



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Sâmara da Silva Gomes

**Toxicidade das misturas dos agrotóxicos sulfentrazone, fipronil e carbendazim em embriões e larvas de zebrafish (*Danio rerio*)**

Recife

2022

SÂMARA DA SILVA GOMES

**Toxicidade das misturas dos agrotóxicos sulfentrazone, fipronil e carbendazim em embriões e larvas de *zebrafish* (*Danio rerio*)**

Tese apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena

Co-orientador: Prof. Dr. Bruno André Fernandes de Jesus da Silva Nunes

Recife

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

G633t

Gomes, Samara da Silva

Toxicidade das misturas dos agrotóxicos sulfentrazone, fipronil e carbendazim em embriões e larvas de zebrafish (Danio rerio) / Samara da Silva Gomes. - 2022.  
130 f. : il.

Orientador: Pabyton Goncalves Cadena.

Coorientador: Bruno Andre Fernandes de Jesus da Silva Nunes.

Inclui referências e anexo(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2022.

1. Peixe. 2. Misturas de pesticidas. 3. Epibolia. 4. Teratogenicidade. 5. Efeitos comportamentais. I. Cadena, Pabyton Goncalves, orient. II. Nunes, Bruno Andre Fernandes de Jesus da Silva, coorient. III. Título

CDD 636.089

---

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

**Toxicidade das misturas dos agrotóxicos sulfentrazone, fipronil e  
carbendazim em embriões e larvas de *zebrafish* (*Danio rerio*)**

Tese elaborada por:

**Sâmara da Silva Gomes**

Defendida em 10 de outubro de 2022

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena (Orientador)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

---

Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico  
Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

---

Prof. Dr. Pierre Castro Soares  
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

---

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares  
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

---

Prof. Dra. Maria Adélia Borstelmann de Oliveira  
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

*“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.*  
(Albert Einstein)

## AGRADECIMENTOS

Gratidão ao meu Deus, que em todos os momentos não me desamparou e me deu força e sabedoria para chegar até aqui.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pabyton Cadena, por toda ciência, exemplo e incentivo necessários para meu crescimento acadêmico e profissional.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Bruno Nunes, por todo conhecimento e atenção nessa jornada acadêmica.

Aos meus pais, por todo amor e educação, que me tornaram um ser pensante e me fizeram querer voar cada vez mais alto, acreditar que sou capaz e posso sempre fazer melhor que antes. Serei eternamente grata a vocês!

Ao marido e companheiro de aventuras Augusto, por estar ao meu lado em todos os momentos, por sonhar e construir junto comigo um futuro, obrigado toda sua dedicação e amor. As minhas cachorrinhas Rubi e Suri, que mesmo sem falar nada demonstram tanto amor e tornaram meus dias mais alegres.

Aos meus familiares que sempre oram e comemoram minhas conquistas. Mas em especial, Mily, Tia Flavia e Tio Roberto que desde criança me apoiam tanto, e que me possibilitaram experiências que expandiram meus horizontes. Minha gratidão!

Aos amigos e companheiros de doutorado Jadson, Renata, Thamires e Marília, por me ajudarem e colaborarem com minhas pesquisas, por tornarem meu trabalho e meus dias no laboratório mais leves e acolhedores.

Aos peixinhos tão especiais, que tanto cuidei e admiro, que serviram como animais de estudo e ajudaram a responder minhas perguntas nesta pesquisa.

Ao programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, pelo apoio à pesquisa e oportunidade. À CAPES, pelo apoio financeiro para ao desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço de coração a todos que, de alguma forma, deram sua contribuição para eu chegar até aqui. É um capítulo que se conclui, para outro começar. Muito obrigado!

## RESUMO

A contaminação das águas superficiais por agrotóxicos é comumente associada a uma combinação de substâncias ao invés de um único composto, pois vários ingredientes ativos são comumente aplicados simultaneamente às culturas e/ou uma variedade de culturas utilizam as mesmas fontes de água. Mas a avaliação atual dos efeitos destes agrotóxicos é predominantemente com base nas substâncias isoladas, portanto, a relevância ecológica pode estar subestimada. Mediante a isto, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos do uso combinado de três agrotóxicos, o sulfentrazone, o fipronil e o carbendazim. Para isto, foram analisados a letalidade, subletalidade e epibolia em embriões de *zebrafish*, e alterações comportamentais em larvas de *zebrafish*, através dos testes de tigmotáxia, sensibilidade ao toque, resposta optomotora, bolas saltitantes e atividade exploratória. Os três pesticidas isolados causaram efeitos tóxicos nos embriões. O sulfentrazone foi o mais letal, apresentando diferença significativa nas três concentrações utilizadas, apresentando até 50% de coagulação dos ovos. Assim como, no teste de epibolia os pesticidas isolados carbendazim e sulfentrazone, reduziram o percentual de epibolia mais do que suas misturas em relação ao controle, reduzindo 30% e 25% respectivamente. Porém, nos testes comportamentais houve alterações significativas nas larvas expostas aos pesticidas isolados e também suas misturas. No teste das bolas saltitantes todos os grupos expostos apresentaram diferença significativa em relação ao controle, sendo o carbendazim o que apresentou maior diferença, mais de 30% de diferença na resposta ao estímulo e 40% no agrupamento das larvas. No teste de atividade exploratória foi possível observar o efeito sinérgico das misturas binárias, significativamente na mistura carbendazim + fipronil, reduzindo até 10 cm a distância percorrida e 10 cm/s a velocidade média das larvas em relação ao controle. Através dos nossos resultados observamos que a toxicidade das misturas difere dependendo do *endpoint* analisado. Por isso trabalhos que busquem entender os efeitos das misturas de pesticidas são importantes, porque ajudarão a entender seus efeitos de forma mais realista, pois os efeitos aditivos destas misturas ainda são pouco compreendidos.

**Palavras-chave:** Peixe, Misturas de pesticidas, Epibolia, Teratogenicidade, Efeitos comportamentais.

## ABSTRACT

Contamination of surface water by pesticides is commonly associated with a combination of substances rather than a single compound, as multiple active ingredients are commonly applied simultaneously to crops and/or a variety of crops utilize the same water sources. But the current evaluation of the effects of these pesticides is predominantly based on the isolated substances, so the ecological relevance may be underestimated. Therefore, this study aimed to investigate the effects of the combined use of three pesticides, sulfentrazone, fipronil and carbendazim. For this, we analyzed lethality, sublethality and epiboly in zebrafish embryos, and behavioral changes in zebrafish larvae, through tests of thigmotaxis, touch sensitivity, optomotor response, bouncing balls and exploratory activity. The three pesticides isolated caused toxic effects on the embryos. Sulfentrazone was the most lethal, showing a significant difference in the three concentrations used, with up to 50% of egg coagulation. As well as, in the epiboly test, the isolated pesticides carbendazim and sulfentrazone, reduced the percentage of epiboly more than their mixtures in relation to the control, reducing 30% and 25% respectively. However, in the behavioral tests there were significant changes in the larvae exposed to the isolated pesticides and also their mixtures. In the bouncing balls test, all exposed groups showed a significant difference in relation to the control, with carbendazim being the one that showed the greatest difference, more than 30% difference in the response to the stimulus and 40% in the grouping of the larvae. In the exploratory activity it was possible to observe the synergistic effect of the binary mixtures, significantly in carbendazim + fipronil, reducing up to 10 cm the distance travelled and 10 cm/s the average speed of the larvae in relation to the control. Through our results we observed that the toxicity of the mixtures differs depending on the analyzed endpoints. Therefore, studies that seek to understand the effects of pesticide mixtures are important, because they will help to understand the effects more realistically, since the additive effects of these mixtures are still poorly understood.

**Keywords:** Fish, Pesticides Mixture, Epiboly, Teratogenicity, Behavioral effects.

## SUMÁRIO

<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>10</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>12</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>14</b>
2.1. Objetivo Geral .....	14
2.2. Objetivos Específicos .....	14
<b>3. Revisão de Literatura</b> .....	<b>14</b>
3.1. Agrotóxicos e seu uso no Brasil .....	14
3.2. Carbendazim: classificação, características, mecanismos de ação .....	24
3.3. Fipronil: classificação, características, mecanismos de ação .....	28
3.4. Sulfentrazone: classificação, características, mecanismos de ação .....	30
3.5. Uso de misturas de agrotóxicos .....	33
3.6. Contaminação aquática .....	35
3.7. O modelo animal <i>zebrafish</i> ( <i>Danio rerio</i> ) e seu uso nas pesquisas científicas .....	39
<b>4. Referências</b> .....	<b>47</b>
<b>5. Capítulo I: Carbendazim, fipronil e sulfentrazone isoladamente afetaram mais o desenvolvimento embrionário do <i>zebrafish</i> do que quando misturados</b> .....	<b>60</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>61</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>62</b>
<b>2. Material e Métodos</b> .....	<b>66</b>
2.1. Reagentes e soluções .....	66
2.2. Cultivo de <i>zebrafish</i> .....	66
2.3. Produção de ovos de <i>zebrafish</i> .....	67
2.4. Exposição química .....	67
2.5. Teste de toxicidade aguda .....	67
2.6. Teste de epibolia .....	68
2.7. Análise estatística .....	68
<b>3. Resultados</b> .....	<b>68</b>
3.1. Teste de toxicidade aguda .....	68
3.2. Teste de epibolia .....	69
<b>4. Discussão</b> .....	<b>70</b>

5. Conclusão .....	75
6. Agradecimentos.....	77
7. Referências .....	77
<b>6. Capítulo II: efeitos comportamentais das misturas e dos compostos isolados carbendazim, fipronil e sulfentrazone em larvas de zebrafish (<i>Danio rerio</i>) ....</b>	<b>91</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>92</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>94</b>
<b>2. Material e Métodos .....</b>	<b>96</b>
2.1. Reagentes e soluções.....	96
2.2. Cultivo de zebrafish e produção de ovos.....	97
2.3. Exposição química .....	97
2.4. Testes comportamentais .....	98
2.4.1. Teste de tigmotáxia.....	98
2.4.2. Teste de sensibilidade ao toque.....	99
2.4.3. Teste de resposta optomotora .....	99
2.4.4. Teste das bolas saltitantes.....	99
2.4.5. Teste de comportamento exploratório larval .....	100
2.4.6. Análise estatística .....	100
2.4.7. Análise de agrupamento .....	101
<b>3. Resultados .....</b>	<b>102</b>
3.1. Testes de tigmotáxia e sensibilidade ao toque.....	102
3.2. Teste de resposta optomotora.....	102
3.3. Teste das bolas saltitantes .....	102
3.4. Teste de comportamento exploratório larval .....	103
3.5. Análise de agrupamento.....	103
<b>4. Discussão.....</b>	<b>104</b>
<b>5. Conclusão .....</b>	<b>111</b>
<b>7. Referências .....</b>	<b>112</b>
<b>7. Anexos .....</b>	<b>129</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do carbendazim (ANVISA, 2019a).

Figura 2. Mecanismo de biodegradação do carbendazim (Singh *et al.*, 2016).

Figura 3. Fórmula estrutural do fipronil (ANVISA, 2019b).

Figura 4. Caminhos de degradação do fipronil por: a) hidrólise, b) redução, c) oxidação e d) fotólise (BOBÉ *et al.*, 1998).

Figura 5. Fórmula estrutural do Sulfentrazone (ANVISA, 2018).

Figura 6. Detecção dos números de agrotóxicos de 2014 a 2017 encontrados na água. O mapa foi construído com base nos dados obtidos em abril de 2018, não refletem atualizações posteriores (AGÊNCIA PÚBLICA, 2019).

Figura 7. Casal de *zebrafish* (Autor, 2021).

Figura 8. Fases de vida do *zebrafish*. (Autor, 2021).

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Limites máximos de resíduos (LMR) permitidos nas monoculturas descritas e os intervalos de tempo de segurança entre as aplicações do carbendazim (ANVISA, 2019a).

Tabela 2. Propriedades físico-químicas do carbendazim (ANVISA, 2019a; FAO, 1998).

Tabela 3. Limites máximos de resíduos (LMR) permitidos nas monoculturas descritas e os intervalos de tempo de segurança entre as aplicações do fipronil (ANVISA, 2019b).

Tabela 4. Propriedades físico-químicas do fipronil (ANVISA, 2019b; TINGLE *et al.*, 2000).

Tabela 5. Limites máximos de resíduos (LMR) permitidos nas monoculturas descritas e os intervalos de tempo de segurança entre as aplicações do sulfentrazone (ANVISA, 2018).

Tabela 6. Propriedades físico-químicas do sulfentrazone (ANVISA, 2018; RODRIGUES; ALMEIDA, 2005).

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os países que mais exportam produtos agropecuários, o que fortalece a influência econômica e política deste setor. A expansão do agronegócio tem levado a perda do valor do alimento humano, transformando-o em mercadoria e reduzindo sua qualidade nutricional (GABOARDI *et al.*, 2019). A pressão política pela liberalização do uso de agrotóxicos tem sido crescente, gerando um embate entre o setor ruralista e instituições da área de proteção à saúde e ao meio ambiente (CANDIOTTO *et al.*, 2017). Assim, impactos socioambientais como a redução da diversidade biológica e de ecossistemas, a contaminação das águas, do solo e de seres humanos, sobretudo trabalhadores rurais, decorrentes da utilização indiscriminada de agrotóxicos nas lavouras brasileiras costumam ser ignoradas e negligenciadas (CARNEIRO *et al.*, 2015)

Desde 2008 o Brasil ocupa o posto de maior consumidor mundial de agrotóxicos (SINDAG, 2015). Segundo dados do Dossiê da Associação Brasileira de Saúde Coletiva (PIGNATI, *et al.*, 2017) o país consome em média 7 litros per capita de agrotóxico a cada ano, o que resulta em mais de 70 mil casos de intoxicações agudas e crônicas em igual período. Isto tem ocorrido principalmente pela maximização das culturas de soja, algodão, milho, cana-de-açúcar e citros, representando 82% deste consumo. A classe de herbicidas é a mais utilizada seguida pelas de inseticidas, fungicidas e acaricidas (ANVISA, 2012). Estas substâncias chegam aos corpos d'água por diversas fontes pontuais ou difusas, como escoamentos, lixiviações, pulverização ou drenagens (DEMIRCI *et al.*, 2018). Eles raramente são detectados nos ambientes aquáticos como compostos isolados, pois os herbicidas, inseticidas e fungicidas são frequentemente aplicados juntos em uma mistura ou porque um único corpo d'água supre a demanda aquífera de mais de uma cultura agrícola (GÜNGÖRDÜ *et al.*, 2016).

No ano de 2019, o ritmo de liberação de agrotóxicos no país é o maior já documentado pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2019). Estão os ingredientes ativos sulfentrazone e fipronil. O sulfentrazone ( $C_{11}H_{10}Cl_2F_2N_4O_3S$ ) é um herbicida, banido na União Europeia desde 2009 por sua toxicidade, porém no Brasil é bastante utilizado nas culturas de abacaxi, café, cana-de-açúcar, citros, eucalipto, fumo e soja no combate a plantas daninhas (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o sulfentrazone possui classificação toxicológica

Classe I, isto é, extremamente tóxico a saúde humana (ANVISA, 2014). O fipronil ( $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$ ) é um inseticida, que desde 2004 é proibido em diversos países europeus por causar a mortalidade das abelhas (EFSA, 2013), porém no Brasil, onde está presente em vários produtos antiparasitários de animais domésticos e infestação de residências, além de ser utilizado nas culturas de cana-de-açúcar, milho, soja, algodão, batata, arroz, eucalipto, amendoim, feijão, girassol, sorgo e pastagens (ANVISA, 2017). O Carbendazim ( $C_9H_9N_3O_2$ ) é apontado como o agrotóxico de maior concentração presente nos alimentos da mesa brasileira, segundo o relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA (ANVISA, 2016). O carbendazim é um fungicida a base de benzimidazol mais amplamente utilizado em culturas de algodão, citros, soja e trigo, arroz, feijão e milho, horticultura, floresta, em jardinagem doméstica, como conservante de pintura, fabricação de papel, têxtil, indústria do couro e frutas (ANVISA 2002).

A avaliação atual dos efeitos tóxicos destas substâncias é predominantemente com base nas substâncias isoladas, portanto, a relevância ecológica pode estar subestimada (BRODEUR *et al.*, 2014). Uma vez que estas substâncias geralmente são usadas combinadas simultaneamente a outra, dificultando a compreensão de como as comunidades ecológicas respondem a eles. Desafiando também a avaliação da toxicidade, pois os efeitos acumulativos de tais combinações podem criar surpresas quando ocorrem interações, podendo produzir efeitos tóxicos aditivos (sinérgicos ou antagônicos) (JACKSON *et al.*, 2016).

Mediante a todas essas evidências, estudos sobre misturas de agrotóxicos são imprescindíveis para compreensão dos efeitos destas combinações, por isso, testes ecotoxicológicos são de suma importância pois fornecem informações fundamentais para a análise e gestão do risco ecológico, tornando-os amplamente úteis na formulação e instituição de políticas normativas e medidas administrativas que visem definir os limites toleráveis de emissão e concentração de substâncias químicas no ambiente (CHAPMAN, 2002), para isso os peixes são excelentes ferramentas no acompanhamento da qualidade dos ambientes, servindo como importantes bioindicadores, pois respondem de várias maneiras à contaminação ambiental (MARTINEZ; SOUZA, 2002).

O *Danio rerio*, tem sido amplamente utilizado em estudos toxicológicos, por apresentar diversas vantagens que torna uma espécie modelo para ensaios

toxicológicos. Entre elas se destacam: um ciclo de vida rápido, grande quantidade de embriões produzidos a cada ciclo de reprodução, tamanho pequeno, sensibilidade a diversas substâncias, similaridade genética e comportamental com seres humanos (TESOLIN *et al.*, 2014). Desta forma, o presente projeto propôs a avaliação dos efeitos tóxicos de combinações entre um herbicida, um inseticida e um fungicida em embriões e larvas de *zebrafish* um tradicional modelo de organismo aquático padronizado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 2013).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos dos agrotóxicos carbendazim, fipronil e sulfentrazone isolados e misturados em embriões e larvas de *zebrafish*.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Realizar ensaios toxicológicos com misturas binárias e terciárias dos agrotóxicos;
- II. Mensurar os efeitos letais (coagulação) e subletais (efeitos teratogênicos) dos agrotóxicos isolados em embriões de *zebrafish* com 24 horas pós fecundação (hpf);
- III. Analisar o processo de epibolia em embriões de *zebrafish* com 8 hpf expostos aos agrotóxicos isolados e misturados;
- IV. Avaliar as alterações comportamentais de larvas de *zebrafish* com 144 hpf expostas aos agrotóxicos isolados e misturados.

## 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1. AGROTÓXICOS E SEU USO NO BRASIL

O registo mais antigo do uso dos agrotóxicos, datam de cerca de 1200 antes de Cristo, descreveu o uso de sal e de cinzas em campos conquistados por exércitos bíblicos, para tornar as terras improdutivas. Esse, possivelmente, foi primeira utilização de herbicidas não seletivos pela humanidade (JARDIM *et al.*, 2009). As

substâncias específicas para os agrotóxicos, só vieram a ser formuladas durante a primeira guerra mundial, mas passaram a ser utilizados como defensivos agrícolas, na década de 40, durante a segunda guerra mundial, onde também tiveram a função de armas químicas (SOARES, 2008). A partir da década 60, o uso destes produtos químicos cresceu exponencialmente devido à chamada Revolução Verde, que, por meio da mecanização e da inserção de formulações de novos produtos, modificou o processo tradicional de produção agrícola (MAZOYER; ROUDART, 2010).

As primeiras indústrias de agrotóxicos no Brasil datam da década de 40. No entanto, somente em 1970 foi constituído o parque industrial brasileiro de agrotóxicos (TERRA; PELAEZ, 2009). Com a implementação da chamada “modernização da agricultura” no Brasil, foi criado o Sistema Nacional de Crédito Rural (SNCR) em 1965 e o Programa Nacional de Defensivos Agrícolas em 1975, importantes iniciativas para a expansão do comércio de agrotóxicos. A partir disso, a indústria e comércio de agrotóxicos cresceu de forma significativa e, desde 2008, o Brasil passou a ser o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (CARNEIRO *et al.*, 2015).

De acordo com a Lei Federal 7.802, de 11 de julho de 1989, os agrotóxicos são definidos como os produtos usados nos setores de produção e beneficiamento de produtos agrícolas, no armazenamento, na proteção de florestas, nas pastagens e de outros ecossistemas. Também são produtos destinados ao uso em ambientes urbanos, industriais e hídricos, com a finalidade de controle da composição da flora ou da fauna, com o intuito de evitar a ação danosa de organismos vivos considerados nocivos, assim como as substâncias e produtos empregados, tais como desfolhantes, dessecantes, inibidores de crescimento e estimuladores (BRASIL, 1989).

Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), a definição de agrotóxico é: [...] qualquer substância ou misturas de substâncias usadas para prevenir, destruir ou controlar qualquer praga – incluindo vetores de doenças humanas e animais, espécies indesejadas de plantas ou animais, causadoras de danos durante (ou interferindo na) a produção, processamento, estocagem, transporte ou distribuição de alimentos, produtos agrícolas, madeiras e derivados – ou que deva ser administrada para o controle de insetos, aracnídeos e outras pestes que acometem os corpos de animais de criação (FAO, 2003).

Os agrotóxicos podem ser classificados com base em diferentes critérios, segundo a sua origem, podendo ser inorgânicos (produzidos a partir de compostos de mercúrio, bário, enxofre e cobre), orgânicos (possuem átomos de carbono em sua estrutura) ou de origem vegetal, bacteriana e fúngica (antibióticos) (SANCHES *et al.*, 2003) ou de acordo com seu modo de ação (herbicidas, inseticidas, fungicidas, acaricidas e etc.) (GAVRILESCU, 2005).

Este processo de modernização da agricultura, trouxe consigo o uso generalizado destes compostos, e sem as devidas instruções sobre suas propriedades e formas de utilização desses compostos, diversos problemas começaram a aparecer, dentro e fora dos agroecossistemas, como: contaminação do solo e da água, resíduos em alimentos, efeitos em organismos não-alvos e intoxicação de trabalhadores rurais. O uso intensivo de agrotóxicos causou um aumento da dependência por eles, pois gera um desequilíbrio pela eliminação de inimigos naturais de pragas e doenças, bem como o surgimento de populações mais resistentes. Com isso, surgiu a necessidade de se utilizar doses mais elevadas, ou de se usar diversos tipos de agrotóxicos, ou, ainda, aumentar a frequência de aplicação (CAMPANHOLA, 2002).

O transporte e persistência dos agrotóxicos no ambiente (ar, água, solo, sedimento) depende de diversos processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem concomitantemente (GAVRILESCU, 2005; SPADOTTO *et al.*, 2010). Os agrotóxicos também sofrem modificações durante sua permanência no ambiente, para alguns compostos, esta permanência pode torna-los mais tóxicos para organismos não-alvo que os compostos originais (BEELER *et al.*, 2001). Os agrotóxicos podem ser suscetíveis a todos estes processos ambientais ou a algum em especial. Os principais processos envolvidos nas modificações químicas dos agrotóxicos segundo Gebler (2004) e Radosevich *et al.*, (1997), são:

A fotólise é o processo que envolve a degradação das moléculas no ambiente pela ação da luz solar. Este processo alcança especialmente as moléculas que apresentam alto grau de volatilidade. Além da fotólise direta, pode-se contar também com a fotólise indireta, onde a luz funciona como um catalisador para outros processos físico-químicos especialmente na água.

A hidrólise é considerada o processo físico-químico mais relevante para a deterioração de moléculas de agrotóxicos. Ela acarreta a quebra da molécula em partes cada vez menores, facilitando sua absorção e transformação pelo meio. Existem produtos que inclusive preveem a ação da hidrólise para a ativação de seu mecanismo de ação.

A oxidação, nesses processos atua principalmente nas trocas químicas que o agrotóxico efetua em suas reações com os componentes do solo, fundamentalmente com a matéria orgânica presente.

A adsorção e a dessorção, são os processos que envolvem a adesão da molécula do agrotóxico com outras partículas do solo ou mesmo dissolvidas na água (partículas em suspensão). Nesses momentos, dependendo das forças envolvidas, pode haver a liberação de radicais, que contribuem para a degradação das moléculas de agrotóxicos. É também um processo muito importante quando levado em conta que ele é responsável pela retenção dos produtos em determinadas camadas do solo, liberando-o lentamente para a solução do solo, permitindo a ação de outras forças degradantes, como a biodegradação e hidrólise.

A volatilização é um processo mais ligado com o transporte do que com transformação em si. Entretanto passa pela mudança de estado físico, o que pode tornar o agrotóxico mais vulnerável à degradação. Está intimamente relacionado com a taxa de vaporização do produto, e pode contribuir para que a degradação do produto seja acelerada no solo.

Condições geoclimáticas também influenciam a dinâmica dos agrotóxicos, como o clima (temperatura, intensidade luminosa, pluviosidade, ventos), a topografia do terreno, assim como condições ambientais, tais como a atividade microbológica, as propriedades físicas e químicas do solo (teor de matéria orgânica e argila, pH, umidade) e do meio aquático (pH, dureza da água, partículas em suspensão, ácidos húmicos dissolvidos) (GAVRILESCU, 2005; BROWN *et al.*, 2006).

Dessa forma, as características físico-químicas destes produtos são fatores que determinam o potencial de acumulação do composto em determinados compartimentos ambientais ou no organismo de seres vivos, no transporte e, conseqüentemente, definem o grau de lixiviação, fugacidade e capacidade de retenção (DEUBER, 1992). As variáveis importantes para a avaliação da relação entre

o ambiente e os agrotóxicos, normalmente os mais comuns e prováveis de serem encontradas, ou solicitadas, quando da execução de análises ambientais são elas:

A pressão de vapor ( $P_0$ ), que pode ser compreendida como a “solubilidade do produto no ar”. Ela é levada em conta em relação ao vapor de uma substância em equilíbrio com sua fase pura condensada, seja ela líquida ou sólida. Logo, ela é a tendência que um produto químico tem de se transferir de/ou para uma fase ambiental gasosa. Essa função é crítica para predizer tanto a distribuição do equilíbrio químico entre as fases como as taxas de trocas entre os meios (SCHWARZENBACH *et al.*, 1993).

A solubilidade em água (CW sat) é definida como a abundância de um produto químico por unidade de volume na fase aquosa, quando a solução está em equilíbrio com o composto puro em seu atual estado de agregação (sólido, líquido ou gasoso) a uma temperatura e pressão específica (normalmente 25°C e 1 atm respectivamente). O quanto um determinado elemento tem de afinidade por moléculas de água é um dos fatores chaves para determinar seus impactos no meio e o comportamento ambiental dos produtos (SCHWARZENBACH *et al.*, 1993).

Coeficiente de partição octanol/ água ( $K_{oc}$ ) é o coeficiente que gera uma estimativa direta da hidrofobicidade ou da tendência de partição de determinado produto de um meio aquoso para um meio orgânico, tais como lipídeos, ceras e matéria orgânica (húmus ou os ácidos húmicos) (MACKAY *et al.*, 1997). É utilizado para avaliar o grau de transporte do produto entre estes meios. Sua importância se deve ao fato de ele ser utilizado como padrão para análises destas reações referenciando as condições naturais de partição entre água e a matéria orgânica contida no solo, ou entre a água e a biota, como tecidos vivos de peixes, aves, microrganismos, dentre outros.

Coeficiente de adsorção ( $K_{ow}$ ), é um coeficiente derivado do anterior, mas de grande importância no estudo do comportamento da atividade dos agrotóxicos e seus resíduos no solo. Ele descreve a movimentação potencial ou a mobilidade do agrotóxico no solo, sedimento e água subterrânea. É importante mencionar que devido à complexidade das estruturas moleculares dos agrotóxicos, a correlação acima pode não ocorrer em alguns casos, uma vez que considera somente a hidrofobicidade química do produto, que pode ser alterada ou mesmo falhar para

componentes polares e iônicos. Além disso, os efeitos do pH, propriedades de solo, cargas de superfície e outros fatores podem influenciar a adsorção (MACKAY *et al.*, 1997).

O tempo de meia-vida ( $T_{1/2}$ ) meia-vida é um termo químico relacionado ao tempo que 50% da massa de determinado produto leva para degradar ou ser degradado na natureza (MAHAN; MYERS, 2000). Ambientalmente ela é muito importante, pois seu conhecimento permite avaliar diretamente o tempo necessário entre aplicações de um produto ou a necessidade de sua variação. Apesar de ser estipulada por isótopos, quando aplicada em questões ambientais, ela dificilmente pode ser datada com precisão, uma vez que o ambiente apresenta variações severas, provocando a alteração da taxa de degradação do agrotóxico. Assim, essa variável pode ser apresentada como valor simples ou como uma faixa de tempo. Dentre os diversos fatores que podem alterá-la, no ambiente, estão a intensidade da radiação solar, a temperatura do solo, a concentração de radicais hidroxila ou a natureza da microbiana (MACKAY *et al.*, 1997).

A dose letal para 50% da população ( $DL_{50}$ ) é expressa em mg de substância por kg do peso corpóreo, que provoca a morte de 50% da população testada ou atingida. Essa variável, juntamente com o KOW e a IDA, fornece uma indicação da propensão do produto à bioacumulação ( $K_{OW} \geq 3$  favorece a bioacumulação).

No que diz respeito aos efeitos aos organismos, a toxicidade depende das frações disponíveis e acessíveis do produto químico (biodisponibilidade e bioacessibilidade), que variam dependendo da estrutura química, das condições ambientais, da fisiologia dos organismos, das características do ciclo de vida, entre outros fatores (PHYU *et al.*, 2011).

A atividade microbiológica influencia os efeitos dos agrotóxicos, aumentando ou diminuindo sua toxicidade e potencial de bioacumulação e interferindo na biomagnificação na cadeia trófica (ZAGATTO, 2006). Porém, a bioacumulação e biomagnificação dependem de diferentes fatores tais como: a presença de mecanismo de absorção dos organismos, das propriedades físico-químicas do composto que podem favorecer ou não sua entrada no organismo e da taxa de entrada e depuração do contaminante pelo organismo (VALARINI *et al.*, 2003).

A utilização do conhecimento destes processos sobre os agrotóxicos é o que permite a recuperação ambiental sem necessidade de intervenção humana. Entretanto, a aplicação continuada de contaminantes principalmente em monoculturas poderá resultar, a longo prazo, na quebra da resistência dos agroambientes. Assim, quando se faz uso de agrotóxicos, é importante conhecer, além dos processos agronômicos, algumas variáveis químicas e ambientais do produto, procurando-se evitar problemas futuros. Eles podem servir de base para tomadas de decisão quando da aplicação de determinado produto em situações limite, tais como da proximidade de corpos d'água, lençol subterrâneo raso, cumulatividade do produto no meio, dentre outros. Além disso, essas variáveis normalmente fazem parte dos dados solicitados pelos simuladores matemáticos existentes no mercado que, que calculam os riscos de exposição a estes compostos (PESSOA *et al.*, 1999).

Em relação à toxicidade dos agrotóxicos, a intoxicação aguda ou crônica, depende de fatores como o grau da toxicidade do produto, a quantidade absorvida, o tempo e a via de exposição ao produto. A classificação dos agrotóxicos é baseada nos resultados de estudos de DL<sub>50</sub>. Os valores referentes à DL<sub>50</sub>, são usados para estabelecer as normas de segurança a serem seguidas para reduzir os riscos que o produto pode apresentar à saúde humana (MOUTINHO, 2016). A partir de tais estudos, os agrotóxicos são agrupados em faixas de classes toxicológicas utilizadas para fins de rotulagem e diferenciadas por cores em classes, de acordo com a sua toxicidade (expressa em termos de DL<sub>50</sub>).

ANVISA divulgou no dia 23 de julho de 2019 algumas mudanças na classificação toxicológica dos agrotóxicos. Segundo a Agência, o método internacional de classificação é mais restrito que o usado no Brasil atualmente, que trata o risco de morte e o de irritação grave da mesma maneira.

De acordo com a Lei 7.802, de 11 de julho de 1989, o registro de um agrotóxico é feito pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que examina a ação no combate a pragas e doenças no campo. Mas o registro só é concedido quando o produto também é aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que avalia os riscos à saúde, e pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), que analisa os perigos ambientais. Sem o aval dos três órgãos, O agrotóxico não é liberado.

Apesar disso, com o intuito de facilitar o uso indiscriminado dessas substâncias, a Câmara dos Deputados analisa uma nova proposta de lei, a PL 6299, que flexibiliza as regras de fiscalização e utilização de agrotóxicos no país. Pela proposta, o termo “agrotóxico” seria extinto e entraria em seu lugar o termo “produto fitossanitário”, o que dificultaria a percepção da população mais carente para o real perigo desses produtos. Além disso, a responsabilidade por conceder registros de novos agrotóxicos caberia ao Ministério da Agricultura que passaria a ter todo o poder decisório (LOPES-FERREIRA *et al.*, 2021). O IBAMA e o Ministério da Saúde teriam apenas a função de homologar pareceres técnicos, mas tais avaliações não seriam elaboradas por esses órgãos públicos. Caberia às próprias empresas interessadas em vender os agrotóxicos a missão de apresentar essas avaliações. Segundo o IBAMA e a ANVISA, a proposta deixa brechas para que sejam vendidos no mercado nacional produtos já banidos em boa parte do mundo, causadores de distúrbios hormonais, danos ao sistema reprodutivo, entre outros (ASCOM, 2019).

Para avaliar a contaminação por agrotóxicos dos alimentos comercializados, muitos países fazem análises sistemáticas. Cada Estado-Membro da União Europeia designa autoridades competentes à Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESA) afim de avaliar, anualmente, amostras de alimentos de origem vegetal coletados em cada Estado (EFSA, 2014). De forma semelhante, nos Estados Unidos o *Pesticide Data Program (PDP)* é encarregado a coletar e analisar produtos agrícolas que vão a mesa do consumidor (ROCHA, 2014). A ANVISA criou o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) para avaliar e controlar os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos de origem vegetal que chegam ao consumidor. Até o momento, o último relatório publicado (2013 a 2015), mostra que sempre houve uma porcentagem considerável de amostras apresentando índices acima dos limites máximos de resíduos (LMR). Na maioria dos casos a irregularidade se dá por presença de resíduos de agrotóxicos não autorizados para aquela determinada cultura (ANVISA, 2016).

### 3.2. CARBENDAZIM: CLASSIFICAÇÃO, CARACTERÍSTICAS E MECANISMO DE AÇÃO

O fungicida benzimidazólico [metil-2-benzimidazole-carbamato] (Figura 1), fórmula molecular  $C_9H_9N_3O_2$ , conhecido popularmente como carbendazim foi notícia internacional em janeiro de 2012, quando os EUA proibiram a importação do suco de

laranja brasileiro devido à presença deste fungicida. O carbendazim é um produto legalizado no Brasil e é utilizado no combate de pragas como a *Guignardia citricarpa* e *Colletotrichum acutatum* (KUPPER *et al.*, 2012).

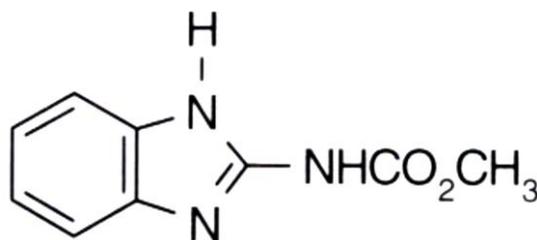


Figura 1. Fórmula estrutural do carbendazim (ANVISA, 2019a).

A introdução dos fungicidas sistêmicos do grupo dos benzimidazóis, desde a década de 60, tornou-se um marco na história do desenvolvimento dos fungicidas. Os benzimidazóis são usados no tratamento de sementes e de solos e em aplicações foliares (SILVA *et al.*, 1999). Dentre os fungicidas desse grupo, os mais utilizados são: benomil, tiofanato-metílico e carbendazim (MAZELLIER-LEROY; LEGUBE, 2002). No Brasil, os benzimidazóis são aplicados em culturas de algodão (sementes), citros (folhas), feijão (sementes e folhas), soja (sementes e folhas), trigo (folhas) e numa grande variedade de frutas e vegetais. Os limites máximos de resíduos e intervalos de segurança desses fungicidas em alimentos são estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2019a).

