

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

Rafael Schroeder Gadini

**EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DE HERBICIDA E DE INSETICIDA
BIOLÓGICO EM SOLO: ESTUDO COM MINHOCAS *Eisenia andrei***

SANTA MARIA, RS
2024

Rafael Schroeder Gadini

**EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DE HERBICIDA E DE INSETICIDA
BIOLÓGICO EM SOLO: ESTUDO COM MINHOCAS *Eisenia andrei***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Área de Concentração em Recursos Hídricos e Tecnologias Ambientais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Ambiental**.

Orientadora: Prof^a. Dra. Bárbara Estevão Clasen

Coorientador: Prof. Dr. Ramiro Pereira Bisognin

SANTA MARIA, RS
2024

Schroeder Gadini, Rafael

EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DE HERBICIDA E DE INSETICIDA
BIOLÓGICO EM SOLO: ESTUDO COM MINHOCAS *Eisenia andrei* /
Rafael Schroeder Gadini.- 2024.

81 p.; 30 cm

Orientadora: Bárbara Estevão Clasen

Coorientador: Ramiro Pereira Bisognin

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Ambiental, RS, 2024

1. Ecotoxicidade 2. Oligoqueta 3. Biomarcadores I.
Estevão Clasen, Bárbara II. Pereira Bisognin, Ramiro
III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, RAFAEL SCHROEDER GADINI, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

RAFAEL SCHROEDER GADINI

**EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DE HERBICIDA E DE INSETICIDA
BIOLÓGICO EM SOLO: ESTUDO COM MINHOCAS *Eisenia andrei***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Área de Concentração em Recursos Hídricos e Tecnologias Ambientais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Ambiental**.

Aprovada em 27 de março de 2024

Bárbara Estevão Clasen, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Jossiele Wesz Leitemperger, Dra. (UFSM)

Eduardo Lorensi de Souza, Dr. (UERGS)

Santa Maria, RS
2024

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos aos meus queridos pais, Liane Schroeder e Marcio Andre Gadini, e à minha amada irmã Ana Julia Schroeder Gadini, por todo o apoio incondicional e pelo carinho com que me acompanharam durante mais uma etapa importante da minha vida. Vocês são a minha base, meu porto seguro.

Minha melhor amiga Daiane, sou imensamente grato pela sua parceria e pelos preciosos momentos que compartilhamos durante a realização deste trabalho. Sua presença foi fundamental.

Expresso minha profunda gratidão à minha orientadora, Dra. Bárbara Estevão Clasen, e ao meu coorientador, Dr. Ramiro Pereira Bisognin, pelo apoio, incentivo e confiança. Obrigado por acreditarem em mim e me guiarem com tanta dedicação.

Ao campus UERGS - Três Passos, agradeço de coração pela acolhida durante minha graduação e, especialmente, durante o mestrado. Meu sincero obrigado a Hardi e Lucila pelo suporte no laboratório, e ao Prof. Dr. Márlon pela disponibilidade e pelos conhecimentos compartilhados durante as análises estatísticas.

Aos pesquisadores do Grupo de Pesquisa GPTOX, em especial Doti, Greicy, Silvana, Edivania, Jaíne e Thamires, sou imensamente grato pela colaboração fundamental no preparo das amostras e execução das análises. Sem vocês, este trabalho não teria sido possível.

À Prof^a. Dra. Vania Lucia Loro, agradeço por ceder o Labtaq da Universidade Federal de Santa Maria, e ao LARP e ao Laboratório de Solos da UFSM, pelo auxílio na realização das análises de solo. Estendo meus agradecimentos especiais a Carina e ao Bruno Souza pelo fornecimento de informações e pelo auxílio na coleta das amostras de solo.

À banca avaliadora, expresso minha profunda gratidão por aceitar o convite e pelas valiosas contribuições que enriqueceram este trabalho.

A todos que contribuíram significativamente para a realização desta dissertação, minha eterna gratidão. Vocês fizeram parte dessa jornada e tornaram este sonho possível.

“Não é nossa função controlar todas as marés do mundo, mas sim fazer o que pudermos para socorrer os tempos em que estamos inseridos, erradicando o mal dos campos que conhecemos, para que aqueles que viverem depois tenham terra limpa para cultivar. Que tempo encontrarão não é nossa função determinar”.

(J.R.R. Tolkien)

RESUMO

EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DE HERBICIDA E DE INSETICIDA BIOLÓGICO EM SOLO: ESTUDO COM MINHOCAS *Eisenia andrei*

AUTOR: Rafael Schroeder Gadini
ORIENTADORA: Bárbara Estevão Clasen
COORDENADOR: Ramiro Pereira Bisognin

Resumo: O uso de herbicidas combinado com inseticidas é motivado pela necessidade do controle de plantas daninhas e pragas que ocorrem concomitantemente em culturas agrícolas. Mesmo com o uso crescente desses produtos para garantir a produtividade, há uma preocupação direcionada à toxicidade ocasionada em organismos não alvo, riscos à saúde humana e efeitos ao meio ambiente. Sendo assim, este estudo tem como objetivo principal avaliar a ecotoxicidade de herbicida a base de 2,4-D + Picloram®, e de inseticida biológico à base de *Bacillus thuringiensis*, em solo, utilizando minhocas da espécie *Eisenia andrei* como bioindicador. Os ensaios foram realizados durante 28 dias de exposição e avaliaram a interação entre os compostos e a avaliação de biomarcadores de atividade antioxidante (ACAP, CAT, GPx e GR), estresse oxidativo (Peróxido, EROs Carbonil, NO, TBARS) e neurotoxicidade (AChE e BChE) em minhocas expostas aos seguintes tratamentos: CT- controle; CD- 2,4-D e Picloram® (4L/ha); BT- *Bacillus thuringiensis*; e CDB- 2,4-D e Picloram® (4L/ha) + *Bacillus thuringiensis* (1L/ha). Após 14 e 28 dias de exposição, os resultados revelaram que o tratamento CDB induziu estresse oxidativo, evidenciado pelos elevados níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e redução na atividade da enzima catalase (CAT). Embora tenha havido uma resposta compensatória do sistema antioxidante, com aumento na glutatona redutase (GR), a exposição prolongada parece ter excedido a capacidade adaptativa das minhocas. Adicionalmente, o tratamento CDB também apresentou efeitos neurotóxicos, com aumento da atividade da acetilcolinesterase (AChE) e redução da butirilcolinesterase (BChE), indicando alterações no sistema nervoso das minhocas. De modo geral, a mistura dos herbicidas com o inseticida biológico demonstrou ser mais prejudicial aos organismos não-alvo do que quando aplicados de forma individual, sugerindo a necessidade de uma avaliação mais abrangente dos efeitos de compostos combinados no solo e seus potenciais riscos ecológicos.

Palavras-chave: Ecotoxicidade, Oligoqueta, Biomarcadores.

ABSTRACT

ECOTOXICOLOGICAL EFFECTS OF HERBICIDE AND BIOLOGICAL INSECTICIDE IN SOIL: STUDY WITH *Eisenia andrei* EARTHWORMS

AUTHOR: Rafael Schroeder Gadini
ADVISOR: Bárbara Estevão Clasen
CO ADVISOR: Ramiro Pereira Bisognin

Abstract: The use of herbicides combined with insecticides is motivated by the need to control weeds and pests that occur concurrently in agricultural crops. Even with the increasing use of these products to ensure productivity, there is a concern directed towards the toxicity caused in non-target organisms, risks to human health, and effects on the environment. Therefore, this study aims to assess the ecotoxicity of the herbicide 2,4-D + Picloram® and the biological insecticide based on *Bacillus thuringiensis* in soil, using the earthworm *Eisenia andrei* as a bioindicator. The tests were carried out during 28 days of exposure and evaluated the interaction between the compounds and the assessment of biomarkers of antioxidant activity (ACAP, CAT, GPx, and GR), oxidative stress (Peroxide, ROS, Carbonyl, NO, TBARS), and neurotoxicity (AChE and BChE) in earthworms exposed to the following treatments: CT- control; CD- 2,4-D and Picloram® (4L/ha); BT- *Bacillus thuringiensis*; and CDB- 2,4-D and Picloram® (4L/ha) + *Bacillus thuringiensis* (1L/ha). After 14 and 28 days of exposure, the results revealed that the CDB treatment induced oxidative stress, evidenced by the high levels of reactive oxygen species (ROS) and a reduction in the activity of the catalase (CAT) enzyme. Although there was a compensatory response of the antioxidant system, with an increase in glutathione reductase (GR), prolonged exposure appears to have exceeded the adaptive capacity of the earthworms. Additionally, the CDB treatment also showed neurotoxic effects, with an increase in acetylcholinesterase (AChE) activity and a reduction in butyrylcholinesterase (BChE), indicating changes in the nervous system of the earthworms. Overall, the mixture of herbicides with the biological insecticide proved to be more harmful to non-target organisms than when applied individually, suggesting the need for a more comprehensive assessment of the effects of combined compounds in the soil and their potential ecological risks.

Keywords: Ecotoxicity, Oligoqueta, Biomarkers.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA	14
3.1 USO DE SUBSTÂNCIAS PARA O CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS E PRAGAS	14
3.1.1 Histórico	14
3.1.2 Herbicidas 2,4-D e Picloram ®	17
3.1.3 Inseticida a base de <i>Bacillus thuringiensis</i>	23
3.1.4 Contaminação do ambiente pelos herbicidas 2,4-D, Picloram ® e inseticida biológico a base de <i>Bacillus thuringiensis</i>	25
3.1.4 Efeitos negativos na saúde humana, animal e riscos relacionados aos produtos	28
3.2 ECOTOXICOLOGIA.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 SOLO, ORGANISMOS TESTE E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	38
4.2 BIOENSAIOS E ANÁLISES ECOTOXICOLÓGICAS	41
4.2.1 Preparo das amostras	41
4.2.2 Determinação de Proteínas	41
4.3.3 Determinação da resposta antioxidante e estresse oxidativo	42
4.3.4 Determinação da resposta enzimática	43
4.3.5 Determinação da resposta neurotóxica	43
4.5 DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE AS SUBSTÂNCIAS	44
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5. RESULTADOS	45
5.1 RESPOSTA ANTIOXIDANTE E ESTRESSE OXIDATIVO	45
5.2 RESPOSTA NEUROTÓXICA	52
5.3 INTERAÇÃO ENTRE AS SUBSTÂNCIAS.....	54
6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

O uso de herbicidas, associado com inseticidas, fungicidas e demais insumos nas produções agrícolas é realizado para evitar a perda da produtividade ocasionada por pragas, doenças e ervas daninhas. O uso intensivo desses compostos se estende por vastas áreas de cultivo, impulsionado pela crescente demanda por alimentos e pelo aumento populacional (ANDRADE *et al.*, 2023; RAJAK *et al.*, 2023).

Segundo o painel de informações sobre a comercialização de agrotóxicos e afins, no Brasil, de 2009 a 2022, os herbicidas lideraram as vendas totais por ano e classes de uso, passando de 229,895 mil toneladas em 2009 para 733,895 mil toneladas de ingredientes ativos no ano de 2021 (IBAMA, 2023). No espectro dos herbicidas, as auxinas sintéticas ocupam uma posição de destaque, figurando como o terceiro grupo mais utilizado globalmente em termos de área tratada (TODD *et al.*, 2020). Além disso, dentro do grupo de herbicidas auxínicos ou mimetizadores de auxina, o 2,4 – D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) e o Picloram ® (ácido 4-amino 3,5,6-tricloro-2-piridinacarboxílico) são produtos amplamente empregados na agricultura, contando com um total de 92 produtos registrados para aplicação em território nacional (BARROS *et al.*, 2021; BRASIL, 2021).

O uso combinado de herbicidas à base de 2,4-D e Picloram ® é vantajoso para a pecuária e agricultura, oferecendo ampliação do controle de plantas daninhas, efeito residual para um controle efetivo a longo prazo e ainda promove economia de recursos. As principais preocupações devido ao uso excessivo e seus possíveis impactos estão relacionadas a perda da biodiversidade e a alteração ecossistêmica em virtude da elevada aplicação e manejo incorreto dessas substâncias, que vem afetando o desenvolvimento de organismos não alvos e influenciando em interações tróficas como a polinização (ZUANAZZI, GHISHI e OLIVEIRA, 2020; RUUSKANEN *et al.*, 2023; ROHLMAN *et al.*, 2022; VELLINGIRI *et al.*, 2022; DAR, HAMID e KAUSHIK, 2023).

Diante desses distúrbios, e como forma complementar aos demais pesticidas sintéticos utilizados na agricultura, observa-se o crescimento do mercado de produtos biológicos, especialmente os derivados do gênero *Bacillus*, o que pode significar uma resposta às preocupações decorrentes do uso intensivo de pesticidas sintéticos na agricultura (KUMAR *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2022). Esses produtos, oferecem uma alternativa promissora e sustentável aos pesticidas químicos, apresentando eficácia no controle de pragas e doenças agrícolas, ao mesmo tempo em que minimizam os impactos negativos no meio ambiente e na

saúde humana (KUMAR *et al.*, 2021). Neste mercado, o gênero *Bacillus* ganha destaque entre os agentes biológicos por oferecerem uma gama de aplicações biotecnológicas, como bioinseticidas, biofungicidas e biofertilizantes e até mesmo na forma de agente biorremediador de solos contaminados (MELO *et al.*, 2021; CHOE *et al.*, 2022; ZHAO *et al.*, 2023; CATTANEO *et al.*, 2023).

Produtos químicos sintéticos, como é o caso das auxinas no grupo dos herbicidas, e toxinas de alguns microrganismos, como o *Bacillus*, proporcionam proteção e produtividade de culturas agrícolas. No entanto, apesar dos benefícios dos produtos, os desafios persistem em relação aos efeitos adversos causados ao solo, aos ecossistemas e a saúde humana, destacando a necessidade de avaliações abrangentes. Isso se deve ao fato que essas substâncias alteram as características do solo, interrompem o ciclo de vida de insetos benéficos, propiciam a resistência dos alvos e causam efeitos prejudiciais à saúde humana, causando em alguns casos, perdas econômicas e problemas epidemiológicos (MCCLINTOCK, SCHAFFER e SJOBLAD, 1995; BENLI *et al.*, 2008; Wafa *et al.*, 2011; HILLBECK e OTTO, 2015; TAYYAB *et al.*, 2019; PAUMGARTTEN, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2022; GONÇALVES e DELABONA, 2022).

Visando o monitoramento dos possíveis impactos destas substâncias, os testes ecotoxicológicos apresentam-se como alternativas para avaliação do modo de ação destes contaminantes, seus efeitos no ecossistema e em organismos, a partir da observação comportamental, análise de biomarcadores e da atividade enzimática (TARAZONA e RAMOS-PERALONSO, 2014; LI *et al.*, 2023; BROOMANDI, RYEOL e RODRÍGUEZ-SEIJO, 2023).

Os biomarcadores estão presentes em organismos, aquáticos e terrestres, atuando assim como indicadores sensíveis de alterações biológicas devido a contaminantes ou outros fatores de estresse ambiental (DAAM *et al.*, 2019; DALMOLIN *et al.*, 2020; GUIMARÃES; RÖMBKE; AMORIM, 2023). A avaliação das respostas antioxidantes, de estresse oxidativo e neurotóxicas, é comumente observada em estudos ecotoxicológicos, pois fornecem informações sobre as alterações na bioquímica celular. Essas avaliações permitem entender como certos contaminantes afetam os organismos ao nível celular e molecular, além de oferecer pistas sobre os mecanismos de toxicidade e potenciais riscos à saúde humana e ambiental (DEMIRCI-ÇEKIÇ *et al.*, 2022; HILGERT, JACOBSEN e PEREIRA *et al.*, 2018; SAMET e WAGES, 2018).

Dentre os organismos bioindicadores, as minhocas destacam-se por desempenharem funções primordiais no solo, como processos de decomposição e mineralização da matéria orgânica, além de estarem em contato direto com possíveis poluentes. Elas são frequentemente

utilizadas em estudos devido à sua resposta sensível aos contaminantes e aos efeitos adversos que podem apresentar, como respostas antioxidantes (enzimáticas e não-enzimáticas), estresse oxidativo, distúrbios no metabolismo energético e lipídico, toxicidade neurológica, inflamação e lesão intestinal, disbiose da microbiota intestinal e toxicidade reprodutiva (SANTO *et al.*, 2018; VASSEUR e BONNARD, 2014; ZHANG *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2022).

Diante do exposto, é evidente a importância de investigar os efeitos ecotoxicológicos dos herbicidas à base de 2,4-D e Picloram ®, bem como do inseticida biológico derivado do *Bacillus thuringiensis*, utilizando a espécie de minhoca *Eisenia andrei* como organismo-teste. Este estudo visa compreender os efeitos individuais e combinados desses produtos químicos nas respostas antioxidantes, de estresse oxidativo e neurotóxicas em *Eisenia andrei*. Com isso, espera-se preencher uma lacuna no conhecimento sobre os potenciais impactos desses agroquímicos neste organismo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ecotoxicidade de herbicida a base de 2,4-D e Picloram ® e de inseticida biológico à base de *Bacillus thuringiensis* em minhocas da espécie *Eisenia andrei* no solo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito antagônico ou sinérgico da aplicação de herbicida à base de 2,4-D e Picloram ® e de inseticida biológico à base de *Bacillus thuringiensis* sobre biomarcadores de minhocas.

- Avaliar biomarcadores de atividade antioxidante e neurológica em minhocas expostas a herbicida a base de 2,4-D e Picloram ® e de inseticida biológico à base de *Bacillus thuringiensis*.

- Avaliar biomarcadores de estresse oxidativo em minhocas expostas a herbicida a base de 2,4-D e Picloram ® e de inseticida biológico à base de *Bacillus thuringiensis*.

3. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA

3.1 USO DE SUBSTÂNCIAS PARA O CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS E PRAGAS

3.1.1 Histórico

O termo técnico pesticida é utilizado para caracterizar substâncias ou mistura de substâncias aplicadas com o intuito de controlar ou prevenir danos causados às plantações por pragas ou plantas daninhas. Pode ser classificado de acordo com sua matriz de origem, como agrotóxico ou biopesticida, abrangendo os grupos dos fungicidas, inseticidas, herbicidas e raticidas (ABUBAKAR *et al.*, 2020; HASSAAN e NEMR, 2020).

Os agrotóxicos, são produtos sintéticos, que contemplam os organofosforados (OPs), carbamatos, organoclorados (CO), piretróides, sulfonilureias e glifosatos (GLY), apresentando elementos altamente tóxicos (BHATT *et al.*, 2021; PANG, 2018). Outros grupos incluem os biológicos, que derivam de materiais naturais como bactérias, plantas, animais e minerais, sendo considerados mais convenientes do que os produtos convencionais em relação aos impactos ambientais, sendo atualmente utilizados pela indústria na forma de complemento às funções dos agrotóxicos (PELAEZ e MIZUKAWA, 2017; KHURSHEED *et al.*, 2022; GYANJYOTI *et al.*, 2023).

Os primeiros usos destas substâncias remetem ao desenvolvimento da agricultura que, a partir da necessidade de armazenamento e maior produtividade de alimentos, houve o desenvolvimento de metodologias de controle de pragas e ervas daninhas. Dentre os métodos, citam-se o uso de extratos botânicos ou o plantio de plantas com propriedades inseticidas em meio às plantações (ABUBAKAR *et al.*, 2020) e, mais tarde, outras técnicas utilizadas consistiam no uso de produtos como o enxofre inorgânico, arsênico, arseniato de chumbo, criolita e bórax para o controle de insetos (OBEREMOK *et al.*, 2015) e sal e borras de azeite como herbicidas (MESNAGE *et al.*, 2021).

Já no século XX, os primeiros agrotóxicos sintetizados quimicamente foram desenvolvidos e utilizados amplamente como armas de guerra. Isso se deve a uma relação direta com o desenvolvimento de substâncias utilizadas primeiramente para atacar inimigos, destruindo suas reservas de alimentos e também visando o controle de besouros, piolhos e na erradicação da malária (SILVA *et al.*, 2012).

Neste período houve a descoberta de diversas substâncias, além do seu amplo uso em epidemias, como saneantes e arma de guerra. Entre estas substâncias, um marco na era dos agrotóxicos modernos foi a descoberta do dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) por Paul Muller em 1939, amplamente utilizado em atividades agrícolas, como inseticida residencial e para o combate da malária e tifo (JARMAN e BALLSCHMITER, 2012).

Além do DDT, outras substâncias que tiveram amplo uso foram as dioxinas, destacando-se o agente laranja, utilizado com o objetivo de destruir as colheitas alemãs e japonesas, e, posteriormente, no sudeste asiático a partir de 1962 (LE, PHAM e POLACHEK, 2022). O agente laranja foi um herbicida composto pela mistura do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido 2,4,5-Triclorofenoxiacético (2,4,5-T), dioxinas altamente tóxicas e perigosas à saúde humana, que, mesmo após décadas da exposição dos civis vietnamitas durante a guerra, ainda há como consequência diversas doenças ligadas a esse acontecimento e traços destes contaminantes em diferentes matrizes ambientais e organismos (PALMER, 2005; MOWERY, CONLIN e CLAYBURGH, 2020; KUDRYAVTSEVA, SHELEPCHIKOV e BRODSKY, 2020; MY *et al.*, 2021).

No pós-guerra, o uso militar destes compostos tornou-se ocioso, sendo necessário o redirecionamento das tecnologias desenvolvidas e dos princípios ativos para o combate de insetos e ervas daninhas na agricultura e na forma de domissanecantes, sendo aplicadas como ferramentas no cultivo de alimentos (JOHNSTONE e McLEISH, 2022). Neste cenário, o DDT e as dioxinas foram uma das primeiras substâncias químicas amplamente difundidas na agricultura e, inclusive, para o uso doméstico e controle sanitário. A partir de então, surgem e emergem os pacotes tecnológicos da chamada Revolução Verde, que incluía diversos agroquímicos, dentre eles o DDT e as dioxinas, como um dos primeiros herbicidas e inseticidas sintéticos utilizados na agricultura (PARAYIL, 2003; KUMAR e DIXIT, 2021).

Foi neste contexto que o livro *Primavera Silenciosa* de Rachel Carson (lançado em 1962) e outros estudos denunciaram os efeitos nocivos do DDT e outros agrotóxicos, desencadeando movimentos ambientalistas e pesquisas sobre os potenciais riscos à saúde humana e contaminação ambiental, ocasionando a proibição do seu uso (VAIL, 2015; JARMAN e BALLSCHMITER, 2012).

Após a proibição do DDT, houve a necessidade e busca por produtos alternativos, o que influenciou diretamente no desenvolvimento de novos produtos e na ampliação do mercado. Com as justificativas de assegurar a produção de alimentos para a população humana em crescimento exponencial, como fator de saúde pública e a partir dos inúmeros incentivos e

fomentos governamentais para o uso do pacote tecnológico desenvolvido, houve o aumento da utilização de insumos agrícolas, inclusive dos agrotóxicos, que ainda é refletido nos dias atuais (ECOBICHON, 2001; GARCÍA *et al.*, 2022).

Neste contexto, a busca por tecnologias e outros ingredientes ativos com diferentes modos de ação que contribuíssem com a redução do uso dos organoclorados resultou no desenvolvimento de tecnologias como a de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) no final da década de 1990 (ARCIERI, 2016; COSTA *et al.*, 2011), além do melhoramento químico dos agrotóxicos.

Quanto aos OGMs, a premissa inicial era criar culturas capazes de suportar estresses bióticos e abióticos sem a necessidade de uso de agroquímicos (PLATANI *et al.*, 2023), entretanto, houve o questionamento sobre a segurança e os potenciais riscos gerados, principalmente à saúde pública (ARCIERI, 2016; COSTA *et al.*, 2011). Apesar disto, na atualidade, os OGM's são responsáveis por uma fatia considerável da produção mundial de alimentos, e, apesar das justificativas e premissas para o seu desenvolvimento, não foi possível cessar a dependência do uso de agroquímicos nas suas culturas. Logo, houve a necessidade de aprimoramento dos agroquímicos utilizados, a fim de não causarem danos nas culturas modificadas. A exemplo disto, surgem novas famílias de herbicidas e há o melhoramento genético das culturas, selecionando e desenvolvendo espécies de plantas, objetivando maior produtividade, além da resistência a pragas e doenças, e melhor adaptabilidade a condições desfavoráveis de estresse (MONQUERO, 2005; ALMEIDA, SOUZA E BATISTA, 2019).

