

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**MARIA LETÍCIA FONSECA RAFALDINI**

**ESTUDO COMPORTAMENTAL DOS EFEITOS DO CONSUMO DE 2,4-D  
(DICLOROFENOXIACÉTICO) EM CAMUNDONGOS PRENHES E NO  
DESENVOLVIMENTO FÍSICO E NEUROLÓGICO INICIAL DE SUAS PROLES**

**ALFENAS/MG**

**2025**

**MARIA LETÍCIA FONSECA RAFALDINI**

**ESTUDO COMPORTAMENTAL DOS EFEITOS DO CONSUMO DE 2,4-D  
(DICLOROFENOXIACÉTICO) EM CAMUNDONGOS PRENHES E NO  
DESENVOLVIMENTO FÍSICO E NEUROLÓGICO INICIAL DE SUAS PROLES**

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biologia da Reprodução.

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior.

**ALFENAS/MG**

**2025**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Rafaldini, Maria Leticia Fonseca .

Estudo comportamental dos efeitos do consumo de 2,4-D  
(Diclorofenoxiacético) em camundongos prenhes e no desenvolvimento  
físico e neurológico inicial de suas proles / Maria Leticia Fonseca Rafaldini.  
- Alfenas, MG, 2025.

36 f. : il. -

Orientador(a): Valdemar Antonio Paffaro Junior.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) -  
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Estudo etológico . 2. Toxicidade . 3. Herbicida . 4. Prole. 5.  
Diclorofenoxiacético. I. Paffaro Junior, Valdemar Antonio, orient. II. Título.

**Maria Letícia Fonseca Rafaldini**

**ESTUDO COMPORTAMENTAL DOS EFEITOS DO CONSUMO DE 2,4-D  
(DICLOROFENOXIACÉTICO) EM CAMUNDONGOS PRENHES E NO  
DESENVOLVIMENTO FÍSICO E NEUROLÓGICO INICIAL DE SUAS PROLES**

O presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 08 de dezembro de 2025

Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior

Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:  Documento assinado digitalmente  
VALDEMAR ANTONIO PAFFARO JUNIOR  
Data: 09/12/2025 10:22:47-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Marcia Cristina Bizinotto de Assunção

Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Bruno Zavan

Universidade Federal de Alfenas

## RESUMO

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um dos pesticidas mais utilizados mundialmente, empregado como herbicida de pré e pós-emergência no controle de ervas daninhas em diversas culturas. A exposição ocorre por contato ocupacional e pelo consumo de água e alimentos contaminados. Estudos com ratos expostos cronicamente ao 2,4-D mostraram efeitos negativos como doenças neurológicas, imunotoxicidade e distúrbios reprodutivos, incluindo alterações na motilidade e morfologia dos espermatozoides. Pesquisas com embriões de aves (*Gallus gallus domesticus*) também indicaram toxicidade pré-natal, especialmente na concentração de 30 µm/L, limite permitido pela legislação brasileira. Contudo, ainda são escassas as evidências sobre os mecanismos de toxicidade e seus efeitos nos períodos pré e pós-natal de diferentes espécies. Assim, este estudo investigou os efeitos do 2,4-D em possíveis alterações comportamentais de fêmeas prenhes e no desenvolvimento de suas proles. Fêmeas Swiss foram acasaladas e tratadas com duas concentrações do herbicida via gavagem durante a gestação. No 10º dia de gestação, foram avaliadas por testes comportamentais (labirinto em Y, barras paralelas e labirinto em cruz elevado) e mantidas até o termo. Também foram analisados o tempo gestacional, peso, tamanho das ninhadas e o desenvolvimento inicial da prole. Os resultados mostram que, embora a exposição gestacional tenha afetado principalmente a capacidade motora das fêmeas, o 2,4-D comprometeu o desenvolvimento físico, o ganho de peso e o crescimento de filhotes machos e fêmeas, além de alterar o desenvolvimento neurológico de machos. O estudo reforça a necessidade de revisões dos limites de exposição ao herbicida e de novas investigações sobre seus mecanismos toxicológicos, podendo subsidiar futuras restrições ao seu uso agrícola no Brasil.

**Palavras-chave:** Estudo etológico; toxicidade; herbicida; prole, diclorofenoxiacético.

## ABSTRACT

The herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is one of the most widely used pesticides worldwide, applied as a pre- and post-emergence product for controlling broadleaf weeds in various crops. Exposure occurs through occupational contact and through the consumption of contaminated water and food. Studies with rats chronically exposed to 2,4-D have shown negative effects such as neurological disorders, immunotoxicity, and reproductive impairments, including alterations in sperm motility and morphology. Research with bird embryos (*Gallus gallus domesticus*) has also indicated prenatal toxicity, especially at a concentration of 30  $\mu\text{m/L}$ , the maximum level allowed by Brazilian regulations. However, evidence regarding the mechanisms of toxicity and its effects in pre- and postnatal periods across different species remains limited. Therefore, this study investigated the effects of 2,4-D on possible behavioral alterations in pregnant females and on the development of their offspring. Swiss female mice were mated and treated with two concentrations of the herbicide via gavage throughout gestation. On the 10th gestational day, they were evaluated through behavioral tests (Y-maze, parallel bars, and elevated plus-maze) and maintained until full term. Gestational length, body weight, litter size, and early development of the offspring were also assessed. The results show that, although gestational exposure primarily affected the motor capacity of pregnant females, 2,4-D compromised the physical development, weight gain, and growth of both male and female pups, in addition to altering neurological development in males. This study reinforces the need to review exposure limits to this herbicide and to conduct further research on its toxicological mechanisms in gestational models, which may support future restrictions on its agricultural use in Brazil.

**Keywords:** Ethological study; toxicity; herbicide; offspring; dichlorophenoxyacetic.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO LITERÁRIA.....</b>	<b>10</b>
2.1	CAMUNDONGOS COMO MODELO EXPERIMENTAL NA GESTAÇÃO	10
2.2	ÁCIDO 2,4 DICLOROFENOXIACÉTICO.....	10
2.3	POTENCIAL TÓXICO PARA ORGANISMOS VERTEBRADOS.....	10
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
4.1	OBJETIVOS GERAIS.....	13
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>14</b>
5.1	ANIMAIS.....	14
5.1.1	ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	14
5.2	ANÁLISE COMPORTAMENTAL.....	16
5.2.1	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE APRENDIZADO ESPACIAL E MEMÓRIA.....	16
5.2.2	ANÁLISE DO EQUILÍBRIO E DA COORDENAÇÃO MOTORA.....	16
5.2.3	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO.....	17
5.3	ANÁLISE DA PREENHEZ A TERMO .....	18
5.3.1	ANÁLISE DA PROLE.....	18
5.3.1.1	ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO FÍSICO.....	18

5.3.1.2	TESTES DE REFLEXOS NEUROLÓGICOS.....	20
5.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	21
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
6.1	ANÁLISES COMPORTAMENTAIS DAS FÊMEAS PRENHES.....	22
6.1.1	LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO).....	22
6.1.2	LABIRINTO EM Y (APRENDIZADO ESPACIAL E MEMÓRIA) E TESTE DAS BARRAS PARALELAS (EQUILÍBRIO E COORDENAÇÃO MOTORA).....	23
6.2	ANÁLISE DO TEMPO DE GESTAÇÃO E DA PROLE AO NASCER.....	24
6.3	TESTES DE DESENVOLVIMENTO FÍSICO.....	24
6.3.1	ANÁLISE DE GANHO DE PESO DOS FILHOTES.....	26
6.3.2	ANÁLISE DO CRESCIMENTO DA PROLE.....	27
6.4	TESTES DE REFLEXO NEUROLÓGICO.....	28
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>32</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>33</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>36</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Como um dos primeiros herbicidas sintéticos introduzidos no mercado e atualmente ingrediente principal de mais de 1.500 produtos comercialmente disponíveis a nível mundial, o ácido 2,4- D revelou-se capaz de induzir efeitos tóxicos em diferentes organismos (MARTINS, 2021). Seu mecanismo de ação está relacionado a mimetização das auxinas naturais das plantas gerando alterações de crescimento, que podem ser percebidos mesmo quando pequenas quantidades entram em contato com plantas sensíveis. Para o meio ambiente, não apresenta toxicidade muito relevante já que é biodegradável e possui baixa lixiviação no solo, não apresentando capacidade de contaminação do lençol freático (OLIVEIRA JR, 2017).

Pouco se sabe ainda sobre os possíveis efeitos do 2,4-D no comportamento de camundongos prenhes, principalmente nos períodos pré e pós-natal e no desenvolvimento de diferentes espécies. Diante desta problemática contextualizada acima, o presente estudo tem o fito de avaliar o efeito do consumo de 2,4-D (Diclorofenoxiacético) durante a gestação de murinos no comportamento de camundongos prenhes e no desenvolvimento inicial de suas proles. Esse modelo experimental foi escolhido devido às semelhanças observadas nos estágios iniciais com o desenvolvimento embrionário de humanos, permitindo este estudo translacional do efeito do 2,4-D do comportamento da mãe e na prole.