Carbendazim constitui o ingrediente ativo mais utilizado do grupo dos fungicidas benzimidazóis (BOUDINA *et al.*, 2003) utilizados pré e pós colheita, contra uma grande variedade de doenças, como as causadas pelos fungos *Ascomycetos spp.*, *Basidiomycetos* e *Deuteromycetos spp.* em culturas de frutas e vegetais (HUTSON; JEWESS, 1999), como banana, manga, morangos, laranjas, ananás, cereais, beterraba, plantas ornamentais, cana-de-açúcar, ervas medicinais e gramados (DEVI *et al.*, 2015). Além disso, o Carbendazim também é usado em tintas, indústrias têxtil, de papel e couro (SELMANOGLU *et al.*, 2001). Os exemplos de limites máximos de resíduos (LMR) em algumas culturas e os intervalos de segurança entre as aplicações deste fungicida (ANVISA, 2019a) estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Limites máximos de resíduos (LMR) permitidos nas monoculturas descritas e os intervalos de tempo de segurança entre as aplicações do carbendazim (ANVISA, 2019a).

Culturas	LMR (mg/kg)	Intervalo de Segurança
Citrus	5,0	7 dias
Feijão	2,0	14 dias
Soja	0,5	14 dias
Maça	5,0	14 dias
Trigo	0,1	35 dias

Os benzimidazóis atuam nos fungos pela inibição de proteínas específicas, chamadas de A e B tubulinas (DAVIDSE, 1988), que mediante polimerização constituem os microtúbulos (LEROUX, 2003). Quando essas proteínas entram em contato com tais fungicidas a formação dos microtúbulos é inibida. Como resultado as células não se dividem e passam a ser multinucleadas, levando o fungo à morte (BASF, 2006). Devido a utilização intensa, o carbendazim tornou-se poluente muito persistente tanto no solo quanto na água (FERNANDEZ *et al.*, 2001).

A duração do efeito do pesticida e sua permanência no meio ambiente estabelecem a persistência desse composto, que também é influenciada pela sua estrutura química (CARDOSO; NEVES, 1992) e condições abióticas e bióticas do meio ambiente (SILVA *et al.*, 1999). Na presença de luz e em diferentes condições ambientais, tais como alterações no pH e temperatura, sua estabilidade é afetada. Portanto, este é um dos fatores que leva o Carbendazim a ser encontrado no meio ambiente na forma de resíduos solúvel (LEE *et al.*, 2003). A tabela 2 mostra outras propriedades físico-químicas desse fungicida.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas do carbendazim (ANVISA, 2019a; FAO, 1998).

PROPRIEDADES	CARACTERÍSTICAS
Aparência	Sólido cristalino branco a 25 °C
Massa Molar (g.mol <sup>-1</sup> )	191,2
Ponto de ebulição (°C)	250
Pressão de Vapor (P <sub>0</sub> )	<1.10 <sup>-7</sup>
Solubilidade em água (CW <sub>sat</sub> )	8,0 mg L <sup>-1</sup>
Constante de adsorção (K <sub>oc</sub> )	-
Coefficiente de partição octanol-água (K <sub>ow</sub> )	1,49 log
Tempo de meia vida (T <sub>1/2</sub> )	6 a 12 meses no solo 2 a 25 dias na água (FAO, 1988)
Ingestão Diária Aceitável (IDA)	0,02 mg/kg (ANVISA, 2019a)

Classificação toxicológica	Classe III (pouco tóxico)
Classificação do potencial de periculosidade ambiental	Classe II (muito perigoso ao meio ambiente)

Os produtos formados a partir do processo de degradação dependem do meio onde ocorre a degradação. A forma como é absorvido e/ou eliminado muda conforme o ambiente em que sofreu a decomposição, se em animais, plantas ou solo. A degradação do carbendazim resulta na formação de 2-amino-benzimidazol (Figura 5), um agente altamente tóxico que se liga aos microtúbulos do fuso mitótico, causando o bloqueio da divisão nuclear (YENJERLA *et al.*, 2009). Sabe-se que o carbendazim manifesta embriotoxicidade, apoptose de células germinativas, teratogênese, infertilidade e desenvolvimento toxicidade em diferentes espécies de animais (YENJERLA *et al.*, 2009; RAMA *et al.*, 2014).

O carbendazim é conhecido por perturbar a dinâmica de montagem e desmontagem de microtúbulo. O carbendazim inibe a polimerização de microtúbulos em células de fungos e mamíferos, agindo com b-tubulina causando interrupção do conjunto de microtúbulos, o que leva à segregação prejudicada dos cromossomos durante a divisão celular (RAMA *et al.*, 2014).

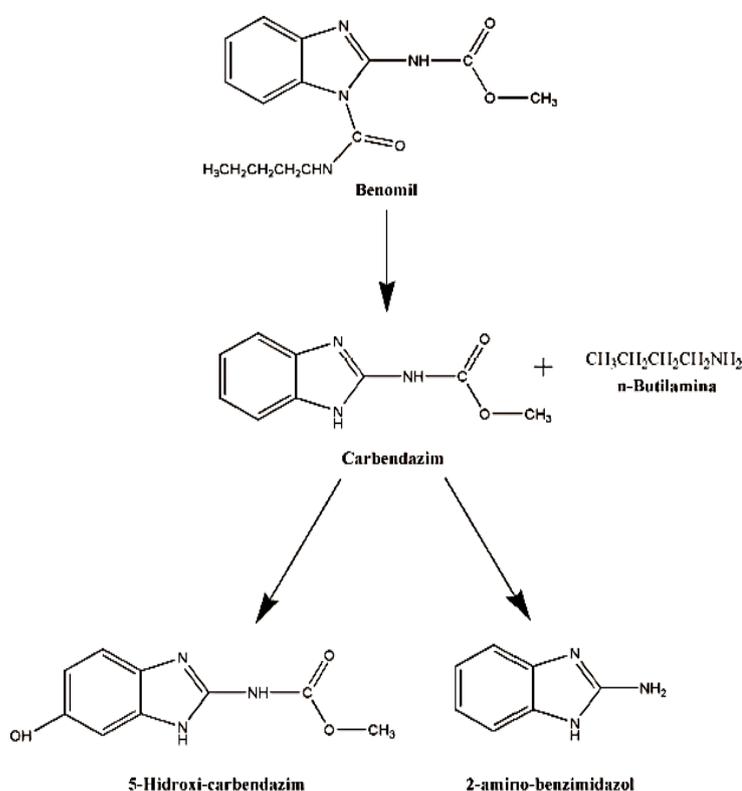


Figura 2. Mecanismo de biodegradação do carbendazim (Singh *et al.*, 2016).

O Carbendazim é altamente tóxico para a comunidade aquática: anfíbios (efeitos genéticos e mortalidade), plantas aquáticas (reprodução), crustáceos (mortalidade), peixes (bioacumulação e mortalidade), fungos, (desenvolvimento e reprodução), moluscos (intoxicação e mortalidade) e plâncton (intoxicação, crescimento, reprodução e mortalidade) (PAN, 2006). A maioria dos estudos disponíveis concentra-se nas comunidades de zooplâncton e macro invertebrados, nas quais a exposição crônica ao carbendazim diminuiu as taxas de sobrevivência, reprodução e alimentação (DAAM *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2011). Até onde sabemos, apenas dois estudos relatam efeitos do carbendazim nos estágios da primeira infância dos peixes. Ludwikowska *et al.*, (2013) mostraram que o carbendazim afeta o sucesso de sobrevivência e incubação das concentrações de embriões prussianos de carpa acima de 0,036 mg / L e Jiang *et al.*, (2014) demonstraram que a exposição embrionária ao carbendazim levou a significativas alterações na expressão de genes relacionados à apoptose, imuno-toxicidade e ruptura endócrina em *zebrafish* (*Danio rerio*). A pesquisa sobre as consequências ecológicas a longo prazo do Carbendazim em animais aquáticos, no entanto, ainda está no início (SINGH *et al.*, 2016).

### 3.3. FIPRONIL: CLASSIFICAÇÃO, CARACTERÍSTICAS E MECANISMO DE AÇÃO

O fipronil (5-amino-[2,6dicloro-4-(trifluorometil)-fenil]-4-trifluorometil-sulfinil-1H-pirazol-3carbonitrila) (Figura 3) é um inseticida descoberto e desenvolvido pela Rhône-Poulenc entre 1984 e 1987 e colocado no mercado em 1993. Ele é um novo membro da classe dos fenilpirazóis (BASF, 2008).

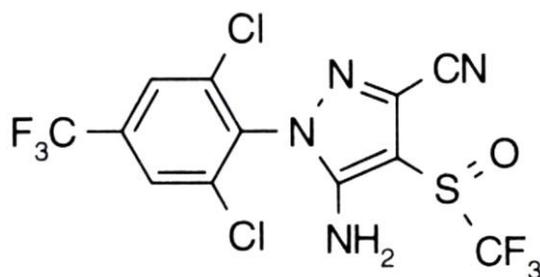


Figura 3. Fórmula estrutural do fipronil (ANVISA, 2019b).

O fipronil é utilizado em mais de 70 países e usado em mais de 100 diferentes tipos de culturas para o controle de pragas. No Brasil sua formulação é bastante abrangente, indo desde iscas atrativas para o controle de formigas até sprays

utilizados no controle de carrapatos e pulgas, além do controle de insetos e pragas na cultura de cana-de-açúcar (TINGLE *et al.*, 2000). Os exemplos de limites máximos de resíduos (LMR) em algumas culturas e os intervalos de segurança entre as aplicações deste inseticida, segundo índice monográfico da ANVISA (ANVISA, 2019b) estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Limites máximos de resíduos (LMR) permitidos nas monoculturas descritas e os intervalos de tempo de segurança entre as aplicações do fipronil (ANVISA, 2019b).

Culturas	LMR (mg/kg)	Intervalo de Segurança
Arroz	0,01	30 dias
Feijão	0,01	14 dias
Soja	0,01	60 dias
Cana-de-açúcar	0,03	60 dias
Batata	0,05	35 dias

O fipronil pode ser utilizado em doses muito baixas até muito altas para controle efetivo de insetos resistentes ou tolerantes a outras famílias de inseticidas como os organofosforados, piretróides e carbamatos, atualmente há uma grande preocupação com a toxicidade do fipronil, principalmente em respeito às abelhas (AMARAL, 2012).

O fipronil apresenta solubilidade de 0,0024 g.L<sup>-1</sup> em água no pH 5,0 e 0,0022 g.L<sup>-1</sup> no pH 9,0, sendo altamente solúvel em solventes orgânicos (545,9 g.L<sup>-1</sup> em acetona) (BASF, 2008). Assim, o fipronil apresenta um caráter hidrofóbico, com forte adsorção no solo ou sedimento, sendo ligeiramente móvel em água. É estável em meio aquoso ácido e neutro e, em meio alcalino, ele é suscetível à reação de hidrólise, formando uma amida. Na tabela 4 estão outras propriedades físico-químicas importantes desse inseticida.

Tabela 4. Propriedades físico-químicas do fipronil (ANVISA, 2019b; TINGLE *et al.*, 2000).

PROPRIEDADES	CARACTERÍSTICAS
Aparência	Sólido branco a 25 °C
Massa Molar (g.mol <sup>-1</sup> )	437
Ponto de ebulição (°C)	200
Pressão de Vapor (P <sub>0</sub> )	370

Solubilidade em água ( $CW_{sat}$ )	2,4 mg.L <sup>-1</sup>
Constante de adsorção ( $K_{oc}$ )	803
Coefficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ )	4,01 log
Tempo de meia vida ( $T_{1/2}$ )	113 a 350 dias no solo 123 dias na água (TINGLE <i>et al.</i> , 2000)
Ingestão Diária Aceitável (IDA)	0,0002 mg/kg (ANVISA, 2019b)
Classificação toxicológica	Classe II (moderadamente tóxico)
Classificação do potencial de periculosidade ambiental	Classe II (muito perigoso ao meio ambiente)

Esse inseticida é extremamente ativo e age no sistema nervoso central (SNC) do inseto. O ingrediente ativo do fipronil tem um modo de ação único e exclusivo, devido à especificidade e precisão do local alvo. A transmissão do impulso nervoso nas células do SNC acontece em função da diferença de concentração de íons dentro e fora dessas células. O estabelecimento do equilíbrio iônico nas células SNC é garantido graças ao GABA (Ácido Gama Amino Butírico), substância que regula o fluxo de íons cloreto através da membrana da célula nervosa (COLE *et al.*, 1993).

O ingrediente ativo do fipronil pode reverter a ação do GABA, modificando o equilíbrio iônico nas células do SNC, causando a morte dos insetos. O GABA é o principal neurotransmissor inibidor nos insetos, daí sua importância na regulação da atividade do SNC (GRANT *et al.*, 1998). Estudos em águas, solos e vegetações indicam que o fipronil sofre degradação química formando quatro possíveis produtos: amida, sulfeto, sulfona e dessulfenil. A Figura 4 apresenta as possíveis reações de degradação do fipronil e seus respectivos metabólitos (BOBÉ *et al.*, 1998).

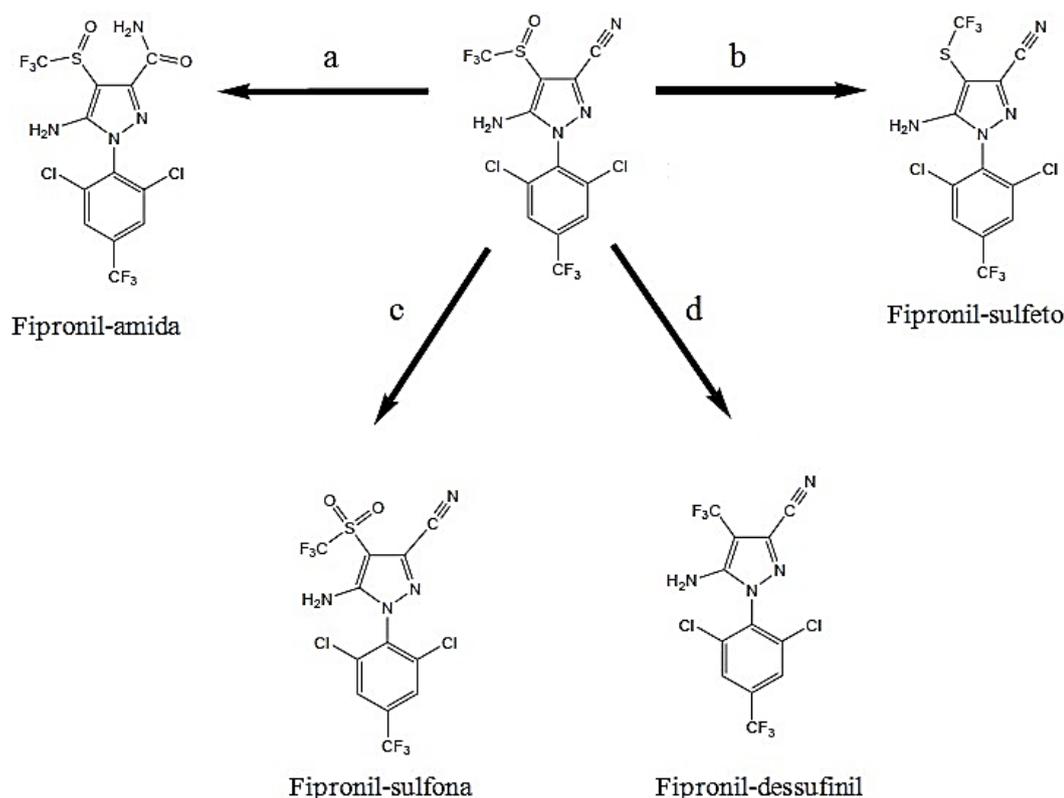


Figura 4. Caminhos de degradação do fipronil por: a) hidrólise, b) redução, c) oxidação e d) fotólise (BOBÉ *et al.*, 1998).

O composto derivado, o dessufinil é formado fotoquimicamente e seu surgimento é rápido. O derivado sulfeto é formado por redução e o metabólito sulfona é formado por oxidação do substituinte sulfinil (PEI *et al.*, 2004). O produto amida resulta da hidrólise do grupo nitrila do fipronil. Este metabólito apresenta uma polaridade maior que o fipronil e é mais solúvel em água, desta forma apresenta baixa afinidade pela matéria orgânica em comparação ao fipronil (MASSUT; MERMUT 2007). Mesmo quando usado de forma adequada, o fipronil pode contaminar o meio ambiente e gerar produtos de degradação mais tóxicos (AMARAL, 2012).

#### 3.4. SULFENTRAZONA: CLASSIFICAÇÃO, CARACTERÍSTICAS E MECANISMO DE AÇÃO

Um dos herbicidas pré-emergentes mais frequentemente usados em sistemas agrícolas é sulfentrazone N- [2,4-dicloro-5-[4-(difluorometil)-4,5-dihidro-3-metil-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-il]fenil] metanossulfonamida (Figura 5).

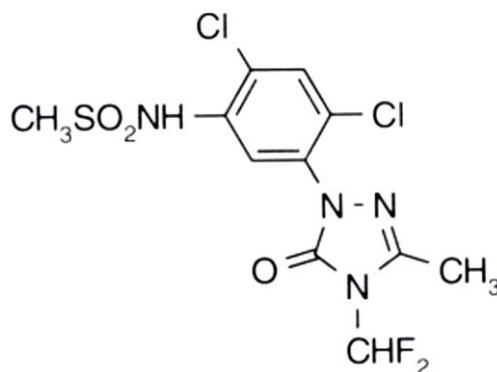


Figura 5. Formula estrutural do Sulfentrazone (ANVISA, 2018).

Esta molécula é recomendada para controle de ervas daninhas em culturas como como soja, cana-de-açúcar, café e eucalipto (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011). Os exemplos de limites máximos de resíduos (LMR) em algumas culturas e os intervalos de segurança entre as aplicações deste herbicida, segundo índice monográfico da ANVISA (ANVISA, 2018) estão descritos na tabela 5.

Tabela 5. Limites máximos de resíduos (LMR) permitidos nas monoculturas descritas e os intervalos de tempo de segurança entre as aplicações do sulfentrazone (ANVISA, 2018).

Culturas	LMR (mg/kg)	Intervalo de Segurança
Abacaxi	0,02	60 dias
Café	0,50	130 dias
Soja	0,10	60 dias
Cana-de-açúcar	0,05	60 dias
Citrus	0,10	200 dias

O sulfentrazone é um herbicida inibidor da PROTOX (protoporfirinogênio oxidase), registrado para aplicação em pré ou pós-emergência das ervas daninhas. Pertence ao grupo das Aril-triazolinonas (BLANCO; VELINI, 2005), e seu modo de ação caracteriza-se como destruidor de membranas celulares, inibindo a enzima PROTOX, envolvida na biossíntese de clorofila, e por consequência há o acúmulo de protoporfina IX, causando peroxidação do oxigênio e a destruição das membranas celulares (REDDY; LOCKE, 1998).

No Brasil, o sulfentrazone é amplamente utilizado em abacaxi, café, cana-de-açúcar, frutas cítricas, tabaco e safras de soja. Possui excelente atividade quando

aplicado em pré-emergência para controle de eudicotiledôneas ervas daninhas e várias espécies monocotiledôneas (AGROFIT, 2017). Além disso, nos últimos anos, tem sido utilizada como uma das alternativas no controle de biótipos resistentes ao glifosato em soja (MINOZZI *et al.*, 2014). Neste caso, o sulfentrazone é frequentemente usado em mistura com glifosato para um espectro de ação mais amplo, além de vantagens econômicas. Quando um agrotóxico é aplicado no campo, grande proporção atinge o solo onde vários fatores podem influenciar seu destino final. Alguns fatores dependem das propriedades intrínsecas do pesticida, outros fatores dependem das propriedades físico-químicas e biológicas que também são influenciadas por fatores climáticos, como precipitação e temperatura, bem como por práticas de cultivo e manejo do solo (OKADA *et al.*, 2016).

A movimentação do sulfentrazone nos solos é altamente influenciada por suas características químicas e físicas, principalmente o teor de argila e a matéria orgânica. Dessa forma, é necessário o conhecimento detalhado do tipo de solo para realizar recomendações técnicas desse herbicida, evitando os riscos de lixiviação e contaminação de lençóis freáticos e cursos de água. O sulfentrazone é muito móvel em solos arenosos e com baixo teor de matéria orgânica, podendo atingir camadas profundas do solo, reduzindo assim a eficácia do controle de plantas daninhas. Por esses motivos, o sulfentrazone não deve ser recomendado para solos com tais características físicas e químicas. Baixa sorção de sulfentrazone, juntamente com sua longa persistência, facilita sua mobilidade no perfil do solo, mostrados na tabela 6 (FREITAS *et al.*, 2014).

Tabela 6. Propriedades físico-químicas do sulfentrazone (ANVISA, 2018; RODRIGUES; ALMEIDA, 2005).

PROPRIEDADES	CARACTERÍSTICAS
Aparência	-
Massa Molar (g.mol <sup>-1</sup> )	228,31
Ponto de ebulição (°C)	-
Pressão de Vapor (P <sub>0</sub> )	1.10 <sup>-9</sup>
Solubilidade em água (C <sub>Wsat</sub> )	490 mg L <sup>-1</sup> , alta
Constante de adsorção (K <sub>oc</sub> )	43
Coefficiente de partição octanol- água (K <sub>ow</sub> )	1,48 log
Tempo de meia vida (T <sub>1/2</sub> )	110 a 220 dias no solo (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005)
Ingestão Diária Aceitável (IDA)	0,01 mg/kg (ANVISA, 2018)

Classificação toxicológica	Classe III (pouco tóxico)
Classificação do potencial de periculosidade ambiental	Classe II (muito perigoso ao meio ambiente)

Este herbicida pode apresentar alta persistência e mobilidade no solo e sistemas aquáticos (EPA, 2015), e possivelmente causar graves problemas ambientais, além de aumentar o risco de intoxicação de culturas sucessivas sensíveis (transporte ativo). Passos *et al.*, (2015), ao avaliar a lixiviação do sulfentrazone em diferentes solos brasileiros, incluindo alfissolo, ultissolo e ntissolo, detectou a presença do herbicida até a última seção testada (30 cm). Braga *et al.*, (2016) avaliaram a lixiviação de sulfentrazone em um ntissolo e um atossolo vermelho-amarelo, e detectou a presença do herbicida em uma profundidade de 45 e 35 cm, respectivamente. De maneira geral, a lixiviação do sulfentrazone aumenta com o aumento do índice pluviométrico mesmo em solos onde sua mobilidade é baixa (MONQUERO *et al.*, 2014).

### 3.5. O USO DE MISTURAS DE AGROTÓXICOS

A regulamentação do uso de agrotóxicos e a caracterização de seus riscos geralmente se baseiam em estudos que se concentram principalmente na sensibilidade de uma variedade de espécies representativas de diferentes níveis tróficos para um único produto químico. Em ambientes naturais, as espécies estão constantemente expostas a misturas complexas de agrotóxicos com constituintes adjuvantes variáveis e em diferentes concentrações e proporções, o que pode levar a efeitos aditivos ou produzir efeitos sinérgicos ou antagônicos (CEDERGREEN *et al.*, 2008; MANSANO *et al.*, 2017).

Diversos produtos tóxicos são oficialmente registrados e licenciados para uso em algumas culturas as quais não têm outro produto para o controle das pragas, porém, devido à sua alta eficácia, são aplicados em outras culturas para as quais não são recomendados. Além disso, buscando ainda maior eficiência, mais de um produto são por vezes aplicados simultaneamente e em doses maiores que as recomendadas pelo fabricante (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014) e por isso, atualmente, estudos com agroquímicos também estão levando em consideração as misturas de contaminantes que possivelmente ocorrem nos ecossistemas aquáticos (VAN DEN BRINK *et al.*, 2002; ZHOU *et al.*, 2010).

Além disso, embora a maioria dos estudos avalie apenas a toxicidade dos ingredientes ativos de agrotóxicos, as formulações comerciais incluem, além dos ingredientes ativos, surfactantes e outros ingredientes inertes, que podem contribuir significativamente para a toxicidade geral destes produtos (CEDERGREEN; STREIBIG, 2005). Por isso é crucial investigar os efeitos tóxicos dos ingredientes ativos de agrotóxicos em uma variedade de espécies, bem como os efeitos tóxicos relacionados com suas formulações comerciais, em exposições individuais e em mistura, a fim de fornecer informações mais realistas sobre os impactos tóxicos de agrotóxicos em organismos sensíveis não-alvo (MOREIRA *et al.*, 2017).

Reconhecendo-se que nos ecossistemas naturais os organismos são frequentemente expostos a um coquetel de produtos químicos, um desafio importante é estimar os efeitos interativos de produtos químicos para melhorar a avaliação de risco ambiental. Além disso, o *Framework for Cumulative Risk Assessment* ressalta a necessidade de analisar os riscos combinados para a saúde humana de múltiplos estressores ao meio ambiente (USEPA, 2003).

Nos últimos 20 anos, a relevância da toxicidade da mistura tem alcançado uma aceitação crescente em ecotoxicologia. Vighi *et al.*, (2003) enfatizou o problema dos coquetéis de substâncias e a qualidade da água. Além desse progresso, na maioria dos casos os contaminantes são regulados com base em uma única substância e não como misturas. Para as baixas concentrações, na faixa de miligramas (mg) nas quais os produtos químicos se encontraram no ambiente uma avaliação de risco baseada unicamente em uma toxicidade de substâncias únicas é muito difícil, uma vez que as concentrações dos testes em testes agudos de embriões de peixes geralmente deveriam estar no intervalo de mg baixo para desencadear efeitos agudos e, portanto, a transferibilidade é desafiadora. Mas como é sabido que a ação genotóxica ou endócrina das substâncias podem ter efeitos adversos mesmo em concentrações muito baixas. Sabe-se que muitas substâncias que contaminam o meio ambiente são encontradas em baixas concentrações, causando aos organismos expostos efeitos crônicos, seria negligente ignorar o risco das misturas destas substâncias, mesmo sendo encontradas baixas concentrações (SILVA *et al.*, 2002).

Os ambientes aquáticos são frequentemente contaminados com agrotóxico de diferentes fontes, principalmente do escoamento agrícola, constituindo um potencial perigo para organismos não-alvos. Esses organismos raramente são expostos a um

único contaminante, mas geralmente a misturas de vários agrotóxicos com constituintes variados em diferentes concentrações e proporções (FAUST *et al.*, 2003; SCHULER; RAND, 2008). As misturas podem levar a efeitos aditivos induz efeitos mais graves (sinérgicos) ou menos graves (antagônicos) (LIU *et al.*, 2013;).

No entanto, considerando que os organismos do ecossistema são constantemente expostos a misturas complexas de substâncias tóxicas (CEDERGREEN *et al.*, 2008; PAVLAKI *et al.*, 2011), algumas ferramentas são utilizadas (JONKER *et al.*, 2005) para prever e avaliar de maneira mais realista o comportamento dos contaminantes quando eles ocorrem juntos no ambiente. Em condições reais, os compostos podem interagir entre si, modificando a amplitude e às vezes a natureza do efeito tóxico. Podem ocorrer interações na fase toxicocinética (processos de captação, distribuição, metabolismo e excreção) ou na fase toxicodinâmica (efeitos de substâncias químicas no receptor, alvo celular ou órgão) (CASSEE *et al.*, 1998).

### 3.6. CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA

Além de contaminar alimentos, resíduos de agrotóxicos podem contaminar os cursos d'água bem como a água que é fornecida à população. Diversos estudos feitos no Brasil e em outras partes do mundo detectaram agrotóxicos nos sistemas hídricos tanto superficiais quanto subterrâneos utilizados para consumo humano direto (BORSOI, 2019). Em 2008, o Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (SISAGUA), do Ministério da Saúde, demonstrou que somente 24% dos sistemas de abastecimento de água (SAA) cadastrados (referentes às médias de 16 unidades da federação) apresentavam informações sobre o controle da qualidade da água para os parâmetros agrotóxicos. Além disso, 11 estados não realizaram tais análises e/ou não alimentaram o referido sistema de informações com dados em 2008 (QUEIROZ, 2012).

Portanto, é evidente a precariedade dos mecanismos de vigilância da saúde em que há poucas ações de monitoramento das agências de vigilância, seja pela grande extensão do país, o que dificulta um controle adequado, ou pela falta de punições pelo uso indiscriminado (CARNEIRO, 2015). Outro agravante que se deve mencionar é que em um estudo publicado pelo Atlas “Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia”, apontou que 79% dos agrotóxicos utilizados no

Brasil estão concentrados em 4 tipos de plantas: soja (52%), milho e cana de açúcar (10%), e algodão (7%) (BOMBARDI, 2017).

De acordo com dados de monitoramento do Ministério da Saúde (Figura 6), 1 em cada 4 das localidades avaliadas apresenta uma mistura de agrotóxicos. No período entre 2014 e 2017 as empresas responsáveis pelo abastecimento de 1.396 municípios detectaram concentrações que ultrapassavam os limites máximos permitidos de 27 agrotóxicos e os relatórios com as informações fizeram parte do Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (SISAGUA) para monitorar a qualidade da água para além dos parâmetros usuais de potabilidade feitos pelas empresas de abastecimento (AGÊNCIA PÚBLICA, 2019).

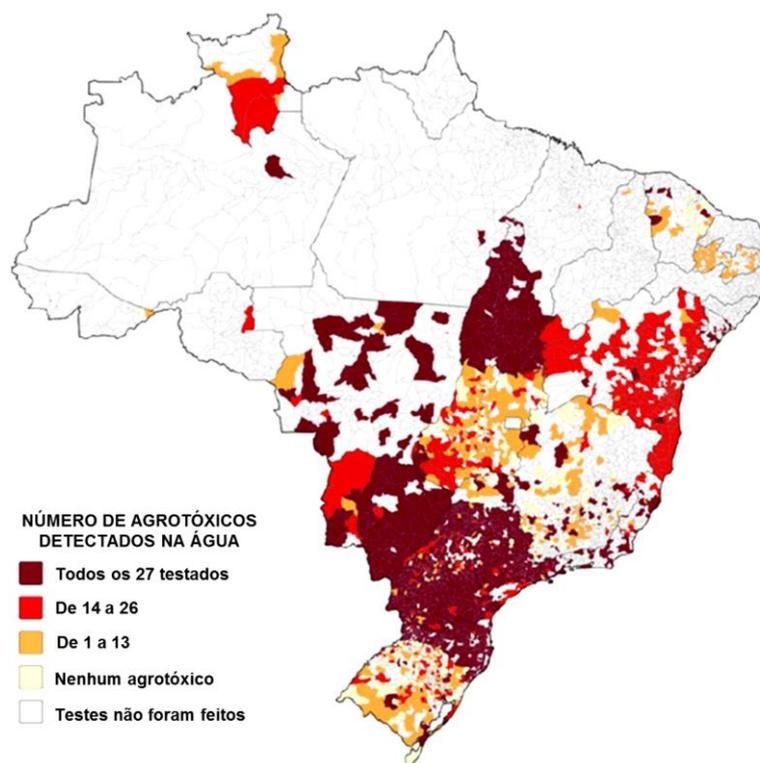


Figura 6. Detecção dos números de agrotóxicos de 2014 a 2017 encontrados na água. O mapa foi construído com base nos dados obtidos em abril de 2018, não refletem atualizações posteriores (AGÊNCIA PÚBLICA, 2019).

O levantamento demonstra que a contaminação da água que abastece a população está aumentando progressivamente. Em 2014, três quartos dos testes detectaram agrotóxicos, subindo para 84% em 2015, 88% em 2016 e alcançando 92% em 2017. Entre os agrotóxicos encontrados em mais de 80% das amostras, existem cinco classificados como “prováveis cancerígenos” pela USEPA e seis

apontados pela União Europeia como desreguladores endócrinos (LOPES-FERREIRA *et al.*, 2021).

O estado de São Paulo foi o recordista em número de municípios onde todos os 27 agrotóxicos testados estavam presentes na água, com mais de 500 cidades avaliadas. O Paraná foi o segundo colocado com o coquetel presente em 326 cidades, seguido por Santa Catarina e Tocantins (Agência Pública, 2019). No mapa, observamos que o monitoramento não é homogêneo ao longo do país, revelando uma compreensão apenas parcial dessa problemática. Muitas outras cidades devem apresentar dados tão ou mais preocupantes, no entanto não foram monitoradas (LOPES-FERREIRA, 2021).

A forma de entrada dos agrotóxicos no ambiente aquático depende, em grande parte, da dinâmica destes compostos com o solo. Para compostos com alta solubilidade em água, é facilmente carregado através da lixiviação, escoamento superficial, infiltração no perfil do solo, escoamento superficial, que são oriundos de áreas de atividades agrícolas e/ou agropecuária, deriva, descarga de efluentes industriais, de manufatura de agrotóxicos ou de esgoto sanitário, até a aplicação direta para o controle de organismos aquáticos prejudiciais (SASAL *et al.*, 2010).

O uso em larga escala destes produtos representa um grande problema de contaminação água. Matviishyn (2014), explica que uso extensivo de agrotóxicos, leva a modificações na composição química dos sistemas aquáticos naturais que causam toxicidade crônica à fauna de água doce, especialmente aos peixes. Sobre as características do produto, Moura (2008) esclarece que estas moléculas têm grande probabilidade de contaminar os recursos hídricos, graças a características como alto potencial de deslocamento no perfil do solo (lixiviação), elevada persistência no solo, moderada solubilidade em água e adsorção moderada à matéria orgânica presente no solo. Machado (2004) enfatiza que a liberação de grandes volumes de resíduos por parte das indústrias formuladoras de defensivos agrícolas (fitossanitários), como o acúmulo de substâncias persistentes tóxicas no solo, são fatores preocupantes, em razão das consequências ambientais provocadas.

Os ecossistemas aquáticos tropicais compõem grandes reservatórios de biodiversidade, mas atualmente são expostos a várias ameaças por serem receptores temporários ou finais de grande quantidade e variedade de poluentes, sejam eles lançados ao ar, ao solo, ou diretamente nos corpos d'água (AGUILAR-ALBEROLA;

MESQUITA-JOANES, 2012). Quando atingem os ambientes aquáticos, os poluentes podem ter vários destinos, que dependem das propriedades físicas e químicas do composto, das características químicas, físicas e biológicas do ecossistema atingido, bem como da taxa de entrada do composto no ambiente (RAND, 1995). Tendo em vista isso, especialmente quando há grande proximidade entre um agroecossistema e ambientes aquáticos, os riscos de contaminação são iminentes (ABHILASH; SINGH, 2009). Um dos maiores problemas relacionados com o uso dos agrotóxicos é que, por não serem completamente seletivos (SCHREINEMACHERS; TIPRAQSA, 2012).

Os agrotóxicos afetam ainda a dinâmica das populações (reprodução, migração, restabelecimento e mortalidade), a estrutura e função das comunidades (alteração na diversidade de espécies, modificações na relação predador-presa) e alteram os serviços ecossistêmicos (alterações nos processos de respiração e fotossíntese e no fluxo de nutrientes) (SILVA *et al.*, 2013). Os efeitos ocasionados à saúde humana também estão intimamente relacionados à contaminação aquática por agrotóxicos, como, por exemplo, os neurológicos (MEYER-BARON *et al.*, 2015), mutagênicos (SALEEM *et al.*, 2014) e perda de qualidade da água como um recurso para o ser humano (SILVA; SANTOS, 2007).

