



Toxicidade de inseticida agrícola em bioensaio com *Artemia salina*

Agricultural insecticide toxicity in bioassay with *Artemia salina*

E. A. Lustosa^{1*}; M. A. N. De Sousa¹; T. L. De Oliveira¹; J.G. de S. Pereira¹; F. V. A. Nobrega²

¹Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Campina Grande, 58708-110, Patos-Paraíba, Brasil

²UNIFIP – Centro Universitário de Patos, Brasil, 58.704-440, Patos-Paraíba, Brasil

*elianelustosa18@hotmail.com

(Recebido em 14 de dezembro de 2022; aceito em 04 de maio de 2023)

Os inseticidas são agrotóxicos utilizados para controlar insetos prejudiciais às plantações agrícolas. Entretanto, o uso exacerbado de agrotóxicos pode resultar em efeitos tóxicos à saúde humana e inúmeros impactos socioambientais. Diferentes ensaios de toxicidade podem ser utilizados para analisar o efeito tóxico de determinadas substâncias. Dentre eles, o bioensaio com *Artemia salina* é considerado um teste rápido, confiável e de custo acessível, quando comparado a testes em outros modelos animais, como mamíferos. O objetivo com esse estudo foi avaliar o potencial tóxico do inseticida agrícola ciromazina utilizando o microcrustáceo *A. salina*. Os náuplios permaneceram em contato com a substância teste diluída em solução de água salina, em concentrações decrescentes a partir da dose usual, e o controle negativo ocorreu apenas em solução salina. O experimento foi realizado em triplicata, e após 24 e 48 horas de exposição foram contabilizadas as larvas sobreviventes, sendo calculada, por meio de análise estatística, a toxicidade aguda, a Concentração Letal Média (CL₅₀) e a relação dose-resposta. O inseticida foi considerado tóxico, e a toxicidade aguda foi maior após 48 horas de exposição. Além disso, foi possível observar uma relação dose-resposta, entre as concentrações e a mortalidade dos organismos expostos. Assim, é importante destacar que é fundamental o monitoramento dos efeitos tóxicos desse inseticida, considerando que é um produto bastante utilizado no âmbito agrícola.

Palavras-chave: agrotóxico, ciromazina, toxicologia.

Insecticides are pesticides used to control insects that are harmful to agricultural crops. However, the excessive use of pesticides may result in toxic effects on human health and numerous socio-environmental impacts. Different toxicity assays can be used to analyze the toxic effect of certain substances. Among them, the *Artemia salina* bioassay is considered a rapid, reliable, and cost-effective test when compared to tests on other animal models, such as mammals. The objective of this study was to evaluate the toxic potential of the agricultural insecticide cyromazine using the microcrustacean *A. salina*. The nauplii remained in contact with the test substance diluted in saline water solution, in decreasing concentrations from the usual dose, and the negative control occurred only in saline solution. The experiment was performed in triplicate, and after 24 and 48 hours of exposure, the surviving larvae were counted, and acute toxicity, the median lethal concentration (CL₅₀), and the dose-response relationship were calculated through statistical analysis. The insecticide was considered toxic, and acute toxicity was higher after 48 hours of exposure. Additionally, a dose-response relationship was observed between the concentrations and the mortality of the exposed organisms. Thus, it is important to emphasize that monitoring the toxic effects of this insecticide is essential, considering that it is a widely used product in the agricultural industry.

Keywords: pesticides, cyromazine, toxicology.

1. INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são substâncias utilizadas para eliminar, repelir ou controlar pragas. Esses compostos são bastante usados na agricultura para proteger as lavouras de insetos, plantas daninhas e doenças causadas por fungos e para evitar a contaminação dos alimentos no processo de armazenamento. Além disso, podem ser usados para controlar vetores e insetos nocivos responsáveis pela transmissão de doenças [1].

O uso de agrotóxicos se consolidou principalmente após a Segunda Guerra Mundial, no século XX. Esses compostos integraram o pacote tecnológico apresentado pela Revolução Verde como uma possível solução para o combate da fome no mundo [2]. Desde então, o uso dessas substâncias tem aumentado consideravelmente com o intuito de atender a grande demanda por alimentos, resultando em impactos ao meio ambiente e à saúde humana [3].