O rápido desenvolvimento de novos produtos orgânicos sintéticos durante o final do século XX apresentou uma variedade de compostos úteis. Entre eles estavam os herbicidas, fungicidas, inseticidas, raticidas, nematicidas e compostos promotores do crescimento de plantas, que em conjunto aperfeiçoaram a produção agrícola e reduziram os danos relacionados a ervas daninhas (PILEGGI, PILEGGI e SADOWSKY, 2020).

Atualmente, observa-se uma tendência significativa na agricultura em relação ao uso combinado de agroquímicos, incluindo herbicidas, juntamente com organismos geneticamente modificados (OGMs) e produtos microbiológicos. Essa prática está se tornando cada vez mais predominante devido à sua eficácia no controle de pragas, doenças e plantas daninhas, além de oferecer benefícios agrônômicos. Entre os agroquímicos mais comumente utilizados em combinação, destacam-se os pertencentes aos grupos dos aminoácidos fosfonados, ácidos ariloxialcanóicos e triazinas. Esses grupos incluem substâncias como o 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético), Picloram ® (ácido 4-amino 3,5,6-tricloro-2-piridinacarboxílico) e o

Bacillus thuringiensis. O 2,4-D e o Picloram ® são herbicidas amplamente empregados na agricultura para o controle de plantas daninhas, enquanto o *Bacillus thuringiensis* é um bioinseticida utilizado para o controle de insetos-praga. A combinação desses agroquímicos com OGM's e produtos microbiológicos visa maximizar os benefícios agrícolas, como o aumento da produtividade e a redução do impacto ambiental, ao mesmo tempo em que se busca minimizar os riscos para a saúde humana e o meio ambiente (ARCIERI, 2016; ARPAIA *et al.*, 2017).

A prática combinada de agroquímicos, organismos geneticamente modificados (OGM's) e produtos microbiológicos na agricultura pode acarretar uma série de desafios, incluindo resistência de pragas e plantas daninhas, impactos ambientais adversos, riscos para a saúde humana e desequilíbrios nos ecossistemas (ARPAIA *et al.*, 2017; HÖSS *et al.*, 2013; RÖMBKE *et al.*, 2010; VAN CAPELLE *et al.*, 2016). A adaptação de organismos às substâncias químicas pode diminuir a eficácia dos métodos de controle, aumentando a necessidade de produtos mais potentes e intensificando a dependência tecnológica. Além disso, a contaminação ambiental, a exposição humana a resíduos de agroquímicos, a perda de biodiversidade e os desequilíbrios genéticos nas culturas são preocupações associadas a essa prática (ARCIERI, 2016; MEYER, 2011; VAN CAPELLE *et al.*, 2016).

Diante desses desafios, é crucial adotar abordagens integradas e sustentáveis na agricultura, que considerem não apenas a eficácia agrônômica, mas também os impactos sociais, ambientais e de saúde. A busca por soluções inovadoras e sustentáveis e de técnicas de monitoramento é essencial para garantir a viabilidade e a resiliência do sistema agrícola a longo prazo, reduzindo a dependência excessiva de agroquímicos e OGM's.

3.1.2 Herbicidas 2,4-D e Picloram ®

Os herbicidas 2,4-D e Picloram ® são representantes de uma classe de agrotóxicos amplamente utilizados na agricultura, cujo manejo requer abordagem cuidadosa e sustentável para garantir a eficácia no controle de ervas daninhas.

A Lei nº 14.785, de 27 de dezembro de 2023, em seu art. 2º, dispõe sobre a pesquisa, experimentação, embalagem e rótulos, transporte, armazenamento, comercialização, propaganda, utilização, importação e exportação, destino final de resíduos e embalagens, registro, classificação, controle, inspeção e fiscalização, além de classificar os agrotóxicos como:

“produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens ou na proteção de florestas plantadas, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos” (BRASIL, 2023, p. 15-53).

Esses produtos podem ser aplicados de várias maneiras, incluindo pulverização aérea, terrestre ou por meio de sistemas de irrigação. Além disso, existem vários tipos de agrotóxicos, que podem ser classificados de acordo com sua finalidade. Dentre os principais, estão os herbicidas, utilizados para controlar plantas invasoras que competem com as culturas, como é o caso do 2,4-D (SILVA *et al.*, 2022).

Os herbicidas são produtos químicos utilizados para controlar o crescimento e desenvolvimento de plantas daninhas em áreas cultivadas. Eles são aplicados diretamente nas plantas daninhas ou no solo para prevenir o seu crescimento e desenvolvimento, sem afetar a cultura principal. Sendo assim, uma ferramenta importante para os agricultores no manejo de plantas daninhas, que podem competir com a cultura principal por nutrientes, luz e água, reduzindo o rendimento da colheita (SILVA *et al.*, 2022; SAMUEL e DINES, 2023; KAUR *et al.*, 2020).

Existem vários tipos de herbicidas disponíveis no mercado, distinguindo-se de acordo com sua composição química e modo de ação. Como é o caso dos herbicidas de contato, que são aplicados diretamente nas folhas das plantas daninhas e causam a dessecação das células, ocasionando a morte da planta. Do mesmo modo, os herbicidas sistêmicos são absorvidos pelas folhas ou raízes e movem-se pelo sistema vascular da planta, causando a morte das plantas daninhas. Também podem ser classificados como herbicidas pré-emergentes, em que sua aplicação é realizada antes do plantio ou do surgimento de plantas daninhas, o que impede o seu crescimento e desenvolvimento. Ou ainda, herbicidas pós-emergentes, que são aplicados após o surgimento de plantas daninhas e agem controlando seu crescimento e desenvolvimento (RUUSKANEN *et al.*, 2023; RIBEIRO *et al.*, 2022; TODD, 2020; KAUR *et al.*, 2020).

Dessa maneira, conforme a classe química e a forma de ação, os herbicidas podem afetar as plantas daninhas de várias formas: impedindo a realização da fotossíntese, interrompendo a divisão celular, também inibindo o crescimento e desidratando as plantas daninhas (RUUSKANEN *et al.*, 2023).

Conforme abordado em tópicos anteriores, os herbicidas são o grupo de agrotóxicos mais comercializados no Brasil, da mesma forma que o 2,4-D está na lista dos mais vendidos. Tendo isso em vista, destaca-se a importância de compreender as características e o

comportamento do 2,4-D para garantir seu uso seguro e eficaz no controle de plantas daninhas e minimizar os impactos negativos sobre a saúde humana e o meio ambiente.

O 2,4-D é conhecido como o primeiro herbicida orgânico sintetizado pela indústria química, em 1941. Nos anos seguintes desenvolveu-se estudos focando o seu uso como arma química, o que de fato aconteceu em diversas guerras. Apenas em 1945, ele foi lançado no mercado na sua formulação comercial, passando a ser um dos herbicidas mais utilizados e difundidos na produção agrícola e produções científicas (SANTOS, 2007; GROSSI, 2009; CATTANI, 2020).

O composto orgânico sintético 2,4-D, pertence ao grupo químico dos ácidos ariloxialcanóicos, é um herbicida seletivo, sistêmico e podendo ser de aplicação pré-emergente ou pós-emergente. Utilizado em ervas daninhas de folha larga, o 2,4-D é um herbicida hormonal que imita os efeitos das auxinas e de outros hormônios reguladores do crescimento. Quando absorvido pelas plantas daninhas causa a superestimulação do crescimento de células jovens, levando-as à morte (ROMAN *et al.*, 2005; GUIMARÃES, 2008).

Quando aplicado, o 2,4-D é absorvido e metabolizado pelas plantas ou pelo meio ambiente. Durante o processo de metabolização podem ser formados diversos metabólitos, alguns dos principais incluem: O Ácido 2,4-diclorofenoxiacético metil éster (2,4-DME), Ácido 2,4-diclorofenoxiacético glicina (2,4-DG), Ácido 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) e Ácido 2,4-diclorofenoxiacético ácido (2,4-DCA) (FERNÁNDEZ *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2023). A presença e a concentração desses metabólitos podem ter implicações na toxicidade e no destino ambiental do 2,4-D. Por isso, é importante considerar os metabólitos do 2,4-D ao avaliar os riscos ambientais e à saúde humana associados ao uso desse herbicida (PETTERSON, 2016).

A dispersão do 2,4-D no meio ambiente pode ocorrer de várias maneiras, dependendo da forma de aplicação, do tipo de solo, do clima e das características da paisagem. Alguns dos principais mecanismos, no que diz respeito ao destino do 2,4-D no ambiente são: a lixiviação, quando o produto pode se infiltrar no solo e acaba atingindo camadas mais profundas, resultando na contaminação de águas subterrâneas. Já o escoamento superficial do produto pelo solo pode ocasionar a contaminação de águas superficiais. Ainda por cima, o produto pode volatilizar e tornar-se um gás na atmosfera, se movendo e se depositando em outras áreas. E ademais pode ocorrer a deriva de gotículas do herbicida para áreas adjacentes (OLIVEIRA, 2011; GEBLER, 2008). A lixiviação e o escoamento superficial são os processos que mais ganham destaque, devido à alta solubilidade do 2,4-D, que pode ser transportado e acabar contaminando rios, lagos e águas subterrâneas. A presença desses contaminantes em

determinados níveis pode ser tóxica para várias espécies e causar problemas na saúde de humanos (SIEDE, 2018; MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA *et al.*, 2017).

O herbicida 2,4-D atinge facilmente corpos d'água, podendo gerar a contaminação dos recursos hídricos, afetando os organismos desse ecossistema ou até mesmo contaminando água utilizada para o consumo humano (CETESB, 2022). Inclusive tem a capacidade de bioacumular em organismos não alvo, podendo causar riscos a esses indivíduos (ZUANAZZI, GHISI e OLIVEIRA, 2020). Além dos prejuízos ambientais, a contaminação de plantas frutíferas, hortaliças, entre outros alimentos, que influencia diretamente na redução da produtividade e consequentemente acarreta em perdas econômicas (MESNAGE *et al.*, 2021).

O uso desse herbicida pode gerar efeitos na saúde humana, em que o contato da população com o 2,4-D pode ocorrer de forma direta (em áreas após a sua aplicação) ou através do consumo de água e alimentos contaminados. Mesmo sendo apresentado como pouco tóxico para seres humanos em sua bula, houveram casos de ingestão acidental ou intencional onde foram observados efeitos como taquipneia, taquicardia, vômito, leucocitose, congestão dos rins e fígado, dentre outros efeitos mais graves em casos fatais (CETESB, 2020).

Para o manejo de plantas daninhas em áreas agrícolas, o 2,4-D se tornou uma ferramenta essencial, proporcionando amplo espectro de controle e alta eficiência. No entanto, para casos específicos de resistência e para o controle de plantas daninhas dicotiledôneas de porte arbóreo, arbustivo e sub-arbustivo o Picloram ® ganha destaque no combate dessas espécies mais desafiadoras. Desta forma, a mistura de 2,4-D e Picloram ® acabam sendo uma prática comum no manejo de plantas daninhas por diversos motivos, que incluem a busca por um controle mais abrangente de diversas espécies em uma única aplicação e a possibilidade de um efeito sinérgico, permitindo o uso de doses menores de cada herbicida. Soma-se a isso, a maior persistência, proporcionando um controle duradouro e o controle de plantas daninhas em áreas críticas (AGBAKOBA e GOODIN, 1970; BOVEY, 1971; SCHULZ e SEGOBYE, 2016).

Assim como o 2-4-D, o Picloram ® é utilizado como herbicida de amplo espectro na agricultura, especialmente para o controle de plantas daninhas herbáceas e folhosas anuais profundamente enraizadas. Foi descoberto entre 1940 e 1950 pela empresa Dow Chemical e foi introduzido no mercado como herbicida em 1963. Atualmente, observa-se o uso em várias culturas agrícolas, tanto em pequenas quanto em grandes propriedades, evidenciando sua relevância e versatilidade no manejo de ervas daninhas (JANKAUSKIENĖ *et al.*, 2004; LEMMA *et al.*, 2019). Ainda, o Picloram ® é frequentemente utilizado em conjunto com outros herbicidas para um controle mais eficaz de plantas daninhas resistentes ou para ampliar o

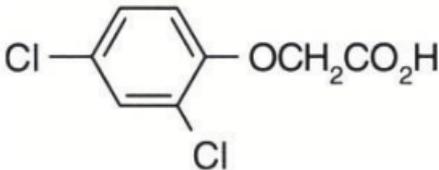
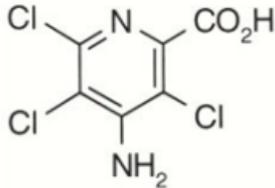
espectro de controle. Sua combinação com outros herbicidas pode proporcionar um efeito sinérgico, permitindo o uso de doses menores de cada produto e, assim, reduzindo os custos e minimizando os impactos ambientais. Além disso, a mistura de herbicidas pode proporcionar um controle mais abrangente de diversas espécies de plantas daninhas em uma única aplicação.

Quimicamente, o Picloram ® pertence à classe dos ácidos piridínicos, sendo o seu princípio ativo o ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico. É também um herbicida sistêmico, ou seja, quando absorvido pelas folhas e outras partes das plantas-alvo, acaba sendo translocado para os tecidos meristemáticos, interferindo diretamente no crescimento e desenvolvimento das raízes e caules das plantas. Ainda, em relação aos seus mecanismos de ação, ele funciona de forma muito similar ao hormônio auxina causando o crescimento desorganizado e descontrolado das células. Além disso interfere no metabolismo de aminoácidos das plantas, levando à produção de proteínas disfuncionais que afetam os processos metabólicos das plantas. De forma combinada, esses mecanismos causam a morte das plantas-alvo por meio de inibição do crescimento e interferência nos processos metabólicos essenciais (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1991; ANVISA, 2022; DUMANCAS *et al.*, 2024;)

No entanto, o Picloram ® também foi associado a preocupações ambientais e de saúde. Por ser altamente solúvel em água, apresenta baixa adsorção à maioria dos solos e é considerado de alta persistência, podendo facilmente lixiviar para águas subterrâneas ou afetar culturas subsequentes. Consequentemente, devido a esses fatores, houve relatos de efeitos adversos em animais e plantas não-alvo e preocupações com a segurança do uso do Picloram ® em áreas próximas a fontes de água potável (MWAKALESI e POTTER, 2020).

A Tabela 1 apresenta as principais características dos herbicidas 2,4-D e Picloram ®. Inclui informações sobre seus nomes químicos, fórmulas brutas, grupos químicos, classe, uso agrícola e fórmulas estruturais. Esses detalhes fornecem uma visão abrangente das propriedades químicas e usos agrícolas desses herbicidas.

Tabela 1. Principais características do 2,4-D e Picloram ®.

	2,4-D	Picloram ®
NOME QUÍMICO	(2,4-dichlorophenoxy) acetic acid	4-amino-3,5,6-trichloropyridine-2-carboxylic acid
FÓRMULA BRUTA	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	C ₆ H ₃ Cl ₃ N ₂ O ₂
GRUPO QUÍMICO	Ácido ariloxialcanóico	Ácido piridinocarboxílico
CLASSE	Herbicida	Herbicida
USO AGRÍCOLA	Algodão, Arroz, Aveia, Café, Cana-de-Açúcar, Centeio, Cevada, Citros, Duboisia, Eucalipto, Milheto, Pastagem, Soja, Sorgo, Trigo e Triticale	Arroz, Cana-de-açúcar, Eucalipto, Pastagens e Trigo
FÓRMULA ESTRUTURAL		

Fonte: Autor (2024), baseado em ANVISA (2024) e PRENTIS (2024).

Embora o uso dos herbicidas 2,4-D e Picloram ® tenha como objetivo principal evitar perdas na produção agrícola, combater doenças e aumentar a receita econômica, esses benefícios são acompanhados por impactos negativos no meio ambiente e nos ecossistemas. Esses impactos incluem a perda de biodiversidade e de habitats naturais devido à destruição de plantas não alvo, a contaminação de alimentos com resíduos de herbicidas e a mortalidade de outros organismos, como insetos benéficos e outras formas de vida selvagem. Essas consequências destacam a necessidade de considerar não apenas os benefícios agrônômicos imediatos dos herbicidas, mas também os seus impactos sociais, ambientais e de saúde a longo prazo (FORGASH, 1984; LI *et al.*, 2020; OBEREMOK *et al.*, 2015; REZENDE-TEIXEIRA *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2022; STARNES; LIU; MARRONE, 1993).

3.1.3 Inseticida a base de *Bacillus thuringiensis*

Levando em consideração a persistência e a toxicidade dos compostos químicos sintéticos, outros compostos vêm sendo utilizados visando maior sustentabilidade, em que os microbiológicos estão se destacando. Além disso, é preciso salientar que os sistemas de agricultura em climas tropicais, apresentam suscetibilidade de ocorrência de pragas, doenças e ervas daninhas, na mesma cultura ao mesmo tempo, sendo assim comumente utilizado abordagens de aplicação de agrotóxicos químicos e microbiológicos misturados em tanque, como é o caso do *Bacillus thuringiensis* que vem sendo utilizado em conjunto com herbicidas, inseticidas, fungicidas e fertilizantes foliares (NASCIMENTO, 2022).

Os agrotóxicos microbiológicos são uma categoria de produtos que utilizam microrganismos (bactérias, fungos, vírus) ou seus metabólitos para o controle de pragas e doenças agrícolas. Diferentemente dos agroquímicos que utilizam moléculas sintéticas que atuam em canais bioquímicos específicos para o controle de pragas, os inseticidas microbiológicos funcionam de duas maneiras: através da infecção direta dos insetos com o microrganismo ou através da liberação de toxinas pelas bactérias ou fungos que matam as pragas (ZHAO *et al.*, 2023; NASCIMENTO *et al.*, 2022; VAIL, 2015).

Assim como os compostos químicos, os agrotóxicos microbiológicos podem ser usados para o controle de uma ampla variedade de pragas e doenças, incluindo insetos, ácaros, nematoides e doenças fúngicas. Esses microrganismos são considerados inofensivos para os seres humanos e animais, mas podem ser patogênicos para as pragas alvo (ANGELO, VILAS-BÔAS e CASTRO-GÓMEZ 2010).

A partir disso, os produtos microbiológicos são considerados uma alternativa mais segura e ambientalmente correta em comparação com os inseticidas químicos convencionais. Embora estes produtos representem cerca de <1% do total de inseticidas vendidos anualmente, o seu uso está crescendo a um ritmo acelerado de 10 a 25% ao ano em comparação com inseticidas químicos, sendo o principal responsável pelo crescimento o *Bacillus thuringiensis* (Bt) (STARNES; LIU; MARRONE, 1993; BAUM; JOHNSON; CARLTON, 1999; DE MAAGD, 2015; IBAMA, 2023). No Brasil, as vendas do produto representaram em 2021, 0,01 mil toneladas vendidas do princípio ativo, sendo predominantemente de Classe Toxicológica III e IV (IBAMA, 2023), e um dos biopesticidas mais eficazes na atualidade com ampla utilização na produção agrícola (LACEY; SIEGEL, 2000; DE LA FUENTE-SALCIDO; CASADOS-VÁZQUEZ; BARBOZA-CORONA, 2013).

O Bt é um grupo de bactérias entomopatogênicas gram-positivas aeróbias formadoras de esporos e cristais tóxicos para uma gama de organismos alvo (GU *et al.*, 2021; KUMAR *et al.*, 2021; LACEY; SIEGEL, 2000). Naturalmente encontradas no solo, material orgânico e em outros compartimentos ambientais, são bactérias com rápida adaptação e encontradas em diversos locais do mundo (HORTA *et al.*, 2017). Foram primeiramente catalogadas e descritas em bichos-da-seda e em traças-da-farinha na Alemanha no início do século XX, sendo utilizado como inseticida pela primeira vez em 1938 (GU *et al.*, 2021; HECKEL, 2020; PALMA; BERRY, 2016; HORTA *et al.*, 2017; SANAHUJA *et al.*, 2011).

Atualmente, mais de uma centena de cepas vem sendo utilizadas para uma diversidade de pragas alvo em culturas como a soja, o milho, o arroz e o algodão, além de ser utilizado com finalidades ambiental, sanitária ou epidemiológica, na biorremediação de áreas contaminadas com metais, agrotóxicos e hidrocarbonetos, na produção de biossurfactantes e polímeros, e na bioprospecção da parasporina e suas possíveis propriedades antitumorais (GU *et al.*, 2021b; HECKEL, 2020; SANAHUJA *et al.*, 2011; VACHON; LAPRADE; SCHWARTZ, 2012; BISOGNIN *et al.*, 2018; DOMANSKA *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2022; KUMAR *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2021; REDDY *et al.*, 2022; GONÇALVES; DELABONA, 2022; KUMAR *et al.*, 2021).

São microrganismos que produzem uma gama de toxinas que afetam o sistema digestivo de insetos, sendo as principais as proteínas cristalinas Cry e Cyt e as proteínas secretadas binárias e vegetativas, denominadas como Vip e Sip, respectivamente (GOMIS-CEBOLLA, 2019; KUMAR *et al.*, 2021; LACEY; SIEGEL, 2000; MCGAUGHEY, 1994; MILNER, 1994). Ainda há outras toxinas geradas por Bt, mas muitas delas ainda são desconhecidas ou a sua forma de ação é incompreendida (PALMA; BERRY, 2016).

De forma geral, Bt produz as toxinas a partir do processo de esporulação bacteriana ocasionado pela pausa nos processos metabólicos da bactéria, devido estresse de exposição a condições ambientais desfavoráveis. Durante esta fase há a geração das inclusões cristalinas Cry e Cyt, que são ativadas por proteases do intestino médio dos insetos ou possuem afinidade com a porção lipídica da membrana celular e causam citólise celular (GU *et al.*, 2021b; HILBECK; OTTO, 2015; SANTOS *et al.*, 2022; VACHON; LAPRADE; SCHWARTZ, 2012). Além da fase de esporulação, quando em fase vegetativa, as bactérias não formam os cristais, mas produzem e secretam as proteínas VIP e SIP, que agem diretamente nas células epiteliais do intestino médio da praga alvo (GOMIS-CEBOLLA, 2019; PALMA *et al.*, 2013).

Quando no intestino da praga-alvo há a ativação das toxinas, que agem na membrana celular formando poros e facilitando o processo de lise celular, ou ainda ativando outras vias de sinalização intracelular. Após o rompimento da célula atingida, há proliferação das toxinas pelo intestino, resultando na desintegração de outras células, culminando na paralisia intestinal, paralisia geral e morte do alvo por sepse ou necrose (HECKEL, 2020; KUMAR *et al.*, 2021; VACHON; LAPRADE; SCHWARTZ, 2012; PALMA; BERRY, 2016; VACHON; LAPRADE; SCHWARTZ, 2012).

Apesar dos benefícios associados ao uso de agrotóxicos microbiológicos em comparação aos agrotóxicos químicos, ainda existem alguns problemas relacionados a esse tipo de produto. Além da mortalidade de organismos alvo, o Bt pode influenciar na resistência desses organismos no meio ambiente, provocar alterações na biodiversidade do solo, e também há alguns efeitos negativos sobre inimigos naturais (ANGELO, VILAS-BÔAS e CASTRO-GÓMEZ, 2010). Ademais, plantas Bt geneticamente modificadas podem realizar a troca de informações genéticas com outras plantas, desenvolvendo espécies daninhas mais resistentes. No geral, ele é considerado um agente favorável e seguro para o controle de insetos, porém a literatura destaca que os efeitos e impactos no ambiente ainda não são claros (LI *et al.*, 2004; CAPALBO, 2005).

É importante observar que, assim como as substâncias sintéticas, os inseticidas microbiológicos devem ser manejados com cuidado e seguindo as instruções do fabricante para garantir que sejam aplicados com segurança e eficácia, além de evitar possíveis impactos ambientais e em populações.