Os agrotóxicos podem causar efeitos nocivos a diferentes níveis de organização biológica, em níveis de organização mais simples (e.g. respostas moleculares e celulares, alterações bioquímicas e fisiológicas), os efeitos acontecem de maneira mais rápida. Em níveis superiores de organização (indivíduo, população e comunidade), diversos estudos comprovaram impactos negativos dos agrotóxicos, como a redução do número de espécies, alterações comportamentais, reprodutivas e de desenvolvimento, suscetibilização a doenças, distúrbios em processos ecológicos, como por exemplo, na atividade de decomposição, que conseqüentemente afetará a sustentabilidade da cultura ou do ambiente em longo prazo (MANSANO *et al.*, 2016; NOVELLI *et al.*, 2012).

A maioria dos estudos sobre a toxicidade e avaliação de risco de agrotóxicos para os ecossistemas aquáticos foi realizado em países da região temperada (RACKE, 2003). Conseqüentemente, as avaliações de risco aquático nos países tropicais geralmente dependem de dados de regiões temperadas, embora o destino e os efeitos dos agrotóxicos possam diferir entre regiões climáticas (DAAM; VAN DEN

BRINK, 2010). Isso implica pouco realismo ecológico das atuais avaliações de risco em região tropical e o risco estimado com base em valores que não ocorrem sob as condições tropicais (SILVA; VAN GESTEL, 2009).

As condições geoclimáticas de cada ecossistema influenciam diretamente nos efeitos tóxicos dos agrotóxicos aos organismos não-alvo (SANCHEZ-BAYO; HYNNE, 2011). Além disso, outros fatores podem influenciar, como a maior frequência de aplicação e durante uma maior parte do ano em países de regiões tropicais, em comparação com aqueles de regiões temperadas (SATAPORNVANIT *et al.*, 2004). Esta exposição repetida pode dificultar a recuperação dos organismos afetados nos intervalos entre as aplicações, levando a comunidades a serem cronicamente afetadas (DAAM; VAN DEN BRINK, 2010). Por exemplo a aplicação via spray-drift pode ser mais severa nos trópicos porque agrotóxicos são frequentemente aplicados muito perto dos ecossistemas aquáticos (DAAM; VAN DEN BRINK, 2010). Além destes contrastes, o uso de agrotóxicos também acaba afetando diretamente a reprodução de animais aquáticos e sua sobrevivência, ocasionando a morte de plantas que são responsáveis por fornecer até 80% do oxigênio dissolvido para a vida aquática, provocando a diminuição dos níveis de oxigênio dissolvido e causando a asfixia desses animais (HERFRICH, 2009).

### 3.7. O MODELO ANIMAL ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*) E SEU USO NAS PESQUISAS CIENTÍFICAS

O uso de peixes como modelos animais para pesquisa acontece a quase 200 anos (HUNN, 1989). O peixe dourado (*Carassius auratus*) pode ser considerado o modelo de peixe mais antigo, e seu uso na toxicologia aquática é documentada pelo menos desde meados do século 18 (PENNY; ADAMS, 1863). Nos últimos 30 anos ou mais, várias espécies de peixes têm sido cada vez mais utilizadas como modelo. Com base no número de artigos publicados em diferentes áreas de pesquisa, as espécies de peixes modelo mais populares são o *zebrafish* (*Danio rerio*), o peixe dourado (*Carassius auratus*), o medaka (*Oryzias latipes*), a barata (*Rutilus rutilus*), o esganagato (*Gasterosteus aculeatus*), o baiacu (*Takifugu rubripes*) e o peixe espada (*Xiphophorus hellerii*) (RIBAS; PIFERRER, 2013).

O *zebrafish* se tornou, sem dúvida, o peixe modelo mais popular em muitos campos de pesquisa, especialmente para biologia do desenvolvimento, toxicologia e

pesquisa genética (HAFFTER *et al.*, 1996). O peixe dourado tem sido usado como modelo para pesquisas nos campos relacionados ao crescimento, estresse, imunologia ou reprodução (CHANG *et al.*, 2009). Medaka é usado para resolver questões relacionadas com genética, reprodução e desenvolvimento (KONDO *et al.*, 2009), enquanto os esgana-gato são amplamente utilizados para estudos relacionados à evolução, adaptação e especiação (CRESKO *et al.*, 2007). O baiacu, por exemplo, é considerado um bom modelo para estudos genômicos, mas devido à dificuldade de reprodução em cativeiro, não é usado para outras aplicações que envolvam a manutenção muitos indivíduos vivos (CRNOGORAC-JURCEVIC *et al.*, 1997).

*Danio rerio* (zebrafish) é um pequeno teleosteo (3-5 cm) de água doce, membro da família Cyprinidae (Figura 10) (SPENCE *et al.*, 2008). Seu habitat natural é o norte da Índia, Bangladesh, e partes do sul do Nepal. O nome Danio deriva de “*dhan*” (Bengali), que significa “do campo de arroz”, por ser encontrado em abundância nestas plantações (ENGESZER *et al.*, 2007; SPENCE *et al.*, 2008).



Figura 7. Casal de zebrafish (Autor, 2021).

O antigo nome científico era *Brachydanio rerio*, porém foi alterado para *Danio rerio* em 1981 (CHU, 1981), porque ambos os gêneros eram muito semelhantes por terem barbatanas dorsais curtas e linhas laterais ausentes ou incompletas (FANG, 2003). A filogenética do zebrafish e seus relacionamentos evolutivos dentro de outros membros do gênero *Danio* gerou algumas controvérsias durante os anos (MAYDEN *et al.*, 2007). Uma análise geográfica em grande escala da variação genética entre as populações de zebrafish selvagens foi comparada com a exibida em várias cepas de

laboratório comumente usadas. Resultados mostram que as populações selvagens eram geneticamente distintas das cepas dos peixes de laboratório, evidenciado que a variação genética que existe no *zebrafish* selvagem está não é encontrada nas cepas de laboratório (WHITELEY *et al.*, 2011). Assim, o *zebrafish* selvagem e o criado em laboratório pode ter valores ligeiramente diferentes para as mesmas variáveis ambientais.

Possuem um padrão específico de listras horizontais, e a coloração destas podem alterar de mais claras a mais escuras dependendo das circunstâncias e do ambiente em que se encontram. Quando agressivo mostra, simultaneamente, nadadeiras abertas e coradas e as listras horizontais rutilantes (MILLER; GERLAI, 2007; SPENCE *et al.*, 2008). Como em muitos teleósteos, os melanóforos (células de pigmentação) podem se concentrar mais ou dispersar em resposta a estímulos, como a intensidade de luz (LARSON *et al.*, 2006).

O *zebrafish* é uma espécie que forma cardume, ou seja, forma um grupo que permanece unido por razões sociais para buscar alimento, se proteger do predador e acasalar (MILLER; GERLAI, 2007). Apresenta uma atividade natatória intermitente (MCHENRY; LAUDER, 2005). Nadam em cardume, para uma mesma direção de forma coordenada, comportamento este inato (SPENCE *et al.*, 2008) e visível logo após a eclosão dos ovos (ENGESZER *et al.*, 2007). Mesmo quando criados em isolamento, rapidamente formam cardumes quando são postos juntos (KERR, 1963).

O *zebrafish* é encontrado normalmente nadando na superfície da água onde busca alimento, mas quando ameaçado por seus predadores naturais simpátricos (estímulo aversivo), dentre eles aves ou peixes maiores, muda seu comportamento e desenvolve uma resposta antipredatória. Reações de alarme (resposta endócrina) ocorrem a partir do primeiro contato com o estímulo aversivo ou a um ambiente novo e evocam características comportamentais que podem ser observadas e quantificadas em laboratório, como: fuga do predador/locomoção aumentada; ficam imóveis por vários minutos; apresentam movimentos erráticos; ficam no fundo do aquário; se agrupam formando um denso cardume; ficam pálidos e algumas vezes pulam para fora dos aquários (SPEEDIE; GERLAI, 2008; GERLAI, 2010). Estas reações apresentam grande valor adaptativo à medida que leva o animal a se proteger de situações prejudiciais ou danosas (GRAEFF, 2004).

Conhecendo sua etologia, ou seja, seu repertório de padrões comportamentais, tem crescido a utilização do *zebrafish* em pesquisas comportamentais para avaliação de substâncias tóxicas, além do seu uso clássico, proposto por George Streisinger há mais de 30 anos atrás, como modelo de estudo da biologia do desenvolvimento (KARI *et al.*, 2007; EGAN *et al.*, 2009).

Os principais benefícios do uso do *zebrafish* como modelo toxicológico em relação a outras espécies de vertebrados são exatamente: seu tamanho, a facilidade de manejo e criação e o desenvolvimento precoce. O pequeno tamanho do peixe juvenil (14 mm) e adulto (de 4 a 5 cm) reduz muito o espaço de acomodação e os custos de criação. Do ponto de vista genético o *zebrafish* tornou-se atrativo por ser útil como intermediário entre os invertebrados (*Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*) e os roedores (NINKOVIC; BALLY-CUIF, 2006). Sendo seu genoma completamente conhecido e possuindo 25 pares de cromossomos contendo 26.000 genes codificantes de proteínas (HOWE *et al.*, 2013).

A grande maioria dos genes descobertos nesta espécie são evolutivamente conservados e tem homólogos em mamíferos (PARNG *et al.*, 2002). O grau de homologia é de 70-80%, permitindo a extrapolação dos resultados encontrados nesta espécie em relação a humanos de maneira mais direta do que aqueles obtidos em invertebrados (PARNG *et al.*, 2002; NINKOVIC; BALLY-CUIF, 2006) e de forma mais econômica em relação a roedores. Em 2001, o Instituto Sanger em Cambridge iniciou o sequenciamento do genoma desta espécie ([http://www.sanger.ac.uk/projects/D\\_rerio](http://www.sanger.ac.uk/projects/D_rerio)) (SPENCE *et al.*, 2008). Há também uma rede de informações, o ZFIN (<http://zfin.org>), na qual laboratórios do mundo inteiro podem depositar diferentes informações a respeito dessa espécie (SPRAGUE *et al.*, 2001).

Desde 1981, quando Streisinger *et al.*, (1981) produziram um diplóide homocigoto para análises genéticas do desenvolvimento, o *zebrafish* vem sendo utilizado como um organismo-modelo para o estudo da frequência de mutações em resposta a contaminantes ambientais com potencial carcinogênico e teratogênico, bem como para descobrir os mecanismos de ação e efeitos específicos de contaminantes.

A Organização Internacional de Normatização (*International Organization for Standardization* - ISO) publicou pela primeira vez o teste de toxicidade em *zebrafish*

em 1984. Posteriormente, vários países promulgaram sua própria lei de normatização do teste de toxicidade usando *zebrafish* de acordo com a ISO 7346-1996, como o padrão britânico BS/EN/ISO 7346-3-1998, o padrão alemão DIN/EN/ISO 7346-3-1998 e o padrão chinês GB/T 13267-91. No Brasil, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), responsável pelo desenvolvimento de protocolos de testes de toxicidade, padronizou o uso de peixes pertencentes à família Cyprinidae em 2016 como *Pimephalis promelas* e *Danio rerio* (NBR 15088:2016) para testes de toxicidade aguda.

O *zebrafish* tem um ciclo de vida muito mais curto, atingindo maturidade sexual por volta do 3º mês de idade (Figura 8). Os *zebrafish* são peixes assíncronos, com folículos em todos os estágios de desenvolvimento nos ovários (CLELLAND; PENG, 2009). Nos selvagens, os *zebrafish* são principalmente criadores anuais e a fase de desova começa um pouco antes da monção (agosto), em um momento de altas temperaturas e disponibilidade de alimentos (TALLING; LEMOALLE, 1998), embora no inverno as fêmeas já possuam oócitos maduros (ou seja, ovulados) (SPENCE *et al.*, 2006). A desova na natureza, bem como em cativeiro (DARROW; HARRIS, 2004) é limitada a um curto período ao amanhecer. Em condições de laboratório, foi registrado que a atividade máxima de desova é durante os primeiros 30 minutos após as luzes serem acesas e continua por cerca de uma hora (DARROW; HARRIS, 2004).



Figura 8. Fases de vida do *zebrafish*. (Autor, 2021).

O *zebrafish* não tem cuidado parental com os ovos, que são depositados sobre o substrato com vegetação aquática e, de preferência, em águas rasas águas (ADATTO *et al.*, 2011). Dados recentes mostraram que a incubação não depende apenas da temperatura, mas também segue um padrão rítmico sincronizado com a fase de luz e que a maioria dos ovos chocam por volta de 2 horas pós fertilização, em temperatura constante em 28 ° C, 79,2 % dos ovos fertilizados eclodiram 50 horas após fertilização (VILLAMIZAR *et al.*, 2012).

O estágio larval dura até 2 semanas, antes do começo da metamorfose, que envolve mudanças em uma variedade de características. Estes incluem a absorção das barbatanas larvais, o tubo intestinal desce ventralmente e o início do desenvolvimento de escamas e dos padrões de pigmentação (FUIMAN *et al.*, 1998; LEDENT, 2002). No entanto, há uma falta de dados para revelar o início preciso e a cessação de tais mudanças de desenvolvimento (PARICHY *et al.*, 2009). Entram na fase juvenil no início da 4ª semana quando o padrão dorsal do pigmento é formado (PARICHY; TURNER, 2003). Os peixes juvenis crescem exponencialmente, e a puberdade é alcançada aproximadamente 45 dias pós fecundação (CHEN; GE, 2013).

Os *zebrafish* selvagens e domesticados parecem atingir a maturidade reprodutiva em tamanhos semelhantes, geralmente em torno de 3-4 meses de idade, embora tenha sido relatado com a idade de 2 meses (LAWRENCE *et al.*, 2012). Eles podem se reproduzir até 42 meses, mas a vida média é de 36 meses. O *zebrafish* registrado mais antigo viveu até 58 meses e, portanto, pode-se dizer que o máximo a vida útil é de aproximadamente 4 anos (GERHARD *et al.*, 2002).

Apesar do *zebrafish* ser uma espécie exótica no Brasil, estudos tem demonstrado que sua utilização como organismo teste é viável. Zagatto e Bertolleti (2008) realizou levantamento sobre sensibilidade de algumas espécies de peixes para realização de ensaios toxicológicos, foram utilizados *Danio rerio* (*zebrafish*), *Poecilia reticulata* (guarú), *Hemigrammus marginatus* (bandeirinha) e *Serrapinnus notomelas* (piabinha) e o autor concluiu que as espécies introduzidas *Danio rerio* e *Poecilia reticulata*, poderiam substituir as espécies nativas nos ensaios de toxicidade.

Observou-se que os estágios iniciais da vida dos peixes são geralmente mais sensíveis a compostos tóxicos em comparação com adultos e juvenis, então os embriões de *zebrafish* oferecem um bom modelo para investigar as avaliações de risco ecológico e ajudam a determinar os processos críticos de desenvolvimento neurológico. Atualmente, a abordagem alternativa mais promissora para a toxicidade aguda dos peixes com peixes vivos é o teste com embriões o Fish Embryo Test (FET) (COOK *et al.*, 2005). O FET é um componente obrigatório na rotina de efluentes na Alemanha desde 2005 (DIN, 2001). O teste de efluentes com embriões de *zebrafish* tem sido padronizado a um Nível ISO (2007), e uma versão modificada foi feita pela

Agência Federal Alemã para o Meio Ambiente (UBA) como um projeto de alternativa ao teste químico com peixes adultos (BRAUNBECK *et al.*, 2005).

Ambos os embriões (ovos) e eleuteroembriões (o intervalo de vida entre a eclosão e o início da alimentação exógena) são considerados alternativas no contexto da legislação europeia (EFSA, 2005). Além de parâmetros como adequação, confiabilidade e reprodutibilidade, tanto do ponto de vista científico como do ponto de vista regulamentar, características importantes para que o teste seja aceito como alternativa de um teste convencional é a correlação entre os resultados obtidos no teste alternativo e o teste a ser substituído. O FET mostrou sensibilidade, reprodutibilidade e adaptabilidade, encontrando caminho para os laboratórios, não só para produtos químicos fortes, mas também para investigações em amostras ambientais, (ex.: sedimentos ou partículas suspensas) (HALLARE *et al.*, 2005).

As fêmeas podem desovar cerca de trezentos embriões por acasalamento, atribuindo alta fecundidade à espécie (WESTERFIELD, 1995). Os embriões, assim como as larvas, são transparentes tornando a microscopia de luz uma útil ferramenta de análise (MEYERS, 2018). A embriogênese ocorre *ex vivo* e se completa com 3 dias após a fertilização (MURAYAMA *et al.*, 2006). Sua transparência óptica permite fácil acompanhamento do desenvolvimento, identificação de características fenotípicas normais ou alteradas durante a triagem e avaliação dos pontos finais da toxicidade durante o teste de toxicidade. Além disso, o uso de embriões de *zebrafish* atende aos princípios de redução, substituição e refinamento proposto para o uso racional de animais experimentais, conhecido como Princípio dos 3R's (*Replacement, Reduction and Refinement*).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHILASH, P. C.; SINGH, N, Pesticide use and application: an Indian scenario. **Journal of hazardous materials**. v. 165, p. 1 – 12, 2009.

ADATTO, I. *et al.*, A new system for the rapid collection of large numbers of developmentally staged *zebrafish* embryos. **PLoS ONE** 6, n. 21715, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Seminário sobre mercado de agrotóxicos em 2012**. Brasília, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxico em Alimentos - PARA**. Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 – 2015, Brasília, 2016.

AGÊNCIA PÚBLICA. **“Coquetel” com 27 agrotóxicos foi achado na água de 1 em cada 4 municípios**. 2019. Disponível em: <<https://apublica.org/2019/04/coquetel-com-27-agrotoxicos-foi-achado-na-agua-de-1-em-cada-4-municipios-consulte-o-seu/>>. Acessado: 28 de setembro de 2019.

AGUILAR-ALBEROLA, J. A.; MESQUITA-JOANES, F. Acute toxicity tests with cadmium, lead, sodium dodecyl sulfate, and *Bacillus thuringiensis* on a temporary pond ostracod. **International Review of Hydrobiology**. v. 97, n. 4, p. 375 - 388, 2012.

ASCOM AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Agrotóxicos: Anvisa é contrária ao PL 6299/02**. 2019. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/noticias/sset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/agrotoxicos-anvisa-e-contraria-ao-pl-6290219201/pop\\_up?\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_viewMode=print&\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_languageld=pt\\_BR](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/sset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/agrotoxicos-anvisa-e-contraria-ao-pl-6290219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageld=pt_BR)>. Acesso em: 07 de novembro de 2019.

BASF. The Chemical Company. **Informativos técnicos: modo de ação - benzimidazóis**. Disponível em: <[http://www.agro.basf.com.br/produtos/informativo/fungicidas/modo\\_de\\_acao\\_princ/benzimidazoles/benzimidazoles.asp?area](http://www.agro.basf.com.br/produtos/informativo/fungicidas/modo_de_acao_princ/benzimidazoles/benzimidazoles.asp?area)> Acesso em: 09 novembro 2019.

BRAGA, D. F. *et al.*, Leaching of sulfentrazone in soils from the sugarcane region in the northeast region of Brazil. **Planta Daninha**, v. 34, n. 1, p. 161-169, 2016

BOBÉ, A. *et al.*, Behaviors of fipronil in soil under sahelian plain field conditions. **Pesticide Science**, v. 52, p. 275 - 281, 1998.

BORSOI, Z. M. F; TORRES, S. D. A. **A política de recursos hídricos no Brasil.** Disponível em: <[http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes\\_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/revista/rev806.pd](http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/revista/rev806.pd)> Acesso em: 01 de novembro de 2019.

BOUDINA, A. *et al.*, Photochemical behavior of carbendazim in aqueous solution. **Chemosphere**. v. 50, p. 649 - 655, 2003.

BRANDÃO, F. P. *et al.*, Short-term effects of neuroactive pharmaceutical drugs on a fish species: biochemical and behavioural effects. **Aquatic Toxicology**, v. 144 – 145, p. 218 – 229, 2013.

BRASIL. Ato nº 24, de 9 de abril de 2019. 2019. Disponível em: [http://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/70888852](http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/70888852). Acesso em: 3 setembro 2019

BRASIL, R. S. Avaliação da contaminação por organofosforados em águas superficiais no município de Rondinha - Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1631 - 1635, 2008.

BRAUNBECK, T. *et al.*, Towards an alternative for the acute fish LC<sub>50</sub> test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species — an update. **ALTEX 22**, p. 87- 02, 2005.

BRODEUR, J. C. *et al.*, Toxicities of glyphosate- and cypermethrin-based pesticides are antagonistic in the ten-spotted livebearer fish (*Cnesterodon decemmaculatus*). **Chemosphere**, v. 155, p. 429 – 435, 2016.

BROWN, C. D. *et al.*, Morphological and physico-chemical properties of British aquatic habitats potentially exposed to pesticides. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 113, p. 307 - 319, 2006.

CAJARAVILLE, M. P. *et al.*, The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of The Total Environment**, v. 247, v. 2 - 3, p. 295 – 311, 2000.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil.** Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE), 2002.

CANDIOTTO, L. Z. P. *et al.*, **Regulation and monitoring of pesticides residues in water and food in Brazil**. In: SACHAN, A.; HENDRICH, S. (Org.). Food toxicology: current advances and future challenges. Toronto; New Jersey: Apple Academic Press, 2018.

CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 1992.

CARNEIRO F. F. *et al.*, **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, São Paulo: Expressão Popular, 2015.

CEDERGREEN, N. *et al.*, A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 27, p. 1621 - 1632, 2008.

CEDERGREEN, N.; STREIBIG, J. C. The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: Assessment of predictive factors and hazard. **Pest Management Science**, v. 61, p. 1152 – 1160, 2005.

CHANG J. P. *et al.*, Signal transduction in multifactorial neuroendocrine control of gonadotropin secretion and synthesis in teleosts studies on the goldfish model. **General and Comparative Endocrinology**, v. 161, p. 42 - 52, 2009.

CHEN, W. T.; GE, W. Gonad differentiation and puberty onset in the *zebrafish*: evidence for the dependence of puberty onset on body growth but not age in females. **Molecular Reproduction and Development**, v. 80, p. 384 - 392, 2013.

CHU, X. L. A preliminary revision of fishes of the genus *Danio* from China. **Zoology Research**, v. 2, p. 145 – 156, 1981.

CLELLAND, E.; PENG, C. Endocrine/paracrine control of *zebrafish* ovarian development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 312, p. 42 - 52, 2009.

COLE, L. M.; NICHOLSON, R. A.; CASIDA, J. E. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. **Pesticide biochemistry and Physiology**, v. b46, p. 47 - 54, 1993.

COLÓN-CRUZ, L. *et al.*, Alterations of larval photo-dependent swimming responses (PDR): New *endpoints* for rapid and diagnostic screening of aquatic

contamination. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 670 - 680, 2018.

COOK, L. W.; PARADISE, C. J.; LOM, B. The pesticide malathion reduces survival and growth in developing *zebrafish*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 1745 - 1750, 2005.

CRESKO, W. A. *et al.*, Studies of threespine stickleback developmental evolution: progress and promise. **Genetica**, v. 129, p. 105 - 126, 2007.

CRNOGORAC-JURCEVIC, T. *et al.*, Tetraodon fluviatilis, a new puffer fish model for genome studies. **Genomics**, v. 41, p. 177 - 184, 1997.

DAAM, M. A.; VAN DEN BRINK, P. J. 2010. Implications of differences between temperate and tropical freshwater ecosystems for the ecological risk assessment of pesticides. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 24 - 37, 2010.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 12, p. 1296 - 1301, 2014.

DEMIRCI, Ö. *et al.*, Effects of endosulfan, thiamethoxam, and indoxacarb in combination with atrazine on multibiomarkers in *G. kischineffensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 749 – 758, 2018.

DARROW, K. O.; HARRIS, W. A. Characterization and development of courtship in *zebrafish*, *Danio rerio*. **Zebrafish**, v. 1, p. 40 - 45, 2004.

DAVIDSE, L. C. Benzimidazole fungicides: mechanism and modes of action. DELF, C.J. (ed). **Fungicide resistance in North America**, Saint Paul: American Phytopathological Society, 1988.

DEUBER, R. **Ciência das plantas daninhas, fundamentos**. FUNEP Jaboticabal. p. 43, 1992.

EGAN, R. *et al.*, Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in *zebrafish*. **Behavior Brain Research**, v. 205, n. 1, p. 38 – 44, 2009.

ENGESZER, R. E. *et al.*, *Zebrafish* in the wild: a review of natural history and new notes from the field. **Zebrafish**, v. 4, p. 21 -126, 2007.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. **EFSA identifies risks to bees from neonicotinoids. EFSA supporting publication**, 2013.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Harmonisation of human and ecological risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. **EFSA supporting publication**, n. 784, p. 39, 2014.

EUROPEAN FOOD SAFETY ADMINISTRATION – EFSA. Aspects of the biology and welfare of animals used for experimental and other scientific purposes. **EFSA Journal**, v. 292, p. 1 - 46, 2005.

FANG, F. Phylogenetic analysis of the Asian cyprinid genus *Danio* (Teleostei, Cyprinidae). **Copeia**, v. 52, p. 714 – 728, 2003.

FERNANDEZ, M.; RODRIGUEZ, R.; PICO, Y.; MANES, J. Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of post harvest fungicides in citrus fruits. **Journal of Chromatography A**, v. 912, p. 301 - 310, 2001.

FERRACINI, V. L.; PESSOA, M.C.Y.P. **Aspectos Toxicológicos e Ambientais dos Agrotóxicos Aplicados na Cultura do Melão**. Proteção Integrada da Planta. Brasília: EMBRAPA, cap. 20, p. 237-336, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. **Agricultural database**, 2003. Disponível em: < <http://www.fao.org>. > Acessado em: 03 de março de 2020.

FREITAS, M. A. M. *et al.*, Sorção do sulfentrazone em diferentes tipos de solo determinada por bioensaios. **Planta Daninha**, v. 32, n. 2, p. 385-392, 2014.

FUIMAN, L. A.; POLING, K. R.; HIGGS, D. M. Quantifying developmental progress for comparative studies of larval fishes. **Copeia**, v. 52, p. 602 - 611, 1998.

GABOARDI, S. C.; CANDIOTTO, L. Z. P.; RAMOS, L. M. Perfil do uso de agrotóxicos no Sudoeste do Paraná (2011-2016). **Revista NERA**, v. 22, n. 46, p. 13 – 40, 2019.

GEBLER, L. **Banco de Informações Ambientais e Toxicológicas dos Agrotóxicos Utilizados até a Safra 2002/2003 na Produção Integrada de Maçãs no Brasil**. Embrapa Uva e Vinho: Bento Gonçalves, RS, Circulação Técnica. n. 48, 2004.

GELMINI, G. A. **Agrotóxicos legislação básica**. Campinas: Fundação Cargill. v.1, p. 13 -55, 1991.

GERHARDT, A. Aquatic behavioral ecotoxicology prospects and limitations. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 13, p. 481 – 491, 2007.

GERHARD, G. S. *et al.*, Life spans and senescent phenotypes in two strains of *Zebrafish (Danio rerio)*. **Experimental Gerontology**, v. 37, p. 1055 – 1068, 2002.

GERLAI, R. *Zebrafish* antipredatory responses: A future for translational research? **Behavior Brain Research**, v. 207, p. 223 – 231, 2010.

GLOBO – G1. **O que muda com o novo marco regulatório de agrotóxicos da Anvisa**. Disponível em: <<https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2019/07/24/entenda-o-que-muda-na-classificacao-dos-agrotoxicos-pela-anvisa.ghtml>>. Acesso em: 20 de setembro 2019.

GRAEFF, F. G. Serotonin, the paraventricular nucleus and panic. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 239 – 259, 2004.

GRANT, D. B. *et al.*, Fipronil: action at the GABA receptor. **Reviews in Toxicology**, v. 2, p. 147-156, 1998.

GRAVILESCU, M. Fate of pesticide in the environment and its bioremediation. **Engineering in life sciences**, v. 5, p. 497 - 526, 2005

GÜNGÖRDÜ, A. *et al.*, Integrated markers of three amphibian species exposed to glyphosate and methidathion based pesticides in single and combination forms. **Chemosphere**, v. 144, p. 2024 – 2035, 2016.

HABIG W. H.; PABST. M. J.; JAKOBY W. B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 7130 – 7139, 1974.

HAFFTER, P. *et al.*, The identification of genes with unique and essential functions in the development of the *zebrafish*, *Danio rerio*. **Development** **123**, p. 1 - 36, 1996.

HALLARE, A. *et al.*, Comparative embryotoxicity and 445 proteotoxicity of three carrier solvents to *zebrafish* (*Danio rerio*) embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 63, n. 446, p. 378 - 388, 2006.

HELFRICH, L. A. **Pesticides and aquatic animals: a guide to reducing impacts on aquatic systems**. Virginia Department of Game and Inland Fisheries, Blacksburg, p. 24, 2009.

HOWE, K. *et al.*, The *zebrafish* reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, p. 498 - 503, 2013.

HUNN, J. B. History of Acute Toxicity Tests with Fish.U.S. **Fish and Wildlife Service, La Crosse**, p. 1863 – 1987. 1989.

HUTSON, D. H., JEWESS, T. R. **Carbendazim**. Cambridge (UK): Royal Society of Chemistry, 1999.

JACKSON, M. C. *et al.*, Net effects of multiple stressors in freshwater ecosystems: a meta-analysis. **Global Challenger Biology**, v. 22, p. 180-189, 2016.

JARDIM, I. C. S. F. *et al.*, Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, n. 4, 996 - 1012, 2009

JIANG, J. *et al.*, Carbendazim has the potential to induce oxidative stress, apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption during *zebrafish* larvae development. **Toxicology In Vitro**, v.29, p. 1473 - 1481, 2015.

JONAS, A. *et al.*, Endocrine, teratogenic and neurotoxic effects of cyanobacteria detected by cellular in vitro and *zebrafish* embryo assays. **Chemosphere**, v.120, p.321-327, 2015.

JONKER, M. J. *et al.*, Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose–response analysis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 10, p. 2701 - 2713, 2005.

KARI, G.; RODECK, U.; DICKER, A. P. *Zebrafish: An Emerging Model System for Human Disease and Drug Discovery*. **Discovery**, v. 82, n. 1, p. 70 – 82, 2007.

KERR, J.P. Grouping behaviour of the *zebrafish* as influenced by social isolation. **American Zoologist**, v. 2, p. 532 - 533, 1963.

KONDO, M. *et al.*, Sex determination and sex chromosome evolution: insights from medaka. **Sexual Development**, v. 3, p. 88 - 98, 2009.

KUPPER, K. C. *et al.*, *Bacillus subtilis* to biological control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum* under field conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 134, p. 139 - 143, 2012.

LARSON, E. T.; O'MALLEY, D. M.; MELLONI JR, R. H. Aggression and vasotocin are associated with dominant subordinate relationships in *zebrafish*. **Behavioural brain research**, v. 167, n. 1, p. 94 – 102, 2006.

LAWRENCE, C. *et al.*, Generation time of *zebrafish* (*Danio rerio*) and medakas (*Oryzias latipes*) housed in the same aquaculture facility. **Lab Animal**, v. 41, p. 158 - 165, 2012.

LEDENT, V. Postembryonic development of the posterior lateral line in *zebrafish*. **Development**, v. 129, p. 597 – 604, 2002.

LEROUX, P. Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. **Comptes Rendus Biologies**, v. 326, p. 9 - 21, 2003.

LI, W. *et al.*, Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. **Chemosphere**, v. 89, n. 11, p. 1307 - 1315, 2012.

LIU, L. *et al.*, Toxic effects of three strobilurins (trifloxystrobin, azoxystrobin and kresoxim-methyl) on mRNA expression and antioxidant enzymes in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) juveniles. **Ecotoxicology Environment Safety**, v. 98, p. 297 - 302, 2013.

LOPES-FERREIRA M. *et al.*, **O modelo *zebrafish* e sua contribuição no meio ambiente**. In: Recurso água tecnologias de pesquisa para uso e a construção dos ecossistemas aquáticos. Ed. Cubo. 1 ed. São Paulo. p. 205 - 236, 2021.

LUDWIKOWSKA, A. *et al.*, The effect of carbendazim on embryonic Prussian carp (*Carassius gibelio*) development and hatching. **Archives of Polish Fisheries**, v. 21, p.367 – 371, 2013.

MACHADO, A. **Degradação do herbicida 2,4-d por processos oxidativos avançados**. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Paraná. p. 1 - 109, 2004.

MACKAY, D.; SHIU, W.; MA, K. Ilustred handbook of physicalchemical and environmental fate for organic chemicals. **Boca Raton: Lewis**, v. 5., p. 812. 1997.

MAHAN, B. M.; MYERS, R. J. **Química, um curso universitário**. São Paulo: Edgar Blücher, p. 582, 2000.

MANSANO, A. S. *et al.*, Acute and chronic toxicity of diuron and carbofuran to the Neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 1 - 12, 2016.

MANSANO, A. S. *et al.*, Effects of diuron and carbofuran and their mixtures on the microalgae *Raphidocelis subcapitata*. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 142, p. 312 - 321, 2017.

MARTINEZ, C. B. R.; SOUZA, M. M. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. **Comparative Biochemical Physiology**, v. 133, p. 151 – 160, 2002.

MASSUTI, C. S. M.; MERMUT, A. R. Degradation of Fipronil under laboratory conditions in a tropical soil from Sirinhaém Pernambuco, Brazil. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 42, p. 33-43, 2007.

MATVIISHYN, T. M. *et al.*, Tissue-specific induction of oxidative stress in goldfish by 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid: mild in brain and moderate in liver and kidney. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 37, p. 861 – 869, 2014.

MAYDEN, R. L. *et al.*, Phylogenetic relationships of Danio within the order cypriniformes: a framework for comparative and evolutionary studies of a model species. **Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution**, v. 308B, p. 642 – 654, 2007.

MAZELLIER, P.; LEROY, E.; LEGUBE, B. Photochemical behavior of the fungicide carbendazim in dilute aqueous solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 153, p. 221 - 227, 2002.

MAZOYER, M.; ROUDART, L. **História das agriculturas no mundo: do neolítico à crise contemporânea**. São Paulo: Editora UNESP; Brasília, DF, p. 568, 2010.

MCHENRY, M. J.; LAUDER, G. V. The mechanical scaling of coasting in *zebrafish* (*Danio rerio*). **Journal of Experimental Biology**, v. 208, n. 12, p. 2289 – 2301, 2005.

MEYER-BARON, M. *et al.*, Meta-analysis on occupational exposure to pesticides - Neurobehavioral impact and dose-response relationships. **Environmental Research**, v. 136, p. 234 - 245, 2015.

MEYERS, J.R. **Zebrafish: Development of a vertebrate model organism**. Current Protocols Essential Laboratory Techniques, Ed. 19, 2018.

MILLER, N.; GERLAI, R. Quantification of shoaling behavior in *zebrafish* (*Danio rerio*). **Behavior Brain Research**, v. 184, n. 2, p. 157 – 166, 2007.

MONQUERO, P. A.; BRAGA, E. M.; MALARDO, M. R. Manejo de *Merremia aegyptia* com misturas de herbicidas utilizando diferentes lâminas de água e na presença ou ausência de palha de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 13, n. 2, p. 88-96, 2014.

MOREIRA, R. A. *et al.*, Toxicity of abamectin and difenoconazole mixtures to a Neotropical cladoceran after simulated run-off and spray drift exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 185, p. 58 - 66, 2017.

MOUTINHO, J. C. **Proposta de Consulta Pública nº 262**. Brasil: ANVISA. 2016.

MURAYAMA, E. *et al.*, Tracing hematopoietic precursor migration to successive hematopoietic organs during *zebrafish* development. **Immunity**, v. 25, p. 963 - 975, 2006.

NINKOVIC, J.; BALLY-CUIF, L. The *zebrafish* as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. **Methods**, v. 39, n. 3, p. 262 – 274, 2006.

NOVELLI, A. *et al.*, Field and laboratory studies to assess the effects of Vertimec® 18EC on *Daphnia similis*. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 75, p. 87 - 93, 2012.

Organization for Economic Cooperation and Development – OECD. **Test no. 215: fish, juvenile growth test. OECD Guidelines for the testing of Chemicals**, OECD Publishing, Paris 2000.