Os agrotóxicos podem ser dispersos no ambiente causando a contaminação do solo, dos recursos hídricos e da biota [4]. Esses compostos podem causar efeitos à saúde dos trabalhadores agrícolas expostos a riscos ocupacionais, dos moradores de áreas rurais próximas às plantações e também dos consumidores de alimentos contendo resíduos dessas substâncias [5].

Os agrotóxicos podem ainda ser classificados de diferentes formas, incluindo o tipo de praga a que são destinados. Entre os vários tipos de agrotóxicos existentes, os inseticidas são compostos utilizados para matar insetos, empregados especialmente para controlar pragas em plantações e/ou eliminar insetos transmissores de doenças [6].

Os inseticidas podem ser divididos em: sintéticos orgânicos, sintéticos inorgânicos, botânicos e agentes biológicos, sendo que, os herbicidas e inseticidas do grupo das triazinas respondem por cerca de 30% da produção anual de pesticidas. Pertencente a este grupo químico, o inseticida ciromazina (N-cyclopropyl-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine), é um regulador do crescimento de insetos que atua principalmente no controle de dípteros [7]. Serve para controlar pragas em cultivos de frutas, vegetais e plantas ornamentais [8]. E também é utilizado em ração animal para inibir o crescimento de larvas, e têm atraído bastante atenção dos pesquisadores devido aos potenciais perigos aos seres humanos e ao meio ambiente, pois ele pode ser metabolizado durante reações de desalquilação, que podem ocorrer em plantas, animais e /ou no meio ambiente, e formar um composto tóxico denominado melamina [9].

Para analisar os efeitos tóxicos de determinadas substâncias no ambiente podem ser utilizadas como ferramentas os denominados ensaios de toxicidade, que são importantes para a detecção e avaliação da toxicidade de determinado agente, ou seja, sua capacidade de produzir efeitos nocivos nos organismos [10].

Nos ensaios de toxicidade frequentemente são empregados animais aquáticos, incluindo o microcrustáceo de água salgada *Artemia salina*. O ensaio que utiliza esta espécie é considerado um teste rápido, confiável e de custo acessível [11]. Este organismo apresenta características intrínsecas que o tornam adequado para estudos em Ecotoxicologia [12], como: ampla distribuição geográfica, fácil cultivo, manutenção, ciclo de vida curto e produção de muitos descendentes [13]. Além disso, os cistos de *A. salina* podem permanecer dormentes por vários anos e são facilmente encontrados no comércio [14]. Os cistos, quando são submetidos a condições ambientais favoráveis, eclodem e fornecem os náuplios, que podem ser utilizados nos experimentos laboratoriais [15].

Os testes de toxicidade são ensaios laboratoriais, realizados sob condições experimentais específicas e controladas [16]; através da exposição de organismos-teste a diferentes concentrações da amostra, nos quais são observados e quantificados os efeitos tóxicos [17]. Vários organismos-modelo podem ser utilizados em testes para avaliação da toxicidade, entre eles temos o microcrustáceo *A. salina*.

Para quantificação dos efeitos tóxicos é calculada a Concentração Letal Média (CL₅₀). A CL₅₀ compreende a concentração necessária para causar a morte de 50% dos organismos expostos nas amostras do estudo [18]. É uma resposta mais reprodutível, determinada com maior nível de confiança e mais relevante para ser extrapolada para a população [19].

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade do inseticida agrícola ciromazina por meio do bioensaio com *A. salina*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa caracteriza-se como um estudo experimental com abordagem quantitativa, que avaliou a toxicidade do inseticida ciromazina utilizando o microcrustáceo *A. salina*, calculando-se o padrão dose-resposta e a Concentração Letal Média (CL₅₀). O estudo foi realizado no Laboratório de Genética e Toxicologia da Universidade Federal de Campina Grande, Centro

de Saúde e Tecnologia Rural (UFCG/CSTR). Foram utilizados cistos de *A. salina* obtidos em uma loja de artigos para aquário da cidade de Campina Grande-PB.

2.1 Substância teste

O agrotóxico utilizado no estudo foi o inseticida ciromazina (N-cyclopropyl-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine) 750 g/kg (75% m/m), vendido sob o nome comercial TRIGARD® 750 WP, adquirido em uma loja de produtos agrícolas da cidade de Teixeira-PB.

