

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**MAYARA BITENCOURT LEÃO**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DOS HERBICIDAS 2,4-D E  
PICLORAM SOBRE PARÂMETROS DE TOXICIDADE EM *Drosophila*  
*melanogaster***

**Caçapava do Sul**

**2017**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo (a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

L433a Leão, Mayara Bitencourt  
Avaliação dos efeitos da associação dos herbicidas  
2,4-D e picloram sobre parâmetros de toxicidade em  
Drosophila melanogaster / Mayara Bitencourt Leão.  
75 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Pampa, ENGENHARIA AMBIENTAL E  
SANITÁRIA, 2017.  
"Orientação: Cristiane Lenz Dalla Corte".

1. Pesticidas. 2. Auxinas. 3. Drosophila  
melanogaster. 4. Acetilcolinesterase. 5. Estresse  
Oxidativo. I. Título.

**MAYARA BITENCOURT LEÃO**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DOS HERBICIDAS 2,4-D E  
PICLORAM SOBRE PARÂMETROS DE TOXICIDADE EM *Drosophila  
melanogaster***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Cristiane Lenz Dalla Corte

**Caçapava do Sul  
2017**



MAYARA BITENCOURT LEÃO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DOS HERBICIDAS 2,4-D E  
PICLORAM SOBRE PARÂMETROS DE TOXICIDADE EM *Drosophila*  
*melanogaster*

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Engenharia  
Ambiental e Sanitária da Universidade  
Federal do Pampa, como requisito parcial  
para obtenção do Título de Bacharel em  
Engenharia Ambiental e Sanitária.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 27 de novembro de 2017.

Banca examinadora:



---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Cristiane Lenz Dalla Corte - Orientadora  
UNIPAMPA



---

Prof. Dr. Thiago Henrique Lugokenski  
UNIPAMPA



---

Me. Débora Farina Gonçalves  
UFSM



*“Se procurar bem, você acaba encontrando  
não a explicação (duvidosa) da vida,  
mas a poesia (inexplicável) da vida.”*

*(Carlos Drummond de Andrade)*



À minha mãe, por fazer dos meus sonhos os  
seus,

Dedico este trabalho.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais, Edila e José, os quais ensinaram-me desde as primeiras letras até os mais importantes valores;

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristiane Dalla Corte, pela paciência, por todo o conhecimento compartilhado e por, em todos os momentos, fazer o possível e o impossível para que esse trabalho fosse concluído;

À Gabriela, por toda a ajuda prestada durante os experimentos e pela incrível amizade. Tua companhia tornou esta caminhada mais leve;

Ao Paulo por todas as conversas e reflexões sobre as nossas mosquinhas. Obrigada por ser esse amigo com quem posso sempre contar;

À Bruna, pela forte amizade construída durante o curso. Agradeço por sempre estar ao meu lado;

À Kelly e à Milene, que além de grandes companheiras de estudos, foram amigas e parceiras em todos os momentos;

Aos demais colegas, Ary, Danrlei, Jádía, João Victor e Luana, pela amizade construída durante o curso;

Aos professores, por todo o conhecimento transferido;

À todos que, direta ou indiretamente, auxiliaram na execução desse trabalho;

À Universidade Federal do Pampa.



## RESUMO

Os pesticidas são substâncias amplamente utilizadas na agropecuária e frequentemente são responsáveis por problemas ambientais, intoxicações humanas e de animais. O 2,4-D é um herbicida que apresenta persistência moderada nos solos e potencial de contaminação de águas subterrâneas. O Picloram é o composto ativo de herbicidas reguladores de crescimento que age de maneira similar ao 2,4-D. A mosca da fruta, *D. melanogaster*, provou ser uma útil ferramenta para avaliar o impacto dos estresses ambientais nas populações, pois possui estruturas que desempenham as funções equivalentes às dos mamíferos, contribuindo assim como modelo para estudos de desenvolvimento, comportamento e doenças humanas. Desta forma, a exposição de *D. melanogaster* e células de mamíferos à pesticidas pode resultar em alterações bioquímicas similares, indicando que a mosca da fruta pode ser considerada um bom modelo para o estudo toxicológico. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a toxicidade dos herbicidas 2,4 – D e Picloram de maneira associada na mosca da fruta, *D. melanogaster*. Para a realização deste trabalho, utilizou-se a mistura comercial de 2,4 – D e picloram com as concentrações de 114,76 g/L de picloram e 447,22 g/L de 2,4-D. Para o estudo do desenvolvimento e da sobrevivência, montou-se curvas com diferentes concentrações dos herbicidas paralelos a um grupo controle sem adição de herbicidas. Moscas fêmeas e machos foram analisadas separadamente. Além da sobrevivência, foi analisado o comportamento locomotor (teste de escalada) bem como a atividade da enzima acetilcolinesterase, a produção de espécies reativas de oxigênio, os níveis de tióis total e não proteico e a atividade antioxidante total do composto. Os resultados obtidos demonstram que a exposição de ovos e larvas de *D. melanogaster* à associação dos herbicidas em estudo não afeta o desenvolvimento dos indivíduos significativamente. A exposição de indivíduos adultos ocasionou mortalidade progressiva de maneira dose-dependente. Quanto ao teste comportamental, a co-exposição aos herbicidas levou a uma redução significativa na locomoção quando comparado ao grupo controle e, assim como na análise da mortalidade, os indivíduos machos foram mais afetados pelos efeitos tóxicos dos herbicidas em estudo. Quanto à avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase, os resultados mostram que a associação destes herbicidas causou um aumento da atividade da enzima em machos de *D. melanogaster*. Na avaliação dos efeitos sobre os níveis de tióis, enquanto houve uma diminuição nos níveis de tiol não proteico com o aumento da concentração dos herbicidas, os níveis de tiol total não foram afetados de maneira uniforme. A produção de espécies reativas de oxigênio foi diminuída em amostras de cabeças e aumentada em amostras de corpos de *D. melanogaster*. Na avaliação da atividade antioxidante total do composto, obteve-se que o mesmo possui atividade antioxidante em todas as diluições testadas com uma atividade antioxidante total de 130,7% para a diluição 1/10. A partir da análise dos resultados obtidos, pode-se observar que a associação dos herbicidas 2,4 – D e picloram provavelmente causa efeitos tóxicos em *D. melanogaster*.

**Palavras chave:** Pesticidas. Auxinas. Acetilcolinesterase. Estresse Oxidativo.



## ABSTRACT

Pesticides are substances widely used in agriculture and are often responsible for environmental problems, human and animal intoxication. 2,4-D is a herbicide that exhibits moderate persistence in soils and the potential for contamination of groundwater. Picloram is the active ingredient of growth regulating herbicides that act similarly to 2,4-D. The fruit fly, *D. melanogaster*, has proved to be a tool to evaluate the impact of environmental stresses, since it has structures that perform functions equivalent to those of mammals, contributing as a model for studies of development, behavior and human diseases. Thus, exposure of *D. melanogaster* and mammalian cells to pesticides may result in similar biochemistry alterations, indicating that the fruit fly can be considered a model for the study of pesticide toxicity. Therefore, the present work aims to evaluate the toxicity of the herbicides 2,4 - D and Picloram in association in the fruit fly, *D. melanogaster*. It was used a commercial mixture of 2,4 - D and picloram with concentrations of 114.76 g / L picloram and 447.22 g / L 2,4 - D. For the study of development and survival, curves with different concentrations of herbicides parallel to a control group were set up without addition of herbicides. Female and male flies were analyzed separately. In addition to survival, the locomotor behavior, acetylcholinesterase activity, production of reactive oxygen species, levels of total and non-protein thiols, and total antioxidant activity of the compound were analyzed. The results obtained demonstrate that an exposure of eggs and larvae of *D. melanogaster* to the herbicide under study does not affect the development significantly. Exposure of adult subjects caused progressive mortality in a dose-dependent manner. Regarding the behavioral test, co-exposure to herbicides led to a significant reduction in locomotion when compared to the control group and, as in the mortality analysis, male subjects were more affected by the toxic effects of the herbicides under study. Regarding the acetylcholinesterase activity, the results show that the association of the herbicides caused significant increase in enzyme activity in males of *D. melanogaster*. Considering the effects on thiol levels, while there was a decrease in non-protein thiol levels with increased herbicide concentration, total thiol levels were not uniformly affected. The production of reactive oxygen species was decreased in the heads and increased in the bodies of *D. melanogaster*. For the total antioxidant activity, it was observed that the herbicide has antioxidant activity in all dilutions tested with a total antioxidant activity of 130.7% for the dilution 1/10. From the analysis of the results, it is possible to conclude that the association of the herbicides 2,4-D and picloram cause remarkable toxic effects in *D. melanogaster*.

**Keywords:** Pesticides. Auxins. Acetylcholinesterase. Oxidative Stress.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processos e transformações que regulam a persistência, o destino e os impactos potenciais dos xenobióticos. ....	29
Figura 2 – Fórmula estrutural do herbicida picloram. ....	36
Figura 3 – Fórmula estrutural do herbicida 2,4 – D. ....	37
Figura 4 – <i>Drosophila melanogaster</i> adulto, aspecto dorsal, vista superior. À esquerda um indivíduo macho, à direita fêmea.....	45
Figura 5 - Efeito da exposição aos herbicidas 2,4-D e picloram sobre a sobrevivência de <i>D. melanogaster</i> em fêmeas e machos, com n = 5. Resultados expressos como média ± erro padrão. *Diferença estatística em relação ao grupo controle, em 24h, por ANOVA de 1 via seguido de teste pos hoc de Tukey (p<0,05). # Diferença estatística em relação ao grupo controle, em 48h, por ANOVA de 1 via seguido de teste pos hoc de Tukey (p<0,05). + Diferença estatística em relação ao grupo controle, em 72h, por ANOVA de 1 via seguido de teste pos hoc de Tukey (p<0,05). ....	53
Figura 6 - Efeito da exposição aos herbicidas 2,4-D e picloram sobre o comportamento de escalada em moscas fêmeas e machos, com n = 17. Resultados expressos como média ± erro padrão. * Diferença estatística em relação ao grupo controle por ANOVA de 1 via seguido de teste pos hoc de Tukey (p<0,05).....	54
Figura 7 - Efeito da exposição aos herbicidas 2,4-D e picloram sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em corpos e cabeças de <i>D. melanogaster</i> , com n = 5. Resultados apresentados separadamente para indivíduos machos e fêmeas e expressos como média ± erro padrão. * Diferença estatística em relação ao grupo controle por teste t (p<0,05). ....	55
Figura 8 - Efeitos da exposição de <i>D. melanogaster</i> aos herbicidas 2,4-D e picloram sobre os níveis de tiol total em corpos e cabeças. Resultados apresentados separadamente para indivíduos machos e fêmeas e expressos como média ± erro padrão, com n = 6. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste pos hoc de Tukey (p<0,05). ....	57
Figura 9 - Efeitos da exposição de <i>D. melanogaster</i> aos herbicidas 2,4-D e picloram sobre os níveis de tiol não proteico. Resultados apresentados separadamente para indivíduos machos e fêmeas e expressos como média ± erro padrão, com n = 6. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste pos hoc de Tukey (p<0,05). ....	58

Figura 10 - Efeito da exposição aos herbicidas 2,4-D e picloram sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em corpos e cabeças de *D. melanogaster*, com  $n = 5$ . Resultados apresentados separadamente para indivíduos machos e fêmeas e expressos como média  $\pm$  erro padrão. \* Diferença estatística em relação ao grupo controle por teste t ( $p < 0,05$ )..... 59

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Diferentes concentrações de herbicidas que foram utilizadas no estudo do desenvolvimento de <i>D. melanogaster</i> . .....	47
Tabela 2 - Diferentes concentrações de herbicidas que foram utilizadas no estudo da sobrevivência. ....	48
Tabela 3 - Efeito da exposição de ovos aos herbicidas 2,4-D e picloram sobre o desenvolvimento de <i>D. melanogaster</i> . Resultados expressos como média ± erro padrão, com n = 4. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste pos hoc de Tukey (p<0,05). ....	51
Tabela 4 - Efeito da exposição de larvas aos herbicidas 2,4-D e picloram sobre o desenvolvimento de <i>D. melanogaster</i> . Resultados expressos como média ± erro padrão, com n = 5. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste pos hoc de Tukey (p<0,05). ....	52
Tabela 5 -Capacidade antioxidante total (%) para diferentes concentrações de 2,4-D e picloram, quantificadas pelo método do complexo de fosfomolibdênio. A porcentagem foi calculada usando BHT 1000 µM como 100%. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão para três diferentes ensaios.....	60



**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Ach – Acetilcolina

AchE – Acetilcolinesterase

AAT – Atividade Antioxidante Total

AIA – Ácido indol acético

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHT – 3,5-Di-tert-4-butilhidroxitolueno

CE<sub>50</sub> – Concentração Efetiva Mediana

CIT/RS – Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul

CL<sub>50</sub> – Concentração Letal Mediana

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DE<sub>50</sub> – Dose Efetiva Mediana

DL<sub>50</sub> – Dose Letal Mediana

DTNB – Ácido 5,5' – ditio – bis – (2 – nitrobenzóico)

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

GSH – Glutationa Reduzida

GSSG – Glutationa Oxidada

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INCA – Instituto Nacional de Câncer

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MMA – Ministério do Meio Ambiente

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

SEAB – Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Paraná

SDA – Secretaria de Defesa Agropecuária

SNC – Sistema Nervoso Central

TFK – Tampão Fosfato de Potássio

Tris – Tris – hidroximetilaminometano

WSSA – Weed Science Society of America



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>24</b>
2.1	Objetivo geral .....	24
2.2	Objetivos específicos .....	25
2.3	Justificativa .....	25
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>26</b>
3.1	<b>Agrotóxicos .....</b>	<b>26</b>
3.1.1	<i>Histórico .....</i>	<i>26</i>
3.1.2	<i>Legislação.....</i>	<i>27</i>
3.1.3	<i>Comportamento e impactos ambientais.....</i>	<i>28</i>
3.1.4	<i>Degradação.....</i>	<i>31</i>
3.2	<b>Classes de agrotóxicos .....</b>	<b>32</b>
3.2.1	<i>Inseticidas .....</i>	<i>32</i>
3.2.2	<i>Fungicidas.....</i>	<i>32</i>
3.2.3	<i>Herbicidas .....</i>	<i>33</i>
3.3	<b>Herbicidas auxínicos .....</b>	<b>34</b>
3.3.1	<i>Picloram .....</i>	<i>35</i>
3.3.2	<i>2,4 – D.....</i>	<i>37</i>
3.3.3	<i>Picloram + 2,4 - D .....</i>	<i>39</i>
3.4	<b>Avaliação da toxicidade.....</b>	<b>41</b>
3.4.1	<i>Atividade da enzima acetilcolinesterase.....</i>	<i>42</i>
3.4.2	<i>Estresse oxidativo .....</i>	<i>43</i>
3.4.2.1	<i>Antioxidantes endógenos .....</i>	<i>43</i>
3.5	<b><i>Drosophila melanogaster</i> .....</b>	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>46</b>
4.1	<b>Reagentes .....</b>	<b>46</b>
4.2	<b>Manutenção dos organismos-teste .....</b>	<b>46</b>
4.3	<b>Desenvolvimento de <i>D. melanogaster</i>.....</b>	<b>47</b>
4.4	<b>Estudo da sobrevivência .....</b>	<b>48</b>
4.5	<b>Análise da habilidade locomotora: geotaxia negativa .....</b>	<b>48</b>
4.6	<b>Atividade da enzima acetilcolinesterase.....</b>	<b>48</b>
4.7	<b>Níveis de tióis .....</b>	<b>49</b>
4.7.1	<i>Tiol total.....</i>	<i>49</i>

4.7.2	<i>Tiol não-proteico</i> .....	49
4.8	Avaliação da produção de EROs.....	50
4.9	Atividade antioxidante total.....	50
4.10	Quantificação de proteínas.....	51
4.11	Análise estatística .....	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
5.1	Desenvolvimento de <i>D. melanogaster</i> .....	51
5.2	Estudo da sobrevivência.....	52
5.3	Análise da habilidade locomotora: geotaxia negativa .....	53
5.4	Atividade da enzima acetilcolinesterase .....	54
5.5	Níveis de tióis.....	56
5.5.1	<i>Tiol total</i> .....	57
5.5.2	<i>Tiol não proteico</i> .....	58
5.6	Avaliação da produção de EROs.....	59
5.7	Atividade antioxidante total.....	60
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	60
	REFERÊNCIAS.....	62

## 1 INTRODUÇÃO

Os compostos praguicidas são substâncias amplamente utilizadas na agropecuária e frequentemente são responsáveis por problemas ambientais (MCLEAY e HALL, 1999; WERNER et al., 2000), intoxicações humanas e de animais (ZWIENER e GINSBURG, 1988; FERRER e CABRAL, 1991; HAYES JUNIOR, 1975). Além de afetar a qualidade do ar, do solo, das águas superficiais e subterrâneas, os pesticidas podem causar problemas à saúde do homem pela exposição direta, através do manuseio dos produtos, ou indireta, representada pelos resíduos contidos em alimentos e água (LIMA et al., 2007).