Organization for Economic Cooperation and Development – OECD. **Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**, OECD Publishing, Paris 2013.

PARNG, C. *et al.*, *Zebrafish: a preclinical model for drug screening*. **ASSAY and Drug Development Technologies**, v. 1, n. 1, p. 41 - 48, 2002.

PARICHY, D. M. *et al.*, Normal table of postembryonic *zebrafish* development: staging by externally visible anatomy of the living fish. **Developmental Dynamics**, v. 238, p 2975 - 3015, 2009.

PARICHY, D. M.; TURNER, J. M. *Zebrafish* puma mutant decouples pigment pattern and somatic metamorphosis. **Developmental Biology**, v. 256, p. 242 - 257, 2003.

PASSOS, A. B. R. J. *et al.*, Leaching of sulfentrazone in soils of reforestation in Brazil. **Environmental Earth Sciences**, v. 74, n. 2, p. 1211 - 1215, 2015.

PEI, Z.; YITONG, L.; BAOFENG, L.; GAN, J. Dynamics of fipronil residue in vegetable field ecosystem. **Chemosphere**, v. 57, p. 1691 - 1696, 2004.

PENNY, C.; ADAMS, C. **Royal Commission on Pollution of Rivers in Scotland**. HMSO, London, p. 377 – 391, 1863.

PESTICIDE ACTION NETWORK - PAN. **Carbendazim: identification, toxicity, use, water pollution potential, ecological toxicity and regulatory information**. Disponível em: <[http://www.pesticideinfo.org/Detail\\_Chemical.jsp?Rec\\_Id=PC32862](http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC32862)>. Acesso em: 12 novembro 2019.

PESSOA, M. C.; LUCHIARI JUNIOR, A.; FERNANDES, E. **Principais modelos matemáticos e simuladores utilizados para análise de impactos ambientais das atividades agrícolas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA. p. 83, 1999.

PHYU, Y. L. *et al.*, comparison of mixture toxicity assessment: examining the chronic toxicity of atrazine, permethrin and chlorothalonil in mixtures to *Ceriodaphnia cf. dubia*. **Chemosphere**, v. 85, n. 10, p. 1568 - 1573, 2011.

PIGNATI, W. A. *et al.*, Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p. 3281-3293, 2017

QUEIROZ, A. C. L. *et al.*, Programa Nacional de Vigilância em Saúde Ambiental Relacionada à Qualidade da Água para Consumo Humano (Vigiagua): lacunas entre a formulação do programa e sua implantação na instância municipal. **Saúde e Sociedade**, v. 21, p. 465 - 478, 2012.

RACKE, K. D. What do we know about the fate of pesticides in tropical ecosystems? **Environmental fate and effects of pesticides**, v. 853, p. 96 - 123, 2003.

RADOSEVICH, S. R.; HOLT, J.; GHERSA, C. **Weed ecology**, New York: John Wiley & Sons. p. 472-495. 1997.

RAMA, E. M. *et al.*, Reproductive and possible hormonal effects of carbendazim. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, p. 476 - 486, 2014.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Washington, DC: Hemisphere Publishing Corporation. 1985.

RIBAS, L.; PIFERRER, F. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. **Reviews in Aquaculture**, v. 6, n. 4, p. 209 – 240, 2013.

RIBEIRO, F. *et al.*, Is ultraviolet radiation a synergistic stressor in combined exposures? The case study of *Daphnia magna* exposure to UV and carbendazim **Aquatic Toxicology**, v.102, p. 114 - 122, 2011.

ROCHA, A. G. **Agrotóxicos: uma análise comparativa da legislação entre Brasil, União Europeia e Estados Unidos da América**. Monografia apresentada em cumprimento parcial dos requisitos da Universidade de São Paulo (USP) para título de graduado em Engenharia Ambiental. São Paulo. 2014.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 6. ed. Londrina: p. 697, 2011.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. **The Principles of Humane Experimental Technique**. London, Methuen: 1959.

SALEEM, U. *et al.*, Mutagenic and cytotoxic potential of Endosulfan and Lambda-cyhalothrin - In vitro study describing individual and combined effects of pesticides. **Journal of Environmental Science**, v. 26, p. 1471 - 1479, 2014.

SANCHES, S. M. *et al.*, Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 53-58, 2003.

SANCHEZ-BAYO, F.; HYNE, R. V. Comparison of environmental risks of pesticides between tropical and nontropical regions. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v.7, n. 4, p. 577 - 586, 2011.

SASAL, M. C. *et al.*, Glyphosate losses by drainage and runoff from Mollisols under no-till agriculture. **Inf. Tecnol**, v. 21, p. 135 - 142, 2010.

SATAPORNVANIT, K. *et al.*, Risks of pesticide use in aquatic ecosystems adjacent to mixed vegetable and monocrop fruit growing areas in Thailand. **Australasian Journal of Ecotoxicology**, v. 10, p. 85 - 95, 2004.

SCHWARZENBACH, R. P.; GSCHWEND, P. M.; IMBODEN, D. M. **Environmental Organic Chemistry**, Wiley-Interscience: USA, 1995.

SCHREINEMACHERS, P.; TIPRAQSA, P. Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries. **Food policy**, v. 37, p. 616 - 626, 2012.

SCHULER, L. J.; RAND, G. M. Aquatic risk assessment of herbicides in freshwater ecosystems of South Florida. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 54, p. 571 - 583, 2008.

SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic Toxicology**, v. 68, p. 369-392, 2004.

SELMANOGLU, G. *et al.*, A. Carbendazim- induced haematological, biochemical and histopathological changes to the liver and kidney of male rats. **Human and Experimental Toxicology**. v. 20, p. 625 – 630, 2001.

SINGH, A. *et al.*, Imprinting of cerebral cytochrome P450s in offsprings prenatally exposed to cypermethrin augments toxicity on rechallenge. **Scientific Reports**, v.6, 2016.

SILVA, C. M. M. S. *et al.*, Isolamento de fungos degradadores de carbendazim. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 7, p.1255 - 1264, 1999.

SILVA, J. M.; SANTOS, J. R. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 4, p. 565 - 573, 2007.

SILVA, M. R.; CAMPOS, A. C. E.; BOHM, F. Z. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. **SaBios - Revista de Saúde e Biologia**, v. 8, n. 2, p. 46 - 58, 2013.

SILVA, P. M. C. S.; VAN GESTEL, C. A. M. Comparative sensitivity of *Eisenia andrei* and *Perionyx excavatus* in earthworm avoidance tests using two soil types in the tropics. **Chemosphere**, v. 77, p. 1609 - 1613, 2009.

SOARES, W. L.; PORTO, M. F. S. **Aspectos teóricos e práticos associados à decisão de uso de agrotóxicos: uma abordagem integrada entre a agricultura, meio ambiente e saúde pública**. In: XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural Rio Branco, Acre, Brazil 20 – 23 July 2008.

SPADOTTO, C. A. *et al.*, **Fundamentos e aplicações da modelagem ambiental de agrotóxicos**. Embrapa Monitoramento por Satélite. Documentos. v. 78, p. 47, 2010.

SPENCE, R. *et al.*, The distribution and habitat preferences of the *zebrafish* in Bangladesh. **Journal of Fish Biology**, v. 69, p. 1435 – 1448, 2006.

SPENCE, R. *et al.*, The behaviour and ecology of the *zebrafish*, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, v. 83, p. 13 - 34, 2008.

SPEEDIE, N.; GERLAI, R. Alarm substance induced behavioral responses in *zebrafish* (*Danio rerio*). **Behavior Brain Research**, v. 188, n.1, p. 168-177, 2008.

SPRAGUE, J. *et al.*, The *zebrafish* information network (ZFIN): a resource for genetic, genomic and developmental research. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 1, p. 87 – 90, 2001.

STREISINGER, G. *et al.*, Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). **Nature**, v. 291, p. 293 - 296, 1981.

TALLING, J. F.; LEMOALLE, J. **Ecological Dynamics of Tropical Inland Waters**. Cambridge University Press, Cambridge, pp. I, 1988.

TERRA, F. H. B.; PELAEZ, V. M. **A evolução da indústria de agrotóxicos no Brasil de 2001 a 2007: a expansão da agricultura e as modificações na lei de agrotóxicos**. In: 46 Congresso, Acre, Brasil. Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2008.

TESOLIN, G. A. S. *et al.*, Avaliação da toxicidade de herbicidas usados em cana-de-açúcar para o Paulistinha (*Danio rerio*). **O Mundo da Saúde**, v. 38, n. 1, p. 86 – 97, 2014.

TINGLE, C. C. D. *et al.*, **and environmental effects of fipronil. Briefing paper for Pesticides Action Network, UK, 2000**. Disponível em: <[http://piat.org.nz/uploads/PIAT\\_content/pdfs/Fipronil%20Info/Tingle%20Fipronil%20Health%20and%20envi%20fx%20UK.pdf](http://piat.org.nz/uploads/PIAT_content/pdfs/Fipronil%20Info/Tingle%20Fipronil%20Health%20and%20envi%20fx%20UK.pdf)>. Acesso em: 18 novembro 2019.

VALARINI, P. J. *et al.*, Cardoso, J. E.; Viana, F. M. P. (Ed). Doenças em fruteiras tropicais de interesse agroindustrial. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. p. 625-687, 2003.

VIGHI, M. *et al.*, Water quality objectives for mixtures of toxic chemicals: problems and perspectives. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 54, p.139 - 150, 2003.

VILLAMIZAR, N. *et al.*, Impact of daily thermocycles on hatching rhythms, larval performance and sex differentiation of *zebrafish*. **PLoS ONE 7**, v. 52153, 2012.

YANG, Y. *et al.*, Toxic effects of thifluzamide on *zebrafish* (*Danio rerio*). **Journal Hazardous Materials**, v.3 07, p. 127 – 136, 2016.

YENJERLA, M. *et al.*, Carbendazim inhibits cancer cell proliferation by suppressing microtubule dynamics. **The Journal of Pharmacology and Experimental Theapeutics**, v. 328, p. 390 - 398, 2009.

WESTERFIELD, M. **The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Brachydanio rerio*)**. University of Oregon Press, Eugene, OR, 1995.

WHITELEY, A. R. *et al.*, Population genomics of wild and laboratory *zebrafish* (*Danio rerio*). **Molecular Ecology**, v. 20, p. 4259 – 4276, 2011.

ZAGATTO, P. A. BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática, princípios e aplicações**, São Carlos: Rima editora. p. 478, 2006.

ZHOU, X. *et al.*, Modeling and prediction for the acute toxicity of pesticide mixtures to the freshwater luminescent bacterium *Vibrio qinghaiensis* sp. Q67. **Journal Environmental Science**, v. 22, n. 3, p. 433 - 440, 2010.

## **CAPÍTULO I**

### **ARTIGO CIENTÍFICO I:**

**CARBENDAZIM, FIPRONIL E SULFENTRAZONA ISOLADAMENTE AFETARAM  
MAIS O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO *ZEBRAFISH* DO QUE  
QUANDO MISTURADOS**

## 1 **Resumo**

2 A avaliação atual dos efeitos tóxicos dos pesticidas é predominantemente baseada em testes de  
3 produtos químicos isolados. Esta abordagem pode, entretanto, subestimar seus efeitos tóxicos  
4 e reduzir sua relevância ecológica, pois geralmente estes pesticidas são encontrados  
5 combinados a outros produtos químicos, desafiando a avaliação da toxicidade. Assim, nosso  
6 objetivo nesta pesquisa foi analisar os efeitos tóxicos em embriões de *zebrafish* (*Danio rerio*)  
7 expostos ao carbendazim (carb), fipronil (fipr) e sulfentrazone (sulf), avaliando a epibolia e a  
8 coagulação em 8 horas pós-fertilização (hpf), subletalidade (efeitos teratogênicos) e letalidade  
9 (coagulação) em 24 hpf. Os três pesticidas isolados se mostraram tóxicos em ambos os períodos  
10 de exposição. Com 8 hpf, a análise de epibolia indicou que as misturas não tiveram seus efeitos  
11 potenciados em comparação com as substâncias químicas isoladas, sendo tóxicas na ordem:  
12 carb > sulf > fipr > fipr + sulf > carb + sulf > carb + fipr + sulf > carb + fipr. Em 24 hpf, todas  
13 as concentrações utilizadas afetaram os embriões, com a ocorrência de efeitos letais e subletais,  
14 sendo o efeito subletal mais frequente o atraso no desenvolvimento. Mediante a nossos  
15 resultados, concluímos que o pesticida mais tóxico entre os estudados foi o sulfentrazone, pois  
16 causou atraso na epibolia e alto percentual de coagulação em 8hpf e também foi tóxico para o  
17 desenvolvimento embrionário em 24 hpf. Enfatizamos a necessidade de avaliar a toxicidade  
18 dos pesticidas, cujos efeitos devem ser caracterizados tanto individualmente como em misturas.

19

20 **Palavras-chave:** Peixe, Epibolia, Teratogenicidade, Pesticidas, Toxicidade combinada.

## 21 1. Introdução

22 Os pesticidas são um tópico de grande interesse para a ecotoxicologia ambiental, pois nos  
23 últimos anos houve um aumento significativo no número de novos produtos comercializados e  
24 registrados por órgãos internacionais competentes (Disner *et al.*, 2021). Entre os problemas  
25 ambientais causados pelos pesticidas, a poluição da água está atraindo grande preocupação  
26 (Wan *et al.*, 2021), já que estes produtos químicos têm sido detectados com frequência em  
27 corpos de água naturais ou artificiais, onde podem entrar nos ecossistemas e causar vários  
28 problemas de saúde a animais e seres humanos (Bernardes *et al.*, 2015). Estes produtos  
29 químicos chegam aos corpos de água por vários processos ou fontes difusas, como escoamento,  
30 lixiviação, pulverização ou drenagem (Demirci *et al.*, 2018).

31 Os pesticidas raramente são detectados em ambientes aquáticos como produtos químicos  
32 isolados, pois são frequentemente aplicados juntos em uma mistura, ou porque um único corpo  
33 de água supre a demanda de mais de uma cultura agrícola (Güngördü *et al.*, 2016) ou devido à  
34 prática agrícola comum de rotação anual de culturas, durante a qual a ocorrência sobreposta  
35 desses produtos químicos nos solos, superfície e águas subterrâneas pode ocorrer (Thorngren  
36 *et al.*, 2017). A avaliação atual da toxicidade desses produtos químicos é predominantemente  
37 baseada em testes dos produtos químicos isolados, e não em combinação, portanto, a relevância  
38 ecológica pode ser subestimada (Brodeur *et al.*, 2014).

39 Consequentemente, estes produtos químicos quando combinados com outros dificultam  
40 a compreensão de como as comunidades ecológicas respondem a eles. Isto também desafia a  
41 avaliação da toxicidade, pois os efeitos dessas interações podem produzir efeitos aditivos  
42 (sinérgicos ou antagônicos) (Jackson *et al.*, 2016). Estudos sobre misturas de pesticidas são  
43 indispensáveis para compreender os efeitos dessas misturas, em condições mais realistas. Os  
44 testes ecotoxicológicos são, portanto, de grande importância, pois fornecem informações para  
45 análise e gerenciamento de riscos ecológicos. Isto os torna amplamente úteis na formulação e

46 aprovação de políticas regulatórias e medidas administrativas que definem os limites toleráveis  
47 de emissão e concentração de produtos químicos no meio ambiente (Chapman, 2002).

48 Historicamente, o Brasil é um país com uma forte economia agrícola, baseada na  
49 monocultura, sendo o maior consumidor de pesticidas (Disner *et al.*, 2021), entre os quais a  
50 classe de herbicidas é a mais utilizada, seguida pelos inseticidas e fungicidas (ANVISA, 2012).  
51 Para este estudo selecionamos dois dos pesticidas comercialmente liberados no Brasil em 2019,  
52 sulfentrazone e fipronil (Grigori, 2019), além disso, escolhemos também o pesticida com maior  
53 concentração nos alimentos dos brasileiros, o carbendazim (ANVISA, 2016).

54 A sulfentrazone ( $C_{11}H_{10}C_{12}F_2N_4O_3S$ ) é um herbicida, proibido na União Europeia desde  
55 2009 por sua toxicidade, mas no Brasil, ainda é amplamente utilizado em diversas culturas  
56 (ANVISA, 2018).. Ele foi identificado e medido no escoamento superficial (10,3 mg/L) e nas  
57 águas subterrâneas (7,5 mg/L) em Illinois, EUA (Thorngren *et al.*, 2017). A exposição materna  
58 de ratos ao sulfentrazone (25, e 50 mg/kg) pode levar a déficits neuromusculares e  
59 comportamentais em filhotes (Castro *et al.*, 2007). Estudos indicam que fitoplâncton,  
60 invertebrados aquáticos e peixes podem ser mais susceptíveis à sulfentrazone (Thorngren *et*  
61 *al.*, 2017).

62 O fipronil ( $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$ ) é um inseticida emergente (Wang *et al.*, 2016) banido em  
63 vários países europeus desde 2004 por causar mortalidade de abelhas (EFSA, 2013), mas ainda  
64 é amplamente utilizado em vários países. Este produto químico foi detectado na água do Rio  
65 Vermelho, no Vietnã, em níveis de até 0,02 ng/L (Wan *et al.*, 2021), e nos rios Vacacaí (0,5  
66  $\mu\text{g/L}$ ) e Vacacaí-Mirim (0,6  $\mu\text{g/L}$ ), Brasil (Marchesan *et al.*, 2010). A exposição a  
67 concentrações de fipronil de 0,2 mg/L foi responsável por causar várias mudanças fisiológicas  
68 (inibição da atividade enzimática antioxidante no fígado e brânquias) no peixe de água doce  
69 *Oncorhynchus mykiss* (Uçar *et al.*, 2020), e prejudicando a angiogênese, neurogênese e  
70 processos de desenvolvimento em *Danio rerio* (15 mg/L) (Park *et al.*, 2019).

71 Carbendazim (C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) é um fungicida sistêmico, proibido Estados Unidos (Singh *et*  
72 *al.*, 2016), mas ainda é usado em muitos outros países (Wang *et al.*, 2019). Sua presença foi  
73 relatada nas águas do rio Taquari, no Brasil (0,4 µg/L) (Kronbauer *et al.*, 2021), no Rio Yangtze,  
74 na China (34,9 µg/L) (Liu *et al.*, 2015), no Lago Hanói, no Vietnã (86,7 µg/L) (Wan *et al.*,  
75 2021) e águas superficiais na Costa Rica (1,5 µg/L) (Carazo-Rojas *et al.*, 2018). Este pesticida  
76 foi considerado responsável por causar danos ao DNA (5,0 µg/L) em *Daphnia magna* (Silva *et*  
77 *al.*, 2015), e efeitos adversos ao desenvolvimento (0,16 µg/L) em *Danio rerio* (Andrade *et al.*,  
78 2016).

79 Os peixes são excelentes ferramentas para avaliar a qualidade do meio ambiente,  
80 servindo como importantes bioindicadores, considerando que respondem de várias maneiras à  
81 contaminação ambiental (Authman *et al.*, 2015). O *zebrafish* (*Danio rerio*) tem sido  
82 amplamente utilizado em estudos toxicológicos, devido às diversas vantagens que o tornam  
83 uma espécie modelo. Entre elas, é possível enumerar tamanho pequeno, acessibilidade  
84 experimental, desenvolvimento rápido (Solnica-Krezel e Sepich, 2012), e similaridade genética  
85 e de desenvolvimento embrionário com humanos (Fukushima *et al.*, 2020).

86 O teste de Toxicidade em embriões de peixe (FET) é uma avaliação toxicológica  
87 baseada no uso de embriões ou ovos recém eclodidos de *zebrafish*, que tem substituído o teste  
88 agudo por peixes adultos e se tornou obrigatório para o monitoramento de efluentes na Europa  
89 (Braunbeck *et al.*, 2014). O FET assumiu alta importância nas modernas avaliações de  
90 ecotoxicidade porque pode avaliar efeitos subletais, que hoje são obrigatórios para caracterizar  
91 a toxicidade das substâncias em amostras ambientais (Arenzon *et al.*, 2013).

92 Entre os parâmetros que podem ser facilmente avaliados em embriões de *zebrafish*  
93 quando expostos a pesticidas, está a análise da epibolia, que permite a avaliação rápida de  
94 muitos grupos experimentais, incluindo também misturas de produtos químicos (Cadena *et al.*,  
95 2020). Durante o desenvolvimento embrionário, a gastrulação é o estágio em que ocorre a

96 epibolia, um momento crítico no desenvolvimento porque corresponde ao estabelecimento dos  
97 principais eixos embrionários (dorsal-ventral, anterior-posterior e esquerda-direita) (Solnica-  
98 Krezel e Sepich, 2012). É uma etapa particularmente sensível à exposição ao teratógenos  
99 (Gilbert-Barness, 2010). Recentemente, alguns autores mostraram que vários pesticidas  
100 sozinhos e em misturas podem causar efeitos teratogênicos em vários estágios de  
101 desenvolvimento do *zebrafish* (Wang, *et al.*, 2017; Mendis *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018;  
102 Shen *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021).

103 Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos causados por misturas dos  
104 pesticidas carbendazim (fungicida), fipronil (inseticida) e sulfentrazone (herbicida), no  
105 desenvolvimento embrionário do *zebrafish* em 8 e 24 hpf. Com esta análise, pretendemos  
106 estabelecer um método rápido de avaliação da toxicidade de misturas de pesticidas no  
107 desenvolvimento do *zebrafish*.

108

## 109 **2. Material e Métodos**

### 110 *2.1. Reagentes e soluções*

111 Os pesticidas usados para preparar as soluções de teste foram Carbendazim (Carb.) (lote  
112 nº 002-18-54392, CAS: 10605-21-7, 50% (p/v)), Fipronil (Fipr.) (lote nº 001/19, CAS: 120068-  
113 37-3, 2,5 (p/p)) e Sulfentrazone (Sulf.) (lote nº 1041-19-13767, CAS: 122836-35-5, 50% (p/v))  
114 foram adquiridos de fornecedores comerciais. Os três pesticidas foram inicialmente diluídos  
115 em 1 mL de acetona (CAS: 67-64-1,  $\geq 99,9\%$  de pureza, Quimex, Brasil), e depois foram  
116 diluídos novamente em água destilada até atingir as concentrações desejadas (Tabela 1). As  
117 concentrações dos pesticidas foram baseadas em valores iguais ou inferiores aos limites  
118 máximos de resíduos (LMR) destes pesticidas em alimentos permitidos pela Agência Nacional  
119 de Vigilância Sanitária - ANVISA (ANVISA, 2018; ANVISA, 2019a; ANVISA, 2019b). Os

120 resíduos de pesticidas foram tratados por processo de oxidação avançado (AOP) em um reator  
121 usando peróxido de hidrogênio/radiação ultravioleta (16w) antes do descarte final.

## 122 2.2. Criação de zebrafish

123 Todos os protocolos envolvendo os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para  
124 o Uso de Animais (Licença 061/2019). Peixes adultos do tipo selvagem foram alojados no  
125 Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal - LECA, Universidade Federal Rural  
126 de Pernambuco - UFRPE. Estes animais foram obtidos de um fornecedor comercial e alojados  
127 em 80 L aquários onde foram colocados em quarentena para detectar e confirmar a ausência de  
128 patógenos ou doenças. Foram alojados sob as seguintes condições laboratoriais, aeração  
129 artificial de 11 mg/L OD, temperatura de  $25 \pm 1$  °C, pH  $7,5 \pm 0,5$ , e ciclo de 14/10 h  
130 (claro/escuro). A água era parcialmente renovada uma vez por semana. Parâmetros abióticos  
131 tais como amônia, nitrito e nitrato também foram observados e mantidos dentro de faixas  
132 ideais. Os animais foram alimentados com ração para peixes Fort Color® (30% de proteína  
133 bruta) duas vezes ao dia e com náuplios de artêmia (*Artemia ssp*) uma vez ao dia.

## 134 2.3. Produção de ovos de zebrafish

135 Para obter ovos, *zebrafishes* machos e fêmeas foram colocados nas câmaras de  
136 cruzamento (Alesco® Zebclean) a uma proporção de 2:1 (Westerfield, 2000). 30 minutos após  
137 a desova os ovos foram coletados, os ovos não fertilizados foram retirados e os ovos fertilizados  
138 (desenvolvimento normal da blástula) (OECD, 2013) foram lavados e encaminhados para as  
139 câmaras de exposição.

## 140 2.4. Exposição a produtos químicos

141 Os testes de toxicidade seguiram as diretrizes da OECD 236 (OECD, 2013), com  
142 modificações. Em resumo, embriões a 2 hpf foram adicionados aleatoriamente em câmaras de  
143 poliestireno estéreis e expostos a 50 mL das soluções de teste (Tabela 1). Os testes foram

144 divididos em duas experiências relativas ao tempo de exposição, a primeira para avaliar a  
145 epibolia após 6 h de exposição (8 hpf) e a segunda para avaliar os efeitos teratogênicos após  
146 22 h de exposição (24 hpf). Além disso, água destilada sem pesticidas foi usada como controle.

#### 147 2.5. *Teste de toxicidade aguda*

148 Foram realizados testes preliminares para determinar as concentrações dos pesticidas  
149 (dados não mostrados) utilizados no experimento definitivo. Os testes foram realizados com  
150 10 animais por grupo experimental em triplicata ( $n = 30$  por grupo com 8 grupos experimentais  
151  $\approx 240$  embriões). Os embriões com 2 hpf foram expostos a pesticidas durante 22 h (24 hpf). As  
152 condições abióticas foram controladas utilizando uma incubadora com uma temperatura de  $27$   
153  $\pm 1$  °C e um ciclo de 14/10 h (claro/escuro). Consideramos que os animais eram afetados por  
154 pesticidas quando apresentavam pelo menos um efeito letal ou subletal. Estes efeitos foram  
155 observados utilizando um microscópio BIO2B SSI com uma lâmpada LED. A mortalidade foi  
156 registrada por falta de desenvolvimento embrionário ou coagulação (OECD 236, 2013),  
157 enquanto os efeitos teratogênicos analisados foram retardo geral de crescimento (*delay*), falta  
158 de pigmentação, edema pericárdico, edema de saco vitelino, deformação da coluna vertebral,  
159 deformação da cauda, falta de movimento espontâneo e raquitismo (Cadena *et al.*, 2020;  
160 Lammer *et al.*, 2009).

#### 161 2.6. *Epibolia*

162 A epibolia foi avaliada em 8 hpf, após 6 h de exposição a pesticidas, as concentrações  
163 individuais e as misturas de pesticidas estão descritas na Tabela 1. Os embriões foram lavados  
164 3 vezes em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) e fixados em paraformaldeído 4% (PFA) diluído  
165 no mesmo tampão durante 24 h (Cadena *et al.*, 2020). Trinta e cinco embriões foram utilizados  
166 em cada grupo experimental ( $n = 35$  por grupo com 8 grupos experimentais  $\approx 280$  embriões).  
167 As fotografias foram registradas com uma câmera digital Hayear HY 2307 14 MP acoplada a

168 um microscópio BIO2B SSI com uma lâmpada LED. A porcentagem da epibolia foi  
169 determinada pela distância entre o polo animal e a margem do blastoderma, dividida pela  
170 distância entre o polo animal e o polo vegetal (Schwend *et al.*, 2011). As medições foram feitas  
171 com o software Image J (versão 1.52A, 2019, National Institutes of Health, MD).

## 172 2.7. Análise estatística

173 O planejamento estatístico para o teste epibólico foi realizado pelo método do *simplex*  
174 *centroide design* (Cadena *et al.*, 2020), como mostrado na Tabela 1, como base para determinar  
175 o número de grupos experimentais e avaliar a interação entre os pesticidas. Um modelo cúbico  
176 especial foi ajustado para analisar os dados. Todos os dados foram apresentados por média  $\pm$   
177 DP. O teste de toxicidade aguda foi realizado em triplicata. Os resultados foram analisados por  
178 ANOVA unidirecional. Quando a diferença foi significativa, as médias foram comparadas pelo  
179 teste de *Tukey* com  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *Origin Pro*  
180 *Academic 2015* (*Origin Lab. Northampton, MA, EUA*) e o *Statistica 13.5* versão experimental  
181 (*TIBCO, EUA*) (Cadena *et al.*, 2020).

## 182 3. Resultados

### 183 3.1. Teste de toxicidade aguda

184 Analisamos os efeitos tóxicos exibidos pelos embriões, em termos de desenvolvimento  
185 embrionário em 24 hpf de desenvolvimento e 22 h de exposição. Os pesticidas causaram uma  
186 ampla gama de efeitos teratogênicos, sendo o mais comum o atraso no desenvolvimento e a  
187 falta de pigmentação, como visto na Figura 1. Além disso, observamos que os agrotóxicos  
188 afetaram os embriões quase na sua totalidade nas três concentrações utilizadas (Figura 2A). Ao  
189 analisar os efeitos subletais e letais após a exposição a um único pesticida, foi possível observar  
190 um efeito de letalidade dose-dependente, na qual o aumento dos efeitos subletais também  
191 ocorreu com o aumento das concentrações dos pesticidas testados (Figuras 2B e 2C). O

192 sulfentrazona mostrou letalidade dose-dependente e foi o composto mais tóxico entre os aqui  
193 estudados. Carbendazim mostrou baixa letalidade e alta subletalidade em concentrações mais  
194 baixas, enquanto o fipronil foi o menos tóxico entre os pesticidas estudados, apresentando  
195 apenas efeitos subletais.

### 196 3.2. Epibolia

197 Os três pesticidas afetaram a epibolia de diferentes maneiras, com base na análise  
198 qualitativa das imagens animais (Figura 3). Os pesticidas carbendazim e sulfentrazona foram  
199 os que afetaram significativamente o processo da epibolia (Figura 4A). Kimmel *et al.*, (1995)  
200 relataram que os embriões de *zebrafish* com desenvolvimento normal após 8 hpf estão a 75%  
201 de epibolia. Considerando esta suposição, pode-se inferir que os embriões expostos a  
202 carbendazim e sulfentrazona tiveram o desenvolvimento retardado. Ao avaliar a epibolia, em  
203 paralelo observamos também a coagulação dos embriões (Figura 4B) e verificamos que o grupo  
204 experimental mais afetado em relação à coagulação foi o fipronil. Este foi o pesticida que  
205 causou o menor retardo na epibolia, porém causou maior coagulação, indicando uma alta  
206 letalidade. Além disso, o carbendazim causou o maior retardo na epibolia e a menor  
207 porcentagem de embriões coagulados. Nossos dados também nos permitiram concluir que o  
208 pesticida mais tóxico para embriões após 8 hpf era o sulfentrazona, uma vez que reduziu  
209 significativamente a epibolia, mas simultaneamente foi responsável por uma grande  
210 porcentagem de animais coagulados. O gráfico *Ternary contour plot* (Figura 4C) resume a  
211 interação entre os três pesticidas, e seus efeitos em termos retardo na epibolia, isolados e em  
212 mistura. É possível observar a mudança causada pelo carbendazim e pela sulfentrazona na  
213 epibolia individualmente. A mistura entre eles, no entanto, causou menos redução na  
214 porcentagem de epibolia. Independentemente do fato de que os testes de epibolia e toxicidade  
215 aguda terem sido realizados em diferentes períodos pós fertilização, o ranking de toxicidade  
216 entre os pesticidas foi mantido.

217

218 **4. Discussão**

219 Em nossa pesquisa, avaliamos os efeitos tóxicos dos pesticidas (um fungicida, um  
220 inseticida e um herbicida), quando isolados, mas também de suas misturas, através de uma  
221 rápida abordagem toxicológica, afim de identificar precocemente os efeitos destes químicos  
222 em embriões de zebrafish.

223 O teste de toxicidade aguda é o primeiro passo para identificar os efeitos tóxicos dos  
224 contaminantes ambientais. Entretanto, os testes agudos às vezes não são inteiramente  
225 adequados para estudar a liberação ambiental de produtos químicos e seus efeitos adversos  
226 sobre a biota exposta. As respostas extraídas da exposição aguda, geralmente subestimam os  
227 dados de toxicidade, mas muitas vezes são ecologicamente relevantes, como no caso de nosso  
228 estudo. Derrames ou liberações acidentais ou escoamento de pesticidas resultarão em  
229 condições comparáveis aos resultados de testes agudos (Wang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018).  
230 Seguindo esta suposição, nosso teste agudo visou avaliar os efeitos adversos após um curto  
231 período de exposição (exposição aguda). Nossos dados mostraram que todas as concentrações  
232 dos pesticidas testados afetaram os embriões após 22 horas de exposição, semelhante também  
233 ao teste realizado por Wang *et al.*, (2018). Portanto, nossos dados de toxicidade usando o  
234 estágio embrionário fornecem informações valiosas sobre toxicidade durante um curto período  
235 de tempo, de modo que estes métodos podem servir como modelo para a triagem de emergência  
236 e também servir como uma avaliação da interação entre diferentes produtos químicos.

237 Quando avaliamos separadamente os efeitos como subletais e letais, vimos algumas  
238 diferenças na resposta toxicológica, especialmente no que diz respeito às concentrações dos  
239 pesticidas. O efeito subletal mais frequente foi um atraso no desenvolvimento, que foi mais  
240 pronunciado nos grupos expostos a menores concentrações dos pesticidas estudados. Com

241 relação à letalidade dos pesticidas usados em embriões, foi possível observar uma alta  
242 letalidade nos animais expostos a carbendazim. Andrade *et al.*, (2017), ao investigar o efeito  
243 do carbendazim em embriões de *zebrafish*, não encontraram mortalidade em concentrações <  
244 1,0 mg/L e encontraram mortalidade de 100% a > 2,0 mg/L, determinando uma CL<sub>50</sub> de 96 h  
245 de 1,75 mg/L. Estes autores também observaram efeitos teratogênicos quando os peixes foram  
246 expostos a concentrações entre 0,85 e 1,6 mg/L. Os autores não encontraram mortalidade  
247 significativa a 24 hpf, mas relataram anormalidades de desenvolvimento, deformidades na  
248 cauda e medula espinhal, e edema a 24 hpf que persistiu a 96 hpf.

249 Os embriões utilizados em nosso estudo mostraram ser mais sensíveis, pois quando  
250 expostos a concentrações acima de 0,75 mg/L de carbendazim, mostraram 100% de  
251 mortalidade e efeitos teratogênicos ocorreram em concentrações abaixo de 0,50 mg/L a 24 hpf.  
252 Diante disto, eles se mostraram mais resistentes que os embriões de *zebrafish* utilizados por  
253 Palanikumar *et al.*, (2014), que relataram um valor de 96 h CL<sub>50</sub> para carbendazim de 0,013  
254 mg/L, e depois *Carassius gibelio* (carpa prussiana) ovos estudados por Ludwikowska *et al.*,  
255 (2013), que relataram um efeito de 100% de mortalidade após 24 h de exposição a 0,216 mg/L  
256 de carbendazim. Os dados corroboram como nossos resultados obtidos no teste de epibolia,  
257 sugerindo que os efeitos do carbendazim tendem a ser mais relevantes nos estágios iniciais da  
258 vida embrionária devido a seu modo de ação.

259 Park *et al.*, (2019), estimaram o valor de 72 h CL<sub>50</sub> para o fipronil em 13,47 mg/L, com  
260 letalidade significativa observada em concentrações acima de 15 mg/L, e efeitos teratogênicos  
261 a partir de 7,5 mg/L, com atraso no desenvolvimento, saco vitelino e edema pericárdico,  
262 deformidade espinhal e diminuição do tamanho do corpo, e uma diminuição da taxa de eclosão  
263 em embriões expostos ao fipronil. Yan *et al.*, (2016) observaram letalidade significativa em  
264 concentrações de fipronil acima de 400 g/L, não observada em concentrações abaixo de 200  
265 g/L, e efeitos teratogênicos foram observados somente em concentrações acima de 100 g/L a

266 120 hpf, tais como bexiga natatória não inflada, redução do comprimento do corpo e  
267 deformidades espinhais. As concentrações utilizadas em nossa pesquisa foram inferiores às  
268 utilizadas nos dois estudos mencionados acima, possivelmente por esta razão não foi observada  
269 uma letalidade significativa, uma vez que a letalidade do fipronil se mostrou ser dose-  
270 dependente. Entretanto, nosso estudo mostrou que o fipronil causou efeitos teratogênicos  
271 semelhantes em concentrações menores do que as utilizadas em pesquisas anteriores.