2.2 Eclosão dos cistos de *Artemia salina*

Para o processo de eclosão dos cistos de *A. salina* foi preparado 1 litro de solução salina (38 g de sal para 1 L de água destilada) e adicionado 5 g de cistos, seguindo o protocolo de Silva et al. (2013) [19] e Meyer et al. (1982) [20] com as devidas adaptações [20]. Posteriormente, o material foi colocado em um recipiente de polietileno (PET) associado a uma bomba externa de aeração [21]. O material foi mantido durante 24 horas a uma temperatura de 26 °C, sob lâmpada incandescente [19]. Após esse período, os cistos eclodiram e os náuplios foram utilizados no bioensaio. Com o auxílio de uma pipeta, 10 náuplios foram transferidos para recipientes de vidro desinfetados e previamente identificados, contendo a solução salina e as soluções das amostras testadas.

2.3 Preparação das amostras e ensaio toxicológico em *Artemia salina*

As amostras foram preparadas utilizando diluições da substância teste em solução de água salina artificial. As concentrações testadas foram preparadas em concentrações decrescentes da dosagem recomendada para uso nas culturas de crisântemo, feijão-vagem, melancia, melão, pepino, tomate e plantas ornamentais, estabelecida na bula, resultando nas seguintes concentrações finais: C1 = 150 ppm (concentração recomendada para uso), C2 = 75 ppm, C3 = 37 ppm e C4 = 18 ppm. O experimento foi acompanhado de controle negativo (CN) composto por água salina e contendo o mesmo número de náuplios, que foram submetidos ao mesmo processo de eclosão que os grupos tratados com a substância teste [19, 21].

O experimento foi realizado em triplicata, totalizando 15 recipientes com as concentrações da substância teste diluídas e o controle negativo. Em cada recipiente foram colocados 10 náuplios. Após 24 e 48 horas de exposição, foram contabilizados os náuplios sobreviventes com o auxílio de um microscópio estereoscópico e uma micropipeta, sendo considerados vivos aqueles que apresentaram algum movimento, quando colocados próximo a uma fonte de luz durante 10 segundos [11].

Os dados foram submetidos a análise estatística utilizando o software PROBIT, o qual forneceu os valores da curva dose-resposta e da Concentração Letal Média (CL₅₀) [21].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de letalidade em *A. salina* baseia-se na capacidade das substâncias bioativas em estudo causarem a morte dos microcrustáceos na fase larval, sendo importante para triagem da toxicidade geral de compostos de diferentes origens. É um ensaio simples, rápido e acessível em comparação com ensaios que utilizam outros organismos teste [22]. A espécie apresenta alta especificidade a intervenções no meio externo, assegurando resultados nítidos diante de pequenas alterações na qualidade ambiental [23].

Ciromazina é um inseticida largamente utilizado na produção e cultivo de variadas culturas e nos últimos anos, têm sido encontrados resíduos em excesso dessa substância nos alimentos [24] podendo causar prejuízos à saúde dos consumidores. Esse composto é bastante utilizado no Brasil,

sendo aplicado na forma foliar em diferentes culturas como feijão, pepino, batata, tomate, crisântemo, melancia e melão [25].

Após 24 horas de exposição dos náuplios de *A. salina* ao agrotóxico ciromazina foi obtido o valor CL_{50} de 770,825 ppm. Contudo, após 48 horas, o valor CL_{50} diminuiu para 39,434 ppm. Segundo Meyer et al. (1982) [20] e Garcez et al. (2018) [26], em bioensaio com *A. salina* as substâncias testadas podem ser classificadas como tóxicas quando a CL_{50} for menor que 1000 ppm e não tóxicas quando for acima deste valor. Assim, o inseticida ciromazina foi considerado tóxico, pois em 24 e 48 horas apresentou valores CL_{50} abaixo de 1000 ppm. Além disso, a redução expressiva da CL_{50} após 48 horas evidenciou que com maior tempo de exposição ocorreu aumento significativo da toxicidade do produto.

Os resultados encontrados neste estudo corroboram com o trabalho de Fernandez-Alba et al. (2001) [27] que avaliou a toxicidade aguda de amostras de água contaminadas com o inseticida ciromazina, por meio de bioensaio com o crustáceo *Daphnia magna*. O inseticida também foi considerado tóxico, aumentando a toxicidade com o tempo de exposição. Os valores CE_{50} foram 23,59 ppm em 24 horas e 5,08 ppm em 48 horas.