3.1.4 Contaminação do ambiente pelos herbicidas 2,4-D, Picloram ® e inseticida biológico a base de *Bacillus thuringiensis*

O Brasil é reconhecido internacionalmente como um importante produtor e exportador de várias commodities, sendo o maior produtor de soja do mundo (ZUFFO, AGUILERA e MORAIS, 2010; SOUZA, 2020). Toda essa demanda por produtividade teve como consequência o aumento considerável do uso de agrotóxicos na agricultura, posicionando o país entre os quatro maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, juntamente com Estados Unidos, União Europeia e China (RANI *et al.*, 2021; PAUMGARTTEN, 2020). Além disso, o uso de agrotóxicos não se limita à agricultura, sendo utilizados para o controle de pragas domésticas, insetos vetores de doenças e jardinagem doméstica (GAMA *et al.*, 2015).

Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA) (2023), no ano de 2021 as vendas totais de ingredientes ativos em produtos formulados foram de 720,87 mil toneladas no território nacional. Os herbicidas são em disparado os produtos mais vendidos (570.627,70 toneladas), seguido pelos fungicidas (183.318,50 toneladas), inseticidas (123.815,97 toneladas) e acaricidas (7.410,36 toneladas).

O uso indiscriminado, o potencial de persistência e outras características específicas dos agrotóxicos vem provocando uma série de perturbações ambientais e na saúde das populações. Dentre os principais efeitos está o acúmulo de resíduos tóxicos no solo, na água e nos alimentos (SOUZA *et al.*, 2022; SOUZA TETTE *et al.*, 2016), a seleção de indivíduos resistentes (CLASS; KINTRUP, 1991; TURUSOV; RAKITSKY; TOMATIS, 2002), danos econômicos (DE MORAIS *et al.*, 2018; PIRES *et al.*, 2016), surtos de pragas, efeitos deletérios em animais selvagens e domesticados (MÜNZE *et al.*, 2017; PISA *et al.*, 2014; REZENDE-TEIXEIRA *et al.*, 2022) além de efeitos ao homem com a predisposição ao desenvolvimento de patologias diversas (DALMOLIN *et al.*, 2020; PAUMGARTTEN, 2020).

As principais formas de entrada destes compostos nas diferentes matrizes ambientais são uso direto ou indireto em culturas agrícolas, na forma de domissaneantes e medicamentos veterinários, despejos de efluentes ou através da deriva dos seus componentes (PANIS *et al.*, 2022; SOARES; PORTO, 2007).

Quando o produto é pulverizado diretamente nas plantações, ele estará suscetível às variáveis ambientais, as quais influenciam no comportamento e nos processos de transporte do produto. Os processos de escoamento e lixiviação são importantes vias de dispersão de agrotóxicos dos solos para águas subterrâneas e superficiais, afetando diretamente sua qualidade, sendo difíceis de controlar. As propriedades químicas dessas substâncias influenciam na sua persistência em matrizes ambientais gerando potenciais problemas toxicológicos. Do mesmo modo, a adsorção de agroquímicos pelo solo e sedimentos gera um acúmulo de elementos e potencial risco toxicológico. Ainda, pode ocorrer a degradação desses compostos químicos e a produção de metabólitos, e por último, eles podem ser absorvidos por animais e plantas, podendo ser bioacumulados (LAINI *et al.*, 2012; PILEGGI, PILEGGI e SADOWSKY, 2020; CHANG *et al.*, 2022).

A contaminação de organismos não alvo como plantas, animais e seres humanos, vêm alterando comunidades microbianas e sua função no solo. Sendo esse efeito intensificado pela volatilização e deriva de produtos (RUUSKANEN *et al.*, 2023; THIOUR-MAUPRIVEZ *et al.*, 2019).

O 2,4-D é um herbicida amplamente utilizado na agricultura, jardinagem e em ambientes aquáticos para o controle de ervas daninhas. Sua aplicação pode ocorrer diretamente no solo, em lagoas ou pulverizado sobre as culturas. Dessa forma, acaba entrando no ambiente aquático através de fontes pontuais, como a utilização de equipamentos de pulverização defeituosos, lavagem de tanques, disposição irregular de resíduos e aplicação diretamente no local e por meio de fontes difusas, provenientes dos processos de deriva, lixiviação e escoamento superficial (SILVA *et al.*, 2022). Não só o 2,4-D como também um dos produtos de sua degradação, o 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), são muito solúveis em água. Em virtude disso, podem ser encontrados em rios, lagos ou em águas subterrâneas, mesmo após não terem sido usados por longos períodos de tempo (PILEGGI, PILEGGI e SADOWSKY, 2020).

Além do mais, o comportamento e o destino do 2,4-D podem sofrer alterações devido a intensidade e frequência dos eventos de precipitação, regime de irrigação, condições de vento durante a aplicação e pela composição geológica do solo (Wafa *et al.*, 2011). Esse herbicida apresenta persistência moderada em solo, a qual pode ser influenciada pelos microrganismos aeróbios e anaeróbios, hidrólise de meia vida e taxa de dissipação. A mobilidade do 2,4-D em solo será definida pela quantidade de água presente e pelo coeficiente de adsorção do meio. Além disso, através da pulverização o 2,4-D adentra na atmosfera, como consequência do manejo incorreto da aplicação do produto. Com exceção dos ésteres altamente voláteis que podem causar o efeito deriva no ambiente, a pequena quantidade da substância volatilizada estará sujeita a fotooxidação ou será dissolvida em gotículas de água, voltando para o solo (FRANCIS *et al.*, 2019; ZITOUNI *et al.*, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2021; BRUM *et al.*, 2020).

O comportamento ambiental do Picloram ® e sua rota de degradação são influenciados por diversas variáveis. O herbicida apresenta facilidade em ficar adsorvido em partículas de argilominerais e matéria orgânica, sendo também considerado hidrofílico, portanto, em solos que não apresentam quantidade adequada de argila ou de matéria orgânica ele acaba sendo prontamente lixiviado. Fatores como a textura do solo, o pH e práticas culturais como a irrigação e o manejo de plantas, influenciam na disponibilidade e na dissipação do Picloram ®. As principais vias de degradação do Picloram ® no ambiente incluem a fotólise e a degradação microbiana em solo aeróbio. É importante ressaltar que a degradação do Picloram ® é dependente da concentração aplicada e das condições ambientais, tais como temperatura e umidade do solo. O principal metabólito resultante desse processo é o dióxido de carbono. Em condições anaeróbias no solo e em meios aquáticos, o Picloram ® degrada-se extremamente lentamente na ausência de luz. Esses fatores devem ser considerados ao avaliar o

comportamento e os impactos ambientais do Picloram ® (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1991; SILVA *et al.*, 2012; FRANCO *et al.*, 2014; PASSOS, 2015).

Os inseticidas também têm seu destino e comportamento ambiental afetados por suas características químicas, físicas e biológicas, e a forma como elas interagem com o ecossistema. Por exemplo, a solubilidade em água do produto, influencia na rapidez com que ele vai biodegradar através do processo de hidrólise. Outro fator de degradação importante no caso dos inseticidas é a fotólise, que pode ocorrer de forma direta ou indireta, influenciando no tempo de permanência do composto no ambiente. Da mesma maneira a temperatura ambiental irá influenciar a solubilidade, volatilidade, mobilidade dos inseticidas, toxicidade e bioacumulação, esses últimos também irão depender do tempo de contato no ambiente ou organismo com o inseticida (REZENDE-TEIXEIRA *et al.*, 2022).

O inseticida biológico *Bacillus thuringiensis* (Bt) é um grupo de cepas ou isolados de bactérias, usados em todo mundo e inseridos no ecossistema através da pulverização de fórmulas comerciais ou de organismos modificados geneticamente (ASTUTO e CATTANEO, 2023). A aplicação dos esporos é a forma mais persistente desse produto, podendo ser detectado no ecossistema após a aplicação do tratamento (POULIN *et al.*, 2022). Outra característica que gera resistência em solo, são as protoxinas proteicas produzidas pelo Bt, que podem ficar fortemente adsorvidas nas superfícies organominerais do solo, causando efeitos adversos não letais em organismos não alvo (HUNG *et al.*, 2016).

3.1.4 Efeitos negativos na saúde humana, animal e riscos relacionados aos produtos

Como citado anteriormente, existe uma ambivalência relacionada ao uso dos dois compostos. Muito tem se discutido sobre estudos que indicam efeitos tóxicos na saúde humana e no meio ambiente devido a exposição crônica e aguda a agrotóxicos, também associados à exposição de trabalhadores rurais envolvidos principalmente na cultura da soja, cana-de-açúcar, milho, frutas e hortaliças. Desta forma, a agroecologia e uso de agrotóxicos biológicos vem sendo indicado como alternativa para controle de questões associadas ao uso indiscriminado e descuidado de agrotóxicos. Porém a interação de agrotóxicos (químicos e biológicos) com o meio ambiente e com humanos, é notavelmente complexa, requerendo o desenvolvimento de estudos e múltiplas análises de biomarcadores, ampliando o conhecimento do problema (LUCIO *et al.*, 2023; ANDRADE *et al.*, 2023; GONÇALVES e DELABONA, 2022). A tabela

abaixo apresenta os principais impactos associados ao 2,4-D, Picloram ® e ao Bt a organismos não-alvos dos compostos.

Tabela 2 - Principais impactos a organismos não-alvos relacionados ao uso dos compostos 2,4-D, Picloram ® e *Bacillus thuringiensis*.

PRODUTO	DANO CAUSADO	ORGANISMO TESTE	REFERÊNCIA
2,4-D	induziu a inibição do crescimento embrionário; causou estresse fisiológico em girinos; lesões nas brânquias, nos rins e no tecido;	Embriões e girinos de <i>Lithobates catesbeianus</i> (rã-touro)	(VIRIATO <i>et al.</i> , 2021)
2,4-D	baixa taxa de germinação; anomalias, epinastia, atrofias e murchas vasculares;	Sementes de <i>Beta vulgaris</i> (beterraba)	(FRANÇA, POSSENTI e SANTANA, 2023)
2,4-D	inibiu completamente a germinação;	Sementes <i>Lycopersicon esculentum</i> L. (tomate)	(FRANÇA, POSSENTI e SANTANA, 2022)
2,4-D	o 2,4-D foi detectado em 97,4% das amostras; ocasionou estresse oxidativo em biomarcadores selecionados;	Amostras de urina de mulheres grávidas	(WANG <i>et al.</i> , 2022)
2,4-D	edema pericárdico; estresse oxidativo; bioacumulação;	Embriões de peixe-zebra	(LI <i>et al.</i> , 2017)

2,4-D + Fipronil	interferem no metabolismo energético; neurotoxicidade; efeitos subletais	Girinos	(FREITAS <i>et al.</i> , 2022)
Microplásticos + 2,4-D	os microplásticos aumentaram a absorção do 2,4-D no tecido das minhocas; genotoxicidade; citotoxicidade; dano oxidativo;	<i>Eisenia andrei</i> (minhoca)	(BOUGHATT AS <i>et al.</i> , 2022)
2,4-D e Picloram ®	Alterações cromossômicas, de aderência, broto nuclear e micronúcleo;	Sementes	(MARTINS E PEREIRA 2018)
2,4-D e Picloram ®	Alterações das características vegetativas e reprodutivas;	Cultura do algodoeiro	(FERRARI <i>et al.</i> , 2021)
Picloram ®	CL ₅₀ média de 22 mg/L; atraso na eclosão de embriões; problemas neuromusculares;	Zebrafish	(MECCA, 2022)
2,4-D e Picloram ®	limitara a emergência das plântulas e a dose 100% impediu a germinação das sementes de soja;	Soja	(TIMOSSI <i>et al.</i> , 2020)

<i>Bacillus thuringiensis</i> + Fipronil	alterações nas atividades enzimáticas; mudanças fisiológicas;	Abelhas	(RENZI <i>et al.</i> , 2016)
Protoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	ocorrência de efeitos deletérios em alguns organismos;	Zebrafish	(GONÇALVE S <i>et al.</i> , 2023)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	alteração do funcionamento de enzimas glutathiona-S-transferase, catalase; genotoxicidade; histopatologia;	Girinos	(LAJMANOVI CH <i>et al.</i> , 2015)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	redução do crescimento; alteração da massa corporal;	<i>Cantareus aspersus</i> (caramujo)	(KRAMARZ <i>et al.</i> , 2009)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Na forma de inseticida, os esporos Bt Cry e Btk ocasionaram modificações fisiológicas nas atividades enzimáticas;	<i>Apis mellifera</i>	(DAI <i>et al.</i> , 2012)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Na forma de inseticida, os esporos Bt Cry e Btk ocasionaram modificações fisiológicas nas atividades enzimáticas;	<i>Apis mellifera</i>	(NIU <i>et al.</i> , 2017)

Fonte: Autor (2024).

De acordo com algumas das informações apresentadas pela Tabela 2, é possível observar efeitos negativos que o 2,4-D exerce sobre diversos organismos, tanto de ecossistemas aquáticos, quanto do solo. Conforme Triques *et al.* (2021) que avaliou a ecotoxicidade do 2,4-D e Fipronil em espécies vegetais terrestres e invertebrados do solo, onde para ambos os agrotóxicos, mesmo em concentrações inferiores, foram observados efeitos negativos para espécies não alvo. Em ratos, o 2,4-D provocou mudanças significativas em parâmetros bioquímicos, aumento da lactato desidrogenase (LDH) e diminuição dos níveis de hemoglobina (Hgb), e a atividade de enzimas antioxidantes em eritrócitos reduziram de forma significativa (Wafa *et al.*, 2011). De acordo com Hattab *et al.* (2015) o 2,4-D ocasionou estresse oxidativo em minhocas, estimulando a peroxidação lipídica da membrana e reduzindo a atividade de enzimas antioxidantes. Da mesma forma, Singh e Singh (2015) também observaram o efeito de toxicidade do 2,4-D sobre minhocas, correlacionando que a toxicidade do herbicida depende do tempo de exposição e da dose.

Em organismos aquáticos, Li *et al.* (2017) avaliou a toxicidade do 2,4-D em embriões de Zebrafish, a exposição dos organismos ao herbicida reduziu a taxa de sobrevivência e eclosão, também causou edema pericárdico e alterações em marcadores de estresse oxidativo. Em Lagostins, considerados organismos não-alvos no ecossistema, o estudo de Benli *et al.* (2007) também observou toxicidade do herbicida para esses organismos, onde foram relatadas alterações comportamentais.

Em relação a organismos que possuem grande importância, as abelhas que desempenham um papel importante na biodiversidade, também vem sofrendo com a toxicidade de herbicidas, que estão acarretando em alterações comportamentais e efeitos de toxicidade aguda, implicando na morte de indivíduos, prejudicando a manutenção das colônias (MONQUERO e OLIVEIRA, 2018).

Um grande problema atual dos herbicidas auxínicos é a deriva, a qual vem afetando culturas sensíveis e organismos não alvos, trazendo prejuízos econômicos (BROCHADO *et al.*, 2022). O 2,4-D por possuir alta capacidade de volatilização é capaz de atingir locais com até 30 Km de distância do local de aplicação, podendo causar consequências irreversíveis para produtores de culturas sensíveis (IZOLANI e OLIVEIRA, 2021). Como é o caso das plantas de videira do município de Jaguari, no Rio Grande do Sul, que vem apresentando sintomas de fitotoxicidade causados pela deriva do 2,4-D (RIBEIRO *et al.*, 2020). Ainda mais, esse herbicida apresentou impactos em plântulas de árvores frutíferas, a exemplo da tangerina *pokan*

que teve vários dos seus processos alterados, dentre eles a taxa fotossintética, condutância estomática e degradação da clorofila (BROCHADO *et al.*, 2022).

Além dos problemas ocasionados pela deriva do produto, em organismos benéficos para o ecossistema e plantas sensíveis, o 2,4-D é classificado pela União Europeia como uma substância de potencial desregulação endócrina. Ou seja, é um produto com potencial efeitos tóxicos à saúde humana (HUPFFER, FIGUEIREDO e WEYERMULLER, 2019). O seu uso também tem sido associado com o risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas de Parkinson e autismo (ZUANAZZI, GHISI e OLIVEIRA, 2020). Além disso, o 2,4-D é um forte indutor de estresse oxidativo em biomarcadores humanos, apresentando potencial carcinogênico, o que é potencializado quando está em mistura com outros agrotóxicos e aplicado em cultivos de larga escala com culturas geneticamente modificadas (MESNAGE *et al.*, 2021).

O desenvolvimento de biótipos de plantas daninhas resistentes é motivado pelo uso intensivo e repetido de um mesmo produto para o controle de plantas daninhas em determinadas áreas (CHRISTOFFOLETI, FILHO e SILVA, 1994). Essa resistência proporciona mudanças bioquímicas e fisiológicas, as plantas daninhas alterando o sítio de ação do herbicida e metabolização do mesmo, permitindo que elas sobrevivam à exposição aos herbicidas. Como consequências principais, há a necessidade do aumento no uso de herbicidas, necessidade de produtos alternativos e o uso combinado de substâncias (VARGAS, 2016; MARKUS *et al.*, 2021). O herbicida 2,4-D devido ao seu mecanismo de ação é considerado uma importante alternativa para manejo de áreas com problemas de resistência (GAZZIERO, BRIGHENTI e VOLL, 2006). Portanto, há um risco associado à intensificação dos efeitos relatados, num aumento da utilização do 2,4-D e da necessidade de se garantir a produtividade de alimentos.

O Picloram ® tem sido objeto de estudos devido aos seus efeitos semelhantes ao do 2,4-D, com impactos em organismos não alvo e plantas. Em organismos como insetos, mamíferos e aves, pode causar toxicidade aguda e crônica, afetando o funcionamento do sistema nervoso, a capacidade reprodutiva e o desenvolvimento. A acumulação do herbicida no solo e na água também pode prejudicar a biodiversidade e comprometer ecossistemas. Estudos evidenciam que o Picloram ® pode causar alterações comportamentais, como redução na atividade alimentar e locomoção, bem como danos morfológicos e fisiológicos, como alterações no crescimento e desenvolvimento de organismos aquáticos. Além disso, o herbicida pode afetar negativamente os biomarcadores de estresse oxidativo, ao aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio, promover a peroxidação lipídica e alterar a atividade de enzimas

antioxidantes. Esses efeitos podem levar a danos celulares e comprometer a saúde dos organismos expostos. Adicionalmente, a persistência e o residual do Picloram® no solo podem interferir no processo de rotação de culturas em áreas agrícolas, gerando fitotoxicidade para plantas de valor comercial. Isso resulta em redução da produtividade e impactos econômicos negativos na produção agrícola (MARTINS e PEREIRA 2018; FERRARI *et al.*, 2021; MECCA, 2022).

Mesmo o Bt sendo considerado um composto favorável e seguro para o controle de insetos, estudos como o de Gonçalves *et al.* (2023) vem relatando a ocorrência de efeitos deletérios em alguns organismos, principalmente em organismos não-alvos. Segundo Dai *et al.* (2021) na forma de inseticida, os esporos do Bt Cry e Btk ocasionam modificações fisiológicas nas atividades enzimáticas de abelhas, efeito que também foi observado por Niu *et al.* (2017). Em girinos, foi relatado por Lajmanovich *et al.* (2015) a ocorrência de genotoxicidade e histopatologia. Ainda, foram apontados efeitos relacionados à redução do crescimento e alteração da massa corporal de caramujos por Kramarz *et al.* (2009).

Para mamíferos, a resistência às toxinas vem sendo associada à sua insolubilidade, principalmente devido ao pH do trato intestinal, que é mais ácido do que o dos insetos (GRIFFITTS *et al.*, 2003). Entretanto, para insetos, o mecanismo de resistência pode ser associado a alterações genéticas e fisiológicas nos animais, como a modificação de proteínas que pertencem a componentes estruturais, a catalisadoras de reações enzimáticas e transportadoras, sendo que o surgimento de resistência a insetos é uma ameaça ao uso contínuo de culturas geneticamente modificadas com Bt, desafiando a continuidade do uso desta tecnologia na agricultura (BALABANIDOU; GRIGORAKI; VONTAS, 2018; BRAVO; SOBERÓN, 2008; FORGASH, 1984; LINACRE; THOMPSON, 2004; MCGAUGHEY, 1994).

O uso crescente de biopesticidas, tem despertado interesse como uma alternativa aos pesticidas químicos sintéticos. No entanto, é importante reconhecer que, assim como os produtos convencionais, os biopesticidas também apresentam riscos ambientais se não forem manejados adequadamente. O manejo incorreto e o uso indiscriminado desses produtos podem resultar em efeitos adversos sobre organismos não alvo, induzir fitotoxicidade e até mesmo causar toxicidade em condições de campo. Portanto, é essencial realizar uma avaliação cuidadosa dos riscos associados ao uso desses compostos e implementar práticas de manejo que minimizem esses impactos negativos (DEYASHI e CHAKRABORTY, 2022; NASCIMENTO *et al.*, 2022).

Nesse contexto, a toxicologia ambiental emerge como uma área do conhecimento essencial, devido à sua capacidade de conceber e aplicar conceitos-chave, como a relação entre dose e risco e a determinação da dose letal (DL₅₀). A importância da toxicologia ambiental é evidenciada pela necessidade de avaliar o impacto de agrotóxicos, no ambiente e na saúde pública. Além disso, seus princípios e métodos fornecem a base para a formulação de políticas de saúde pública voltadas para a proteção da população e do meio ambiente contra os efeitos nocivos dos pesticidas e outros produtos químicos (VAIL, 2015).

3.2 ECOTOXICOLOGIA

Derivada da união dos ramos da ecologia e toxicologia, a ecotoxicologia é definida como sendo o estudo dos efeitos de substâncias químicas sobre os ecossistemas (CHAPMAN, 2002; FOTH, 1999). Desenvolvendo a avaliação do potencial de toxicidade dessas substâncias, realizando o monitoramento comportamental delas e o diagnóstico de possíveis efeitos tóxicos, levando em consideração interação dessas substâncias em populações, comunidades e ecossistemas, além das interações com o ambiente físico e químico (VERSONNEN *et al.*, 2022). O seu principal objetivo é a prevenção de impactos negativos ao ambiente e em organismos, possibilitando a determinação de condições seguras para a utilização de produtos químicos. Posto isto, é uma ciência extremamente importante que nos permite entender melhor como elementos químicos presentes no meio ambiente podem afetar a vida das espécies, bem como monitorar riscos e as consequências de substâncias tóxicas (TARAZONA e DOHMEN, 2008; BELDEN, 2020).

Os ecotoxicologistas avaliam os riscos associados à contaminação de alimentos e do meio ambiente devido ao uso excessivo ou incorreto de produtos químicos e outras substâncias tóxicas (FRANZLE, 2003). Esses riscos incluem danos graves à saúde humana, animais e plantas, bem como a mortalidade de alguns organismos. Tais avaliações são realizadas através de testes, conhecidos como ensaios ecotoxicológicos ou testes de toxicidade (CONNELL, 2014; FOTH, 1999).

Os testes são padronizados por agências reguladoras como a *International Organization for Standardization (ISO)* e *Organization for Economic Co-operation and Development (OECD)*, envolvem a exposição de organismos-testes vivos a substâncias possivelmente tóxicas, viabilizando assim detectar a toxicidade de amostras. Os testes de toxicidade aguda são realizados em um curto período de tempo, usados para avaliar a toxicidade acumulada, a

toxicidade metabolizada, os mecanismos de toxicidade de substâncias e seus metabólitos, além de serem usados para identificar os níveis subletais, letais e dose necessária para causar um efeito. Enquanto os testes de toxicidade crônicos são realizados para avaliar efeitos a longo prazo, usados para avaliar a toxicidade, bioacumulação, biodegradação de substâncias químicas, como por exemplo água residual, lama industrial, pesticidas e contaminantes ambientais (CARVALHO e PILOTO, 2011; CLOTFELTER, SINO e ALAVANCAR, 2004; COSTA *et al.*, 2008).

Os organismos-testes são indivíduos também padronizados utilizados nos ensaios ecotoxicológicos, representando uma ampla gama de organismos no ecossistema que potencialmente podem ser impactados por substâncias tóxicas. Sendo assim, precisam ser biológica e fisiologicamente bem conhecidos, encontrarem-se disponíveis em todas as estações do ano, serem fáceis de trabalhar e de mantê-los em laboratório, além de apresentarem resultados representativos, utilizando-os com modelos (COSTA *et al.*, 2008; RIVAS-ZABALLOS *et al.*, 2021).