272 Os resultados obtidos no teste de epibolia mostraram que o pesticida que causou o maior  
273 atraso neste processo foi o carbendazim. Os efeitos tóxicos do carbendazim tendem a ser mais  
274 relevantes nos estágios iniciais da vida embrionária, onde a divisão celular principal está em  
275 andamento, já que este produto químico age inibindo a formação de tubulina/ microtúbulos em  
276 fungos e mamíferos (Lim e Miller, 1997). Os efeitos adversos do carbendazim em processos  
277 similares no *zebrafish* não foram descritos anteriormente, mas sabe-se que a epibolia no  
278 *zebrafish* é impulsionada por microtúbulos e forças exercidas por filamentos de actina. Os  
279 efeitos no desenvolvimento dessas estruturas podem retardar a progressão da epibolia (Cheng  
280 *et al.*, 2004; Solnica-Krezel e Drivier, 1994), o que explicaria os resultados obtidos em nossa  
281 pesquisa. A sensibilidade das fases iniciais do desenvolvimento embrionário do *zebrafish* já foi  
282 demonstrada. Sharmah *et al.*, (2013) mostraram os efeitos adversos do etanol no processo  
283 epibólico do *zebrafish*, relatando que o desenvolvimento anormal da epibolia está associado à  
284 formação dos microtúbulos e ao movimento celular de intercalação radial. Considerando os  
285 mecanismos já descritos de ação tóxica causada pelo carbendazim (interferência na  
286 polimerização da tubulina e na formação de microtúbulos), é possível sugerir que o atraso aqui  
287 observado na epibolia pode ter sido causado desta forma pelo carbendazim.

288 A partir de nossos resultados, podemos considerar o herbicida sulfentrazone como o  
289 mais tóxico para embriões de *zebrafish* entre todos os pesticidas testados, uma vez que reduziu  
290 significativamente a epibolia, ao mesmo tempo em que causou a coagulação de mais de 50%

291 dos embriões expostos. De acordo com Bianchi et al (2015), a exposição ao sulfentrazone pode  
292 levar a quebras cromossômicas e perdas cromossômicas, e esta genotoxicidade pode estar  
293 relacionada à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Li et al (2020) também  
294 observaram que o sulfentrazone induziu a produção de ROS, bem como alterou a atividade das  
295 enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, guaiacol peroxidase e glutathione-S-  
296 transferase) indicando que a exposição ao sulfentrazone, pode causar estresse oxidativo e danos  
297 às biomoléculas (tais como proteínas, lipídios e DNA) nas células de minhocas (*Eisenia fetida*).  
298 O estudo de Freitas *et al.*, (2017) avaliou a produção de ROS em duas espécies de girino  
299 (*Eupemphix nattereri* e *Rhinella schneideri*) após a exposição ao sulfentrazone e também  
300 mostrou que a exposição a este pesticida causou a superprodução de ROS. Especulamos,  
301 portanto, que a superprodução de ROS causada pela exposição ao sulfentrazone pode ser  
302 responsável pela letalidade e pelo atraso na epibolia observados na presente pesquisa. Também  
303 foi descoberto que o acúmulo de ROS induziu danos ao DNA, desencadeou anormalidades na  
304 proliferação celular e causou malformações e aumento da apoptose celular no desenvolvimento  
305 embrionário do *zebrafish* (Wei *et al.*, 2021; Sulukan *et al.*, 2017).

306 O fipronil foi o pesticida que causou a maior coagulação nos embriões, no entanto, os  
307 embriões que sobreviveram mostraram menos atraso na epibolia quando comparados aos  
308 outros pesticidas testados. O Fipronil é um antagonista dos receptores do Ácido gama-  
309 aminobutírico (GABA), ele age bloqueando os receptores GABA no SNC, o que impede a  
310 transmissão sináptica GABAérgica, levando à estimulação neuronal excessiva resultando em  
311 morte (Wu *et al.*, 2021; Eadie *et al.*, 2020). O bloqueio desses receptores pelo fipronil induz a  
312 apoptose celular e altera a transcrição gênica modificando o ciclo celular (Park *et al.*, 2019);  
313 quando essa desregulação do ciclo celular ocorre, vários reguladores, tais como ciclinas,  
314 induzem a parada do ciclo celular e a senescência, causando a apoptose. Essa parada do ciclo  
315 celular bloqueia a diferenciação no desenvolvimento do *zebrafish*, que requer rápida replicação

316 de DNA e mitose para morfogênese e desenvolvimento parcial do SNC (Verduzco e Amatruda,  
317 2011), esta parada pode ser responsável pela alta coagulação encontrada em embriões que  
318 foram expostos ao fipronil em nosso teste.

319 Os embriões que se desenvolveram e mostraram menos atraso na epibolia, presume-se  
320 que, de acordo com Overmeyer *et al.*, (2007), ao avaliar a toxicidade do fipronil, observaram  
321 que as larvas de *Palaemonetes pugio* eram geralmente menos sensíveis que os adultos,  
322 sugerindo que a sensibilidade está relacionada à diferenciação dos receptores GABA neste  
323 estágio de desenvolvimento dos organismos, indicando que o desenvolvimento dos receptores  
324 progride com o tempo, de modo que o fipronil se liga mais tarde com o avanço do  
325 desenvolvimento destes receptores, causando maior toxicidade em estágios posteriores do que  
326 os avaliados neste estudo.

327 Com isto, observamos que a epibolia foi um parâmetro prático e rápido para a avaliação  
328 da toxicidade dos pesticidas em embriões de *zebrafish*, mas não observamos as interações entre  
329 os pesticidas utilizados neste estudo. Silva *et al.*, (2015) utilizaram diferentes *endpoints* no  
330 microcrustáceo *Daphia magna* para analisar os efeitos das misturas dos pesticidas triclosan e  
331 carbendazim e observaram diferentes respostas em relação à toxicidade da mistura, incluindo  
332 sinergia e antagonismo. Isto também foi observado em outros estudos, onde os efeitos sobre o  
333 mesmo organismo variaram dependendo dos *endpoints* escolhidos (Santos *et al.*, 2011;  
334 Loureiro *et al.*, 2010; Turgut e Formin, 2002). A toxicidade das misturas pode ser expressa de  
335 diferentes maneiras dependendo do *endpoint* analisado, que está interligado com o modo de  
336 ação de cada produto químico, mas também está relacionado com o mecanismo potencial e as  
337 vias de interação entre os produtos químicos dentro dos organismos de teste. Dito isto, podemos  
338 sugerir que a ausência de potencialização dos efeitos das misturas nos *endpoints* utilizados em  
339 nossa pesquisa não significa que as misturas estudadas não causem efeitos sinérgicos, que  
340 poderiam ser observados se outros *endpoints* fossem escolhidos.

341 Dos resultados vistos no presente estudo, observamos que os pesticidas  
342 individualmente, e em baixas concentrações, causaram efeitos subletais, que podem afetar o  
343 *zebrafish*. Isto é particularmente importante se assumirmos que tais efeitos podem levar a sua  
344 letalidade a curto ou longo prazo. Estes resultados também demonstram que o teste rápido de  
345 toxicidade em 24h foi sensível aos químicos utilizados mesmo em baixas concentrações,  
346 podendo ser utilizado como um sinal de alerta ou primeiro passo estudos mais aprofundados  
347 de toxicidade com embriões de *zebrafish*.

348 Nossos dados também sugerem que mesmo quando o organismo não desenvolveu  
349 completamente os órgãos específicos que são alvos conhecidos de um determinado pesticida,  
350 isto ainda afeta o organismo de diferentes maneiras e que as misturas destes produtos químicos  
351 podem exibir padrões distintos de toxicidade dependendo do *endpoint* escolhido,  
352 demonstrando que são necessárias mais investigações para determinar a toxicidade e a  
353 liberação de um pesticida.

## 354 **5. Conclusão**

355 Observamos que a análise do processo epibólico foi eficaz na abordagem da toxicidade  
356 dos pesticidas, de diferentes grupos químicos e suas misturas, provando ser tão sensível quanto  
357 a análise tradicional da letalidade. A toxicidade dos pesticidas encontrados nesta pesquisa  
358 permaneceu no teste de toxicidade aguda, onde os compostos isolados carbendazim e  
359 sulfentrazone mostraram o maior atraso na epibolia e causaram a maior letalidade no teste de  
360 toxicidade aguda. Usando este *endpoint*, não foi possível medir as interações e toxicidade das  
361 misturas de pesticidas usadas neste estudo, demonstrando quão complexa a interação destes  
362 compostos e seus efeitos sobre os organismos pode ser, demonstrando a necessidade de mais  
363 pesquisas sobre os efeitos das misturas de pesticidas. Concluímos que os três pesticidas  
364 selecionados causaram efeitos tóxicos no estágio embrionário do *zebrafish* nos dois intervalos  
365 analisados, causando efeitos tanto nas concentrações limite permitidas para consumo quanto

366 em concentrações três vezes inferiores a este limite. Além da letalidade, estas substâncias  
367 também causaram efeitos teratogênicos que comprometem estes organismos de várias  
368 maneiras. Nossa pesquisa fornece informações toxicológicas valiosas sobre os efeitos dos  
369 pesticidas nos organismos aquáticos, o que promoverá uma maior compreensão dos perigos  
370 subjacentes da mistura de pesticidas, particularmente no ecossistema aquático.

371

## 372 **6. Agradecimentos**

373 A Universidade Federal Rural de Pernambuco, por permitir o desenvolvimento desta  
374 pesquisa e o CNPq pela bolsa de produtividade para Pabyton Cadena (306947/2020-0) e  
375 CAPES pelo apoio financeiro e a bolsa concedida a Samara Gomes (88887.528986/2020-00).  
376 Agradecimentos, são também devidos ao "ECO-R-pharmplast - Ecotoxicidade de combinações  
377 realistas de drogas farmacêuticas e microplásticos em ecossistemas marinhos", Fundação para  
378 a Ciência e a Tecnologia, FCT (referência POCI-01-0145-FEDER-029203). Esta pesquisa foi  
379 apoiada financeiramente pelo CESAM (UIDB/50017/2020+UIDP/50017/2020), pela  
380 FCT/MCTES através de fundos nacionais (PIDDAC), e pelo cofinanciamento pelo FEDER,  
381 dentro do Acordo de Parceria PT2020 e Compete para 2020.

382

## 383 **7. Referencias**

384 Andrade, T.S., Henriques, J.F., Almeida, A.R., Machado, L., Koba, O., Giang, P. T.,  
385 Domingues, I., *et al.*, 2016. Carbendazim exposure induces developmental, biochemical  
386 and behavioural disturbance in *zebrafish* embryos. *Aquatic. Toxic.*, 170, 390–399.

387 ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2016. Programa de análise de resíduos  
388 de agrotóxicos em alimentos - PARA. Relatório das análises de amostras monitoradas no  
389 período de 2013 a 2015. Brasília, Distrito Federal, Brasil.

- 390 ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada -  
391 Resolução RE nº 2.752 de 02 de outubro de 2019a. Disponível em: <  
392 [http://www.aenda.org.br/wp-content/uploads/2020/04/cir1198-anexo\\_res-](http://www.aenda.org.br/wp-content/uploads/2020/04/cir1198-anexo_res-2752_carbendazim.pdf)  
393 [2752\\_carbendazim.pdf](http://www.aenda.org.br/wp-content/uploads/2020/04/cir1198-anexo_res-2752_carbendazim.pdf) > Acessado em: 13 julho 2020.
- 394 ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada -  
395 Resolução - Re Nº 3.573, de 17 de dezembro de 2019b. Disponível em: <  
396 [http://www.aenda.org.br/wp-content/uploads/2020/04/cir1486-anexo-res-](http://www.aenda.org.br/wp-content/uploads/2020/04/cir1486-anexo-res-3573_fipronil.pdf)  
397 [3573\\_fipronil.pdf](http://www.aenda.org.br/wp-content/uploads/2020/04/cir1486-anexo-res-3573_fipronil.pdf) > Acessado em: 13 julho 2020.
- 398 ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada –  
399 Resolução - RE Nº 3.067, de 8 de novembro de 2018. Disponível em: <  
400 [https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-re-n-3-067-de-8-de-novembro-de-2018-](https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-re-n-3-067-de-8-de-novembro-de-2018-49799376)  
401 [49799376](https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-re-n-3-067-de-8-de-novembro-de-2018-49799376) > Acessado em: 14 julho 2020.
- 402 ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2012. Seminário sobre mercado de  
403 pesticidas em 2012.
- 404 Arenzon, A; De Lorenzo, C; Coimbra, N. J; Schulz, S. H. 2013. A determinação da toxicidade  
405 crônica para peixes baseada apenas na sobrevivência é suficiente? *Ecotox. Environ.*  
406 *Contam.* 8, 2, 65 - 68.
- 407 Authman, M.M.N., Zaki, M.S., Khallaf, E.A., Abbas, H.H., 2015. Use of Fish as Bioindicator  
408 of the Effects of Heavy Metals Pollution. *J. Aquac. Res. Develop.*, 6, 1-13.
- 409 Berlett, B., Stadtman, E.R., 1997. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress.  
410 *J. Biol. Chem.*, 272, 20313–20316.
- 411 Bernardes, M. F. F., Pazin, M., Pereira, L.C., Dorta, D.J., 2105. Impact of Pesticides on  
412 Environmental and Human Health, in: A. C. Andrezza, G. Scola (Eds.),  
413 *Toxicology Studies: Cells, Drugs and Environm.*, InTech, London, 195-233.

- 414 Bianchi, J., Fernandes, T.C.C., Marin-Morales, M.A., 2016. Induction of mitotic and  
415 chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and  
416 sulfentrazone and the mixture of them. *Chemosphere*. 144, 475–483.
- 417 Bobé, A.; Cooper, J.F.; Coste, C.M., Marie-Anne, M. 1998. Behavior of fipronil in soil  
418 under Sahelian plain field conditions. *Pestic. Sci.*, 52, 275-281.
- 419 Braunbeck, T., Kais, B., Lammer, E., Otte, J., Schneider, K., Stengel, D., Strecker, R.  
420 2014. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environ. Sci. Pollut.*  
421 *Res.*, 22, 21, 16247–16261.
- 422 Brodeur, J. C., Poliserpi, M. B., D’andrea, M. F., Sánchez, M., 2014. Synergy between  
423 glyphosate- and cypermethrin-based pesticides during acute exposures in tadpoles of the  
424 common South American Toad *Rhinella arenarum*. *Chemosphere*, 112, 70-76.
- 425 Cadena, P.G., Cadena, M.R.S., Sarmah, S., Marrs, J.A., 2020. Protective effects of quercetin,  
426 polydatin, and folic acid and their mixtures in a *zebrafish* (*Danio rerio*) fetal alcohol  
427 spectrum disorder model. *Neurotox. Terato.*, 82, 106928.
- 428 Carazo-Rojas, E., Pérez-Rojas, G., Pérez-Villanueva, M., Chinchilla-Soto, C., Chin-Pampillo,  
429 J. S., Aguilar-Mora, P., *et al.*, 2018. Pesticide monitoring and ecotoxicological risk  
430 assessment in surface water bodies and sediments of a tropical agro-ecosystem.  
431 *Environm. Pollut.*, 241, 800–809.
- 432 Castro, V., Destefani, C., Diniz, C., Poli, P., 2007. Evaluation of neurodevelopmental effects on  
433 rats exposed prenatally to sulfentrazone. *NeuroToxicology*, 28(6), 1249–1259.
- 434 Chapman, P.M.; Wang, F.; Germano, J.; Batley, G., 2002. Pore water testing and analysis: the  
435 good, the bad, and the ugly. *Mar. Pollut. Bull.*, 44, 359-366.

- 436 Cheng, J.C., Miller, A.L., Webb, S.E., 2004. Organization and function of microfilaments  
437 during late epiboly in *zebrafish* embryos. *Develop. Dynam.*, 231, 2, 313–323.
- 438 Demirci, O., Güven, K., Asma, D., Ögüt, S., Uğurlu, P., 2018. Effects of endosulfan,  
439 thiamethoxam, and indoxacarb in combination with atrazine on multibiomarkers in *G.*  
440 *kischineffensis*. *Ecotox. Environ. Saf.*, 147, 749-758.
- 441 Disner, G.R., Falcao, M.A.P., Andrade-Barros, A.I., Leite dos Santos, N.V., Soares, A.B.S.,  
442 Marcolino-Souza, M., *et al.*, 2021. The toxic effects of glyphosate, chlorpyrifos,  
443 abamectin, and 2,4-D on animal models: a systematic review of Brazilian studies. *Integ.*  
444 *Environ. Assess. and Manag.*, 17(3), 507-520.
- 445 Eadie, A., Vasquez, I., Liang, X., Wang, X., Souders, C., El Chehour, J., *et al.*, 2020. Residual  
446 molecular and behavioral effects of the phenylpyrazole pesticide fipronil in larval  
447 *zebrafish* (*Danio rerio*) following a pulse embryonic exposure. *Comp. Bioch. and Physio.*  
448 *Part D: Gen. and Prot.*, 36, 100743.
- 449 EFSA - European Food Safety Authority, 2013. EFSA identifies risks to bees from  
450 neonicotinoids.
- 451 Ferreira, F.A., Silva, A.A.D., Ferreira, L.R., 2005. Mecanismos de ação de herbicidas. In V  
452 Congresso Brasileiro de Algodão, p. 4.
- 453 Freitas, J.S., Teresa, F.B., Almeida, E.A., 2017. Influence of temperature on the antioxidant  
454 responses and lipid peroxidation of two species of tadpoles (*Rhinella schneideri* and  
455 *Physalaemus nattereri*) exposed to the herbicide sulfentrazone (Boral 500SC®). *Comp.*  
456 *Biochem. Physiol. C.*, 197, 32–44.
- 457 Fridman, J.S., Lowe, S.W., 2003. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 22(56), 9030-9040.
- 458 Fukushima, H., Bailone, R., Baumgartner, I., Borra, R., Correa, T., De Aguiar, L.K., Janke, H.,  
459 Roça, R. and Setti, P., 2020. Potenciais usos do modelo animal *Zebrafish* *Danio rerio* em

- 460 pesquisas na Medicina Veterinária. Revista de Educação Continuada em Medicina  
461 Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP, 18(1).
- 462 Gilbert-Barness, E., 2010. Teratogenic causes of malformations. Ann. Clin. Lab. Sci.40, 99-  
463 114.
- 464 Grichar, W.J., Besler, B.A., Dotray, P.A., 2006. Weed control and peanut (*Arachis hypogaea*)  
465 response to sulfentrazone. Crop Prot., 5, 753–7.
- 466 Griogori, P. 2019. Governo libera registro de agrotóxicos altamente tóxicos em 2019. Agência  
467 Pública. Repórter Brasil. Disponível em: < [https://reporterbrasil.org.br/2019/01/governo-](https://reporterbrasil.org.br/2019/01/governo-liberou-registros-de-agrotoxicos-altamentetoxicos/?fbclid=IwAR2jXq4vckcliIFmsrPZBpEDFYZy89RoH_9m29VSqsRpYkAMIRiKFHs7YBI)  
468 [liberou-registros-de-agrotoxicos-](https://reporterbrasil.org.br/2019/01/governo-liberou-registros-de-agrotoxicos-altamentetoxicos/?fbclid=IwAR2jXq4vckcliIFmsrPZBpEDFYZy89RoH_9m29VSqsRpYkAMIRiKFHs7YBI)  
469 [altamentetoxicos/?fbclid=IwAR2jXq4vckcliIFmsrPZBpEDFYZy89RoH\\_9m29VSqsR](https://reporterbrasil.org.br/2019/01/governo-liberou-registros-de-agrotoxicos-altamentetoxicos/?fbclid=IwAR2jXq4vckcliIFmsrPZBpEDFYZy89RoH_9m29VSqsRpYkAMIRiKFHs7YBI)  
470 [pYkAMIRiKFHs7YBI](https://reporterbrasil.org.br/2019/01/governo-liberou-registros-de-agrotoxicos-altamentetoxicos/?fbclid=IwAR2jXq4vckcliIFmsrPZBpEDFYZy89RoH_9m29VSqsRpYkAMIRiKFHs7YBI) > Acessado em: 03 de março 2019.
- 471 Güngördü, A., Uçkun, M., Yoloğlu, E., 2016. Integrated assessment of biochemical markers in  
472 premetamorphic tadpoles of three amphibian species exposed to glyphosate- and  
473 methidathion- based pesticides in single and combination forms. Chemosphere, 144,  
474 2024–2035.
- 475 Høy, T., Horsberg, T.E., Nafstad, I., 1990. The disposition of ivermectin in Atlantic salmon  
476 (*Salmo salar*). Pharm. Toxi. 67, 307-312.
- 477 Jackson, M.C., 2016. Net effects of multiple stressors in freshwater ecosystems: a meta-  
478 analysis. Glob. Chal. Biol., 22, 180-189.
- 479 Kim, Y.A., Yoon, Y.S., Kim, H.S., Jeon, S.J., Cole, E., Lee, J., *et al.*, 2019. Distribution of  
480 fipronil in humans, and adverse health outcomes of in utero fipronil sulfone exposure  
481 in newborns. Int. J. Hyg. Environ. Heal., 222, 524–532.
- 482 Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of  
483 embryonic development of the *zebrafish*. The Amer. Ass. Anat., 203, 253–310.

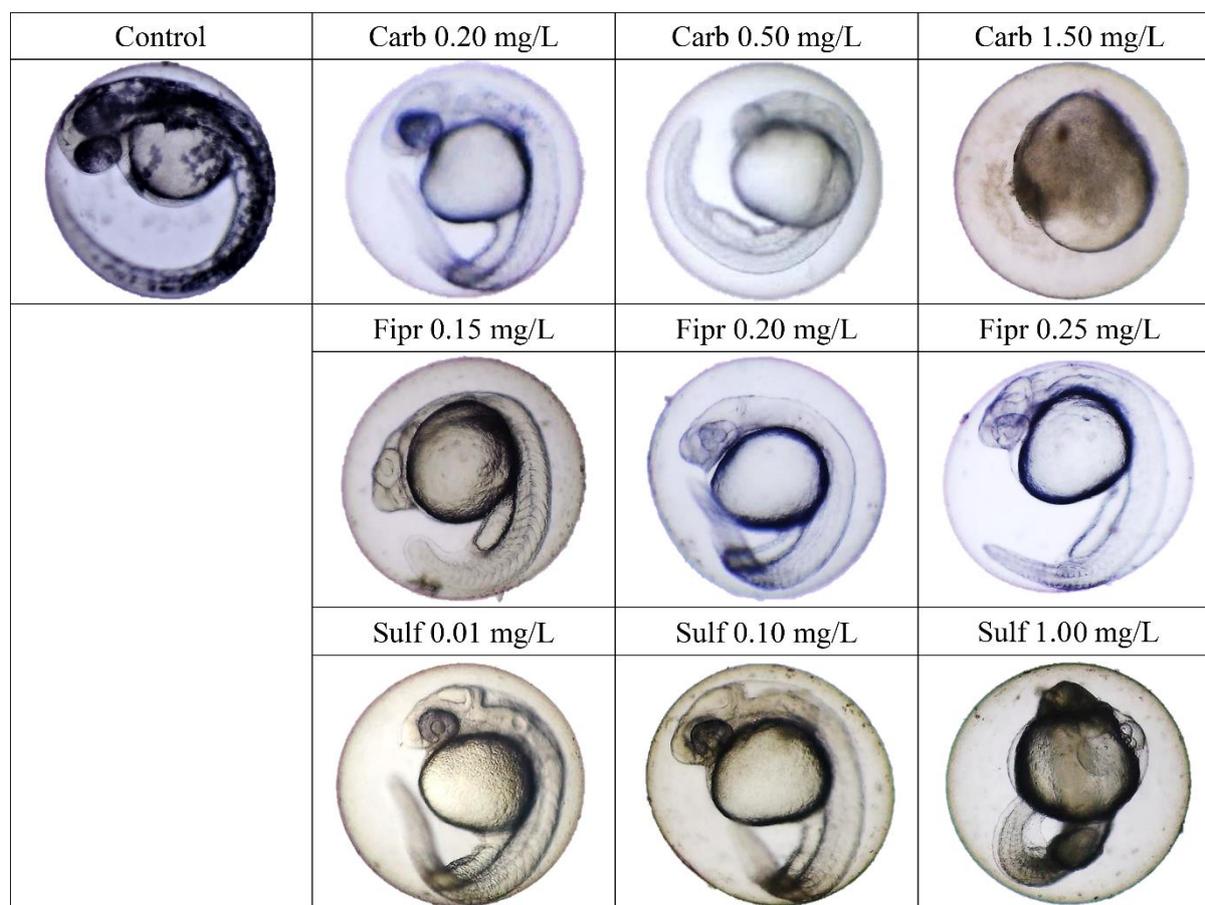
- 484 Kronbauer, E.A., Biondo, E., Zanetti, C., Kolchinski, E.M., 2021. Agrotóxicos em água do rio  
485 e água tratada no Município de Encantado/RS. Ambiente: Gestão e  
486 Desenvolvimento, 14, 2.
- 487 Li, M., Ma, X., Saleem, M., Wang, X., Sun, L., Yong, Y., *et al.*, 2020. Biochemical response,  
488 histopathological change and DNA damage in earthworm (*Eisenia fetida*) exposed to  
489 sulfentrazone herbicide. Eco. Indic. 11, 106465.
- 490 Lim, J., Miller, M.G., 1997. The role of the benomyl metabolite carbendazim in benomyl-  
491 induced testicular toxicity. Toxicol. Appl. Pharmacol., 142: 401–410.
- 492 Liu, W. R., Zhao, J. L., Liu, Y. S., Chen, Z. F., Yang, Y. Y., *et al.* 2015. Biocides in the Yangtze  
493 River of China: spatiotemporal distribution, mass load and risk assessment. Environm.  
494 Pollut., 200, 53-63.
- 495 Loureiro, S., Svendsen, C., Ferreira, A.L., Pinheiro, C., Ribeiro, F., Soares, A. M., 2010.  
496 Toxicity of three binary mixtures to *Daphnia magna*: comparing chemical modes of  
497 action and deviations from conceptual models. Environ. Toxi. and Chem., 29(8), 1716-1726.
- 498 Ludwikowska, A., Bojarski, B., Socha, M., Lutnicka, H., Trzeciak, K.B., 2013. The effect of  
499 carbendazim on embryonic Prussian carp (*Carassius gibelio*) development and  
500 hatching. Fish. & Aquatic Life, 21(4), 367-371.
- 501 Marchezan, E., Sartori, G.M.S., Avila, L.A., Machado, S.L.O., Zanella, R., *et al.*, 2010.  
502 Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande  
503 do Sul, Brasil. Ciência Rural, 40, 1053-1059.
- 504 Mendis, J.C., Tennakoon, T.K., Jayasinghe, C. D., 2018. *Zebrafish* Embryo Toxicity of a  
505 Binary Mixture of Pyrethroid Insecticides: d-Tetramethrin and Cyphenothrin. Journ.  
506 Toxic., 2018, 1–8.

- 507 Novelli, A., Vieira, B.H., Braun, A.S., Mendes, L.B., Daam, M.A., Espíndola, E.L.G.,  
508 2016. Impact of runoff water from an experimental agricultural field applied with  
509 Vertimec ® 18EC (abamectin) on the survival, growth and gill morphology of *zebrafish*  
510 juveniles. *Chemosphere*, 144, 1408–1414.
- 511 OECD, 2013. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Fish Embryo Acute Toxicity  
512 (FET) Test. OECD, Paris, France (No. 236).
- 513 Overmyer, J.P., Rouse, D.R., Avants, J.K., Garrison, A.W., DeLorenzo, M.E., Chung, K.W.,  
514 Black, M. C., *et al.*, 2007. Toxicity of fipronil and its enantiomers to marine and  
515 freshwater non-targets. *Jour. of Environ. Scie. and Heal. Part B*, 42(5), 471-480.
- 516 Palanikumar, L., Kumaraguru, A.K., Ramakritinan, C.M., Anand, M., 2014. Toxicity,  
517 biochemical and clastogenic response of chlorpyrifos and carbendazim in milkfish  
518 *Chanos chanos*. *Intern. Jour. of Environm. Scie. and Tech.*, 11(3), 765-774.
- 519 Park, H., Lee, J.-Y., Park, S., Song, G., Lim, W., 2019. Developmental toxicity of fipronil in early  
520 development of *zebrafish (Danio rerio)* larvae: disrupted vascular formation with angiogenic  
521 failure and inhibited neurogenesis. *Jour. of Hazar. Mater.*, 121531.
- 522 Pérez, J., Domingues, I., Monteiro, M., Soares, A.M.V.M., Loureiro, S., 2013. Synergistic  
523 effects caused by atrazine and terbuthylazine on chlorpyrifos toxicity to early-life stages  
524 of the *zebrafish Danio rerio*. *Environm. Sci. Pollu. Rese.*, 20, 7, 4671–4680.
- 525 Sanches, A.L.M., Vieira, B.H., Reghini, M.V., Moreira, R.A., Freitas, E.C., Espíndola, E.L.G.,  
526 Daam, M.A., 2017. Single and mixture toxicity of abamectin and difenoconazole to adult  
527 *zebrafish (Danio rerio)*. *Chemosphere*, 188, 582–587.
- 528 Santos, M.J., Morgado, R., Ferreira, N.G.C., Soares, A., Loureiro, S., 2011. Evaluation of the  
529 joint effect of glyphosate and dimethoate using a small-scale terrestrial  
530 ecosystem. *Ecotox. and environ. Saf.*, 74(7), 1994-2001.

- 531 Sarmah, S., Muralidharan, P., Curtis, C.L., McClintick, J.N., Buente, B.B., Holdgrafer, D.J.,  
532 Marrs, J.A., *et al.*, 2013. Ethanol exposure disrupts extraembryonic microtubule  
533 cytoskeleton and embryonic blastomere cell adhesion, producing epiboly and  
534 gastrulation defects. *Biol. Op.* 2, 1, 1013–1021.
- 535 Schwend, T., Loucks, E.J., Snyder, D., Ahlgren, S.C., 2011. Requirement of Npc1 and  
536 availability of cholesterol for early embryonic cell movements in *zebrafish*. *Jour. Lip.*  
537 *Res.* 52, 7, 1328–1344.
- 538 Shen, W., Lou, B., Xu, C., Yang, G., Yu, R., Wang, X., Wang, Y., *et al.*, 2020. Lethal toxicity  
539 and gene expression changes in embryonic *zebrafish* upon exposure to individual and  
540 mixture of malathion, chlorpyrifos and lambda-cyhalothrin. *Chemosphere*, 239, 124802.
- 541 Silva, A.R.R., Cardoso, D.N., Cruz, A., Lourenço, J., Mendo, S., Soares, A.M., *et al.*, 2015.  
542 Ecotoxicity and genotoxicity of a binary combination of triclosan and carbendazim to  
543 *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 115, 279–290.
- 544 Singh, S., Singh, N., Kumar, V., Datta, S., Wani, A.B., Singh, D., *et al.*, 2016. Toxicity,  
545 monitoring and biodegradation of the fungicide carbendazim. *Environ. Chem. Lett.* 14,  
546 317–329.
- 547 Solnica-Krezel, L., Driever, W., 1994. Microtubule arrays of the *zebrafish* yolk cell:  
548 organization and function during epiboly. *Development*, 120, 2443-2455.
- 549 Solnica-Krezel, L., Sepich, D.S., 2012. Gastrulation: making and shaping germ layers. *Annu.*  
550 *Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 687-717.
- 551 Sulukan, E., Köktürk, M., Ceylan, H., Beydemir, Ş., Işık, M., Atamanalp, M., *et al.*, 2017. An  
552 approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during  
553 embryonic development of *zebrafish* (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 180, 77 - 85.

- 554 Thorngren, J. L., Harwood, A. D., Murphy, T. M., Huff Hartz, K. E., Fung, C. Y., Lydy, M. J.,  
555 2016. Fate and risk of atrazine and sulfentrazone to nontarget species at an agriculture  
556 site. *Environ. Tox. and Chem.*, 36(5), 1301–1310.
- 557 Turgut, C., Fomin, A., 2002. Sensitivity of the rooted macrophyte *Myriophyllum aquaticum*  
558 (Vell.) Verdcourt to seventeen pesticides determined on the basis of EC50. *Bull. of*  
559 *Environm. Contam. and toxic.*, 69(4), 601-608.
- 560 Uçar, A., Parlak, V., Özgeriş, F.B., Yeltekin, A.Ç., Alak, G., Atamanalp, M., 2020.  
561 Determination of Fipronil toxicity by different biomarkers in gill and liver tissue of  
562 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *In Vit. Cell. & Develop. Biol.-Anim.*, 56(7), 543-549.
- 563 Verduzco, D., Amatruda, J.F., 2011. Analysis of cell proliferation, senescence, and cell death  
564 in *zebrafish* embryos. *Meth. in cell biol.*, 101, 19-38.
- 565 Yan, L., Gong, C., Zhang, X., Zhang, Q., Zhao, M., Wang, C., 2016. Perturbation of  
566 metabonome of embryo/larvae *zebrafish* after exposure to fipronil. *Environm. Toxic, and*  
567 *pharmac.*, 48, 39-45.
- 568 Wan, Y., Tran, T.M., Nguyen, V.T., Wang, A., Wang, J., Kannan, K., 2021. Neonicotinoids,  
569 fipronil, chlorpyrifos, carbendazim, chlorotriazines, chlorophenoxy herbicides,  
570 bentazon, and selected pesticide transformation products in surface water and drinking  
571 water from northern Vietnam. *Sci. of The Tot. Environ.*, 750, 141507.
- 572 Wang, A., Mahai, G., Wan, Y., Jiang, Y., Meng, Q., Xia, W., *et al.*, 2019. Neonicotinoids and  
573 carbendazim in indoor dust from three cities in China: spatial and temporal variations.  
574 *Sci. Total Environ.* 695, 133790.
- 575 Wang, Y., Lv, L., Yu, Y., Yang, G., Xu, Z., Wang, Q., Cai, L., 2017. Single and joint toxic  
576 effects of five selected pesticides on the early life stages of *zebrafish* (*Denio rerio*).  
577 *Chemosphere*, 170, 61–67.

- 578 Wang, Y., Wu, S., Chen, J., Zhang, C., Xu, Z., Li, G., Wang, Q., *et al.*, 2018. Single and joint  
579 toxicity assessment of four currently used pesticides to *zebrafish* (*Danio rerio*) using  
580 traditional and molecular *endpoints*. *Chemosphere*, 192, 14–23.
- 581 Wei, Y., Meng, Y., Huang, Y., Liu, Z., Zhong, Ke., Ma, J., *et al.*, 2020. Development toxicity  
582 and cardiotoxicity in *zebrafish* from exposure to iprodione. *Chemosphere*, 127860.
- 583 Westerfield, M., 2000. The *Zebrafish* Book: A Guide for the Laboratory Use of *Zebrafish*  
584 (*Danio rerio*), 4th ed. University of Oregon Press, Eugene, OR.
- 585 Weston, D.P., Lydy, M.J., 2014. Toxicity of the insecticide fipronil and its degradates to  
586 benthic macroinvertebrates of urban streams. *Environ. Sci. Technol.* 48, 1290–1297.
- 587 Wu, C. H., Lu, C. W., Hsu, T. H., Wu, W. J., Wang, S. E. 2021. Neurotoxicity of fipronil  
588 affects sensory and motor systems in zebrafish. *Pestic. Bioch. and Physio.*, 177, 104896.
- 589 Zhang, Y., Li, S., Wang, W., Xu, C., Liang, S., Liu, M., Hao, W., Zhang, R., 2015. Beneficial  
590 effects of polydatin on learning and memory in rats with chronic ethanol exposure. *Int.*  
591 *J. Clin. Exp. Pathol.*, 8, 11116–11123.