## **2 REVISÃO LITERÁRIA**

### **2.1 Camundongos como modelo experimental na gestação**

Os camundongos são amplamente utilizados como modelo experimental em estudos sobre gravidez e comportamento materno devido à sua relevância genética e fisiológica em relação aos seres humanos. Estudos indicam que esses roedores compartilham aproximadamente 95% de similaridade genética com humanos, o que permite que reações e respostas biológicas sejam observadas e analisadas de forma comparativa (RIDGWAY; COOK, 2019). Além disso, sua facilidade de manejo, baixo custo de manutenção e curto ciclo reprodutivo tornam os camundongos um modelo ideal para investigações de alterações comportamentais e neurológicas relacionadas à gestação e ao desenvolvimento da prole (JONES; BAKER, 2021).

### **2.2 Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético**

O composto herbicida conhecido como 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) emergiu como o pioneiro bem-sucedido entre os herbicidas seletivos, sendo introduzido em 1946 e rapidamente conquistando o título de herbicida mais amplamente empregado globalmente (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002). Após meio século de uso em lavouras, ainda ocupa a terceira posição na lista dos herbicidas mais empregados para o controle de plantas daninhas nos Estados Unidos e Canadá (INDUSTRY TASK FORCE II, 2000). O 2,4-D é caracterizado como um herbicida altamente seletivo, de natureza sistêmica e aplicação pós-emergente, que funciona como um regulador de crescimento, apresentando um efeito que se assemelha ao da auxina, conforme descrito por Guerra (2014). Este composto químico é amplamente empregado na agricultura, destinando-se a culturas como trigo, milho, soja, arroz (irrigado e de sequeiro), aveia, sorgo, cana-de-açúcar, café, bem como na silvicultura e na manutenção de gramados, graças à sua relativa baixa toxicidade aguda e à sua eficácia no combate a plantas de folhas largas consideradas invasoras.

### **2.3 Potencial tóxico para organismos vertebrados**

O 2,4-D é classificado como um herbicida de baixa toxicidade aguda para os seres humanos. No entanto, há preocupações quanto aos possíveis efeitos crônicos à saúde. Estudos epidemiológicos associaram a exposição ao 2,4-D a riscos elevados de câncer, especialmente

linfoma não-Hodgkin e câncer de próstata (ZAHM e BLAIR, 2001). Além disso, ele tem sido associado a problemas reprodutivos e neurotoxicidade em estudos com animais (DUKE *et al.*, 2018). No Brasil, assim como em muitos outros países, o uso do 2,4-D é regulamentado por órgãos de controle, como o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Essas agências estabelecem limites máximos de resíduos (LMR) para o 2,4-D em alimentos e monitoram sua utilização para garantir o cumprimento das regulamentações (BRASIL, 2018). A toxicidade do herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) para vertebrados é um tema de preocupação significativa, pois esse composto químico é amplamente utilizado na agricultura e pode ter impactos negativos na saúde e no ambiente. O 2,4-D é considerado de baixa toxicidade aguda para mamíferos, incluindo seres humanos (DUKE *et al.*, 2018). No entanto, exposições crônicas ou agudas a concentrações elevadas podem causar efeitos adversos, como irritação ocular, dermatite e sintomas gastrintestinais (EPA, 2005). Em estudos demonstraram que aves expostas podem sofrer efeitos negativos, como diminuição da fertilidade e toxicidade aguda em algumas espécies (HARPER *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2014). Os seus efeitos tóxicos em vertebrados são atribuídos à sua ação como um regulador de crescimento de plantas que interfere nos processos metabólicos celulares. Isso pode levar a disfunções em sistemas fisiológicos, causando danos aos órgãos e tecidos dos vertebrados (DUKE *et al.*, 2018). Em muitos países, incluindo os Estados Unidos, o 2,4-D é regulamentado por agências ambientais que estabelecem limites máximos de resíduos (LMR) em alimentos e monitoram sua aplicação para minimizar a exposição e os riscos à saúde humana e ao meio ambiente (EPA, 2005). Embora o 2,4-D seja considerado de baixa toxicidade aguda para vertebrados, estudos indicam que ele pode ter efeitos adversos em mamíferos, aves, peixes e anfíbios, especialmente em exposições crônicas e em concentrações elevadas. Portanto, a regulamentação e o monitoramento rigorosos são essenciais para mitigar os riscos associados ao uso deste herbicida.

### 3 JUSTIFICATIVA

O herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) é uma substância química amplamente empregada na agricultura em todo o mundo, incluindo o Brasil, ele é altamente eficaz no controle de plantas daninhas de folhas largas, o que o torna valioso em uma variedade de culturas, incluindo soja, milho, trigo, arroz e algodão (VILA-ANGULOS *et al.*, 2012). Sua ação seletiva permite que seja usado para eliminar plantas indesejadas, enquanto as culturas desejadas continuam a crescer normalmente. Apesar de sua eficácia, ele levanta preocupações ambientais significativas. A deriva durante a aplicação pode afetar culturas não-alvo e ecossistemas adjacentes (GREEN *et al.*, 2012; KOH *et al.*, 2016). O herbicida também é conhecido por ser tóxico para algumas espécies aquáticas e terrestres (KINNEY *et al.*, 2015). Nos últimos anos, diversas investigações foram conduzidas com base neste herbicida, visando a avaliar seu potencial tóxico, principalmente em células de organismos animais. De acordo com Friedrich (2014), a ANVISA classifica o 2,4-D como Classe I (ANVISA, 2016), ou seja, o categoriza como um agente altamente tóxico, identificado pelo indicativo de cor vermelha, que é atribuído aos produtos fitossanitários extremamente nocivos. Essa classificação fundamenta-se principalmente nos efeitos agudos que a substância pode provocar após uma única exposição em animais de laboratório. Sendo assim, este projeto buscou elucidar os efeitos da administração do herbicida ácido 2,4- diclorofenoxiacético no comportamento dos camundongos prenhes e no desenvolvimento de suas proles.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Testar os efeitos da administração, na primeira metade da gestação, do herbicida sintético 2,4-D sobre o comportamento de camundongos prenhes e no desenvolvimento físico e neurológico inicial de suas proles.

### **4.2 Objetivos Específicos**

- a) Analisar os efeitos do 2,4-D no comportamento espacial de aprendizado e memória em camundongos prenhes no 10º ddg.
- b) Analisar os efeitos do 2,4-D no equilíbrio e coordenação motora de camundongos prenhes no 10º ddg.
- c) Analisar os efeitos do 2,4-D no comportamento do tipo ansioso em camundongos prenhes no 10º ddg.
- d) Analisar os efeitos do 2,4-D no tempo gestacional, tamanho da ninhada, bem como, do desenvolvimento físico e neurológico da prole por meio de testes no seu desenvolvimento inicial.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Animais

Foram utilizados 24 camundongos adultos fêmeas e 5 machos da linhagem SWISS (7 a 10 semanas de idade), provenientes do Biotério Central da UNIFAL-MG e mantidos no biotério do Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno e estantes ventiladas e em ciclos claro-escuro de 12 horas usufruindo de água e ração ad libitum e temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Os camundongos foram acasalados, na proporção de três fêmeas para cada macho noturnamente e o dia cuja manhã, foi observado o tampão vaginal, foi considerado o primeiro dia de gestação (1º ddg) (Figura 1). Todos os procedimentos à que foram submetidos os animais deste estudo foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal (Protocolo CEUA N°: 0049/2023) da Unifal-MG (anexo 1)

#### 5.1.1 Organização dos Grupos Experimentais

Os camundongos prenhes foram tratados com herbicida 2,4-D (Pestanal/Sigma/USA Cod:D70724-5G/Pureza de 97%) diluída em água destilada (DH<sub>2</sub>O) via gavagem orogástrica realizada do 1º ao 10º ddg e divididos em três grupos:

Grupo controle (CON): Recebeu apenas DH<sub>2</sub>O

Grupo Herbicida (GH60): foi exposto à gavagem do herbicida com concentração de 60 mg/Kg

Grupo Herbicida (GH100): foi exposto à gavagem do herbicida com concentração de 100 mg/Kg

As dosagens de 60mg/kg e 100 mg/kg foram estabelecidas de acordo com o demonstrado na revisão de literatura de Freitas e colaboradores (2019). Além disso, essas doses foram escolhidas levando em consideração as indicações do NOAEL (nível sem efeitos adversos observáveis) (US EPA, 2005).

Tabela 1. Descrição do número de fêmeas utilizadas nas diferentes análises realizadas com as diferentes concentrações utilizadas.

	CON	GH60	GH100
Avaliação comportamental das fêmeas prenhes	8	8	8
Avaliação do desenvolvimento da prole	8	8	8

Fonte: Autores (2025)

Figura 1 - Local de armazenamento dos animais e diagnóstico de acasalamento



Fonte: Autores (2025). Legenda: Fotografias mostrando as gaiolas de polipropileno utilizadas para manutenção dos animais, devidamente identificadas e armazenadas em estantes ventiladas (A e B). Detalhe da rolha vaginal utilizada para diagnóstico do acasalamento dos camundongos e início da contagem dos dias de gestação (C).

## **5.2. Análise comportamental**

Oito fêmeas prenhes no 10º ddg de cada grupo foram submetidas aos testes comportamentais do Labirinto em Y, Teste das Barras Paralelas e Labirinto em cruz elevado. Todos os testes foram realizados em ambiente livre de odores, ruídos e após ambientalização prévia dos animais. Após a execução dos testes, esses animais retornaram para suas caixas de polipropileno e foram mantidos até a prenhez a termo, para as análises da viabilidade gestacional e de desenvolvimento das proles.