Comparando-se a taxa de mortalidade de náuplios de *A. salina* em 24 horas (Figura 1) e 48 horas (figura 2) de exposição, foi possível observar aumento na mortalidade após 48 horas em todas as concentrações testadas. Verificou-se também que houve um acréscimo da taxa de mortalidade relacionada a um aumento da concentração do produto. O que foi confirmado pelo coeficiente de determinação (R^2) que em 24 horas de exposição foi 0,98 e em 48 horas 0,63. Os valores de R^2 podem variar entre 0 e 1 e quanto mais próximo de 1 mais forte é a relação entre as duas variáveis e menor a variabilidade [28]. Nesse contexto, os resultados foram considerados satisfatórios, pois apresentaram valores próximos de 1; ainda que após 48 horas tenha ocorrido redução no valor de R^2 de 0,98 para 0,63.

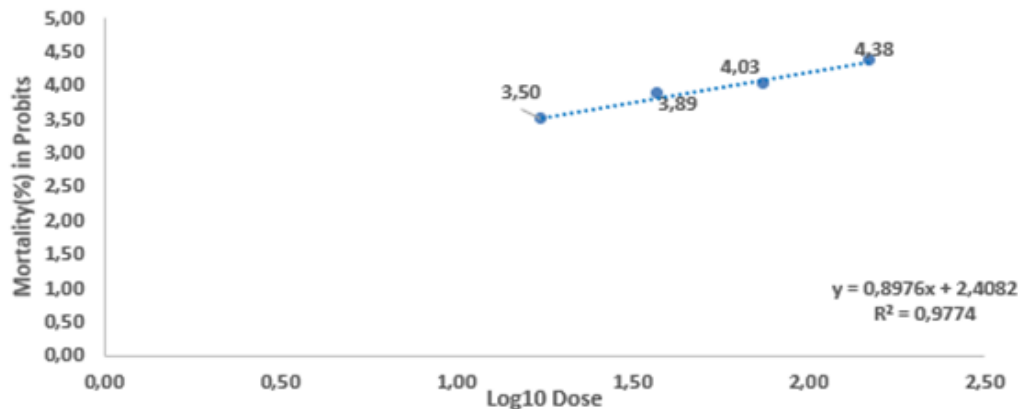


Figura 1: Relação entre porcentual da mortalidade de náuplios de *Artemia salina* e o aumento da concentração do agrotóxico ciromazina após 24 horas de exposição. Fonte: Mekapogu, A.R. (2021) Finney's probit analysis spreadsheet calculator (Version 2021). Disponível em: <https://probitanalysis.wordpress.com/>.

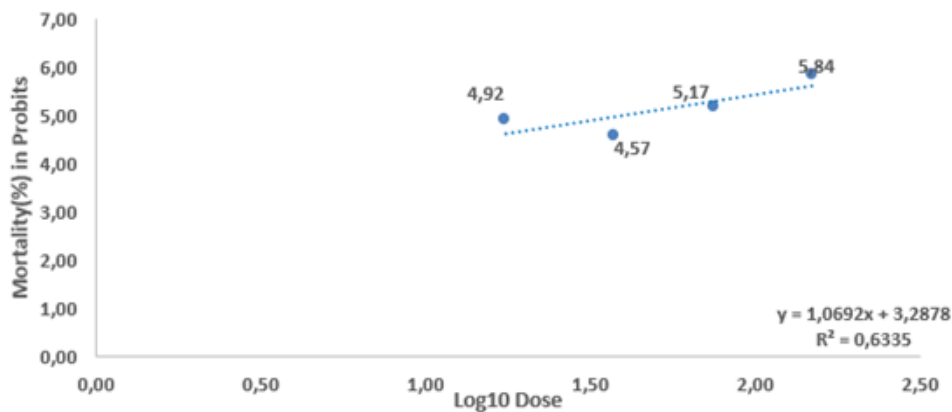


Figura 2: Relação entre porcentual da mortalidade de náuplios de *Artemia salina* e o aumento da concentração do agrotóxico ciromazina após 48 horas de exposição. Fonte: Mekapogu, A.R. (2021) Finney's probit analysis spreadsheet calculator (Version 2021). Disponível em: <https://probitanalysis.wordpress.com/>.

Por meio da análise da curva dose-resposta foi possível observar um crescimento da curva relacionada com a concentração do agrotóxico, ou seja, à medida que aumentou a concentração do composto houve também acréscimo na mortalidade dos náuplios, tanto após 24 (Figura 3), quanto após 48 horas de exposição (Figura 4). Os resultados foram considerados estatisticamente confiáveis apresentando valores de $p = 0,0002$ (24 horas) e $p < 0,0001$ (48 horas). Após 48 horas, pode-se observar que a curva apresentou um formato sigmoide, típico em testes de toxicidade [28].