No meio ambiente, as moléculas de agrotóxicos podem seguir diferentes rotas, atingindo diferentes ecossistemas e interferindo na dinâmica de diversos seres vivos. Desta forma, a contaminação de um organismo representante de um nível trófico mais baixo da cadeia alimentar, muito provavelmente causará impactos negativos em organismos pertencentes a níveis tróficos mais elevados, em virtude do efeito residual das moléculas xenobióticas ingeridas (STEFFEN et al., 2011). Neste caso, os últimos níveis da cadeia alimentar poderão apresentar maior quantidade de produto tóxico no organismo (COSTA et al., 2004). Independentemente da forma de aplicação, no momento em que a molécula de um agrotóxico é aplicada no ambiente, na maior parte dos casos, atinge o solo (LAVORENTI, 2003).

O ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) é um herbicida que controla essencialmente ervas de folhas largas anuais e algumas perenes, em culturas de cereais, cana-de-açúcar e pastagens, entre outras. Segundo Rodrigues e De Almeida (1998), por ser muito volátil, quando aplicado em períodos de ventos seus vapores podem atingir quilômetros de distância, causando contaminação atmosférica. De acordo com Amarante Junior et al. (2002) e D'Antonino et al. (2009), este herbicida apresenta persistência moderada nos solos sendo algumas formulações menos adsorvidas, como as formulações aminas, as quais são mais propícias a serem lixiviadas para cursos d'água e acumularem metabólitos secundários no perfil do solo. Segundo Primel et al. (2005) o 2,4-D detêm baixo potencial de contaminação de águas superficiais, porém, apresenta potencial de contaminação de águas subterrâneas. Este herbicida possui classificação toxicológica I, ou seja, é extremamente tóxico.

O Picloram é o princípio ativo de herbicidas reguladores de crescimento amplamente utilizados para o controle de ervas daninhas, agindo de maneira similar

ao 2,4-D, e mesmo sendo considerado não tóxico em baixas doses, possui a mesma classificação toxicológica do anterior. No mercado, são comercializadas inúmeras misturas deste herbicida de maneira associada ao 2,4 – D, como o Tordon®, o Norton® e o Palace®.

A mosca da fruta, *Drosophila*, provou ser uma útil ferramenta para avaliar o impacto dos estresses ambientais nas populações (COYNE et al., 1983; DOBZHANSKY, 1935; HOFFMANN e PARSONS, 1991), sendo empregada em estudos de transmissão dos caracteres hereditários, interações genéticas, ligações e aberrações cromossômicas e mudanças evolutivas em populações (CAMPOS et al, 2014; LAVINGTON et al, 2014; LEE et al, 2014; POWELL, 1997; SCHAEFFER et al, 2008; SINGH et al, 2013; STRICKBERGER, 1962;). A mosca adulta tem estruturas que desempenham as funções equivalentes do coração, pulmão, rim, intestino, cérebro e trato reprodutivo do mamífero, contribuindo assim como modelo para estudos de desenvolvimento, comportamento e doenças humanas (PANDEY e NICHOLS, 2011). É um importante modelo para estudos toxicológicos (AFFLECK e WALKER, 2008; GUPTA et al., 2005), tendo sido bem descrita a utilização deste modelo para o estudo de mecanismos moleculares envolvidos em doenças humanas que afetam o sistema nervoso (NICHOLS, 2006; YANG, 2006), elucidando os mecanismos envolvidos em muitas doenças neurológicas, fazendo com que esse modelo continue sendo utilizado na explanação de detalhes de mecanismos e servindo como base para a criação de terapias farmacológicas (CELOTTO e PALLADINO, 2005).

Desta forma, a exposição de *Drosophila melanogaster* e células de mamíferos à pesticidas pode resultar em alterações bioquímicas similares, indicando que a mosca da fruta pode ser considerada um bom modelo para os estudos toxicológicos. Todavia, o número de estudos disponíveis na literatura ainda é pequeno, tornando-se necessária, então, a realização dos mesmos.

## **2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA**

### **2.1 Objetivo geral**

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade dos herbicidas 2,4 – D e Picloram de maneira associada na mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*.

## 2.2 Objetivos específicos

- a) Estudar os efeitos dos herbicidas sobre o desenvolvimento e a sobrevivência de *D. melanogaster*;
- b) Analisar os efeitos dos herbicidas em testes comportamentais para avaliação da atividade motora de *D. melanogaster*;
- c) Estudar os efeitos dos herbicidas sobre a enzima acetilcolinesterase;
- d) Determinar os efeitos dos herbicidas sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e níveis de tióis.

## 2.3 Justificativa

Conforme o INCA (2015), o atual modelo de cultivo com o uso intensivo de agrotóxicos gera grandes prejuízos, como poluição ambiental e intoxicação, tanto de trabalhadores, quanto da população em geral. As intoxicações agudas por agrotóxicos são as mais relatadas e atingem, principalmente, pessoas expostas em seu ambiente de trabalho. Os efeitos mais recorrentes relatados são irritação da pele e olhos, coceira, cólicas, vômitos, diarreias, espasmos, dificuldades respiratórias, convulsões e morte. No caso das intoxicações crônicas toda a população pode ser afetada, pois são resultantes da exposição múltipla aos agrotóxicos, ou seja, da presença de resíduos de pesticidas em alimentos e no ambiente, usualmente em doses baixas. Os efeitos adversos decorrentes da exposição crônica aos agrotóxicos podem aparecer muito tempo após a exposição, impossibilitando a correlação com o agente. Dentre os efeitos referentes à exposição crônica a princípios ativos de agrotóxicos podem ser apontados: infertilidade, impotência, abortos, más-formações, neurotoxicidade, desregulação hormonal, efeitos sobre o sistema imunológico e câncer. De acordo com Baird e Cann (2011), a regulamentação no uso dos pesticidas não dá a atenção necessária à proteção da saúde humana, particularmente de recém-nascidos e crianças, onde o crescimento e desenvolvimento estão ameaçados. As crianças ingerem, proporcionalmente, mais alimentos que os adultos, os quais tendem a conter níveis mais elevados de pesticidas. Seus órgãos internos, incluindo o cérebro, estão, ainda, em desenvolvimento e amadurecimento, tornando-os mais vulneráveis a qualquer efeito negativo que os compostos possam ter.

Diante da crescente utilização de herbicidas na agricultura e do risco de contaminação da biota no ambiente, faz-se necessário o estudo da toxicidade destas substâncias. De acordo com Dallegrave et al. (2005), as principais substâncias envolvidas nos acidentes com herbicidas em 2005 foram, respectivamente, Glifosato, Ácido 2,4 - D, Picloram e Paraquat. Considerando a escassez de estudos sobre a ação da associação entre o 2,4 - D e o Picloram sobre parâmetros de toxicidade, o presente estudo visa compreender a toxicologia desta associação.

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Agrotóxicos**

Defensivos agrícolas, agrotóxicos ou pesticidas são substâncias químicas, xenobióticos em sua grande maioria, naturais ou sintéticas, com ação tóxica, destinadas à prevenção ou erradicação, de maneira geralmente específica, de pragas e doenças que, de algum modo, lesam ou transmitem enfermidades às plantas cultivadas em sistemas agrícolas e florestais. Essa definição tem como referência insetos, fungos, bactérias, plantas infestantes ou qualquer outra forma de vida que comprometa a produtividade do sistema de cultivo (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006; ZAMBRONE, 1996). São substâncias que atingem o solo, não só pela incorporação direta de superfície, como também, através do tratamento de sementes com fungicidas e inseticidas como forma de controle de agentes fitopatogênicos presentes no solo, ou eliminação de plantas invasoras, no caso de herbicidas (MUSUMECI, 1992).

Os principais pesticidas utilizados, são xenobióticos pertencentes ao grupo dos organofosforados, organoclorados, carbamatos, feniluréias, entre outros. Suas vantagens no aumento e estabilização da produção são evidentes, pois as pragas e doenças são responsáveis por detrimientos de 30 a 40% na agricultura, podendo atingir perda total da produção se o controle eficaz não for praticado em tempo hábil (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006).

##### **3.1.1 Histórico**

Os primeiros compostos a serem usadas como pesticidas na agricultura já eram conhecidos há muito tempo, como cianetos, arseniacais, enxofre e compostos de cobre. No Brasil, estes produtos também eram usados, e após 1929, quando iniciou – se o predomínio de algodão na região centro-sul, além do milho e da cana, os produtos mais usados eram os sais de cobre e arsênio, enxofre e cal (LARA e BATISTA, 1992). Os pesticidas começaram a ser usados em larga escala no início da década de 40, tornando-se importantes fatores da produção agrícola mundial. Milhares de compostos orgânicos já foram registrados como pesticidas, os quais variam de moléculas simples a moléculas bastante complexas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

No Brasil, a partir de 1970, a produção agrícola experimentou grandes transformações. A política de estímulo do crédito agrícola, relacionada às novas tecnologias, fomentou várias culturas, principalmente as destinadas à exportação. A criação de pacotes tecnológicos ligados ao financiamento bancário obrigava os agricultores a obter insumos e equipamentos, muitas vezes dispensáveis. Dentre os insumos, estavam os pesticidas, os quais eram recomendados para o controle de pragas e doenças, como método de proteger as culturas. Essa metodologia obrigava o emprego sistemático de pesticidas, mesmo sem presença de pragas, ocasionando em pulverizações excessivas e desnecessárias (RUEGG et al., 1991).

### **3.1.2** *Legislação*

Os agrotóxicos são considerados extremamente importantes no modelo de desenvolvimento da agricultura no país. O Brasil é o maior consumidor de produtos agrotóxicos do mundo. Em decorrência da significativa importância, tanto em relação à sua toxicidade quanto à escala de uso, os mesmos possuem uma ampla cobertura legal no Brasil, com um grande número de normas legais (MMA, 2017). Os agrotóxicos, no Brasil, passaram a ser regulamentados pela Lei nº 7802 de 11 de julho de 1989, também conhecida como Lei dos Agrotóxicos, posteriormente regulamentada pelo decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, a qual dispõe sobre pesquisa, experimentação, produção, embalagem, rotulagem, transporte, armazenamento, comercialização, propaganda comercial, utilização, exportação, importação, destino final dos resíduos e embalagens, registro, classificação, controle, inspeção e fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins (BRASIL, 1989).

Anterior a criação desta lei, os agrotóxicos eram regulados apenas por portarias ministeriais. A criação de uma lei específica de regulamentação representou, então, um grande avanço no controle dessas substâncias. Posterior a esta lei, foram criados inúmeros decretos, instruções normativas, portarias e resoluções, das quais destacam-se a Instrução Normativa nº 036 de 24 de novembro de 2009, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) – a qual estabelece as exigências para a realização de pesquisa e experimentação, no que concerne à condução e emissão de laudos de eficiência e praticabilidade agrônômica, de fitotoxicidade e ensaios de campo para fins de estudo de resíduos de agrotóxicos e afins (MAPA, 2009); e a Resolução RDC nº 034 de 16 de agosto de 2010, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – que regulamenta produtos saneantes para venda livre, e Instrução Normativa nº 042 de 05 de dezembro de 2011, que a altera e tem como objetivo estabelecer as informações a serem mencionadas na rotulagem de produtos saneantes desinfetantes de forma a minimizar o risco à saúde do usuário (ANVISA, 2010).

Além disso, as resoluções 357/2005 e 396/2008, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) e a Portaria 2914/2011 Ministério da Saúde, dispõem sobre os valores máximos permitidos de agrotóxicos, e outros compostos, para a classificação dos corpos de água, enquadramento das águas subterrâneas e qualidade da água para consumo humano, respectivamente.

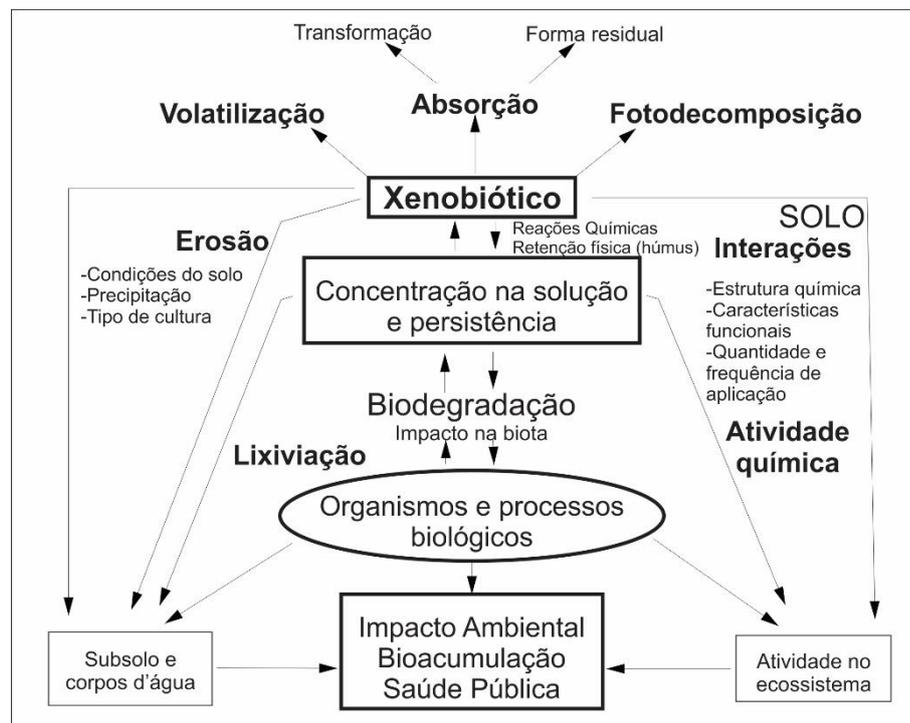
### **3.1.3 *Comportamento e impactos ambientais***

De acordo com Moreira e Siqueira (2006), os pesticidas são utilizados, geralmente, sobre as plantas ou diretamente sobre o solo ou sementes. Seus efeitos vão além do organismo alvo podendo causar perturbações nas plantas, na biota da parte aérea e do solo. A utilização destes produtos pode, portanto, causar diversos efeitos indiretos sobre os componentes do ecossistema agrícola. Uma fração residual permanece nos tecidos vegetais, no solo e nos organismos. A fração que atinge o solo sofre consideráveis interações químicas com a fase inerte e com a biota, além de sofrer inúmeras alterações químicas que determinam a dissipação ou persistência, assim como seu impacto no ecossistema.

O impacto de xenobióticos, nos quais incluem-se os agrotóxicos, sobre o meio ambiente, é um tema bastante complexo, polêmico e amplamente debatido.

Especialistas procuram melhorar seus entendimentos sobre dois aspectos principais: a biodegradação e redução da bioacumulação desses produtos, além dos seus impactos na atividade dos organismos essenciais à boa qualidade e funcionamento do ecossistema (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). Devido à sua toxicidade inerente e persistência na natureza, os pesticidas têm contribuído significativamente na degradação de ecossistemas (JOY et al., 2005).

Figura 1 – Processos e transformações que regulam a persistência, o destino e os impactos potenciais dos xenobióticos.



Fonte: Adaptado de MOREIRA e SIQUEIRA, 2006.

Segundo Moreira e Siqueira (2006), os xenobióticos podem ser transferidos do solo para os organismos, tais como as plantas, através da absorção pelas raízes e para os componentes da biota microscópica, meso e macrofauna, entrando na cadeia trófica do ecossistema, podendo atingir o homem por diversas vias de exposição, ocasionando a biomagnificação do produto. Pode, também, ocorrer transformações químicas que promovem sua volatilização e decomposição fotocatalítica ou degradação. Quando esta é resultado da ação direta dos microrganismos ou indireta de enzimas extracelulares, esse processo é conhecido como biodegradação, o qual se constitui na principal via de desaparecimento da maior parte dos xenobióticos no solo. O produto adsorvido às partículas do solo pode ser arrastado com o material

particulado pela erosão, até os corpos d'água, onde pode persistir e exercer significativo impacto na qualidade da água e na vida aquática, introduzindo-se na cadeia alimentar. Compostos em solução também são passíveis de perda, através da lixiviação para o subsolo, atingindo o lençol freático, afetando a qualidade dos reservatórios subterrâneos de água, tornando axiomáticos os riscos potenciais desses produtos ao meio ambiente (FIGURA 2). De acordo com o Ministério da Saúde (2006), a contaminação de um corpo hídrico por agrotóxicos ocorre especialmente de uma forma difusa, o que evidentemente prejudica a adoção de medidas para impedir sua chegada aos rios e lagos, contaminando ainda as águas subterrâneas.

O uso dos agrotóxicos pode levar à comparência de resíduos na cadeia alimentar e consumidores podem ser expostos a baixos níveis dessas substâncias químicas (GRAILLOT et al., 2012). Devido aos efeitos adversos ao meio ambiente e a segurança dos alimentos, esses produtos despertam cada vez mais preocupação e exigem mais cuidados em sua utilização (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Os efeitos dos agrotóxicos sobre componentes físicos e biológicos do solo, embora complicados, têm sido frequentemente avaliados. No entanto, a maioria dos estudos é conduzida em condições de laboratório, utilizando-se de metodologias baseadas em bioensaios (CORTET et al., 2002). É indubitável que agentes tóxicos ao atingirem o solo interferem no ecossistema, mas a magnitude ecológica disso, no contexto da microbiologia do solo, ainda não pode ser efetivamente determinada (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

O comportamento e o destino de determinado composto químico no solo dependem, principalmente, de suas propriedades particulares e aspectos funcionais da molécula. Porém, outros fatores como a quantidade e frequência de aplicação, condições físicas, químicas e biológicas do solo, são também de análoga importância (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Mesmo que empregados de maneira correta, os pesticidas podem ocasionar problemas de saúde pública ou ambiental. Uma probabilidade é a de causar desequilíbrio nos sistemas ecológicos, favorecendo o ataque de pragas desconhecidas, além do efeito indesejado em insetos polinizadores. Além disso, podem causar grande mortalidade de aves e peixes, que não são os alvos originalmente pretendidos. Isto ocorre, pois os rios, lagos e mares são contaminados pelos pesticidas, que são levados pela lixiviação e pelo vento, a locais distantes do ponto de aplicação (TARDIVO, 2004).