### **5.2.1 Análise do comportamento de aprendizado espacial e memória**

Foi realizado o teste do labirinto em Y em um aparato experimental com três braços idênticos (35 x 7 x 20cm) dispostos em uma angulação de 120º entre si, situado em um local com iluminação reduzida. Em suas paredes haviam objetos peculiares, sendo estes diferentes entre cada braço com a função de fornecer pistas visuais. Os animais foram colocados individualmente no centro do labirinto, podendo durante a duração do experimento (10 minutos), explorar os 3 braços. O teste foi filmado e feito uma avaliação do vídeo para a quantificação do parâmetro de alternância espontânea, sendo que foi considerado o sucesso na alternância quando houver consecutivas entradas em um novo braço antes de voltar para os dois ramos visitados anteriormente. A alternância percentual foi calculada pela razão entre o número de alternâncias bem-sucedidas e o total de entrada nos braços menos 2 vezes 100.

### **5.2.2 Análise do equilíbrio e da coordenação motora**

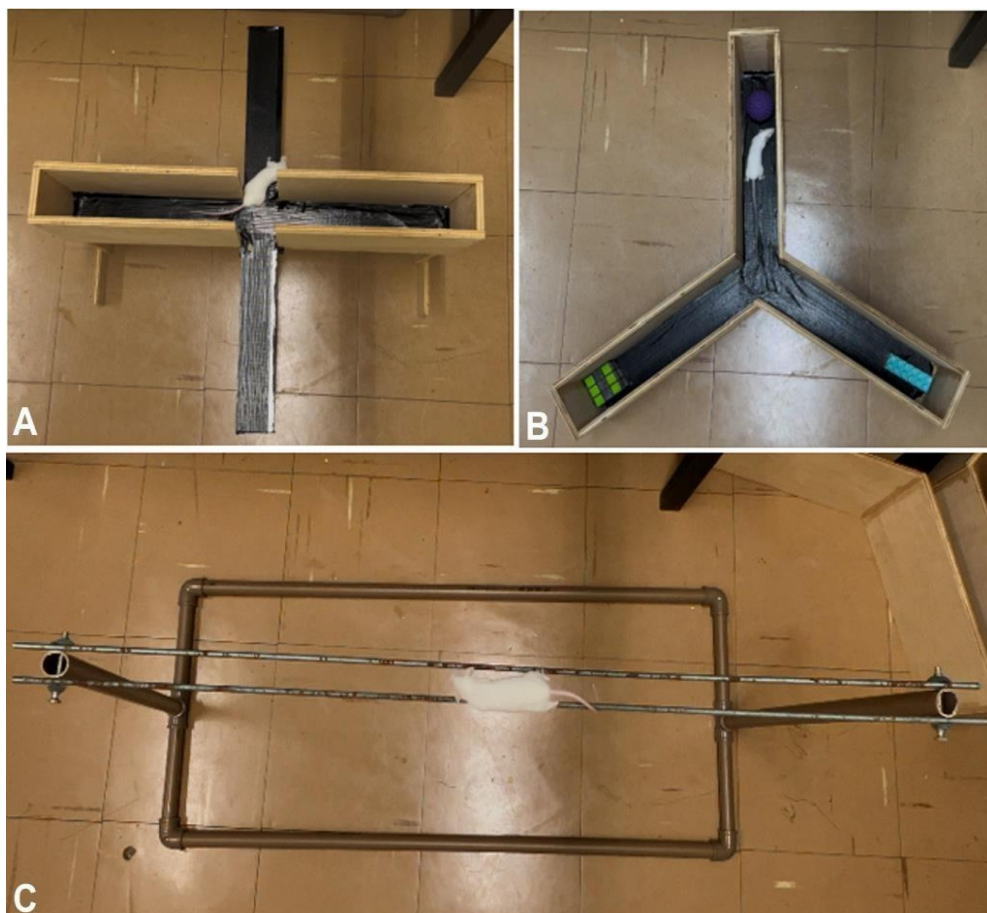
Foi realizado o teste no aparato das Barras Paralelas, que consiste em duas barras de aço de 1m de comprimento e 4mm de diâmetro, fixadas de maneira paralela a 30mm de distância, ambas a 60 cm acima do chão apoiadas por colunas de madeira nas extremidades.

O animal foi colocado no centro das duas barras com seu eixo longitudinal perpendicular ao das barras; as duas patas dianteiras devem estar em uma barra, e as duas patas traseiras na outra barra. A movimentação do animal é filmada até o momento em que ele atinge uma das extremidades da barra. Foram então analisados o tempo necessário até o animal se orientar em 90º para posição de movimentação nas barras e o tempo até atingir uma das extremidades, sendo considerado sem resultado quando o animal permaneceu imóvel ou sem percorrer significativas distâncias em até 10 minutos do início do teste.

### 5.2.3 Análise do comportamento do tipo ansioso

O labirinto em cruz elevado, LCE, foi validado para testes com camundongos em 1987 pelo pesquisador Lister em 1987. O labirinto em cruz é formado por quatro braços com o comprimento de 27 cm que se encontram no centro em uma plataforma de área 6 cm<sup>2</sup>. Dois braços possuem “colunas” com altura de 16 cm e dois são livres destas. Os animais possuem livre acesso aos braços. Os animais foram colocados no centro de frente para um dos braços fechados e filmados por cinco minutos. As medidas comportamentais registradas foram: frequência de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e fechados. Uma redução seletiva nos parâmetros correspondentes aos braços abertos (entradas e tempo) revela um comportamento do tipo ansioso (Lister, 1987; File *et al.*, 1990, Carobrez e Bertoglio, 2005).

Figura 2 - Fotografias mostrando os aparelhos utilizados nos testes comportamentais das fêmeas prenhes



Fonte: Autores (2025). Legenda: A. Labirinto em cruz para o teste de comportamento do tipo ansioso. B. Labirinto em Y para o teste de aprendizado espacial e memória. C. Barras Paralelas para o teste do equilíbrio e coordenação motora.

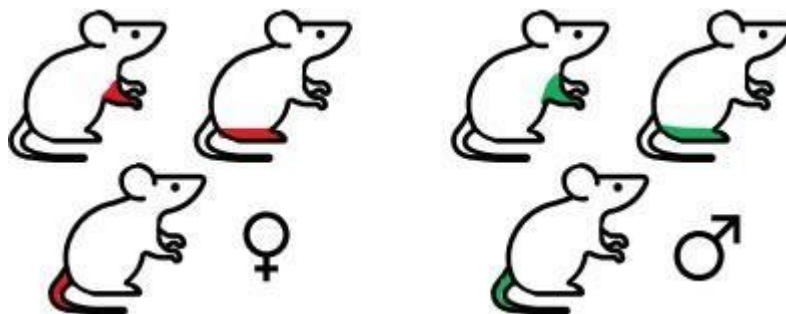
### 5.3 Análise da prenhez a termo

Os mesmos animais submetidos aos testes comportamentais foram mantidos até a prenhez a termo para avaliação do tempo gestacional, tamanho da ninhada, bem como, do desenvolvimento físico e neurológico da prole.

#### 5.3.1 -Análise da Prole

No 1º dia pós-nascimento (dpn) a prole foi contada e padronizada em seis filhotes (três fêmeas e três machos prioritariamente) e marcados com caneta permanente de cor vermelha (fêmeas) e verde (machos). Tal marcação foi renovada todos os dias e antes das análises para evitar engano na amostragem (Figura 3). Os filhotes foram avaliados quanto a existência de alterações morfológicas visíveis e a normalização da prole foi realizada considerando a existência de leite no estômago dos animais por meio da observação de mancha branca existente no abdômen como preconizado por Chorilli e colaboradores (2007).

Figura 3 - Marcação padronizada dos filhotes destinados aos testes de desenvolvimento físico e neurológico



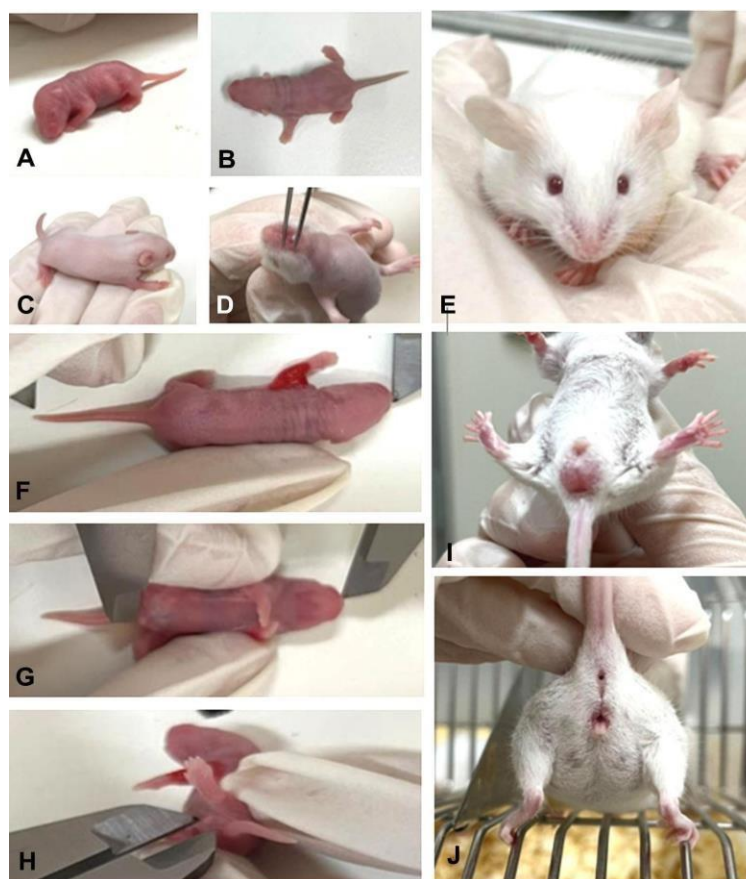
Fonte: Autores (2025).