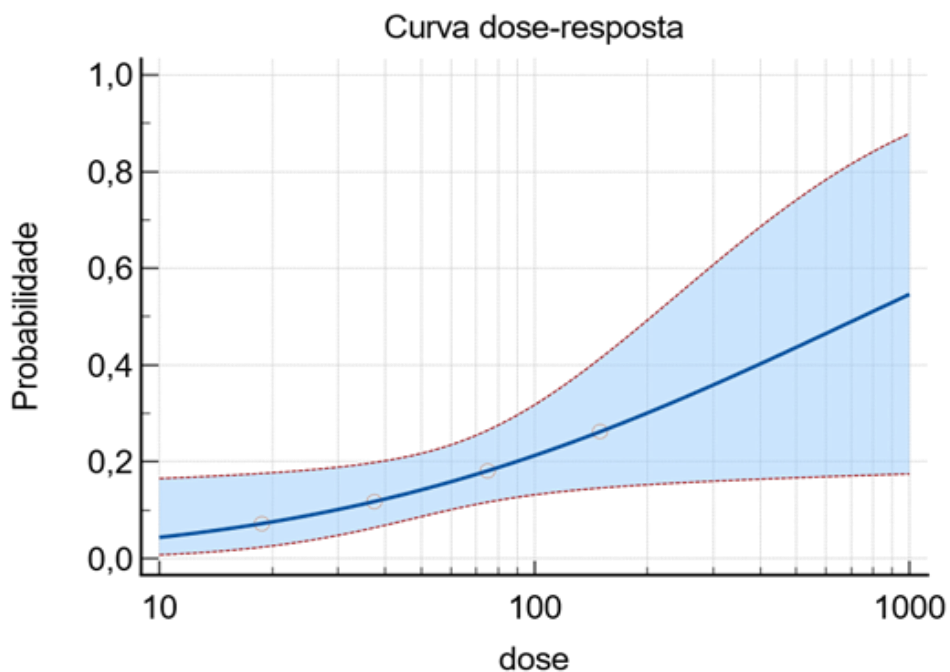


Figura 3: Curva dose-resposta do agrotóxico ciromazina após 24 horas de exposição. Fonte: Regressão – probits analysis MedCalc® Statistical Software version 20.100 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium).

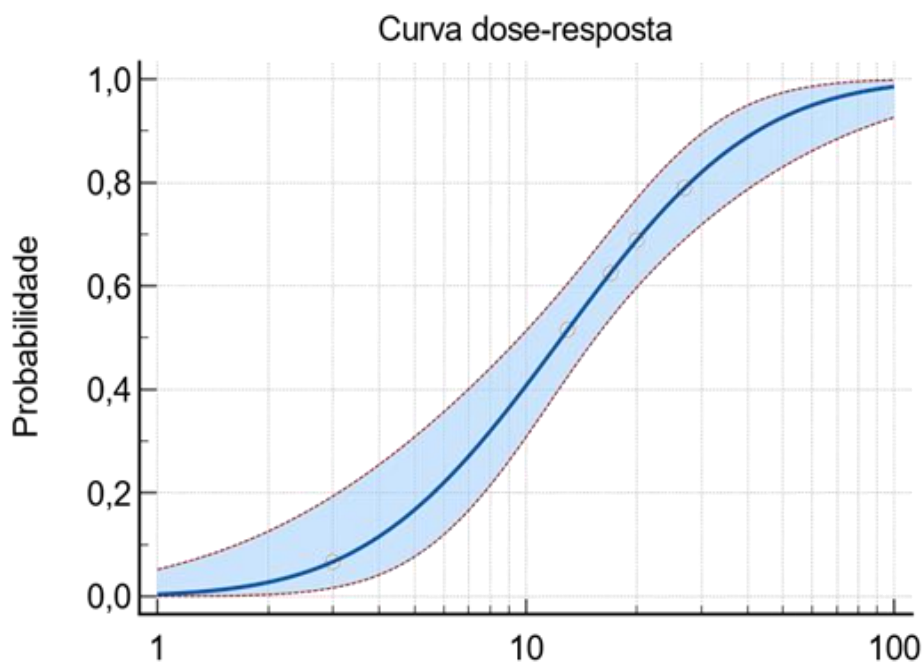


Figura 4: Curva dose-resposta do agrotóxico ciromazina após 48 horas de exposição. Fonte: Regressão – probits analysis MedCalc® Statistical Software version 20.100 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium).

