imunológica dos animais, indicando a mobilização celular para proteger o corpo contra infecções em tecidos danificados que pode ser comprovado pelos achados histopatológicos. Esse herbicida pode ser um alérgeno respiratório para girinos de *Lithobates catesbeianus*. Desta forma, recomendamos medidas de cautela para exposição prolongada de organismos aquáticos a este agente químico.

### **Conflito de Interesse**

Os autores não possuem conflitos de interesse a declarar.

### **Apoio**

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (CAPES); e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – (FAPESP) [Processo 2018/26153-1].

### **Referências**

- Agostinho, C.A., Wechsler, F.S., Nictheroy, P.E.O., Pinheiro, D.F., 2000. Indução à Ovulação pelo Uso de LHRH Análogo e Fertilização Artificial em Rã-Touro (*Rana catesbeiana*). Rev. Bras. Zootec. 29(5). <https://doi.org/10.1590/S1516-3598200000500001>.
- Agostini, M.G., Roesler, I., Bonetto, C., Ronco, A.E., Bilenca, D., 2020. Pesticides in the real world: The consequences of GMO-based intensive agriculture on native amphibians. Biol. Conserv. 241, 108355. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108355>.

- APHA, AWWA, WPCF - American Public Health Association 456 APHA., 2005. Standard methods for the examination of water and 457 wastewater. 20th ed. Washington DC.
- Aronzon, C.M., Sandoval, M.T., Herkovits, J., Pérez-Coll, C.S., 2010. Stage-dependent toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad, *Rhinella arenarum*. Environ. Toxicol. 26(4), 373–381. <https://doi.org/10.1002/tox.20564>.
- ASTM (American Society for Testing and Materials) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus (FETAX), ASTM E1439-98, Reapproved 2012. 16p.
- ASTM (American Society for Testing and Materials) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians, ASTM E729 – 96 (2014). West Conshohocken, PA, 218-238p.
- Bantle, J.A., Burton, D.T., Dawson, D.A., Dumont, J.N., Finch, R.A., Fort, D.J., Linder, G., Rayburn, J.R., Buchwalter, D., Maurice, M.A., 1994. Initial interlaboratory validation study of FETAX: phase I testing. J. Appl. Toxicol. 14(3), 213-223. <https://doi.org/10.1002/jat.2550140312>.
- Bantle, J.A., Dumont, J.N., Finch, R.A., Linder, G., 1991. Atlas of Abnormalities: A Guide for the Performance of FETAX, Oklahoma State University Publications Department, Still-water OK.
- Benli, A.Ç.K., Sarıkaya, R., Sepici-Dincel, A., Selvi, M., Şahin, D., Erkoç, F., 2007. Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) herbicide on crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823). Pestic. Biochem. Phys. 88(3), 296–299. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.01.004>.

- Bernarbò, I., Guardia, A., La Russa, D., Madeo, G., Triepi, S., Brunelli, E., 2013. Exposure and post-exposure effects of endosulfan on *Bufo bufo* tadpoles: Morphological and ultrastructural study on epidermis and iNOS localization. *Aquat. Toxicol.* 142-143, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.08.002>.
- Bruner, M.A., Shipman, P.A., Rao, M., Bantle, J.A., 2002. Developmental effects of ambient UV-B light and landfill leachate in *Rana blairi* and *Hyla chrysoscelis*. *Ecotox. Environ. Safe.* 53(1), 73-80. <https://doi.org/10.1006/eesa.2002.2248>.
- Cai, J., Zhou, M., Yang, W., Pan, Y., Lu, X., Serrano, K.G., 2018. Degradation and mechanism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) by thermally activated persulfate oxidation. *Chemosphere.* 212, 784-793. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.127>.
- Cardoso-Vera, J.D., Islas-Flores, H., SanJuan-Reyes, N., Montero-Castro, E.I., Galar-Martínez, M., García-Medina S., Elizalde-Velázquez, A., Dublán-García, O., Gómez-Oliván, L.M., 2017. Comparative study of diclofenac-induced embryotoxicity and teratogenesis in *Xenopus laevis* and *Lithobates catesbeianus*, using the frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus* (FETAX). *Sci. Total. Environ.* 574, 467-475. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.095>.
- Carvalho, C.S., Utsunomiya, H.S.M., Pasquoto, T., Lima, R., Costa, M.J., Fernandes, M.N., 2017. Blood cell responses and metallothionein in the liver, kidney and muscles of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, following exposure to different metals. *Environ. Pollut.* 221, 445–452. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.12.012>
- Cattaneo, R., Loro, V.L., Spanevello, R., Silveira, F.A., Luz, L., Miron, D.S., Fonseca, M.B., Moraes, B.S., Clasen, B., 2008. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-

- dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. *Pestic. Biochem. Phys.* 92(3), 133–137. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2008.07.004>.
- Cazalis, V., Loreau, M., Henderson, K., 2018. Do we have to choose between feeding the human population and conserving nature? Modelling the global dependence of people on ecosystem services. *Sci. Total. Environ.* 634, 1463–1474. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.360>.
- Chai, L., Chen, A., Luo, P., Zhao, H., Wang, H., 2017. Histopathological changes and lipid metabolism in the liver of *Bufo gargarizans* tadpoles exposed to Triclosan. *Chemosphere.* 182, 255–266. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.040>.
- Chesnokova, L.A., Mikhaylova I.V., Voronkova, I.P., Karmanova, D.S., 2016. Experimental evaluation of the impact of low doses of the herbicide 2,4-D in drinking water on some indices of lipid and immune status. *Gigiena i sanitaria.* 95(5), 450-454.
- Clauss, T.M.; Dove, A.D.; Arnold J.E., 2008. Hematologic disorders of fish. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 11, 445–462. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2008.03.007>.
- Coady, K., Marino, T., Thomas, J., Sosinski, L., Neal, B., Hammond, L., 2013. An evaluation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in the Amphibian Metamorphosis Assay and the Fish Short-Term Reproduction Assay. *Ecotox. Environ. Safe.* 90, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.12.025>.
- Cooke, A.S., 1972. The effects of DDT, dieldrin and 2,4-D on amphibian spawn and tadpoles. *Environ. Pollut.* 3(1), 51–68.
- Cribb, A.Y.; Fonso, A.M.; Ferreira, C.M. Manual Técnico de Ranicultura. Brasília: Embrapa/Instituto de Pesca de São Paulo/UFPR, 2014. 73p. Disponível em

<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/160735/1/Manual-Ranicultura-Versao-Final-com-capa.pdf>.

Curi, L., Peltzer, P., Sandoval, M., Lajmanovich, R., 2019. Acute Toxicity and Sublethal Effects Caused by a Commercial Herbicide Formulated with 2,4-D on *Physalaemus albonotatus* Tadpoles. *Water. Air. Soil. Pollut.* 230(1), 1-15. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-4073-x>.

DeGruchy, G.S., 1989. Clinical haematology in medical practice. In: Chesterman FF, Pemington D, Rush B (eds) *Haematology: principles and procedures*. CBS Publishers, New Delhi. 392p.

Douxflis, J., Lambert, S., Mathieu, C., Milla, S., Mandiki, S.N.M., Henrotte, E., Wang, N., Dieu, M., Raes, M., Rougeot, C., Kestemont, P., 2014. Influence of domestication process on immune response to repeated emersion stressors in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.). *Comp. Biochem. Phys. A.* 173, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.03.012>.

Duellman, W.E., Trueb, L., 1994. *Biology of Amphibians*. Johns Hopkins University, London. Ernst, W.R., Jonah, P., Doe, K., Julien, G., Hennigar, P., 1991. Toxicity to aquatic organisms of offtarget deposition of endosulfan applied by aircraft. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 103-114.

EPA – United States Environmental Protection Agency., 2005. Reregistration Eligibility Decision for 2,4-D. <[https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/24d\\_red.pdf](https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/24d_red.pdf)>

Fort, D.J., Rogers, R.L., Thomas, J.H., Hopkins, W.A., Schlekat, C., 2006. Comparative Developmental Toxicity of Nickel to *Gastrophryne carolinensis*, *Bufo terrestris*, and *Xenopus laevis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51(4), 703–710. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-0217-2>.