### 3.1.4 Degradação

O termo degradação tem sido utilizado para descrever transformações de toda espécie, estando inclusas, também, aquelas que resultam em produtos mais tóxicos que o composto inicial, através da sua inativação, assim como aquelas responsáveis pela completa mineralização, resultando em  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}_3$ , entre outros (MUSUMECI, 1992). De maneira análoga à maioria dos compostos orgânicos, os pesticidas existentes no meio ambiente – na presença de ar, água ou solo – degradam-se para formar outros compostos, os quais seguem se decompondo. A ocasional quebra total dos compostos orgânicos para  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , e formas inorgânicas estáveis de seus elementos, é chamada de mineralização (BAIRD e CANN, 2011). Os xenobióticos podem se decompor no solo através de inúmeros processos, dentre eles estão a volatilização, lixiviação e reações fotoquímicas de natureza hidrolítica ou por fotólise. Entretanto, em numerosas circunstâncias a decomposição do agrotóxico é atribuído à atividade microbiana do solo (MUSUMECI, 1992). De acordo com Baird e Cann (2011), mesmo que alguns pesticidas possuam um longo tempo de vida no ambiente, a maior parte deles sofre reações químicas e bioquímicas em poucos dias ou meses, resultando em outros compostos. Levando em consideração seu tempo de vida, os pesticidas classificam-se como sendo não persistentes, se eles duram menos que 30 dias; moderadamente persistentes, para aqueles que duram entre 30 e 100 dias; e persistentes, para os que possuem tempo de vida superior a 100 dias.

Na atmosfera, o processo de degradação usualmente começa com o ataque sobre a molécula orgânica e através do radical hidroxila (-OH), ou através de uma reação fotoquímica, caso a substância absorva luz com comprimentos de onda específicos. A decomposição fotoquímica é possível, também, para pesticidas presentes na água ou adsorvidos no solo (BAIRD e CANN, 2011).

As características estruturais de uma determinada molécula e os fatores ambientais onde sucede-se a degradação são muitos, interagindo e variando intensamente em espaço e tempo. Dentre as principais características químicas do produto em relação à degradação estão o tamanho, a estrutura química, a forma e carga de molécula e a existência de grupos funcionais. Esses fatores estabelecem o comportamento no solo, o grau de toxicidade, a rota metabólica e a absorção pelos microrganismos. Comumente, quanto maior, mais condensada e mais ramificada,

maior é a estabilidade química e menor será a degradação da substância. (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006)

### **3.2 Classes de agrotóxicos**

Todos os pesticidas químicos compartilham uma propriedade comum de interferir no metabolismo vital de organismos aos quais eles são tóxicos (BAIRD e CANN, 2011). Dentre as várias categorias de pesticidas, serão descritas as três principais: herbicidas, inseticidas e fungicidas, os quais representam, respectivamente, 62,6%, 12,6% e 7,8% do total de vendas de agrotóxicos no Brasil (IBGE, 2015).

#### **3.2.1 *Inseticidas***

Inseticidas têm sido utilizados pela sociedade através dos anos. Uma das motivações importantes para o uso desses pesticidas é o controle de patologias. O uso de inseticidas tem reduzido significativamente a incidência de doenças transmitidas por insetos. Entre essas doenças estão a malária, febre amarela, peste bubônica, doença do sono, entre outras. Além disso, outra razão importante para o uso de inseticidas é a prevenção de insetos que atacam as culturas de alimentos, pois mesmo com um extensivo uso de pesticidas, aproximadamente um terço do total da produção de grãos do mundo é destruídas por pestes e ervas daninhas, durante o crescimento, colheita e estocagem (BAIRD e CANN, 2011). Entretanto, a aplicação desenfreada de inseticidas, tem causado efeitos negativos, tais como o desaparecimento de algumas espécies de insetos úteis e, conseqüentemente, manifestação de novas pragas. Ademais, espécies de insetos tornaram-se resistentes a determinados inseticidas, levando à busca de novos produtos com maior seletividade (SENENT, 1979 apud FLORES, 2004). Entre os compostos inseticidas utilizados em grande escala, estão os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (LARA e BATISTA, 1992).

#### **3.2.2 *Fungicidas***

Os fungicidas são parte importante na produção agrícola mundial. Em sua ausência, as perdas seriam consideravelmente maiores (WALTERS, 2009). Uma das suas formas de uso é a aplicação nas sementes, a qual oferece garantia adicional no estabelecimento de lavouras a custos reduzidos (HENNING, 2005). A aplicação contínua de fungicidas com os mesmos mecanismos de ação pode gerar o desenvolvimento de resistência em populações de patógenos (WALTERS, 2009). Além desta característica negativa, já são conhecidos efeitos fitotóxicos em plântulas (GOULART, 1993) e impactos negativos a organismos não alvo, tais como organismos terrestres (RÖEMBKE et al., 2007), animais selvagens, peixes, e também ao meio ambiente (MUNKVOLD et al, 2006).

### **3.2.3 Herbicidas**

A aplicação de herbicidas para o controle de plantas daninhas tem sido uma atividade comum na agricultura global, sempre com o objetivo de ampliação na produtividade das culturas. No entanto, quando esses compostos são empregados de maneira descontrolada, podem ocasionar impacto em organismos não-alvos, como os que vivem no ambiente, incluindo os seres humanos (NWANI et al., 2011). A utilização de herbicidas, pode ser considerada uma ferramenta eficiente e altamente sofisticada. Desde 2007, herbicidas assumiram o posto de pesticida mais utilizado entre três das maiores categorias de agrotóxicos (ZHANG et al., 2011). Hoje, os herbicidas são as substâncias químicas mais usadas no mundo (HE et al., 2012), atingindo cerca de 85% do total usado em alguns países desenvolvidos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Este rápido crescimento no consumo de herbicidas é consequência da consolidação das áreas de plantio direto, da agregação de novas áreas produtivas, da crescente dificuldade em conseguir mão de obra no campo, aliadas à grande disponibilidade e eficiência de produtos químicos (INOUE e DE OLIVEIRA JÚNIOR, 2011)

Embora os herbicidas sejam muito importantes para a agricultura, sob certas situações podem agir como poluentes que deterioram a água e o solo. Enquanto a maior parte dos herbicidas não são deliberadamente aplicados ao solo, eles podem entrar no mesmo por interceptação direta do herbicida pela superfície durante as aplicações iniciais, pelo escoamento do produto da vegetação e lixiviação do material das plantas em decomposição (ZABALOY et al., 2008). Também podem ocorrer disfunções induzidas nas plantas por xenobióticos residuais no solo, onde, no caso

dos herbicidas, têm-se o denominado “carryover” – ou efeitos residuais do herbicida aplicado na cultura anterior – os quais têm grande impacto nos cultivos em rotação (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Entre os anos de 1997 e 2004, o Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul (CIT/RS) registrou 252 mortes causadas por ingestão de agentes tóxicos. Destas, 12,7% foram causadas por herbicidas, o qual ficou atrás apenas de organofosforados e carbamatos (19,4%) (SILVA, et al., 2006). Ao analisar-se o perfil das intoxicações por agrotóxicos registrados no CIT/RS entre 1997 a 2005, observa-se maior incidência no sexo masculino, na idade produtiva, em circunstâncias acidentais e com evolução para cura (DALLEGRAVE, 2005).

Tal como os inseticidas, esses agrotóxicos são distribuídos em diferentes classes químicas, e o seu comportamento no solo dependerá de sua estrutura química. Algumas das classes importantes de herbicidas são as triazinas, feniluréias, tiocarbamatos, acilanilidas, cloroacetamidas, amitrolas, ácidos fenoxialcalóides, carbamatos, fenóis e dinitroanilinas (MUSUMECI, 1992).

### **3.3 Herbicidas auxínicos**

O grupo de herbicidas mimetizadores da auxina, também conhecidos por reguladores de crescimento, auxinas sintéticas ou herbicidas hormonais, em função da similaridade estrutural com a auxina natural das plantas, tem grande importância histórica, uma vez que o 2,4 – D foi o primeiro composto orgânico sintetizado pela indústria utilizado como herbicida seletivo, dando estímulo ao desenvolvimento inicial da indústria química na agricultura (DE OLIVEIRA JR et al., 2011). Estes herbicidas apresentam ação semelhante à auxina, porém potencializada, induzindo mudanças metabólicas e bioquímicas no metabolismo de ácidos nucleicos e na plasticidade da parede celular (CARVALHO, 2013)

Em 1931, Kogl e Haagen-Smit, isolaram, pela primeira vez, um hormônio vegetal, ao qual deu-se o nome de auxina. Esse por sua vez, foi identificado como sendo o ácido indol acético (AIA). Pouco depois do isolamento deste, vários pesquisadores demonstraram que certos compostos cuja existência nos vegetais era desconhecida, induziam reações nas plantas semelhantes àquelas determinadas pela auxina natural (ALTERMAN e NEPTUNE, 1977). Sabendo-se que as auxinas, quando aplicadas em determinadas concentrações, exerciam efeitos tóxicos nas plantas,

surgiu a ideia de usar produtos sintéticos de efeitos semelhantes às auxinas com o propósito de combater plantas indesejáveis (MITCHELL e HAMNER, 1944).

Segundo Carvalho (2013), as auxinas controlam atividades de genes através de diversos eventos metabólicos, assim como a concentração de auxina é controlada pela célula. Normalmente, os níveis de auxina são elevados apenas quando é necessária a alongação celular ou outra atividade que lhe é específica. Com a aplicação de auxinas sintéticas, a concentração de auxina na célula não pode ser regulada pelo metabolismo celular, mantendo-se em altos níveis. Com isso, o metabolismo celular fica desregulado, proporcionando alongação celular descontrolada. Isso, aliado ao fato de que as substâncias de reserva são mobilizadas e transportadas para os pontos de crescimento, acarreta crescimento e reprodução celular abundante, principalmente nessas regiões. Com isso, a planta é levada à morte devido ao esgotamento das reservas e à inativação de mecanismos de reparo das células, que resultam na perda de função celular.

De acordo com De Oliveira Jr (2011), os herbicidas mimetizadores da auxina afetam o crescimento das plantas de maneira similar à auxina natural das plantas, no entanto, são mais persistentes e mais ativos que o AIA, apresentam efeitos no crescimento das plantas e podem ser notados em doses muito baixas, apresentam baixa toxicidade para mamíferos, controlam basicamente plantas daninhas dicotiledôneas anuais ou perenes e, com exceção do Picloram, não persistem no solo por mais do que uma safra.

Dentre os grupos de herbicidas mimetizadores de auxina, estão o Ácido Benzoico (Dicamba); os Ácidos Piridinecarboxílicos (Aminopyralid, Clopyralid, Fluroxypir, Picloram e Triclopyr); os Ácidos Fenoxicarboxílicos (2,4 – D, MCPA) e o Ácido Quinolinocarboxílico (Quinclorac) (DE OLIVEIRA JR (2011).

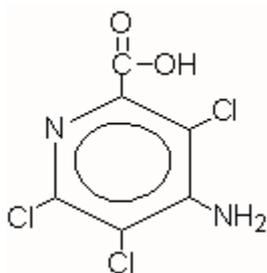
### **3.3.1 *Picloram***

O Picloram (Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridinacarboxílico) é um herbicida de propriedades auxínicas usado extensivamente no controle de plantas invasoras dicotiledôneas (folhas largas) em pastagens e em campos de culturas tolerantes a sua ação (MANTOVANI, 2007). Mesmo sendo o Picloram um herbicida recomendado para controle de folhas largas, algumas gramíneas são extremamente sensíveis a ele, inclusive espécies utilizadas como pastagens, onde o herbicida apresenta registro

para uso (CARMO et al., 2008). Sua fórmula estrutural é mostrada na FIGURA 3 e sua fórmula molecular é dada por  $C_6H_3Cl_3N_2O_2$ .

O Picloram apresenta longa persistência no ambiente, com meia-vida entre 20 e 300 dias (SILVA et al., 2007), e pode ser encontrado no solo até três anos após sua aplicação (DEUBERT e CORTE-REAL, 1986). Conclui-se, erroneamente, que o Picloram é facilmente lixiviado devido a sua mobilidade, porém, o sistema solo é altamente complexo, e uma gama enorme de fatores dificulta a sua mobilidade. Por exemplo, pode-se citar a presença de matéria orgânica, óxidos e óxi-hidróxidos de ferro, alumínio e manganês, fatores ambientais, entre outras coisas, fazendo crer que a lixiviação do Picloram não ocorre tão rapidamente quanto se poderia supor (MANTOVANI, 2007).

Figura 2 – Fórmula estrutural do herbicida picloram.



FONTE: WSSA (2017).

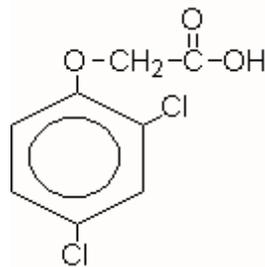
O picloram foi previamente testado em mamíferos quanto a sua toxicidade crônica. Em 1969, McCollister e Leng apud Reuber (1981) alimentaram ratos albinos, machos e fêmeas, com 10000 ou 30000 ppm de Picloram por 90 dias. Foram observadas alterações patológicas ligeiras a moderadas nos rins e no fígado dos ratos. Verificou-se um aumento estatisticamente significativo nas razões dos pesos do fígado e do rim para os pesos corporais em ratos de ambos os sexos.

Em outro estudo, cães beagle foram alimentados com picloram em suas rações em níveis diários de 15, 50, e 150 mg/kg de peso corporal durante 2 anos. Alguns cães foram mortos após 1 ano para exames patológicos. Os resultados indicaram a inexistência de alterações brutas ou histopatológicas que pudessem ser atribuídos à ingestão do herbicida (LYNN, 1965, MCCOLLISTER E LENG, 1969 apud REUBER, 1981).

### 3.3.2 2,4 – D

O 2,4 – D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético) é um membro da família dos herbicidas clorofenoxiacéticos (RODRIGUES e SERRA, 1996), sendo classificado pela ANVISA como um herbicida hormonal do grupo fenoxiacético. Suas formulações amplamente utilizadas no controle de plantas dicotiledôneas, principalmente em culturas de cereais, grama e alguns vegetais, entre outras (RODRIGUES e SERRA, 1996). O 2,4 – D (FIGURA 4) foi o primeiro herbicida seletivo bem-sucedido, sendo introduzido em 1946, transformando-se rapidamente no herbicida mais extensamente usado em todo o mundo (INDUSTRY TASK FORCE II, 2017). Desde a guerra do Vietnã, quando foi utilizado pela força aérea norte-americana como agente desfolhante, junto com o ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), formando o agente laranja, o 2,4-D tem substituído a capina manual e mecânica, diminuindo a mão-de-obra, ocasionando o aumento da produtividade agrícola (PRADO, 1998).

Figura 3 – Fórmula estrutural do herbicida 2,4 – D.



FONTE: WSSA (2017).

Quando o 2,4 – D é aplicado sobre as plantas susceptíveis, ele é rapidamente absorvido e migra às outras partes do vegetal, afetando principalmente os tecidos meristemáticos. A sua rápida distribuição contribui em grande parte para a sua eficiência como agente tóxico (ALTERMAN e NEPTUNE, 1977).

O 2,4 – D apresenta persistência curta a média nos solos e, em doses normais, a atividade residual não excede a quatro semanas em solos argilosos em clima quente (SILVA et al., 2007).

Bucher, em 1946, foi um dos primeiros a relatar os resultados de experimentos com pequenos animais usando 2,4 – D. Em seus estudos observou miotonia temporária de 8 a 24 horas após uma única injeção de 150 a 250 mg/kg em

camundongos, ratos, coelhos e cães. Em 1947, Hill e Carlisle publicaram os resultados de estudos orais agudos. Após doses únicas de 2,4 – D encontraram que a DL<sub>50</sub> para camundongos é de 375 mg/kg; para ratos, 666 mg/kg; para coelhos, 800 mg/kg e para porquinhos-da-índia, 1.000 mg/kg. A maior dose oral única administrada a macacos sem a observação de efeitos adversos, foi de 214 mg/kg, enquanto que para a administração intraperitoneal foi encontrada a dose de 428 mg/kg. Uma injeção oral, mais uma intraperitoneal em macacos com uma dose total de 500 mg/kg de 2,4 – D causou náuseas, vômitos, letargia e falta de coordenação muscular. Observou-se que todas as espécies reagiram de forma semelhante e que as mortes por grandes doses foram, aparentemente, devido à fibrilação ventricular. Quando a morte foi adiada, observou-se miotonia, rigidez das extremidades, ataxia, paralisia e coma. Florsheim e Velcoff (1962) relataram uma diminuição do peso da tireoide e do peso corporal em ratos machos após injeções subcutâneas únicas de 2,4 – D a 100 mg/kg.

Em cães, Drill e Hiratzka (1953) descobriram que os sintomas tóxicos ocorriam em até seis horas após uma administração única, oral, de doses letais de 2,4 – D sendo que os óbitos ocorriam entre 2 e 9 dias após a administração dos compostos.

Experimentos conduzidos em macacos indicam que o 2,4 – D é um irritante gástrico em grandes doses, de modo que a possibilidade de ocorrência de intoxicação aguda em humanos pareceria relativamente remota devido à grande dose que o homem poderia presumivelmente tolerar (HILL e CARLISLE, 1947). É usualmente aceito que a DL<sub>50</sub> oral de 2,4 – D para o homem é de cerca de 500 mg/kg. (YOUNG, 1978).

