



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Ítalo Bertoni Lopes de Andrade

**TOXICIDADE DOS CONTAMINANTES DE PREOCUPAÇÃO
EMERGENTE DECAMETILCICLOPENTASILOXANO E TRICLOPIR
NO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES E LARVAS DE
ZEBRAFISH**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre em
Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lílian Cristina Pereira

**Botucatu
2021**

Ítalo Bertoni Lopes de Andrade

Toxicidade dos contaminantes de preocupação emergente decametilciclopentasiloxano e triclopir no desenvolvimento de embriões e larvas de zebrafish

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Lílian Cristina Pereira

Botucatu
2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Andrade, Italo Bertoni Lopes de. Toxicidade dos contaminantes de preocupação emergente decametilciclopentasiloxano e triclopir no desenvolvimento de embriões e larvas de zebrafish / Italo Bertoni Lopes de Andrade. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Lílían Cristina Pereira
Capes: 40303004

1. Zebrafish. 2. Toxicidade. 3. Pesquisas com embriões.
4. Larvas. 5. Herbicidas.

Palavras-chave: Contaminantes de preocupação emergente;
Decametilciclopentasiloxano; Toxicidade; Triclopir;
Zebrafish.

Agradecimentos

À minha orientadora Dra. Lílian Cristina Pereira, pela impecável orientação, pela dedicação e paciência, profissionalismo e principalmente por todos os ensinamentos e conhecimento compartilhado.

À minha grande e talentosíssima amiga Nayane, pelo apoio, pela confiança e companheirismo não só durante o mestrado, mas desde o primeiro dia da graduação. Agradeço ainda, por sempre me estimular e acreditar em mim.

À Bianca Sales, minha parceira de bancada, por todo o apoio, disposição e suporte para conduzir este trabalho, além, é claro, dos momentos mais divertidos que compartilhamos no laboratório e biotério.

À minha amiga Paloma Vitória, mulher forte, inteligente e melhor mestranda desse mundo todo, pela companhia além do biotério, pelas trocas de conhecimento e por me inspirar a ser um militante melhor.

À Danielle Selotto, minha companheira de mestrado, pelo apoio, carinho, confiança e por toda a ajuda durante todo o mestrado.

Ao meu melhor amigo Ângelo Thompson, pelo apoio, pela confiança, pelas trocas de confidências, por toda a ajuda que precisei e pelas aventuras mais insanas vividas em Botucatu.

À minha família pelo estímulo e apoio.

À Thânia Rios, pela paciência e disponibilidade para me ajudar a resolver questões complexas relacionadas a minha pesquisa, também por todo o conhecimento compartilhado.

A todos os membros do grupo TOXICAM, pelo acolhimento e por todos os ensinamentos, essenciais para minha formação.

Ao Dr. Rafael Henrique Nobrega, pela parceria, a qual foi de extrema importância para a execução deste trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelas concessões das bolsas de mestrado, as quais possibilitaram a execução e dedicação integral ao curso de mestrado.

Agradeço o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo nº 18/00229-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP), o que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

*“When the last tree has fallen and the rivers are
poisoned, you cannot eat money”*

(Aurora Aksnes)

RESUMO

O uso volumoso de praguicidas, de fármacos e de químicos industriais, entre outros, tem provocado a contaminação do meio ambiente, com bioacumulação e biomagnificação de seus resíduos que, eventualmente, podem provocar exposições inadequadas e aumentar as incidências de doenças humanas. O pouco conhecimento de seus destinos no meio ambiente e potenciais efeitos a saúde, e ainda combinados a falta de monitoramento nos compartimentos ambientais, classificam essas substâncias químicas como contaminantes de preocupação emergentes (CPEs). Estudos experimentais têm a capacidade de prever a toxicidade desses CPEs, sendo de grande importância para a compreensão dos mecanismos potencialmente envolvidos no risco à saúde humana e ambiental. Atualmente, o uso de métodos alternativos para avaliação da toxicidade de substâncias químicas é uma tendência internacional em resposta à política dos 3R (*reduce, refine, replace*), que sugere a diminuição no uso de animais em pesquisas. Dentre as novas metodologias alternativas aplicadas à toxicologia inclui-se a utilização do peixe *Danio rerio* (zebrafish) como organismo modelo para ensaios de alto rendimento (*high-throughput screening*). Neste trabalho, avaliamos o potencial de embriotoxicidade neurotoxicidade de dois CPEs, o decametilciclopentasiloxano (D5), um representante dos produtos de cuidados pessoais, e o triclopir, um representante dos praguicidas. Para a avaliação da toxicidade aguda desses contaminantes, seguimos o protocolo OECD TG236, pelo qual os embriões do zebrafish foram expostos por até 144 horas pós fertilização (hpf) a concentrações ambientalmente realistas, na faixa de 0,5-500 $\mu\text{mol/L}$. Os embriões foram observados a cada 24 horas até o final do teste (144hpf). Ainda, nossos resultados revelaram a ocorrência de efeitos letais (ovo coagulado e falta de batimento cardíaco) e subletais (edema de pericárdio e saco vitelínico, não eclosão dos ovos e bexiga não inflada) para os dois compostos em todas as concentrações testadas, e efeitos teratogênicos (escoliose, malformação de cabeça e olhos) nos organismos expostos a 10 e 50 $\mu\text{mol/L}$ de triclopir. A partir de nossos resultados determinamos a CL50 e CE50 das substâncias testadas. A atividade da AChE como biomarcador de neurotoxicidade também foi avaliada. Não foi observada diferença significativa na atividade da AChE nos grupos tratados com os contaminantes estudados. Avaliados em conjunto, nossos resultados indicam que ambas as substâncias são capazes de causar efeitos adversos no desenvolvimento do zebrafish, mesmo em concentrações muito baixas, àquelas comumente recomendadas. Ainda, os dados gerados neste trabalho podem oferecer embasamento científico para a implementação de estratégias coerentes e eficazes de controle desses contaminantes ambientais relacionadas a avaliação do risco.

Palavras-chave: Contaminantes de Preocupação Emergente; decametilciclopentasiloxano; D5; triclopir; zebrafish, avaliação de toxicidade.

ABSTRACT

The massive use of pesticides, drugs and industrial chemicals, among others, has caused contamination of the environment, with bioaccumulation and biomagnification of its residues, which, eventually, can cause inappropriate exposures and increase the incidence of human diseases. The little knowledge of their destinations in the environment and potential health effects, and even combined with the lack of monitoring in the environmental compartments, classify these chemical substances as contaminants of emerging concern (CECs). Experimental studies have the ability to predict the toxicity of these CECs, being of great importance for the understanding of the mechanisms potentially involved in the risk to human and environmental health. Currently, the use of alternative methods for assessing the toxicity of chemical substances is an international trend in response to the 3R (reduce, refine, replace) policy, which suggests a decrease in the use of animals in research. Among the new alternative methodologies applied to toxicology, the use of the fish *Danio rerio* (zebrafish) is included as a model organism for high-throughput screening tests. In this work, we evaluated the embryotoxicity potential of two CECs, decamethylcyclopentasiloxane (D5), a representative of personal care products, and triclopir, a representative of pesticides. To assess the acute toxicity of these contaminants, we adopted the OECD TG236 protocol, whereby the zebrafish embryos were exposed for up to 144 hours after fertilization (hpf) to environmentally realistic concentrations, in the range of 0.5-500 $\mu\text{M/L}$. The embryos were observed every 24 hours until the end of the test. Furthermore, our results revealed the occurrence of lethal effects (coagulated egg and lack of heart beat) and sublethal effects (edema of pericardium and yolk sac, non-hatching of eggs and non-inflated bladder) for both compounds in all tested concentrations, and effects teratogenic (scoliosis, malformation of head and eyes) in organisms exposed to 10 and 50 $\mu\text{M/L}$ of triclopyr. From our results, we determined the LC50 and EC50 of the tested substances. The activity of AChE as a neurotoxicity biomarker was also assessed. No significant difference was observed in AChE activity in the groups treated with the assessed contaminants. Taken together, our results indicate that both substances can cause adverse effects on the development of zebrafish, even at very low concentrations, to those commonly recommended. In addition, the data generated in this work can provide a scientific basis for the implementation of coherent and effective strategies to control these environmental contaminants related to risk assessment.

Keywords: Contaminants of Emerging Concern; decamethylcyclopentasiloxane; D5; triclopyr; zebrafish, toxicity assessment.