592 **FIGURAS**

593

594 Figura 1. Foram observados efeitos teratogênicos em embriões de *zebrafish* expostos a  
595 diferentes concentrações dos pesticidas carbendazim, fipronil e sulfentrazone com 24 hpf em  
596 comparação com um embrião normal (grupo de controle). Chave: Controle - Controle; Carb -  
597 Carbendazim; Fipr - Fipronil; Sulf - Sulfentrazone.

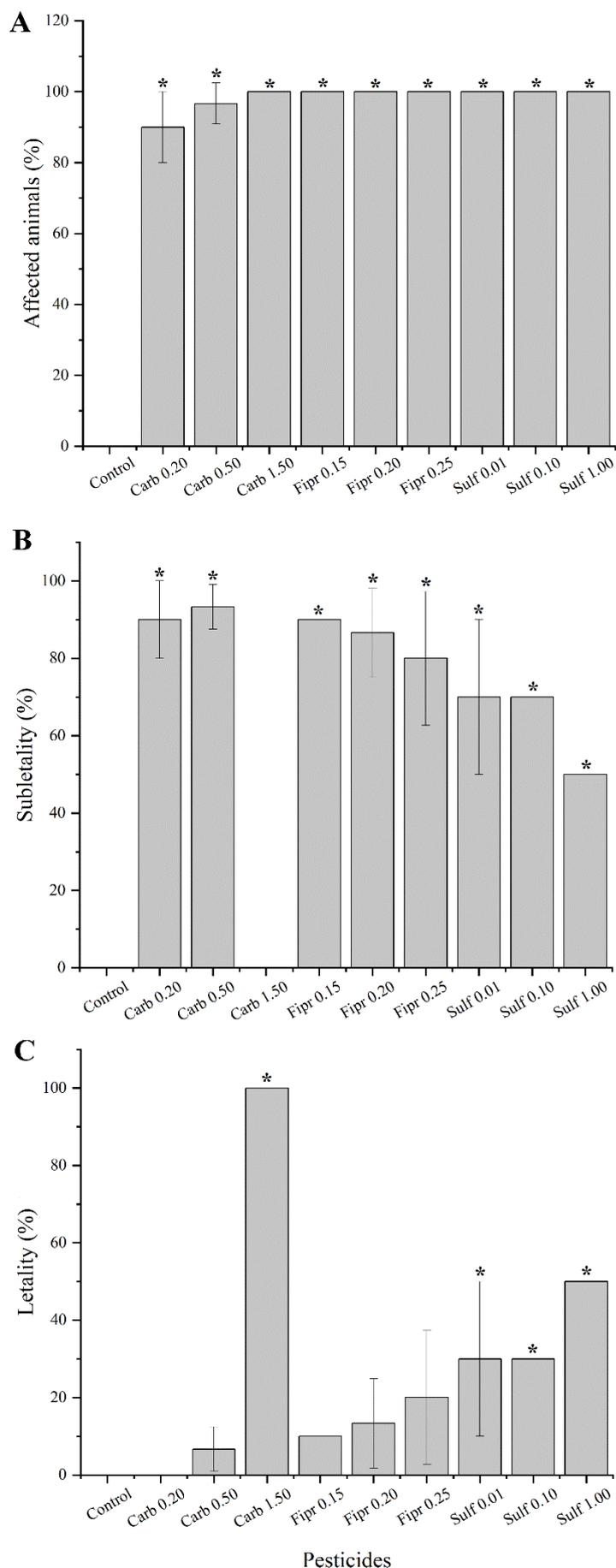
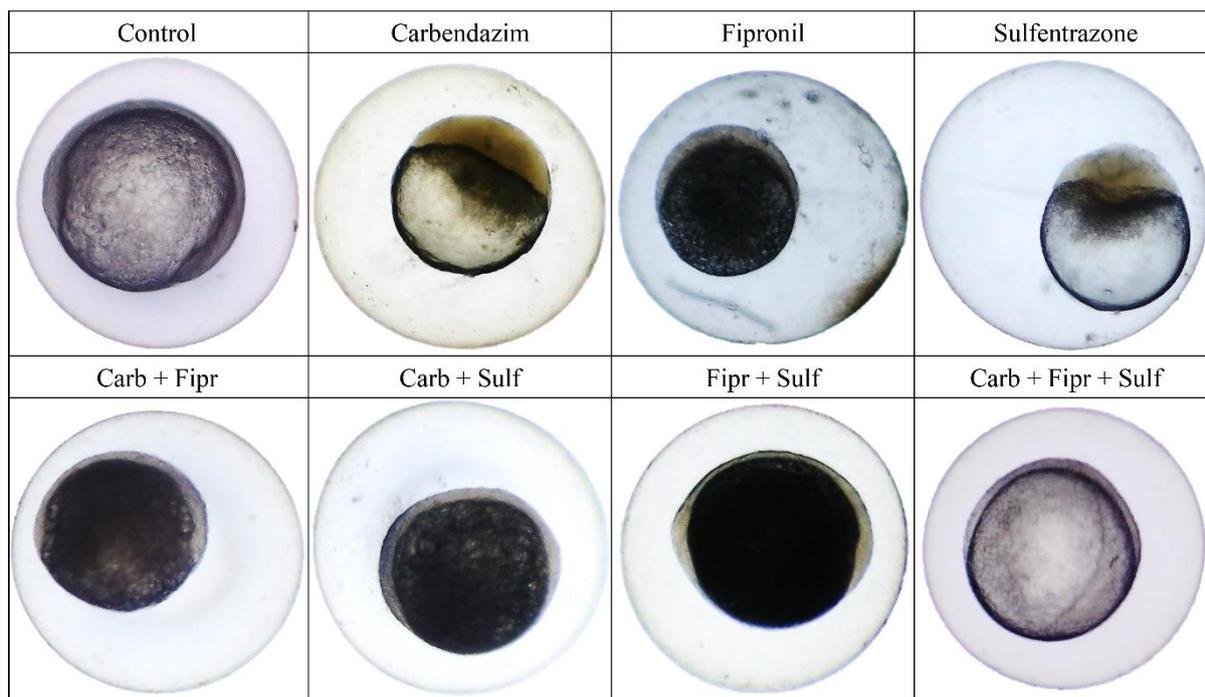
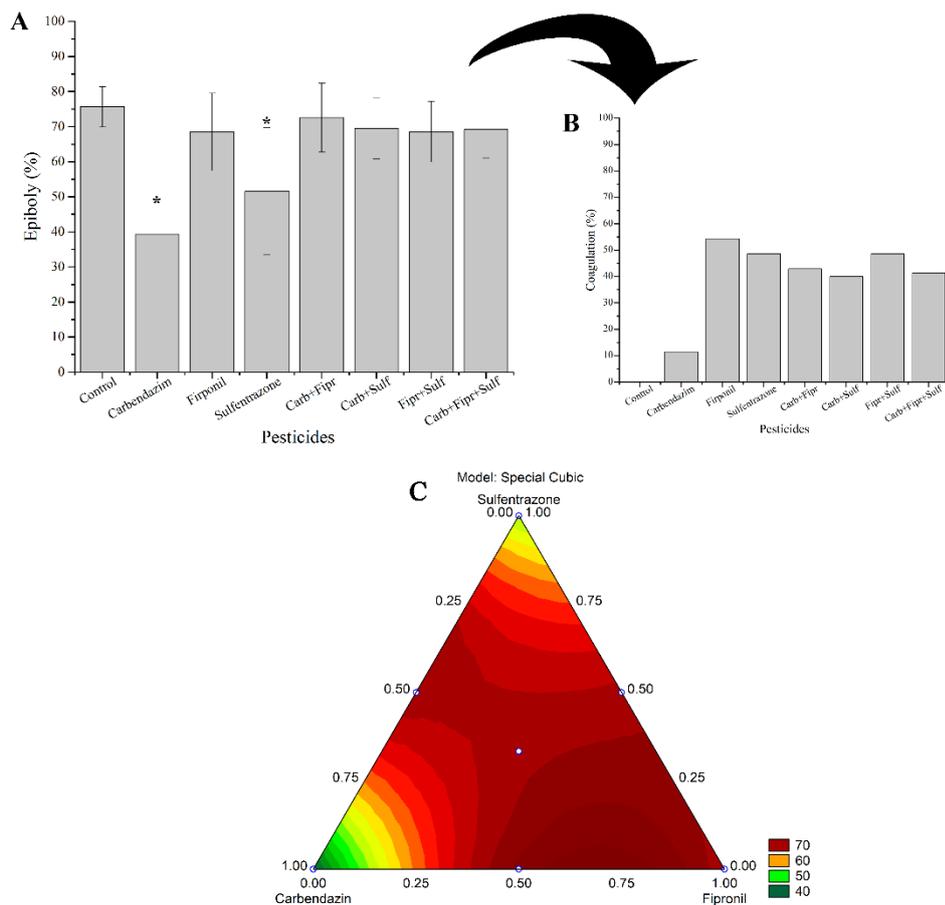


Figura 2. Resultados do teste de toxicidade dos pesticidas carbendazim, fipronil e sulfentrazone em embriões *zebrafish* com 24 hpf. Onde (A) representa a porcentagem de animais afetados, incluindo efeitos letais e subletais, em comparação com o grupo de controle por ANOVA unidirecional ( $F(9,29) = 220.67$ ,  $p < 0,001$ ); (B) porcentagem de animais que apresentaram efeitos subletais em comparação com o grupo de controle por ANOVA unidirecional ( $F(9,29) = 39,42$ ,  $p < 0,001$ ); e (C) porcentagem de animais que apresentaram efeitos letais em comparação com o grupo de controle por ANOVA unidirecional ( $F(9,29) = 31,78$ ,  $p < 0,01$ ). \* Representa a diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Legenda: Controle - Controle; Carb - Carbendazim; Fipr - Fipronil; Sulf - Sulfentrazone.



599

600 Figura 3. Foram observados efeitos tóxicos em embriões de *zebrafish* expostos aos compostos  
601 isolados e misturas binárias e ternárias com 8 hpf em comparação com um embrião normal  
602 (grupo de controle). Legenda: Controle - Controle; Carb - Carbendazim; Fipr - Fipronil; Sulf -  
603 Sulfentrazone.



604

605 Figura 4. Exposição do *zebrafish* aos pesticidas carbendazim, fipronil, e sulfentrazone durante  
 606 a embriogênese com 8 hpf. (A) Percentual de epibolia, foi considerado afetado quando o teste  
 607 de Tukey =  $p < 0,05$  (\*). Cada grupo experimental foi comparado com o grupo controle por  
 608 ANOVA unidirecional ( $F(7,190) = 47,29$   $p < 0,001$ ) seguido pelo teste de Tukey (Carbendazim  
 609  $p = 0,00$ ; Fipronil  $p = 0,19$ ; Sulfentrazone  $p < 0,001$ ; Carb + Fipr  $p = 0,93$ ; Carb + Sulf  $p =$   
 610  $0,30$ ; Fipr + Sulf  $p = 0,16$ ; Carb + Fipr + Sulf  $p = 0,12$ ). (B) Porcentagem de animais coagulados  
 611 visualizada durante o teste de epibolia dos pesticidas isolados e misturados. (C) Gráfico  
 612 Ternary contour plot das variáveis do Carbendazim, Fipronil, e Sulfentrazone para um modelo  
 613 cúbico especial ( $F(1,150) = 6,02$ ,  $p = 0,01$ ) avaliando os efeitos individuais e as interações  
 614 destes pesticidas em suas misturas. Carbendazim e Sulfentrazone causaram maior redução no  
 615 percentual de epibolia (áreas verdes). Legenda: Controle - Controle; Carb - Carbendazim; Fipr  
 616 - Fipronil; Sulf - Sulfentrazone.

617 **TABELAS**

618

619 **Tabela 1.** (A) Concentrações dos compostos individuais usados no teste de toxicidade para  
 620 avaliar os efeitos teratogênicos em embriões *zebrafish* a 24 hpf. (B) Concentrações dos  
 621 compostos individuais, misturas binárias e ternárias usadas para medir os efeitos tóxicos dos  
 622 pesticidas carbendazim (Carb), fipronil (Fipr) e sulfentrazone (Sulf) no modelo *zebrafish*  
 623 durante a epibolia. O layout do método de projeto *simplex centroid design* para avaliação das  
 624 interações entre os compostos químicos.

625

<i>A – Teste de toxicidade para a avaliação dos efeitos teratogênicos a 24 hpf</i>			
Componentes	Carbendazim (mg/L)	Fipronil (mg/L)	Sulfentrazone (mg/L)
Controle	0.00	0.00	0.00
Carb 0.20	0.20	-	-
Carb 0.50	0.50	-	-
Carb 1.50	1.50	-	-
Fipr 0.15	-	0.15	-
Fipr 0.20	-	0.20	-
Fipr 0.25	-	0.25	-
Sulf 0.01	-	-	0.01
Sulf 0.10	-	-	0.10
Sulf 1.00	-	-	1.00
<i>B - Simplex centroid desing para avaliação da epibolia a 8 hpf</i>			
Componentes	Carbendazim (mg/L)	Fipronil (mg/L)	Sulfentrazone (mg/L)
Carb	0.20	0.00	0.00
Fipr	0.00	0.20	0.00
Sulf	0.00	0.00	0.20
Carb + Fipr	0.10	0.10	0.00
Carb + Sulf	0.10	0.00	0.10
Fipr + Sulf	0.00	0.10	0.10
Carb + Fipr + Sulf	0.06	0.06	0.06

626

## **CAPÍTULO II**

### **ARTIGO CIENTÍFICO II:**

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS DAS MISTURAS E DOS COMPOSTOS  
ISOLADOS CARBENDAZIM, FIPRONIL E SULFENTRAZONA EM LARVAS DE  
*ZEBRAFISH (DANIO RERIO)***

## 1 **Resumo**

2 Os pesticidas são frequentemente detectados em ambientes aquáticos, e raramente são  
3 encontrados como compostos isolados. No entanto, a avaliação destes químicos em relação ao  
4 meio aquático é principalmente estudada através dos compostos isolados, e os efeitos aditivos  
5 das interações pode estar subestimado. Estes químicos mesmo em baixas concentrações podem  
6 afetar adversamente o organismo exposto, alterando comportamentos ecologicamente  
7 importantes (como alimentação e fuga dos predadores) que provavelmente terão importantes  
8 repercussões para as populações. O objetivo do presente estudo foi utilizar uma abordagem  
9 multi comportamental, para avaliar os impactos comportamentais da exposição ao  
10 carbendazim(C), fipronil (F) e sulfentrazone (S) isolados e misturados (C+F, C+S, F+S e  
11 C+F+C), comparando as respostas de diferentes testes comportamentais em larvas de *zebrafish*.  
12 Para atingir este objetivo, foram realizados cinco testes comportamentais (Tigmotáxia,  
13 Sensibilidade ao toque, resposta optomotora, bolas saltitantes e atividade exploratória), onde  
14 foi possível avaliar comportamentos como ansiedade, medo, interação espacial e social. Houve  
15 alterações significativas no desempenho de larvas expostas aos pesticidas e suas misturas em  
16 três testes comportamentais (resposta optomotora, bolas saltitantes e atividade exploratória).  
17 No entanto, o teste das bolas saltitantes se mostrou mais sensível, onde todos os grupos  
18 expostos apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Nos testes de resposta  
19 optomotora e atividade exploratória foi possível observar o efeito sinérgico das misturas  
20 binárias (C+F, C+S, F+S), onde os grupos expostos a estas misturas apresentaram maiores  
21 reduções em relação ao controle do que os grupos exposto aos pesticidas individuais. Por isso  
22 pesquisas que utilizem testes comportamentais para testar misturas de pesticidas são  
23 importantes, para padronizar os métodos de testes comportamentais, e para associar alterações  
24 a comportamentos ecologicamente relevantes, ajudando a promover o uso desses ensaios  
25 quando investigando os potenciais impactos ambientais dos compostos neurotóxicos.

26 **Palavras-chave:** Peixes, Pesticidas, Abordagem multi comportamental, Neurotoxicidade,  
27 Resposta sinérgica.

28

## 29 **1. Introdução**

30 Os pesticidas são reconhecidos como um problema que vai além da saúde humana,  
31 porque representam sérias ameaças a vertebrados, invertebrados e ecossistemas em geral, a  
32 dispersão destes produtos pode atingir organismos não-alvo como os peixes, que podem sofrer  
33 alterações fisiológicas e, em alguns casos, podem causar até a morte, além de mudanças no  
34 comportamento do organismo que por sua vez pode reduzir a aptidão de um indivíduo, levando  
35 à população declínio e graves efeitos no ecossistema (Peterson *et al.*, 2017; Fitzgerald *et al.*,  
36 2021). The application of these products does not respect natural barriers such as relief and  
37 riparian forest, being almost impossible to control its course in the field (Severo *et al.*, 2020).  
38 Sendo raramente detectados em ambientes aquáticos como químicos isolados, pois são  
39 frequentemente aplicados juntos em uma mistura ou porque um único corpo d'água supre a  
40 demanda aquífera de mais de uma cultura agrícola (Güngördü *et al.*, 2016)

41 No entanto, a avaliação destes químicos em relação ao meio aquático é principalmente  
42 estudada através da determinação de concentrações letais, o que é essencial para o ponto de  
43 vista regulatório, mas reflete apenas o pior caso cenário (Fitzgerald *et al.*, 2021). Os efeitos  
44 sutis da exposição subletal são pouco compreendidas, mas são importantes para a compreensão  
45 real dos cenários ambientais (Legradi *et al.*, 2018). E químicos como os pesticidas comumente  
46 são encontrados no meio aquático em baixas concentrações, sendo acumulados e seus efeitos  
47 ampliados através da cadeia alimentar (Syafudin *et al.*, 2021). Dentre os efeitos subletais, os  
48 comportamentais estão sendo cada vez mais estudados, embora a análise comportamental tenha  
49 demorado inicialmente a ser integrada na toxicologia aquática, sua velocidade, sensibilidade e  
50 por serem tão quão ambientalmente relevantes em comparação com os tradicionais *endpoints*

51 de letalidade, fizeram dela uma ferramenta promissora (Klüver *et al.*, 2015; Fitzgerald *et al.*,  
52 2021). Vários estudos relatam efeitos tóxicos comportamentais em concentrações de ordens de  
53 grandeza inferiores às concentrações letais já descritas dos químicos (Fitzgerald *et al.*, 2021;  
54 Rosa *et al.*; 2022).

55 O *zebrafish* (*Danio rerio*) surgiu como um modelo animal para o estudo do  
56 comportamento dos peixes, sua validade como modelo animal não é apenas devido à  
57 proximidade morfológica e genética da espécie (60 a 80% de homologia com genes humanos)  
58 (Howe *et al.*, 2013), mas também comportamental (Fitzgerald *et al.*, 2021). Em particular, o  
59 *zebrafish* exibe uma ampla gama de comportamentos complexos, incluindo interações sociais,  
60 ansiedade, aprendizagem, memória e comportamentos de evasão que podem ser úteis para  
61 modelagem de doenças neurológicas e psiquiátricas (Rosa *et al.*, 2022).

62 Há um crescente interesse no comportamento de larvas de *zebrafish*, uma vez que as  
63 larvas são ideais para testes em grande escala, onde um único ciclo reprodutivo pode produzir  
64 centenas de embriões e um rápido desenvolvimento, com órgãos como o cérebro, coração,  
65 fígado, pâncreas, rins, ossos, músculos e sistemas sensoriais funcionando em 5 dpf (dias pós  
66 fertilização) (Kimmel *et al.*, 1995), além de exibir também, um conjunto de comportamentos,  
67 como, natação, caça e fuga durante a primeira semana de desenvolvimento (Basnet *et al.*, 2019;  
68 Lau *et al.*, 2012). Além de que a exposição a agentes neurotóxicos podem causar danos ao  
69 cérebro, especialmente se a exposição ocorre durante o período de desenvolvimento inicial  
70 (Grandjean e Landrigan, 2006).

71 Apesar da óbvia diferença entre *zebrafish* e humanos, tais como a ausência de alguns  
72 órgãos de mamíferos, os paradigmas comportamentais dos mamíferos e do *zebrafish* estão em  
73 estreito paralelo, sugerindo a natureza evolutivamente conservada em muitos comportamentos  
74 através das espécies (Basnet *et al.*, 2019; Keney *et al.*, 2017). Mesmo com diferenças  
75 neuroanatomias entre os mamíferos e os teleósteos, as pesquisas mostram funções homólogas

76 em várias áreas do cérebro do *zebrafish* (Randlett *et al.*, 2015). As larvas de *zebrafish*  
77 apresentam um robusto repertório cognitivo, como memória, aprendizagem social e espacial,  
78 comportamentos ansiosos, stress e medo, assim como em outros vertebrados, uma vez que os  
79 mesmos neurotransmissores e sistema neuroendócrino estão presentes (Rosa *et al.*, 2022;  
80 Mueller *et al.* 2006; Panula *et al.*, 2006)

81 Muitos testes diferentes são utilizados para investigar os efeitos toxicológicos sobre o  
82 comportamento, como respostas motoras básicas, respostas sensorimotoras, e/ou aprendizagem  
83 e memória (d'Amora e Giordani 2018). Entretanto, devido à alta complexidade das respostas  
84 comportamentais, não há atualmente nenhum método ou ensaio padronizado, o que leva a  
85 dificuldades ao comparar experiências comportamentais e seus resultados (Ogungbemi *et al.*,  
86 2019). Portanto, o uso de uma estratégia com testes multi comportamentais é aconselhável para  
87 determinar as interações entre as estruturas do sistema nervoso (Jordi *et al.*, 2018), visto que,  
88 produtos químicos nem sempre apresentam o mesmo fenótipo comportamental (Leuthold *et*  
89 *al.*, 2018).

90 Recentemente, uma série de estudos demonstraram que os pesticidas, incluindo  
91 carbendazim, fipronil e sulfentazona, foram detectados em ecossistemas aquáticos e até  
92 mesmo em alimentos (Thorngren *et al.*, 2017; Xianjiang *et al.*, 2020; Kronbauer *et al.*, 2021;  
93 Yanjian *et al.*, 2021), indicando que avaliar os riscos destes pesticidas e suas misturas é  
94 necessário e importante. Alguns estudos posteriores também confirmaram a toxicidade destes  
95 pesticidas em animais aquáticos (Park *et al.*, 2020; Gomes *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2022; Zhang  
96 *et al.*, 2022).

97 Mediante a isto, o presente estudo vem testar os pesticidas carbendazim, fipronil e  
98 sulfentazona em larvas de *zebrafish*, analisando seus efeitos através de uma análise multi  
99 comportamental, uma vez que esta pode revelar defeitos não apenas em células neuronais, mas  
100 também em funções neurais (Pelowski *et al.*, 2011) Visto que, estudos anteriores sugerem que

101 estes pesticidas isolados e misturados causam efeitos neurotóxicos no *zebrafish* (Gomes *et al.*,  
102 2022; Zhang *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2022; Fan *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2021).

103

## 104 **2. Material e Métodos**

### 105 *2.1. Reagentes e soluções*

106 Os pesticidas usados para preparar as soluções de teste foram Carbendazim (C) (lote nº  
107 002-18-54392, CAS: 10605-21-7, 50% (p/v)), Fipronil (F) (lote nº 001/19, CAS: 120068-37-  
108 3, 2,5 (p/p)) e Sulfentrazona (S) (lote nº 1041-19-13767, CAS: 122836-35-5, 50% (p/v)) foram  
109 adquiridos de fornecedores comerciais. Os três pesticidas testados foram inicialmente diluídos  
110 em dimetil sulfóxido (DMSO) (lote # 85713, CAS: 67-68-5,  $\geq 99,9\%$  de pureza, Dinâmica,  
111 Brasil), e estas soluções foram posteriormente diluídas em meio embrionário (Westerfield,  
112 2000) para obter as concentrações finais (Tabela 1). A concentração nominal final de DMSO  
113 era inferior a 1% (v/v). As concentrações de pesticidas foram baseadas em valores iguais ou  
114 inferiores aos limites máximos de resíduos (LMR) destes pesticidas em alimentos permitidos  
115 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (ANVISA, 2018; ANVISA, 2019a;  
116 ANVISA, 2019b). Os resíduos de pesticidas foram tratados por processo de oxidação avançado  
117 (AOP) em um reator usando peróxido de hidrogênio/radiação ultravioleta (16w) antes do  
118 descarte final.

### 119 *2.2. Cultivo de zebrafish e produção de ovos*

120 Todos os protocolos envolvendo os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para  
121 o Uso de Animais (Licença nº 7373131021). Peixes adultos do tipo selvagem foram alojados  
122 no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal - LECA, Universidade Federal  
123 Rural de Pernambuco - UFRPE. Estes animais foram obtidos de um fornecedor comercial e  
124 colocados em quarentena em 80 L aquários para detectar e confirmar a ausência de patógenos  
125 ou doenças. Foram alojados sob as seguintes condições laboratoriais, aeração artificial de 11

126 mg/L OD, temperatura de  $25 \pm 1$  °C, pH  $7,5 \pm 0,5$ , e ciclo de 14/10 h (claro/escuro). A água  
127 era parcialmente renovada uma vez por semana. Parâmetros abióticos tais como amônia, nitrito  
128 e nitrato também foram observados e mantidos dentro de faixas ideais. Os animais eram  
129 alimentados três vezes ao dia com 2x ração para peixes Fort Color® (30% de proteína bruta),  
130 e 1x com náuplios de artêmia (*Artemia spp*).

131 Para obtenção dos ovos, machos e fêmeas de *zebrafish*, na proporção de 2:1  
132 (Westerfield, 2000) foram colocados nos tanques de desova (Alesco® Zebclean). Após 30  
133 minutos do início da desova, os ovos foram coletados, ovos não fertilizados foram retirados e  
134 os ovos fertilizados (desenvolvimento normal da blástula) (OECD 236, 2013) foram lavados e  
135 encaminhados para as câmaras de exposição.

### 136 2.3. *Exposição química*

137 Os testes de toxicidade foram realizados seguindo as diretrizes da OCDE 236 (2013)  
138 com modificações. Em resumo, embriões a 2 hpf (horas pós fertilização) foram adicionados  
139 aleatoriamente às câmaras de poliestireno estéril e expostos a 50 mL das soluções de teste  
140 (Tabela 1). Os animais foram expostos até 144 hpf (ou 6 dpf (dias após a fertilização)). As  
141 soluções foram renovadas diariamente e meio embrionário sem pesticidas foi usado como  
142 controle.

### 143 2.4. *Testes Comportamentais*

144 Para os testes comportamentais realizados entre 11 e 12 da manhã, foi utilizado um sistema  
145 de filmagem equipado com uma câmera (Canon 6D Mark e lente EF 75-300 mm f/4 - 5.6 III),  
146 placa LED, e/ou tela LCD para reproduzir e gravar os vídeos. Um total de 7 réplicas de cada  
147 grupo experimental, com 15 larvas cada uma foram usadas para os testes (n = 105 por grupo  
148 com 8 grupos experimentais  $\approx$  de 840 larvas). Inicialmente, as larvas foram distribuídas em  
149 placas de 48 poços, cada placa continha 5 larvas de cada grupo experimental, e nenhuma larva

150 morta ou com defeitos morfológicos induzidos por pesticidas foi utilizada (Cadena *et al.*,  
151 2020a; Cadena *et al.*, 2020b).

152 Posteriormente, as larvas foram transferidas para placas de 6 poços, onde foram  
153 organizadas em grupos de 5 larvas por poço. A avaliação comportamental das larvas foi  
154 realizada através da análise posterior dos vídeos gravados durante os testes descritos e  
155 realizados na sequência abaixo, todos no mesmo dia, respectivamente.

#### 156 2.4.1. *Tigmotáxia*

157 O teste de tigmotáxia foi utilizado para avaliar a tendência das larvas se aproximarem  
158 da parede dos poços, como forma de medir a ansiedade em *zebrafish* (Cadena et al. 2020), pois  
159 quando a larva entra em um novo ambiente, tende a nadar contra as paredes do poço (Colwill  
160 e Creton, 2011). Antes de realizar a sequência de testes comportamentais, as larvas ficaram nas  
161 placas de 48 poços por 15 minutos de aclimação em ambiente com iluminação natural, como  
162 1 mL da solução teste em cada poço, a resposta ao teste de tigmotáxia registrada por fotografia,  
163 de forma que todas as larvas pudessem ser avaliadas no mesmo intervalo de tempo e essa  
164 resposta foi medida de acordo com as larvas que se localizavam na borda ou no centro do poço.

#### 165 2.4.2. *Sensibilidade ao toque*

166 O teste de sensibilidade ao toque foi usado para avaliar a resposta larval a estímulos  
167 mecânicos. As larvas foram suavemente tocadas na porção posterior da cauda, e a resposta foi  
168 registrada se as larvas exibissem comportamento de fuga. A resposta de comportamento de  
169 fuga foi considerada quando as larvas apresentavam comportamentos de natação (Cadena *et*  
170 *al.*, 2020a) e nenhuma resposta quando as larvas permaneciam sem movimento após o toque.

#### 171 2.4.3. *Resposta Optomotora*

172 A resposta optomotora é utilizada para medir as respostas visuais inatas das larvas nas  
173 quais o indivíduo nada em direção ao fluxo óptico e imita o comportamento naturalista, visando  
174 estabilizar-se de acordo com o fluxo das linhas de vídeo. A metodologia foi baseada em Cadena

175 *et al.*, (2020a) e Brastrom *et al.*, (2019) com modificações. Em resumo, as placas com animais  
176 foram colocadas em uma tela LCD, onde foram aclimatadas por 15 minutos em uma tela escura,  
177 e então a animação foi iniciada (vídeo como linhas pretas e brancas movendo-se da direita para  
178 a esquerda por 30 s e depois da esquerda para a direita por mais 30 s). Em seguida, a gravação  
179 do vídeo foi analisada, e o posicionamento larval foi classificado em dois tipos com relação ao  
180 fluxo das linhas: baixo alinhamento (70% do poço) e alto alinhamento (30% do poço), segundo  
181 Cadena *et al.*, (2020a).

#### 182 2.4.4. *Teste das bolas saltitantes*

183 O teste das bolas saltitantes é usado para observar a interação espacial, as respostas  
184 sociais e de fuga das larvas aos estímulos visuais (Pelkowski *et al.*, 2011; Nery *et al.*, 2014;  
185 Bridi *et al.*, 2017). As larvas foram transferidas para placas de 6 poços (5 larvas por poço) e  
186 colocadas em sob o monitor LCD. Uma animação com estímulos visuais criada no Microsoft  
187 PowerPoint (Office 365) foi reproduzida. A animação possuía bolas vermelhas (diâmetro 1,35  
188 cm) que se moviam da esquerda para a direita em uma reta com trajetória de 2 cm na metade  
189 inferior da área do poço (área de estímulo), durante 5 minutos, após uma aclimatação de 15  
190 minutos em uma tela escura. A porcentagem de larvas na área sem estímulos (parte superior do  
191 poço) durante a sessão de 5 minutos foi tomada como indicativo da capacidade cognitiva do  
192 grupo de exibir comportamento de fuga em relação à bola vermelha. O número de larvas no  
193 mesmo quadrante do poço foi usado para medir a porcentagem de agrupamento e interação  
194 social entre as larvas no poço. Foi usado um método de amostragem por pontos de tempo para  
195 coletar os dados (uma análise a cada 30 s) (Nery *et al.*, 2014; Bridi *et al.*, 2017).

#### 196 2.4.5. *Comportamento exploratório das larvas*

197 O comportamento exploratório das larvas foi avaliado durante natação espontânea (sem  
198 estímulos), onde as larvas tendem a nadar nos limites dos poços (perto da parede), uma  
199 tendência que se explica pelo comportamento exploratório inicial e pela evitação da zona

200 central do poço, onde há menos proteção (tigmotáxia). Foi baseado no protocolo de Altenhofen  
201 *et al.*, (2017) com modificações. A atividade exploratória das larvas também foi registrada nas  
202 placas de 48 poços durante 3 minutos com iluminação artificial (placa LED) sem estímulos,  
203 após 15 minutos de aclimatação. Os vídeos foram analisados, os animais que permaneceram  
204 parados durante a gravação foram contabilizados e aqueles que apresentaram algum  
205 movimento de natação tiveram sua velocidade média (cm/s) e trajetória total percorrida (cm)  
206 medida pelo software IdTracker (Romero-Ferrero *et al.*, 2019). Estes parâmetros foram  
207 considerados os principais parâmetros de exploração do novo ambiente.

#### 208 *2.4.6. Análise estatística*

209 As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Origin Pro Academic 2015  
210 (Laboratório de Origem de Northampton, MA, EUA). Todos os dados foram apresentados por  
211 média  $\pm$  DP. Para os testes comportamentais de Tigmotáxia, Sensibilidade ao toque, Bolas  
212 saltitantes e Comportamento exploratório, utilizamos amostras combinadas de vários animais.  
213 Os resultados destes testes paramétricos foram analisados pela ANOVA unidirecional, seguida  
214 pelo teste de Tukey com  $p < 0,05$ , para determinar a diferença significativa entre o grupo de  
215 controle e os grupos expostos aos pesticidas. Para avaliar as interações dos pesticidas na  
216 trajetória percorrida durante o teste de atividade exploratória, foi utilizado o método de projeto  
217 do *Simplex Centroid Design*, no *software Statistica 13.5* (TIBCO, EUA) de acordo com Cadena  
218 *et al.* (2020b). Os resultados do teste de resposta optomotora foram analisados pelo teste não  
219 paramétrico Bowker com  $p < 0,05$  (Brastrom *et al.*, 2019).

#### 220 *2.4.7. Análise de Agrupamento*

221 Os testes foram avaliados pela ANOVA unidirecional, e para os sete comportamentos  
222 observados. Para os resultados obtidos foi atribuído um número entre 1 e 3 com base em seus  
223 valores de  $p$  estatísticos, de acordo com Richendrfer e Creton (2018), com algumas  
224 modificações. Para qualquer comportamento estatisticamente diferente do controle foram

225 atribuídos os números 1 ou 2 (1 para  $p < 0,01$  ou 2 para  $p < 0,05$ ). Comportamentos que não  
226 eram estatisticamente diferentes do controle receberam o número 3 ( $p > 0,05$ ). Os números  
227 atribuídos às pontuações de comportamento foram importados para o *software Origin Pro*  
228 *Academic 2015* (Origin Lab. Northampton, MA, EUA). As cores foram atribuídas aos números  
229 para ilustrar, a cor verde corresponde aos números 1 e 2 ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ) e o preto  
230 corresponde ao 3 ( $p > 0,05$ ). Os resultados do Teste de Atividade Optomotora não foram  
231 incluídos nesta análise porque os dados foram analisados utilizando um teste não paramétrico  
232 (teste Bowker), portanto não houve valor de  $p$  contra o controle a ser comparado.

233

### 234 **3. Resultados**

#### 235 *3.1. Testes de Tigmotáxia e Sensibilidade ao toque*

236 As larvas que foram expostas aos pesticidas individualmente e suas misturas nos testes  
237 de tigmotáxia (Fig. 1A) e sensibilidade ao toque (Fig. 1B) não apresentaram diferença  
238 significativa em relação ao controle.

#### 239 *3.2. Teste de Resposta Optomotora*

240 Foi observado no teste de Resposta optomotora (Fig 2) que as larvas expostas aos  
241 compostos F e S individualmente e as misturas C+F e C+S, não apresentaram diferença  
242 significativa, quando comparado os períodos de análise. Demonstrando que essas larvas  
243 apresentaram baixo alinhamento em relação a direção do movimento das listras, não  
244 respondendo normalmente à animação, mostrando que estes pesticidas produziram uma  
245 deficiência no sistema visual das larvas de *zebrafish*. Observamos que grupos expostos as  
246 misturas C+F e C+S não apresentaram diferença significativa, indicando que os compostos F  
247 e S quando misturados com o C, causam efeito sinérgico, apresentando maior percentual de  
248 larvas em baixo alinhamento, do que quando as larvas expostas individualmente aos três  
249 compostos, porém quando misturados (F+S) apresentam efeito antagônico, reduzindo a

250 percentual de larvas em baixo alinhamento, em comparação ao apresentado pelos dois  
251 compostos individualmente.