Em um estudo realizado por Shavgulidze et al. (1976), a DL<sub>100</sub> oral única do sal de sódio 2,4-D em ovelhas foi de 900 mg/kg. A morte ocorreu entre 2 e 4 dias após os sinais clínicos de astenia, depressão, ataxia, hipotermia, dispneia, paralisia muscular, anorexia e fotofobia intensa nos animais que receberam doses entre 500 e 1.000 mg/kg. A dose oral única de 300-400 mg de 2,4 – D foi desintoxicada entre 9 e 12 dias sem que restasse vestígios do composto nos tecidos. McLennan (1974), relatou sobre a administração acidental oral de 2,4 – D em duas vacas. Observou-se que a morte de um animal ocorreu dentro de 12 horas após uma dose calculada de 150-188 mg/kg. A dose tóxica para o animal que sobreviveu foi calculada entre 105 e 132 mg/kg.

Clark et al. (1975) trataram bovinos e ovinos adultos com ácido 2,4 – D (99% de pureza) com diferentes concentrações de 2,4 – D introduzidas na ração durante 28 dias. Os animais foram mortos e os tecidos foram amostrados um dia após a última

dose, e outros, uma semana depois. Os resíduos do 2,4 – D e seus metabólitos de fenol foram determinados no músculo, gordura, fígado e rim. Músculo e gordura continham os níveis mais baixos, enquanto rins e fígado continha o maior nível de resíduos. A retirada do tratamento durante uma semana antes da morte resultou numa redução significativa nos teores de resíduos, com exceção dos rins. Não foi detectado 2,4 – D na gordura ou no músculo de quaisquer animais. O 2,4 – D foi rapidamente eliminado dos animais, principalmente na urina, com meia-vida plasmática entre 3 e 12 horas após uma única dose. De maneira geral, o mesmo acumulou-se em tecidos animais quando administrado em altas doses ou repetidas doses menores, entretanto estes resíduos diminuíram rapidamente, possuindo uma meia-vida de 1 a 2 semanas. Devido à sua excreção pelos rins, os níveis do composto nos tecidos renais eram até vinte vezes maiores do que os níveis observados em outros órgãos e tecidos.

De acordo com Young (1978), os potenciais embriotóxicos, fetotóxicos e teratogênicos do 2,4 – D são extremamente variáveis com efeitos observáveis dependentes da concentração, grau de pureza e método de administração, com alguns efeitos ocorrendo apenas com doses que se aproximavam da toxicidade materna.

Resíduos de herbicidas fenóxi em alimentos tratados foram facilmente absorvidos no intestino de animais e excretados rapidamente na urina, em grande parte como fenoxiácido inalterado (LENG, 1977). Em geral, devido às vias de degradação amplamente diferentes, os herbicidas fenóxi não persistem nas plantas (YOUNG et al., 1978). Entretanto, Muzik (1976) observou que em algumas plantas, como o tomate, o 2,4 – D não-metabolizado pode ligar-se às membranas celulares e persistir por dois ou três meses.

A maior parte dos dados obtidos em estudos agudos sugerem que o 2,4 – D não é particularmente tóxico em animais (BERNDT e KOSCHIER, 1973). Sugeriu-se que parte da razão para esta falta de toxicidade deve-se ao fato que o 2,4 – D é excretado rapidamente pela maioria dos mamíferos (BERNDT e KOSCHIER, 1973; KHANNA e FANG, 1966). Em contrapartida, vários autores demonstraram que o 2,4 – D pode induzir danos aos tecidos hepático e muscular (PAULINO e PALERMONETO, 1991; TÓTH et al., 1977).

### **3.3.3 *Picloram + 2,4 – D***

A mistura dos compostos 2,4 – D e Picloram foi utilizada entre 1966 e 1971 na guerra do Vietnã em uma mistura conhecida como Agente Branco (WALKER et al., 2012) na formulação Picloram 102 g/l e 2,4 – D 396 g/l (OAKES et al., 2002a). Atualmente, a mistura destes herbicidas é muito utilizada, sendo que as principais misturas comerciais de Picloram + 2,4 – D são Norton®, Tordon® (DE OLIVEIRA JR et al., 2011), Palace®, Pampa®, entre outros (SEAB, 2017).

A mistura de 2,4 – D e Picloram é solúvel em água e persistente no solo e, conseqüentemente, tem um elevado potencial de lixiviação, não sendo recomendada sua utilização em solos de textura grossa com presença de zona saturada, onde a contaminação das águas subterrâneas é mais provável de ocorrer (CARVALHO, 2013; PETERSON et al., 2001).

Nascimento e Yamashita (2009), realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o comportamento de olerícolas cultivadas em solos com aplicação da formulação de herbicida 2,4 – D + Picloram nas subdoses de 0,04; 0,08; 0,24; 0,48 e 0,96 L ha<sup>-1</sup> comparadas com um solo sem contaminante. Avaliou-se a emergência das plântulas, a altura das mesmas e a fitointoxicação promovida pelo cultivo em solo previamente contaminado. Observou-se que solos contaminados com 2,4 – D + Picloram provocaram redução na emergência e altura das plantas e o aumento na fitotoxicidade em todas as doses analisadas.

Em um estudo realizado por Oakes et al. (2002a), ratos machos foram submetidos a gavagem durante 9 semanas com uma mistura de 2,4 – D e Picloram comercialmente chamada Tordon 75D. Cada macho foi acasalado com seis fêmeas não tratadas. Todas as fêmeas acasaladas foram mortas no vigésimo dia da gestação, sendo os fetos pesados e examinados quanto a malformações estruturais e desenvolvimento esquelético. Os itens analisados – tamanho da ninhada, peso fetal e taxa de malformação – não foram afetados pelo tratamento. Em outro estudo realizado por Oakes (2002b), os ratos foram tratados de maneira similar e ao final do tratamento, seus testículos foram pesados e examinados histologicamente. Foram coletadas amostras de sangue para determinar a testosterona no soro. O tratamento com Tordon 75D causou uma grave redução no peso testicular em alguns animais. Os danos testiculares não foram devidos a perturbações endócrinas uma vez que não houve diferenças significativas na concentração sérica de testosterona em animais controle quando comparados aos animais tratados.

Gallagher e Giulio (1991), expuseram exemplares de bagre americano (*Ictalurus punctatus*) a uma mistura de Picloram e 2,4 – D durante 10 dias, mostrando diminuição das concentrações séricas de cloreto e da razão fígado/peso corporal. Tais alterações não foram observadas em peixes expostos aos compostos isoladamente. Nenhum dos compostos, nem a sua mistura, aumentaram as atividades da catalase hepática peroxisomal. Desta forma, a exposição diária de 2,4-D ou Picloram não induz enzimas peroxisomais em bagres de canal, diferente da exposição a uma mistura de 2,4 – D e Picloram, que pode causar efeitos fisiológicos não observados com os compostos isoladamente.

### **3.4 Avaliação da toxicidade**

Antes limitada ao estudo dos venenos, atualmente a toxicologia é norteadas para o estudo dos efeitos adversos das substâncias químicas sobre organismos vivos, estando inclusos os efeitos em níveis moleculares, celulares e bioquímicos, buscando o estabelecimento da significância do dano e do uso seguro destas substâncias (SISINNO e OLIVEIRA-FILHO, 2013). O propósito principal da toxicologia é gerenciar o risco, o que é condição indispensável para o estabelecimento de ações de segurança no emprego dos xenobióticos e que promove a proteção do ecossistema e da saúde humana (CHASIN e AZEVEDO, 2003).

A toxicidade é uma propriedade individual que cada composto tem, de gerar efeitos danosos a um algum organismo quando este é submetido, durante um determinado período de tempo, a certas doses ou concentrações. Os fatores com maior influência na toxicidade são a duração e a frequência de exposição, a rota de administração da substância, e a existência de processos físicos, químicos e biológicos no ambiente. (SISINNO e OLIVEIRA-FILHO, 2013)

Em relação à duração da exposição, a exposição aguda é aquela resultante da administração de altas quantidades de uma substância, por um período de 24h ou menos, na qual observa-se um efeito tóxico imediato (SISINNO e OLIVEIRA-FILHO, 2013). Ainda que a toxicidade aguda de uma substância seja de maior relevância no caso de exposição acidental a um composto químico puro, na toxicologia ambiental julga-se mais importante a exposição crônica, a qual corresponde a uma baixa dose individual de um composto químico tóxico que está presente no ambiente, por um maior período de tempo. (BAIRD e CANN, 2011).

Ao executar um estudo de toxicidade, de acordo com Chasin e Azevedo (2003), os critérios para avaliar a toxicidade podem ser, dentre outros, testes bioquímicos, como inibição de enzimas; avaliação do comportamento; estudo da ação e dos efeitos do tóxico sobre os reflexos condicionados; efeito sobre fertilidade e fetos; DE<sub>50</sub>, DL<sub>50</sub>, CE<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub>.

### 3.4.1 *Atividade da enzima acetilcolinesterase*

A acetilcolina (Ach) é um dos mais importantes neurotransmissores do sistema nervoso autônomo, sendo encontrada em gânglios autonômicos, junções neuroefetoras parassimpáticas e neuromusculares somáticas, na medula adrenal e também no sistema nervoso central (SNC). Quando é liberada na fenda sináptica, a Ach interatua com receptores executando seus efeitos fisiológicos (ADAMS, 1992). Após a liberação da Ach na fenda sináptica ou junção neuromuscular e sua atuação em receptores específicos, é necessário que este neurotransmissor seja removido, de maneira que possibilite a recuperação do receptor e evite respostas repetitivas e descontroladas após um único estímulo. Esta supressão deve ser resultado da hidrólise da Ach, com formação de colina e ácido acético, catalisada pela acetilcolinesterase (AChE) (SILMAN e SUSSMAN, 2005).

A enzima AChE é vital para o desempenho padrão do sistema sensorial e motor (PAYNE et al., 1996). Em virtude da sua função chave no controle da transmissão sináptica, esta enzima se torna um dos alvos moleculares mais expostos aos efeitos de agentes neurotóxicos, como íons metálicos (ARAÚJO, 2015) e pesticidas organofosforados e carbamatos (ARAÚJO, 2015; OLIVEIRA et al., 2005; STURM et al., 2000).

Compostos como os inseticidas carbamatos e organofosforados inibem, respectivamente, a atividade da AChE de maneira reversível e irreversível. Outros compostos como pesticidas organoclorados e metais pesados parecem agir da mesma forma, contudo a concentração necessária para provocar tal efeito é relativamente maior (STURM et al, 2000). A inibição da AChE pode ser perigosa para peixes, particularmente por interferir na atividade natatória, comprometendo sua alimentação e fuga de predadores (BALINT et al., 1995). Ainda que a inibição da AChE seja um biomarcador mais específico de exposição aos organofosforados ou

carbamatos, é essencial a investigação da atuação de outros compostos sobre a atividade da mesma (GUILOSKI, 2010).

### 3.4.2 Estresse oxidativo

Um radical é qualquer molécula que apresenta elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo, considerado agente oxidante. Entre os oxidantes com maior relevância nos processos patológicos tem-se as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), as quais dividem-se em dois grupos, as radicalares: superóxido, hidroxila, peroxila e alcoxila; e as não-radicalares: oxigênio singlete, o peróxido de hidrogênio e o ácido hipocloroso. A maior parte destes compostos é elevadamente reativa, com tempo de vida bastante curto. Eles são produzidos *in vivo* no decorrer do metabolismo celular normal, assim como quando o organismo é exposto a uma série de estímulos tóxicos, como radiação ionizante e xenobióticos diversos (BARREIROS et al., 2006; COMPORTI, 1989; GILLHAM et al., 1997). A formação de uma grande quantidade de EROs pode lesar macromoléculas biológicas como ácidos nucléicos, proteínas, lipídios e carboidratos (XIONG et al., 2007). O desequilíbrio entre a produção de EROs e a sua remoção por sistemas antioxidantes, é denominado estresse oxidativo (ALI et al., 1991; SANFELIU et al., 2001; SARAFIAN, 1999; YEE e CHOI, 1996). Sugere-se que a magnitude do estresse oxidativo pode ser controlada pela relação GSSG/GSH (HALLIWELL, 1993).

Frente ao estresse oxidativo, enzimas antioxidantes importantes tais como catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutathiona-s-transferase (GST), que empregam esses compostos como seus substratos específicos, podem ter sua atividade alterada (ARAÚJO, 2015). Nessa circunstância, é sabido que o estresse oxidativo pode estar relacionado com muitas desordens neurológicas, particularmente o mal de Parkinson (MARIANI et al., 2005), a doença de Alzheimer (KEDAR, 2003; MEYDANI et al., 2001) e a neurotoxicidade induzida pela exposição à xenobióticos como os organofosforados (KEHRER, 1993).

#### 3.4.2.1 Antioxidantes endógenos

Em sistemas aeróbicos, a existência de equilíbrio entre agentes pró-oxidantes, como as EROs, e os sistemas de defesas antioxidantes é fundamental. Conforme

mencionado anteriormente, tais agentes são gerados endogenamente como resultado direto do metabolismo do  $O_2$  e em situações não-fisiológicas, tais como a exposição da célula a compostos xenobióticos, os quais provocam a redução incompleta de  $O_2$ . (HEBBEL, 1986; ROSS e MOLDEUS, 1991). A exposição de organismos aos radicais livres, oriundos de inúmeras fontes, levou os organismos ao desenvolvimento de uma série de mecanismos de defesa capazes de eliminar estes radicais livres (CADENAS, 1997). Os organismos eucariotos apresentam enzimas antioxidantes tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), que reagem com os compostos oxidantes e protegem as células e os tecidos do estresse oxidativo (TRABER, 1996).

A GSH é um tripeptídeo de baixo peso molecular, composta por glutamato, cisteína e glicina. Possui na cisteína um grupo tiol, e está presente em grandes quantidades na célula, tornando-se o principal tampão redox intracelular. Na defesa antioxidante a GSH exerce várias funções (FERREIRA e ABREU, 2007), podendo reagir com uma grande variedade de xenobióticos eletrofílicos pela ação da enzima GST, tornando estes compostos mais solúveis e mais facilmente excretáveis (FANG, 2002). A GSH também é substrato da enzima GPx, doando elétrons para a redução de peróxidos em água à medida que é convertida na sua forma oxidada, GSSG.

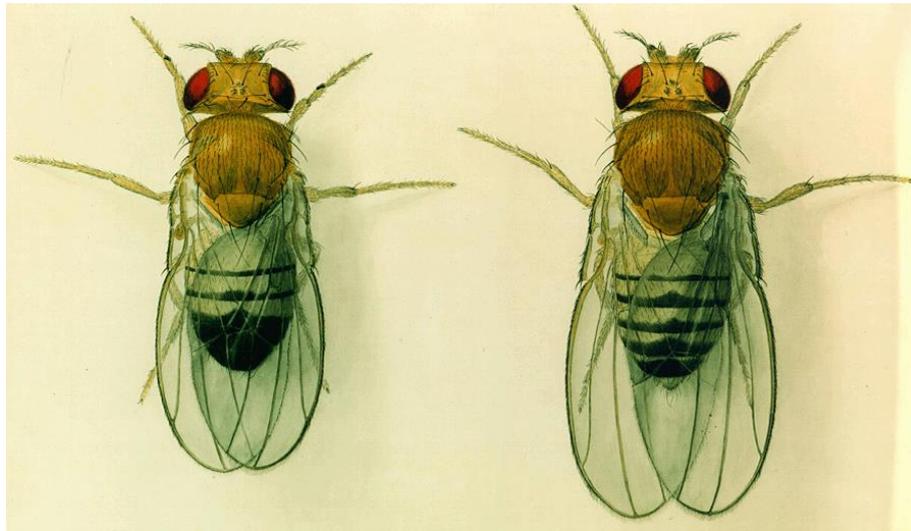
### **3.5 *Drosophila melanogaster***

A *Drosophila melanogaster* foi o primeiro organismo complexo a ter o seu genoma sequenciado (ADAMS et al., 2000). Com o sequenciamento do genoma humano, as correspondências observadas entre os dois genomas destacaram e estimularam seu papel como modelo experimental para interpretar a biologia humana e os processos patológicos. A mosca continua sendo uma das primeiras opções na biologia, onde estudos experimentais são, muitas vezes, realizados primeiro em moscas para depois em organismos mais complexos como os mamíferos. (PANDEY e NICHOLS, 2011).

Além das vantagens de ter seu genoma já sequenciado, existem muitas características notórias na mosca, as quais a tornam um modelo chamativo para a realização de estudos. Além de possuir um curto ciclo de vida, sendo possível um único par fértil de acasalamento produzir centenas de descendentes geneticamente idênticos dentro de 10 a 12 dias, a mosca pode ser considerada um modelo múltiplo,

definidos pelo estágio de desenvolvimento, respectivamente, o embrião, a larva, a pupa e o adulto. Ainda que hajam inúmeras diferenças entre as moscas e os seres humanos, o grau de biologia e fisiologia conservada tornam a *D. melanogaster* uma ferramenta imensamente eficaz no processo de elucidação do efeito de drogas (PANDEY e NICHOLS, 2011). A *D. melanogaster* têm sido utilizada como modelo biológico para testes de toxicidade de praguicidas (NARCISO e NAKAGAWA, 2009), na detecção de inseticidas por bioensaio (HIRATA et al., 2002), como avaliador do efeito tóxico-genético do própolis em suas próprias células somáticas (OLIVEIRA et al., 2007), como bioindicadora na avaliação da letalidade de extrato de *Nicotiana tabacum* (MORATORE et al., 2009), no potencial tóxico-genético dos larvicidas (ACIOLE et al., 2014), na avaliação do potencial genotóxico do metabólito secundário de Prodigiosina (LIMA, 2014), entre muitos outros estudos.