Sumário

CAPÍTULO I - Revisão da literatura	8
1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Contaminantes de preocupação emergente (CPEs)	9
1.1.1 Siloxanos e decametilciclopentasiloxano (D5)	13
1.1.1.1 Destino ambiental de D5	15
1.1.1.2 Toxicidade do D5	16
1.1.2 Triclopir.....	18
1.1.2.1 Toxicidade do triclopir	20
1.2 Zebrafish como modelo experimental em pesquisa toxicológica	21
1.3 Ensaios de toxicidade com zebrafish	25
1.3.1 Teste de toxicidade aguda em embrião de peixe (teste FET).....	25
1.3.2 Acetilcolinesterase (AChE) como biomarcador de toxicidade em embriões de zebrafish	27
2 OBJETIVOS	28
REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO II - Artigo científico	41
1 INTRODUÇÃO	42
2 MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1 Estratégia de estudo.....	45
2.2 Substâncias químicas.....	45
2.3 Peixes.....	46
2.4 Toxicidade aguda em embrião de peixe (FET test)	46
2.5 Ensaio da atividade da acetilcolinesterase (AChE)	48
2.6 Análise estatística.....	48
2.7 Aspectos Éticos.....	48
3 RESULTADOS	49
3.1 Ensaio de embriotoxicidade (FET test).....	49
3.2 Atividade da Acetilcolinesterase	65
4 DISCUSSÃO	67
5 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXO	75

CAPÍTULO I - Revisão da literatura

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contaminantes de preocupação emergente (CPEs)

A ação antropogênica tem inserido no meio ambiente, ao longo dos anos, inúmeros compostos químicos, desde moléculas sintéticas em formulações de produtos de cuidados pessoais (PCPs), corantes, retardantes de chamas, praguicidas e até mesmo genes resistentes de microrganismos (Sauvé *et al.*, 2014; Richardson *et al.*, 2020). O crescimento populacional acelerado somado ao progresso no desenvolvimento industrial e tecnológico, têm diretamente impulsionado a grande produção desses compostos, sob a premissa de atender a demanda das necessidades humanas por produtos cada vez mais sofisticados (Pereira *et al.*, 2015; Bambino *et al.*, 2017; Starling *et al.*, 2019). Esses produtos, tais como os PCPs e praguicidas, são onipresentes em nosso cotidiano e, desta forma, estão presentes em nossa casa, no trabalho, no campo, em nossa comida e, conseqüentemente, em fluidos biológicos (Bellato *et al.*, 2019; Fontenele *et al.*, 2010).

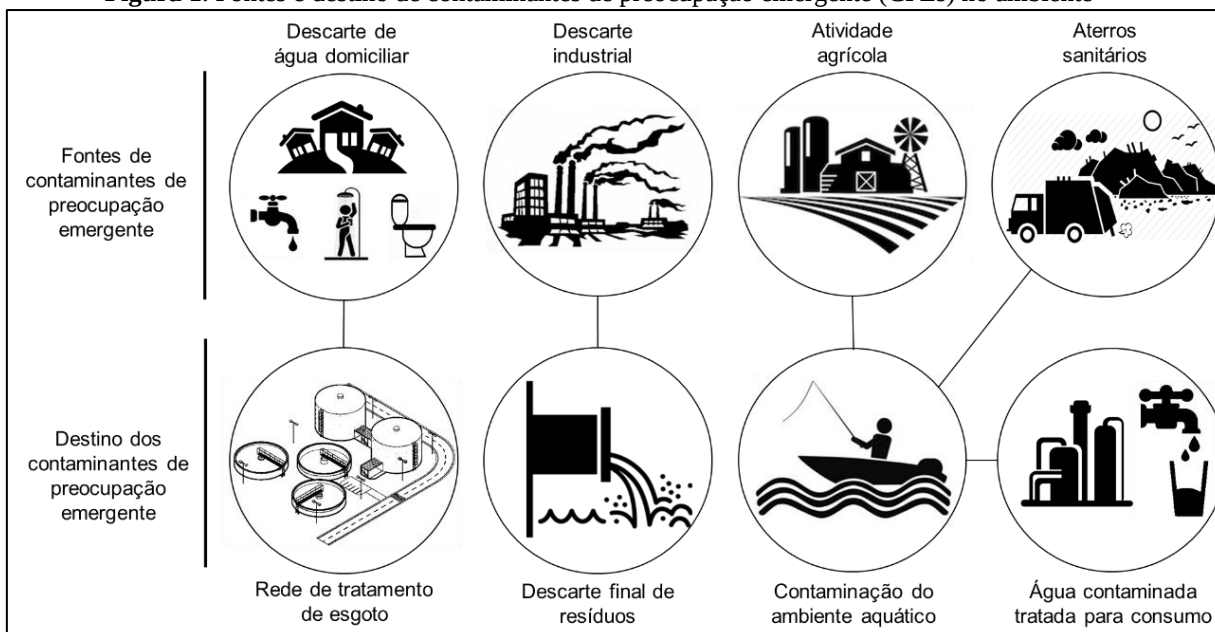
Neste cenário, de acordo com um levantamento realizado pela Organização das Nações Unidas (ONU) para a Alimentação e Agricultura (FAO) (2017), em 2016 o Brasil apareceu na 44ª posição no *ranking* de países que mais utilizam praguicidas no mundo, com um consumo relativo de 4,31 quilos desses produtos por hectare (Kg/ha) cultivado, ficando atrás de países europeus como Países Baixos (9,38 kg/isso), Bélgica (6,89 Kg/ha), Itália (6,66 Kg/ha), Irlanda (5,78 Kg/ha), Portugal (5,63 Kg/ha) e Suíça (5,07 Kg/ha) (FAO, 2020). Em relação ao uso em pastagens, os praguicidas mais utilizados no país são o 2,4-D, Dicamba, Fluroxipir-MHE, Glifosato, Paraquat, Picloram, Tebutiuron e Triclopir (EMBRAPA, 2020). Como resultado, a detecção de resíduos desses compostos químicos em matrizes ambientais (água, solo, ar, sedimentos) é cada vez mais frequente, variando em escalas de ng a µg (Starling *et al.*, 2019), o que alerta a comunidade científica ao risco toxicológico desses compostos químicos no meio ambiente. Como uma das consequências do uso crescente desses produtos, 84.206 casos de intoxicações foram registrados em unidades de saúde pública e privadas apenas no período de 2007 a 2015 no Brasil (BRASIL, 2018).

Outra classe de compostos químicos bastante consumida mundialmente são os PCPs (Juliano *et al.*, 2017). Atualmente, o Brasil é o 4º maior mercado consumidor de PCPs do mundo, com um faturamento de US\$ 29,6 bilhões em 2019, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, China e Japão (ABIHPEC, 2020). Conseqüentemente, compostos químicos como parabenos, siloxanos e antissépticos, frequentemente utilizados como ingredientes na formulação de alguns PCPs (perfumes, esmaltes, shampoos, condicionadores, maquiagens

entre outros), têm chamado a atenção devido sua ocorrência no meio ambiente (Juliano *et al.*, 2017; Starling *et al.*, 2019) e risco toxicológico para humanos (Juliano *et al.*, 2017; SCCS, 2015).

O pouco conhecimento sobre os mecanismos de toxicidade, assim como a carência de informações acerca dos riscos desses compostos à saúde humana e ao meio ambiente, para curto e longo prazo de exposição, os coloca em um grupo de compostos de importância ecotoxicológica denominados “contaminantes de preocupação emergente” (Metcalf *et al.*, 2013; Geissen *et al.*, 2015; Salimi *et al.*, 2017; Wilkinson *et al.*, 2017; Poynton, Robinson, 2018). Por definição, contaminantes de preocupação emergente (CPEs) são materiais ou compostos químicos de origem sintética ou natural, previamente conhecidos ou não, caracterizados por apresentar uma ameaça real ou potencial para a saúde humana ou para o ambiente (Geissen *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2014; Poynton, Robinson, 2018). Esses CPEs não estão incluídos em qualquer legislação ou programas de monitoramento (monitoramento de uso e destino, por exemplo), o que impulsiona a necessidade de pesquisa para a melhor compreensão dos seus mecanismos de toxicidade e efeitos decorrentes da exposição (Pereira *et al.*, 2015; Geissen *et al.*, 2015; UNEP, 2017; Taheran *et al.*, 2018).

Os CPEs são liberados constantemente no meio ambiente e suas fontes são variadas (Geissen *et al.*, 2015; Taheran *et al.*, 2018). Todavia, podemos considerar como principais fontes de introdução dos compostos no ambiente: descarte doméstico por efluentes urbanos (PCPs, fármacos, detergentes), descartes hospitalares (fármacos), industriais (corantes, micro e nanoplásticos dentre outros materiais), e de atividades de produção animal ex., medicamentos de uso veterinário), lixiviação de campos agrícolas (praguicidas e fertilizantes), além de depósitos de lixo em aterros sanitários (Gogoi *et al.*, 2018) (Figura 1). Além disso, a precipitação e escoamento de vias urbanas também podem ser consideradas fontes importantes de entradas de CPEs no meio ambiente (Wilkinson *et al.*, 2017).

Figura 1. Fontes e destino de contaminantes de preocupação emergente (CPEs) no ambiente

Legenda: As principais fontes de emissão de CPEs destacadas são: descarte de água da atividade domiciliar, descarte de resíduo industrial, atividade agrícola e depósito de lixo em aterros sanitários. O destino dos CPEs, provenientes de descarte domiciliar, se dá através de redes de tratamento de esgoto; resíduos de atividade industrial são descartados como efluente em matrizes naturais; contaminantes da atividade agrícola e de aterros sanitários podem ser lixiviados e infiltrados no solo contaminando águas superficiais que são captadas por redes de tratamento para o consumo.