#### 5.3.1.1- Análise do desenvolvimento Físico

As análises de desenvolvimento físico e neurológico foram realizadas no primeiro mês de vida dos neonatos e até que todos os parâmetros fossem analisados e com metodologia modificada de Castro e colaboradores (2000) que trabalharam com ratos. Para os testes de desenvolvimento físico, os filhotes foram numerados e marcados diariamente com caneta permanente, de forma

padronizada, para possibilitar o reconhecimento de cada um durante o período de experimento (figura 3). Todas as observações físicas dos filhotes foram realizadas no mesmo horário até o 30º dpn para fêmeas e 20º dpn para os machos. A presença ou ausência dos parâmetros observados foram relacionados à idade do animal, sendo cada parâmetro avaliado até todos os filhotes apresentarem resposta para o mesmo. Foram realizados os seguintes testes de desenvolvimento físico: Análise do descolamento de orelha (DO); aparecimento de pelo (AP); abertura do olho (AO); rompimento do dente incisivo superior (RIS) e inferior (RII); descida dos testículos (DT) e abertura da vagina (AV). Além disso, foram analisados a cada dois dias o ganho de peso, o crescimento naso/caudal, naso/anal e anus/genital destes filhotes, até que houvesse, em machos, a descida dos testículos, e em fêmeas, a abertura da vagina (Figura 4).

Figura 4 – Fotografias dos parâmetros físicos analisados



Fonte: Autores (2025). Legenda: A. Animal no dia do nascimento; B. Deslocamento de orelha; C. Aparecimento de pelos; D. Rompimento dos dentes incisivos; E. Abertura dos olhos; F. Descida dos testículos; G. Abertura da vagina; H. Medida da distância naso/caudal; I. Medida da distância naso/anal; J. Medida da distância anus/genital.

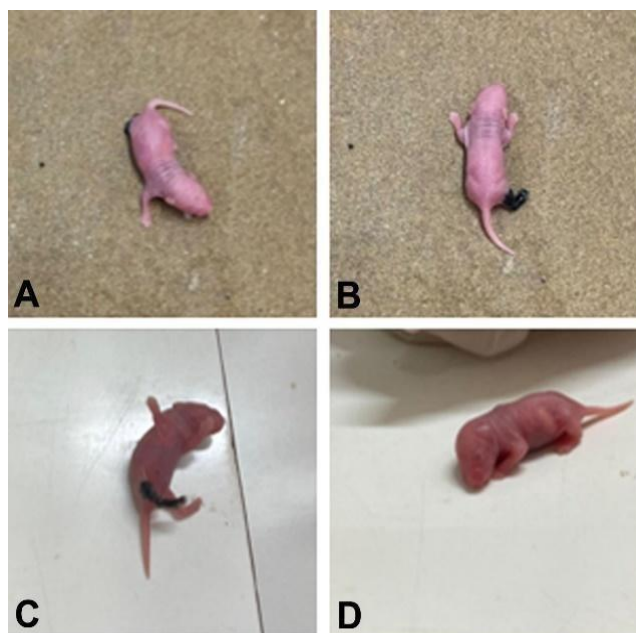
### 5.3.1.2 Testes de reflexos neurológicos

Os testes de desenvolvimento neurológico (figura 5), foram realizados nas mesmas condições dos testes físico e segundo os testes realizados por Castro (2006) e Davydov e colaboradores (2015) como descrito abaixo:

- Reflexo de endireitamento: o filhote foi colocado deitado em uma superfície plana em decúbito dorsal. Observou-se se em 30 segundos totais o animal consegue retornar ao decúbito ventral, com as quatro patas apoiadas na superfície.
- Geotaxia negativa: O animal foi colocado em uma rampa de superfície antiderrapante com um ângulo de 30º de inclinação, com a cabeça voltada para a parte mais baixa. Observamos o filhote por 60 segundos para analisar se ele consegue virar-se 180º, de forma a estar com a cabeça voltada para a parte mais alta da rampa.
- Sobressalto auditivo: O filhote foi exposto a um som alto e estridente e observamos se houve percepção do som, causando um sobressalto no animal. O sobressalto indica início da atividade auditiva do filhote.

A geração parental e suas proles sobreviventes, após as análises da prole, foram submetidas à eutanásia utilizando overdose de solução anestésica e analgésica contendo Cetamina, Xilazina e Buprenorfina em salina.

Figura 5 – Fotografias dos testes de reflexo neurológico da prole



Fonte: Autores (2025). Legenda: A, B. Filhote executando teste de geotaxia negativa, iniciando com a cabeça voltada para parte baixa da rampa e, finalizando depois de uma volta de 180°, com a cabeça para a parte alta da rampa. C, E. Filhote desempenhando o teste de reflexo de endireitamento, sendo colocado em decúbito dorsal, com habilidade para se endireitar em decúbito ventral.

#### 5.4 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por meio de análise da variância (ANAVA). Quando os pré-supostos de normalidade e de homocedasticidade não foram satisfeitos, foi aplicado um teste não paramétrico. Quando analisados os efeitos de duas variáveis independentes (categóricas) sobre uma variável dependente (contínua) foi aplicado o teste ANAVA de dois fatores (two-way). Os testes paramétricos ou não paramétricos foram seguidos de pós-testes de múltiplas comparações. Todas as análises estatísticas e gráficos foram gerados utilizando o software Graphpad Prism 9 (San Diego, CA, USA) com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ ).

## 6.RESULTADOS

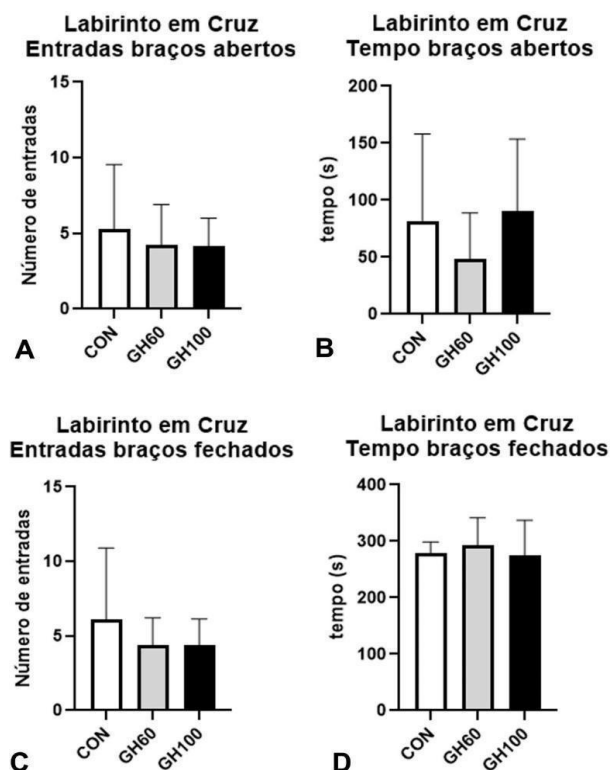
Os resultados obtidos nos experimentos detalhados no item anterior estão descritos abaixo:

### 6.1 Análises comportamentais das fêmeas prenhez

#### 6.1.1 Análise do comportamento do Tipo Ansioso

Nossas análises com fito de investigação do comportamento ansioso em animais tratados com 2,4-D, demonstraram um número aparentemente alterado de entradas nos braços abertos (CON=5,25 x GH60=4,25,  $p=0,7989$ ) e fechados (CON=6,125 x GH60=4,375,  $p=0,5120$ ), concomitante à uma diminuição no tempo nos braços abertos (CON=81,97 x GH60=48,81,  $p=0,5396$ ) em animais tratados com o pesticida (figura 6) . No entanto, como observado nos valores de significância (p), esses resultados não foram confirmados pelos testes estatísticos.

Figura 6. Gráficos relacionados ao teste para verificação de comportamento do tipo ansioso (labirinto em cruz).