Figura 4 – *Drosophila melanogaster* adulto, aspecto dorsal, vista superior. À esquerda um indivíduo macho, à direita fêmea.



Fonte: FlyBase (2017)

O ciclo de vida da *D. melanogaster* é bastante curto quando comparado à outras espécies. A partir da fase de ovo, da qual decorre a embriogênese, em cerca de 24 horas, têm-se a eclosão de uma primeira forma larval que, após 24h, muda de cutícula e transforma-se em uma larva de segunda fase. Após mais 24h, a larva troca mais uma vez de cutícula, passando então para a terceira fase, onde seu tamanho é significativamente aumentado, por cerca de 72h. A partir daí, surge uma cutícula espessa que forma uma espécie de casulo, o qual denomina-se pupa. Durante a fase

de pupa, que possui duração de aproximadamente cinco dias, ocorre metamorfose, a qual envolve a degradação de praticamente todos os tecidos larvais e a propagação significativa dos discos imaginais. Da pupa eclode o indivíduo adulto, que atinge a maturidade sexual ao fim de 12 horas, com uma expectativa média de vida de 60 dias. Os adultos eclodem com moderada pigmentação, e apenas ao final de algumas horas, é que se torna óbvia a coloração acastanhada do corpo e o padrão de listas escuras dos segmentos abdominais (LIMA, 2014), sendo possível, então, diferenciar indivíduos machos e fêmeas, os quais diferem-se pela coloração na porção final do abdômen – escura para machos e clara para fêmeas. A *D. melanogaster* (FIGURA 5) possui o corpo dividido em três segmentos: cabeça, tórax e abdômen. Na cabeça, evidencia-se as antenas, as peças bucais e os olhos; no tórax apresenta 3 pares de patas e no abdômen, possui uma nítida segmentação e é este que constitui seu centro de nutrição.

## **4 METODOLOGIA**

Neste capítulo serão apresentados todos os procedimentos, equipamentos e materiais utilizados neste trabalho. A maioria das metodologias usadas neste projeto já são rotina em nossos laboratórios. Além disso, os laboratórios em questão, dispunham dos equipamentos e materiais necessários à realização do trabalho proposto.

### **4.1 Reagentes**

Para a realização deste trabalho, utilizou-se a mistura comercial de 2,4 – D e picloram denominada Palace®. Este herbicida possui em sua composição 114,76 g/L de picloram, 64 g/L de equivalente ácido de picloram, 447,22 g/L de 2,4-D, 240 g/L de equivalente ácido de 2,4-D e 596,02 g/L de ingredientes inertes.

### **4.2 Manutenção dos organismos-teste**

As *Drosophila melanogaster* (linhagem Harwich) foram mantidas em incubadora à 25°C, ciclo claro/escuro de 12 h, umidade de 65% e alimentadas com

dieta padrão – farinha de milho, sacarose, glicose, melado, farinha de soja, gérmen de trigo, levedura e ágar.

### 4.3 Desenvolvimento de *D. melanogaster*

A postura de ovos e a avaliação dos diferentes estágios do desenvolvimento de *D. melanogaster* do ovo a pupa, e de pupa a mosca foi realizada de acordo com Golombieski et al. (2008). Para a realização dos tratamentos, foram utilizadas moscas fêmeas virgens. Após 4 dias da separação destas, as moscas foram colocadas para ovopositarem em placas de petri contendo meios de cultura.

Tabela 1 – Diferentes concentrações de herbicidas que foram utilizadas no estudo do desenvolvimento de *D. melanogaster*.

<b>Grupo</b>	<b>% de Palace®</b>	<b>2,4 – D (g/L)</b>	<b>Picloram (g/L)</b>
<b>1</b>	<b>0,011</b>	0,05	0,0128
<b>2</b>	<b>0,022</b>	0,1	0,0256
<b>3</b>	<b>0,112</b>	0,5	0,128
<b>4</b>	<b>0,224</b>	1	0,256

Fonte: A autora, 2017.

Para o tratamento dos ovos, após retirados do meio de ovoposição, os mesmos foram mantidos por 2 min em uma solução de hipoclorito de sódio (NaClO), à 2,5%, para a remoção do córion e adicionados, em seguida, a um meio de tratamento (MgCL<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, glucose, glutamato, glicina, ácido málico e acetato de sódio) com o herbicida em uma curva de concentração (TABELA 1), paralelos à um grupo controle sem a adição de herbicidas. Após 18h, os ovos (10 por grupo) foram transferidos para o meio sólido (ágar, leite em pó e açúcar) sem herbicidas. O desenvolvimento dos indivíduos foi acompanhado diariamente.

Para o tratamento das larvas, 24h após a ovoposição as larvas foram retiradas das placas de petri e expostos às mesmas concentrações do tratamento dos ovos, através do meio sólido (10 larvas por grupo). Os tratamentos foram acompanhados diariamente para observação das mudanças de estágios, e os indivíduos estiveram expostos ao herbicida durante todo o tratamento.

#### 4.4 Estudo da sobrevivência

Para o estudo da sobrevivência, montou-se curvas de sobrevivência com diferentes concentrações dos herbicidas (TABELA 2) paralelos a um grupo controle sem a adição de herbicidas. Um total de 10 indivíduos de até três dias de idade foram colocados em tubos de ensaio contendo discos de papéis filtro no fundo, com 30  $\mu$ L de solução de sacarose 5% contendo a concentração correspondente do herbicida. Os indivíduos foram, então, transferidos a cada 24h para uma solução recentemente preparada, durante 3 dias. A mortalidade foi registrada às 24, 48 e 72h. Moscas fêmeas e machos foram analisados separadamente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 2 - Diferentes concentrações de herbicidas que foram utilizadas no estudo da sobrevivência.

<b>Grupo</b>	<b>% de Palace®</b>	<b>2,4 – D (g/L)</b>	<b>Picloram (g/L)</b>
<b>1</b>	<b>0,224</b>	1	0,256
<b>2</b>	<b>1,12</b>	5	1,28
<b>3</b>	<b>2,24</b>	10	2,56
<b>4</b>	<b>11,2</b>	50	12,8
<b>5</b>	<b>22,4</b>	100	25,6

Fonte: A autora, 2017.

#### 4.5 Análise da habilidade locomotora: geotaxia negativa

O comportamento locomotor (teste de escalada) foi realizado conforme descrito por Jimenez-Delrio et al. (2010), com algumas modificações.

Após transferir as moscas para tubos de ensaio com marcações na altura de 8 cm, os tubos foram suavemente batidos em uma superfície adequada para que as moscas caíssem no fundo do tubo. Cronometrou-se 10 segundos e contou-se o número de moscas que ultrapassou a marca no tubo de ensaio. Este procedimento foi repetido 10 vezes e teve o resultado expresso como a porcentagem média de moscas que ultrapassaram a marca de 8 cm em 10 segundos.

#### 4.6 Atividade da enzima acetilcolinesterase

Para a determinação da atividade da acetilcolinesterase, as moscas tratadas durante 24h tiveram suas cabeças separadas do tórax e abdômen para que fossem homogeneizadas. A homogeneização foi realizada na proporção 1:10 em tampão fosfato de potássio (TFK) a 0,1 M, pH 7,5. Os homogeneizados foram centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos à 4°C, sendo coletados e reservados apenas o sobrenadante para posterior análise.

Para a análise utilizou-se o método de Ellman et al. (1961). O sistema (TFK + DTNB na proporção 4:1) foi incubado com a água e o tecido por 2 minutos, à temperatura ambiente. Após, pipetou-se o substrato (acetilticolina 8mM). A leitura foi realizada no espectrofotômetro à 412 nm por 5 minutos, com intervalos de leitura de 30 segundos, tendo os resultados expressos como  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\u00ednas}^{-1}$ , calculados de acordo com a Equação 1.

$$\frac{\Delta\text{min} \times \text{dilui\u00e7\u00e3o}}{13,6 \times \text{volume de amostra} \times [\text{prote\u00ednas}]}$$

Equação 1

## 4.7 N\u00edveis de ti\u00f3is

Para a determinação nos n\u00edveis de ti\u00f3is, as moscas j\u00e1 tratadas tiveram suas cabe\u00e7as separadas do resto do t\u00f3rax e abd\u00f4men para que fossem homogeneizadas. A homogeneiza\u00e7\u00e3o foi realizada na propor\u00e7\u00e3o 1:10 em tamp\u00e3o fosfato de pot\u00e1ssio (TFK) a 0,1 M, pH 7,5. Os homogeneizados foram centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos \u00e0 4°C, sendo coletados e reservados apenas o sobrenadante para posterior an\u00e1lise.

### 4.7.1 *Tiol total*

Preparou-se as amostras para a leitura utilizando \u00e1gua destilada, DTNB 10mM e TFK 0,1 M, pH 7,5, realizando, a seguir, a leitura em espectrofot\u00f4metro \u00e0 412 nm.

### 4.7.2 *Tiol n\u00e3o-proteico*

Para a quantifica\u00e7\u00e3o de tiol n\u00e3o-proteico, precipitou-se as amostras em \u00e1cido tricloroac\u00e9tico na propor\u00e7\u00e3o 1:2. Ap\u00f3s, as amostras foram centrifugadas por 10

minutos, à 5000 rpm e 4°C e incubadas por 30 minutos com água destilada, DTNB 10mM e TFK 0,1 M, pH 7,5, antes de realizar a leitura em espectrofotômetro à 412 nm.

#### **4.8 Avaliação da produção de EROs**

A produção de espécies reativas foi determinada espectrofluorimetricamente, usando o marcador fluorescente permeável a membrana H<sub>2</sub>-DCFDA de acordo com Lebel et al., 1992 e Garcia-Ruiz et al., 1997;

Para a preparação das amostras, as moscas já tratadas tiveram suas cabeças separadas do tórax e abdômen para que fossem homogeneizadas em solução tampão Tris – HCl 40mM, pH 7,4 na proporção 1:10. Os homogeneizados foram, então, centrifugados à 2000 RPM, durante 3 minutos à 4°C, e o sobrenadante filtrado em musselina.

Para a preparação das amostras as quais realizaram-se leituras, foram utilizados a solução tampão Tris – HCl, a amostra e a diclorofluoresceína diacetato. Após serem adicionadas tais soluções em tubos de ensaio, os mesmos foram armazenados em um local escuro durante 30 minutos. Finalizado este tempo, utilizou-se o espectrofluorímetro para a leitura das amostras, onde foram selecionados os comprimentos de onda – 488 nm para excitação e 522 nm para emissão. Para o branco utilizou-se a solução tampão Tris – HCl, e as amostras de cada grupo foram realizadas em triplicata. O resultado final foi dado como a média dos três valores obtidos para cada grupo.

#### **4.9 Atividade antioxidante total**

O potencial antioxidante total do herbicida foi avaliado pelo método do complexo fosfomolibdênio. O herbicida em estudo foi diluído nas concentrações 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 e 1:50, e os resultados foram comparados com a atividade antioxidante total do 3,5-Di-tert-4-butilhidroxitolueno (BHT) 1000 µM. As amostras foram incubadas à 95°C durante 90min. Depois de arrefecer a mistura até à temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 695 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em relação ao BHT, considerando sua absorbância correspondente a 100% de atividade antioxidante.

#### 4.10 Quantificação de proteínas

O conteúdo de proteína das amostras foi determinado pelo método de Bradford (1976) usando-se albumina bovina como padrão.

#### 4.11 Análise estatística

Para a representação gráfica e análise estatística dos resultados obtidos, empregou-se o software GraphPad Prism 5, versão 5.0. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida do teste pos hoc de Tukey ou pelo teste t não-pareado, sendo considerados estatisticamente significativos valores com  $p < 0,05$ .

### 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1 Desenvolvimento de *D. melanogaster*

Tabela 3 - Efeito da exposição de ovos aos herbicidas 2,4-D e picloram sobre o desenvolvimento de *D. melanogaster*. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão, com  $n = 4$ . A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste pos hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Estágios de desenvolvimento	Palace® (%)				
	0	0,011	0,022	0,112	0,224
Ovos	10	10	10	10	10
Larvas	4,25 $\pm$ 0,75	5,50 $\pm$ 1,50	5,33 $\pm$ 0,33	3,00 $\pm$ 1,08	5
Pupas	4,00 $\pm$ 0,71	3,50 $\pm$ 0,50	5,33 $\pm$ 0,33	2,75 $\pm$ 1,11	4,67 $\pm$ 0,33
Moscas	3,75 $\pm$ 0,75	3,50 $\pm$ 0,50	5	2,67 $\pm$ 1,76	1,67 $\pm$ 1,67

Fonte: A autora, 2017.

Nas TABELAS 3 e 4 são mostrados os resultados obtidos para o desenvolvimento de *D. melanogaster*. A primeira tabela apresenta os dados para o tratamento de ovos e a segunda do tratamento com larvas. A análise estatística foi

realizada por ANOVA de uma via seguida do teste pos hoc de Tukey, e nenhum grupo apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle. Os resultados obtidos mostram uma tendência à redução da sobrevivência durante o desenvolvimento de *D. melanogaster* quando há exposição ao herbicida testado, no entanto esse efeito não é estatisticamente significativo.

Tabela 4 - Efeito da exposição de larvas aos herbicidas 2,4-D e picloram sobre o desenvolvimento de *D. melanogaster*. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão, com n = 5. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste pos hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Estágios de desenvolvimento	Palace® (%)				
	0	0,011	0,022	0,112	0,224
<b>Larvas</b>	10	10	10	10	10
<b>Pupas</b>	3,20 $\pm$	5,50 $\pm$	3,80 $\pm$	4,20 $\pm$	0,60 $\pm$
	1,68	0,50	1,39	1,02	0,60
<b>Moscas</b>	2,80 $\pm$	4,25 $\pm$	3,20 $\pm$	2,80 $\pm$	0,60 $\pm$
	1,71	0,75	1,24	1,50	0,60

Fonte: A autora, 2017.

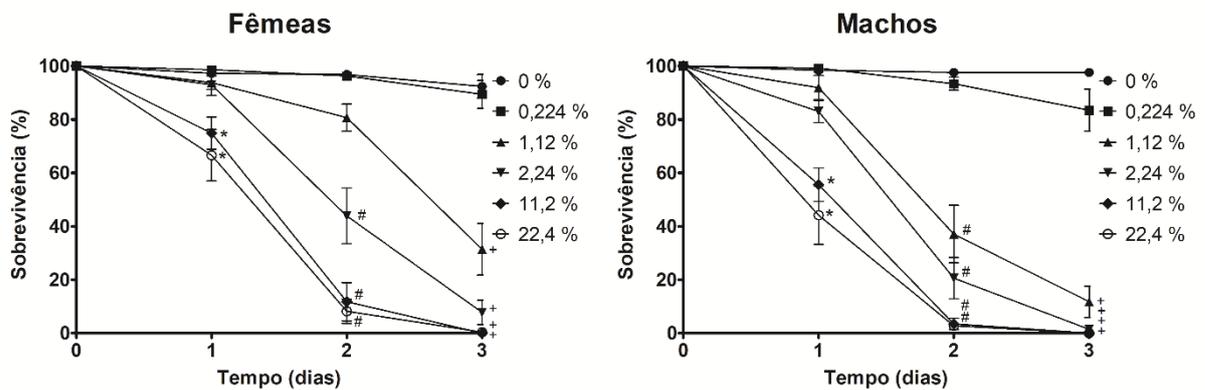
Estudos similares podem ser encontrado na literatura. Em um estudo realizado por Özkan e Yanikolu (1999), foi observado que o 2,4-D, aplicados em várias concentrações, diminuiu a taxa de eclosão e os níveis de glicogênio em ovos de *Pimpla turionellae* que ainda estavam passando por desenvolvimento embrionário. Por outro lado, Somers et al (1978), ao expor ovos de galinhas aos herbicidas 2,4 – D ou picloram, não observou efeitos adversos em qualquer parâmetro usado para avaliar a incubação.

## 5.2 Estudo da sobrevivência

Os resultados obtidos demonstram que a exposição de *D. melanogaster* à associação dos herbicidas 2,4-D e picloram ocasiona mortalidade progressiva de maneira dose-dependente (FIGURA 5). Além disso, observou-se que esta associação possui efeitos potencializados em indivíduos machos. Nas fêmeas, foram observados efeitos estatisticamente significativos nas duas concentrações mais altas de 11,2 e

22,4% já a partir do primeiro dia. Na concentração de 2,24% os efeitos significativos foram observados a partir do segundo dia, e na concentração de 1,12% apenas no terceiro dia. Quanto aos machos, o comportamento apresentado foi similar, no entanto para a concentração de 1,12 % a significância estatística ocorreu a partir do segundo dia do tratamento. A maior sensibilidade dos machos frente ao tratamento, pode ser explicada por diferenças entre os gêneros, como as hormonais.

Figura 5 - Efeito da exposição aos herbicidas 2,4-D e picloram sobre a sobrevivência de *D. melanogaster* em fêmeas e machos, com n = 5. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*Diferença estatística em relação ao grupo controle, em 24h, por ANOVA de 1 via seguido de teste pos hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ). # Diferença estatística em relação ao grupo controle, em 48h, por ANOVA de 1 via seguido de teste pos hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ). + Diferença estatística em relação ao grupo controle, em 72h, por ANOVA de 1 via seguido de teste pos hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ).