Fonte: próprio autor.

A identificação de CPEs no meio ambiente, principalmente em matrizes aquáticas, tem se tornado frequente (Escher *et al.*, 2019). Em sua revisão, Montagner *et al.* (2019) listaram cerca de duzentos CPEs, datados de 1997 a 2017, presentes em águas brasileiras, incluindo águas superficiais, sedimentos e água potável (água de beber) (Montagner *et al.*, 2019). Entre os contaminantes com maior frequência de detecção no ambiente estão os praguicidas, por exemplo, o triclopir, um herbicida de uso bastante comum em território brasileiro (EMBRAPA, 2020; Guilherme *et al.*, 2015; Richardson *et al.*, 2016).

Além dos praguicidas, produtos farmacêuticos, principalmente anti-inflamatórios e antibióticos, os PCPs estão no topo da lista de CPEs com maior índice de detecção no ambiente aquático (Montagner *et al.*, 2019). Entre os representantes dos PCPs considerados CPEs está o siloxano decametilciclopentasiloxano (D5), um composto de amplo uso industrial, reportado no relatório bianual “*Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues*” (Richardson e Kimura, 2016), e alvo de agências reguladoras europeias.

Em grandes centros urbanos como a cidade de São Paulo, a identificação de CPEs das mais variadas classes químicas em águas superficiais, rios e esgoto é cada vez mais comum

(Starling et al., 2019). A distribuição de CPEs no meio ambiente se torna praticamente ilimitada, à medida que novos compostos e substâncias químicas são continuamente introduzidas no mercado (Wilkinson *et al.*, 2017).

Tendo em vista a meta de alcançar os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU até 2030 (ONU, 2020) e em paralelo com o Plano Nacional de Saneamento Básico (PLANSAB) até 2033, ambos com a finalidade de universalizar o acesso ao saneamento básico, no Brasil quase metade da população continua sem acesso a sistemas de esgotamento sanitário. De acordo com o Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS) de 2018, apenas 53,2% da população brasileira, cerca de 107,5 milhões de pessoas, possui serviço de coleta de esgoto. Deste total, estima-se que apenas 46% recebam tratamento. Em contrapartida, quase 47% dos brasileiros, isto é, 100 milhões de pessoas, não possuem serviços de saneamento básico (SNIS, 2018). Neste contexto, essa fração da população utiliza medidas alternativas para lidar com os dejetos gerados, seja através de fossas sépticas ou jogando o esgoto diretamente em rios, o que contribui de forma expressiva para a entrada de contaminantes em matrizes ambientais (Silva *et al.*, 2014).

Frente a este cenário, além da evidente situação de vulnerabilidade da população carente de saneamento básico, a contaminação do meio ambiente, com prejuízos à biota e a saúde humana, chega a ser inevitável, uma vez que sistemas sépticos são considerados as principais fontes de CPEs, como os PCPs, em águas superficiais e subterrâneas (Schaidler *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014). Além disso, as concentrações de contaminantes detectadas em sistemas sépticos podem variar de acordo com os tipos de produtos químicos utilizados. E ainda, a remoção desses contaminantes nestes sistemas é quase nula (Stanford, Weinberg 2010).

Muitos contaminantes distribuídos no ambiente, a exemplo do Bisfenol A (BPA) e DDT, podem causar toxicidades crônicas como desregulação endócrina, tanto em humanos quanto em organismos aquáticos, diminuição da qualidade e taxa reprodutiva, mortalidade e até mesmo o desenvolvimento e seleção de bactérias resistentes a antibióticos (Pontelli *et al.*, 2016; UNESCO, 2018). Além disso, embora alguns autores afirmem que as concentrações de contaminantes no ambiente, por exemplo, os praguicidas e PCPs, estão em níveis muito abaixo das doses usualmente aplicadas e consumidas diariamente (UNEP, 2019; Gupta et al., 2020), o processo de bioacumulação, referido à absorção, armazenamento e acumulação de contaminantes por organismos em seu ambiente, deve ser considerado como um parâmetro importantíssimo, favorecedor de toxicidade (Streit *et al.*, 1998; Borgå *et al.*, 2019). Isto posto, a exemplo dos PCPs, o siloxano D5 apresenta grande capacidade de bioacumulação tanto no ambiente aquático (principalmente em sedimentos), quanto em tecidos biológicos de

organismos (Kierkegaard *et al.*, 2012; Norwood *et al.*, 2013; Fairbrother *et al.*, 2015; Xue *et al.*, 2019), representando um fator de risco importante à saúde, pensando em exposição a longo prazo.

Somados aos danos ambientais, como alterações climáticas, diminuição da biodiversidade e contaminação do ar, a contaminação da água, devido ao aumento de CPEs, poderá contribuir direta e indiretamente para agravos à saúde de milhões de pessoas, incluindo morte, ao redor do mundo até 2050, segundo o relatório “*Global Environment Outlook – GEO-6: Healthy Planet, Healthy People*” emitido pela Organização das Nações Unidas (ONU) (UNEP, 2019).

Para melhor compreensão do impacto dos CEPs devem ser levados em consideração aspectos importantes como: desenvolvimento e implementação de protocolos e métodos analíticos para quantificar e qualificar os CPEs; delineamento e estudos de ocorrência e persistência de contaminantes em diferentes matrizes ambientais; tratamento de águas residuais e água potável para a remoção de contaminantes; e, avaliação continua da toxicidade e riscos à saúde humana e ao meio ambiente dos CPEs, individual e conjuntamente (Bravo, 2009; Vélez *et al.*, 2019). No entanto, essa tarefa não é fácil, pois existem milhares de compostos com diferentes propriedades físicas e químicas que podem ser classificados como CPEs.

Contaminantes de preocupação emergente fazem parte da realidade da sociedade moderna. Devido à falta ou limitado conhecimento sobre a maioria desses contaminantes, suas fontes e formação, eles ainda configuram um enorme desafio quanto à pesquisa, manejo e tomada de decisões, assim como a regulamentação visando minimizar seus impactos (Wilkinson *et al.*, 2017; Taheran *et al.*, 2018).

1.1.1 Siloxanos e decametilciclopentasiloxano (D5)

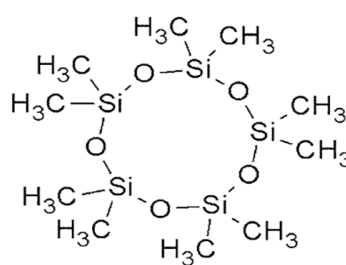
Siloxanos constituem um grupo de compostos que incluem organosilicones, oligômeros e polímeros. Esses compostos foram sintetizados inicialmente em 1863 e tiveram sua produção industrial em escala a partir de 1940 (Mojsiewicz-Pienkowska *et al.*, 2016). Estima-se que a produção de siloxanos chega a um volume superior a 4.500 toneladas por ano (ECHA, 2016). A produção, consumo e importação de siloxanos estão atreladas a sua utilização em uma gama muito grande de PCPs, aditivos alimentares, produtos farmacêuticos e produtos intermediários para a produção de outros polímeros de silicone, com as mais variadas aplicações na indústria (Alaee *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013).

Os siloxanos são produzidos a partir da hidrólise ácida de silanos (dimetildiclorossilano, clorotrimetilsilano) e purificação por destilação. Estes compostos diferem entre si por apresentarem variação em: tamanho molecular, peso molecular, forma (lineares ou cíclicos) e propriedades físico-químicas, o que influencia em seu emprego (HSDB, 2005; EPA, 2014). Ainda, os siloxanos, incluindo os siloxanos cíclicos, possuem muitas propriedades comercialmente atrativas, como textura lisa, baixa tensão superficial e alta estabilidade térmica e devido a essas propriedades, são comumente usados em quantidades significativas na formulação de PCPs (Loretz *et al.*, 2008; Horii, Kannan, 2008; Wang *et al.*, 2013).

Os siloxanos são resistentes às reações químicas como: oxidação, redução e fotodegradação, os tornando persistentes no ambiente 41,42. Alguns representantes desta classe de compostos, como o octametilciclotetrasiloxano (D4), decametilciclopentasiloxano (D5) e dodecametilciclohexa-siloxano (D6) têm chamado a atenção pelos seus potenciais riscos à saúde humana e ambiental devido a sua capacidade de dispersão no ambiente e de bioacumulação (Kent *et al.*, 1996; Brooke *et al.*, 2009; Howard, Muir, 2010).

De grande interesse toxicológico, o D5 é um siloxano de estrutura molecular cíclica (figura 2), que se apresenta como um líquido incolor, sem cheiro e volátil em temperatura ambiente (25 °C) (Mackay *et al.*, 2015). Suas principais características físico-químicas estão sumarizadas na tabela 1.