Em relação aos testes de toxicidade crônica, os marcadores bioquímicos são uma ferramenta de grande interesse. Incluem espécies reativas de oxigênio como os peróxidos lipídicos, espécies reativas de nitrogênio como os óxidos nitrosos e a produção de radicais livres, como os radicais hidroxila. Estes marcadores são usados para medir a atividade enzimática, a concentração de metais pesados, a análise de marcadores mensageiros como mRNA e proteínas e outras espécies químicas. Os principais são, a capacidade antioxidante contra radicais peroxil (ACAP), espécies reativas de oxigênio (EROs), Óxido Nítrico (NO), Peróxidos, Carbonil, Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Redutase (GR), Glutathione Peroxidase (GPx) e Glutathione S-transferase (GST), Acetilcolinesterase (AChE), Butirilcolinesterase (BChE) (FRANZLE, 2003; BARBOSA *et al.*, 2010).

A avaliação destes marcadores, além de demonstrar que a exposição aos compostos avaliados possui significado toxicológico, pode indicar um efeito ou uma disfunção do sistema avaliado (ALMEIDA *et al.*, 2008). São indicadores extremamente sensíveis a distúrbios causados por xenobiontes, possuindo suma importância por antever possíveis danos severos às células (peroxidação lipídica, oxidação enzimática e oxidação do DNA e RNA), esses danos se observados com antecedência, evitam que o ecossistema seja afetado como um todo (OLIVEIRA e SOUZA, 2006).

As minhocas são consideradas ótimos bioindicadores e têm sido usadas nos estudos de ecotoxicologia. graças a sua tolerância às baixas concentrações de toxinas, são capazes de monitorar vários tipos de compostos químicos no solo. Além disso, elas têm uma curta expectativa de vida e são susceptíveis a mudanças nas características ambientais e podem ajudar a detectar precocemente possíveis mudanças ambientais (GOMES *et al.*, 2012; ANDRÉA, 2010; BROWN e DOMÍNGUEZ, 2010; LIJTEROFF, 2009; STEFFEN *et al.*, 2013; FERREIRA, 2015).

A ecotoxicologia no Brasil vem se desenvolvendo de forma relevante nos últimos anos, principalmente em relação à aplicação de métodos e técnicas de estudo para o monitoramento e a avaliação da toxicidade ambiental. A exemplo da resolução do Conama nº 454, de 1º de novembro de 2012, que propõem o uso de ensaios ecotoxicológicos para auxiliar no gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional.

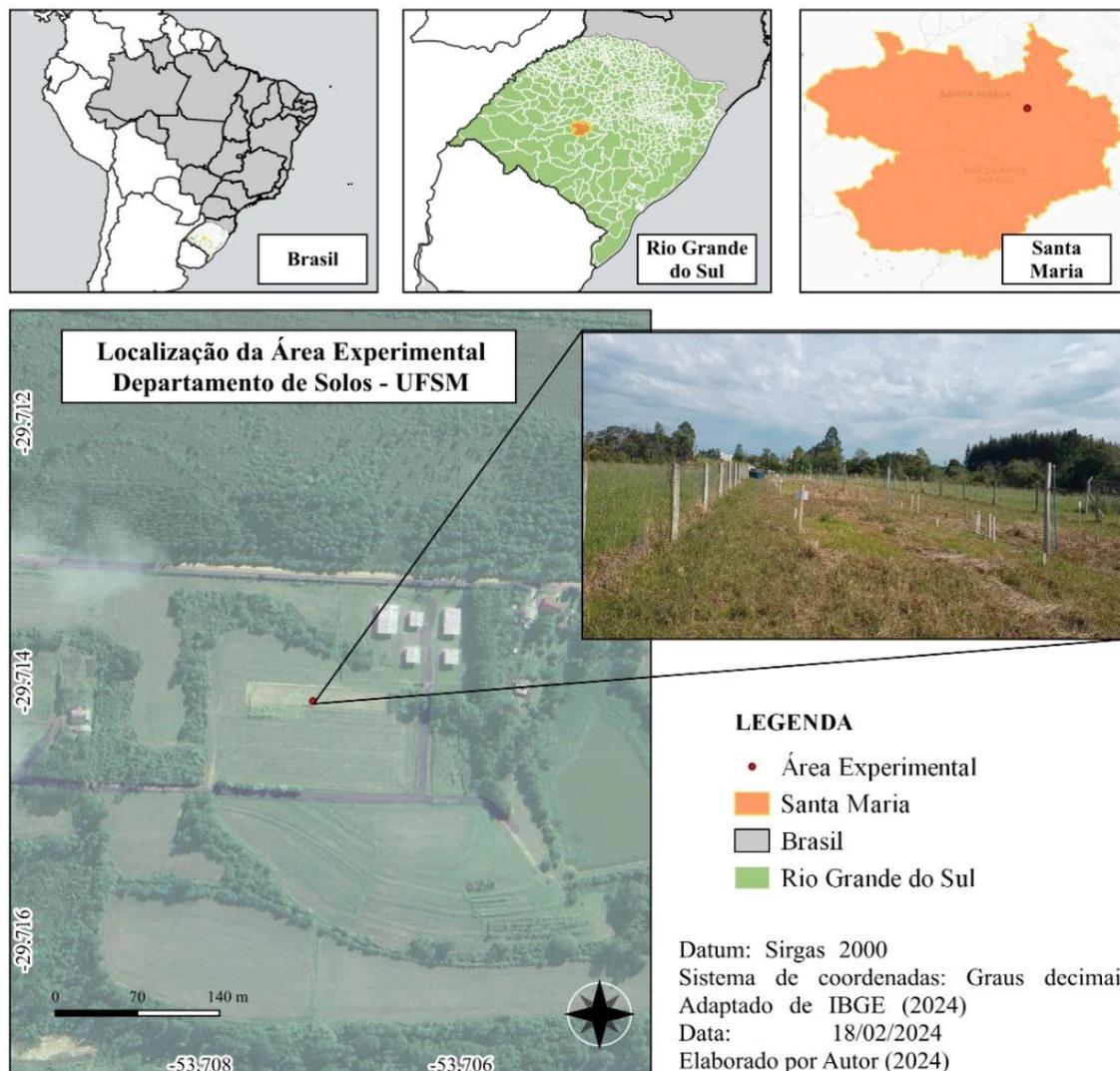
4. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos de acordo com os padrões e diretrizes técnicas estabelecidos pelas normas ASTM E1676 (ASTM, 2021), ISO 17512-1 (ABNT, 2011) e OECD 207 (OECD, 1984b). Estas normas abrangem procedimentos para coleta de amostras de solo, preparo dos organismos teste, períodos de aclimação, realização dos testes, bem como a coleta de amostras biológicas. Esses protocolos foram seguidos rigorosamente para possibilitar a observação das respostas antioxidantes (enzimáticas e não-enzimáticas), estresse oxidativo e neurotóxicas dos organismos-teste após exposição ao solo natural com aplicação de herbicida e bioinseticida. Portanto, a seção a seguir apresenta os materiais e métodos empregados na condução destes estudos.

4.1 SOLO, ORGANISMOS TESTE E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a realização dos testes, foram utilizadas amostras de solo coletadas em uma área experimental da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), no município de Santa Maria – RS, localizada na latitude 29°43'12''S e longitude 53°43'4''W (Figura 1), sem histórico de aplicação de agrotóxicos ou plantio de OGM's. Durante o processo de coleta das amostras de solo, foram adotadas as diretrizes recomendadas para a amostragem com pá-de-corte, conforme descrito no Manual de Calagem e Adubação para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (SBCS, 2016). Para adequação às condições específicas do local, foram realizadas adaptações nas técnicas de coleta, levando em consideração as características do terreno, conforme norma vigente (ASTM, 2021).

Figura 1- Mapa de localização da Área Experimental



As amostras foram retiradas na profundidade de 0 a 20 cm, excluindo-se a camada de serrapilheira, e em seguida foram homogeneizadas, secas ao ar e peneiradas utilizando uma malha de 2 mm. A análise das características físico-químicas do solo foi conduzida no laboratório de química e fertilidade do solo da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), seguindo os métodos padronizados frequentemente utilizados no laboratório.

O solo utilizado no experimento pode ser caracterizado como solo natural do tipo 1 (ASTM E1676, 2021), classificado como Argissolo Vermelho Distrófico arênico (EMBRAPA, 2021), correspondente ao Typic Hapludalf (SOIL SURVEY STAFF, 2022), com as seguintes características físicas: 108 g kg⁻¹ de argila, 183 g kg⁻¹ de silte e 709 g kg⁻¹ de areia. O solo utilizado não apresentou contaminação para os compostos analisados, 2,4-D e Picloram ®,

conforme relatório de ensaio do Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP). Ainda, em relação aos resultados da análise do solo, o pH médio foi de 5,15, indicando uma leve acidez. Além disso, o teor de fósforo (P) foi de 15,7 mg/kg⁻¹, indicando uma concentração classificada como "médio" de acordo com a norma ASTM E1676 (2021). Também, o potássio (K) foi de 35 mg/kg⁻¹, apresentando um teor relativamente baixo segundo a mesma referência. Já o cálcio (Ca) foi de 1,9 cmolc/kg⁻¹, mostrando uma quantidade classificada como "médio" conforme a ASTM E1676 (2021) e o magnésio (Mg) foi de 0,9 cmolc/kg⁻¹, indicando um teor baixo de acordo com a norma. Ademais, a capacidade de troca catiônica a pH 7 (CTCpH7) foi de 5,8 cmolc/kg⁻¹, com uma capacidade classificada como "médio" de retenção de nutrientes, segundo a ASTM E1676 (2021). A saturação de bases foi de 51,3%, indicando uma proporção classificada como "médio" de bases em relação à capacidade de troca catiônica total, conforme a mesma referência. Por fim, os teores de nitrogênio total (NT), carbono total (CT), cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) foram de 0,81 mg/L⁻¹, 8,05 mg/L⁻¹, 0,77 mg/L⁻¹, 1,36 mg/L⁻¹ e 64,76 mg/L⁻¹, respectivamente.

O organismo teste utilizado foram minhocas adultas da espécie *Eisenia andrei* com clitelo e peso entre 300 e 600 mg, que passaram por um período de aclimação de 15 dias em recipientes de polietileno de 50 litros contendo esterco bovino antes do início do estudo. Ainda antes do início dos testes houve o esvaziamento do conteúdo intestinal das minhocas, que foram pesadas e mantidas em amostra de solo controle por 24 horas.

Estes ensaios foram realizados em quatro réplicas, utilizando 500 g de solo para cada tratamento, com 10 minhocas adultas e cliteladas por réplica. A umidade do solo foi ajustada e mantida de 50% da capacidade de retenção de água no solo (CMRA), a qual foi definida através do método de Monteiro e Frighetto, (2000) (ABNT, 2011; OECD, 2016). No decorrer dos ensaios ecotoxicológicos as minhocas foram mantidas com alimentação mínima semanal e submetidas às mesmas condições de criação (iluminação 12 horas escuro/12 horas claro e temperatura ambiente de 23 ± 2°C). Os testes ecotoxicológicos ocorreram em recipientes de polietileno com capacidade de 1 L, com tampas perfuradas para a entrada de ar, mas sem permitir a fuga dos animais. A coleta de material biológico ocorreu em 14 e 28 dias de exposição, sendo este o último dia de exposição. Nas datas citadas, cinco indivíduos foram coletados, lavados com água deionizada, pesados, deixados um período de purga de 24h e logo após conservados a -20° C até a realização dos bioensaios.

O delineamento experimental aplicado, foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC), tendo como tratamentos: controle (CT), 2,4-D e Picloram® (CD), *Bacillus thuringiensis* (BT) e 2,4-D e Picloram® + *Bacillus thuringiensis* (CDB).

A definição das doses para os bioensaios de toxicidade crônica, foi realizada com base nos valores médios recomendados para aplicação agrícola, conforme bulas dos produtos. Desta forma, adotou-se como referência para a mistura comercial de 2,4-D e Picloram® o valor de 4 L ha⁻¹ e *Bacillus thuringiensis* (Hizobio®) 1 L ha⁻¹. Considerando a área do recipiente utilizado, que possuía 0,0302255 m², as doses aplicadas foram de: 12 µL de 2,4-D e Picloram®; e 3,02 µL de *Bacillus thuringiensis*. Antes da aplicação em solo, as substâncias utilizadas nos ensaios foram diluídas e homogeneizadas em água deionizada, sendo realizada uma única aplicação de forma uniforme por todo o solo, considerando a capacidade máxima de retenção de água do solo (CRMA) Para a adequação da capacidade de campo do solo controle, utilizou-se apenas água deionizada, sem adição de outras substâncias.

4.2 BIOENSAIOS E ANÁLISES ECOTOXICOLÓGICAS

4.2.1 Preparo das amostras

As amostras foram preparadas a partir da pesagem de 50 mg de tecido que foram homogeneizados com solução com tampão TRIS-HCl 50 mM em pH de 7,5. Após a homogeneização, as amostras passaram para a centrifuga, a 3000 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para as análises bioquímicas dos seguintes biomarcadores: capacidade antioxidante contra radicais peroxil (ACAP), espécies reativas de oxigênio (EROs), Óxido Nítrico (NO), Peróxidos, Proteína Carbonil, Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), Catalase (CAT), Glutathione redutase (GR), Glutathione Peroxidase (GPx), Acetilcolinesterase (AChE) e Butirilcolinesterase (BChE).

Em relação aos reagentes utilizados nos ensaios, os mesmos foram comprados da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), com elevado grau de pureza (95-99%).

4.2.2 Determinação de Proteínas

Em tubos de ensaio, foi adicionada albumina de soro bovino como padrão, juntamente com 10 µL das diferentes amostras. A absorbância foi medida a 595 nm em um espectrofotômetro UV-VIS, seguindo a metodologia proposta por Bradford (1976).

4.3.3 Determinação da resposta antioxidante e estresse oxidativo

Para análise da resposta antioxidante e do estresse oxidativo, os parâmetros ACAP, EROs, NO, peróxidos, carbonil e TBARS foram avaliados.

A capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP) e as espécies reativas de oxigênio (EROs) foram determinadas conforme descrito por Garcia *et al.*, (2009). O método envolveu a avaliação de EROs, com e sem a presença de um gerador de radicais peroxil (ABAP). Para a detecção de EROs, 10 µL de homogeneizado, 130 µL de tampão de reação TRIS HCl 10 mM (pH 7,4) e 10 µL de H2DCF-DA 0,1 mM (diacetato de 2',7' diclorofluorescein) foram adicionados em microplacas. Após a leitura inicial, foi adicionado 10 µL de ABAP 4 mM, sendo necessário aguardar 10 minutos antes de adicionar 10 µL de solução estoque de Dicloro, seguido de uma segunda leitura realizada após 10 minutos. As leituras foram feitas em um leitor de placas a 488 nm (excitação) e 525 nm (emissão) a cada 5 minutos, totalizando 30 minutos. Os resultados foram calculados pela diferença entre as áreas relativas utilizando o software GraphPad Prism 9, sendo que uma área maior indica menor capacidade antioxidante (AMADO *et al.*, 2009).

O óxido nítrico (NO) foi determinado pelo método da Reação de Griess (GRIESS, 1879; TSIKAS, 2007). As amostras foram pipetadas em duplicata em uma microplaca, sendo adicionados nitrito de sódio 200 µM (NaNO₂) em um poço e água destilada com nitrito em diluição nos demais poços. Após a adição da solução AB (A: sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 2,5% e B:naftil etileno amida dihidroclorido 0,1% em ácido fosfórico 2,5%), as leituras foram feitas a 570 nm. Os resultados foram expressos em concentração de óxido nítrico (NO) em µmol por litro.

A carbonilação de proteína foi analisada conforme o método de Yan *et al.* (1997) com adaptações. As amostras foram diluídas em água destilada e distribuídas em tubos de ensaio. Após incubação com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) e reagentes subsequentes, a absorbância foi medida a 370 nm. Os resultados foram expressos em nmol de carbonil por mg de proteína.

Os peróxidos foram determinados pelo método de Velikova, Yordanov e Edreva (2000), que envolveu a desproteínização das amostras com ácido tricloroacético (TCA) 10%. Após a adição de iodeto de potássio (KI) e a leitura a 400 nm, os resultados foram expressos em µmol/mg de proteína.

A quantificação dos produtos de peroxidação lipídica foi realizada pela determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme Buege e Aust (1978),

adaptado para ensaio em microplacas. As amostras foram desproteinizadas com TCA 10%, incubadas com TBA 0,67% em banho-maria e a leitura foi feita a 532 nm. Os resultados foram expressos em nmol de malondialdeído (MDA) por mg de proteína.

4.3.4 Determinação da resposta enzimática

Para investigar a resposta antioxidante enzimática do organismo, foram analisadas as atividades das enzimas, CAT, GR e GPx.

Para avaliar a atividade da CAT, responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), utilizou-se o método de Hadwan e Abed (2016). Em uma microplaca, foram pipetados 5 μ L de amostra com 100 μ L de peróxido de hidrogênio 20 mM, aguardando 3 minutos antes de adicionar 150 μ L de molibdato de amônia 32,4 nmol/L. A leitura foi realizada em 374 nm e os resultados foram expressos em unidades de catalase (U CAT) por mg de proteína.

A atividade da enzima Glutathione redutase (GR) foi avaliada conforme o método descrito por Paglia, Donald e Valentine em (1967). O sistema de ensaio foi montado utilizando NADPH, GSH, GR e 250 μ L de azida a 100 mM em um volume final de 20 ml de solução de tampão fosfato de potássio a 100 mM e pH 7. Em seguida, foram adicionados 20 μ L das amostras de ensaio juntamente com 250 μ L do sistema reacional em uma microplaca e a leitura foi realizada a 340 nm. Posteriormente, o substrato GSSG foi adicionado e a leitura cinética foi realizada por 2 minutos, com intervalos de 30 segundos. Os resultados foram expressos em μ mol de produto formado por minuto por mg de proteína.

O método de Paglia e Valentine (1967) foi utilizado para a Glutathione Peroxidase (GPX). Preparou-se o sistema com NADPH, GSH, GR e azida em TFK 100 mM, pH 7. Na microplaca, foram pipetados 10 μ L de amostra e 260 μ L do sistema, enquanto o controle (branco) foi preparado com 10 μ L de H_2O . Após zerar o equipamento com água, realizou-se a leitura em 340 nm. Em seguida, foram adicionados 30 μ L de substrato (H_2O_2 4 mM) e realizou-se uma nova leitura durante 2 minutos, a cada 30 segundos. Os resultados foram expressos em μ mol de proteína por minuto.

4.3.5 Determinação da resposta neurotóxica

A avaliação da resposta neurotóxica foi conduzida por meio da avaliação das enzimas AChE e BChE, ambas envolvidas na regulação da concentração de acetilcolina no organismo. Destaca-se que a análise da BChE foi também realizada seguindo o método de Ellman *et al.*

(1961) e iodeto de butirilcolina 1 mM como substrato para iniciar a reação, sendo os demais procedimentos efetuados conforme técnica da AChE, descrita abaixo.

Para avaliar a AChE, o método de Ellman *et al.* (1961) foi utilizado. e as absorvâncias foram determinadas a 412 nm durante 2 minutos e 30 segundos, com leituras efetuadas em intervalos de 30 segundos. A atividade enzimática foi expressa em μmol de AcSCh hidrolisada por minuto por mg de proteína.

4.5 DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE AS SUBSTÂNCIAS

Para compreender como as substâncias químicas interagem quando os organismos são expostos a misturas delas, foi utilizada a metodologia proposta por Viana (2020) e Gottardi *et al.* (2017), que avalia a razão entre os efeitos esperados (EE) e observados (EO).

Inicialmente, foram realizados os cálculos do modelo de ação independente das substâncias testadas: 2,4-D e Picloram® (CD) e *Bacillus thuringiensis* (BT), em relação ao Controle (CT). O EE foi calculado para cada substância isoladamente: $EE = CD/CT * BT/CT$. Em seguida, o EO foi calculado para a mistura das substâncias: 2,4-D e Picloram® + *Bacillus thuringiensis* (CDB), em relação ao Controle (CT): $EO = CDB/CT$. Por fim, foi feita a classificação do tipo de interação observada (I), levando em consideração os resultados da razão entre EE e EO ($R = EE/EO$). Os valores resultantes da Razão inferiores a 1 indicam antagonismo, valores superiores a 1 indicam sinergismo e valores iguais a 1 indicam que não há sinergismo nem antagonismo.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

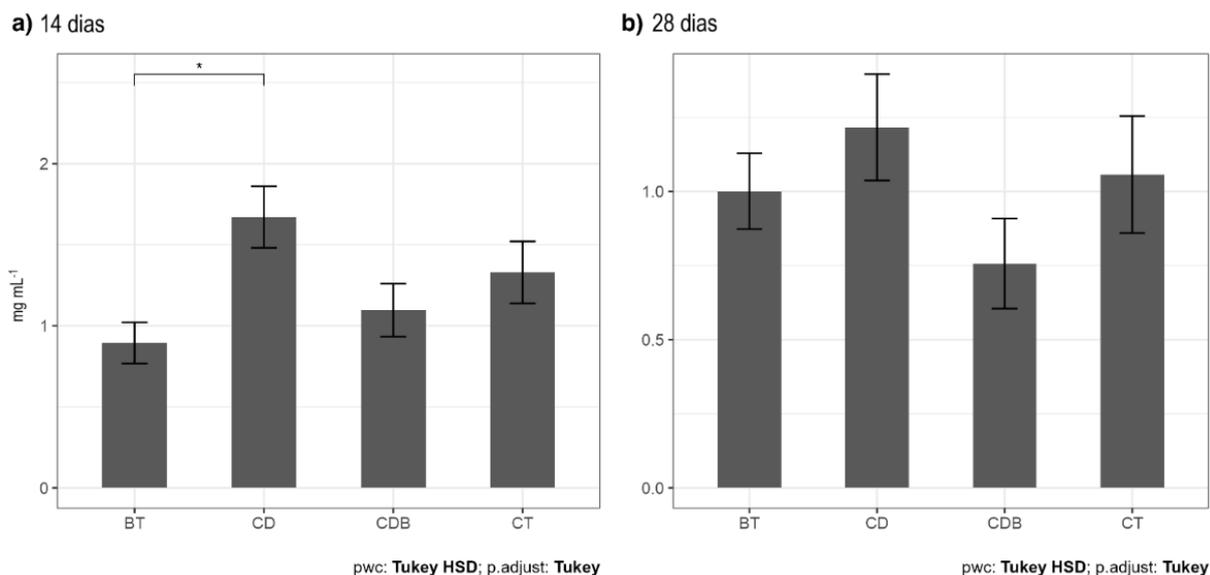
Para a análise estatística, foi empregado o pacote estatístico R (R CORE TEAM, 2024). A normalidade e homogeneidade dos dados foram verificadas por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Nos casos em que os dados não atenderam aos pressupostos, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. Já os dados que atenderam aos pressupostos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, comparações post hoc foram realizadas utilizando o teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de $P \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 RESPOSTA ANTIOXIDANTE E ESTRESSE OXIDATIVO

Os resultados da ACAP apresentados na Figura 2, mostraram aumento na atividade da ACAP no tratamento CD aos 14 dias de exposição. Enquanto aos 28 dias de exposição, o tratamento CDB apresentou diminuição dos níveis.

Figura 2- Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil em minhocas expostas a 2,4-D, Picloram ® e *Bacillus thuringiensis*.