Fonte: A autora, 2017.

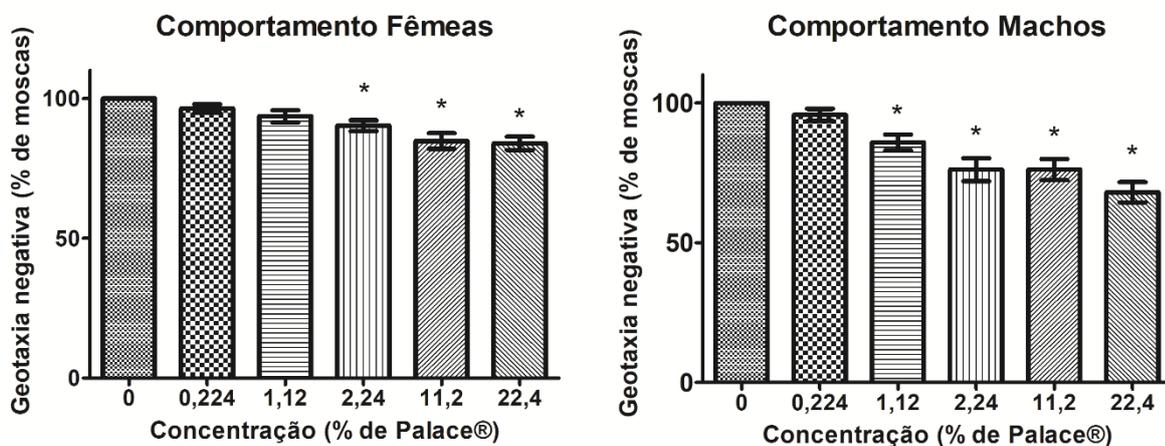
### 5.3 Análise da habilidade locomotora: geotaxia negativa

Quanto ao teste comportamental (FIGURA 6), fica evidente que a co-exposição aos herbicidas levou a uma redução significativa na locomoção quando comparado ao grupo controle e, assim como na análise da mortalidade, os indivíduos machos foram mais afetados pelos efeitos tóxicos dos herbicidas em estudo. Para fêmeas, os resultados foram significativos estatisticamente a partir da concentração e 2,24 %, enquanto para os machos, a significância estatística foi observada a partir da concentração de 1,12 %.

Comportamentos semelhantes já foram observados em outros modelos experimentais expostos aos mesmos herbicidas. Estudos anteriores relataram miotonia temporária em camundongos, ratos, coelhos e cães, após serem expostos

ao herbicida 2,4 – D. Além disso, em um estudo realizado por Hill et al. (1947), foi observado que macacos expostos ao 2,4 – D apresentaram falta de coordenação muscular. Além disso, Browne e Moore (2014) observaram que lagostins expostos à níveis subletais de 2,4 – D apresentaram diminuição na habilidade locomotora. Assim como no estudo da sobrevivência, a menor sensibilidade de fêmeas frente ao tratamento com a associação dos herbicidas 2,4 – D e picloram pode ser explicada devido às diferenças relacionadas ao gênero. Diferenças quanto à sensibilidade de machos e fêmeas à herbicidas já foram observadas previamente, conforme estudo realizado por Figueira et al (2017), o qual comparou o efeito de atrazina em *D. melanogaster*, para fêmeas e machos. Os resultados demonstraram que este herbicida pode afetar o comportamento em *D. melanogaster*, de maneira diferente em fêmeas e machos.

Figura 6 - Efeito da exposição aos herbicidas 2,4-D e picloram sobre o comportamento de escalada em moscas fêmeas e machos, com n = 17. Resultados expressos como média ± erro padrão. \* Diferença estatística em relação ao grupo controle por ANOVA de 1 via seguido de teste pos hoc de Tukey (p<0,05).



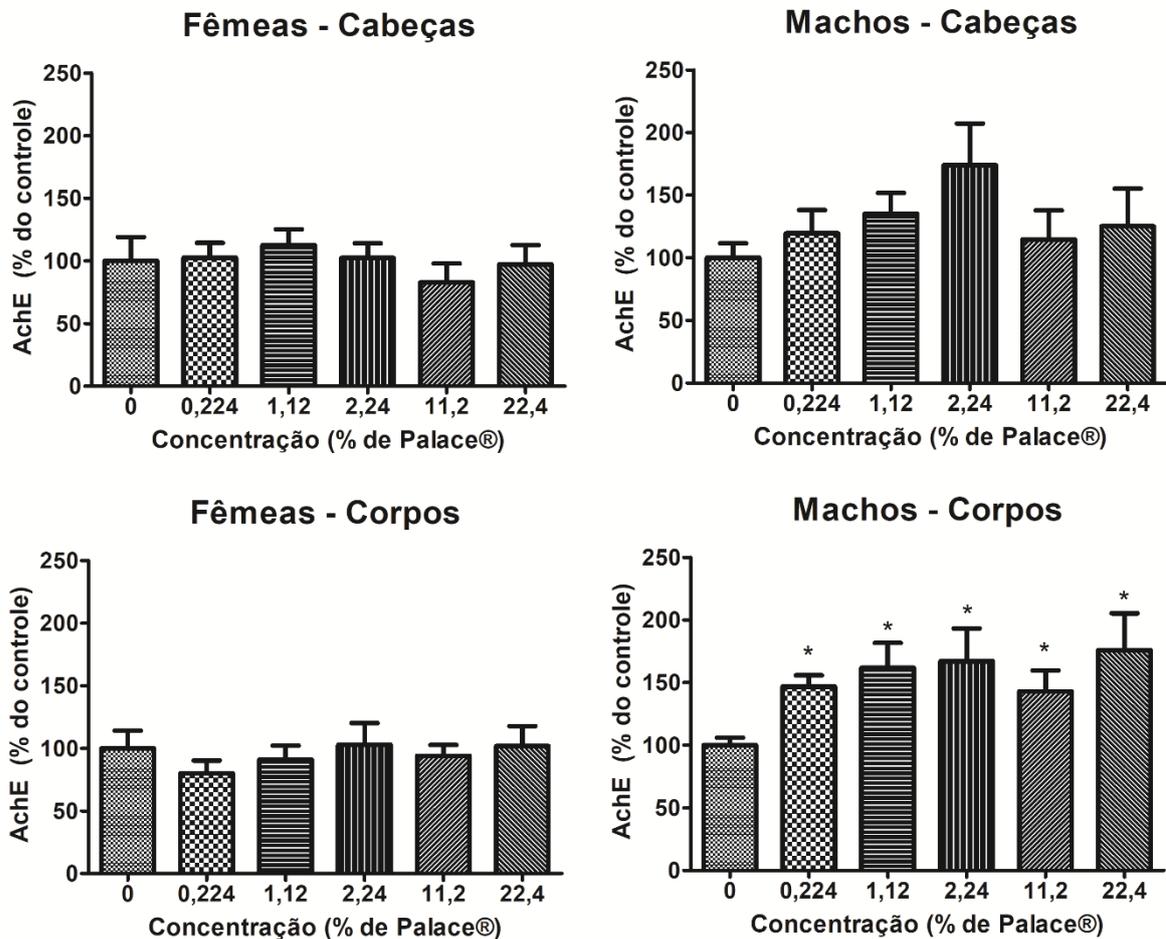
Fonte: A autora, 2017.

#### 5.4 Atividade da enzima acetilcolinesterase

Os resultados obtidos a partir da avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase (FIGURA 7) mostram que a associação dos herbicidas 2,4 – D e picloram não causa efeitos estatisticamente significativos em fêmeas de *D. melanogaster*. Para a análise dos efeitos sobre os corpos de machos, foi observado

aumento estatisticamente significativo da atividade da enzima para todas as concentrações testadas. Quanto às cabeças de machos, foi observada uma tendência ao aumento da atividade da AchE em todas as concentrações, porém este aumento não foi significativo estatisticamente.

Figura 7 - Efeito da exposição aos herbicidas 2,4-D e picloram sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em corpos e cabeças de *D. melanogaster*, com  $n = 5$ . Resultados apresentados separadamente para indivíduos machos e fêmeas e expressos como média  $\pm$  erro padrão. \* Diferença estatística em relação ao grupo controle por teste t ( $p < 0,05$ ).



Fonte: A autora, 2017.

De acordo com os resultados obtidos, a diminuição da capacidade de escalada dos indivíduos testados não parece estar relacionada à atividade da enzima acetilcolinesterase, uma vez que alterações significativas na atividade da enzima só foram observadas no corpo de moscas macho. No entanto, estes resultados evidenciam mais uma vez a maior sensibilidade dos machos frente ao herbicida.

Considerando os resultados obtidos, sugere-se que o composto testado não interfere diretamente no sítio ativo da enzima. É sabido que pesticidas, como os organofosforados e carbamatos, possuem efeitos inibitórios sobre a atividade da AchE, envolvendo, principalmente, o sítio esterásico, formando um complexo muito estável (WIENER e HOFFMAN, 2004). A estabilidade deste complexo está relacionada, principalmente, com a estrutura química do composto, causando menor ou maior inibição da atividade enzimática. Tal inibição é uma reação específica, considerada o principal efeito da exposição aos pesticidas organofosforados (TAYLOR et al., 1995) e carbamatos (METCALF, 1971; MACHEMER e PICKEL, 1994).

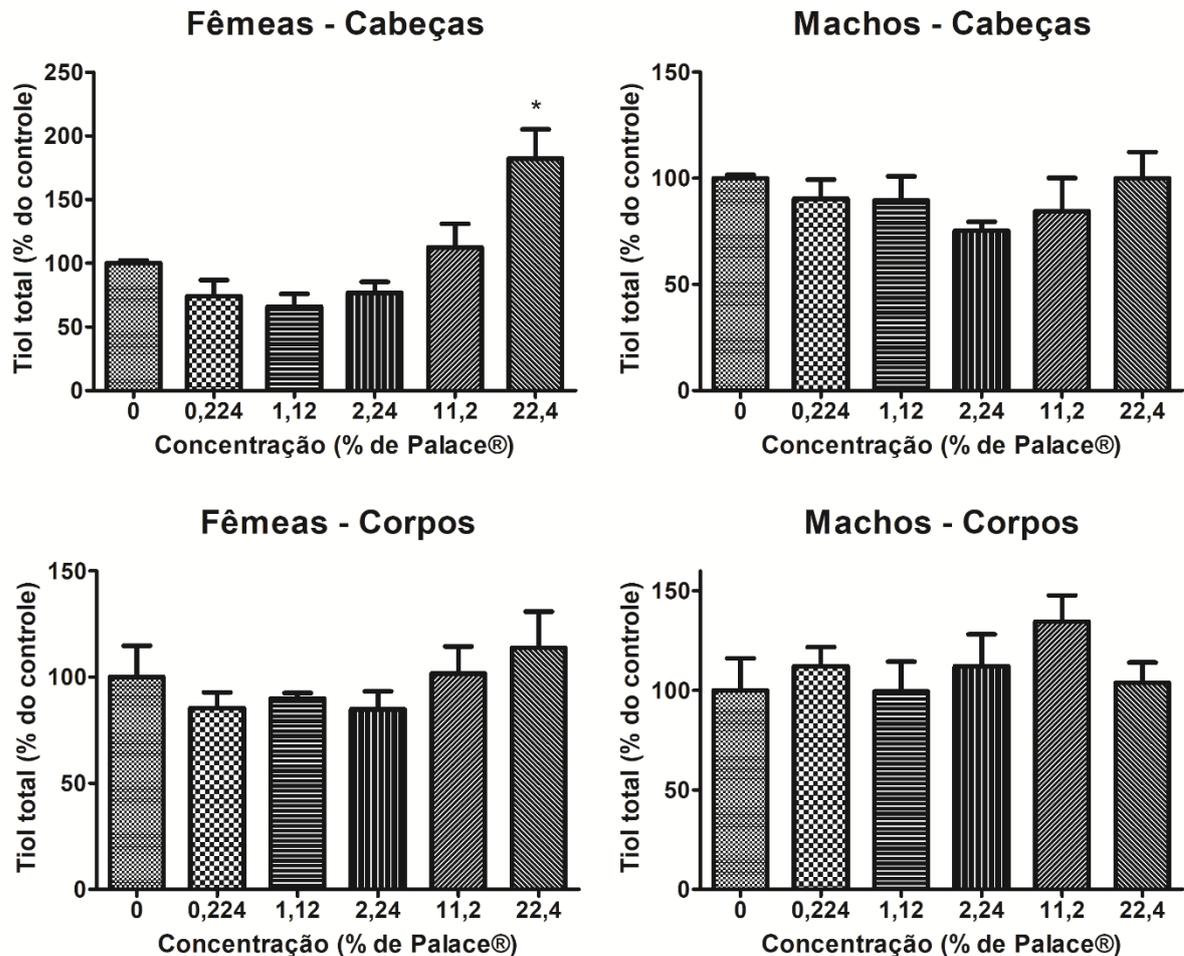
No caso dos herbicidas estudados, por serem compostos ácidos, uma das possíveis explicações para os efeitos apresentados, é a de que suas moléculas não tenham afinidade com o sítio esterásico devido à porção ácida da tríade catalítica. Além disso, os compostos testados podem não interagir diretamente com a enzima AchE, mas podem ter efeito sobre receptores pré- e pós-sinápticos da Ach causando alterações nos níveis de Ach na fenda sináptica. Um aumento da liberação de Ach ou uma inibição do seu receptor poderiam explicar a maior atividade da AchE observado para indivíduos machos através de um efeito compensatório, levando ao aumento na expressão do gene da AchE e, portanto, um aumento da síntese da enzima. Este efeito foi relatado por Shankland e Schroeder (1973), que concluíram em suas investigações sobre os efeitos do dieldrin na função sináptica no sexto gânglio abdominal da barata americana, que este pesticida organoclorado exerce sua ação na membrana pré-sináptica de sinapses colinérgicas e atua causando a liberação excessiva e espontânea de ACh de locais de armazenamento pré-sinápticos. Outra possível explicação para os resultados encontrados, seria a atuação dos pesticidas organoclorados no fluxo de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , como em estudo realizado por Davis e Wedemeyer (1971), onde levantou-se a possibilidade de que a inibição da atividade de ATPase ativada por  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  nos órgãos vitais envolvidos no transporte de sódio possa ser um fator causal nos efeitos subletais crônicos e na letalidade aguda de pesticidas organoclorados em peixes. A inibição da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase também pode afetar a sinalização pela Ach interferindo na sua ação.

## **5.5 Níveis de tióis**

### 5.5.1 Tiol total

Para os níveis de tiol total (FIGURA 8), os valores obtidos em cabeças de fêmeas apresentaram ascensão com o aumento da concentração de herbicida, sendo que a concentração de 22,4% apresentou resultado significativo quando comparado ao grupo controle. Tal resultado pode sugerir uma resposta adaptativa compensatória induzida pela maior concentração do herbicida, aumentando os níveis de tióis totais e assim, melhorando as defesas celulares frente à toxicidade do herbicida. Não houve diferenças significativas entre o controle e os grupos tratados com herbicida quanto aos níveis de tióis totais na cabeça de moscas macho e no corpo de machos e fêmeas.

Figura 8 - Efeitos da exposição de *D. melanogaster* aos herbicidas 2,4-D e picloram sobre os níveis de tiol total em corpos e cabeças. Resultados apresentados separadamente para indivíduos machos e fêmeas e expressos como média  $\pm$  erro padrão, com  $n = 6$ . A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste pos hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ).

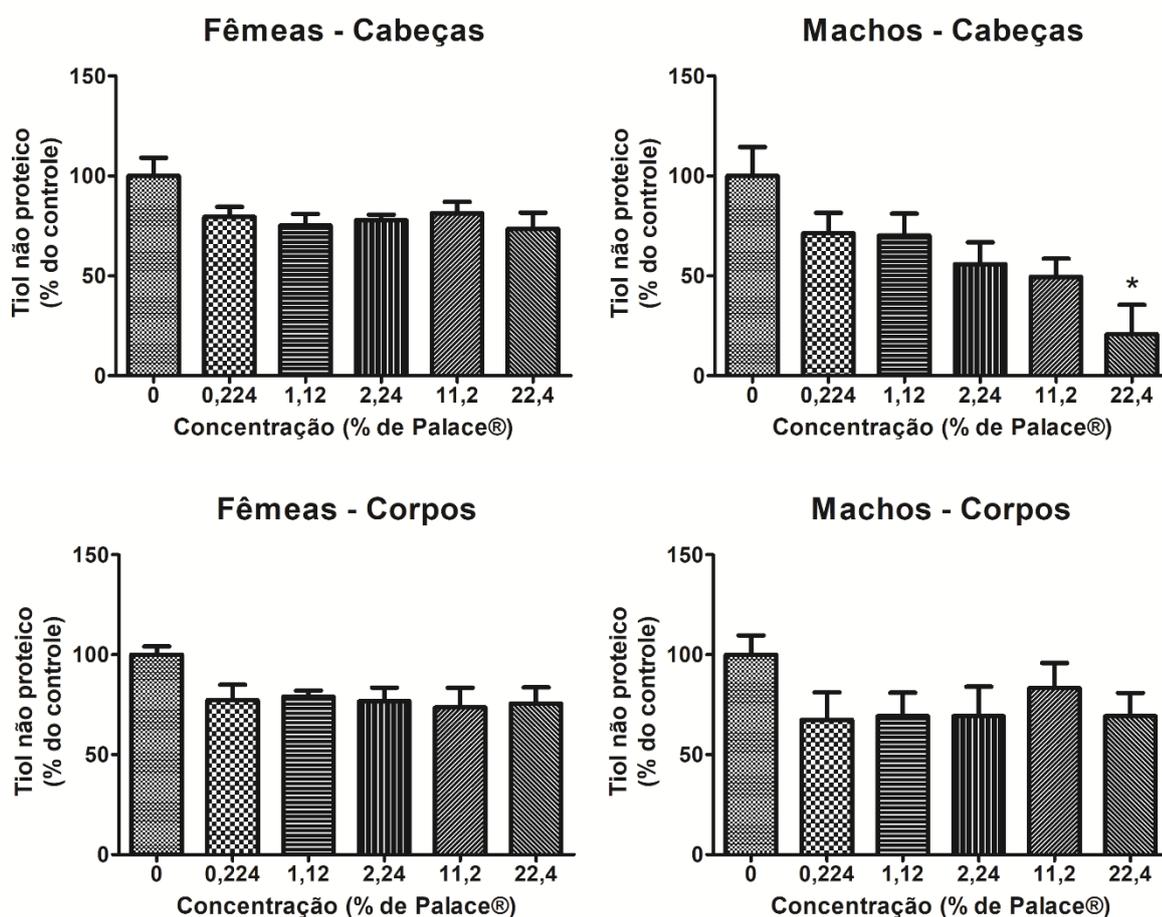


Fonte: A autora, 2017.