Figura 2. Estrutura molecular do decametilciclopentasiloxano



Fonte: Mackay, 2015.

Quadro 1. Características e propriedades físicas—químicas do decametilciclopentasiloxano.

Nome	Fórmula molecular	Peso molecular	Solubilidade em água	log K _{ow}	Número CAS
Decametilciclopentasiloxano; D5	C ₁₀ H ₃₀ O ₅ Si ₅	370,77	17,0 µg/L a 23°C	8,09	541-02-6

Fonte: Sahlin, Ågerstrand, 2018.

Industrialmente, o D5 é utilizado como precursor na produção de polímeros de polidimetilsiloxano (PDMS), também referidos como silicones. O D5 é usado na mistura e formulação de uma variedade de PCPs incluindo xampus, condicionadores, cremes para a pele e cabelo, cosméticos e desodorantes. Além disso, o D5 é empregado como solvente em produtos comerciais de limpeza a seco e fluídos de limpeza industrial (Mackay *et al.*, 2015).

1.1.1.1 Destino ambiental de D5

A liberação de D5 no meio ambiente ocorre principalmente por meio de sua volatilização, descarte industrial e uso em ambientes internos e externos (Xue *et al.*, 2018). No entanto, o descarte de PCPs contendo D5, através da água domiciliar residual, seja a mais importante via de contaminação ambiental por esse siloxano (Sahlin, Ågerstrand, 2018).

Como resultado do uso generalizado em produtos de consumo, muitos estudos têm relatado a ocorrência de D5 em sedimentos de rios e lagos, lodo, ar, ambientes de água doce, águas residuais, água do mar, poeira e em tecidos humanos e de outros animais (Xu *et al.* 2015; Krogseth *et al.* 2013; Hanssen *et al.* 2013; Sanchis *et al.* 2013; Tran e Kannan 2015; Tran *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2011; Lu *et al.* 2011; Wang *et al.* 2013).

As concentrações de D5 detectadas variam de acordo com o ambiente ao qual é amostrado. No ar o D5 já foi detectado na faixa de concentração de 0,19-1,3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de ar; em águas superficiais <0,02-1,6 $\mu\text{g}/\text{L}$, água doce <0,01-1,48 $\mu\text{g}/\text{L}$; 27.000-50.000 ng/g por peso drenado de lodo após tratamento de esgoto e <2-2.000 ng/g de peso drenado de sedimentos (Greve *et al.*, 2014). Baseado nestas concentrações detectadas em matrizes ambientais (concentrações ambientalmente realistas), os estudos de ecotoxicologia têm voltado a atenção para a avaliação dos possíveis efeitos adversos causados pelo D5 no meio ambiente, principalmente em ambientes aquáticos (Parrott *et al.*, 2013; Xue *et al.*, 2019). O tempo de meia-vida do D5 no ar, água, solo e sedimento, em dias, é de 6,90, 70,4 (em pH 7 a 25 °C), 12,6 e 3.100, respectivamente (Mackay *et al.*, 2015), o que contribui para a identificação desse siloxano no ambiente.

Apresentando um coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) de 8,09, o D5 possui um alto potencial para bioacumulação (Greve *et al.*, 2014; Gobas *et al.*, 2015). Estudos têm comprovado a bioacumulação do D5 em tecidos biológicos e apontado para o seu potencial de biomagnificação através da cadeia trófica, como observado nos estudos de Cui *et al.* (2019) e Xue *et al.* (2019) a partir da exposição de pequenos crustáceos, que fazem parte da dieta de organismos superiores (zooplâncton-crustáceos-peixe-pássaro).

Devido sua capacidade de bioacumulação e persistência no meio ambiente, em 2018 a União Europeia (EU) determinou a limitação do uso de D5, assim como do siloxano D4, em produtos de cuidados pessoais. Esta medida foi tomada devido a detecção frequente desses compostos e possíveis efeitos adversos no meio ambiente, uma vez que esses siloxanos acabam alcançando o ambiente principalmente através do descarte contínuo de PCPs, os quais levam esses compostos em suas formulações (EU, 2018).

1.1.1.2 Toxicidade do D5

A Dose Letal 50% (DL50) de D5 para toxicidade aguda oral em ratos é de >5.000 mg/Kg (D5, 2017). Dados de estudos experimentais disponíveis na literatura indicam que esse composto foi capaz de induzir um aumento da incidência de adenocarcinoma endometrial em fêmeas de rato *Fischer* 344 (F344), expostas por 24 meses (via inalatória). Ainda, a administração oral de D5 em doses de 100, 400 e 1.600 mg/Kg por peso corpóreo (p/c), resultou em aumento do fígado de fêmeas de rato *Sprague-Dawley*. A mesma alteração foi observada na exposição inalatória (160 ppm) (Klaunig *et al.*, 2016).

Em relação a metabolização, é assumido que a exposição ao D5 induz enzimas de metabolização hepática, mecanismo semelhante à indução enzimática pelo fenobarbital (Zhang *et al.* 2000). Sabe-se também que, ambos D4 e D5 induzem a atividade de enzimas da família P450 do fígado, o que justifica o aumento do órgão (EA, 2009), além da expressão de CAR (do inglês *constitutive androstane receptor*) em roedores, indicando que ambos os compostos interagem potencialmente com vias metabólicas de xenobióticos (Johnson *et al.*, 2011). Em adição, o Comitê Científico de Segurança do Consumidor (SCCS) considerou o fígado como um órgão-alvo potencial após exposição oral de dose repetida, e fígado, pulmões e útero como órgãos-alvo potenciais após exposição por inalação de dose repetida em frango (Bernauer *et al.*, 2016; Rousselle *et al.*, 2017). Parâmetros bioquímicos também mostraram alterações após exposição ao D5, tais como diminuição da concentração de ureia, aumento do colesterol, aumento dos triglicerídeos, aumento da proteína total e aumento da gama-glutamyltransferase (Bernauer *et al.*, 2016).

Em relação a genotoxicidade e mutagenicidade do D5, dados de ensaios *in vivo* com ratos Fischer (expostos a 7 dias por 6 horas a 160 parte por milhão (ppm) de D5 por via inalatória), e ensaios *in vitro* utilizando *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* ou então células de linfoma de camundongo L5178Y, não detectaram danos no DNA, nem aberrações cromossômicas (Bernauer *et al.*, 2016).

Estudos de avaliação do risco ambiental conduzidos pela *Environment Canada* indicaram que o D5 é persistente no meio ambiente e pode causar efeitos ecologicamente prejudiciais (ECHC, 2008). No entanto, os dados sobre o mecanismo de toxicidade do D5 em organismos aquáticos são escassos e pouco explorados. Em peixes, truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a Concentração Letal Média 50% (CL50) foi estabelecida em 0,016 mg/L em 96 horas e a toxicidade crônica, definida pela Concentração de Efeito Não Observado (NOEC), também para truta-arco-íris, foi 0,014 mg/L em 90 dias (EC, 2018). Estudos de toxicidade aquática com D5 apontam que, as concentrações abaixo de sua solubilidade em água (17 µg/L), parecem não estar associadas a efeitos adversos em peixes ou a outros organismos aquáticos (Fairbrother *et al.*, 2015). No entanto, o número limitado de espécies utilizadas nesses estudos, nos faz questionar sobre a sensibilidade dessas espécies em relação a outros modelos experimentais, tal como o zebrafish, e também ao uso de novos métodos de avaliação da toxicidade, a exemplo da OECD TG236 (FET test) (OECD, 2013). Um estudo com embriões e larvas de zebrafish expostos a amostras de água coletadas no rio Washington Navy Yard em 0 a 30 dpf (dias após a fertilização) na presença de 13 contaminantes, incluindo D5 e derivados de hormônios, mostraram alterações no crescimento e comportamento de natação (Wilken *et al.*, 2020). No entanto, para este estudo, a avaliação isolada dos efeitos dos contaminantes não foi realizada.

Farasani *et al.* (2016) observaram que o D5 induziu uma diminuição na quantidade de mRNA de BRCA1, gene pertencente à família de supressores tumorais (Venkitaraman, 2001), em cultura de células epiteliais (MCF10F) expostas a 10^{-5} M por uma semana. O mesmo estudo mostrou ainda que a exposição ao D5 na mesma concentração foi capaz de diminuir a quantidade de proteína BRCA1, por *Western immunoblot*, após 30 dias de exposição (Farasani *et al.*, 2015).

Devido ao uso frequente de produtos contendo D5 em suas formulações (xampus, condicionadores de cabelo, desodorantes aerossóis, loções, maquiagens etc.), estima-se que a taxa de exposição diária de mulheres com idade de 19–25 ao D5 seja de 0,39 a 81,800 µg/g de produto utilizado contendo D5 na sua formulação (Horii, Kannan, 2008; Bernauer *et al.*, 2016). Em adição, o uso de cosméticos e PCPs, em estimativas realistas, sugere uma exposição de 1.261-3.188 µg/dia de D5 para crianças e 1.563-1.875 µg/dia para adultos (Mojsiewicz-Pienkowska, Krenczkowska, 2018). Ainda, de acordo com a revisão de Mojsiewicz-Pienkowska, Krenczkowska (2018), é esperado que, devido a esta exposição, efeitos como mudanças na conformação de proteínas, desregulação do sistema imune e

endócrino, aumento de enzimas hepáticas, além da irritação do trato respiratório e migração e bioacumulação em tecidos ocorram em humanos à longo prazo.