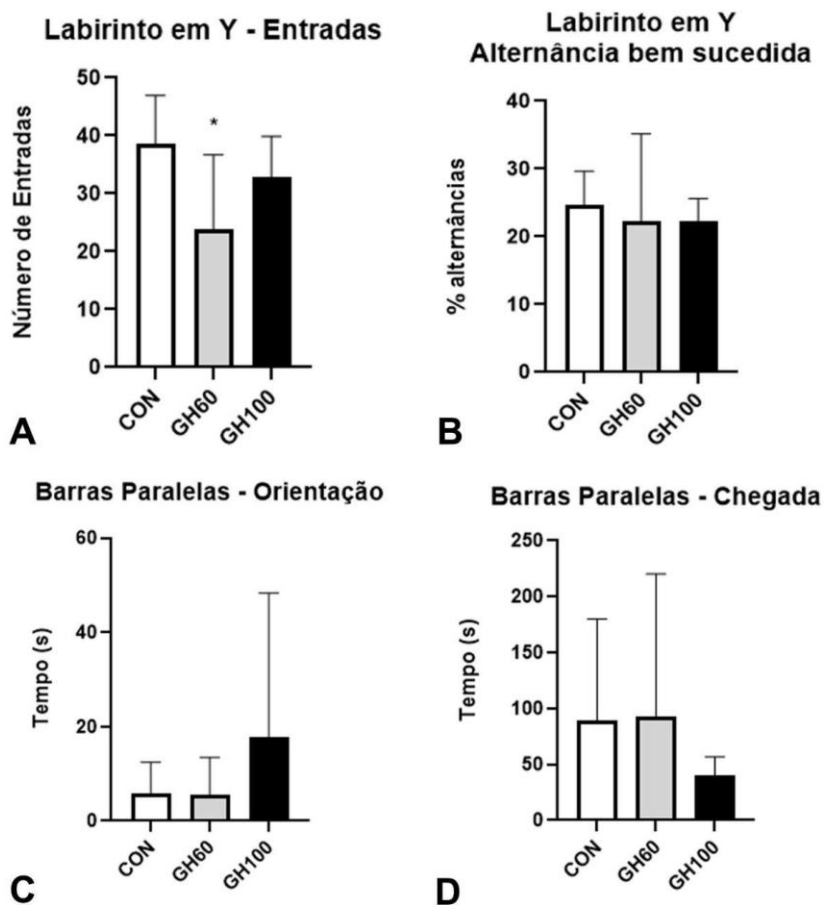


Fonte: Autores (2025). Legenda: A. entrada nos braços abertos. B. Tempo nos braços abertos. C. Entrada nos braços fechados. D. Tempo nos braços fechados. Anava e teste de múltiplas comparações de Tukey.

### 6.1.2 Análise do Aprendizado Espacial e Memória e do Equilíbrio e Coordenação Motora

As análises utilizando o labirinto em Y e as barras paralelas não demonstraram resultados estatisticamente significativos, com exceção do parâmetro número de entradas nos braços do labirinto em Y no grupo GH60 (figura 7). Nesses animais foi estatisticamente reduzido o número de entradas em relação ao controle (CON=38,63 x GH60=23,88,  $p=0,0171$ ).

Figura 7 - Gráficos relacionados ao Aprendizado Espacial e Memória (labirinto em Y) e equilíbrio e coordenação motora (barras paralelas).

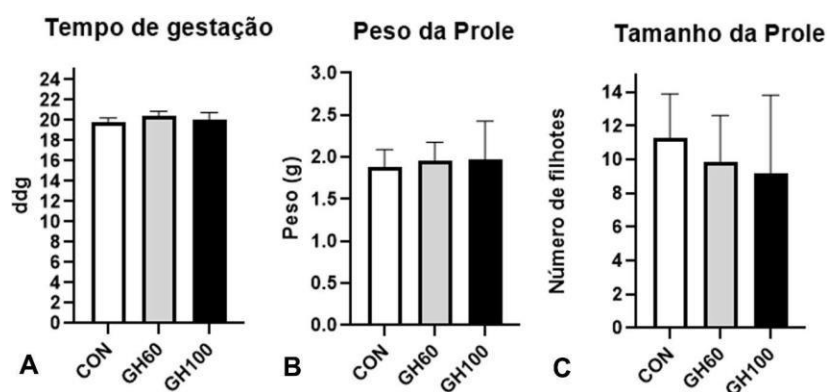


Fonte: Autores (2025). Legenda: A. Número de entradas nos braços do labirinto em Y. B. Alternâncias bem sucedidas no labirinto em Y. C. Tempo para orientação nas barras paralelas. D. Tempo de chegada à extremidade nas barras paralelas. Anava e teste de múltiplas comparações de Tukey.

## 6.2 Análise do tempo de gestação e da prole ao nascer

Em nossos estudos analisamos o tempo de gestação e a prole ao nascer nos parâmetros número de filhotes (tamanho da prole) e peso dos filhotes ao nascer. Essas análises revelaram que o tratamento com 2,4-D não foi capaz de causar mudanças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ) no tempo de gestação, bem como, no peso e tamanho da prole ao nascer (figura 8).

Figura 8 - Gráficos relacionados às análises do tempo de gestação e da prole ao nascer



Fonte: Autores (2025). Legenda: A. Tempo de gestação. B. Peso dos filhotes ao nascer (peso da prole). C. Número de filhotes ao nascer (tamanho da prole). Para o tempo de gestação e peso da prole foi usado Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste de múltiplas comparações de Dunn's. Para o tamanho da prole foi usado ANAVA e teste de múltiplas comparações de Tukey.

## 6.3 Testes de desenvolvimento físico

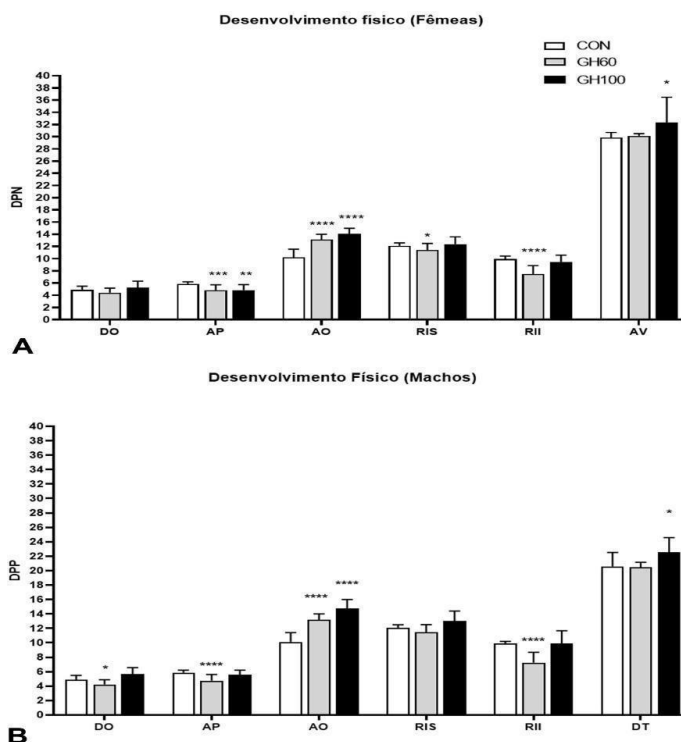
Após a padronização da prole realizada no 1º dpp, cada um dos filhotes machos e fêmeas, foram avaliados a cada dois dias em parâmetros que marcam o desenvolvimento físico da prole. Vários destes parâmetros foram alterados significativamente na prole macho e fêmea de mães tratadas com o pesticida 2,4-D durante a gestação (figura 9).

O descolamento da orelha (DO) em fêmeas do grupo GH60 e GH100 ocorreu em tempo similar ao dos animais do grupo controle (CON=4,86 dpp; GH60=4,42 dpp; GH100=5,23 dpp;  $p>0,999$ ). O tempo de aparecimento de pelos (AP), por sua vez, foi menor em filhotes fêmeas do grupo GH60 (4,85 dpp;  $p=0,0002$ ) e GH100 (4,84 dpp;  $p=0,0017$ ) quando comparados ao controle (5,86 dpp). O tempo para abertura da orelha destes filhotes (AO), no entanto, foi maior nos animais tratados com 2,4-D (GH60=13,14 dpp;  $p=0,0002$  e GH100=14,08 dpp;  $p=0,0017$ ) em relação ao controle (10,21 dpp). Quanto ao rompimento dos incisivos superior (RIS) e inferior (RII) esses ocorreram antes em animais do grupo GH60 (GH60-RIS=11,42 dpp;  $p=0,0451$  GH600=RII= 7,47

dpp;  $p=0,0001$ ) que em animais controle (COM-RIS=12,13 dpp e COM-RII=9,95 dpp). Finalmente, em filhotes fêmeas a abertura da vagina aconteceu mais tardiamente ( $p=0,0380$ ) em animais do grupo GH100 (32,3 dpp) em relação ao controle (29,8 dpp).

Em filhotes machos, por sua vez, o descolamento da orelha aconteceu precocemente ( $p=0,0116$ ) em animais do grupo GH60 (4,21 dpp) em relação ao controle (4,9 dpp). Nos mesmos filhotes machos (4,73 dpp) o aparecimento de pelos foi precoce ( $p=0,0001$ ) em relação ao controle (5,87 dpp). A abertura dos olhos nos filhotes machos ocorreu tardiamente nos grupos GH60 (13,17 dpp  $p=0,0001$ ) e GH100 (14,72 dpp;  $p=0,0001$ ) em relação ao controle (10,12 dpp). Nesses filhotes machos apenas nos do grupo GH60 os incisivos inferiores romperam precocemente (7,2 dpp;  $p=0,0001$ ) em relação aos controles (9,87 dpp). Interessantemente, a exemplo do ocorrido no parâmetro abertura da vagina em fêmeas, a descida dos testículos ocorreu tardiamente ( $p=0,0444$ ) em animais do grupo GH100 (22,54 dpp) quando comparado ao controle (20,58 dpp).