### 5.5.2 Tiol não proteico

Na FIGURA 9 são apresentados os resultados obtidos para os níveis de tiol não proteico. Nos tratamentos realizados, observou-se que os níveis de tiol não proteico possuem tendência a diminuir com o aumento da concentração de herbicida, apresentando resultados significativos em comparação com o grupo controle, apenas na concentração de 22,4% em cabeças de machos.

Figura 9 - Efeitos da exposição de *D. melanogaster* aos herbicidas 2,4-D e picloram sobre os níveis de tiol não proteico. Resultados apresentados separadamente para indivíduos machos e fêmeas e expressos como média  $\pm$  erro padrão, com  $n = 6$ . A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste pos hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ).



Fonte: A autora, 2017.

Considerando que os níveis de tióis não proteicos representam a quantificação dos níveis de GSH, o qual está envolvido na detoxificação de xenobióticos, acreditamos que a diminuição dos níveis de tiol não proteico esteja relacionada com

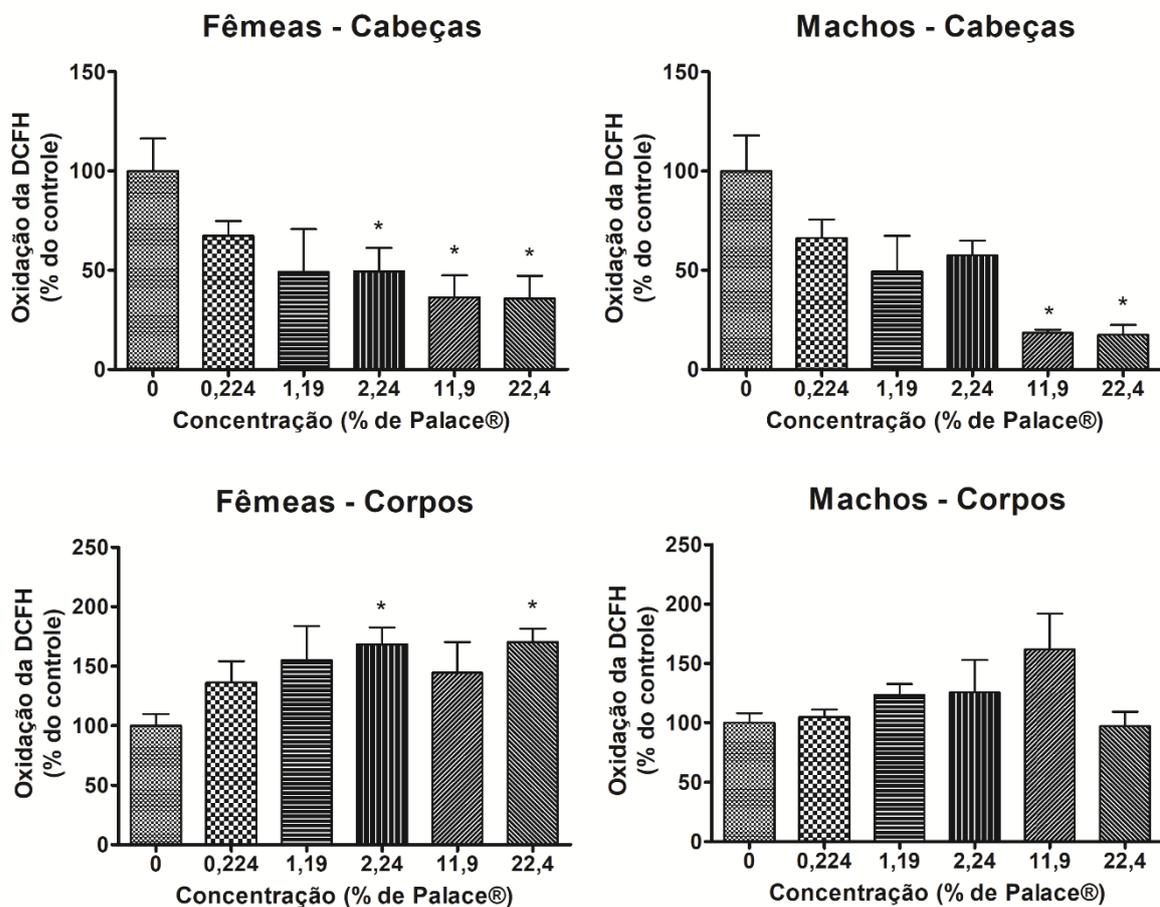
a depleção dos níveis de GSH devido à sua ligação e consequente eliminação com o herbicida.

## 5.6 Avaliação da produção de EROs

Os resultados obtidos demonstram que a associação dos herbicidas picloram e 2,4-D diminui a produção de EROs em cabeças de *D. melanogaster* para todas as concentrações testadas em machos e fêmeas, sendo significativos os resultados obtidos nas concentrações iguais ou superiores à 2,24%. Para os corpos de fêmeas de *D. melanogaster*, apenas as concentrações de 2,24% e 22,4% apresentaram resultados significativos estatisticamente em relação ao grupo controle (FIGURA 10).

Figura 10 - Efeito da exposição aos herbicidas 2,4-D e picloram sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em corpos e cabeças de *D. melanogaster*, com n = 5. Resultados apresentados separadamente para indivíduos machos e fêmeas e expressos como média ± erro padrão. \*

Diferença estatística em relação ao grupo controle por teste t ( $p < 0,05$ ).



Fonte: A autora, 2017.

Tais resultados demonstram que a neurotoxicidade induzida pelo herbicida em *D. melanogaster* não parece estar relacionada ao aumento da produção de espécies reativas e sim, a outros mecanismos de toxicidade. No entanto, o herbicida foi capaz de aumentar a produção de espécies reativas no corpo de *D. melanogaster* evidenciando mecanismos de ação diferentes do herbicida na cabeça e no corpo. Estas diferenças entre os tecidos podem estar relacionadas a diferentes alvos moleculares ou a diferentes metabólitos dos compostos presentes no herbicida.

### 5.7 Atividade antioxidante total

Na TABELA 5 são apresentados os resultados da atividade antioxidante total do herbicida Palace®. Os resultados demonstram que a diluição 1/10 (44,72 g/L de 2,4 – D e 11,48 g/L de picloram), possui atividade antioxidante maior que a do BHT, utilizado como referência no ensaio. Tais resultados indicam que o composto pode exercer atividade antioxidante, capturando espécies reativas de oxigênio, o que justificaria a diminuição da oxidação da DCFH, conforme apresentado na FIGURA 10. Esses resultados podem ser explicados a partir da análise da estrutura molecular do 2,4-D e do picloram devido à presença de hidroxilas que poderiam atuar na neutralização das espécies reativas de oxigênio.

Tabela 5 -Capacidade antioxidante total (%) para diferentes concentrações de 2,4-D e picloram, quantificadas pelo método do complexo de fosfomolibdênio. A porcentagem foi calculada usando BHT 1000 µM como 100%. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão para três diferentes ensaios.

Diluição	1/10	1/20	1/30	1/40	1/50
% de Palace®	10	5	3,33	2,5	2
AAT (%)	130,70 ± 4,70	58,70 ± 20,25	46,39 ± 5,48	30,15 ± 1,92	52,12 ± 7,52

Fonte: A autora, 2017.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De maneira geral, a associação dos herbicidas 2,4 – D e picloram apresentou toxicidade em *D. melanogaster*, interferindo de maneira variada em todos os testes

realizados. No entanto, mais estudos serão necessários para investigar o exato mecanismo de toxicidade dos herbicidas.

Na avaliação da sobrevivência, habilidade locomotora, atividade da enzima acetilcolinesterase e dos níveis de tiol não proteico, fica evidente a maior sensibilidade dos indivíduos machos aos herbicidas testados.

Desta forma, recomenda-se, para estudos futuros, investigar o efeito da associação dos herbicidas 2,4 – D e picloram sobre a expressão gênica da AchE e de genes envolvidos em vias relacionadas às defesas celulares, bem como a atividade de enzimas antioxidantes em moscas machos e fêmeas. Além disso, recomenda-se a realização de testes de genotoxicidade, como o ensaio cometa, a fim de se investigar outros possíveis mecanismos de toxicidade dos herbicidas.

## REFERÊNCIAS

- ACIOLE, E. E. P. et al. Genetic toxicity of dillapiol and spinosad larvicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Pest management science**, v. 70, n. 4, p. 559-565, 2014.
- ADAMS M. D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 287, n. 5461, p. 2185-2195, 2000.
- ADAMS, H. R. Drogas que Atuam Sobre os Sistemas Nervosos Somático e Autonômico. **BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. Farmacologia e Terapêutica em Veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.** p. 57-109, 1992.
- AFFLECK J. G.; WALKER V. K. A role for *Drosophila* in understanding drug-induced cytotoxicity and teratogenesis. **Cytotechnology**, v. 57, n. 1, p. 1-9, 2008.
- ALI, S. F.; LEBEL, C. P.; BONDY, S. C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 13, n. 3, p. 637-648, 1991.
- ALTERMAN, M. K.; NEPTUNE, A. M. L. Efeito do ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) na absorção do fósforo (<sup>32</sup>P) pelo trigo (*Triticum aestivum*, L) e a sua distribuição na planta. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 34, p. 541-550, 1977.
- AMARANTE JUNIOR, O. P. et al. Revisão das propriedades, usos e legislação do Ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D). **Cad. Pesq**, v. 13, n. 1, p. 60-70, 2002.
- ARAÚJO, M. C. **Caracterização da acetilcolinesterase cerebral do ciclídio jaguar (*Parachromis managuensis*) e seu potencial como biomarcador de pesticidas e íons metálicos.** Recife, 2015.
- BAIRD, C.; CANN, M. **Química ambiental.** Tradução de Marco Tadeu Grassi. 2011.
- BALINT, T. et al. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin. **Aquatic Toxicology**, v. 33, n. 3-4, p. 279-295, 1995.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 113, 2006.
- BERNDT, W. O.; KOSCHIER, F. In vitro uptake of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) and 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid (2, 4, 5-T) by renal cortical tissue of rabbits and rats. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 26, n. 4, p. 559-570, 1973.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 34, de 16 de agosto de 2010.** Disponível em: <[http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GSV/Agrotoxicos/lf\\_7\\_resolucao\\_RDC\\_34\\_de\\_2010.pdf](http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GSV/Agrotoxicos/lf_7_resolucao_RDC_34_de_2010.pdf)>. Acesso em 14 abr. 2017.

\_\_\_\_\_. **Lei nº 7802 de 11 de julho de 1989.** Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/L7802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7802.htm)>. Acesso em 14 abr. 2017.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 36, de 24 de novembro de 2009.** Disponível em: <[http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/Legislacao/Sanidade\\_Vegetal/Agrotoxicos/IN\\_SDA\\_036\\_09.pdf](http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/Legislacao/Sanidade_Vegetal/Agrotoxicos/IN_SDA_036_09.pdf)>. Acesso em 14 abr. 2017.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa SDA nº 42, de 5 de dezembro de 2011.** Disponível em: <[http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/Legislacao/Sanidade\\_Vegetal/Agrotoxicos/IN\\_SDA\\_042\\_11.pdf](http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/Legislacao/Sanidade_Vegetal/Agrotoxicos/IN_SDA_042_11.pdf)>. Acesso em 14 abr. 2017.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. **Portaria n. 2914 de 12 de dezembro de 2011.** Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/maio/25/Portaria-MS-no-2.914-12-12-2011.pdf>>. Acesso em: 04 jun. 2016.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano.** Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

\_\_\_\_\_. Ministério do Meio Ambiente. **Agrotóxicos.** Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotóxicos>>. Acesso em 14 abr. 2017.

\_\_\_\_\_. Ministério do Meio Ambiente. **Decreto nº 4074 de 04 de janeiro de 2002.** Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=515>>. Acesso em 14 abr. 2017.

\_\_\_\_\_. Ministério do Meio Ambiente. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005.** Disponível em <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em 20 mai. 2017.

\_\_\_\_\_. Ministério do Meio Ambiente. **Resolução nº 396, de 03 de abril de 2008.** Disponível em <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=562>>. Acesso em 20 mai. 2017.

BROWNE, A. M.; MOORE, P. A. The effects of sublethal levels of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide (2, 4-D) on feeding behaviors of the crayfish *O. rusticus*. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 67, n. 2, p. 234-244, 2014.

BUCHER, N. L. R. Effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on experimental animals. **Experimental Biology and Medicine**, v. 63, n. 1, p. 204-205, 1946.

CADENAS, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. **Biofactors**, v. 6, n. 4, p. 391-397, 1997.

CAMPOS J. L. et al. The relation between recombination rate and patterns of molecular evolution and variation in *Drosophila melanogaster*. **Molecular biology and evolution**, v. 31, n. 4, p. 1010-1028, 2014.

CARMO, M. L. et al. Seleção de plantas para fitorremediação de solos contaminados com picloram. **Planta Daninha**, v. 26, n. 2, p. 301-313, 2008

CARVALHO, L. B. **Herbicidas**. Lages, SC, 62 p. 2013.

CELOTTO, A. M.; PALLADINO, M. J. *Drosophila*. **Molecular Interventions**, v. 5, n. 5, p. 292, 2005.

CHASIN, A. A. M.; AZEVEDO, F. A. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2003.

CLARK, D. E. et al. Residues of chlorophenoxy acid herbicides and their phenolic metabolites in tissues of sheep and cattle. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 23, n. 3, p. 573-578, 1975.

COMPORTI, M. Three models of free radical-induced cell injury. **Chemico-biological interactions**, v. 72, n. 1-2, p. 1-56, 1989.

CORTET, J. et al. Effects of pesticides on organic matter recycling and microarthropods in a maize field: use as a discussion of the litterbag methodology. **European journal of soil biology**, v. 38, n. 3, p. 261-265, 2002.

COSTA, C. N. et al. Contaminantes e poluentes do solo e do ambiente. **EJ Meurer. Fundamentos de química do solo**. 2ª ed. Porto Alegre, 209 p, 2004.

COYNE, Jerry A.; BUNDGAARD, Jorgen; PROUT, Timothy. Geographic variation of tolerance to environmental stress in *Drosophila pseudoobscura*. **The American Naturalist**, v. 122, n. 4, p. 474-488, 1983.

DALLEGRAVE E.; FERREIRA E. M.; SARTORI A. S. Intoxicações por agrotóxicos reportadas ao Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul com ênfase em herbicidas. **Centro De Informação Toxicológica. Toxivigilância–Toxicologia Clínica: dados e indicadores selecionados**, Rio Grande do Sul. 2005.

D'ANTONINO, L. et al. Efeitos de culturas na persistência de herbicidas auxínicos no solo. **Planta Daninha**, v. 27, n. 2, p. 371-378, 2009.

DAVIS, P. W.; WEDEMEYER, G. A. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-activated-ATPase inhibition in rainbow trout: a site for organochlorine pesticide toxicity?. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 823-827, 1971.

DE OLIVEIRA JR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. 362p, 2011.

DEUBERT, K. H.; CORTE-REAL, I. Soil residues of picloram and triclopyr after selective foliar application on utility rights-of-way. **Journal of arboriculture**, v. 12, n. 11, p. 269-272, 1986.

DOBZHANSKY, Th. Fecundity in *Drosophila pseudoobscura* at different temperatures. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 71, n. 3, p. 449-464, 1935.

DRILL, V. A. et al. Toxicity of 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid and 2, 4 5-Trichlorophenoxyacetic Acid. A Report on their Acute and Chronic Toxicity in Dogs. **Arch. Indust. Hyg. & Occupational Med.**, v. 7, n. 1, p. 61-7, 1953.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70-77, 1959.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

FANG, Y. Z.; YANG S, W. U. G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, n. 10, p. 872-879, 2002.

FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, p. 32-39, 2007.

FERRER, A.; CABRAL, R. Toxic epidemics caused by alimentary exposure to pesticides: a review. **Food Additives and Contaminants**, v.8, p.755-776, 1991.

FIGUEIRA, F. H.; DE AGUIAR, L. M.; DA ROSA, C. E. Embryo-larval exposure to atrazine reduces viability and alters oxidative stress parameters in *Drosophila melanogaster*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 191, p. 78-85, 2017.