### 252 *3.3. Teste das Bolas saltitantes*

253 No teste das bolas vermelhas observamos dois comportamentos, fuga do estímulo visual  
254 (Fig. 2A) e o agrupamento (Fig. 2B) das larvas. Todos os grupos expostos apresentaram  
255 diferença significativa em relação ao controle nos dois comportamentos analisados. Em relação  
256 a fuga do estímulo visual, as larvas expostas as pesticidas individuais e suas misturas passaram  
257 significativamente mais tempo na parte inferior do poço (área com estímulo), não apresentaram  
258 comportamento evasivo relativo à bola vermelha, como o controle. Os grupos expostos aos  
259 pesticidas C e S individualmente foram os que permaneceram mais tempo na área com estímulo  
260 seguidos respectivamente pelos grupos expostos a C+S, F, C+F+S, C+F e F+S. Em relação ao  
261 agrupamento, as larvas expostas ao grupos dos compostos individuais S, C e F apresentaram  
262 com maior frequência um distribuição aleatória nos poços, respectivamente e seguidas pelos  
263 grupos C+S, C+F+S, C+F e F+S, onde era esperado que como resposta ao estímulo visual,  
264 ficassem agrupadas em um mesmo quadrante com mais frequência, como o grupo controle.  
265 Observamos que as respostas ao estímulo visual e o agrupamento estão interligadas, quando  
266 um grupo apresentou um percentual menor de resposta ao estímulo visual também apresentou  
267 um menor percentual de agrupamento durante o teste.

### 268 *3.4. Comportamento exploratório das larvas*

269 Neste teste nos primeiramente separamos e contabilizamos os animais que  
270 permaneceram parados (Fig. 4A) durante todo o tempo de realização do teste. O grupo F foi o  
271 que apresentou diferença significativa em relação ao controle apresentando um maior  
272 percentual de animais parados. Posteriormente, com os animais que apresentaram algum  
273 movimento natatório, nós avaliamos a velocidade média (Fig. 4B) e a trajetória total percorrida  
274 (Fig. 4C). Vimos que os grupos C+F, S e F+S apresentaram diferença significativa em relação

275 a velocidade média comparados ao controle, assim como, estes mesmos grupos apresentaram  
276 diferença significativa em relação à trajetória percorrida. Constatamos desta forma que os  
277 grupos que apresentaram menor velocidade também foram os grupos de larvas que  
278 apresentaram menor trajetória percorrida. Observamos também que os grupos C+F e F+S  
279 apresentaram efeito sinérgico (Fig. 4D), pois apresentaram uma redução maior do que os  
280 grupos expostos a C e F individualmente. Assim como, também foi possível avaliar  
281 qualitativamente a trajetória percorrida (Fig. 5) das larvas em cada grupo e vimos que mesmo  
282 os grupos que não apresentaram uma redução significativa em relação ao controle na sua  
283 trajetória percorrida eles também apresentaram uma trajetória anormal durante os testes.

284 O análise dos resultados comportamentais agrupados por grupo de exposição foi  
285 descrito no Figura 6, onde é identificar os grupos que apresentaram maior quantidade de  
286 comportamentos diferentes do controle. Mediante a isto, observamos que entre os compostos  
287 isolados o sulfentrazone foi o grupo que apresentou mais diferenças em relação ao controle,  
288 seguido pelo fipronil, e posteriormente carbendazim. Vimos também que a mistura binária C+F  
289 apresentou mais diferenças do que os compostos isolados, mesmo sendo 50% da concentração  
290 isolada. Sugerindo que estes compostos misturados potencializaram os efeitos tóxicos em  
291 larvas de *zebrafish*. Da mesma forma que o grupo exposto a mistura binária de F+S.

292

#### 293 **4. Discussão**

294 O presente estudo fornece uma abordagem multi comportamental para avaliar como a  
295 exposição as pesticidas interferem na dinâmica dos peixes e que estão intimamente conectadas  
296 formando uma paisagem heterogênea de alterações comportamentais. Os resultados mostram  
297 que que a exposição aos pesticidas e suas misturas afetam comportamentos variados dos  
298 organismos, como detectar e escapar de um estímulo.

299 O Carbendazim dentre os compostos isolados foi o que apresentou menos diferenças  
300 significativas nos testes comportamentais em relação ao controle (Fig. 6). Andrade et al. (2016)  
301 observaram que larvas de *zebrafish* expostas ao carbendazim (entre 0.0001 – 0.5 mg/L por  
302 96hpf), passaram mais tempo nadando, porém o aumento do tempo gasto nadando não se  
303 traduziu em um aumento da distância percorrida, significando que os organismos nadaram mais  
304 lentamente. No seu estudo Nwani et al. (2015), com juvenis da *Claria gariepinus* (Bagre  
305 Africano) expostos a concentrações subletais de carbendazim (2.0 - 7.0 mg/L por 96h) os  
306 peixes apresentaram comportamentos anormais, tais como natação em espiral, hiperatividade,  
307 movimentos erráticos e perda de equilíbrio.

308 O que corrobora com nossos resultados, mesmo que nosso tempo de exposição tenha  
309 sido maior a concentração que utilizamos (0.2 mg/L), observamos que este grupo não  
310 apresentou reduções na velocidade média e distância percorrida, porém foi observada uma  
311 trajetória anormal em relação ao controle (Fig. 5), este grupo não apresentou diferença no teste  
312 de tigmotáxia, entretanto durante a atividade exploratória, era esperado que estes animais  
313 nadassem próximos a borda como o controle, porém isto não foi observado. Zhang et al. (2022)  
314 em sua pesquisa observaram que o carbendazim tem efeitos excitatórios no sistema de motor  
315 *zebrafish*. O que pode explicar nossos resultados onde o grupo exposto ao carbendazim, não  
316 teve a velocidade e nem a distância percorrida reduzida em relação ao controle.

317 Desta forma, vemos que o sistema locomotor não foi afetado pelo carbendazim, pois as  
318 larvas deste grupo também apresentaram resposta ao teste de sensibilidade ao toque. Mas este  
319 grupo foi o que apresentou menor resposta de fuga ao estímulo visual e menor percentual de  
320 agrupamento, mostrando que o carbendazim afetou neurologicamente este grupo, alterando  
321 suas habilidades sociais e espaciais.

322 O *zebrafish* é um animal social que forma cardumes para melhorar o forrageamento,  
323 evitando a predação (Miller and Gerlai, 2011), indicando ser uma espécie ideal para estudar as

324 bases neurobiológicas do comportamento social. Estudos mostraram que o *zebrafish* prefere  
325 áreas co-específicas; preferem ficar com indivíduos da mesma espécie ao realizar o teste de  
326 interação social (Gerlai *et al.*, 2000; Miller and Gerlai, 2011). É importante considerar que a  
327 cognição social é um indicador primário do funcionamento e desenvolvimento normal do  
328 cérebro humano. No entanto, vários transtornos, como autismo (Leekam, 2016), transtornos  
329 afetivos (Bo *et al.*, 2017), transtornos alimentares (Bora and Köse, 2016) e esquizofrenia  
330 (Green *et al.*, 2015) são associados ao comprometimento da cognição social.

331 Zhang *et al.* (2022) em sua pesquisa sugere que a expressão alterada da DEG ctsl  
332 causada pelo carbendazim contribuiu para as mudanças comportamentais no *zebrafish*. DEG  
333 ctsl é uma cisteína responsável pela degradação de numerosas proteínas, e é uma das principais  
334 proteases lisossômicas responsáveis pelo processamento de antígenos e degradação de  
335 proteínas lisossômicas (Shen *et al.*, 2019). Estudos também mostraram que a desregulação do  
336 DEG ctsl aumentou a apoptose neuronal (Fei *et al.*, 2009) e a falta de DEG ctsl exibiu acúmulo  
337 de lisossomos autofágicos em neurônios corticais, resultando em morte celular (Tholen *et al.*,  
338 2014).

339 Alterações prejudiciais durante o desenvolvimento inicial do sistema nervoso, pode  
340 levar a efeitos duradouros e permanentes, como déficits em capacidade mental e distúrbios  
341 comportamentais (Andrade *et al.*, 2016; Altenhofen *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2022). Nos  
342 aspectos sociais, as consequências da neurotoxicidade durante o desenvolvimento incluem o  
343 aumento da probabilidade de fracasso escolar, diminuição da produtividade econômica e  
344 aumento do risco de comportamento antissocial ou sociopatas (Grandjean e Landrigan, 2006).

345 As larvas do grupo exposto ao fipronil apresentaram diferença significativa em relação  
346 ao controle, sendo observado o maior percentual de larvas paradas durante o teste de atividade  
347 exploratória (Fig. 4A), este grupo também foi o que teve o menor percentual de larvas com  
348 resposta ao teste de sensibilidade ao toque (Fig. 1B). Park *et al.* (2020) observaram que o

349 fipronil em concentração de 15.000 µg/L induziu a degeneração dos neurônios motores da  
350 medula espinhal, suprimindo o crescimento dos neurônios motorizados do *zebrafish*, estes  
351 efeitos no desenvolvimento podem em parte explicar quaisquer déficits comportamentais ou  
352 locomotores nos animais expostos ao fipronil.

353 Porem nossos resultados mostram que este grupo não teve a velocidade e a distância  
354 percorrida alterada. Estudos anteriores apontam que o fipronil não modificou a atividade  
355 locomotora em roedores (Godinho et al. 2016), abelhas (El Hassani et al. 2005). Moreira et al.  
356 (2021) em seu estudo, onde expos o *zebrafish* ao fipronil (50, 75 e 100 mg/L) não mostrou  
357 mudanças na atividade natatória sobre a velocidade média; entretanto, a distância percorrida  
358 foi menor em todas as concentrações de exposição. A diferença dos resultados encontrados em  
359 nosso estudo em relação a distância percorrida pode estar relacionada ao fato de termos  
360 utilizado uma menor concentração de fipronil (0.05 mg/L).

361 Este grupo também apresentou respostas significativamente diferentes do controle nos  
362 comportamentos espacial (Fig. 3A) e social (Fig. 3B) durante o teste das bolas saltitantes, a  
363 redução do comportamento de fuga em relação ao estímulo visual, também pode estar  
364 relacionada também a defeitos oculares produzidos pelo fipronil, pois estas larvas também não  
365 responderam normalmente ao teste da resposta optomotora e de acordo com Brastrom et al.  
366 (2019), este teste pode ser usado para detectar deficiência no sistema visual nas larvas.

367 Este Pesticida age diretamente sobre o ácido  $\gamma$ -aminobutírico impedindo o fechamento  
368 dos canais de cloro (GABA), levando à superestimulação neuronal (Huang *et al.*, 2019). A  
369 diminuição de genes associados ao  $\gamma$ -aminobutírico, sistemas glutamáticos e orientação  
370 axonal, sugerem que estas alterações podem ser devidas à redução da sinalização do receptor  
371 GABA, e a neuro inflamação gerada precede a perda de células ganglionares da retina  
372 (Gramlich *et al.*, 2021).

373           Supomos que mesmo em baixas concentrações o fipronil, além de causar déficits  
374 locomotores e oculares, também gera alterações comportamentais que comprometeriam a  
375 manutenção destes indivíduos no meio ambiente. Outros estudos também mostram que  
376 substancias com esse modo de ação, antagonistas do GABA, como o fipronil, causam vários  
377 efeitos, por exemplo, convulsões, hiperatividade e morte em peixes (Beggel *et al.*, 2012). Além  
378 disso, estudos usando modelos de roedores apoiam a hipótese de que a disfunção de GABA  
379 contribui para déficits cognitivos e sociais observados em condições psiquiátricas, como  
380 esquizofrenia, autismo e depressão (Paine *et al.*, 2017; Piantadosi *et al.*, 2016 ).

381           Dentre os grupos expostos aos pesticidas individualmente, o grupo exposto ao  
382 sulfentrazona apresentou uma grande variedade de diferenças comportamentais em  
383 comparação com o grupo de controle (Fig. 6). A velocidade média (Fig. 4B) foi  
384 significativamente reduzida, assim como, a distância percorrida (Fig. 4C). Do ponto de vista  
385 ecológico, as alterações no comportamento de natatório podem ter consequências importantes  
386 para a manutenção dos organismos, pois podem originar ainda mais perturbações na  
387 alimentação (capacidade de capturar presas) e aumentar a vulnerabilidade à predação (através  
388 da incapacidade de permanecer discreto) entre outros processos (Little e Finger, 1990).

389           O grupo exposto ao sulfentrazona foi o que apresentou maior percentual de larvas  
390 agrupadas, o que poderia indicar uma preferência social ou pode estar relacionado ao fato de  
391 que as larvas deste grupo tiveram as velocidades médias mais baixas e conseqüentemente não  
392 se movimentavam tanto quanto os outros grupos. Este grupo também não respondeu ao  
393 estímulo visual, indicando que as larvas tiveram o comportamento evasivo reduzido pelo  
394 composto. Entretanto, este resultado também pode ser um comportamento residual devido ao  
395 fato de que as larvas tinham as velocidades mais baixas e assim se movimentavam menos.

396           Sabe-se que o modo de ação do sulfentrazona sobre os organismos alvo é através da  
397 destruição das membranas celulares, através da inibição da enzima PROTOX, que causa o

398 acúmulo da protoporfirina IX que causa a peroxidação do oxigênio, destruindo as membranas  
399 celulares (Grichar *et al.*, 2006). De acordo com Jiang *et al.* (2022), exposição ao sulfentrazone  
400 (0.01 - 3.60 mg/L por 30 dias) teve efeito adverso efeitos sobre as bombas ATPase na regulação  
401 dos canais de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) em larvas de *zebrafish*.

402 A mecânica muscular determina o desempenho da atividade locomotora em *zebrafish*  
403 (Seebacher *et al.*, 2015) em um processo complexo no qual a interação da actina e da miosina  
404 depende da promoção de  $\text{Ca}^{2+}$ . Consequentemente, a manutenção da homeostase  $\text{Ca}^{2+}$  é vital  
405 nos vertebrados, para a manutenção da homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$ , a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  deve ser  
406 modulada através do canal epitelial  $\text{Ca}^{2+}$  em células ricas em  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase em *zebrafish*  
407 (Lin & Hwang, 2016). O  $\text{Ca}^{2+}$  é exportado com alta especificidade por  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases da  
408 membrana plasmática. Alguns contaminantes podem inibir a atividade do  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase  
409 resultando em defeitos sistema locomotor de *zebrafish* (Yan *et al.*, 2020). Isto sugere que as  
410 alterações em  $\text{Ca}^{2+}$  e -ATPase causadas pelo sulfentrazone pode ter sido o fator para déficit  
411 locomotor observado neste estudo. Em estudos anteriores com peixes expostos ao cobre,  
412 relacionaram a divisão da utilização da energia, entre a manutenção do equilíbrio homeostática  
413 e locomoção, levaram a alteração do comportamento dos peixes (Handy *et al.*, 1999),  
414 corroborando esta hipótese.

415 As larvas expostas ao sulfentrazone também apresentaram reposta diferente do controle  
416 no teste de atividade optomotora, o que demonstra que o sulfentrazone além de afetar o sistema  
417 locomotor das larvas também afetou o visual. Segundo Fox *et al.* (1991) alterações em  $\text{Na}^+$ -  
418  $\text{K}^+$ -ATPase inibem o desenvolvimento da retina em ratos adultos, mediante aos nossos  
419 resultados desregulação causa pelo sulfentrazone também pode ter sido responsável pela  
420 resposta comportamental observada neste teste. A falta de resposta ao estímulo visual  
421 observada neste grupo no teste das bolas-saltitantes também pode estar relacionada as  
422 alterações do sistema visual causada pelo sulfentrazone.

423 Jiang *et al.* (2022) observou que o sulfentrazone (0,4 mg/L) pode alterar a frequência  
424 cardíaca, e entre 1,20 mg/L e 3,60 mg/L causou efeitos significativos sobre taxa de eclosão,  
425 taxa de mortalidade e reabsorção do saco vitelino, e entre 0,01 - 0,10 mg/L não causou  
426 alterações fenotípicas no desenvolvimento embrionário do *zebrafish* após 30 dias de exposição.  
427 Observamos nos nossos testes que os animais exibiram diferenças comportamentais do  
428 controle em concentrações mais baixas (0.2 mg/L), demonstrando que sulfentrazone em  
429 concentrações abaixo do LMR é tóxico para larvas de *zebrafish*.

430 Nossos resultados demonstraram que a mistura binária de C em combinação com F  
431 exibiram respostas sinérgicas sobre o *zebrafish* (Fig. 4D), mesmo a concentração da mistura  
432 binária ser 50% inferior à dos grupos individuais, observamos uma maior redução na  
433 velocidade e distância percorrida pelos animais expostos a esta mistura em relação ao controle  
434 do que os grupos individuais. Frequentemente toxicidade sinérgica é encontrada em  
435 organismos expostos a misturas de pesticidas (Wang *et al.*, 2021). Além de também  
436 apresentaram resposta diferente do controle no teste de resposta optomotora.

437 Mesmo que estes pesticidas não apresentem os mesmos modos de ação, supomos que  
438 as larvas expostas a eles, entram em stress oxidativo, levando à produção de espécies reativas  
439 de oxigênio (ROS) (Shukla *et al.*, 2017). Pois diversos estudos com misturas pesticidas com  
440 diferentes modos de ação apontaram como efeitos da sinergia entre esses compostos o aumento  
441 da produção de ROS em *zebrafish* (Shukla *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021).

442 No estágio inicial de desenvolvimento, a produção excessiva de ROS tem sido  
443 associada à morte celular apoptótica em embriões a larvas de peixe-zebra (Shi e Zhou, 2010;  
444 Wu *et al.*, 2019b; Ren *et al.*, 2020). Wu *et al.* (2022) observamos que a geração de ROS  
445 aumentou significativamente em larvas de peixe-zebra expostas a perfluorooctanossulfonatos  
446 e foi significativamente na cabeça de larvas de *zebrafish*, indicando que o aumento de ROS  
447 pode causar danos ao sistema nervoso central. Qiu *et al.* (2022) apontam com seus resultados

448 que o estresse oxidativo induzido por poluentes pode desencadear deficiências  
449 comportamentais e pode finalmente resultar na diminuição da aptidão e sobrevivência dos  
450 teleósteos (Border *et al.*, 2019).

451 As misturas binárias e terciária, C+S, F+S e C+F+S, também causaram alterações  
452 comportamentais significativas em comparação ao controle. Apresentando menores  
453 percentuais de reposta ao estímulo visual (Fig. 3A) e agrupamento (Fig. 3B), além das misturas  
454 binária também terem apresentado redução na velocidade (Fig. 4B) e na distância percorrida  
455 (Fig. 4C). Em nossa pesquisa anterior (dados não mostrados) como estas mesmas misturas, não  
456 observaram diferenças significativas em embriões de *zebrafish* expostos até 24 hpf na redução  
457 da epibolia e efeitos teratogenicos.

458 Esta diferença de resultados, pode estar relacionada ao tempo de exposição que neste  
459 teste foi maior (144 hpf), o que possibilitou a eclosão dos animais, pois sabemos que o córion  
460 funciona como uma barreira durante o desenvolvimento embrionário *zebrafish* sob exposição  
461 a alguns químicos (Braunbeck *et al.*, 2005). Podendo ser esta uma das razões pelas quais as  
462 larvas do *zebrafish* são mais sensíveis em comparação com os embriões (Yang *et al.*, 2019). É  
463 interessante salientar também que neste teste nos utilizamos concentrações de inferiores  
464 fipronil (0.05, 0.02 e 0.10 mg/L) do teste anterior que realizamos (dados não mostrados) (0.20,  
465 0.10 e 0.06 mg/L), o que demonstrou que o fipronil é proporcionalmente mais tóxico ao tempo  
466 de exposição.

467 Nossos estudos ressaltam a dificuldade de interpretação da toxicidade de misturas de  
468 pesticidas, pois a partir dos nossos resultados observamos diferentes padrões de toxicidade para  
469 misturas dependendo dos *endpoints* analisados, onde efeitos aditivos, como sinergismo foi  
470 observado. Mostrando que, existem mecanismos potenciais de interação destas misturas com  
471 os organismos, e que são potencializados quando em contato com outros químicos (Loureiro  
472 *et al.*, 2010), mesmo quando individualmente possuem modos de ação diferente. Silva *et al.*

473 (2015) também observou este tipo de variação, em sua pesquisa com *Daphnia magna* expostas  
474 a uma mistura binária (triclosan e carbendazim), onde constatou que diferentes *endpoints*  
475 avaliados proporcionaram diferentes resultados em relação à toxicidade da mistura. Este tipo  
476 de resposta também foi observado em outras pesquisas, onde os efeitos sobre o mesmo  
477 organismo variaram dependendo do *endpoint* escolhido (Santos *et al.*, 2011; Loureiro *et*  
478 *al.*, 2010).

479         Desta forma também podemos constatar que os testes comportamentais são realmente  
480 mais sensíveis do que os parâmetros de desenvolvimento e, portanto, têm o potencial de ser um  
481 sinal de alerta precoce para o estresse ambiental. Os estudos devem se concentrar em entender  
482 como as perturbações comportamentais medidas se traduzem em uma deficiência física na fase  
483 adulta. Embora muitas pesquisas venham sendo realizados para avaliar a toxicidade combinada  
484 dos pesticidas nos últimos anos, concluímos que informações adicionais ainda são necessárias  
485 para entender a toxicidade das misturas de pesticidas.

486

## 487 **5. Conclusão**

488         A partir dos resultados encontrados, pode-se concluir que a exposição a misturas de  
489 pesticidas também leva a mudanças no comportamento larval do *zebrafish*, como a exposição  
490 ao pesticida individual, mesmo que a mistura tenha 50% da concentração usada na exposição  
491 com o pesticida individual. Onde misturas binárias mostraram ser mais tóxicas em alguns  
492 comportamentos, indicando sinergia entre os compostos, o que dificulta os estudos tradicionais  
493 de toxicidade. Entretanto, os testes comportamentais provaram ser sensíveis e grandes  
494 ferramentas para analisar o fenótipo dos efeitos causados por estas interações e podem indicar  
495 o caminho da toxicidade da mistura. Apesar do potencial toxicológico das misturas, seus efeitos  
496 sobre os parâmetros comportamentais e bioquímicos ainda não são bem compreendidos.

497 Portanto, estudos que analisam os efeitos destas interações são importantes para entender e  
498 expor a realidade que se encontra no ambiente, pois seus riscos podem ser subestimados.

499

## 500 **6. Referências**

501

502 Altenhofen, S., Nabinger, D. D., Wiprich, M. T. *et al.*, 2017. Tebuconazole alters  
503 morphological, behavioral, and neurochemical parameters in larvae and adult *zebrafish*  
504 (*Danio rerio*). Chemosphere, 180, 483 - 490.

505 Andrade, T. S., Henriques, J. F., Almeida, A. R., *et al.*, 2016. Carbendazim exposure induces  
506 developmental, biochemical, and behavioral disturbance in *zebrafish* embryos. Aqua.  
507 Toxic. 170, 390 - 399.

508 Basnet, R. M., Zizioli, D., Taweedet, S., *et al.*, 2019. *Zebrafish* larvae as a behavioral model in  
509 neuropharmacology. Biomedicines. 7, 1, 23.

510 Beggel, S., Werner, I., Connon, R. E. *et al.*, 2012. Impacts of the phenylpyrazole insecticide  
511 fipronil on larval fish: time-series gene transcription responses in fathead minnow  
512 (*Pimephales promelas*) following short-term exposure. Sci. of the Tot.l Environ. 426,  
513 160-165.

514 Bo, Q., Mao, Z., Li, X., *et al.*, 2017. Use of the MATRICS consensus cognitive battery (MCCB)  
515 to evaluate cognitive deficits in bipolar disorder: a systematic review and meta-  
516 analysis. PloS one. 12, 4, e0176212.

517 Bora, E., Köse, S. 2016. Meta-analysis of theory of mind in anorexia nervosa and bulimia  
518 nervosa: A specific impairment of cognitive perspective taking in anorexia  
519 nervosa?. Inter. Jour. of Eat. Disorders. 49, 8, 739 - 740.

- 520 Border, S. E., DeOliveira, G. M., Janeski, H. M. *et al.*, 2019. Social rank, color morph, and  
521 social network metrics predict oxidative stress in a cichlid fish. *Behav. Ecol.* 30, 2, 490  
522 - 499.
- 523 Brastrom, L. K., Scott, C. A., Dawson, D. V. *et al.*, 2019. A high-throughput assay for  
524 congenital and age-related eye diseases in *zebrafish*. *Biomedicines*, 7, 2, 28.
- 525 Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H. *et al.*, 2005. Towards an alternative for the acute fish  
526 LC50 test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes the multi-species-  
527 an update. *ALTEX -Altern. to anim.experim.* 22, 2, 87 - 102.
- 528 Bridi, D., Altenhofen, S., Gonzalez, J. B. *et al.*, 2017. Glyphosate and Roundup® alter  
529 morphology and behavior in *zebrafish*. *Toxicology*. 392, 32-39.
- 530 Cadena, P. G., Cadena, M. R. S., Sarmah, S., *et al.*, 2020a. Folic acid reduces the ethanol-  
531 induced morphological and behavioral defects in embryonic and larval *zebrafish* (*Danio*  
532 *rerio*) as a model for fetal alcohol spectrum disorder (FASD). *Reprod. Toxic.* 96, 249 -  
533 257.
- 534 Cadena, P. G., Cadena, M. R. S., Sarmah, S., *et al.*, 2020b. Protective effects of quercetin,  
535 polydatin, and folic acid and their mixtures in a *zebrafish* (*Danio rerio*) fetal alcohol  
536 spectrum disorder model. *Neurotox. and Terato.* 82, 106928.
- 537 Colwill, R. M., Creton, R. 2011. Locomotor behaviors in *zebrafish* (*Danio rerio*)  
538 larvae. *Behav.proces.* 86, 2, 222 - 229.
- 539 d'Amora, M., Giordani, S. 2018. The utility of *zebrafish* as a model for screening  
540 developmental neurotoxicity. *Front. in neuro.* 12, 976.
- 541 El Hassani, A. K., Dacher, M., Gauthier, M., *et al.*, 2005. Effects of sublethal doses of fipronil  
542 on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmac. Bioch. and Behav.* 82, 1, 30  
543 - 39.

- 544 Fan, R., Zhang, W., Li, L., *et al.*, 2021. Individual and synergistic toxic effects of carbendazim  
545 and chlorpyrifos on *zebrafish* embryonic development. *Chemosphere*, 280, 130769.
- 546 Fei, X. F., Qin, Z. H., Xiang, B., *et al.*, 2009. Olomoucine inhibits cathepsin L nuclear  
547 translocation, activates autophagy and attenuates toxicity of 6-hydroxydopamine. *Brain*  
548 *Resea.* 1264, 85-97.
- 549 Fitzgerald, J. A., Könemann, S., Krümpelmann, L., *et al.*, 2021. Approaches to test the  
550 neurotoxicity of environmental contaminants in the *zebrafish* model: From behavior to  
551 molecular mechanisms. *Environ. Toxic. and Chem.* 40, 4, 989 - 1006.
- 552 Fox, D. A., Rubinstein, S. D., Hsu, P. 1991. Developmental lead exposure inhibits adult rat  
553 retinal, but not kidney, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. *Toxic. and appl. Pharmac.* 109, 3, 482 - 493.
- 554 Gerlai, R. 2010. *Zebrafish* antipredatory responses: a future for translational research?. *Behavi.*  
555 *brain Res.* 207, 2, 223 - 231.
- 556 Godinho, C., Domingos, J., Cunha, G. *et al.*, 2016. A systematic review of the characteristics  
557 and validity of monitoring technologies to assess Parkinson's disease. *Jour. of*  
558 *neuroeng. and rehabil.* 13, 1, 1-10.
- 559 Gramlich, O. W., Godwin, C. R., Wadkins, D., *et al.*, 2021. Early Functional Impairment in  
560 Experimental Glaucoma Is Accompanied by Disruption of the GABAergic System and  
561 Inceptive Neuroinflammation. *Internat. Jour. of mole. Sci.* 22, 14, 7581.
- 562 Grandjean, P., Landrigan, P. J. 2006. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals.  
563 *Lancet.* 368, 2167 – 2178.
- 564 Green, M. F., Horan, W. P., Lee, J. 2015. Social cognition in schizophrenia. *Nat. Rev.*  
565 *Neurosci.* 16, 10, 620 - 631.
- 566 Grichar, W. J., Besler, B. A., Dotray, P. A. 2006. Weed control and peanut (*Arachis hypogaea*)  
567 response to sulfentrazone. *Crop Protec.* 25, 8, 753 - 757.

- 568 Handy, R. D., Sims, D. W., Giles, A. *et al.*, 1999. Metabolic trade-off between locomotion and  
569 detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow  
570 trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. *Aqua.*  
571 *Toxic.* 47, 1, 23 - 41.
- 572 Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., *et al.*, 2013. The *zebrafish* reference genome sequence  
573 and its relationship to the human genome. *Nature.* 496, 7446, 498 - 503.
- 574 Huang, Q. T., Sheng, C. W., Jiang, J. *et al.*, 2019. Interaction of insecticides with heteromeric  
575 GABA-gated chloride channels from *zebrafish* *Danio rerio* (Hamilton). *Jour. of hazar.*  
576 *Mat.* 366, 643 - 650.
- 577 Jiang, J., Wang, L., Zhang, C., *et al.*, 2022. Health risks of sulfentrazone exposure during  
578 *zebrafish* embryo-larvae development at environmental  
579 concentration. *Chemosphere*, 288, 132632.
- 580 Jordi, J., Guggiana-Nilo, D., Bolton, A. D., *et al.*, 2018. High-throughput screening for  
581 selective appetite modulators: A multibehavioral and translational drug discovery  
582 strategy. *Sci. Advan.* 4, 10, eaav1966.
- 583 Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., *et al.*, 1995. Stages of embryonic development  
584 of the *zebrafish*. *Develop. Dynam.* 203, 3, 253 - 310.
- 585 Klüver, N., König, M., Ortmann, J., *et al.*, 2015. Fish embryo toxicity test: Identification of  
586 compounds with weak toxicity and analysis of behavioral effects to improve prediction  
587 of acute toxicity for neurotoxic compounds. *Environ. Sci. & tech.* 49, 11, 7002 - 7011.
- 588 Kronbauer, E. A., Biondo, E., Zanetti, C., *et al.*, 2021. Agrotóxicos em água do rio e água  
589 tratada no Município de Encantado/RS. *Amb.: Gest. e Desen.* 14, 2.
- 590 Lau, B. Y., Mathur, P., Gould, G. G., *et al.*, 2011. Identification of a brain center whose activity  
591 discriminates a choice behavior in *zebrafish*. *Procee. of the Natio. Acad. of Sci.* 108, 6,  
592 2581 - 2586.

- 593 Legradi, J.B., Di Paolo, C., Kraak, M.H.S., *et al.*, 2018. An ecotoxicological view on  
594 neurotoxicity assessment. *Environ. Sci Eur.* 30 - 46.
- 595 Leekam, S. (2016). Social cognitive impairment and autism: what are we trying to  
596 explain?. *Philos. Transac. of the Royal Soc. B: Biolog. Sci.* 371, 1686, 20150082.
- 597 Leuthold, D., Klüver, N., Altenburger, R., *et al.*, 2018. Can environmentally relevant  
598 neuroactive chemicals specifically be detected with the locomotor response test in  
599 *zebrafish* embryos?. *Environ. Sci. & tech.* 53, 1, 482 - 493.
- 600 Li, X., Ma, W., Li, H., *et al.*, 2020. Determination of residual fipronil and its metabolites in  
601 food samples: A review. *Tren. in Food Sci. & Tech.* 97, 185 - 195.
- 602 Lin, C. H., Hwang, P. P. 2016. The control of calcium metabolism in *zebrafish* (*Danio*  
603 *rerio*). *Intern. Jour. of molec. Sci.* 17, 11, 1783.
- 604 Little, E. E., Finger, S. E. 1990. Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in  
605 fish. *Environ. Toxic. and Chem.: An Intern.l Jour.* 9, 1, 13-19.
- 606 Loureiro, S., Svendsen, C., Ferreira, A. L. *et al.*, 2010. Toxicity of three binary mixtures to  
607 *Daphnia magna*: comparing chemical modes of action and deviations from conceptual  
608 models. *Environmental Toxic. and Chem.* 29, 8, 1716 - 1726.
- 609 Miller, N. Y., Gerlai, R. 2011. Shoaling in *zebrafish*: what we don't know.
- 610 Moreira, R. A., Araújo, C. V., da Silva Pinto, T. J., *et al.*, 2021. Fipronil and 2, 4-D effects on  
611 tropical fish: Could avoidance response be explained by changes in swimming behavior  
612 and neurotransmission impairments?. *Chemosphere*, 263, 127972.
- 613 Nery, L. R., Eltz, N. S., Hackman, C. *et al.*, 2014. Brain intraventricular injection of amyloid-  
614  $\beta$  in *zebrafish* embryo impairs cognition and increases tau phosphorylation, effects  
615 reversed by lithium. *PLoS One.* 9, 9, e105862.