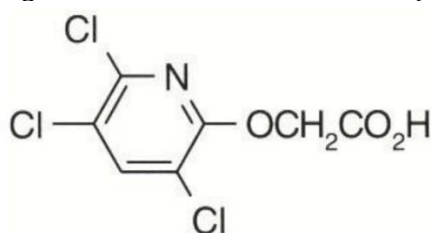
Em 2016, o Comitê Científico de Segurança do Consumidor (SCCS) emitiu uma opinião, baseada em estudos de toxicidade prévios, onde apontou que os compostos D4 e D5 não oferecem riscos para humanos expostos nas concentrações usuais em PCPs (119 mg/Kg p/c de produtos aplicados dermicamente e 69 mg/Kg p/c de inalação). No entanto, o comitê ressalta a exceção para o uso em formulações de loção corporal e cabelo e de produtos que podem levar à exposição pulmonar por inalação, por exemplo, aerossóis, *sprays* pressurizados e pó (Bernauer *et al.*, 2016; Rousselle *et al.*, 2017).

1.1.2 Triclopir

Herbicidas são amplamente utilizados na agricultura para prevenir o crescimento de plantas indesejadas na lavoura. Embora sejam desenvolvidos para afetar as plantas indesejadas, os herbicidas podem afetar organismos não-alvo, como insetos, peixes, roedores e humanos (Colborn *et al.*, 1999; Bernardes *et al.*, 2015).

No Brasil, de acordo com a ANVISA o herbicida triclopir (ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiniloxiacético) (figura 3) é indicado no combate de plantas infestantes nas culturas de arroz, eucalipto, milho, pastagens e soja (ANVISA, 2020). As principais características físico-químicas do triclopir estão sumarizadas no quadro 2.

Figura 3. Estrutura molecular do triclopir



Fonte: ANVISA, 2020.

Quadro 2. Propriedades físico-químicas do triclopir.

Nome	Fórmula molecular	Peso molecular	Solubilidade em água	log K _{ow}	Número CAS
Triclopir; [(3,5,6-tricloro-2-piridinil) oxi] acético	C ₇ H ₄ Cl ₃ NO ₃	256,5	430 mg/L a 25 °C	0.42 (pH 5), -0.45 (pH 7), -0.96 (pH 9)	55335-06-3

Fonte: Cessna *et al.*, 2002.

O triclopir faz parte do grupo químico ácido piridiniloxialcanóico e é classificado como um mimetizador do hormônio vegetal auxina (Holmes *et al.*, 1994). O mecanismo de

ação desses compostos, no combate às plantas indesejadas (erva-daninhas) é bem caracterizado, estando envolvido no metabolismo de ácidos nucleicos e plasticidade da parede celular; ainda se aceita que possam causar acidificação da parede celular por estímulo da atividade da bomba de prótons ATPase, ligada à membrana celular (Ahrens, 1994).

Além de sua formulação como ácido, o triclopir apresenta outras duas formulações, o éster de triclopir butoxietil (TBEE) e o sal de triclopir trietilamina (TEA) (Cessna *et al.*, 2002; Bartels *et al.*, 2020). Tanto o triclopir em forma de ácido, quanto em forma de sal e éster, são utilizados como ingredientes ativos em formulações de herbicidas de grande importância comercial, comumente usados para o controle de ervas daninhas. Dentre os herbicidas popularmente conhecidos e já estudados estão o Garlon[®] 3 (TEA), Garlon[®] 4 (TBEE) e Renovate[®] (TEA) (Wan *et al.* 1987; Servizi *et al.* 1987; Stehr *et al.*, 2009).

O triclopir pode ser transportado além do local onde foi aplicado através da água, ar e movimento do solo (preparação para o plantio). A água transporta os herbicidas para fora do local aplicado por meio da lixiviação desses produtos dissolvidos através do solo para águas subterrâneas, escoamento superficial de herbicidas dissolvidos e fixados no solo (Kegley *et al.*, 2010).

O triclopir é considerado moderadamente persistente no ambiente, com tempo de meia vida entre 11-100 dias em climas temperados e de 365-720 dias em climas frios (Kegley *et al.*, 2010). Em contraste com a degradação por hidrólise de suas formulações parentais, TBEE e TEA, que ocorre dentro de horas e até em poucos dias, a degradação do ácido de triclopir pode ocorrer durante um período de 30 dias em pH 5, 7 e 9 (Cleveland, Rolbrook, 1991) ou por períodos superiores a 200 dias em temperatura de 35°C em pH variando de 4,5-8,5 (Szeto, 1993). Por outro lado, a fotodegradação é o principal meio de transformação do triclopir na água. As formulações TEA e TBEE são rapidamente convertidas em ácido de triclopir por fotólise na água em 29-142 dias (McCall, Gavit, 1986; Solomon *et al.*, 1988). Desta forma, concluiu-se que o ácido triclopir precisa ser considerado para estudos de impacto ambiental, uma vez que esse composto também tem sido identificado tanto em águas naturais quanto em sedimentos (McCall *et al.* 1988; Szeto 1993; Petty, Gardner 1993; Thompson *et al.* 1995).

Tanto no solo, quanto na água, o triclopir é degradado através de processos aeróbicos e anaeróbicos e como produto dessa degradação é gerado dois compostos: o 3,5,6-tricloro-2-metoxipiridina (TMP) e 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), com tempo de meia vida variando entre 12-229 dias e 50-450 dias, respectivamente. Desta forma, é possível concluir que, estes produtos de degradação são mais persistentes que a molécula parental em forma de ácido de triclopir (Kegley *et al.*, 2010).

O triclopir é considerado um problema ambiental devido ao seu uso constante e crescente, ao descarte incorreto, à detecção de altas concentrações no meio ambiente, e à lixiviação, além da dispersão aérea proveniente da atividade agrícola. Este tipo de contaminação pode representar riscos à saúde do meio ambiente e para saúde humana, principalmente na Europa e América do Sul, mais precisamente no Brasil, onde o triclopir é muito utilizado (Bernardes *et al.*, 2015; Guilherme *et al.*, 2015).

1.1.2.1 Toxicidade do triclopir

Pouco se sabe sobre o mecanismo de toxicidade do triclopir em humanos. No entanto, o triclopir apresenta toxicidade moderada em ratos, com DL50 oral de 630-729 mg/Kg (Guilherme *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). Ainda, o triclopir apresenta baixa taxa de absorção e rápida eliminação através da urina (Timchalk *et al.*, 1997; Carmichael *et al.*, 1989). Dentre os danos induzidos pela sua exposição já descritos podemos citar neurotoxicidade, observada pela diminuição de viabilidade de células neuronais primárias de camundongos C57BL/6 (Reddy *et al.*, 2011). Kreutzweiser *et al.* (1994) mostraram que há uma chance significativa de efeitos letais agudos em peixes expostos a baixos níveis de resíduos de triclopir por mais de seis horas. Além disso, efeitos letais tardios foram observados em peixes expostos as concentrações de 0,08 e 0,32 $\mu\text{mol/L}^{-1}$ por um curto período (1 e 3 dias) (Kreutzweiser *et al.* 1994). Também, já foi evidenciada sua genotoxicidade e interferência no desenvolvimento embrionário de zebrafish e enguias (*Anguilla anguilla* L.), provocada tanto pela formulação comercial Garlon® quanto pelo princípio ativo (Guilherme *et al.*, 2015; Suvarchala *et al.*, 2016)

Em humanos a exposição ao triclopir pode ocorrer através das vias dérmica, inalatória e oral. Através da pele, o triclopir é absorvido lentamente e passa a ser excretado na urina em quantidades decrescentes por até quatro dias. Por sua vez, o potencial da exposição inalatória é considerado baixo, devido à baixa pressão de vapor do triclopir ($<1 \times 10^{-8}$ mm Hg (25 °C)). Já a exposição oral pode ocorrer durante o consumo de água e alimentos contaminados com resíduos de triclopir (MMWDVMP, 2010).

O ácido triclopir é prontamente absorvido pelo trato gastrointestinal após exposição oral. Este mesmo composto tem depuração plasmática de 0,92 mL/min-Kg, e é eliminado em 4,5 horas principalmente na urina (Dow Elanco, 1992; Dryzga *et al.*, 1994). Estudos com voluntários humanos mostraram que entre 80-84% do triclopir administrado pelas vias oral e dérmica foi excretado de forma inalterada pela urina, e entre 1-2% excretado em forma do metabólito TCP (Bartels *et al.*, 2020).