FLORES, A. V. et al. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 111-124, 2004.

FLORSHEIM, W. H.; VELCOFF, S. M. Some Effects of 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid on Thyroid Function in the Rat: Effects on Iodine Accumulation. **Endocrinology**, v. 71, n. 1, p. 1-6, 1962.

FLYBASE – **A Database of *Drosophila* Genes & Genomes**. Disponível em <<http://flybase.org/>> Acesso em 24 abr. 2017.

GALLAGHER, E. P.; DI GIULIO, R. T. Effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and picloram on biotransformation, peroxisomal and serum enzyme activities in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Toxicology letters**, v. 57, n. 1, p. 65-72, 1991.

GARCÍA-RUIZ, C. et al. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species Role of mitochondrial glutathione. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 17, p. 11369-11377, 1997.

GILLHAM, B.; PAPACHRISTODOULOU, D. K.; THOMAS, J. H. **Wills: biochemical basis of medicine**. 3. ed. 494 p. 1997.

GOLOMBIESKI, R. M. et al. Over-activation of the *Drosophila melanogaster* hsp83 gene by selenium intoxication. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 128-135, 2008.

GOULART, A. C. P. Tratamento de Sementes de milho (zea mays l.) com fungicidas. **Revista brasileira de Sementes**, v. 15, n. 2, p. 165-169, 1993.

GRAILLOT, V. et al. Genotoxicity of pesticide mistures present in the diet of the French population. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 53, n. 3, p. 173-184, 2012.

GUILOSKI, I. C. et al. Atividade da colinesterase em cérebro e músculo de *Corydoras paleatus* (Pisces, Teleostei) expostos ao carbaril. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient**, v. 8, n. 4, p. 461-468, 2010.

GUPTA S. C. et al. Comparative toxic potential of Market formulation of two organophosphate pesticides in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ). **Cell biology and toxicology**, v. 21, n. 3-4, p. 149-162, 2005.

HALLIWELL, B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 23, n. Suppl. 1, p. 118-126, 1993.

HAYES JUNIOR, W. J. **Toxicology of pesticides**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1975, 53p.

HE, H. Z. et al. Acute toxicity of butachlor and atrazine to freshwater green alga *Scenedesmus obliquus* and cadoceran *Daphnia carinata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 80, p. 91-96, 2012.

HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 107, n. 5, p. 401, 1986.

HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes: noções gerais**. Londrina, Embrapa Soja, 52p, 2005.

HILL, E. V. et al. Toxicity of 2, 4 Dichlorophenoxyacetic Acid for Experimental Animals. **Indust. Hyg. & Toxicol.**, v. 29, n. 2, p. 85-95, 1947.

HIRATA, R. et al. Detecção de inseticidas por bioensaio com *Drosophila melanogaster*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 3, p. 97-102, 2002.

HOFFMANN, A. A. et al. **Evolutionary genetics and environmental stress**. Oxford University Press, 1991.

IBGE. **Indicadores de desenvolvimento sustentável: Brasil 2015** / IBGE, Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais [e] Coordenação de Geografia. – Rio de Janeiro: IBGE, 2015.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. **Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva Acerca dos Agrotóxicos**. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento\\_do\\_inca\\_sobre\\_os\\_agrotoxicos\\_06\\_abr\\_15.pdf](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf)>. Acesso em 09 abr. 2017.

INDUSTRY Task Force II on Research Data. **2,4-D**. Disponível em < <http://24d.org/>>. Acesso em 11 jun 2017.

INOUE, M. H.; DE OLIVEIRA JR, R. S. Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, p. 193-214, 2011.

JIMENEZ-DEL-RIO, M.; GUZMAN-MARTINEZ, C.; VELEZ-PARDO, C. The effects of polyphenols on survival and locomotor activity in *Drosophila melanogaster* exposed to iron and paraquat. **Neurochemical Research**, v. 35, n. 2, p. 227-238, 2010.

JOY, V. V.; PRAMANIK, R.; SARKAR, K. Biomonitoring insecticide pollution using nontarget soil micro arthropods. **Journal of environmental biology/Academy of Environmental Biology**, India, v. 26, n. 3, p. 571-577, 2005.

KEDAR, N. P. Can we prevent Parkinson's and Alzheimer's disease? **Journal of postgraduate medicine**, v. 49, n. 3, p. 236, 2003.

KEHRER, J. P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Critical reviews in toxicology**, v. 23, n. 1, p. 21-48, 1993.

KHANNA, S.; FANG, S. C. Metabolism of C14-labeled 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 500-503, 1966.

KOGL F., HAAGEN-SMIT A. J. Uber die chemie des wuchsstoffs. **Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie Van Wetenschappen**, 1931.

LARA W. H.; BATISTA, G. C. Pesticidas. **Química Nova**, v.15 n.2, p.161-166, 1992.

LAVINGTON, E. et al. A small system—high-resolution study of metabolic adaptation in the central metabolic pathway to temperate climates in *Drosophila melanogaster*. **Molecular biology and evolution**, v. 31, n. 8, p. 2032-2041, 2014.

LAVORENTI, A.; PRATA, F.; REGITANO, J. B. Comportamento de pesticidas em solos: fundamentos. **Tópicos em ciência do solo**, v. 3, p. 291-334, 2003.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical research in toxicology**, v. 5, n. 2, p. 227-231, 1992.

LEE Y. C. G.; Langley C. H.; Begun D. J. Differential strengths of positive selection revealed by hitchhiking effects at small physical scales in *Drosophila melanogaster*. **Molecular biology and evolution**, v, 31, n. 4, p. 804-816, 2014.

LENG, M. L. **Comparative metabolism of phenoxy herbicides in animals**. Academic Press, New York, 1977.

LIMA, C. D. S. **Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* para a avaliação do potencial genotóxico do metabólito secundário de *Serratia marcescens*, a Prodigiosina**. Pernambuco, 2014.

LIMA, L. M. et al. **Anais Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, 13. Florianópolis, Brasil, 21-26 abril 2007, INPE, 2007, p. 3397-3404.

MACHEMER, L.H.; PICKEL, M. Carbamates Insecticides. **Toxicology**. v. 91, p. 29-36, 1994.

MANTOVANI, E. C. et al. **Modelagem de lixiviação do herbicida picloram através de lisímetro de drenagem sob vegetação de *Brachiaria decumbens***. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola, Campinas, SP. 141p. 2007.

MARIANI, E. et al. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. **Journal of Chromatography B**, v. 827, n. 1, p. 65-75, 2005.

MCLEAY, M. J.; HALL, K. J. Monitoring agricultural drainage ditches and the receiving water (Nicomekl River, Surrey, BC) for toxicity to *Ceriodaphnia dubia* and probable cause due to organophosphate contamination. **Water Quality Research Journal of Canada**, v.34, n.3, p.423-453, 1999.

MCLENNAN, M. W. 2,4-D Toxicity In Dairy Cattle. **Australian veterinary journal**, v. 50, n. 12, p. 578-578, 1974.

METCALF, R. L. Session I – The Inhibition of Esterases by Organophosphorus Compounds and Carbamates: Structure – activity relationships for insecticidal carbamates. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 44, n. 1-2-3, p. 43, 1971.

MEYDANI, M. Nutrition Interventions in Aging and Age-Associated Disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 928, n. 1, p. 226-235, 2001.

MITCHELL, J. W.; HAMNER, C. L. Polyethylene glycols as carriers for growth-regulating substances. **Botanical Gazette**, v. 105, n. 4, p. 474-483, 1944.

MORATORE, C. et al. Utilização de *Drosophila melanogaster* como bioindicador na avaliação da letalidade de extrato de *Nicotiana tabacum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 3, p. 471-474, 2009.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras, Universidade Federal de Lavras. 625p, 2002.

\_\_\_\_\_. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2.ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras. 729p, 2006.

MUSUMECI, M. R. Defensivos agrícolas e sua interação com a microbiota do solo. **Microbiologia do solo, Campinas: Sociedade Brasileira do Sol**, p. 341-360, 1992.

MUNKVOLD, G. O.; SWEERS, L.; WINTERSTEEN, W. Iowa Commercial Pesticide Applicator Manual. **Seed Treatment**. Ames, Iowa. Iowa State University, 35 p. 2006.

MUZIK, T. J. Influence of environmental factors on toxicity to plants. **Herbicides: Physiology**, 1976.

NARCISO, L. E.; NAKAGAWA, E. S. Análise de praguicidas por bioensaio com mosca *Drosophila melanogaster* e cromatografia em camada delgada. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 2, p. 313-316, 2009.

NASCIMENTO, E. R.; YAMASHITA, O. M. Desenvolvimento inicial de olerícolas cultivadas em solos contaminados com resíduos de 2,4-D + picloram. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 47-54, 2009.

NICHOLS, C. D. *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. **Pharmacology & therapeutics**, v. 112, n. 3, p. 677-700, 2006.

NWANI, C. D. et al. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 314-322, 2011.

OAKES, D. J. et al. A study of the potential for a herbicide formulation containing 2, 4-D and picloram to cause male-mediated developmental toxicity in rats. **Toxicological Sciences**, v. 68, n. 1, p. 200-206, 2002a.

\_\_\_\_\_. Testicular changes induced by chronic exposure to the herbicide formulation, Tordon 75D® (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and picloram) in rats. **Reproductive Toxicology**, v. 16, n. 3, p. 281-289, 2002b.

OLIVEIRA, I. G. et al. Avaliação comparativa dos efeitos tóxico-genéticos da própolis em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, portadoras de diferentes níveis de enzimas de metabolização. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 4, n. 1, p. 64-69, 2007.

OLIVEIRA, R. et al. AChE inhibition as a biomarker for pollutants contamination in tropical aquatic ecosystems. **Biomedical and Health Research-Commission of the European Communities Then los Press**, v. 63, p. 103, 2005.

ÖZKAN, A.; YANIKOLU, A. Effects of 2, 4-D and maleic hydrazide on the glycogen level in the embryonic development of *Pimpla turionellae* (L.)(Hym., Ichneumonidae). **Journal of applied entomology**, v. 123, n. 4, p. 211-216, 1999.

PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacological reviews**, v. 63, n. 2, p. 411-436, 2011.

PAULINO, C. A.; PALERMO-NETO, J. Effects of acute 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid intoxication on some rat serum components and enzyme activities. **Brazilian journal of medical and biological research: Revista brasileira de pesquisas medicas e biológicas/ Sociedade Brasileira de Biofísica**. v. 24, n. 2, p. 195-198, 1991.

PAYNE, J. F. et al. Acetylcholinesterase, na old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Marine Pollution Bulletin** v. 32, n. 2, p. 225-231, 1996.

PETERSON, D. E. et al. **Herbicide mode of action**. Kansas State University, 24p, 2001.

POWELL J. R. Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The *Drosophila* Model. **Oxford University Press**, NY. 1997.

PRADO, A. G. S.; VIEIRA, E. M.; REZENDE, M. O. O. Avaliação das quantidades crônicas do herbicida 2,4-D aplicadas no solo baseada em estudos de adsorção/dessorção. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 47, n. 3, p. 239-246, 1998.

PRIMEL, E. G. et al. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 605-609, 2005.

REUBER, M. D. Carcinogenicity of picloram. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues**, v. 7, n. 2, p. 207-222, 1981.

RODRIGUES, B. N.; DE ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. Ed. dos autores, 1998.

RODRIGUES, M. V. N.; SERRA, G. E. Determinação de resíduos de 2,4-D em amostras vegetais. **Pesticidas**, V. 6, p.99-104, 1996.

RÖMBKE, J.; GARCIA, M. V.; SCHEFFCZYK, A. Effects of the fungicide benomyl on earthworms in laboratory tests under tropical and temperate conditions. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 53, n. 4, p. 590-598, 2007.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. **Membrane lipid oxidation**, v. 2, p. 151-170, 1991.

RUEGG, E. F. et al. O impacto dos agrotóxicos sobre o ambiente, a saúde e a sociedade. In: **Coleção Brasil. Agrícola**. Ícone, 1986.

SANFELIU, C.; SEBASTIÀ, J.; KIM, S. U. Methylmercury neurotoxicity in cultures of human neurons, astrocytes, neuroblastoma cells. **Neurotoxicology**, v. 22, n. 3, p. 317-327, 2001.

SARAFIAN, T. A. Methylmercury-induced generation of free radicals: biological implications. **Metal ions in biological systems**, v. 36, p. 415-444, 1999.

SCHAEFFER, S. W. et al. Polytene chromosomal maps of 11 *Drosophila* species: the order of genomic scaffolds inferred from genetic and physical maps. **Genetics**, v. 179, n. 3, p. 1601-1655, 2008.

SHAVGULIDZE, M. M.; NANOBASHVILI, V. I.; MIRIANASHVILI, M. N. Toxicity of the herbicide 2,4-D. **Veterinariia Mosk**, 1976.

SEAB – Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Paraná. Disponível em <<http://celepar07web.pr.gov.br/agrotoxicos/pesquisar.asp>>. Acesso em 21 mar. 2017

SHANKLAND, D. L.; SCHROEDER, M. E. Pharmacological evidence for a discrete neurotoxic action of dieldrin (HEOD) in the American cockroach, *Periplaneta americana* (L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 3, n. 1, p. 77-86, 1973.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. **Current opinion in pharmacology**, v. 5, n. 3, p. 293-302, 2005.

SILVA, A. A.; SILVA, J. F. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p. 189-248, 2007.

SILVA, C. A. M. et al. A. Mortalidade por intoxicações agudas graves: análise dos casos atendidos pelo Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul, 1997-2004. **Toxicovigilância – Toxicologia Clínica: dados e indicadores selecionados**, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 49-54, 2006.

SINGH, N. D. et al. Fine-scale heterogeneity in crossover rate in the garnet-scalloped region of the *Drosophila melanogaster* X chromosome. **Genetics**, v. 194, n. 2, p. 375-387, 2013.

SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. **Princípios de toxicologia ambiental**. Rio de Janeiro. Interciência, 2013.

SOMERS, J. D.; MORAN, E. T.; REINHART, B. S. Hatching success and early performance of chicks from eggs sprayed with 2,4-D, 2,4,5-T and picloram at various stages of embryonic development. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 20, n. 1, p. 289-293, 1978.

STEFFEN, G. P. K.; STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I. Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. **Tecno-Lógica**, v. 15, n. 1, p. 15-21, 2011.

STRICKBERGER, M. W. **Experiments in genetics with *Drosophila***. New York: John Wiley and Sons. P. 144, 1962.

STURM, A. et al. Different sensitivity to organophosphates of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase from Three-spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*)

application in biomonitoring. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 6, p. 1607-1615, 2000.

TARDIVO, M. **Determinação de compostos organoclorados em espécies de insetos aquáticos e peixes dos rios da bacia do Betari, Vale do Ribeira-SP**. Tese de Doutorado. 2004

TAYLOR, Palmer et al. Structural bases for the specificity of cholinesterase catalysis and inhibition. **Toxicology letters**, v. 82, p. 453-458, 1995.

TÓTH, I. et al. The possible cellular mechanism of 2, 4-dichlorophenoxyacetate-induced myopathy. **FEBS letters**, v. 82, n. 2, p. 219-222, 1977.

TRABER, M. G. Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. **Mineral and electrolyte metabolism**, v. 23, n. 3-6, p. 135-139, 1996.

WALKER, M. K. et al. **Veterans and Agent Orange**. 2012.

WALTERS, Dale (Ed.). **Disease Control in Crops: Biological and Environmentally-Friendly Approaches**. John Wiley & Sons, 2009.

WERNER, I.; DEANOVIC, L. A.; CONNOR, V.; VLAMING, V.; BAILEY, H. C.; HILTON, D. E. Insecticide-caused toxicity to *Ceriodaphnia dubia* (Cladocera) in the Sacramento-San Joaquin River Delta, California, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.19, n.1, p.215-227, 2000.

WIENER, S. W.; HOFFMAN, R. S. Nerve agents: a comprehensive review. **Journal of intensive care medicine**, v. 19, n. 1, p. 22-37, 2004.

WSSA. Weed Science Society of America. Disponível em: <<http://wssa.net/wssa/weed/herbicides/>>. Acesso em 23 abr. 2017.

XIONG, S. et al. Seleno-L-methionine protects against beta-amyloid and iron/hydrogen peroxide-mediated neuron death. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 9, n. 4, p. 457-467, 2007.

YANG Y. et al. Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 28, p. 10793-10798, 2006

YEE, S., CHOI, B. H. Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning. **Neurotoxicology**, v. 17, n. 1, p. 17-26, 1995.

YOUNG, A. L. et al. The toxicology, environmental fate, and human risk of herbicide orange and its associated dioxin. **Air Force Occupational And Environmental Health Lab Brooks Afb Tx**, 1978.

ZABALOY, M. C.; GARLAND, J. L.; GÓMEZ, M. A. Na integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2,4-D and metsulfuron methyl on soil

microbial communities in the Pampas region, Argentina. **Applies Soil Ecology**, v. 40, n.1, p. 1-12, 2008.

ZAMBRONE, F. A. D. Defensivos agrícolas ou agrotóxicos? Descrição: perigosa família. **Revista Ciência Hoje**, v. 4, n. 22, p.44-47, 1996.

ZHANG, W.; JIANG, F.; OU, J. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, v. 1, n. 2, p. 125, 2011.

ZWIENER, R. I.; GINSBURG, C. M. Organophosphate and carbamate poisoning in infants and children. **Pediatrics**, v.81, p.121-126, 1998.