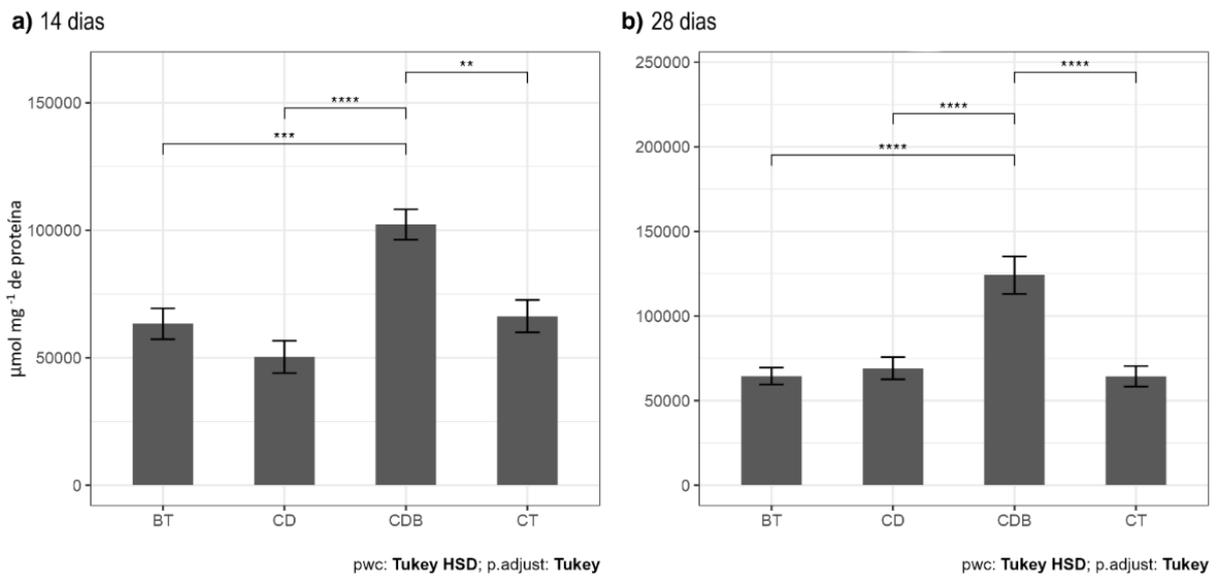


Legenda: Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Período: a) 14 dias e b) 28 dias. Tratamentos: BT = *Bacillus thuringiensis*; CD = 2,4-D e Picloram ®; CDB = *Bacillus thuringiensis* + 2,4-D e Picloram ®.

Fonte: Autor (2024).

Conforme apresentado na Figura 3, a atividade de EROs no tratamento CDB apresentou aumento significativa em relação ao CT, BT e CD, em ambos os tempos de exposição.

Figura 3 - Espécies reativas a oxigênio em minhocas expostas a 2,4-D, Picloram ® e *Bacillus thuringiensis*.

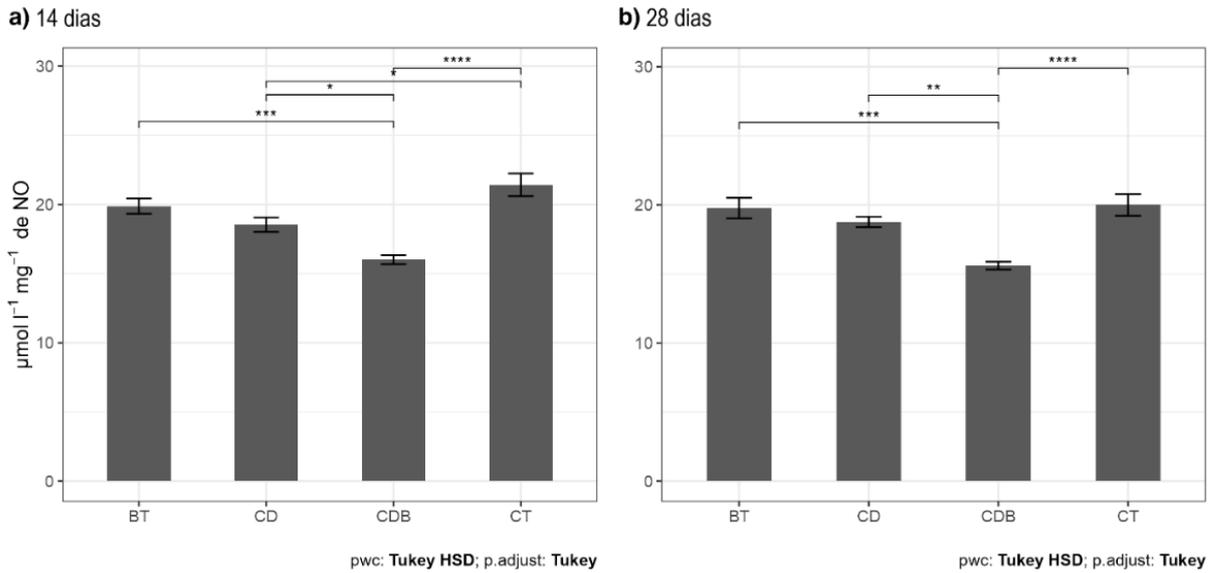


Legenda: Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Período: a) 14 dias e b) 28 dias. Tratamentos: BT = *Bacillus thuringiensis*; CD = 2,4-D e Picloram ®; CDB = *Bacillus thuringiensis* + 2,4-D e Picloram ®.

Fonte: Autor (2024).

A Figura 4 mostra uma redução significativa nos níveis de NO no tratamento CDB, tanto aos 14 quanto aos 28 dias, em comparação aos demais tratamentos. Ao analisar os tratamentos nos quais as substâncias foram aplicadas individualmente, o grupo CD apresentou uma redução aos 14 dias em relação ao CT. No entanto, aos 28 dias, não foram observadas alterações significativas nos resultados para os grupos CD e BT em comparação ao grupo controle.

Figura 4 - Óxido nítrico em minhocas expostas a 2,4-D, Picloram ® e *Bacillus thuringiensis*.

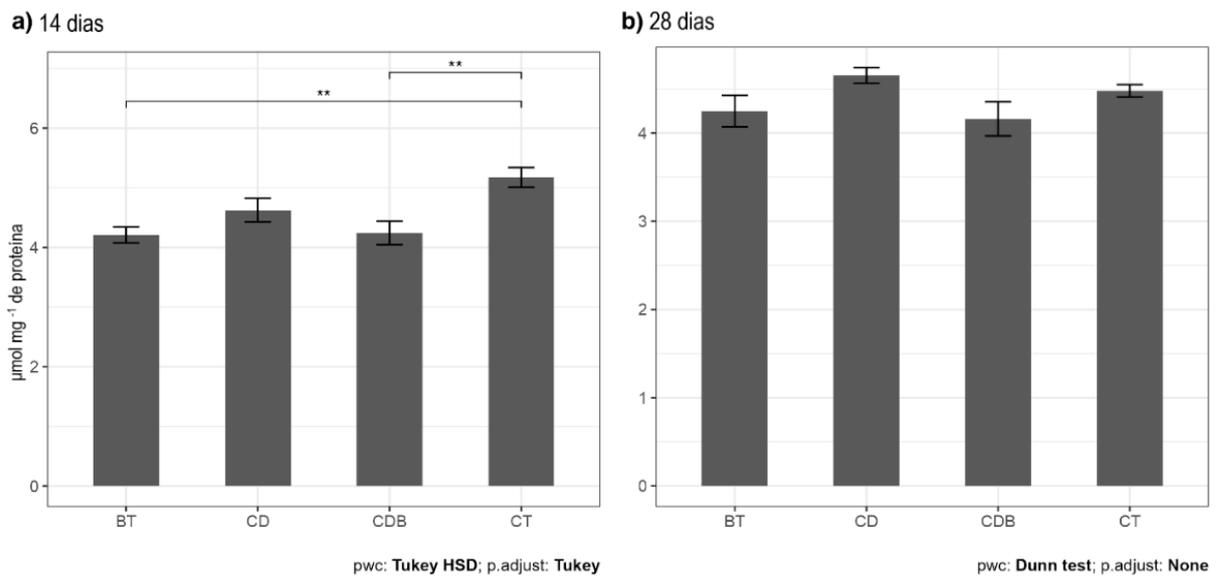


Legenda: Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Período: a) 14 dias e b) 28 dias. Tratamentos: BT = *Bacillus thuringiensis*; CD = 2,4-D e Picloram ®; CDB = *Bacillus thuringiensis* + 2,4-D e Picloram ®.

Fonte: Autor (2024).

Na determinação de peróxidos, conforme Figura 5, foi observado uma diminuição nos níveis de peróxidos nas amostras dos grupos BT e CDB em relação ao CT nos 14 dias de exposição.

Figura 5 - Peróxido em minhocas expostas a 2,4-D, Picloram ® e *Bacillus thuringiensis*.

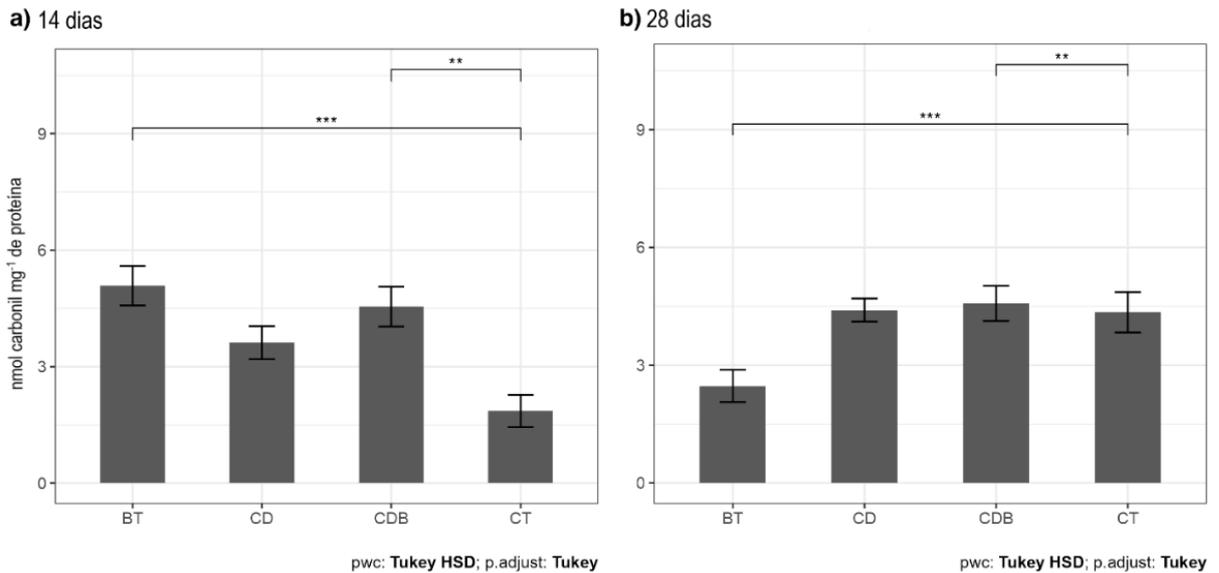


Legenda: Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Período: a) 14 dias e b) 28 dias. Tratamentos: BT = *Bacillus thuringiensis*; CD = 2,4-D e Picloram ®; CDB = *Bacillus thuringiensis* + 2,4-D e Picloram ®.

Fonte: Autor (2024).

Os níveis de carbonilação de proteínas estão demonstrados na Figura 6, pela qual se evidencia que os tratamentos BT e CDB apresentaram valores maiores do que o CT aos 14 dias. Ainda, houve uma redução de 14 para 28 dias de exposição no BT. No restante, os demais tratamentos não apresentaram diferença significativa.

Figura 6 - Carbonil em minhocas expostas a 2,4-D, Picloram ® e *Bacillus thuringiensis*.

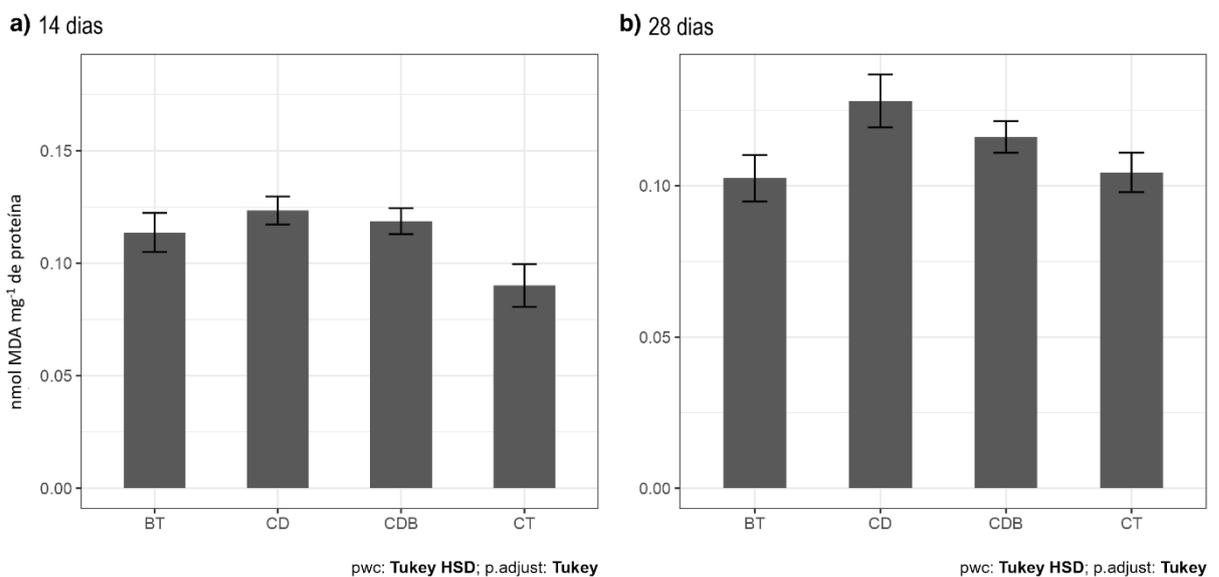


Legenda: Nível de significância: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001. Período: a) 14 dias e b) 28 dias. Tratamentos: BT = *Bacillus thuringiensis*; CD = 2,4-D e Picloram ®; CDB = *Bacillus thuringiensis* + 2,4-D e Picloram ®.

Fonte: Autor (2024).

Pelos níveis de TBARS apresentados na Figura 7, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos testados e os dias de exposição.

Figura 7 - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em minhocas expostas a 2,4-D, Picloram ® e *Bacillus thuringiensis*.



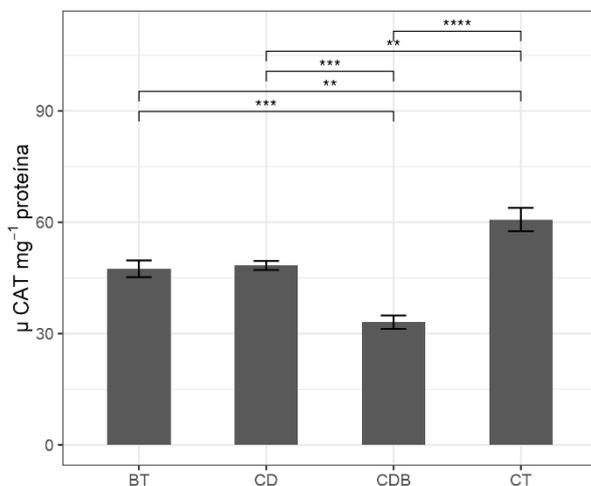
Legenda: Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Período: a) 14 dias e b) 28 dias. Tratamentos: BT = *Bacillus thuringiensis*; CD = 2,4-D e Picloram ®; CDB = *Bacillus thuringiensis* + 2,4-D e Picloram ®.

Fonte: Autor (2024).

Nos resultados da resposta enzimática observados na Figura 8 para a CAT, o grupo CDB apresentou os menores níveis de atividade, tanto aos 14 quanto aos 28 dias de exposição. Além disso, aos 14 dias, as atividades do grupo BT e CD foram significativamente menores em comparação com o controle (CT).

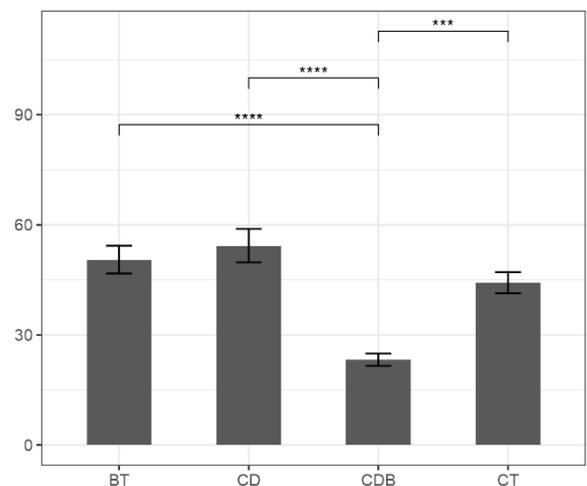
Figura 8 - Catalase em minhocas expostas a 2,4-D, Picloram ® e *Bacillus thuringiensis*.

a) 14 dias



pwc: Tukey HSD; p.adjust: Tukey

b) 28 dias



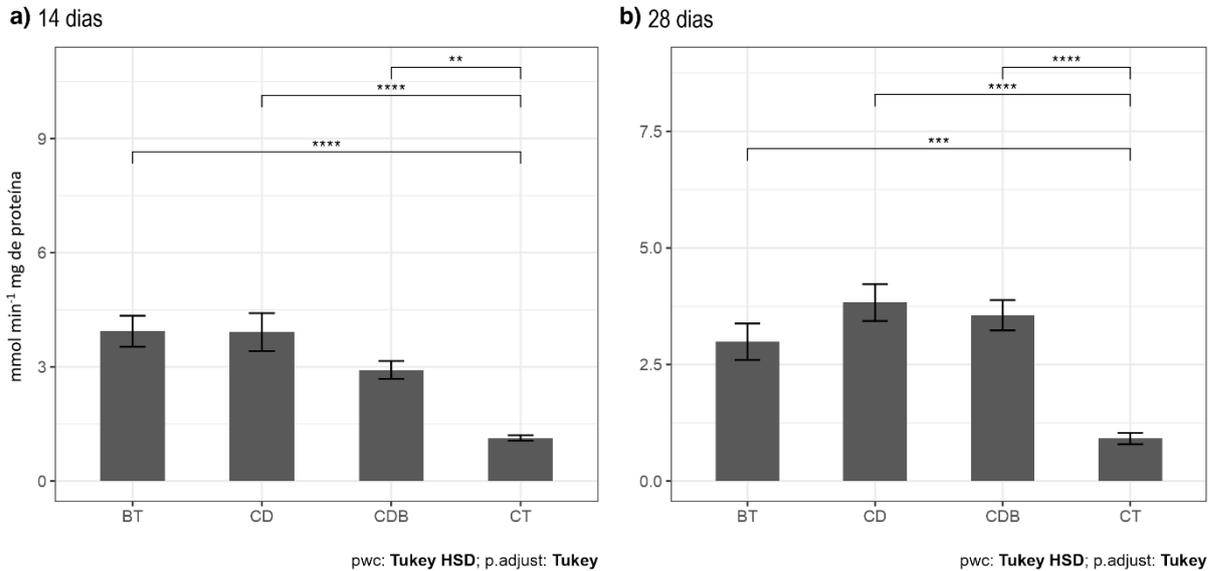
pwc: Tukey HSD; p.adjust: Tukey

Legenda: Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Período: a) 14 dias e b) 28 dias. Tratamentos: BT = *Bacillus thuringiensis*; CD = 2,4-D e Picloram ®; CDB = *Bacillus thuringiensis* + 2,4-D e Picloram ®.

Fonte: Autor (2024).

A atividade enzimática da GR, conforme apresentada na Figura 9, demonstra que todos os tratamentos com adição das substâncias (CD, BT e CDB) resultaram em níveis significativamente superiores em comparação com o grupo controle total (CT).

Figura 9 - Glutaciona Redutase em minhocas expostas a 2,4-D, Picloram ® e *Bacillus thuringiensis*.

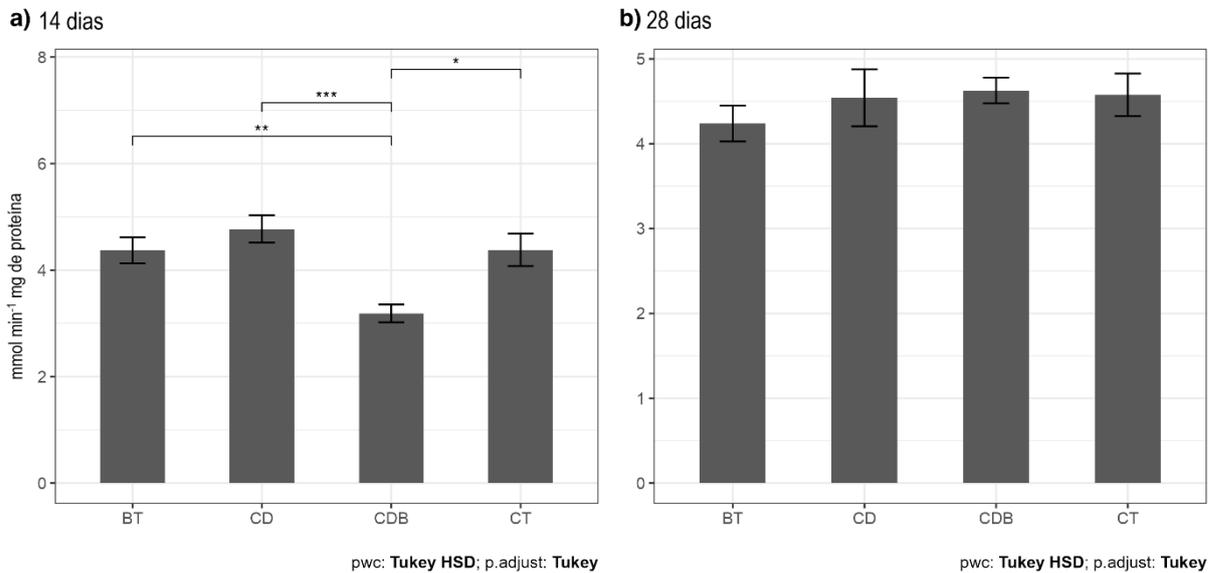


Legenda: Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Período: a) 14 dias e b) 28 dias. Tratamentos: BT = *Bacillus thuringiensis*; CD = 2,4-D e Picloram ®; CDB = *Bacillus thuringiensis* + 2,4-D e Picloram ®.

Fonte: Autor (2024).

Os resultados da atividade da enzima GPx revelam variações nos diferentes tratamentos e períodos de exposição (Figura 10). Aos 14 dias, o grupo CDB apresentou níveis mais baixos de atividade enzimática em comparação com os outros grupos. Além disso, foi observado um aumento nos níveis de atividade da GPx no grupo CDB entre os períodos de 14 e 28 dias de exposição.

Figura 10 - Glutationa peroxidase em minhocas expostas a 2,4-D, Picloram ® e *Bacillus thuringiensis*.



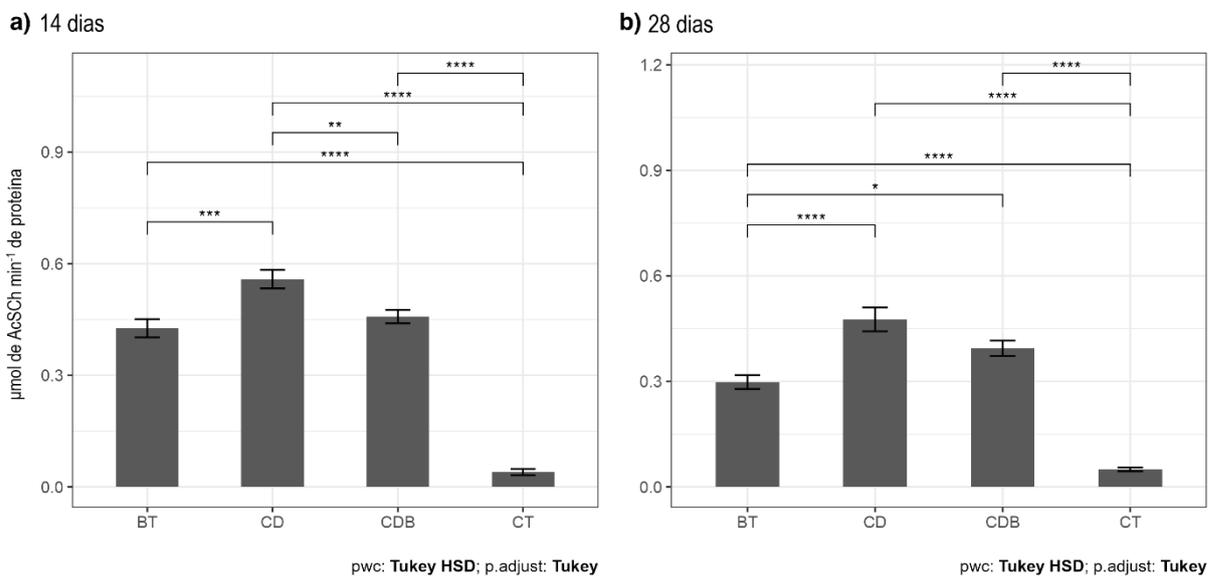
Legenda: Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Período: a) 14 dias e b) 28 dias. Tratamentos: BT = *Bacillus thuringiensis*; CD = 2,4-D e Picloram ®; CDB = *Bacillus thuringiensis* + 2,4-D e Picloram ®.