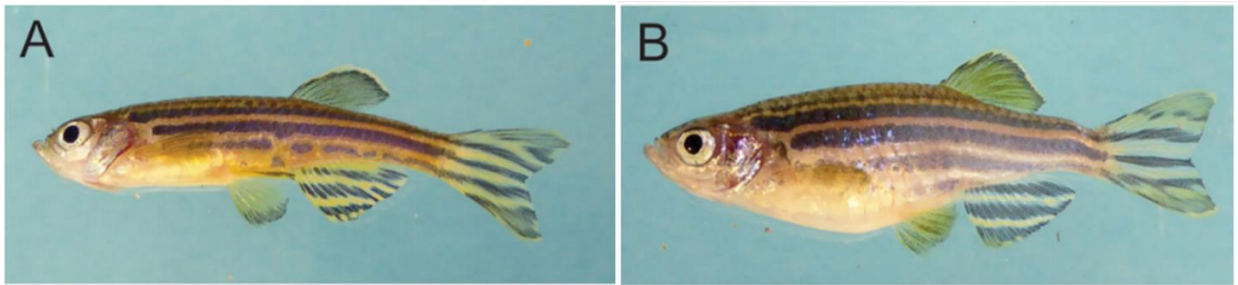
A toxicocinética e o metabolismo do triclopir em mamíferos (cães, ratos, camundongos e coelhos) têm sido amplamente investigados. O rim é o órgão alvo reconhecido para o triclopir e os efeitos renais são os efeitos toxicológicos mais sensíveis (ou seja, aqueles que conduzem a avaliação de risco para a saúde humana) em todas as espécies (Bartels *et al.*, 2020).

O triclopir é conhecido por ser moderadamente tóxico para peixes, anfíbios e invertebrados aquáticos (Wan *et al.* 1987; Servizi *et al.* 1987). Efeitos como letargia, sobre o salmão prateado foram observados em baixas concentrações de triclopir (0,24-0,23 mg/L). Além disso, o triclopir induziu a redução da sobrevivência de embriões e larvas de peixes fathead minnow (*Pimephales promelas Rafinesque*) na concentração de 178 mg/L de forma significativa (Johanson, Geen 1990). Por outro lado, o triclopir (TEA) e as formulações de Garlon® 3 e Renovate®, na faixa de concentração entre 0,003 mg/L e 10 mg/L não demonstraram mortalidade e nem alterações morfológicas de forma significativa em larvas de zebrafish em até 5 dias pós fertilização (dpf), em exposição semi-estática (Sther *et al.*, 2009).

1.2 Zebrafish como modelo experimental em pesquisa toxicológica

Originário da Ásia, o *Danio rerio*, pertencente à família *Cyprinidae*, popularmente conhecido como zebrafish, é um peixe teleósteo bentopelágico de água doce de até 5 cm de comprimento quando adulto. O zebrafish é comumente encontrado nas regiões de águas calmas e rasas do Nepal, sudoeste da Ásia, compreendendo Índia e Bangladesh, norte do Himalaia e sul de Karnataka (Engeszer *et al.*, 2007).

O zebrafish apresenta características fenotípicas distintas em relação ao seu sexo. Eventualmente, machos e fêmeas podem ser distinguidos pela forma e cor do corpo (Nasiadka *et al.*, 2012). Os machos têm uma barriga mais lisa (Figura 5A), enquanto as fêmeas mostram uma barriga mais cheia, arredondada e prateada (Figura 5B) (Nasiadka *et al.*, 2012; Goodwin *et al.*, 2016; Meyers, 2018). Além disso, os machos também exibem uma tonalidade dourada entre as listras azuis ao longo de seu corpo, principalmente nas nadadeiras anal e caudal. As listras azuis nas fêmeas são alternadas com listras prateadas, e sua nadadeira dorsal mostra um tom amarelo mais forte (Nasiadka *et al.*, 2012).

Figura 5. Zebrafish macho e fêmea adultos

Legenda: (A) Zebrafish macho apresentando listras características e barbatanas curtas. O macho apresenta uma barriga mais lisa e coloração mais marcante que a fêmea. (B) Zebrafish fêmea também apresentando listras características e barbatanas curtas, além de uma barriga mais redonda. Geralmente as fêmeas são notavelmente maiores que os machos.

Fonte: Adaptado de Meyers, 2018.

Em relação a outras espécies de peixes, vários motivos fazem do zebrafish um modelo experimental atrativo, como a alta produtividade de ovos durante todo o ano, atingindo em média 200 ovos por casal em um único acasalamento (Figura 6). Além disso, a fecundação dos ovos e o desenvolvimento embrionário ocorrerem fora do ventre materno, também pelo fato de os embriões e larvas serem transparentes, o que possibilita o acompanhamento de seu desenvolvimento por horas e até dias pós fertilização (dpf) (Garcia *et al.*, 2016; Kimmel *et al.*, 1995).

Figura 6. Acasalamento de zebrafish

Legenda: Zebrafish machos e fêmea alocados separadamente em aquário próprio para acasalamento. O acasalamento ocorre entre a fêmea e apenas um dos machos, após disputa entre eles pela fêmea.

Fonte: Próprio autor.

A introdução do zebrafish como organismo modelo em laboratórios de todo o mundo se deu a partir trabalho pioneiro de George Streisinger, professor do Instituto de Biologia Molecular da Universidade de Oregon, através de suas pesquisas sobre as bases genéticas do desenvolvimento neural de vertebrados (Traver *et al.*, 2020). Desde então o zebrafish tem se destacado como modelo experimental em pesquisas científicas das mais diversas áreas como biologia, genética e biotecnologia, fisiologia, farmacologia, imunologia, medicina e principalmente na grande área da toxicologia (Hill *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2021).

Embora os modelos experimentais tradicionais como mamíferos (roedores), ainda sejam considerados padrão ouro para o estudo da toxicidade e avaliação do risco de substâncias químicas para humanos, o zebrafish apresenta inúmeras vantagens quanto a sua utilização para os mesmos fins (Bruni *et al.*, 2014). Além disso, seu tamanho pequeno, alta taxa de produtividade, fácil manuseio, também a possibilidade de sua criação em locais pequenos (Figura 7), fazem com que os custos de manutenção sejam relativamente mais baixos, quando comparado com estes modelos mais tradicionais (Goodwin *et al.*, 2016; Graham *et al.*, 2018).

Figura 7. Biotério de criação, manutenção e experimentação com zebrafish



Fonte: Próprio autor.

Geneticamente, o zebrafish possui 70% de genes homólogos ao do genoma humano (Howe *et al.*, 2013). Além disso, o desenvolvimento assim como a função dos sistemas cardiovascular, nervoso e digestivo neste modelo é similar ao de mamíferos (Garcia *et al.*, 2016; Balasubramanian *et al.*, 2019). Em adição, o zebrafish apresenta 84% de genes ortólogos para doenças humanas, o que sustenta seu emprego como modelo experimental para o estudo dos mecanismos de doenças, como por exemplo, doença de Parkinson, doenças inflamatórias intestinais, doenças metabólicas e até o câncer (Bugel *et al.*, 2014).

Com perfil metabólico bem conservado e semelhante ao de humanos e outros mamíferos, o zebrafish tem assumido um papel essencial em pesquisas com foco no metabolismo de xenobióticos de interesse toxicológico (Anselmo *et al.*, 2018; Horzmann *et al.*, 2018). Devido à complexidade fisiológica, desenvolvimento singular e sua adequação

em testes *in vitro*, o zebrafish tem possibilitado a compreensão do mecanismo de toxicidade de substâncias através do emprego de métodos alternativos bem consolidados, como os propostos pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) (OECD, 2013; Kawakami *et al.*, 2016; Sobanska *et al.*, 2018).

Na toxicologia aquática, o zebrafish têm espaço bem estabelecido como organismo modelo, principalmente para a pesquisa da toxicidade de CPEs na água e seus possíveis efeitos no meio ambiente. Sendo assim, cada vez mais, estudos sobre CPEs, tais como praguicidas, fármacos, metais pesados, micro e nanoplásticos têm utilizado do zebrafish como um método alternativo para a avaliação do risco (Horzmann *et al.*, 2018; Alestrom *et al.*, 2019).

O zebrafish também se destaca por sua notável versatilidade no emprego de metodologias, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. As avaliações toxicológicas aplicadas neste modelo experimental se baseiam geralmente em abordagens como toxicidade do desenvolvimento, imunotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, neurotoxicidade e alterações comportamentais, toxicidade reprodutiva, desregulação endócrina, além de estresse oxidativo e alterações metabólicas (Hill *et al.*, 2005; Gonçalves *et al.*, 2020). Como resultado, a utilização de zebrafish, assim como o número de publicações envolvendo este modelo experimental, tem mostrado um aumento exponencial na última década (Cassar *et al.*, 2020).