- Fort, D.J.; Stover, E.L.; Bantle, J.A.; Rayburn, J.R.; Hull, M.A.; Finch, R.A.; Burton, D.T.; Turley, S.D.; Dawson, D.A.; Linder, G.; Buchwalter, D.; Dumont, J.N.; Kumsher-King, M.; Gaudet-Hull, A.M. 1998. Phase III Interlaboratory Study of Fetax, Part 2: Interlaboratory Validation of an Exogenous Metabolic Activation System for Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (Fetax). *Drug and Chemical Toxicology*, 21(1), 1–14. <https://doi.org/10.3109/01480549809017846>.
- Freitas, J.S., Giroto, L., Goulart, B.V., Alho, L. de O.G., Gebara, R.C., Montagner, C.C., Schiesari, L., Espíndola, E.L.G., 2019. Effects of 2,4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. *Ecotox. Environ. Safe.* 182, 109446. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109446>.
- Fukuyama, T., Tajima, Y., Ueda, H., Hayashi, K., Shutoh, Y., Harada, T., Kosaka, T., 2009. Allergic reaction induced by dermal and/or respiratory exposure to low-dose phenoxyacetic acid, organophosphorus, and carbamate pesticides. *Toxicology*. 261(3), 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.05.014>.
- Gaaied, S., Oliveira, M., Domingues, I., Banni, M., 2019. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid herbicide effects on zebrafish larvae: development, neurotransmission and behavior as sensitive endpoints. *Environ Sci Pollut Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04488-5>.
- GHS, 2011. Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals. United Nations, New York. Acessível em [https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev04/English/ST-SG-AC10-30-Rev4e.pdf](https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/English/ST-SG-AC10-30-Rev4e.pdf).
- Gosner, K.L., 1960. A simplified table for standing anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*. 16, 183-90.



- Grant, E.H.C., Muths, E., Schmidt, B.R., Petrovan, S.O., 2019. Amphibian conservation in the Anthropocene. *Biol. Conserv.* 236, 543-547. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.03.003>.
- Gürkan, M., Çetin, A., Hayretdağ, S., 2014. Acute Toxic Effects of Cadmium in Larvae of the Green Toad, *Pseudepidalea variabilis* (Pallas, 1769) (Amphibia: Anura). *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 65(3), 301–309. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-65-2014-2522>.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R.V., 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11(7), 714-719. <https://doi.org/10.1021/es60130a004>.
- Hampshire, V.A., Gilbert, S.H. 2018. Refinement, Reduction, and Replacement (3R) Strategies in Preclinical Testing of Medical Devices. *Toxicol. Pathol.* 019262331879728. <https://doi.org/10.1177%2F0192623318797289>
- Holcombe, G.W., Benoit, D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N., Johnson, R.D., 1995. Acute and Long-Term Effects of Nine Chemicals on the Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *Arch. Environ. Contain. Toxicol.* 28, 287-297. <https://doi.org/10.1007/BF00213104>.
- Honrubia, M.P., Herráez, M.P., Alvarez, R., 1993. The carbamate insecticide ZZ-Aphox® induced structural changes of gills, liver, gall-bladder, heart, and notochord of *Rana perezi* tadpoles. *Arch. Environ. Contain. Toxicol.* 25(2). <https://doi.org/10.1007/bf00212129>.
- Hrubec, T.C., Smith, S.A., 1998. Hematology of fish. In: Feldman. B.F.; Zinkl, J.G.; Jain, N.C. Schalm's Veterinary Hematology.5.ed. Sydney: W.W. Lippincott, p. 1120-1125.

- Hu, L., Wu, L., Xue, Y., Zhu, J., Shi, H., 2016. An assay to determine the sensitive window of embryos to chemical exposure using *Xenopus tropicalis*. J. Appl. Toxicol. 36, 685-691. <https://doi.org/10.1002/jat.3200>.
- IARC, 2018. DDT, Lindane, and 2,4-D / International Agency for Research on Cancer Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Vol 113. Lyon, France. [https://publications.iarc.fr/\\_publications/media/download/5170/308b6654a2abecf64f2d8856fc4a85bbd97f00e8.pdf](https://publications.iarc.fr/_publications/media/download/5170/308b6654a2abecf64f2d8856fc4a85bbd97f00e8.pdf).
- Jain, N.C., 1993. Evaluation of anemias and polycythemias. p 159–168. In: Jain NC, editor. Essentials of veterinary hematology. Ames (IA): Wiley-Blackwell.
- Katz, U., Gabbay, S., 2010. Mitochondria-rich cells in amphibian skin epithelium: Relationship of immuno- and peanut lectin labeling pattern and transport functions. Acta Histochem. 112, 345-54. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2009.02.006>.
- Kubrak, O.I., Atamaniuk, T.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2013. Goldfish can recover after short-term exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetate: Use of blood parameters as vital biomarkers. Comp. Biochem. Phys. C. Toxicol. Pharmacol. 157(3), 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.12.005>.
- Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Simoniello, M.F., Poletta, G.L., Junges, C.M., Peltzer, P.M., Grenón, P. Cabagna-Zenklusen, M.C., 2015. Harmful Effects of the Dermal Intake of Commercial Formulations Containing Chlorpyrifos, 2,4-D, and Glyphosate on the Common Toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). Water. Air. Soil. Pollut. 226(12). <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2695-9>.
- Lal, B., Singh, A., Kumari, A., Sinha, N., 1986. Biochemical and haematological changes following malathion treatment in the freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). Environ. Pollut. Ser. A. Ecol. Biol. 42(2), 151–156. [https://doi.org/10.1016/0143-1471\(86\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0143-1471(86)90004-8).