Figura 9 - Gráficos referentes aos testes no desenvolvimento físico da prole



Fonte: Autores (2025). Legenda: A. desenvolvimento dos filhotes fêmeas. B. desenvolvimento dos filhotes machos. Descolamento da orelha (DO). Aparecimento de pelos (AP). Abertura dos olhos (AO). Rompimento do incisivo superior (RIS). Rompimento do incisivo inferior (RII). Abertura da Vagina (AV). descida dos testículos (DT). Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste de múltiplas comparações de Dunn`s.

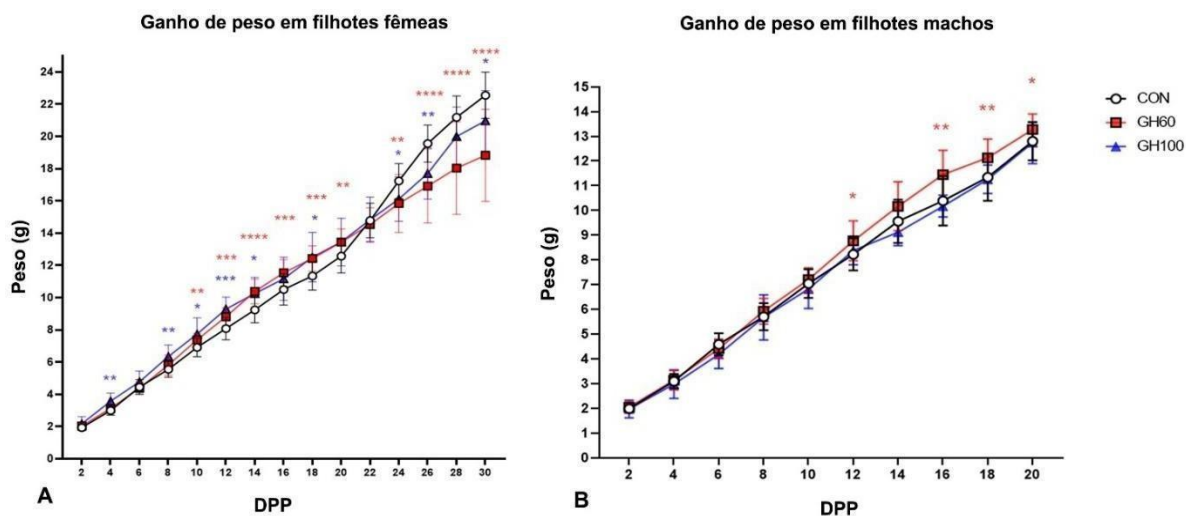
### 6.3.1 Análise de ganho de peso dos filhotes

O ganho de peso dos filhotes foi monitorado a cada dois dias. Os filhotes fêmeas e machos de mães tratadas com 2,4-D apresentaram curvas de ganho de peso significativamente diferentes das curvas dos filhotes de mães controle (figura 10). Em filhotes fêmeas dos grupos GH60 e GH100 os pesos eram maiores que os do grupo controle do 10º dpp (GH60=7,37g;  $p=0,0056$ . GH100=7,73 G;  $p=0,0273$ . COM= 6,9 g) até o 18º dpp (GH60=12,41g;  $p=0,0002$ .

GH100=12,5 G;  $p=0,0424$ . COM= 11,34 g ). Curiosamente, os pesos dos filhotes de todos os grupos foram semelhantes no 22º dpp (GH60=14,53 g;  $p=0,6408$ . GH100= 14,82;  $p=0,9931$  e COM=14,78g). A partir do 24º dpp, os filhotes de mães tratadas com 2,4-D tiveram pesos menores que os filhotes de mães controle (GH60=15,83 g;  $p=0,005$ . GH100= 16,11 g;  $p=0,0385$ . COM=17,23g). O peso desses filhotes de mães submetidas ao 2,4-D continuou significativamente menor que os dos filhotes controles até o 30º dpp (GH60=18,82 g;  $p=0,0001$ . GH100= 20,96 g;  $p=0,0302$ . COM=22,55 g).

Quanto aos filhotes machos, esses tiveram seus pesos aferidos apenas até o 20º dpp. E assim como os filhotes fêmeas, os filhotes machos de mães do grupo GH60 tiveram peso significativamente maior até o 20º dpp (GH60=13,27g. COM=12,23g  $p=0,048$ ). Não foram identificadas alterações significativas no ganho de peso dos filhotes machos do grupo GH100 ( $p=0,96$ ) até o 20 dpp.

Figura 10 - Gráficos referentes às análises do ganho de peso de filhotes machos e fêmea



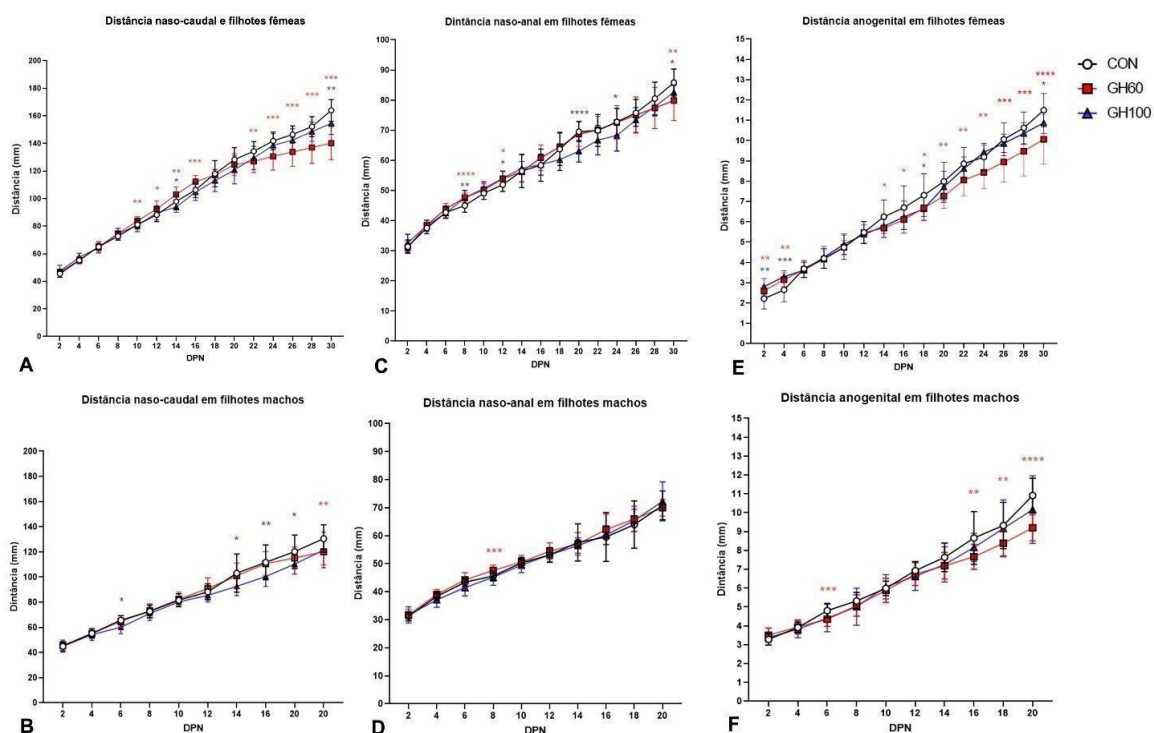
Fonte: Autores (2025). Legenda: A. Ganho de peso em fêmeas. B. Ganho de peso em machos. ANAVA de dois fatores (two-way) seguido de teste de múltiplas comparações de Dunnett's.

### 6.3.2 Análise do crescimento da prole

O crescimento da prole fêmea e macho foi aferido por meio de medição naso-caudal, naso-anal e anogenital. Nesse estudo as fêmeas foram analisadas até o 30° dpp, enquanto os machos até o 20° dpp.

A análise das curvas de crescimento naso-caudal, naso-anal e anogenital de filhotes fêmeas (figura 11) vai de encontro aos resultados obtidos no ganho de peso destes filhotes (figura 10), nas quais pode ser notado um crescimento maior de filhotes e mais tratadas com 2,4D até por volta do 18° e 20° dpp. Após esse período começa a ser notado um menor crescimento significativo nesses filhotes fêmeas que pode ser observado até o 30° dpp em todos os parâmetros de crescimento analisados, incluindo o comprimento nos-caudal (GH60=140,16 mm;  $p=0,0001$ . GH100=154,53 mm;  $p=0,0047$ . COM=163,99 mm). Resultados semelhantes foram observados nas análises de crescimento da prole macho, em que os filhotes do grupo CH60 se encontraram menores em tamanho no 20° dpp quando comparados aos controles como demonstrado, por exemplo, no parâmetro anogenital destes filhotes (GH60= 9,2 mm. COM= 10,91.  $p=0,0001$ ).