A diretiva europeia 2010/63/EU sobre a proteção de animais usados para fins científicos é clara quanto a proteção de fases larvais de zebrafish. Sendo assim, larvas de zebrafish que passam a se alimentar de forma independente, ou seja, nadando em busca de alimento, são consideradas animais e passam a ser protegidas pela atual diretiva e ainda, necessitam de autorização prévia por órgãos responsáveis, como o CEUA no Brasil, para a sua utilização em pesquisas científicas. No entanto, a mesma diretiva considera que, as larvas que não alcançaram a alimentação independente, ou seja, que dependem do conteúdo de seu saco vitelínico como fonte de nutrição, não necessitam de proteção ou até mesmo não exigem regulamentação para sua utilização (Directive, 2010/63/EU; Scholz *et al.*, 2008; Teixidó *et al.*, 2013).

Devido a razões éticas, e baseados na diretiva europeia citada anteriormente, os testes com embriões de zebrafish têm sido propostos como uma alternativa aos experimentos com animais adultos (Nagel, 2002; Scholz *et al.*, 2008; Domingues *et al.*, 2010; Teixidó *et al.*, 2013). Além disso, a consolidação do zebrafish como modelo experimental vertebrado em pesquisa é sustentada até os dias atuais devido ao fato deste animal possuir características físicas e biológicas que o enquadra aos princípios dos 3Rs (do inglês *Reduce*, *Replace* e

Refinement) Redução, Substituição e Refinamento no uso de animais de pesquisa (Russel *et al.*, 1992; Cazarin *et al.*, 2004; Kirk *et al.*, 2018).

Os princípios dos 3Rs foram estabelecidos por Russel e Burch (1992) e hoje é uma tendência mundial, uma vez que associa o bem-estar animal a práticas laboratoriais mais refinadas. Sendo assim, a utilização de modelos, como zebrafish, que permitam um *screening* para a identificação do efeito de relevância e para posterior investigação com outro modelo animal são exemplos práticos da aplicação dos conceitos dos 3Rs.

1.3 Ensaios de toxicidade com zebrafish

1.3.1 Teste de toxicidade aguda em embrião de peixe (teste FET)

Publicado em 2013 pela OECD, o protocolo do teste de toxicidade aguda com embrião de peixe (OECD Test Guideline no. 236) é um guia para determinar a toxicidade aguda de substâncias químicas em estágios embrionários de zebrafish (OECD, 2013). A princípio, este protocolo foi proposto como um método alternativo à utilização de peixes adultos para testes de toxicidade aguda (por exemplo, OECD TG203, de 1992) (Braunbeck *et al.*, 2015).

De acordo com o procedimento especificado pelo protocolo OECD TG236, embriões de zebrafish recém fertilizados são expostos à substância química a ser testada por até 96 horas. Ao longo do teste, quatro observações apicais são registradas como indicadores de letalidade a cada 24 horas, sendo estas: coagulação dos ovos fertilizados, falta de formação de somitos, falta de destacamento da cauda do saco vitelino e ausência de batimento cardíaco (OECD, 2013) (Braunbeck *et al.* 2005; Knöbel *et al.* 2012; Nagel, 2002). Além dos efeitos letais, adicionalmente são considerados outros critérios de observação como efeitos subletais e teratogênicos. Nagel *et al.* (2002) sugere integração de

No final do período de exposição, a toxicidade aguda é determinada com base em um resultado positivo em qualquer uma das quatro observações apicais registradas, e a Concentração Letal capaz de causar a morte de 50% da população exposta (CL50) é então calculada. Além disso, o protocolo OECD TG236 estabelece critérios para a validação de seus resultados, como, por exemplo, o uso de controles negativos e positivos, e a necessária qualidade das matrizes e embriões do zebrafish, e dos padrões das substâncias e materiais a serem utilizados no ensaio (OECD, 2013). Este teste tem sido incluído na rotina laboratorial para a avaliação da toxicidade aguda de uma ampla gama de outros produtos químicos presentes no ambiente aquático. Aqui podemos destacar, a avaliação da toxicidade aguda de efluentes para fins regulatórios (Busquet *et al.*, 2014); nanomateriais (Pereira *et al.*, 2019);

nano e microplásticos e seus potenciais como carreadores de contaminantes ambientais (Cormier *et al.*, 2019; Bhagat *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020).

De acordo com Lilicrap *et al.* (2016), além de seu uso na análise de toxicidade aguda, o ensaio FET fornece embasamento para o desenvolvimento de vias de desfechos adversos (Adverse Outcome Pathways, AOPs), devido a atividade de aproximadamente 90% do genoma durante a sua embriogênese. Uma vez que os estágios iniciais de vida do zebrafish podem ser mais sensíveis aos contaminantes do que os adultos (Vitor *et al.*, 2010), seu uso em avaliações do modo de ação (MoA) também pode aumentar as previsões de efeitos ecotoxicológicos crônicos (modulação imunológica, inflamações, desregulação endócrina, genotoxicidade) em peixes (Scholz *et al.*, 2008).

Embora seja um teste alternativo de alto rendimento e ainda com a capacidade de trazer respostas rápidas quanto a toxicidade de substâncias químicas, o teste FET nos impõe certas limitações. Características físico-químicas, tais como o peso molecular das substâncias a serem avaliadas deve ser levado em consideração, uma vez que o córion do embrião de zebrafish possui poros com aproximadamente 0,5 µm de diâmetro com um espaçamento de 2 µm (Cheng *et al.* 2007), o que delimita e impede a entrada de substâncias com peso molecular acima de 3 kDa. Nestes casos, o córion acaba por retardar a exposição do embrião à substância até o momento da sua eclosão (48-72hpf). Outra limitação em relação à utilização de substâncias químicas, é a evidência de que algumas substâncias com ações neurotóxicas são menos tóxicas para embriões do que para peixes adultos (Scholz *et al.*, 2008; Braunbeck *et al.*, 2015).

Inicialmente proposto como método toxicológico alternativo ao uso de peixes adultos, como o protocolo OECD TG203 (2019), o teste FET apresenta grande potencial para sua aplicação em toxicologia regulatória. Desde sua implementação, tem se observado uma gradual adesão do teste FET dentro do contexto regulatório, resultado da associação entre um modelo robusto com um método alternativo de alto rendimento. Por exemplo, em países como a Alemanha o uso de embriões de zebrafish tem sido aplicado para a testagem de efluentes (Braunbeck *et al.*, 2015). Infelizmente, no Brasil ainda não há por parte de qualquer agência reguladora, como ANVISA e IBAMA, a integração do uso de zebrafish em seus relatórios regulatórios. Isto porque, embora seja um teste preditivo e bastante eficiente, algumas adequações ainda são necessárias para sua harmonização e ampliação de uso (Hellfeld *et al.*, 2020).

1.3.2. Acetilcolinesterase (AChE) como biomarcador de toxicidade em embriões de zebrafish

A acetilcolinesterase (AChE) é uma esterase do sistema colinérgico responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). Durante a sinapse colinérgica é liberado na fenda sináptica o neurotransmissor ACh pelo neurônio pré-sináptico. Por sua vez, a ACh se liga a seus receptores colinérgicos (AChR), presentes nos neurônios pós-sinápticos, onde desempenha sua função propagando o estímulo nervoso. Na fenda sináptica, a ACh é prontamente hidrolisada pela AChE. Como resultado da hidrólise da ACh são gerados dois produtos, o ácido acético e colina, que é posteriormente recaptada pelo neurônio pré-sináptico para a síntese de novas moléculas de ACh. Desta forma, a reação catalítica da AChE permite o retorno do neurônio colinérgico ao estado de repouso após a sua ativação (Araújo *et al.*, 2016).

A AChE está distribuída em todo o sistema nervoso central (SNC), sistema nervoso periférico (SNP) e está presente em hemácias (Araújo *et al.*, 2016). A inibição da AChE leva ao acúmulo do neurotransmissor ACh na fenda sináptica, atingindo concentrações tóxicas e causando hiperestimulação dos receptores e um bloqueio na despolarização dos receptores da junção neuromuscular no neurônio pós-sináptico (Fukuto, 1990) e, portanto, à ativação da transdução de sinal através das sinapses colinérgicas (Fulton *et al.*, 2001; Russom *et al.*, 2014). Esse processo pode levar a vários efeitos tóxicos, tais como miose, hipersecreções, depressão respiratória, convulsões e, em alguns casos, morte. Este mecanismo de ação tóxico é classicamente observado nas intoxicações por praguicidas organofosforados, carbamatos e alguns piretróides (Fulton *et al.*, 2001; Russom *et al.* 2014; Parlak *et al.*, 2018), resultante da inibição da AChE pela fosforilação de um resíduo catalítico de serina (Fukuto, 1990).

A acetilcolinesterase é um importante biomarcador para a avaliação da toxicidade de contaminantes ambientais (Rico *et al.*, 2006; Senger *et al.*, 2006). O zebrafish tem sido utilizado como modelo vertebrado experimental para o estudo da neurotoxicidade dos contaminantes, como metais pesados e praguicidas, que podem envolver a atividade da AChE (Senger *et al.*, 2006; Küster *et al.*, 2007).