- Larsson, A., 1973. Metabolic effects of epinephrine and norepinephrine in the eel *Anguilla anguilla*. Gen. Comp. Endocrinol. 20, 155-67. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(73\)90141-x](https://doi.org/10.1016/0016-6480(73)90141-x).
- LeClere, S., Wu, C., Westra, P., Sammons, R.D., 2018. Cross-resistance to dicamba, 2,4-D, and fluroxypyr in *Kochia scoparia* is endowed by a mutation in na AUX/IAA gene. PNAS [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1712372115//DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1712372115//DCSupplemental).
- Lenkowski, J.R., McLaughlin, K.A., 2010a. Acute atrazine exposure disrupts matrix metalloproteinases and retinoid signaling during organ morphogenesis in *Xenopus laevis*. J. Appl. Toxicol. 30(6), 582–589. <https://doi.org/10.1002/jat.1529>.
- Lenkowski, J.R., Sanchez-Bravo, G., McLaughlin, K.A., 2010b. Low concentrations of atrazine, glyphosate, 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid, and triadimefon exposures have diverse effects on *Xenopus laevis* organ morphogenesis. Int. J. Environ. Sci. 22(9), 1305–1308. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60254-0](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60254-0).
- Li, S., Li, M., Gui, W., Wang, Q., Zhu, G., 2017. Disrupting effects of azocyclotin to the hypothalamo-pituitary-gonadal axis and reproduction of *Xenopus laevis*. Aquat. Toxicol. 185, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.02.010>.
- Malaj, E., Liber, K., Morrissey, C.A., 2019. Spatial distribution of agricultural pesticide use and predicted wetland exposure in the Canadian Prairie Pothole Region. Sci. Total. Environ. 134765. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134765>.
- Mallat, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42, 630-648. <https://doi.org/10.1139/f85-083>.
- Martínez-Ruiz, E.B., Martínez-Jerónimo, F., 2018. Exposure to the herbicide 2,4-D produces different toxic effects in two different phytoplankters: A green microalga

- (*Ankistrodesmus falcatus*) and a toxigenic cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*). *Sci. Total. Environ.* 619–620, 1566-1578. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.145>.
- Mesak, C., Mendes, B.O., Ferreira, R.O., Malafaia, G., 2018. Mutagenic assessment of *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to the 2,4-D herbicide in a simulated realistic scenario. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25(15), 15235-15244. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1979-1>.
- Monteiro, J.A. do N., Cunha, L.A. da, Costa, M.H.P. da, Reis, H.S. dos, Aguiar, A.C. da S., Oliveira-Bahia, V.R.L., Burbano, R.M.R., Rocha, C.A.M. d., 2018. Mutagenic and histopathological effects of hexavalent chromium in tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura, Ranidae). *Ecotox. Environ. Safe.* 163, 400–407. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.083>.
- Morgan, M.K., Scheuerman, P.R., Bishop, C.S., Pyles, R.A., 1996. Teratogenic potential of atrazine and 2,4-D using FETAX. *J. Toxicol. Env. Heal.* 48(2), 151-168. <https://doi.org/10.1080/009841096161401>.
- Munro, I.C., Carlo, G.L., Orr, J.C., Sund, K.G., Wilson, R.M., Kennepohl, E., Lynch, B.S., Jablinske, M., Lee, N.L., 1992. A Comprehensive, Integrated Review and Evaluation of the Scientific Evidence Relating to the Safety of the Herbicide 2,4-D. *J. Am. Coll. Toxicol.* 11(5), 559-664. <https://doi.org/10.3109%2F10915819209141893>.
- Nakana, T., Tomlinson, N., 1967. Catecholamines and carbohydrates concentrations in rainbow trout *Salmo gairdneri* in relation to physical disturbances. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 24, 1701-15. <https://doi.org/10.1139/f67-140>.
- Nieuwkoop, P.D., Faber, J., 1975. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin), North Holland, Amsterdam.