Fonte: Autor (2024).

5.2 RESPOSTA NEUROTÓXICA

Os resultados da atividade da enzima AChE revelaram alterações significativas nos tratamentos BT, CD e CDB em comparação com o grupo controle aos 14 e 28 dias de exposição, tendo todos os tratamentos testados apresentando níveis maiores do que controle. Notavelmente, aos 28 dias, o grupo BT apresentou níveis de atividade menores do que o grupo CD e CDB.

Figura 11 - Acetilcolinesterase em minhocas expostas a 2,4-D, Picloram ® e *Bacillus thuringiensis*.

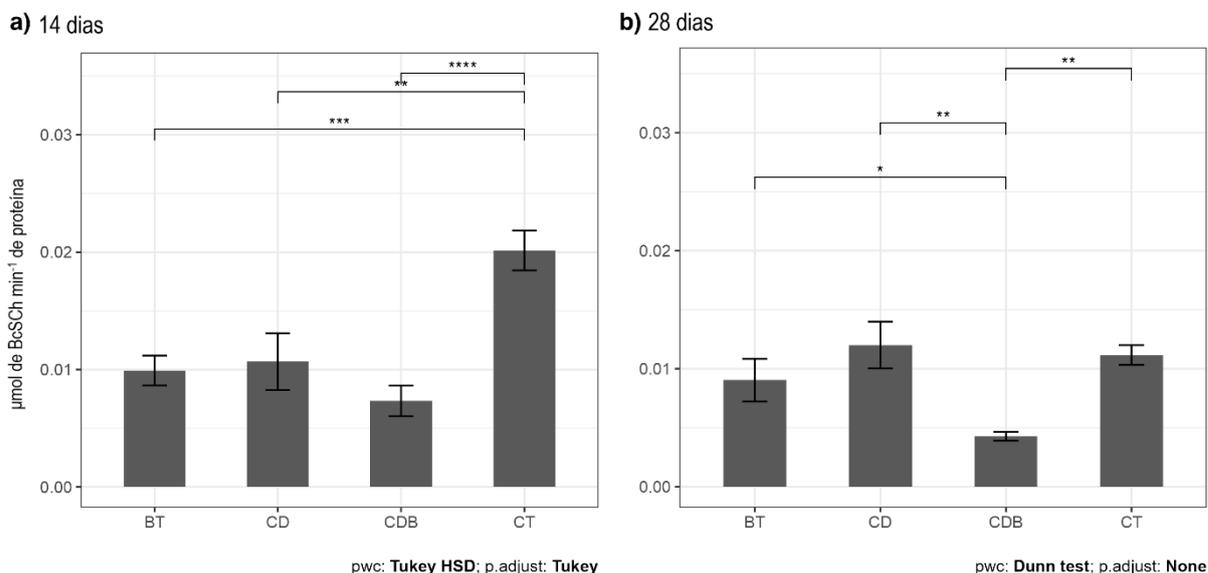


Legenda: Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Período: a) 14 dias e b) 28 dias. Tratamentos: BT = *Bacillus thuringiensis*; CD = 2,4-D e Picloram ®; CDB = *Bacillus thuringiensis* + 2,4-D e Picloram ®.

Fonte: Autor (2024).

Aos 14 dias de exposição, os grupos BT, CD e CDB apresentaram níveis mais baixos de atividade da BChE em comparação com o grupo controle (CT) (Figura 12). Adicionalmente, o grupo CDB demonstrou menores níveis de atividade da BChE do que os demais tratamentos aos 28 dias de exposição.

Figura 12 - Butirilcolinesterase em minhocas expostas a 2,4-D, Picloram ® e *Bacillus thuringiensis*,



Legenda: Nível de significância: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001. Período: a) 14 dias e b) 28 dias. Tratamentos: BT = *Bacillus thuringiensis*; CD = 2,4-D e Picloram ®; CDB = *Bacillus thuringiensis* + 2,4-D e Picloram ®.

Fonte: Autor (2024).

5.3 INTERAÇÃO ENTRE AS SUBSTÂNCIAS

Com base nos resultados (Tabela 3), foi possível observar que aos 14 dias de exposição a interação entre a mistura do herbicida (Camp-D®: 2,4-D e Picloram ®) com o bioinseticida (*Bacillus thuringiensis*) apresentou efeitos antagônicos sobre a AChE, carbonil e GR, pois foi potencializado seus efeitos individuais. Por outro lado, foi observado um pequeno efeito sinérgico nas ERO, indicando uma interferência mútua entre as substâncias.

Tabela 3 – Interação (I) Sinérgica (S) ou Antagônica (A) entre 2,4-D, Picloram ® e *Bacillus thuringiensis* aos 14 dias de exposição.

	CT14	BT14	CD14	CDB14	EE	EO	R	I
Proteína	1,74	1,88	1,58	1,97	0,98	1,13	1	-
TBARS	0,09	0,11	0,12	0,12	1,71	1,32	1	-
AChE	0,04	0,41	0,55	0,46	142,66	11,41	13	A
BChE	0,02	0,01	0,01	0,01	0,26	0,36	1	-

SOD	0,11	0,08	0,10	0,07	0,60	0,64	1	-
CAT	60,74	46,56	49,14	33,09	0,62	0,54	1	-
Óxido Nítrico	21,41	19,91	18,68	16,01	0,81	0,75	1	-
GPx	4,38	4,38	4,71	3,19	1,08	0,73	1	-
Carbonil	1,86	5,36	3,53	4,55	5,49	2,45	2	A
EROs	66337,04	64995,91	50334,17	102273,29	0,74	1,54	0,5	S
Peróxido	5,17	4,25	4,54	4,24	0,72	0,82	1	-
ACAP	1,33	0,88	1,59	1,10	0,79	0,82	1	-
GR	1,14	3,88	3,98	2,92	11,97	2,57	5	A

Notas: o tipo de interação observada (I), leva em consideração a razão (R) entre o efeito esperado (EE) e o efeito obtido (EO). Os valores da razão inferiores a 1 indicam antagonismo, valores superiores a 1 indicam sinergismo e valores iguais a 1 indicam que não há sinergismo nem antagonismo.

Fonte: Autor (2024).

Já aos 28 dias de exposição, a Tabela 4 revelou que a mistura das substâncias resultou em um efeito antagônico na AChE, BChE, CAT, ACAP e GR.

Tabela 4 - Interação (I) Sinérgica (S) ou Antagônica (A) entre 2,4-D, Picloram ® e *Bacillus thuringiensis* aos 28 dias de exposição

	CT28	BT28	CD28	CDB28	EE	EO	R	I
Proteína	1,74	1,88	1,54	1,99	0,96	1,148	1	-
TBARS	0,10	0,10	0,13	0,12	1,20	1,112	1	-
AChE	0,05	0,30	0,48	0,39	56,79	7,881	7	A
BChE	0,01	0,01	0,01	0,00	0,87	0,383	2	A
SOD	0,10	0,08	0,09	0,08	0,86	0,799	1	-
CAT	44,23	50,53	54,33	23,23	1,40	0,525	3	A
Óxido Nítrico	20,00	19,77	18,77	15,60	0,93	0,780	1	-
GPx	4,58	4,24	4,54	4,63	0,92	1,011	1	-
Carbonil	4,34	2,47	4,40	4,57	0,58	1,053	1	-
EROs	64393,87	64561,37	69230,00	124158,94	1,08	1,928	1	-

Peróxido	4,48	4,25	4,65	4,16	0,99	0,929	1	-
ACAP	1,06	1,00	1,22	0,76	1,09	0,716	2	A
GR	0,91	2,99	3,83	3,56	13,69	3,891	4	A

Notas: o tipo de interação observada (I), leva em consideração a razão (R) entre o efeito esperado (EE) e o efeito obtido (EO). Os valores da razão inferiores a 1 indicam antagonismo, valores superiores a 1 indicam sinergismo e valores iguais a 1 indicam que não há sinergismo nem antagonismo.

Fonte: Autor (2024).

6. DISCUSSÃO

Com base nos resultados apresentados pelo modelo matemático, observou-se que a interação entre a mistura do herbicida (2,4-D e Picloram ®) com o bioinseticida (*Bacillus thuringiensis*) teve efeitos antagônicos sobre algumas enzimas e biomarcadores analisados, como a acetilcolinesterase (AChE), carbonil e glutatona redutase (GR), aos 14 dias de exposição. A combinação dessas substâncias revelou um comportamento que divergiu dos efeitos individuais esperados, sugerindo uma possível redução ou neutralização dos efeitos das substâncias quando combinadas. Isso evidencia uma resposta que não estava prevista com base nos efeitos isolados de cada substância. Por outro lado, foi observado efeito sinérgico dos produtos nas espécies reativas de oxigênio (EROs), sugerindo uma interação positiva entre os compostos quando misturados nesse aspecto.

Do mesmo modo, aos 28 dias de exposição, a mistura das substâncias resultou em um efeito antagônico em várias enzimas e biomarcadores, como a AChE, BChE, CAT, ACAP e GR. Isso sugere que, com o tempo, a combinação dessas substâncias teve um efeito menos prejudicial do que o esperado individualmente, possivelmente devido a capacidade de modulação dos mecanismos de defesa das minhocas frente ao longo do tempo de exposição.

A ocorrência de efeitos antagônicos em misturas de herbicidas é um fenômeno importante, pois pode reduzir a eficácia da aplicação dos produtos, impactando negativamente no controle de ervas daninhas e no manejo agrícola. Estudos apontam que a seleção adequada de herbicidas para as misturas é crucial para evitar tais interações negativas (ARMSTRONG, 2009; JORDAN *et al.*, 2011; BARBIERI *et al.*, 2023). A eficácia reduzida de herbicidas por interações antagônicas não apenas compromete o combate às ervas daninhas, mas também pode levar a consequências ambientais adversas (MATZENBACHER *et al.*, 2015). Por exemplo, a necessidade de aplicações múltiplas ou em doses maiores, para alcançar o controle desejado, pode resultar em maiores resíduos de herbicidas no ambiente, com potenciais efeitos nocivos a organismos não-alvo e à biodiversidade local (BRÜHL e ZALLER, 2021).

Os resultados apresentados por Chen *et al.*, (2018) contribuem significativamente para entender como o efeito antagônico apresentado pela mistura do tribenuron-metílico (TBM) e do tebuconazol (TEB) afetou minhocas da espécie *Eisenia fetida*. Que, sob uma concentração subletal desses compostos, a aplicação individual ou combinada induziu a estresse oxidativo e inibição na atividade da celulase nos primeiros dias de exposição das minhocas. No entanto, nenhum dano ao DNA das minhocas foi identificado.

A pesquisa de Wang *et al.*, (2016) destaca que a mistura de agrotóxicos, incluindo herbicidas, pode resultar em efeitos sinérgicos. Os quais acarretam em um impacto maior nos organismos do solo em comparação com a aplicação de produtos químicos individuais. Além disso, há relatos de que combinações ternárias e quaternárias de misturas de herbicidas e inseticidas mostraram efeitos sinérgicos significativos sobre as minhocas em sistemas de bioensaio (YANG *et al.*, 2017).

Quando expostas a poluentes em potencial, como herbicidas e bioinseticidas, as minhocas podem apresentar respostas celulares, comportamentais, morfológicas, genéticas e bioquímicas. Essas respostas incluem alterações na atividade enzimática, alterações genéticas, modificações nas proteínas ligantes de metais, entre outras. Podendo apontar para o estresse fisiológico induzido pela exposição a esses compostos, oferecendo indicações sobre os efeitos potenciais destas substâncias no ambiente (DHIMAN e PANT, 2022). Além disso, a análise desses biomarcadores em minhocas permite avaliar o potencial tóxico das substâncias em questão, ajudando na identificação dos efeitos causados, tornando os biomarcadores uma ferramenta útil para a avaliação de riscos ambientais e impactos negativos sobre o solo e os organismos que nele habitam (THIOUR-MAUPRIVEZ *et al.*, 2019).

Considerando os resultados obtidos após 14 e 28 dias de exposição das minhocas aos tratamentos CT, BT, CD e CDB, observou-se uma série de respostas nos biomarcadores relacionados à resposta antioxidante e ao estresse oxidativo.

Inicialmente, após 14 dias de exposição, houve um aumento significativo nos níveis das espécies reativas de oxigênio (EROs) no tratamento CDB em comparação com os tratamentos CD e CT. Da mesma forma, aos 28 dias de exposição, as minhocas do grupo CDB apresentaram o nível mais elevado de EROs, diferindo significativamente de todos os outros tratamentos. De acordo com Cao *et al.*, (2022), o nível de EROs foi o indicador mais afetado após expor minhocas a combinação de herbicidas. Portanto, a mistura, incluindo herbicidas e bioinseticidas, foi capaz de induzir a produção de EROs nos organismos expostos.

As EROs, como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, são subprodutos metabólicos normalmente regulados por sistemas antioxidantes dentro dos organismos. Contudo, a exposição excessiva a substâncias químicas pode levar a uma produção desenfreada dessas moléculas, excedendo a capacidade antioxidante e levando ao estresse oxidativo (BANERJEE, SETH e AHMED, 2001; BARBOSA *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2021; SULE *et al.*, 2022). Por sua vez, o estresse oxidativo pode resultar em danos a lipídios, proteínas, e ácidos nucleicos, comprometendo a integridade celular e, em casos severos,

levando à morte do organismo. No caso das minhocas, este fenômeno pode impactar sua sobrevivência, reprodução, e capacidade de contribuir para os ecossistemas do solo, afetando a decomposição de matéria orgânica e a estrutura do solo (QIAO *et al.*, 2022; WEN *et al.*, 2023)

Ao serem expostas a agentes estressores, as minhocas ativam seu sistema antioxidante como uma resposta protetora para lidar com o aumento potencial na produção de EROs. Esta resposta antioxidante é uma manifestação da plasticidade fisiológica desses organismos, permitindo-lhes sobreviver em ambientes com diferentes níveis de contaminação (QIAO *et al.*, 2022; JIMÉNEZ *et al.*, 2023).

A atividade da enzima CAT aos 14 dias foi significativamente menor no tratamento CDB em comparação com CD e CT. Após 28 dias de exposição, a atividade da CAT também foi significativamente menor no tratamento CDB em comparação com todos os outros tratamentos. Segundo Cao *et al.* (2017) minhocas expostas a toxinas de cianobactérias apresentaram inibição nas atividades de catalase e glutathione oxidase. Adicionalmente, VELKI e HACKENBERGER (2013) relataram a inibição da catalase após 7 dias de exposição ao dimetoato, destacando que mesmo após 28 dias de recuperação a inibição era observada. Essa redução na atividade da CAT pode inferir diretamente na capacidade de degradar o peróxido de hidrogênio, levando a uma possível acumulação deste composto. O peróxido de hidrogênio em excesso pode causar danos às células e tecidos, pois é um agente oxidante que pode provocar estresse oxidativo (BARBOSA *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2023).

Dentro desse contexto, a glutathione reductase (GR) apresentou níveis mais altos em todos os tratamentos em comparação com o controle após 14 e 28 dias de exposição. Isso sugere um aumento na produção dessa enzima antioxidante para lidar com o estresse oxidativo induzido pelos tratamentos. Por essa razão, a GR é considerada uma enzima crucial no ciclo da glutathione, responsável por manter a forma reduzida da glutathione (GSH) em células vivas. A GSH é um agente redutor e detoxificante essencial, que protege as células contra os danos oxidativos causados por radicais livres, metais pesados, e xenobióticos (ISKUSNYKH, ZAKHAROVA e PATHAK, 2022; VAŠKOVÁ *et al.*, 2023). Outro efeito importante é a manutenção do equilíbrio redox celular, protegendo componentes celulares críticos, como proteínas e lipídios, contra a oxidação. Isso é especialmente relevante em cenários onde as células estão expostas a herbicidas e bioinseticidas (SILVAGNO, VERNONE e PESCARMONA, 2020).

Por fim, a redução nos níveis de glutathione peroxidase (GPx) no tratamento CDB, em comparação com o tratamento CD após 14 dias de exposição, indica uma resposta inicial das

minhocas ao estresse oxidativo induzido. A GPx é uma enzima responsável pela redução de peróxidos em água, contribuindo para a proteção contra danos oxidativos nas células. Uma redução nessa enzima sugere que há uma maior acumulação de peróxidos não neutralizados, o que pode levar a danos celulares e ativação de vias inflamatórias (ESPINOZA *et al.*, 2008). O aumento significativo da GPx no tratamento CDB após 28 dias, que não apresentou diferenças significativas em comparação aos demais tratamentos, sugere uma adaptação ou resposta compensatória das minhocas ao estresse oxidativo. Este fenômeno pode ser interpretado como um ajuste na atividade enzimática onde, após um período de exposição prolongada, as minhocas aumentam a produção ou a atividade da GPx como mecanismo de defesa contra a acumulação contínua de peróxidos. Essa capacidade de ajuste indica uma possível resiliência das minhocas ao estresse induzido pelo tratamento CDB (HUBER, ALMEIDA e FÁTIMA, 2008; OLIVEIRA-SILVA *et al.*, 2019; FLOHÉ, TOPPO e ORIAN, 2022; PEI *et al.*, 2023; JIANG *et al.*, 2023).

Em relação aos mecanismos antioxidantes não-enzimáticos, foi verificado a redução dos níveis de óxido nítrico (NO) nas minhocas submetidas ao tratamento com aplicação combinada dos herbicidas e bioinseticida (CDB) por períodos de 14 e 28 dias, quando comparado com os resultados dos demais tratamentos (CT, BT e CD). No que diz respeito a isso, a alteração nos níveis de NO pode ter múltiplas implicações para as minhocas, considerando a diversidade de processos fisiológicos nos quais o NO está envolvido (REN *et al.*, 2022). Sabendo-se que o NO tem um papel importante na sinalização entre células e na defesa contra patógenos, além de estar envolvido na regulação do metabolismo e da bioenergética celular através da atuação sobre as enzimas mitocondriais, e alterações nos seus níveis podem acabar impactando esses processos fundamentais (KITAMURA *et al.*, 2001; CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002). Ainda, é importante destacar que o óxido nítrico (NO), devido à sua natureza de radical livre, pode ter sido consumido em reações para neutralizar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que foi observada como elevada no mesmo tratamento (CDB). Isso pode explicar a redução observada na concentração de NO. Esses resultados sugerem uma interação entre o NO e as EROs (KITAMURA *et al.*, 2001; TOMAZINI, ANDRADE e MÁXIMO, 2019).

A determinação de peróxidos mostrou uma redução dos níveis nos tratamentos BT e CDB aos 14 dias em relação ao CT. Esses resultados podem indicar que as minhocas desses tratamentos puderam efetivamente mitigar o dano oxidativo ao longo dos 14 dias de exposição (DE LIMA LEMOS e D'AGOSTINI, 2016). Em concordância com Gallagher e Giulio (1991), que avaliaram a exposição de peixes a 2,4-D e Picloram ®, ao longo de 10 dias, constatando

que não houve aumento das atividades peroxidativas, porém destacando que a mistura deles foi capaz de causar efeitos fisiológicos. Ademais, o peróxido não apresentou diferença significativa entre os tratamentos testados durante os 28 dias de exposição, indicando que a produção ou neutralização dessa espécie reativa não foi significativamente afetada ao longo do tempo.

Os níveis de carbonilação de proteínas do BT apresentaram uma redução de 14 para 28 dias de exposição. O tratamento BT também apresentou valores maiores do que o CT aos 14 dias. A carbonilação de proteínas é um processo de dano oxidativo que pode indicar uma resposta adaptativa ou uma lesão celular, dependendo do contexto. Nesse caso, os resultados sugerem que inicialmente o *Bacillus thuringiensis* pode ter um efeito no dano oxidativo em proteínas, pelo menos em comparação com o grupo controle. Ainda, a redução dos níveis ao longo do tempo, reforça a possibilidade das minhocas terem ativado seus mecanismos de defesa antioxidante ou reparação celular (SUZUKI, CARINI e BUTTERFIELD, 2010; RODRÍGUEZ-GARCÍA *et al.*, 2020).

A ausência de diferença nos níveis de TBARS pode sugerir que, sob as condições específicas do estudo, os tratamentos envolvendo certos herbicidas e bioinseticidas não induziram estresse oxidativo significativo nas minhocas ou que a resposta antioxidante foi suficiente para neutralizar os potenciais efeitos danosos dessas substâncias. Este resultado pode estar relacionado à capacidade de adaptação e resiliência das minhocas à exposição de baixas concentrações de pesticidas ou à complexidade do solo que possivelmente oferece condições para mitigação dos efeitos desses produtos (PELOSI *et al.*, 2014; YATOO *et al.*, 2022).

A resposta neurotóxica das minhocas envolve diversos mecanismos e biomarcadores, entre eles a atividade das enzimas Acetilcolinesterase (AChE) e Butirilcolinesterase (BChE), que são fundamentais no sistema nervoso central. Interferências na atividade dessas enzimas podem indicar efeitos neurotóxicos significativos.

Nos 14 dias de exposição, os níveis da AChE foram significativamente maiores nos tratamentos BT, CD e CDB em comparação com o controle. Em relação à BChE, os tratamentos BT e CDB apresentaram níveis mais baixos do que o controle, o que também sugere uma possível neurotoxicidade desses tratamentos.

Os resultados demonstrados nos 28 dias de exposição foram semelhantes. Os níveis da AChE continuaram significativamente maiores nos tratamentos BT, CD e CDB em comparação com o controle, indicando uma persistência da resposta neurotóxica ao longo do tempo. Em relação à BChE, apenas o tratamento CDB apresentou níveis mais baixos do que o controle,

sugerindo uma possível recuperação nos níveis dessa enzima nos tratamentos BT e CD após 28 dias.

É importante ressaltar, que a BChE tem um sítio ativo consideravelmente maior que o da AChE, o que confere diferenças na susceptibilidade e interação com pesticidas. A menor atividade de BChE observada pode ser resultado de sua menor afinidade de ligação em comparação com a AChE, frente aos compostos químicos presentes nos herbicidas e bioinseticidas testados (ČADEŽ *et al.*, 2019).

Essencialmente, enquanto alguns compostos podem inibir a ação da AChE, aumentando temporariamente a disponibilidade de acetilcolina e causando hiperestimulação neuromuscular, outros podem afetar a BChE de forma que sua atividade reduza, alterando o equilíbrio e funcionamento do sistema nervoso das minhocas (GAMBI, PASTERIS e FABBRI, 2007; LAMMERTYN *et al.*, 2021).

Deste modo, constatou-se um aumento nos níveis de EROs devido a exposição das minhocas ao tratamento CDB. Ainda, houve ativação do sistema antioxidante, com aumento da atividade da GR, como resposta protetora. Entretanto, a redução da CAT e, inicialmente, da GPx pode ter comprometido a neutralização de peróxidos, contribuindo para o estresse oxidativo. Observou-se também uma redução nos níveis de NO no tratamento CDB, o que pode ter implicações em diversos processos fisiológicos desses organismos. Em relação aos efeitos neurotóxicos, os tratamentos BT, CD e CDB apresentaram níveis elevados de AChE em comparação ao controle, sugerindo uma resposta neurotóxica. Portanto, os resultados indicam que a combinação de herbicida e bioinseticida (CDB) induz respostas complexas e, por vezes, antagônicas nas minhocas, com potencial para causar danos oxidativos e neurotóxicos.

Visto isso, é importante salientar que avaliação de múltiplos biomarcadores é essencial porque cada um fornece informações específicas sobre diferentes aspectos da resposta do organismo ao estresse oxidativo. Enquanto alguns biomarcadores podem indicar uma resposta imediata e aguda aos agrotóxicos, outros podem revelar efeitos a longo prazo ou adaptações compensatórias.