Figura 11 - Gráficos referentes à análise do crescimento da prole fêmea e macho



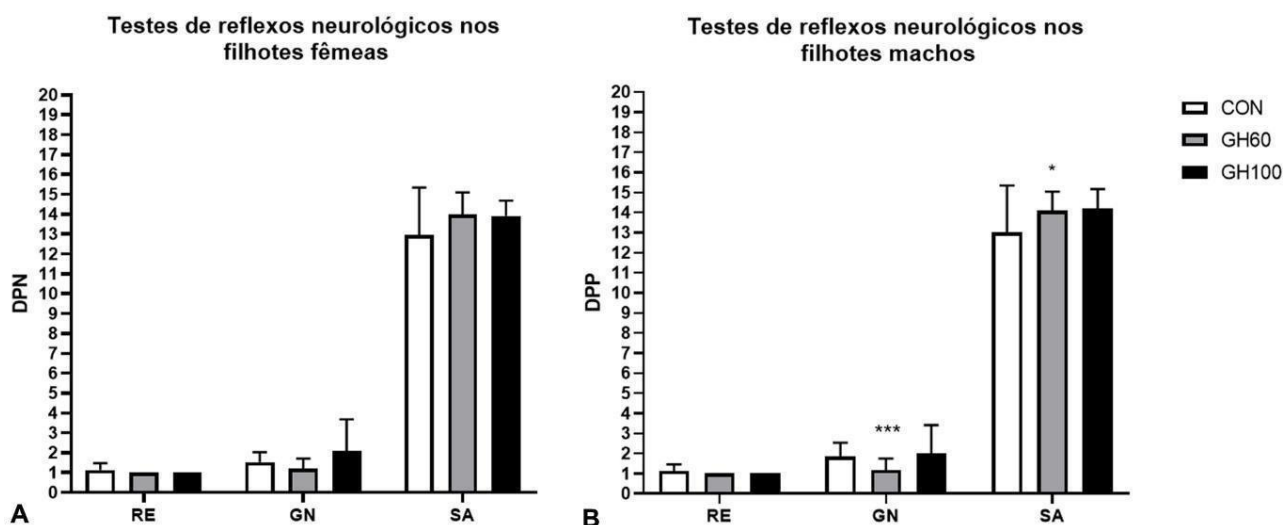
Fonte: Autores (2025). Legenda: A e B. Crescimento naso-caudal em fêmeas e machos respectivamente. C e D. Crescimento naso-anal em fêmeas e machos respectivamente. E e F. crescimento anogenital em fêmeas e machos respectivamente. ANAVA de dois fatores (two-way) seguido de teste de múltiplas comparações de Dunnett's.

## 6.4 Testes de reflexo neurológico

Os reflexos neurológicos avaliados incluíram o reflexo de endireitamento, geotaxia negativa e sobressalto auditivo. Os filhotes dos grupos expostos ao 2,4-D demonstraram um atraso no desenvolvimento desses reflexos, com latências maiores para a execução dos movimentos, o que sugere um comprometimento no amadurecimento do sistema nervoso.

Não foram identificadas alterações nos reflexos neurológicos em qualquer um dos três testes em filhotes fêmeas de mães dos grupos GH60 e GH100. No entanto, os filhotes machos de mães do grupo GH60 desempenharam precocemente a geotaxia negativa em relação aos controles (GH60= 1,17 dpp. COM= 1,83 dpp.  $p=0,0005$ ). Além disso, tais filhotes machos atrasaram para efetuar o sobressalto auditivo em comparação aos respectivos controles (GH60= 14,08 dpp. COM= 13 dpp.  $p=0,0317$ ).

Figura 12 - Gráficos referentes ao estudo do desenvolvimento neurológico da prole



Fonte: Autores (2025). Legenda: A. Testes da reflexo neurológico em fêmeas. B. Testes de reflexo neurológico em machos. Reflexo de endireitamento (RE). Geotaxia negativa (GN). Sobressalto auditivo (SA). Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste de múltiplas comparações de Dunn's.

## 7.DISCUSSÃO

Em nossos estudos, os camundongos prenhes foram submetidos no 10º ddg à três testes comportamentais que visaram o diagnóstico de comportamento do tipo ansioso, bem como, de perdas no aprendizado espacial, memória e do equilíbrio e coordenação motora. Os animais tratados com 2,4-D e submetidos à essa análise etológica não apresentaram alterações nos parâmetros investigados, com exceção de uma diminuição no número de entradas no braços do labirinto em Y em animais do grupo GH-60. Um estudo precursor utilizando 2,4-D marcado com carbono 14 (Elo HA e Ylitalo P, 1979) demonstrou um acúmulo preferencial de 2,4-D no tronco encefálico, cerebelo e córtex frontal de ratos. No entanto, outros estudos demonstraram que o tratamento dérmico com 2,4-D não causou consequências neuropatológicas em ratos (Mattsson JL *et al*, 1986) e as maiores alterações comportamentais observadas em ratos após o tratamento com 2,4-D notadas no aparelho de campo aberto foram a redução em parâmetros locomotores e na atividade motora (Oliveira e Palermo, 1993). Nossos resultados, no estudo comportamental de camundongos prenhes, portanto, corroboram os achados de Mattsson *et al* (1996) e Oliveira e Palermo já que o único parâmetro que sofreu alteração em nossos estudo em animais tratados com 2,4-D foi o número de entradas no labirinto em Y, que pode indicar um prejuízo na atividade locomotora destes animais.

Todas as fêmeas prenhes submetidas às análises comportamentais foram retornadas às suas gaiolas e mantidas até o parto. Após o parto registramos o tempo de gestação, avaliamos o número e peso dos filhotes das proles ao nascer. Nessa análise não foram encontradas modificações na prole ao nascer de camundongos submetidos ao tratamento com 2,4-D. Trabalhos iniciais em ratas, indicaram uma diminuição no tamanho da ninhada e no peso fetal, além de malformações esqueléticas (Schwetz *et al.*, 1971; Khera e McKinley, 1972), enquanto dados mais recentes indicaram que o herbicida somente produz efeitos adversos nos fetos de ratas em concomitância com toxicidade materna em doses acima de 90 mg/kg/dia (Charles *et al.*, 2001), sem que parâmetros reprodutivos, como número de implantações uterinas ou reabsorções, fossem alterados. Por outro lado, Cavieres *et al.* (2002) observaram uma diminuição no tamanho da ninhada em camundongos que receberam doses crescentes de uma formulação comercial contendo uma mistura de 2,4-D e outros herbicidas derivados de ácidos fenólicos e acéticos durante a organogênese. Em doses mais baixas, uma redução no número de sítios de implantação explicou a diminuição no tamanho da ninhada. Em trabalho recente de nosso laboratório (dados não publicados) foi demonstrado que o 2,4-D nas dosagens de 60, 100 e 200 mg/Kg durante a gestação de

camundongos não causou diminuição no número dos sítios de implantação no útero do 10º ddg e 15º ddg, mas provocou o aparecimento de áreas hemorrágicas nesses sítios observadas macro e microscopicamente.

Com o fito de analisar os efeitos da administração materna do 2,4-D sobre a qualidade e desenvolvimento dos filhotes, realizamos a análise temporal do desenvolvimento físico, no ganho de peso e aqueles referentes ao crescimento da prole.

Interessantemente, apesar da falta de efeitos contundentes no comportamento das fêmeas prenhes expostas ao pesticida, muitas foram as alterações observadas em seus filhotes fêmeas e machos durante o desenvolvimento inicial. A maioria das alterações no desenvolvimento físico observadas em filhotes fêmeas foi também observada nos machos. Alguns parâmetros como aparecimento de pelos, descolamento das orelhas, rompimento do incisivo superior e inferior ocorreram precocemente, enquanto outros como abertura dos olhos e abertura da vagina e descida dos testículos ocorreram tardiamente em animais com mães tratadas com 2,4-D. Quanto ao ganho de peso, filhotes machos e fêmeas tiveram menor ganho de peso em dias pós-parto mais adiantados, concomitante ao atraso no crescimento em tamanho dos filhotes de mães tratadas com o pesticida até o 10º ddg. Marty *et al* (2013) demonstraram que o 2,4 D, em ratos, diminuiu o ganho de peso da prole quando administrado em machos e fêmeas em período pré-acasalamento, bem como, durante a lactação. Esses autores, revelaram ainda uma diminuição no peso de testículos, bem como, um atraso na separação prepucial nos filhotes machos. Em trabalho recente (Inversen *et al*, 2026) foi demonstrado que a exposição pré-natal de mulheres ao 2,4-D foi capaz de causar alterações no eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal (HPG) em suas filhas, diagnosticado por uma diminuição nos níveis de hormônio luteinizante (LH) nessas meninas. Sendo assim, nossos resultados da análise do desenvolvimento físico da prole de animais tratados com 2,4-D revelam o impacto que esse pesticida pode ter no desenvolvimento físico inicial da prole, com efeitos significativos até mesmo em parâmetros reprodutivos como abertura da vagina e descida dos testículos, que são marcos do desenvolvimento sexual de camundongos controlados pelo eixo HPG (Spinedi, *et al*. 1997).

Bortolozzi *et al* (1999) demonstraram que a exposição neonatal de ratos do mesmo sexo ao 2,4-D causou atraso no reflexo de endireitamento e a geotaxia negativa, além de causar anormalidades motoras, comportamentos estereotipados (limpeza excessiva e movimentos verticais da cabeça) e hiperatividade no campo aberto. No presente estudo, concomitantemente às análises do desenvolvimento físico, foram também realizados testes de reflexo neurológico nas proles dos camundongos. Essa análise revelou que apenas os filhotes machos tiveram alterações

significativas no teste da geotaxia negativa e do sobressalto auditivo.

A exposição ao ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) tem vários efeitos deletérios no sistema nervoso, como alterações nas concentrações de neurotransmissores no cérebro e/ou mudanças comportamentais, taxa de mielinização, padrão de gangliosídeos (Bortolozzi, *et al.* 2002).