Outros trabalhos que avaliaram a toxicidade de agrotóxicos utilizando bioensaio com *A. salina* também encontraram resultados semelhantes ao desse estudo. No trabalho de Shoaib et al. (2012) [29], os inseticidas paration e fenvalerato foram tóxicos, apresentando baixos valores de CL_{50} e taxa de mortalidade diretamente proporcional à concentração dos compostos. Em estudo de Rao et al. (2007) [30] foi observado que inseticidas organofosforados foram capazes de alterar a morfologia e o sistema locomotor de *A. salina*, apresentando toxicidade variável conforme o princípio ativo do produto.

A contaminação dos cursos hídricos com agrotóxicos pode afetar drasticamente os organismos e a cadeia alimentar marinha, pois alguns compostos possuem a capacidade de bioacumular nos organismos aquáticos e biomagnificar ao longo das cadeias tróficas [31]. *A. salina* é uma espécie primária da cadeia alimentar e a exposição a longo prazo desses organismos a agrotóxicos pode representar um alto perigo para a saúde da população pelo consumo de animais de nível trófico superior contaminados [32].

O uso demorado do inseticida ciromazina pode causar contaminação dos alimentos, potenciais problemas ao meio ambiente e prejuízos à saúde humana [33]. Além da toxicidade sobre *A. salina* observada no presente estudo, o inseticida produz a melamina que também é considerada tóxica em concentrações mais elevadas. Além disso, o inseticida foi considerado um composto potencialmente cancerígeno [34].

Embora o teste com *A. salina* seja considerado confiável, é uma avaliação preliminar de toxicidade, sendo importante também a utilização de outras metodologias para assim garantir o uso seguro do composto teste [35]. Visto que, para confirmar que o aumento da toxicidade é exclusivamente por conta do inseticida, é necessário o emprego de análises mais sensíveis e complexas [36].

4. CONCLUSÃO

No bioensaio realizado com *A. salina* o inseticida agrícola ciromazina foi tóxico, apresentando valores CL_{50} abaixo de 1000 ppm, sendo observado maior toxicidade após 48 horas de exposição.

Também foi possível observar relação dose-resposta, pois o aumento da concentração do produto causou aumento na mortalidade dos indivíduos expostos.