7. CONCLUSÃO

Em suma, este estudo revelou que a interação entre o herbicida e o bioinseticida desencadeou as seguintes respostas nos biomarcadores e enzimas avaliados:

O modelo matemático aos 14 e 28 dias de exposição a mistura apresentou um efeito antagônico em diversas enzimas e biomarcadores, como a AChE, BChE, CAT, ACAP e GR. Entretanto, as análises bioquímicas revelaram que isso não refletiu em uma diminuição da toxicidade geral.

Aos 14 e 28 dias, o tratamento CDB apresentou os maiores níveis de EROs, indicando que a mistura desses compostos induziu a produção de EROs nas minhocas. Corroborando com isso, observou-se redução nos níveis de NO nos tratamentos com aplicação combinada (CDB), possivelmente devido ao consumo deste radical livre para neutralizar as EROs elevadas.

A atividade da enzima CAT foi significativamente menor no tratamento CDB em comparação com os demais tratamentos aos 14 e 28 dias, sugerindo inibição desta enzima e possível acúmulo de peróxido de hidrogênio. Por outro lado, houve aumento nos níveis de GR em todos os tratamentos em comparação ao controle, indicando uma resposta das minhocas para lidar com o estresse oxidativo induzido. Quanto à GPx, inicialmente houve redução nos seus níveis no tratamento CDB, mas após 28 dias houve um aumento significativo, sugerindo uma resposta compensatória das minhocas como mecanismo de defesa contra o acúmulo contínuo de peróxidos. Esses resultados demonstram que as minhocas ativaram seus sistemas antioxidantes em resposta ao estresse oxidativo, porém a exposição prolongada ao tratamento CDB parece ter desafiado sua capacidade adaptativa.

É importante ressaltar que tratamento BT apresentou maiores níveis de carbonilação de proteínas aos 14 dias, sugerindo dano oxidativo.

Aos 14 e 28 dias, os tratamentos BT, CD e CDB apresentaram maiores níveis de AChE em comparação ao controle, indicando efeito neurotóxico. Também sugerindo neurotoxicidade, os tratamentos BT e CDB apresentaram menores níveis de BChE aos 14 dias.

Em geral, o tratamento com a combinação de herbicidas e bioinseticida (CDB) demonstrou os maiores impactos, induzindo estresse oxidativo e respostas neurotóxicas nas minhocas.

REFERÊNCIAS

ABNT. **ABNT NBR 15499:2016 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - método de ensaio com peixes**. São Paulo (SP): ABNT NBR, 2016. Disponível em: <https://www.normas.com.br/visualizar/abnt-nbr-nm/26523/abnt-nbr15499-ecotoxicologia-aquatica-toxicidade-cronica-de-curta-duracao-metodo-de-ensaio-com-peixes>

ABNT. **ABNT NBR ISO 17512-1. Qualidade do Solo — Ensaio de fuga para avaliar a qualidade de solos e efeitos de substâncias químicas no comportamento. Parte 1: Ensaio com minhocas (*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*)**. Rio de Janeiro (RJ): [s. n.], 2011. Disponível em: <https://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=086201>

ABUBAKAR, Y. *et al.* Pesticides, history, and classification. In: **Natural remedies for pest, disease and weed control**. Academic Press, 2020. p. 29-42.

AHMADPOUR, M. *et al.* Joint toxicity of cadmium and fenpyroximate on two earthworms: Interspecific differences, subcellular partitioning and biomarker responses. **Chemosphere**, 337, 139329, 2023. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2023.139329>.

ALMEIDA, C. G.; MARTINS, L. H. B. Enzimas hepáticas e acetilcolinesterase como biomarcadores de efeito dos agrotóxicos utilizados na cultura do *Allium sativum*. **Revista Biociências**, v. 14, n. 2, 2008.

ALMEIDA, I. V. B; SOUZA, J. T. A.; BATISTA, C. M. Melhoramento genético de plantas forrageiras xerófilas: Revisão. **Pubvet**, v. 13, p. 1-11, n. 8, ago. 2019.

ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010.

ARCIERI, M. Spread and Potential Risks of Genetically Modified Organisms. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, 8, p. 552–559, 2016. <https://doi.org/10.1016/J.AASPRO.2016.02.072>.

ARMSTRONG, J. **Herbicide how-to: Understanding herbicide mode of action**. Oklahoma Cooperative Extension Service, 2009.

ARPAIA, S. *et al.* Assessing environmental impacts of genetically modified plants on non-target organisms: The relevance of in planta studies. **Science of The Total Environment**, 583, 123–132. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.01.039>.

ASAGBA, S. O.; ICHIPI-IFUKOR, P. C.; OKWUDIBIE, C. Oxidative Stress and Antioxidant Parameters in Earthworm (*Eisenia fetida andrei*); a Probable index of Environmental Pollution Status. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, 24(8), 1375–1382, 2020. <https://doi.org/10.4314/jasem.v24i8.11>.

ASTM E1676 - **Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm *Eisenia Fetida* and the**

Enchytraeid Potworm *Enchytraeus Albidus* (2021). <https://www.astm.org/e1676-12r21.html>.

ASTUTO, M. C.; CATTANEO, I. *Bacillus thuringiensis*. **Reference Module in Biomedical Sciences**, mar. 2023.

BALABANIDOU, V.; GRIGORAKI, L.; VONTAS, J. (2018). Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. **Current Opinion in Insect Science**, 27, 68–74. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2018.03.001>.

BANERJEE, B. D.; SETH, V.; AHMED, R. S. Pesticide-induced oxidative stress: perspective and trends. **Reviews on environmental health**, v. 16, n. 1, p. 1-40, 2001.

BARBIERI, G. F. *et al.* Herbicide mixtures: interactions and modeling. **Advances in Weed Science**, v. 40, p. e020220051, 2023.

BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr**, p. 111-128, 2008.

BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.

BARROS, R. E. *et al.* Impacts of the addition of biochar, biosolid and aluminum silicate on the leaching and bioavailability of 2, 4-D+ Picloram in soil. **Environmental Technology e Innovation**, v. 23, p. 101682, 2021.

BAUM, J. A., JOHNSON, T. B., e CARLTON, B. C. *Bacillus thuringiensis*. **Biopesticides**, 189–209, 1999. <https://doi.org/10.1385/0-89603-515-8:189>.

BELDEN, J. Introduction to ecotoxicology. In *An Introduction to Interdisciplinary Toxicology: From Molecules to Man*. **Elsevier**, p. 381–393, 2020.

BENLI, A. Ç. K. *et al.* Investigation of acute toxicity of (2, 4-dichlorophenoxy) acetic acid (2, 4-D) herbicide on crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 296-299, 2007.

BHATT, P. *et al.* Characterization of the role of esterases in the biodegradation of organophosphate, carbamate, and pyrethroid pesticides. **Journal of hazardous materials**, v. 411, p. 125026, 2021.

BOUGHATTAS, I. *et al.* Interactive effects of environmental microplastics and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on the earthworm *Eisenia andrei*. **Journal of Hazardous Materials**, 424, 127578, 2022. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2021.127578>

Brasil. Decreto nº 98.816, de 11 de janeiro de 1990. Regulamenta a Lei 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências.

In: Legislação federal de agrotóxicos e afins. Brasília (DF): Ministério da Agricultura e do Abastecimento; 1998. p. 15-53.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários: **AGROFIT**. 2021. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/ap_ing_ativo_detalhe_cons?p_id_ingrediente_ativo=1. Acesso em: 24 fev. 2024>.

BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? **Trends in Biotechnology**, 26(10), 573–579, 2008. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2008.06.005>.

BROCHADO, M. G. S. *et al.* Impacts of dicamba and 2, 4-D drift on ‘Ponkan’ mandarin seedlings, soil microbiota and *Amaranthus retroflexus*. **Journal of Hazardous Materials Advances**, v. 6, p. 100084, 2022.

BRÜHL, C. A.; ZALLER, J. G. Indirect herbicide effects on biodiversity, ecosystem functions, and interactions with global changes. In: **Herbicides**. Elsevier, 2021. p. 231-272.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal Lipid Peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, n. C, p. 302–310, 1978.

BUENO F. S. *et al.*, Kinetics of the metabolic effects, distribution spaces and lipid-bilayer affinities of the organo-chlorinated herbicides 2,4-D and picloram in the liver. **Toxicology Letters**, 313, 137–149, 2019. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2019.06.008>.

ČADEŽ, T. *et al.*, Assessment of four organophosphorus pesticides as inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 21486, 2021.

CAO, Bo *et al.* Combined toxicity of acetochlor and metribuzin on earthworm *Eisenia fetida*: Survival, oxidative stress responses and joint effect. **Applied Soil Ecology**, v. 178, p. 104583, 2022.

CAO, Q. *et al.*, Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida* to cyanobacteria toxins. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 15954, 2017.

CAPALBO, D. M. F.; ARANTES, O.; SUZUKI, M. T. *Bacillus thuringiensis*. 2005.

CARVALHO, N. L.; PIVOTO, T. S. Ecotoxicologia: conceitos, abrangência e importância agrônômica. **Revista Monografias Ambientais**, p. 176-192, 2011.

CERQUEIRA, Nereide Freire; YOSHIDA, Winston Bonetti. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, p. 417-423, 2002.

CHANG, J. *et al.* Toxicological effects, environmental behaviors and remediation technologies of herbicide atrazine in soil and sediment: A comprehensive review. **Chemosphere**, p. 136006, 2022.

CHAPMAN, P. M. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. **Marine pollution bulletin**, v. 44, n. 1, p. 7-15, 2002.

CHOE, S. G. *et al.* Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide using penicillin fermentation waste matter and application in agriculture. **Journal of Natural Pesticide Research**, v. 2, p. 100012, 2022.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; VICTORIA FILHO, R.; SILVA, C. B. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, v. 12, p. 13-20, 1994.

CLARK, B. W.; COATS, J. R. Subacute Effects of Cry1Ab Bt Corn Litter on the Earthworm *Eisenia fetida* and the Springtail *Folsomia candida*. **Environmental Entomology**, 35(4), 1121–1129, 2006. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-35.4.1121>.

CONNELL, D. W. *et al.* Introduction to ecotoxicology. **Reference Module in Biomedical Sciences**, 28 nov. 2014.

COSTA, C. R. *et al.* A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química nova**, v. 31, p. 1820-1830, 2008.

DA COSTA, L. E. C.; MARTINS, E. S. Plantas geneticamente modificadas com toxinas de *Bacillus thuringiensis*: uma ferramenta para conferir resistência contra insetos praga. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 12, n. 2, p. 99-106, 2014.

DAR, M. A.; HAMID, B.; KAUSHIK, G. Temporal trends in the use and concentration of organophosphorus pesticides in Indian riverine water, toxicity, and their risk assessment. **Regional Studies in Marine Science**, p. 102814, 2023.

DE ANDRADE, J. C. *et al.* Consumption of fruits and vegetables contaminated with pesticide residues in Brazil: A systematic review with health risk assessment. **Chemosphere**, p. 138244, 2023.

DE LA FUENTE-SALCIDO, N. M.; CASADOS-VÁZQUEZ, L. E.; BARBOZA-CORONA, J. E. Bacteriocins of *Bacillus thuringiensis* can expand the potential of this bacterium to other areas rather than limit its use only as microbial insecticide. **Canadian Journal of Microbiology**, 59(8), 515–522, 2013. <https://doi.org/10.1139/CJM-2013-0284>.

DE LIMA LEMOS, L.; D'AGOSTINI, F. M. USO DE ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS COM MINHOCAS PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE POLUENTES DE SOLO. **Jornada Integrada em Biologia**, p. 19-19, 2016.

MAAGD, R. A. *Bacillus thuringiensis*-based products for insect pest control. **Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture**, 185–192, 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3_20/COVER.

DE SANTO, F. B. *et al.*, Screening effects of metsulfuron-methyl to collembolans and earthworms: the role of adjuvant addition on ecotoxicity. **Environmental Science and Pollution Research**, 25(24), 24143–24149, 2018. <https://doi.org/10.1007/S11356-018-2481-5>.

DEMIRCI-ÇEKİÇ, S. *et al.*, Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 209, 2022. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2021.114477>.

DENG, J. *et al.*, Persistence of insecticidal Cry toxins in Bt rice residues under field conditions estimated by biological and immunological assays. **Science of The Total Environment**, 679, 45–51, 2019. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.05.026>

DEYASHI, M.; CHAKRABORTY, S. B. Acute exposure to a neem based biopesticide and mahua oil cake changes haemocyte parameters in freshwater crab, *Varuna litterata* (Decapoda, Crustacea). **Fish e Shellfish Immunology**, v. 131, p. 505-517, 2022.

DHIMAN, V.; PANT, D. Bioindication and biomarker responses of earthworms: a tool for soil pollution assessment. In: *Advances in Bioremediation and Phytoremediation for Sustainable Soil Management: Principles, Monitoring and Remediation*. **Cham: Springer International Publishing**, 2022. p. 365-378.

DUAVÍ, W. C. *et al.*, CONTAMINAÇÃO DE AMBIENTES AQUÁTICOS POR "AGROTÓXICOS URBANOS": O CASO DOS RIOS COCÓ E CEARÁ, FORTALEZA–CEARÁ, BRASIL. **Química Nova**, v. 38, p. 622-630, 2015.

DUBOVSKIY, I. M. *et al.* *Bacillus thuringiensis* spores and Cry3A toxins act synergistically to expedite Colorado potato beetle mortality. **Toxins**, v. 13, n. 11, p. 746, 2021.

DUMANCAS, G. G. *et al.*, Picloram. In P. Wexler (Ed.), Academic Press. **Encyclopedia of Toxicology** (Fourth Edition) (Fourth Edition, pp. 659–665), 2024. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00581-9>

ECOBICHON, D. J. Pesticide use in developing countries. **Toxicology**, v. 160, n. 1-3, p. 27-33, 2001.

EMBRAPA. (2021). Argissolos Vermelhos - Portal Embrapa. **Solos Tropicais**. <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/solos-tropicais/sibcs/chave-do-sibcs/argissolos/argissolos-vermelhos>

ESPINOZA, S. E. *et al.* Glutathione peroxidase enzyme activity in aging. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 63, n. 5, p. 505-509, 2008.

FARINA, M. *et al.* Metals, oxidative stress and neurodegeneration: A focus on iron, manganese and mercury. **Neurochemistry International**, 62(5), 575–594, 2013. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2012.12.006>

FAROON, O. *et al.* Toxicological profile for 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid: draft for public comment. 2017.

FERNANDEZ, M. E. *et al.* Effectiveness of a simple biomixture for the adsorption and elimination of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) herbicide and its metabolite, 2, 4-dichlorophenol (2, 4-DCP), for a biobed system. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 1, p. 106877, 2022.

FERRARI, S. *et al.* EFEITOS DE SUBDOSES DE 2, 4-DE PICLORAM NA CULTURA DO ALGODOEIRO. **Revista Ciência Agrícola**, v. 19, n. 2, p. 175-182, 2021.

FLOHÉ, L.; TOPPO, S.; ORIAN, L. The glutathione peroxidase family: Discoveries and mechanism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 187, p. 113-122, 2022.

FORGASH, A. J. History, evolution, and consequences of insecticide resistance. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 22(2), 178–186, 1984. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(84\)90087-7](https://doi.org/10.1016/0048-3575(84)90087-7)

FOTH, H. Ecotoxicology. In: **Toxicology**. Academic Press, 1999. p. 1067-1085.

FRANCO, M. H. R. *et al.* Fitorremediação de solos contaminados com picloram por *Urochloa brizantha*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, p. 460-467, 2014.

FRÄNZLE, O. Bioindicators and environmental stress assessment. In: **Trace Metals and other Contaminants in the Environment**. Elsevier, 2003. p. 41-84.

FRÄNZLE, O. Complex bioindication and environmental stress assessment. **Ecological indicators**, v. 6, n. 1, p. 114-136, 2006.

FREITAS, J. S. *et al.*, Realistic exposure to fipronil, 2,4-D, vinasse and their mixtures impair larval amphibian physiology. **Environmental Pollution**, 299, 118894, 2022. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2022.118894>

FREITAS, J. S. *et al.* Realistic exposure to fipronil, 2, 4-D, vinasse and their mixtures impair larval amphibian physiology. **Environmental Pollution**, v. 299, p. 118894, 2022.

GAMBI, N.; PASTERIS, A.; FABBRI, E. Acetylcholinesterase activity in the earthworm *Eisenia andrei* at different conditions of carbaryl exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology e Pharmacology**, v. 145, n. 4, p. 678-685, 2007.

GARCÍA, M. G. *et al.* Presence, distribution and current pesticides used in Spanish agricultural practices. **Science of The Total Environment**, p. 157291, 2022.

GAZZIERO, D. L. P.; BRIGHENTI, A. M.; VOLL, E. Resistência cruzada da losna-branca (*Parthenium hysterophorus*) aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase. **Planta Daninha**, v. 24, p. 157-162, 2006.

GOMES, L. *et al.* Ecotoxicity of sludges generated by textile industries: a review. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 7, n. 1, 2012.

GONÇALVES, C. R.; DELABONA, P. S. Bioremediation of pesticides in Brazil: a brief overview. **Environmental Advances**, p. 100-220, 2022.

GONÇALVES, Í. F. S. *et al.*, An innovative insecticidal approach based on plant protease inhibitor and Bt protoxins inhibits trypsin-like activity in zebrafish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology e Pharmacology**, 109576, 2023. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2023.109576>

GRIFFITTS, J. S. *et al.*, Resistance to a Bacterial Toxin Is Mediated by Removal of a Conserved Glycosylation Pathway Required for Toxin-Host Interactions. **Journal of**

Biological Chemistry, 278(46), 45594–45602, 2003
<https://doi.org/10.1074/JBC.M308142200>

GU, J. *et al.* A historical overview of analysis systems for *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry proteins. **Microchemical Journal**, v. 165, p. 106137, 1 jun. 2021.

GYANJYOTI, A. *et al.* Recent advancement in fluorescent materials for optical sensing of pesticides. **Materials Today Communications**, p. 105193, 2022.

HASSAAN, M. A.; EL NEMR, A. Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 46, n. 3, p. 207-220, 2020.

HATTAB, S. *et al.* Transcriptional expression levels and biochemical markers of oxidative stress in the earthworm *Eisenia andrei* after exposure to 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 76-82, 2015.

HILBECK, A.; OTTO, M. Specificity and combinatorial effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in the context of GMO environmental risk assessment. **Frontiers in Environmental Science**, v. 3, p. 71, 2015.

HILGERT JACOBSEN-PEREIRA, C. *et al.*, Markers of genotoxicity and oxidative stress in farmers exposed to pesticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 148, 177–183, 2018. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2017.10.004>

HÖSS, S. *et al.*, Effects of insecticidal crystal proteins (Cry proteins) produced by genetically modified maize (Bt maize) on the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Pollution**, 178, 147–151, 2013. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2013.03.002>

HUANG, C. *et al.*, Evidence for the metal resistance of earthworm *Eisenia fetida* across generations (F1 and F2) under laboratory metal exposure. **Journal of Hazardous Materials**, 425, 128006, 2022. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2021.128006>

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. Glutathiona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1170-1179, 2008.

HUNG, T. P. *et al.* Persistence of detectable insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* (Cry) and toxicity after adsorption on contrasting soils. **Environmental Pollution**, v. 208, p. 318-325, 2016.

HUPFFER, H. M.; FIGUEIREDO, J. A. S.; WEYERMÜLLER, A. R. Conflito e Construção de Riscos na Sociedade Complexa e Globalizada: o Caso da Deriva do Herbicida 2, 4-D. **Revista de Direito Brasileira**, v. 25, n. 10, p. 120-141, 2020.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Occupational Exposures in Insecticide Application, and Some Pesticides. **Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer**; 1991. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 53.) Picloram. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499673/>

IBAMA. (2023). Painéis de informações de agrotóxicos. **Painel de Informações Sobre a Comercialização de Agrotóxicos e Afins No Brasil – Série Histórica 2009 - 2021**. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos#Painel-comercializacao>.

ISKUSNYKH, I. Y.; ZAKHAROVA, A. A.; PATHAK, D. Glutathione in brain disorders and aging. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 324, 2022.

ISLAM, F. *et al.*, Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. **Environment International**, 111, 332–351, (2018).
<https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2017.10.020>

IZOLAN, F. I.; DE OLIVEIRA, J. S. A SEGURANÇA ALIMENTAR FRENTE À DERIVA DO 2, 4-D NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL: PERSPECTIVAS DO MINISTÉRIO PÚBLICO PARA A CONCRETIZAÇÃO DESSE DIREITO DIFUSO. **Revista Acadêmica Escola Superior do Ministério Público do Ceará**, v. 13, n. 1, p. 185-204, 2021.
JANKAUSKIENĖ, J. *et al.*, Microbial biostimulant counteracts negative effects of herbicides on oilseed rape growth. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, 37, 101351(2024).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101351>

JANKAUSKIENĖ, J. *et al.* Microbial biostimulant counteracts negative effects of herbicides on oilseed rape growth. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, 37, 101351, 2024.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101351>

JARMAN, W. M.; BALLSCHMITER, K. From coal to DDT: the history of the development of the pesticide DDT from synthetic dyes till Silent Spring. **Endeavour**, v. 36, n. 4, p. 131-142, 2012.

JIMÉNEZ, H. D. *et al.* Evaluation of Acute Toxicity and Antioxidant Response of Earthworm Exposed to a Lignin-Modified Crosslinked Hydrogel. **Toxics**, v. 11, n. 6, p. 476, 2023.

JOHNSTONE, P.; MCLEISH, C. World wars and sociotechnical change in energy, food, and transport: A deep transitions perspective. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 174, p. 121206, 2022.

JORDAN, D. L. *et al.* Defining Interactions of Herbicides with Other Crop Protection Products Applied to Peanut. In: **Herbicides, Theory and Applications**. IntechOpen, 2011.

KAUR, R. *et al.* Impacts of sequential herbicides and residue mulching on weeds and productivity and profitability of vegetable pea in North-western Indo-Gangetic Plains. **Scientia Horticulturae**, v. 270, p. 109456, 2020.

KHURSHEED, A. *et al.* Plant based natural products as potential ecofriendly and safer biopesticides: A comprehensive overview of their advantages over conventional pesticides, limitations and regulatory aspects. **Microbial Pathogenesis**, p. 105854, 2022.

KITAMURA, Yoshiichiro *et al.* Visualization of nitric oxide production in the earthworm ventral nerve cord. **Neuroscience Research**, v. 40, n. 2, p. 175-181, 2001.

- KRAMARZ, P. E., VAUFLEURY, A., e CAREY, M. Studying the effect of exposure of the snail *Helix aspersa* to the purified Bt toxin, Cry1Ab. **Applied Soil Ecology**, 37(1–2), 169–172, 2007. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2007.06.006>
- KRAMARZ, P., *et al.*, Effects of Bt-maize material on the life cycle of the land snail *Cantareus aspersus*. **Applied Soil Ecology**, 42(3), 236–242, 2009. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2009.04.007>
- KUDRYAVTSEVA, A. D.; SHELEPCHIKOV, A. A.; BRODSKY, E. S. Free-range chicken eggs as a bioindicator of dioxin contamination in Vietnam, including long-term Agent Orange impact. **Emerging Contaminants**, v. 6, p. 114-123, 2020.
- KUMAR, N.; DIXIT, A. Chapter 2 - Nanotechnology in agriculture. **Nanotechnology for Rural Development**, p. 33-68, 26 mar. 2021.
- KUMAR, P. *et al.* *Bacillus thuringiensis* as microbial biopesticide: uses and application for sustainable agriculture. **EGYPTIAN JOURNAL OF BIOLOGICAL PEST CONTROL**, v. 31, n. 1, p. 1–7, 1 dez. 2021. <https://doi.org/10.1186/S41938-021-00440-3/FIGURES/1>
- LACEY, L. A.; SIEGEL, J. P. Safety and ecotoxicology of entomopathogenic bacteria. **Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application**, 253–273, 2000. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1429-7_14
- LAINI, A. *et al.* Herbicide contamination and dispersion pattern in lowland springs. **Science of the total environment**, v. 438, p. 312-318, 2012.
- LAJMANOVICH, R. C. *et al.*, Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis in aqueous suspension on the South American common frog *Leptodactylus latrans* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles. **Environmental Research**, 136, 205–212, 2015. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2014.10.022>
- LAMMERTYN, S. *et al.*, Biomarkers response and population biological parameters in the earthworm *Eisenia fetida* after short term exposure to atrazine herbicide. **Ecological Indicators**, v. 121, p. 107173, 2021.
- LE, D. T.; PHAM, T. M.; POLACHEK, S. The long-term health impact of Agent Orange: Evidence from the Vietnam War. **World Development**, v. 155, p. 105813, 2022.
- LEMMA, T., *et al.*, The pesticide picloram affects biomembrane models made with Langmuir monolayers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 181, 953–958, 2019. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.06.060>
- LI, H. *et al.* Binding analyses of Cry1Ab and Cry1Ac with membrane vesicles from *Bacillus thuringiensis*-resistant and-susceptible *Ostrinia nubilalis*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 323, n. 1, p. 52-57, 2004.
- LI, K. *et al.* Developmental toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. **Chemosphere**, v. 171, p. 40-48, 2017.