Sturtz *et al* (2008) trataram ratas mães do 1º ao 7º dpp com ração contendo 2,4D. Esses autores relataram alterações no comportamento materno dessas ratas, especialmente naqueles relacionados à amamentação como a redução no ato de buscar, agachamento e lambedura dos filhotes, acompanhadas de diminuição dos níveis séricos de prolactina e de monoaminas no núcleo accumbens (NAC) nestas mães.

Portanto, é possível que as alterações diagnosticadas em nossos estudos no desenvolvimento físico e talvez neurológico da prole de mães submetidas ao 2,4-D até o 10º ddg se devam, pelo menos em parte, a uma provável alteração no comportamento materno nessas mães, parâmetros esses que não foram avaliados durante nossas análises.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O 2,4-D apenas alterou o número de entradas das fêmeas prenhes nos braços do labirinto em Y, sugerindo seu efeito na diminuição na capacidade motora destes animais durante a gestação.
- Esse pesticida não alterou o tempo de gestação, o número e o peso dos filhotes ao nascer.
- O tratamento de camundongos prenhes com 2,4-D alterou o desenvolvimento físico, o peso e o crescimento inicial de filhotes, fêmeas e machos.
- 2,4 D foi capaz de atrasar a abertura da vagina e a descida dos testículos da prole de mães tratadas, sugerindo um atraso na maturação sexual nesses filhotes.
- O pesticida 2,4 D alterou significativamente parâmetros de dois testes do desenvolvimento em filhotes machos. Esse efeito não foi confirmado estatisticamente em filhotes fêmeas.
- O conjunto de achados nesse estudo efetuado como trabalho de conclusão de curso da graduação em ciências biológicas bacharelado, demonstraram que embora não tenham sido diagnosticadas grandes modificações etológicas em camundongos prenhes submetidos às duas diferentes concentrações de 2.4-D, seus efeitos deletérios sobre a prole destes animais revelaram o potencial tóxico deste pesticida sugerindo fortemente que seu uso amplo em países como o Brasil oferece grande risco para humanos e reforçam a importância de revisões periódicas sobre os limites de exposição a este herbicida, bem como, a realização de novos estudos que investiguem seus mecanismos de ação toxicológico em modelos gestacionais.

## REFERÊNCIAS

- AMARANTE JUNIOR, O. P. *et al.* Revisão das propriedades, usos e legislação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). **Caderno de Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão**, v. 13, n. 1, p. 60-70, 2002.
- BLAIR, A. Cancer among farmers: a review. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**, 2001.
- BORTOLOZZI, A. A.; DUFFARD, R. O.; EVANGELISTA DE DUFFARD, A. M. Behavioral alterations induced in rats by a pre- and postnatal exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 21, n. 4, p. 451-465, 1999.
- BORTOLOZZI, A.; DUFFARD, R.; ANTONELLI, M.; EVANGELISTA DE DUFFARD, A. M. Increased sensitivity in dopamine D2-like receptors from 2,4-D exposed and amphetamine-challenged rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 965, p. 314-323, 2002.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Reavaliação toxicológica – Agrotóxico 2,4-D passa a ter restrições na aplicação. 2019.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RE n. 2.636, de 19 de dezembro de 2018. Estabelece os limites máximos de resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 dez. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 284, de 21 de maio de 2019. Dispõe sobre a manutenção do ingrediente ativo ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em produtos agrotóxicos no país. Brasília, 2020.
- CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1193-1205, 2005.
- CASTRO, V. L.; CHIORATO, S.; PINTO, N. Relevance of developmental testing of exposure to methamidophos during gestation to its toxicology evaluation. **Toxicology Letters**, v. 118, n. 1-2, p. 93-102, 2000.
- CAVIERES, M.F., JAEGER, J. PORTER, W. Developmental toxicity of a commercial herbicide mixture in mice: effects on embryo implantation and litter size. **Environ. Health Perspect.** 110, 1081– 1085. 2002.
- CHARLES, J.M., *et al.* Developmental toxicity studies in rats and rabbits on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its forms. **Toxicology Science.** 60, 121–131. 2001.
- CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 11-23, 2007.
- COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UFABC. Como calcular o número de animais (n).
- DAVYDOV, D. M. *et al.* Neurodevelopment and phenotype-modulating functions of S100B protein: a pilot study. **Physiology & Behavior**, v. 140, p. 188-196, 2015.

DUKE, S. O. *et al.* Glyphosate, paraquat, and paraquat mixtures depress mitochondrial function in isolated rat liver mitochondria: implications for Parkinson's disease. **Environmental Health Perspectives**, 2018.

ELO, H. A.; YLITALO, P. Distribution of 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid and 2,4-D in male rats: evidence for CNS involvement. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 51, p. 439-446, 1979.

EPA. *2,4-D RED* – Reregistration Eligibility Decision. United States Environmental Protection Agency, 2005.

FILE, S. E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. **Behavioural Brain Research**, v. 125, p. 151-157, 2001.

FREITAS, L. M. *et al.* Animal models in the neurotoxicology of 2,4-D. **Human & Experimental Toxicology**, v. 38, n. 10, p. 1178-1182, 2019.

GREEN, J. M. *et al.* Pesticide drift into aquatic ecosystems: a review. **Journal of Experimental Agriculture International**, 2012.

GUERRA, J. F. Remoção do herbicida 2,4-D no tratamento convencional de água e adsorção em carvão ativado. 2014. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)** – Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.

HARPER, A. *et al.* Efeitos da exposição subletal ao 2,4-D na corticosterona e na função imunológica em sapos americanos juvenis. **Poluição Ambiental**, 2019.

IVERSEN AP, *et al.* Prenatal exposure to the pesticides chlorpyrifos and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid is associated with circulating levels of reproductive hormones in healthy infant girls. **Reproductive Toxicology**. 139: 109112. 2026.

JONES, S.; BAKER, O. Animal models in neurodevelopmental research. **Behavioral Science Review**, v. 29, n. 3, p. 78-91, 2021.

KINNEY, C. A. *et al.* Aquatic concentrations of chemical analytes compared with ecotoxicity estimates. **Science of the Total Environment**, 2015.

KHERA, K.S., MCKINLEY, W.P. Pre-and postnatal studies on 2,4,5- trichlorophenoxy acid, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and their derivatives in rats. **Toxicology Applied Pharmacology**. 22, 14–28. 1972.

KOH, Y. K. K. *et al.* Emerging adsorbents and demand for defluoridation: future perspectives. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 2016.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 180-185, 1987.

LIU, W. *et al.* Ecological risk assessment of chlorophenoxy herbicides in aquatic ecosystems in China. **Ecotoxicology**, 2014.

MARTINS, R. X. Herbicida ácido 2,4-D: efeitos no desenvolvimento e estresse oxidativo em zebrafish. 2021. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba, 2021.

MARTY, M. S. *et al.* An F1-extended one-generation reproductive toxicity study with 2,4-D in rats. **Toxicological Sciences**, v. 136, n. 2, p. 527-547, 2013.

MATTSSON, J. L.; JOHNSON, K. A.; ALBEE, R. R. Lack of neuropathologic consequences of repeated dermal exposure to 2,4-D in rats. **Toxicology**, v. 6, p. 175-181, 1986.

OLIVEIRA, R. J. 2,4-D: polêmico desde sempre, imprescindível como nunca. **Revista Cultivar**, 2017.

OLIVEIRA, G. H.; PALERMO-NETO, J. Effects of 2,4-D on open-field behaviour and neurochemical parameters in rats. **Pharmacology & Toxicology**, v. 73, p. 79-85, 1993.

RIDGWAY, W.; COOK, M. The use of rodents in biomedical research. **Journal of Biomedical Research**, v. 34, n. 2, p. 134-145, 2019.

SCHWETZ, B.A., SPARSCHU, G.L. GEHRING, P.J. The effect of 2,4- D on rat embryonal, foetal and neonatal growth and development. **Food and Chemical Toxicology**. 9, 801–817. 1971.

SPINEDI E, *et al.* Sexual dimorphism in the mouse hypothalamic-pituitary-adrenal axis function after endotoxin and insulin stresses during development. **Neuroimmunomodulation**. 2:77-83. 1997.

STURTZ, N. *et al.* Effect of 2,4-D on rat maternal behavior. **Toxicology**, v. 247, p. 73-79, 2008.

US EPA. **Re-registration Eligibility Decision (RED): 2,4-D**. EPA-738-R-05-002, 2005.

## ANEXO 1 - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO CEUA DA UNIFAL/M



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
 Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG  
 Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005



Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

# Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **ESTUDO MORFOLÓGICO, ESTEREOLÓGICO E COMPORTAMENTAL DOS EFEITOS DO CONSUMO DE 2,4-D (DICLOROFENOXIACÉTICO) EM CAMUNDONGOS PRENHES E NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DA PROLE**, registrada com o nº **0049/2023**, sob a responsabilidade de **Valdemar Antônio Paffaro Júnior**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **03/06/2024 a 06/07/2026**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Camundongo / Swiss	90	18	72	Biotério central da universidade federal de alfenas

Alfenas, 23 de Abril de 2024

**Prof(a). Dr(a). Lisandra Brandino de Oliveira**  
 Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/ceua/autenticidadecertificado/> e digite a chave: 3cdaab09c8e04588c44b0495f0b4291c