Nesse contexto, é importante a realização de outras pesquisas que avaliem a toxicidade desse inseticida em diferentes organismos teste, possibilitando assim o levantamento de mais informações sobre o seu potencial tóxico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bolognesi C, Merlo FD. Pesticides: human health effects. In: Nriagu JO, editor. Encyclopedia of environmental health. 2nd ed. Burlington (CA): Elsevier; 2011. p. 438-53. doi: 10.1016/j.pestbp.2014.11.014
2. Dutra RMS, Souza MMO. Impactos negativos do uso de agrotóxicos à saúde humana. Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde. 2017 Jun;13(24):127-40.
3. Alleva R, Manzella N, Gaetani S, Bacchetti T, Bracci M, Ciarapica V, et al. Mechanism underlying the effect of long-term exposure to low dose of pesticides on DNA integrity. Environmental Toxicology. 2018 Jan;33:476-87. doi: 10.1002/tox.22534
4. Serra LS, Mendes MRF, Soares MVA, Monteiro IP. Revolução Verde: reflexões acerca da questão dos agrotóxicos. Revista Científica do Centro de Estudos em Desenvolvimento Sustentável da UNDB. 2016;1(4):2-25.
5. Sarpa M, Friedrich, K. Exposição a agrotóxicos e desenvolvimento de câncer no contexto da saúde coletiva: o papel da agroecologia como suporte às políticas públicas de prevenção do câncer. Saúde Debate. 2022 Jun;46(2):407-25. doi: 10.1590/0103-11042022E227
6. De Sousa DS, Roberto CHA, Mendes FRS, Marinho MM, Dos Santos HS, Marinho ES. Incidence of penile neoplasia associated with the use of pesticides in the Irrigated Perimeter Jaguaribe Apodi - Ceará, Brazil: An in silico approach. Research, Society and Development. 2022 Out;11(10):e553111033178. doi: 10.33448/rsd-v11i10.33178
7. Khalid MZ, Sun Z, Chen Y, Zhang J, Zhong G. Cyromazine effects the reproduction of *Drosophila* by decreasing the number of germ cells in the female adult ovary. Insects. 2022 Apr;13(414):2-12. doi: 10.3390/insects13050414
8. Fu D, Zhang S, Wang M, Liang X, Xie Y, Zhang Y, et al. Dissipation behavior, residue distribution and dietary risk assessment of cyromazine, acetamiprid and their mixture in cowpea and cowpea field soil. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2020 May;100:4540-4548. doi: 10.1002/jsfa.10495
9. Guo M, Liu S, Wang M, Lv Y, Shi J, Zeng Y, et al. Double surfactants-assisted electromembrane extraction of cyromazine and melamine in surface water, soil and cucumber samples followed by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. Journal of the Science of Food Agriculture. 2020 Nov;100:301-7. doi: 10.1002/jsfa.10039
10. Marcantonio AS, Ranzani-Paiva MJT, Franca FM, Dias DC, Teixeira PC, Ferreira CM. Toxicidade do sulfato de zinco para girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*): toxicidade aguda, crônica e parâmetros hematológicos. Revista Científica de Pesca, Aquicultura e Limnologia. 2011;37(2):143-54.
11. Martins ACR, Costa JKN, Herbert A, Farias FRS, Rezende M, Kozłowski Junior VA, et al. Avaliação da toxicidade das tinturas de aroeira e de romã através do bioensaio com *Artemia salina*. Research, Society and Development. 2021 Mar;10(3):e52010313751. doi: 10.33448/rsd-v10i3.13751
12. Wang C, Jia H, Zhu L, Zhang H, Wang Y. Toxicity of α -Fe₂O₃ nanoparticles to *Artemia salina* cysts and three stages of larvae. Science of the Total Environment. 2017 Apr;598:847-55. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.04.183
13. Varó I, Redón S, Garcia-Roger EM, Amat F, Guinot D, Serrano R, et al. Aquatic pollution may favor the success of the invasive species *A. franciscana*. Aquatic Toxicology. 2015 Feb;161:208-20. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.02.008
14. Gambardella C, Nichino D, Iacometti C, Ferrando S, Falugi C. Long term exposure to low dose neurotoxic pesticides affects hatching, viability and cholinesterase activity of *Artemia* sp. Aquatic Toxicology. 2018 Mar; 196:79-89. doi: 10.1016/j.aquatox.2018.01.006
15. Salgueiro ACF, Goulart AS, Viçosa DL, Viçosa CSCL, Folmer V. Resolução de problemas no ensino de Ciências: utilização de *Artemia salina* como modelo experimental para o estudo de plantas medicinais na escola básica. Journal of Biochemistry Education. 2018 Dec;16(2):31-47. doi: 10.16923/reb.v16i2.814
16. Costa CR, Olivi P, Botta CM, Espindola EL. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Química Nova. 2008 Set;31(7):1820-30.
17. Gomes PRR, Leite Júnior JDC, Sousa DA, Everton GO, Reis JB, Louzeiro HC, et al. Estudo da composição química, toxicidade e atividade moluscicida do óleo essencial *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

- Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacêuticas. 2020 Abr;49(1):28-43. doi: 10.15446/rcciquifa.v49n1.87004
18. Oliveira MA, Mota LJT, Cantuária PC, Souza ACF, Costa EVM, Cantuária PC, et al. Estudo fitoquímico, toxicidade em *Artemia salina* (Linnaeus, 1758) e atividade antibacteriana de *Pseudoxandra cuspidata* Maas. In: Oliveira RJ, editor. Plantas medicinais do estado do Amapá [livro eletrônico]: dos relatos da população à pesquisa científica. Guarujá (SP): Científica Digital; 2021. p 154-65. doi: 10.37885/210303482
 19. Silva LF, Cunha LC, De Paula JR, Delprete PG. Avaliação toxicológica comparativa entre *Palicourea marcgravii* St. Hil e *P. officinalis* Mart. (RUBIACEAE) em *Artemia salina* Leach. Enciclopédia Biosfera. 2013 Dec;8(17):2695-707.
 20. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnan JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McAughlin JL. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*. 1982;45(1):31-4.
 21. Oliveira TL, Lustosa EA, Nóbrega FVA, Souza MAN. Toxicidade de medicamentos de uso popular na covid-19. In: Freitas PG, Mello RG, editores. Ciências da saúde [livro eletrônico]: pesquisas e práticas multidisciplinares. Rio de Janeiro (RJ): e-Publicar; 2022. p. 452-65. doi: 10.47402/ed.ep.c2022177339900
 22. Santos Filipe M, Isca VMS, Ntungwe NE, Princiotto S, Díaz-Lanza AM, Rijo P. Lethality bioassay using *Artemia salina* L. *Journal of Visualized Experiments* . 2022;188:e64472. doi: 10.3791/64472
 23. Lima MFF, Silva JWSA, Silva JK, Moura AHN, Lopes LRF, Cordeiro BA, et al. Avaliação toxicológica através do bioensaio com *Artemia salina* Leach de espécimes vegetais pertencentes à caatinga. *Brazilian Journal of Health Review*. 2019 Nov-Dec;2(6):5950-63. doi: 10.34119/bjhrv2n6-088
 24. Peng S, Wang A, Lian Y, Jia J, Ji X, Yang H, et al. Technology for rapid detection of cyromazine residues in fruits and vegetables: molecularly imprinted electrochemical sensors. *Biosensors*. 2022 Jun;12(414):2-12. doi: 10.3390/bios12060414
 25. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografias de agrotóxicos [Internet]. Brasília (DF): ANVISA; 2020 [citado em 29 nov 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas-por-letra>
 26. Garcez D, Carreiro E, Nogueira C, Macedo S, Nascimento SLS, Silva JN, et al. Toxicidade aguda da dipirona sódica in vitro utilizando o bioindicador de toxicidade *Artemia salina* leach. *Revinter*. 2018 Jun;11(2):114-9. doi: 10.22280/revintervol11ed2.362
 27. Fernández-Alba AR, Guil LH, López GD, Chisti Y. Toxicity of pesticides in wastewater: a comparative assessment of rapid bioassays. *Analytica Chimica Acta*. 2001 Jan; 426(2):289-301. doi: 10.1016/S0003-2670(00)00874-6
 28. Silva PHL. Aplicando o modelo de regressão linear para determinar as horas de aprendizagem: um estudo de caso. *Revista Carioca de Ciência, Tecnologia e Educação*. 2016;1(1):1-9.
 29. Shoaib N, Siddiqui PJA, Khalid H. Acute toxic effect of pesticides on *Brine shrimp* and *Opossum shrimp*. *Pakistan Journal of Zoology* . 2012;44(6):1753-7.
 30. Rao JV, Kavitha P, Jakka NM, Sridhar V, Usman PK. Toxicity of organophosphates on morphology and locomotor behavior in Brine Shrimp, *Artemia salina*. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 2007;53:227-32. doi: 10.1007/s00244-006-0226-9
 31. Clasen B, Loro VL, Murussi CR, Tiecher TL, Morais B, Zanella R. Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* reared in a rice-fish system. *Science of the Total Environment*. 2018 Jan;626:737-43. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.154
 32. Xing H, Zheng B, Li X, Dang X, Zhang H, Tian F, et al. Sensitive SERS detection of melamine and cyromazine in raw milk using aptamer-based in situ silver nanoparticles synthesis. *Results in Chemistry*. 2022;4:100266. doi: 10.1016/j.rechem.2021.100266
 33. Su H, Chen L, Sun B, Ai S. Fluorescence detection of cyromazine using gallic acid-reduced gold nanoparticles. *Sensors and Actuators B*. 2012;174:458-64. doi: 10.1016/j.snb.2012.08.080
 34. Zhao Z, Chen L, Bai B, Yang X, Tan Y, Wang J, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry method for evaluating the dissipation dynamics of cyromazine and its metabolite in *Agaricus bisporus* and dietary risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018 Nov;25(3):2285-92. doi: 10.1007/s11356-017-0658-y
 35. Tchemra FGC, Pontes MM, De Melo AR, De Geus JL, Junior VAK, Rezende M. Avaliação da toxicidade de diferentes concentrações de tinturas de malva e calêndula através do bioensaio com *Artemia salina*. *Research, Society and Development*. 2022 Fev;11(3):e20511326255. doi: 10.33448/rsd-v11i3.26255
 36. Camilo, FF. Utilização do bioindicador *Artemia salina* na avaliação toxicológica em extratos vegetais de *Allium sativum* com presença de praguicidas. *Revista Saúde e Meio Ambiente – RESMA*. 2021;12(1):31-45.