LI, X. *et al.* Evaluation of soil ecological health after exposure to environmentally relevant doses of Di (2-ethylhexyl) phthalate: Insights from toxicological studies of earthworms at different ecological niches. **Environmental Pollution**, v. 322, p. 121204, 2023.

LINACRE, N. A.; THOMPSON, C. J. Dynamics of insect resistance in Bt-corn. **Ecological Modelling**, 171(3), 271–278, 2004. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLMODEL.2003.08.009>

LIU, B. *et al.*, Assessing effects of transgenic Cry1Ac cotton on the earthworm *Eisenia fetida*. **Soil Biology and Biochemistry**, 41(9), 1841–1846, 2009. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2009.06.004>

LIU, J. *et al.*, Environmental fate of Bt proteins in soil: Transport, adsorption/desorption and degradation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 226, 112805, 2021. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.112805>

LIU, Y. *et al.*, Responses and detoxification mechanisms of earthworm *Amyntas hupeiensis* to metal contaminated soils of North China. **Environmental Pollution**, 327, 121584, 2023. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2023.121584>

LUCIO, F. T. *et al.* Genetic instability in farmers using pesticides: A study in Brazil with analysis combining alkaline comet and micronucleus assays. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, p. 503587, 2023.

LUKKARI, T. *et al.*, Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure: differences between populations with and without earlier metal exposure. **Environmental Pollution**, 129(3), 377–386, 2004. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2003.12.008>

MARKUS, C. *et al.* Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Matologia: Estudos sobre plantas daninhas**. Editora Fábrica da Palavra, Jaboticabal, p. 324–364, 2021.
MARTINS, H.; PEREIRA, F. D. C. Avaliação dos efeitos tóxicos do agroquímico tordon® sobre os organismos teste *Lactuca sativa* e *Allium cepa*. **Visão Acadêmica**, v. 19, n. 2, 2018.

MECCA, C. Z. P. **Síntese e Caracterização de compostos de coordenação com o herbicida picloram e seus efeitos toxicológicos em Danio rerio (Zebrafish)**. 2022. 64 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2022.

MATZENBACHER, F. O. *et al.* Antagonism is the predominant effect of herbicide mixtures used for imidazolinone-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) control. **Planta Daninha**, v. 33, p. 587–597, 2015.

MCCLINTOCK, J. T.; SCHAFFER, C. R., e SJOBLAD, R. D. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. **Pesticide Science**, 45(2), 95–105, 1995. <https://doi.org/10.1002/PS.2780450202>

MCGAUGHEY, W. H. Problems of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Agriculture, Ecosystems e Environment**, 49(1), 95–102, 1994. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(94\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0167-8809(94)90027-2)

MELO, L. H. V. *et al.*, Diversity and biotechnological potential of endophytic *Bacillus* species originating from the stem apoplast fluid of sugarcane plants. **Applied Soil Ecology**, v. 166, p. 103985, 2021.

MESNAGE, R. *et al.*, Genotoxicity evaluation of 2,4-D, dicamba and glyphosate alone or in combination with cell reporter assays for DNA damage, oxidative stress and unfolded protein response. **Food and Chemical Toxicology**, 157, 112601, 2021.
<https://doi.org/10.1016/J.FCT.2021.112601>

MESNAGE, R.; SZÉKÁCS, A.; ZALLER, J. G. Herbicides: Brief history, agricultural use, and potential alternatives for weed control. **Herbicides**, p. 1-20, jun. 2021.

MESNAGE, R. *et al.*, Genotoxicity evaluation of 2, 4-D, dicamba and glyphosate alone or in combination with cell reporter assays for DNA damage, oxidative stress and unfolded protein response. **Food and Chemical Toxicology**, v. 157, p. 112601, 2021.

MEYER, H. Systemic risks of genetically modified crops: The need for new approaches to risk assessment. **Environmental Sciences Europe**, 23(1), 1–11, 2011.
<https://doi.org/10.1186/2190-4715-23-7/TABLES/1>

Ministério da Saúde (Brasil). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Picloram: bula [Internet]. Brasília: Anvisa; 2022. p. 2. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/p/4466json-file-1>>

MKHININI, M. *et al.* Biochemical and transcriptomic response of earthworms *Eisenia andrei* exposed to soils irrigated with treated wastewater. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 3, p. 2851-2863, 2019.

MONQUERO, P. A. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas. **Bragantia**, v. 64, p. 517-531, 2005.

MONQUERO, P. A.; OLIVEIRA, A. S. Os herbicidas causam impactos na sobrevivência e desenvolvimento de abelhas?. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 17, n. 1, p. 95-105, 2018.

MOWERY, A.; CONLIN, M.; CLAYBURGH, D. Increased risk of head and neck cancer in Agent Orange exposed Vietnam Era veterans. **Oral Oncology**, v. 100, p. 104483, 2020.
MWAKALESI, A. J.; POTTER, I. D. Removal of picloram herbicide from an aqueous environment using polymer inclusion membranes. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 8(5), 103936, 2020.

MY, T. T. A. *et al.* Evaluation of the dioxin-like toxicity in soil samples from Thua Thien Hue province using the AhR-CALUX bioassay—An update of Agent Orange contamination in Vietnam. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 212, p. 111971, 2021.

NARVÁEZ, C.; SABAT, P.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C. Synergistic effects of pesticides and environmental variables on earthworm standard metabolic rate. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology e Pharmacology**, v. 260, p. 109404, 2022.

NASCIMENTO, J. *et al.* Adoption of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides in agricultural systems and new approaches to improve their use in Brazil. **Biological Control**, v. 165, p. 104792, 2022.

OJO, O. F.; ADEWUMI, D. G.; OLUWATOYIN, A. K. Glutathione-S-transferase production in earthworm (Annelida: Eudrilidae) as a tool for heavy metal pollution assessment in abattoir soil. **Revista de Biologia Tropical**, 64(2), 779–789, 2016.
<https://doi.org/10.15517/rbt.v64i2.18484>

OLIVEIRA, M. C.; SOUZA, V. H. E. Utilização de biomarcadores de estresse oxidativo no monitoramento ambiental. **Revista Uningá**, v. 10, n. 1, 2006.

OLIVEIRA-SILVA, J. A. *et al.* Oxidative stress assessment by glutathione peroxidase activity and glutathione levels in response to selenium supplementation in patients with Mucopolysaccharidosis I, II and VI. **Genetics and molecular biology**, v. 42, p. 1-8, 2019.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, 70(1), 158–169, 1967. <https://doi.org/10.1515/cclm.1974.12.10.444>

PALMER, M. G. The legacy of agent orange: empirical evidence from central Vietnam. **Social Science e Medicine**, v. 60, n. 5, p. 1061-1070, 2005.

PANG, G. F. Chapter 1 - Introduction. **Analytical Methods for Food Safety by Mass Spectrometry**, p. 1-9, 29 jun. 2018.

PARAYIL, G. Mapping technological trajectories of the Green Revolution and the Gene Revolution from modernization to globalization. **Research policy**, v. 32, n. 6, p. 971-990, 2003.

PARK, K. *et al.*, Biological and molecular responses of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) to herbicide 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology e Pharmacology**, 151(4), 439–446, 2010.
<https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2010.01.009>

PASSOS, A. B. R. J. **Atributos do solo e práticas culturais que influenciam o comportamento do picloram no ambiente**. 55f. Tese (Doutorado em Agroquímica) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

PAUL, V.; STEINKE, K.; MEYER, H. H. D. (2008). Development and validation of a sensitive enzyme immunoassay for surveillance of Cry1Ab toxin in bovine blood plasma of cows fed Bt-maize (MON810). **Analytica Chimica Acta**, 607(1), 106–113.
<https://doi.org/10.1016/J.ACA.2007.11.022>

PAUMGARTTEN, F. JR. Pesticides and public health in Brazil. **Current opinion in toxicology**, v. 22, p. 7-11, 2020.

PEI, J. *et al.* Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxidation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1147414, 2023.

PELOSI, C. *et al.* Pesticides and earthworms. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 34, p. 199-228, 2014.

PILEGGI, M.; PILEGGI, S. A. V.; SADOWSKY, M. J. Herbicide bioremediation: from strains to bacterial communities. **Heliyon**, v. 6, n. 12, p. e05767, 2020.

POSSENTI, J. C. *et al.* Toxicidade do herbicida 2, 4-D sobre germinação de sementes de *Beta vulgaris* L.(beterraba). **Brazilian Journal of Science**, v. 2, n. 1, p. 34-41, 2023.

POSSENTI, J. C. *et al.* Toxicidade do herbicida 2, 4-D sobre germinação de sementes de *Lycopersicon esculentum* L. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 10, n. 4, p. 297-301, 2022.

POULIN, B. *et al.* Long-term persistence and recycling of *Bacillus thuringiensis* israelensis spores in wetlands sprayed for mosquito control. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 243, p. 114004, 2022. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2022.114004>

QIAO, Z. *et al.*, Oxidative stress and detoxification mechanisms of earthworms (*Eisenia fetida*) after exposure to flupyradifurone in a soil-earthworm system. **Journal of environmental management**, v. 322, p. 115989, 2022.

RAJAK, P. *et al.*, Agricultural Pesticides–Friends or Foes to Biosphere? **Journal of Hazardous Materials Advances**, p. 100264, 2023.

RANI, L. *et al.*, An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. **Journal of Cleaner Production**, v. 283, p. 124657, 2021.

REN, Q. *et al.*, Nitric oxide (NO) involved in Cd tolerance in NHX1 transgenic duckweed during Cd stress. **Plant Signaling e Behavior**, v. 17, n. 1, p. 2065114, 2022.

REZENDE-TEIXEIRA, P. *et al.* What can we learn from commercial insecticides? Efficacy, toxicity, environmental impacts, and future developments. **Environmental Pollution**, p. 118983, 2022.

RIBEIRO, A. L. P. *et al.* 2, 4-D em videiras: estudo de caso no Município de Jaguari-RS, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e2129108379-e2129108379, 2020.

RIBEIRO, Y. M. *et al.* Adverse effects of herbicides in freshwater Neotropical fish: a review. **Aquatic Toxicology**, p. 106293, 2022.

RODRÍGUEZ-GARCÍA, Alba *et al.* Protein carbonylation and lipid peroxidation in hematological malignancies. **Antioxidants**, v. 9, n. 12, p. 1212, 2020.

ROHLMAN, D. S. *et al.* Chapter Six - Identifying and preventing the neurotoxic effects of pesticides. **Advances in Neurotoxicology**, v. 7, p. 203-255, 10 jun. 2022.

RÖMBKE, J. *et al.*, General recommendations for soil ecotoxicological tests suitable for the environmental risk assessment of genetically modified plants. **Integrated Environmental**

Assessment and Management, 6(2), 287–300, 2010. https://doi.org/10.1897/IEAM_2009-043.1

RUBIO-INFANTE, N.; MORENO-FIERROS, L. (2016). An overview of the safety and biological effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in mammals. **Journal of Applied Toxicology**, 36(5), 630–648. <https://doi.org/10.1002/JAT.3252>

RUUSKANEN, Suvi *et al.* Ecosystem consequences of herbicides: The role of microbiome. **Trends in Ecology e Evolution**, 2022.

SAMET, J. M.; WAGES, P. A. Oxidative stress from environmental exposures. **Current Opinion in Toxicology**, 7, 60–66, 2018. <https://doi.org/10.1016/J.COTOX.2017.10.008>

SAMUEL, A.; DINES, L. Weeds of farm crops. Lockhart e Wiseman's Crop Husbandry Including Grassland. **Woodhead Publishing**. p. 115-141, 19 jan. 2023.

SANTOS, E. N. *et al.*, *Bacillus thuringiensis*: From biopesticides to anticancer agents. **Biochimie**, 192, 83–90, 2022. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2021.10.003>

SAXENA, D.; STOTZKY, G. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, 33(9), 1225–1230, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00027-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00027-X)

SBANO, A. *et al.* Otimização de método cromatográfico para quantificação do herbicida ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D). **Acta Scientiae et Technicae**, v. 1, n. 2, 2013.

SCHULZ, B.; SEGOBYE, K. 2, 4-D transport and herbicide resistance in weeds. **Journal of experimental botany**, v. 67, n. 11, p. 3177-3179, 2016.

SEGAT, J. C. *et al.*, Increasing level of liquid pig manure reduces *Eisenia andrei* and *Enchytraeus crypticus* reproduction in subtropical soils. **Scientific Reports**, 10(10687), 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67360-4>

SHU, Y. *et al.*, The presence of *Bacillus thuringiensis* (Bt) protein in earthworms *Eisenia fetida* has no deleterious effects on their growth and reproduction. **Chemosphere**, 85(10), 1648–1656, 2011. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2011.08.032>

SILVA, A. P. *et al.* Does exposure to environmental 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations increase mortality rate in animals? A meta-analytic review. **Environmental Pollution**, p. 119179, 2022.

SILVA, G. R. *et al.* Defesa química: histórico, classificação dos agentes de guerra e ação dos neurotóxicos. **Química Nova**, v. 35, p. 2083-2091, 2012.

SILVA, L. O. C. *et al.* Ação de Eleusine coracana na remediação de solos contaminados com picloram. **Planta Daninha**, v. 30, p. 627-632, 2012.

SILVA, L. O. C. *et al.* Ação de Eleusine coracana na remediação de solos contaminados com picloram. **Planta Daninha**, v. 30, p. 627-632, 2012.

SILVA, L. V. J. B. *et al.* AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DO *Bacillus thuringiensis* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 27, n. 1, 2022.

SILVAGNO, F.; VERNONE, A.; PESCARMONA, G. P. The role of glutathione in protecting against the severe inflammatory response triggered by COVID-19. **Antioxidants**, v. 9, n. 7, p. 624, 2020.

SINGH, P.; PRASAD, S. M. Antioxidant enzyme responses to the oxidative stress due to chlorpyrifos, dimethoate and dieldrin stress in palak (*Spinacia oleracea* L.) and their toxicity alleviation by soil amendments in tropical croplands. **Science of the Total Environment**, 630, 839–848, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.203>

SINGH, V.; SINGH, K. Toxic effect of herbicide 2, 4-D on the earthworm *Eutyphoeus waltoni* Michaelsen. **Environmental Processes**, v. 2, p. 251-260, 2015.

Soil Survey Staff. (2022). *Keys to Soil Taxonomy* (13th ed.). USDA Natural Resources Conservation Service.

STARNES, R. L.; LIU, C. L.; MARRONE, P. G. History, Use, and Future of Microbial Insecticides. **American Entomologist**, 39(2), 83–91, 1993. <https://doi.org/10.1093/AE/39.2.83>

SULE, R. O. *et al.* A common feature of pesticides: oxidative stress—the role of oxidative stress in pesticide-induced toxicity. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2022, 2022.

SUZUKI, Y. J.; CARINI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Protein carbonylation. **Antioxidants e redox signaling**, v. 12, n. 3, p. 323-325, 2010.

TAKANO, H. K. *et al.* Efeito da adição do 2, 4-D ao glyphosate para o controle de espécies de plantas daninhas de difícil controle. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2013.

TANNER, C. M. *et al.* Occupation and risk of parkinsonism: a multicenter case-control study. **Archives of neurology**, v. 66, n. 9, p. 1106-1113, 2009.

TAO, H. *et al.*, Redox signaling and antioxidant defense in osteoclasts. *Free Radical Biology and Medicine*, 212, 403–414, 2004. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2023.12.043>.

TAPP, H.; STOTZKY, G. Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, 30(4), 471–476, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00148-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00148-X)

TARAZONA, J. V.; DOHMEN, G. P. Ecotoxicology of rice pesticides. **Pesticide Risk Assessment in Rice Paddies**, p. 69-90, 2008.

TARAZONA, J. V.; RAMOS-PERALONSO, M. J. **Ecotoxicology, terrestrial**. 2014.

- TAYYAB, Saad *et al.* Probing the interaction of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid with human serum albumin as studied by experimental and computational approaches. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 207, p. 284-293, 2019.
- THIOUR-MAUPRIVEZ, C. *et al.* Effects of herbicide on non-target microorganisms: towards a new class of biomarkers?. **Science of the Total Environment**, v. 684, p. 314-325, 2019.
- THIOUR-MAUPRIVEZ, C. *et al.* Effects of herbicide on non-target microorganisms: towards a new class of biomarkers? **Science of the Total Environment**, v. 684, p. 314-325, 2019.
- TIMOSSI, P. C. *et al.* Efeito residual de herbicidas auxínicos em soja. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 19, n. 3, p. 699-1-7), 2020.
- TODD, O. E. *et al.* Synthetic auxin herbicides: finding the lock and key to weed resistance. **Plant Science**, v. 300, p. 110631, 2020.
- TOMAZINI, L. N. *et al.* ÓXIDO NÍTRICO: UMA BREVE REVISÃO SOBRE ASPECTOS HISTÓRICOS, ESTRUTURA QUÍMICA E ALGUMAS APLICAÇÕES RELEVANTES PARA O CORPO HUMANO. **Multi-Science Journal**, v. 2, n. 2, p. 82-88, 2019.
- TRANG, A.; KHANDHAR, P. B. Physiology, acetylcholinesterase. 2019.
- TRIQUES, M. C. *et al.* Assessing single effects of sugarcane pesticides fipronil and 2, 4-D on plants and soil organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111622, 2021.
- VAIL, D. D. Toxicity abounds: new histories on pesticides, environmentalism, and silent spring. **Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**, p. 118-121, 2015.
- VAN C. C.; SCHRADER, S.; ARPAIA, S. Selection of focal earthworm species as non-target soil organisms for environmental risk assessment of genetically modified plants. **Science of The Total Environment**, 548–549, 360–369, 2016.
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2015.12.165>
- VARGAS, Leandro *et al.* Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil: histórico, distribuição, impacto econômico, manejo e prevenção. 2016.
- VAŠKOVÁ, J. *et al.* Glutathione-Related Enzymes and Proteins: A Review. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1447, 2023.
- VASSEUR, P.; BONNARD, M. Ecogenotoxicology in earthworms: A review. **Current Zoology**, 60(2), 255–272, 2014. <https://academic.oup.com/cz/article/60/2/255/1804199>
- VAZ, C. M. P.; MARTIN NETO, L.; CRESTANA, S. Avanços da instrumentação em ciência do solo. 2007.

VELKI, M.; HACKENBERGER, B. K. Inhibition and recovery of molecular biomarkers of earthworm *Eisenia andrei* after exposure to organophosphate dimethoate. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 57, p. 100-108, 2013.

VELLINGIRI, B. *et al.*, Role of heavy metals (copper (Cu), arsenic (As), cadmium (Cd), iron (Fe) and lithium (Li)) induced neurotoxicity. *Chemosphere*, 301, 134625, 2022.
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2022.134625>

VELLINGIRI, B. *et al.* Neurotoxicity of pesticides—A link to neurodegeneration. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 243, p. 113972, 2022.

VERCESI, M. L., KROGH, P. H., e HOLMSTRUP, M. Can *Bacillus thuringiensis* (Bt) corn residues and Bt-corn plants affect life-history traits in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*? **Applied Soil Ecology**, 32(2), 180–187, 2006.
<https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2005.07.002>

VERSONNEN, B. J. *et al.*, *Ecotoxicology, Aquatic. Reference Module in Biomedical Sciences*, 2022.

VIRIATO, C. *et al.*, Evaluation of the potential teratogenic and toxic effect of the herbicide 2, 4-D (DMA® 806) in bullfrog embryos and tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). **Chemosphere**, v. 266, p. 129018, 2021.

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

WAFI, T.; IKBAL, C.; MOHAMED, H. Environmental fate and effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic herbicide. **Herbicides: Properties, Crop Protection**, p. 161-187, 2011.

WANG, H. *et al.* BcWRKY22 Activates BcCAT2 to Enhance Catalase (CAT) Activity and Reduce Hydrogen Peroxide (H₂O₂) Accumulation, Promoting Thermotolerance in Non-Heading Chinese Cabbage (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*). **Antioxidants**, v. 12, n. 9, p. 1710, 2023.

WANG, H. *et al.* Biochemical responses and DNA damage induced by herbicide QYR301 in earthworm (*Eisenia fetida*). **Chemosphere**, v. 244, p. 125512, 2020.

WANG, Y. *et al.* Urinary 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in Chinese pregnant women at three trimesters: Variability, exposure characteristics, and association with oxidative stress biomarkers. **Chemosphere**, v. 304, p. 135266, 2022.

WANG, Y. *et al.* Complete biodegradation of the oldest organic herbicide 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid by engineering *Escherichia coli*. **Journal of Hazardous Materials**, p. 131099, 2023.

WEN, S. *et al.* Fluopicolide-Induced Oxidative Stress and DNA Damage in the Earthworm *Eisenia foetida*. **Toxics**, v. 11, n. 10, p. 808, 2023.

WU, F. *et al.*, Biochemical analyses demonstrate that Bt maize has no adverse effects on *Eisenia fetida*. **PLOS ONE**, 17(6), e0269303, 2022.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0269303>

YAN, L. J. *et al.*, Apolipoprotein B Carbonyl Formation Is Enhanced by Lipid Peroxidation during Copper-Mediated Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 339, n. 1, p. 165-171, 1997.

YATOO, A. M. *et al.* Assessment of pesticide toxicity on earthworms using multiple biomarkers: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 20, n. 4, p. 2573-2596, 2022.

YU, W.; ZHANG, Y.; SANG, W. Integration of transcriptomic and metabolomic reveals metabolic pathway alteration in earthworms (*Eisenia fetida*) under copper exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology e Pharmacology**, 260, 109400, 2022. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2022.109400>

ZHANG, C. *et al.*, Applying fungicide on earthworms: Biochemical effects of *Eisenia fetida* exposed to fluoxastrobin in three natural soils. **Environmental Pollution**, 258, 113666, 2020.
<https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2019.113666>

Zhang, D. *et al.*, Exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces oxidative stress and apoptosis in mouse testis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 141, 18–22, 2017.
<https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2016.10.006>

ZHANG, Q. *et al.* Oxidative stress and lipid peroxidation in the earthworm *Eisenia fetida* induced by low doses of fomesafen. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, p. 201-208, 2013.

ZHAO, W. *et al.*, Insights into the mechanisms of organic pollutant toxicity to earthworms: Advances and perspectives. **Environmental Pollution**, 303, 119120, 2022.
<https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2022.119120>

ZHAO, X. *et al.* Prevalence, attachment ability and strength of the biological control agent *Bacillus thuringiensis* on tomato. **Food Microbiology**, v. 112, p. 104235, 2023.

ZHOU, X. *et al.*, Effects of toxin from *Bacillus thuringiensis* (Bt) on sorption of Pb (II) in red and black soils: equilibrium and kinetics aspects. **Journal of Hazardous Materials**, 360, 172–181, 2018. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2018.07.114>

ZHU, L. *et al.*, The overlooked toxicity of environmentally persistent free radicals (EPFRs) induced by anthracene transformation to earthworms (*Eisenia fetida*). **Science of The Total Environment**, v. 853, p. 158571, 2022.

ZUANAZZI, N. R.; DE CASTILHOS GHISI, N.; OLIVEIRA, E. C. Analysis of global trends and gaps for studies about 2, 4-D herbicide toxicity: a scientometric review. **Chemosphere**, v. 241, p. 125016, 2020.