- Nikinmaa, M., 2019. Environmental regulation of the function of circulating erythrocytes via changes in age distribution in teleost fish: Possible mechanisms and significance. *Marine Genomics*, 100717. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2019.100717>.
- Peterson, M.A., Collavo, A., Ovejero, R., Shivrain, V., JWalsh, M.I., 2018. The challenge of herbicide resistance around the world: a current summary. *Pest. Manag. Sci.* 74, 2246–2259. <https://doi.org/10.1002/ps.4821>.
- Quentel, C., Obach, A., 1992. The cellular composition of the blood and haematopoietic organs of turbot *Scophthalmus maximus* L. *J. Fish. Biol.* Blackwell Publishing Inc., United Kingdom. 41(5), 709-716. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1992.tb02700.x>.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavares-Dias, M. Egami, M.I., 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. Maringá: Eduem. 140p. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012001300016>.
- Ruiz de Arcaute, C., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2016. Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Ecotox. Environ. Safe.* 128, 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.027>.
- Rutten, A.A., Falke, H.E., Catsburg, J.F., Wortelboer, H.M., Blaauboer, B.J., Doorn, L., van Leeuwen, F.X., Theelen, R., Rietjens, I.M., 1992. Interlaboratory comparison of microsomal ethoxyresorufin and pentoxyresorufin O-dealkylation determination. Standardization of assay conditions. *Arch. Toxicol.* 66, 237–244. <https://doi.org/10.1007/bf02307168>.

- Sacerdote, A.B., King, R.B., 2014. Direct Effects of an Invasive European Buckthorn Metabolite on Embryo Survival and Development in *Xenopus laevis* and *Pseudacris triseriata*. *J. Herpetol.* 48(1), 51–58. <https://doi.org/10.1670/12-066>.
- Sai, L., Dong, Z., Li, L., Guo, Q., Jia, Q., Xie, L., Bo, C., Liu, Y., Qu, B., Li, X., Shao, H., Ng, J.C., Peng, C., 2016a. Gene expression profiles in testis of developing male *Xenopus laevis* damaged by chronic exposure of atrazine. *Chemosphere.* 159, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.008>.
- Sai, L., Qu, B., Li, Y., Jia, Q., Bo, C., Liu, Y., Yu, G., Xie, L., Li, L., Ng, J.C., Peng, C., 2016b. Continued Studies on the Effects of Simazine on the Liver Histological Structure and Metamorphosis in the Developing *Xenopus laevis*. *B. Environ. Contam. Tox.* 97(4), 517–520. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1897-1>.
- Singh, N.N., Srivastava, A.K., 2010. Haematological parameters as bioindicators of insecticide exposure in teleosts. *Ecotoxicology.* 19(5), 838–854. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0465-4>.
- Slaby, S., Marin, M., Marchand, G., Lemiere, S., 2019. Exposures to chemical contaminants: What can we learn from reproduction and development endpoints in the amphibian toxicology literature? *Environ. Pollut.* 248, 478-495. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.014>.
- Teh, S.J., Adams, S.M., Hinton, D.E., 1997. Histopathological biomarkers in feral Fresh water fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquat. Toxicol.* 37, 51–70.
- Turner, R.J., 1988. Amphibians. In: Rowley, A.F., Ratcliffe, N.N.A. *Vertebrate Blood Cells*, New York. Cambridge University Press, pp. 129-209.
- U.S. Environmental Protection Agency, 2017. Pesticides Industry Sales and Usage. 2008–2012 Market Estimates. Washington. Disponível em <https://>

[www.epa.gov/sites/production/files/2017-01/documents/pesticides-industry-sales-usage-2016\\_0.pdf](http://www.epa.gov/sites/production/files/2017-01/documents/pesticides-industry-sales-usage-2016_0.pdf)

Vismara, C., Caloni, F., 2007. Evaluation of aflatoxin B1 embryotoxicity using the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus and bio-activation with microsome activation systems. *Birth. Defects. Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* 80(3), 183–187. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20113>

Walters, J., 2011. Environmental Fate of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. Environmental Monitoring and Pest Management, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA, USA.