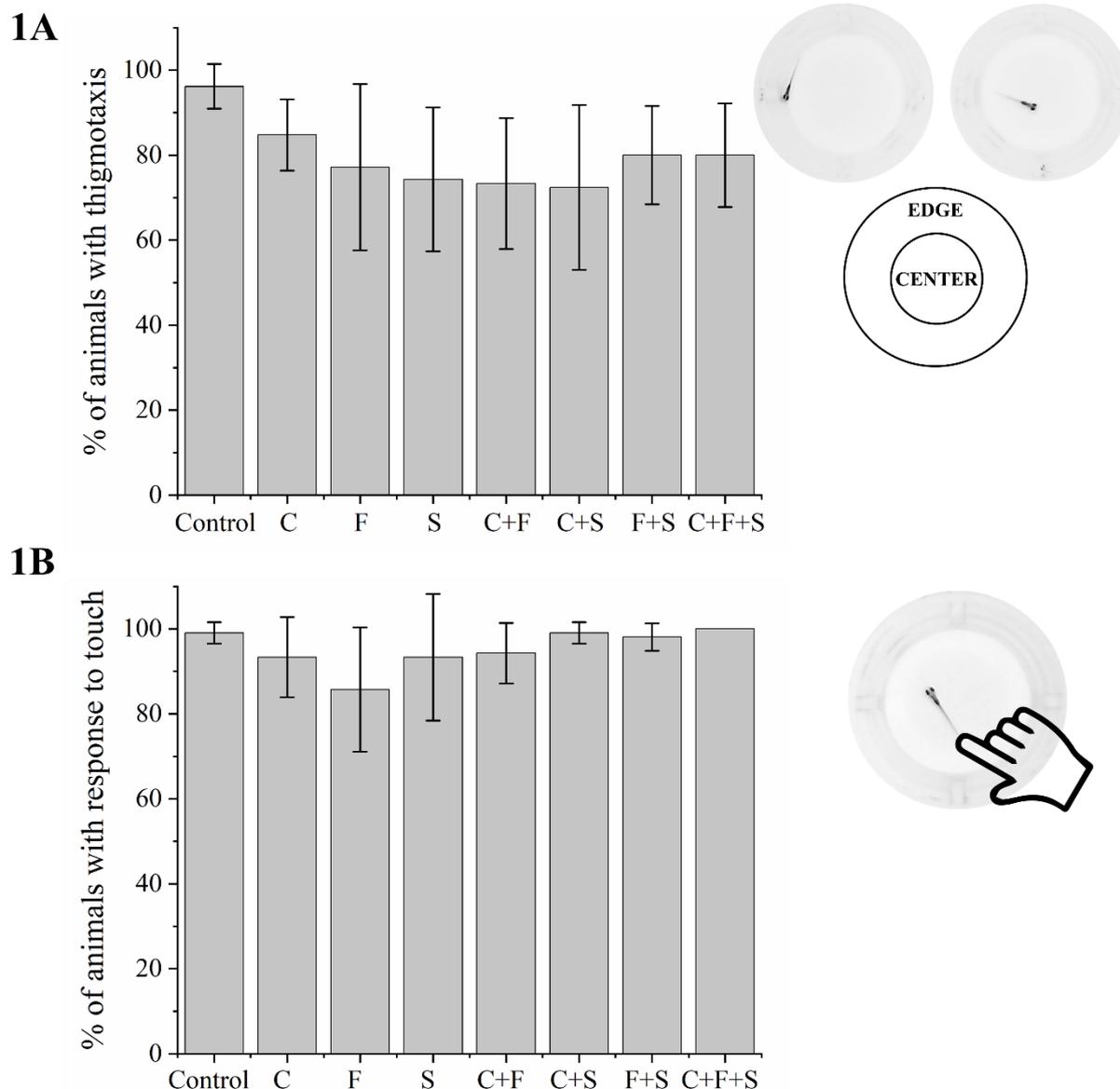
- 616 Nwani, C. D., Omah, M. C., Ivoke, N. *et al.*, 2015. Biochemical, haematological and  
617 morphological variations in juvenile *Clarias gariepinus* exposed to Carbendazim®  
618 fungicide. Afri. Jour. of Aqua. Sci. 40, 1, 63 - 71.
- 619 Ogungbemi, A., Leuthold, D., Scholz, S., *et al.*, 2019. Hypo-or hyperactivity of *zebrafish*  
620 embryos provoked by neuroactive substances: a review on how experimental  
621 parameters impact the predictability of behavior changes. Environ. Sci. Euro. 31, 1, 1 -  
622 26.
- 623 Paine, T. A., Swedlow, N., Swetschinski, L. 2017. Decreasing GABA function within the  
624 medial prefrontal cortex or basolateral amygdala decreases sociability. Behav. brain  
625 resea. 317, 542 - 552.
- 626 Panula, P., Sallinen, V., Sundvik, M., *et al.*, 2006. Modulatory neurotransmitter systems and  
627 behavior: towards *zebrafish* models of neurodegenerative diseases. *Zebrafish*. 3, 2,  
628 235-247.
- 629 Park, H., Lee, J. Y., Park, S. *et al.*, 2020. Developmental toxicity of fipronil in early  
630 development of *zebrafish* (*Danio rerio*) larvae: Disrupted vascular formation with  
631 angiogenic failure and inhibited neurogenesis. Jour. of hazar. Mater. 385, 121531.
- 632 Pelkowski, S. D., Kapoor, M., Richendrfer, H. A., *et al.*, 2011. A novel high-throughput  
633 imaging system for automated analyses of avoidance behavior in *zebrafish*  
634 larvae. Behavi. brain resea. 223, 1, 135 -144.
- 635 Peterson E.K., Buchwalter D.B., Kerby J.L., *et al.*, 2017. Integrative behavioral ecotoxicology:  
636 Bringing together fields to establish new insight to behavioral ecology, toxicology, and  
637 conservation. Curr. Zool. 63, 185 - 194.
- 638 Piantadosi, P. T., Khayambashi, S., Schluter, M. G. *et al.*, 2016. Perturbations in reward-related  
639 decision-making induced by reduced prefrontal cortical GABA transmission: relevance  
640 for psychiatric disorders. Neuropharmacology, 101, 279 - 290.

- 641 Qiu, Y., Lin, X., Chen, Z., Li, B. *et al.*, 2022. 5-Hydroxymethylfurfural exerts negative effects  
642 on gastric mucosal epithelial cells by inducing oxidative stress, apoptosis, and tight  
643 junction disruption. *Jour. of Agricul. and Food Chem.* 70, 12, 3852 - 3861.
- 644 Randlett, O., Wee, C. L., Naumann, E. A., *et al.*, 2015. Whole-brain activity mapping onto a  
645 *zebrafish* brain atlas. *Nat. Meth.* 12, 11, 1039 - 1046.
- 646 Richendrfer, H., Creton, R. 2018. Cluster analysis profiling of behaviors in *zebrafish* larvae  
647 treated with antidepressants and pesticides. *Neurotox. and terato.* 69, 54 - 62.
- 648 Romero-Ferrero, F., Bergomi, M. G., Hinz, R. C. *et al.*, 2019. Idtracker. ai: tracking all  
649 individuals in small or large collectives of unmarked animals. *Nat. Meth.* 16, 2, 179 -  
650 182.
- 651 Rosa, J. G. S., Lima, C., Lopes-Ferreira, M. 2022. *Zebrafish* larvae behavior models as a tool  
652 for drug screenings and pre-clinical trials: a review. *Inter. Jour. of Mol. Sci.* 23, 12,  
653 6647.
- 654 Santos, M. J. G., Soares, A. M., Loureiro, S. 2011. Joint toxicity of three plant protection  
655 products to *Triticum aestivum* (L.) and *Brassica rapa* (L.). *Jour. of Soi. and Sed.* 11, 6,  
656 990 -999.
- 657 Seebacher, F., Little, A. G., James, R. S. 2015. Skeletal muscle contractile function predicts  
658 activity and behavior in *zebrafish*. *Jour. of Exper. Biol.* 218, 24, 3878 - 3884.
- 659 Severo, E. S., Marins, A. T., Cerezer, C., *et al.*, 2020. Ecological risk of pesticide contamination  
660 in a Brazilian river located near a rural area: a study of biomarkers using *zebrafish*  
661 embryos. *Ecotox. and Environ. Saf.* 190, 110071.
- 662 Shen, C., Zhou, Y., Tang, C. *et al.*, 2020. Developmental exposure to mepanipyrim induces  
663 locomotor hyperactivity in *zebrafish* (*Danio rerio*) larvae. *Chemosphere*, 256, 127106.

- 664 Shen, X., Zhao, Y. F., Xu, S. Q. *et al.*, 2019. Cathepsin L induced PC-12 cell apoptosis via  
665 activation of B-Myb and regulation of cell cycle proteins. *Acta Pharmac. Sini.* 40, 11,  
666 1394 - 1403.
- 667 Shukla, S., Jhamtani, R. C., Dahiya, M. S., *et al.*, 2017. Oxidative injury caused by individual  
668 and combined exposure of neonicotinoid, organophosphate and herbicide in  
669 *zebrafish*. *Toxic. Rep.* 4, 240 -244.
- 670 Silva, A. R. R., Cardoso, D. N., Cruz, A. *et al.*, 2015. Ecotoxicity and genotoxicity of a binary  
671 combination of triclosan and carbendazim to *Daphnia magna*. *Ecotox. and environ.*  
672 *Saf.* 115, 279 - 290.
- 673 Syafrudin, M., Kristanti, R. A., Yuniarto, A., *et al.*, 2021. Pesticides in drinking water—a  
674 review. *Inter. Jour. of Environ. Res. and Pub. Heal.* 18, 2, 468.
- 675 Tholen, S., Biniossek, M. L., Gansz, M. *et al.*, 2014. Double deficiency of cathepsins B and L  
676 results in massive secretome alterations and suggests a degradative cathepsin-MMP  
677 axis. *Cell. and molec. life sci.* 71, 5, 899 - 916.
- 678 Thorngren, J. L., Harwood, A. D., Murphy, T. M., *et al.*, 2017. Fate and risk of atrazine and  
679 sulfentrazone to nontarget species at an agriculture site. *Environ. Toxic. and chem.* 36,  
680 5, 1301 - 1310.
- 681 Wan, Y., Tran, T. M., Nguyen, V. T., *et al.*, 2021. Neonicotinoids, fipronil, chlorpyrifos,  
682 carbendazim, chlorotriazines, chlorophenoxy herbicides, bentazon, and selected  
683 pesticide transformation products in surface water and drinking water from northern  
684 Vietnam. *Sci. of the Tot. Environ.* 750, 141507.
- 685 Wang, Y., Lv, L., Xu, C. *et al.*, 2021. Mixture toxicity of thiophanate-methyl and fenvalerate  
686 to embryonic *zebrafish* (*Danio rerio*) and its underlying mechanism. *Sci. of The Tot.*  
687 *Environ.* 756, 143754.

- 688 Westerfield, M., 2000. The *Zebrafish* book: a guide for the laboratory use of *Zebrafish* (*Danio*  
689 *rerio*), fourth ed. University of Oregon Press, Eugene, OR.
- 690 Wu, L., Dang, Y., Liang, L. X., *et al.*, 2022. Perfluorooctane sulfonates induces  
691 neurobehavioral changes and increases dopamine neurotransmitter levels in *zebrafish*  
692 larvae. *Chemosphere*, 297, 134234.
- 693 Wu, Y., Huang, J., Deng, M. *et al.*, 2019. Acute exposure to environmentally relevant  
694 concentrations of Chinese PFOS alternative F-53B induces oxidative stress in early  
695 developing *zebrafish*. *Chemosphere*, 235, 945-951.
- 696 Yan, J., Chen, S., Zuo, Z., *et al.*, 2020. Graphene oxide quantum dot exposure induces  
697 abnormalities in locomotor activities and mechanisms in *zebrafish* (*Danio rerio*). *Jour.*  
698 *of App. Toxic.* 40, 6, 794 - 803.
- 699 Yang, Y., Tang, T. L., Chen, Y. W. *et al.*, 2020. The role of chorion around embryos in toxic  
700 effects of bisphenol AF exposure on embryonic *zebrafish* (*Danio rerio*)  
701 development. *Estua. Coas. and Shelf Sci.* 233, 106540.
- 702 Zhang, W., Fan, R., Luo, S., *et al.*, 2022. Antagonistic effects and mechanisms of carbendazim  
703 and chlorpyrifos on the neurobehavior of larval *zebrafish*. *Chemosphere*, 293, 133522.

## 704 FIGURAS

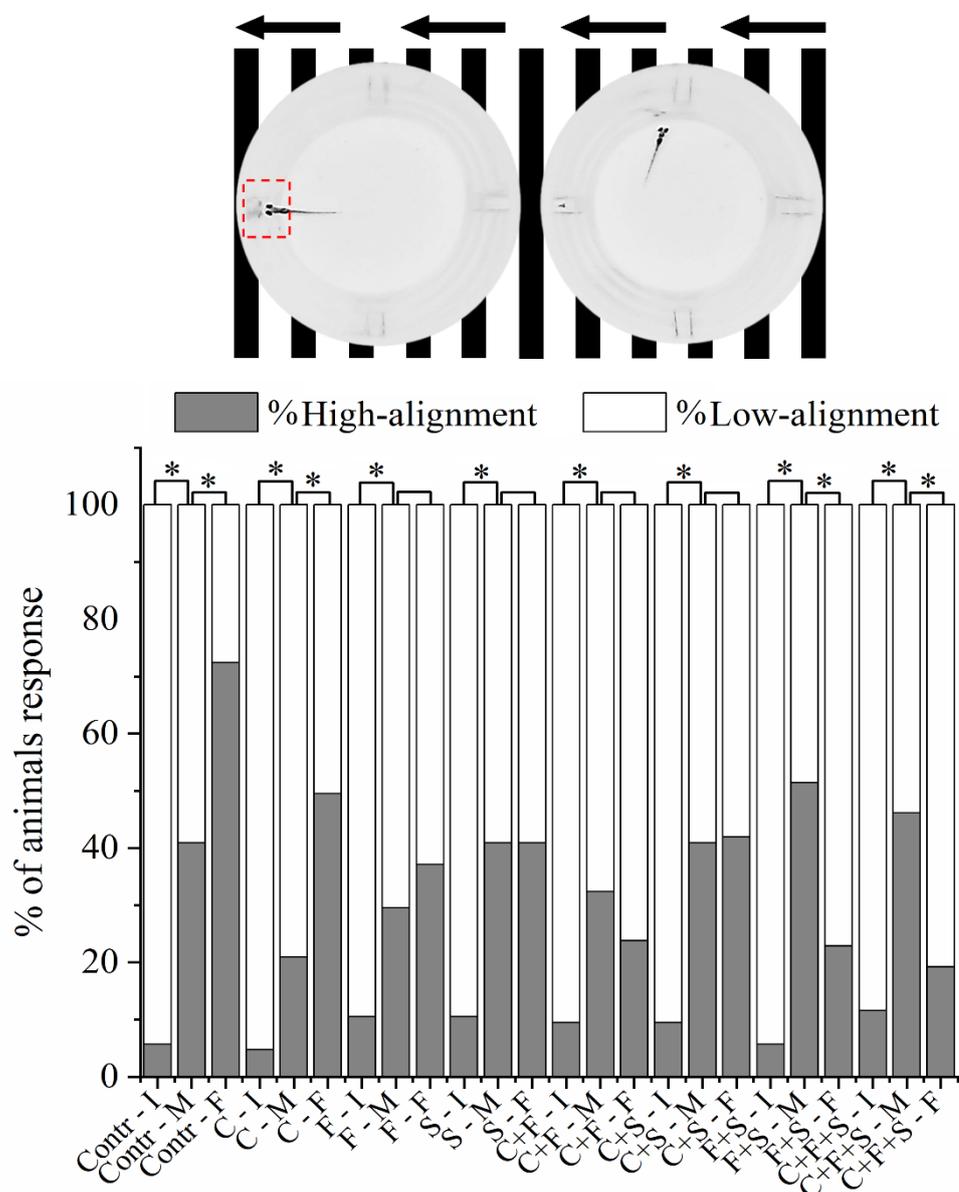


705

706 **Figura 1.** Efeitos dos pesticidas e suas misturas no teste de tigmotáxia (A) e respostas de cada  
 707 grupo em relação ao grupo de controle por ANOVA unidirecional ( $F(7,55) = 2,06$   $p < 0,07$ )  
 708 seguido pelo teste de Tukey (C  $p = 0,82$ ; F  $p = 0,24$ ; S  $p = 0,11$ ; C + F  $p = 0,08$ ; C + S  $p = 0,06$ ;  
 709 F + S  $p = 0,43$ ; C + F + S  $p = 0,43$ ). Teste de sensibilidade ao toque (B) e respostas de cada  
 710 grupo em comparação com o grupo de controle de um modo ANOVA ( $F(7,55) = 2,11863$   $p <$   
 711  $0,05935$ ) seguido pelo teste de Tukey (C  $p = 0,92$ ; F  $p = 0,09$ ; S  $p = 0,92$ ; C + F  $p = 0,97$ ; C +

712 S p = 1; F + S p = 1; C + F + S p = 1), p < 0,05 (\*), p < 0,05 (\*). Legenda: Contr - Controle; C  
 713 - Carbendazim; F - Fipronil; S - Sulfentrazona.

714



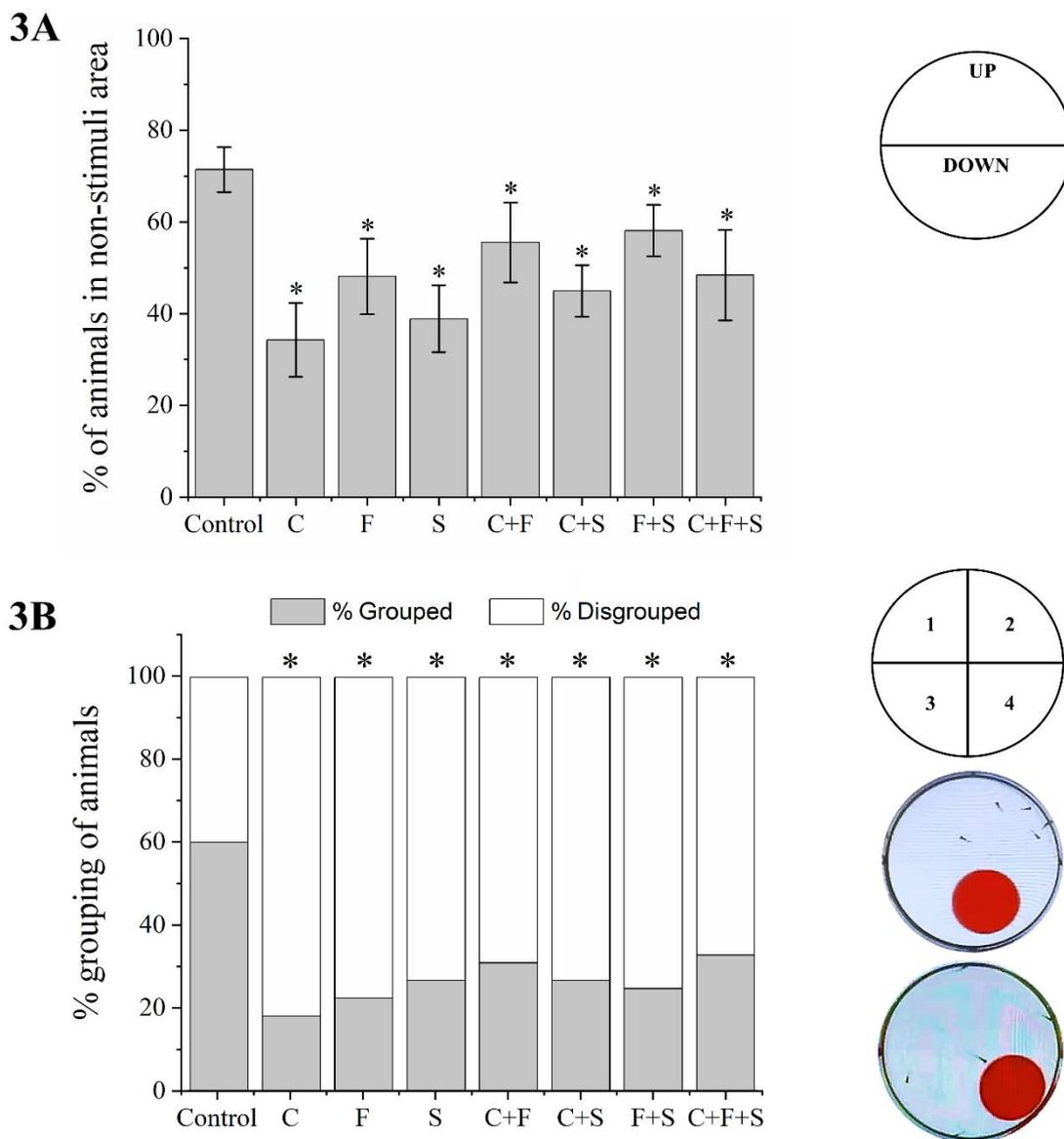
715

716 **Figura 2.** Percentual total de alinhamento de larvas de *zebrafish* ao poço durante o teste de  
 717 Resposta Optomotora sendo analisado pelo teste de simetria do Bowker, p < 0,05 (\*), para o  
 718 mesmo grupo entre as posições inicial, média e final do teste. (Contr. p < 0,05; C p < 0,05; F p  
 719 = 0,16; S p = 1; C + F p = 0,16; C + S p = 0,88; F + S p < 0,05; C + F + S p < 0,05). Legenda:

720 Contr - Controle; C - Carbendazim; F - Fipronil; S - Sulfentrazona; I - Inicial; M - Meio; F -

721 Fim.

722



723

724 **Figura 3.** Percentual total do número de larvas que exibiram comportamento de fuga em

725 resposta ao estímulo visual e permaneceram mais tempo na parte superior do poço, área sem

726 estímulo, durante o teste das bolas saltitantes (A). A resposta de cada grupo foi comparada ao

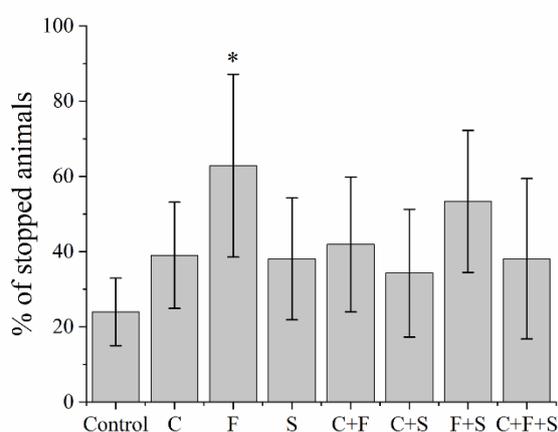
727 grupo de controle de uma forma ANOVA ( $F(7,55) = 17,11, p < 0,01$ ) seguido pelo teste de

728 Tukey (C  $p < 0,05$ ; F  $p < 0,05$ ; S  $p < 0,05$ ; C + F  $p = 0$ ; C + S  $p < 0,05$ ; F + S  $p = 0,03$ ; C + F

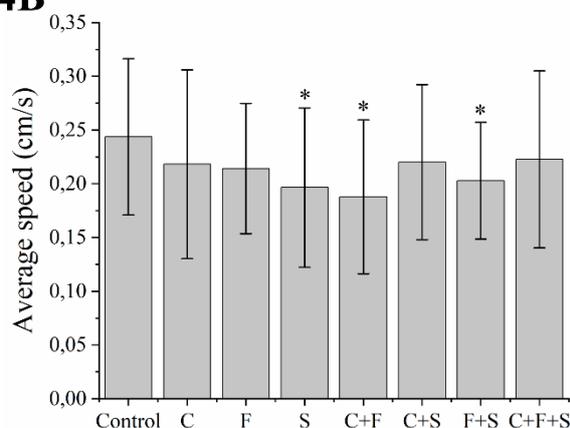
729 + S  $p < 0,05$ ),  $p < 0,05$  (\*). Agrupamento percentual de larvas durante o teste da Bola saltitante  
 730 (B), os grupos foram comparados ao grupo de controle por um lado ANOVA ( $F(7,55) = 6,20$ ,  
 731  $p < 0,01$ ), seguido pelo teste de Tukey (C  $p < 0,05$ ; F  $p < 0,05$ ; S  $p < 0,05$ ; C + F  $p < 0,05$ ; C +  
 732 S  $p < 0,05$ ; F + S  $p < 0,05$ ; C + F + S  $p < 0,05$ ; C + F + S  $p = 0,01$ ),  $p < 0,05$  (\*). Legenda:  
 733 Contr - Controle; C - Carbendazim; F - Fipronil; S - Sulfentrazona.

734

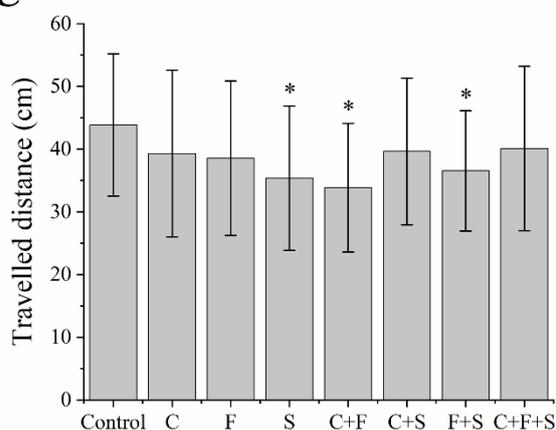
4A



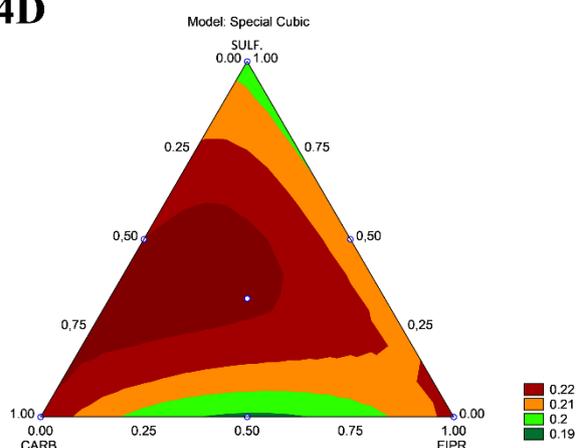
4B



4C



4D

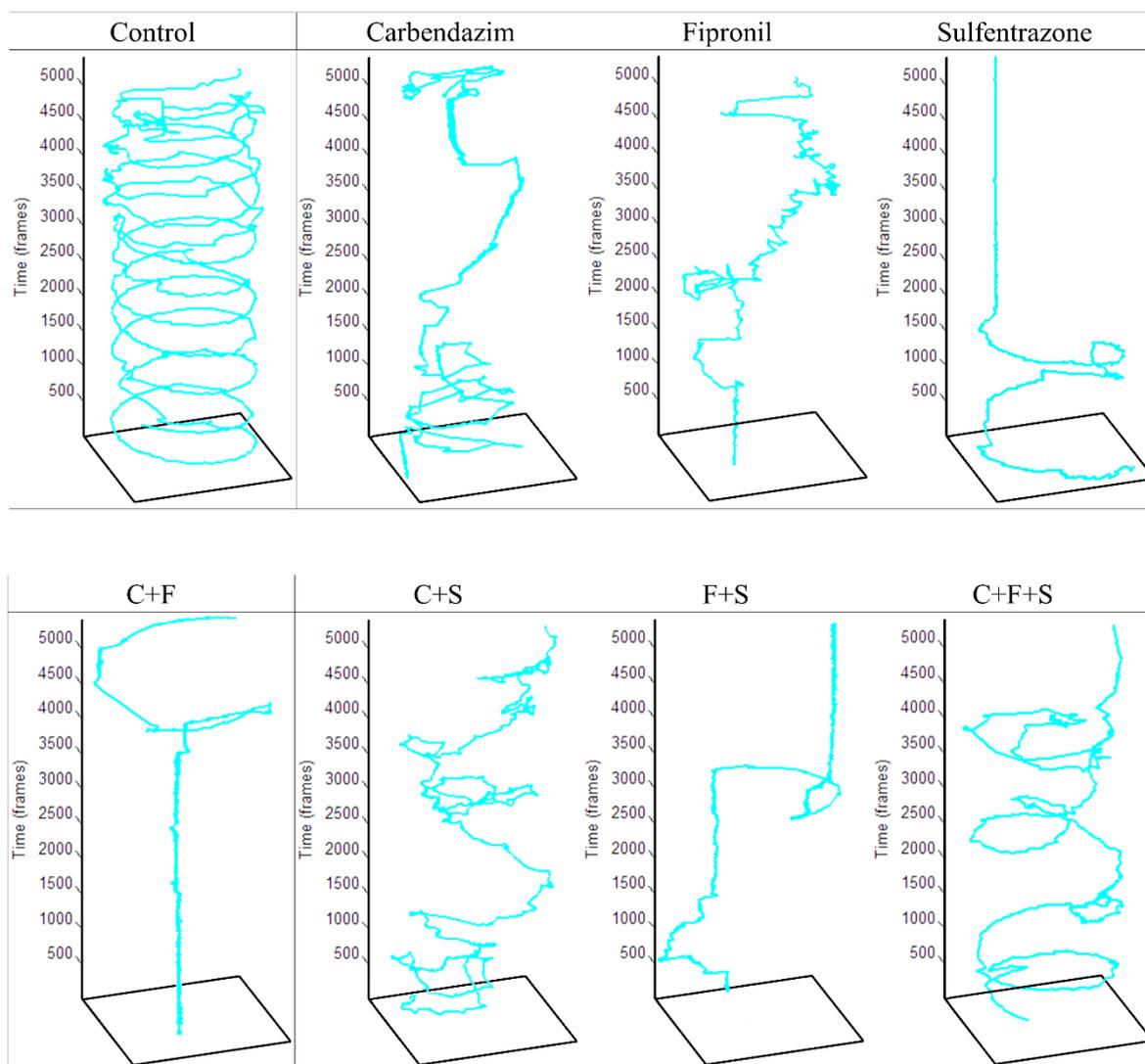


735

736 **Figura 4.** Percentual total de larvas que permaneceram paradas durante o teste de Atividade  
 737 Exploratória (A). Os grupos foram comparados ao grupo de controle de uma forma ANOVA  
 738 ( $F(7,55) = 2.71277$ ,  $p < 0,01$ ) seguido pelo teste de Tukey (C  $p = 0,84$ ; F  $p = 0,01$ ; S  $p = 0,88$ ;  
 739 C + F  $p = 0,70$ ; C + S  $p = 0,98$ ; F + S  $p = 0,13$ ; C + F + S  $p = 0,88$ ),  $p < 0,05$  (\*). Velocidade  
 740 média de natação das larvas durante o teste (B). Os grupos foram comparados ao grupo de

741 controle de uma forma ANOVA ( $F(7.435) = 4,0053$ ,  $p < 0,01$ ) seguido pelo teste de Tukey (C  
742  $p = 0,44$ ; F  $p = 0,37$ ; S  $p = 0,002$ ; C + F  $p < 0,05$ ; C + S  $p = 0,52$ ; F + S  $p = 0,03$ ; C + F + S  $p$   
743  $= 0,67$ ),  $p < 0,05$  (\*). Distância média total percorrida pelas larvas que nadaram durante o teste  
744 (C). Os grupos foram comparados ao grupo de controle ANOVA de um sentido ( $F(7.435) =$   
745  $4.00565$ ,  $p < 0,01$ ) seguido pelo teste de Tukey (C  $p = 0,44$ ; F  $p = 0,37$ ; S  $p = 0,003$ ; C + F  $p$   
746  $< 0,05$ ; C + S  $p = 0,52$ ; F + S  $p = 0,03$ ; C + F + S  $p = 0,68$ ),  $p < 0,05$  (\*). (D) Traçado de  
747 contorno ternário das variáveis Carbendazim, Fipronil e Sulfentrazone para um modelo cúbico  
748 especial ( $F(3.380) = 3,004$ ,  $p = 0,03$ ) avaliando os efeitos individuais e as interações destes  
749 pesticidas em suas misturas. Carbendazim e Sulfentrazone eram mais tóxicos ao reduzir a  
750 distância total percorrida (áreas verdes). Legenda: Contr - Controle; C - Carbendazim; F -  
751 Fipronil; S - Sulfentrazone.

752

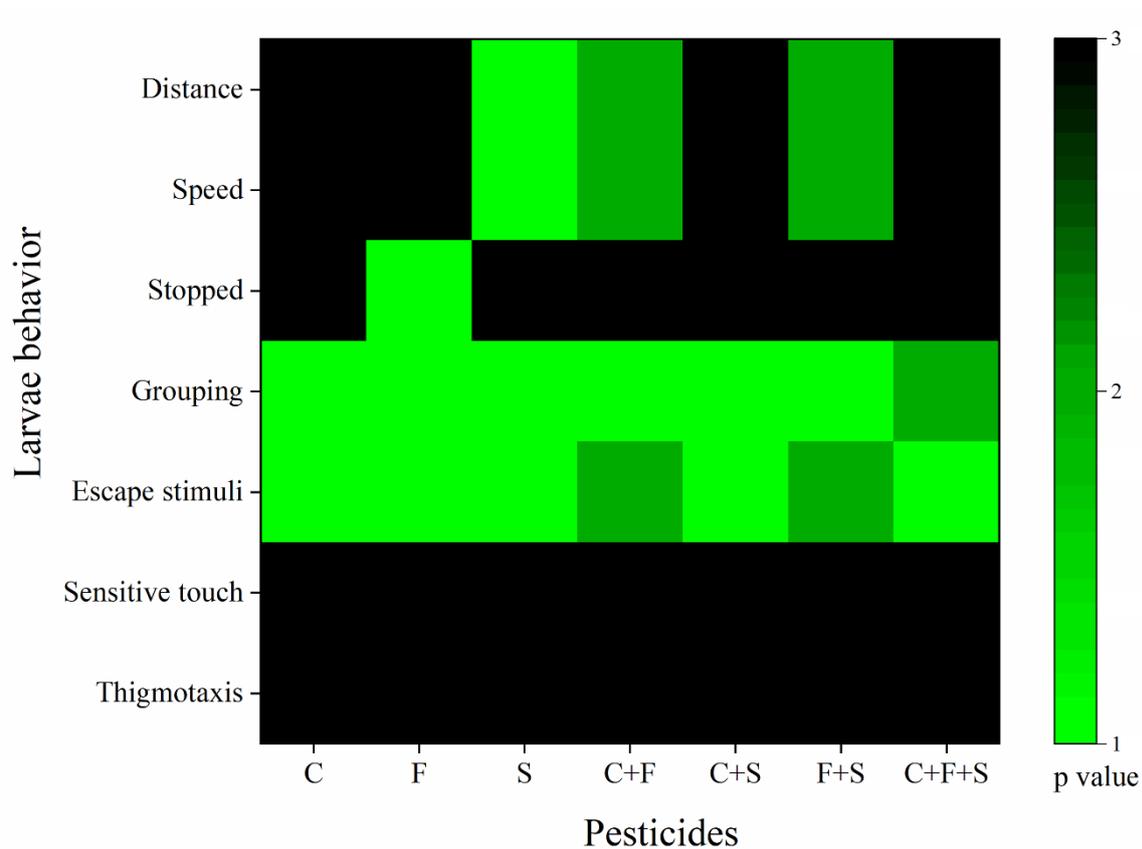


753

754

755 **Figura 5.** A trajetória total percorrida por uma larva *zebrafish* de cada grupo experimental e  
 756 do controle em um poço de uma placa de 48 poços durante a gravação de 3 minutos do teste de  
 757 Atividade Exploratória. Legenda: Contr - Controle; C - Carbendazim; F - Fipronil; S -  
 758 Sulfentrazone.

759



760

761 **Figura 6.** Análise de agrupamento de comportamentos das larvas expostas a pesticidas  
 762 individualmente e misturados com 6 dpf. Comparação do valor da variável P dos grupos testes  
 763 com o grupo de controle. As barras verdes indicam valores de 1 - 2, e as barras pretas indicam  
 764 um valor de 3. Legenda: Contr - Controle; C - Carbendazim; F - Fipronil; S - Sulfentrazona.

765

766 **TABELAS**

767 **Tabela 1.** Concentrações dos compostos carbendazim (C), fipronil (F), e sulfentrazona (S)  
 768 isolados, nas misturas binárias e terceárias usadas nos testes de comportamento com larvas de  
 769 *zebrafish* expostas. O layout do método de projeto do *Simplex centroid design* para avaliar as  
 770 interações entre os compostos químicos.

<i>Simplex centroid design para avaliação comportamental em 6 dpf</i>			
Componentes	Carbendazim (mg/L)	Fipronil (mg/L)	Sulfentrazona (mg/L)
C	0.200	0.0	0.0
F	0.0	0.050	0.0
S	0.0	0.0	0.200
C + F	0.100	0.025	0.0
C + S	0.100	0.0	0.100
F + S	0.0	0.025	0.100
C + F + S	0.060	0.0170	0.060

771

## ANEXOS



UNIVERSIDADE  
FEDERAL RURAL  
DE PERNAMBUCO

## Comissão de Ética no Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Toxicidade das misturas dos agrotóxicos Sulfentrazone, Fipronil e Carbendazim no modelo animal zebrafish (*Danio rerio*)", protocolada sob o CEUA nº 7373131021 (ID 000915), sob a responsabilidade de **Pabyton Gonçalves Cadena e equipe; Samara da Silva Gomes; Matheus Victor Viana de Melo** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE) na reunião de 15/12/2021.

We certify that the proposal "Toxicity of the pesticide mixtures Sulfentrazone, Fipronil and Carbendazim in the zebrafish animal model (*Danio rerio*)", utilizing 3906 Fishes (males and females), protocol number CEUA 7373131021 (ID 000915), under the responsibility of **Pabyton Gonçalves Cadena and team; Samara da Silva Gomes; Matheus Victor Viana de Melo** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Rural Federal University of Pernambuco (CEUA/UFRPE) in the meeting of 12/15/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **01/2022 a 12/2022** Área: **Ciências Biológicas**

Origem:	Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal - LECA		
Espécie:	Peixes	sexo: Machos e Fêmeas	idade: 1 a 7 dias N: 3510
Linhagem:	Variadas		Peso: 1 a 1 g
Origem:	Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal - LECA		
Espécie:	Peixes	sexo: Machos e Fêmeas	idade: 3 a 12 meses N: 396
Linhagem:	Variadas		Peso: 1 a 3 g

Local do experimento: No Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal - LECA da UFRPE.

Recife, 19 de setembro de 2022

Prof. Dr. Carlos Fernando Rodrigues Guaraná  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza  
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal Rural de Pernambuco