Zar, J.H., 1999. *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice Hall. 946p.

[dataset] Maggi, F., Tang, F.H.M., la Cecilia, D., McBratney, A., 2019. PEST-CHEMGRIDS, global gridded maps of the top 20 crop-specific pesticide application rates from 2015 to 2025. *Scientific Data*, v6, 170. <http://doi.org/10.1038/s41597-019-0169-4>.

ANVISA, 2020. Reavaliação Toxicológica. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/agrotoxico-2-4-d-passa-a-ter-restricoes-na-aplicacao-219201/pop\\_up?\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_viewMode=print&\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_languageId=pt\\_BR](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/agrotoxico-2-4-d-passa-a-ter-restricoes-na-aplicacao-219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=pt_BR)>. Acesso em: 30 mai. 2020.

Wagner, S., Bell, J., Biyikal, M., Gawlitza, K., Rurack, K., 2018. Integrating fluorescent molecularly imprinted polymer (MIP) sensor particles with a modular microfluidic platform for nanomolar small-molecule detection directly in aqueous samples. *Biosens. Bioelectron.* 99, 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.07.053>.

Amiri, M.J., Bahrami, M., Beigzadeh, B., Gil, A., 2018. A response surface methodology for optimization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid removal from

- synthetic and drainage water: a comparative study. *Environ. Sci. Pollut. Res.*  
<https://doi.org/10.1007/s11356-018-3327-x>.
- Munira, S., Farenhorst, A., Sapkota, K., Nilsson, D., Sheedy, C., 2018. Auxin Herbicides and Pesticide Mixtures in Groundwater of a Canadian Prairie Province. *J. Environ. Qual.* 47(6), 1462. <https://doi.org/10.2134/jeq2018.05.0202>.
- Félix-Cañedo, T.E., Durán-Álvarez, J.C., Jiménez-Cisneros, B., 2013. The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources. *Sci. Total. Environ.* 454-455, 109–18.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.088>.
- WHO, 2003. 2,4-D in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Report No. WHO/SDE/WSH/03.04/70. Geneva: World Health Organization.  
[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/24D.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/24D.pdf).
- Su, L., Sivey, J.D., Dai, N. 2018. Emerging investigator series: sunlight photolysis of 2,4-D herbicides in systems simulating leaf surfaces. *Environ. Sci. Process. Impacts.* 20(8), 1123–1135. <https://doi.org/10.1039/c8em00186c>.
- De Castro Marcato, A.C., de Souza, C.P., Fontanetti, C.S., 2017. Herbicide 2,4-D: A Review of Toxicity on Non-Target Organisms. *Water. Air. Soil. Pollut.* 228(3).  
<https://doi.org/10.1007/s11270-017-3301-0>.
- Rocha, D.R., Nery, J.F., Furini, L.N., Constantino, C.J.L., Eller, L.K.W., Nai, G.A., Nakagaki, W.R., 2020. Effects of consumption of contaminated feed with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on the rat tibia: analysis by Raman spectroscopy and mechanical properties. *Laser. Med. Sci.*  
<https://doi.org/10.1007/s10103-020-02961-z>.



- Leão, M.B., Gonçalves, D.F., Miranda, G.M., da Paixão, G.M.X., Dalla Corte, C.L., 2019. Toxicological evaluation of the herbicide Palace® in *Drosophila melanogaster*. J. Toxicol. Env. Heal. A. 82(22), 1172–1185. <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1709109>.
- Es Ruiz de Arcaute, C., Ossana, N.A., Pérez-Iglesias, J.M., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2019. Auxinic herbicides induce oxidative stress on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae). Environ. Sci. Pollut. Res. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05169-z>.
- Moutinho, M.F., de Almeida, E.A., Espíndola, E.L.G., Daam, M.A., Schiesari, L., 2020. Herbicides employed in sugarcane plantations have lethal and sublethal effects to larval *Boana pardalis* (Amphibia, Hylidae). Ecotoxicology. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02226-z>.
- CONCEA, 2016. Resolução Normativa (26/09/2016) – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Dispõe sobre o reconhecimento no país de métodos alternativos validados que tenham por finalidade a redução, a substituição ou o refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa. Disponível em: <<http://www.invitare.com.br/arq/ceua/Arquivo-3-normativas-concea-2016.pdf>>.
- Acesso em: 30 mai. 2020.