Em contraste com mamíferos, que possuem além do gene para AChE (ACHE, localizado no cromossomo 7q22) um outro gene para a enzima butirilcolinesterase (BChE), cuja atividade catalítica é semelhante ao da AChE, este pequeno teleósteo possui apenas o gene para a AChE (*ache*, cromossomo 7), responsável por toda a degradação da ACh. Além de bem conservado em zebrafish, este mesmo gene apresenta de 60% a 80% de similaridade com os genes responsáveis pela codificação da mesma esterase encontrada em mamíferos (Bertrand *et al.* 2001), fomentando a utilização do zebrafish como um organismo modelo

biomarcador de ecotoxicidade para análise da atividade da AChE. A expressão da AChE é detectada em todos os estágios de desenvolvimento do zebrafish, até mesmo antes das funções sinápticas (Bertrand *et al.*, 2001; Russom *et al.* 2014). No entanto, a avaliação da atividade desta esterase é possível de ser realizada, por exemplo, logo no período que compreende a formação de 5 a 7 somitos do desenvolvimento embrionário (Behra *et al.* 2002; Bertrand *et al.* 2001).

Em 1961, Ellman *et al.* (1961) desenvolveram um método colorimétrico rápido para a determinação da atividade da AChE em amostras biológicas. O princípio do método consiste na medição da taxa de produção de tiocolina a partir da hidrólise da Acetiltiocolina pela AChE. Isso é realizado pela reação contínua do tiol com o íon 5-5-ditiobis-2-nitrobenzoato para produzir o ânion amarelo do ácido 5 tio-2-nitro-benzóico. A taxa de produção de cor é então medida em um fotômetro. A reação com o tiol tem se mostrado suficientemente rápida para não ser limitante da taxa na medição da enzima e nas concentrações usadas não inibe a hidrólise enzimática (Araújo *et al.*, 2016).

2 OBJETIVOS

Esse projeto propõe a avaliação da embriotoxicidade induzida pelos contaminantes de preocupação emergentes triclopir e decametilciclopentasiloxano (D5), utilizando o zebrafish como organismo modelo. Para tanto, são propostos especificamente os seguintes objetivos:

- ✓ Avaliar se a exposição ao D5 ou ao triclopir provoca alterações no desenvolvimento embrionário e larval do zebrafish;
- ✓ Avaliar se a exposição ao D5 ou ao triclopir causa neurotoxicidade em larvas de zebrafish.

REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Índice Monográfico: Triclopir. [Internet]. 2020. [citado 20 Ago 2020]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/T28%2B%2BTriclopir.pdf/b24b997a-66fb-45c0-b43a-5060db498aa4>.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Regularization of Products – Pesticides: Reassessment of Pesticides [Internet]. Brasília; 2020. [citado 8 Jun 2020]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/28%2B%2Bprodutos/28%2B%2Bde-agrotoxicos#:~:text=Com%20%20reavalia%C3%A7%C3%A3o%20de%20agrot%C3%B3xicos,riscos%20relacionados%20%20agrot%C3%B3xicos%20com>

Ahrens WH. Herbicide Handbook. 7^a ed. Champaign, IL: Weed Science Society of America; 1994.

Alaee M, Gouin T. Cyclic volatile methyl siloxanes in the environment. Chemosphere 2013;93:709-710.

Alestrom P, D'Angelo L, Midtlyng PJ, Schorderet DF, Schulte-Merker S, Sohm F, *et al.* Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. Lab. Anim-UK 2019;1-12.

Anselmo CS, Sardela VF, Sousa VP, Pereira HMG. Zebrafish (*Danio Rerio*): A Valuable Tool for Predicting the Metabolism of Xenobiotics in Humans? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharm. 2018;212:34-46.

Araújo CRM, Santos VL, Gonsalves AA. Acetilcolinesterase – AchE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. Isso. Virtual Quim. 2016;8(6):1818-1834.

Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC). Panorama do setor. São Paulo: Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos; 2020. Disponível em: https://abihpec.org.br/site2019/wp-content/uploads/2020/09/Panorama_do_Setor_atualizado_setembro_2020.pdf. Acesso em: 09 out. 2020.

Balasubramanian S, Raghunath A, Peruma E. Role of Epigenetics in Zebrafish. Dev. Genes Evol. 2019;718:1440-49.

Bambino K, Chu J. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. Curr. Top. Dev. Biol. 2017;124:331-367.

Barceló D. Emerging organic contaminants and human health. 20^a ed. Barcelona: Springer; 2012.

Bartels M, Brown C, Chung G, Chan M, Terry C, Gehen S, Corvaro M. Review of the pharmacokinetics and metabolism of triclopyr herbicide in mammals: Impact on safety assessments. Regulatory Toxicology and Pharmacology 2020;116(104714).

Behra M, Cousin X, Bertrand C, Vonesch JL, Biellmann D, Chatonnet A, Strähle U. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. Nat Neurosci. 2002;5(2):111-118.

Bellato LR, Oliveira LA, Cupertino MC. Analysis of impacts on human health from exposure to organic environmental pollutants and endocrine interferents. Braz. J. Surg. Clin. Res. 2019;28(2):49-58.

Bernardes MFF, Pazin M, Pereira LC, Dorta DJ. Toxicology Studies - Cells, Drugs and Environment. In: Andreazza C. Toxicology Studies: Cells, Drugs and Environment. Impact of pesticides on Environmental and Human Health. Intech: 2015.

Bernauer U, Bodin L, Celleno L, Chaudhry Q, Coenraads P, *et al.* SCCS Opinion on Decamethylcyclopentasiloxane (cyclopentasiloxane, D5) in cosmetic products. 2016.

Bertrand C, Chatonnet A, Takke C, Yan Y, Postlethwait J, Toutant J, et al. Zebrafish Acetylcholinesterase Is Encoded by a Single Gene Localized on Linkage Group 7. *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276(1):464–474.

Bhagat J, Zang L, Nishimura N, Shimada Y. Zebrafish: Isso emerging model to study microplastic and nanoplastic toxicity. *Science of the Total Environment* 2020;728:1-11.

Borgå K, Ruus A. Quantifying Bioaccumulation in the Aquatic Environment. In: Kang YJ, editor. *Methods in Pharmacology and Toxicology*. Humana Press; 2019. P. 1-18.

Brasil. Ministério da Saúde. National Health Surveillance 30ândida30o Populations Exposed to Pesticides. Brasília (DF): Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador; 2018.

BRASIL. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS). Indicadores Brasileiros para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. Agenda 2030. 2020. Disponível em: <https://odsbrasil.gov.br/> Acesso em: 01/12/2020.

Braunbeck T, Boettcher M, Hollert H, Kosmehl T, Lammer E, Leist E, et al. Towards isso alternative for the acute fish LC50 test in 30ândida30 assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species—isso update. *Altex* 2005;22:87–102.

Braunbeck T, Kais B, Lammer E, Otte J, Schneider K, Stengel D, et al. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environ Sci Pollut Res* 2015;22:16247–16261.

Bravo JEB. Contaminantes Emergente isso el Agua. *Revista Digital Universitaria* 2009;10(8):1067-6079.

Brooke DN, Crookes MJ, Gray D, Robertson S. Environmental Risk Assessment Report: Decamethylcyclopentasiloxane. Environment Agency of England and Wales, Bristol. 2009.

Bruni G, Lakhani P, Kokel D. Discovering Novel Neuroactive Drugs Through High-Throughput Behavior-Based Chemical Screening in the Zebrafish. *Front. Pharmacol.* 2014;5:153.

Bugel SM, Tanguay RL, Planchart A. Zebrafish: A Marvel of high-throughputbiology for 21st century toxicology. *Curr. Envir. Health Rpt.* 2014;1:341-52.

Busquet F, Strecker R, Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck T, Carr GJ, et al. OECD validation study to assess intra- and inter-laboratoryreproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatotoxicity testing. *Egulatory Toxicology and Pharmacology* 2014;69:496–511.

Carmichael NG, Nolan R, Perkins JM, Davies R, Warrington SJ. Oral and dermal pharmacokinetics of triclopyr in human volunteers. *Hum. Toxicol.* 1989;8(6):431-437.

Cassar S, Adatto I, Freeman JL, Gamse JT, Iturria I, Lawrence C., et al. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 2020;33:95–118.

Cazarin KCC, Corrêa CL, Zambrone FAD. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2004;40(3):289-299.

Cessna AJ, Grovert R, Waite DT. Environmental Fate of Triclopyr. *Rev Environ Contam Toxicol* 2002;174:19-48.

Cheng J, Flahaut E, Cheng SH. Effect of 31ândida nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ Toxicol Chem* 2007;26:708–716.

Choi TY, Choi TI, Lee YR, Choe SK, Kim CH. Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Experimental & Molecular Medicine* 2021;53:310–317.

Cleveland CB, Holbrook DL (1991) A hydrolysis study of triclopyr. GH-C 2491. Dow Elanco, Indianapolis, IN.

Colborn T, Short P. Pesticide use in the U.S. and policy implications: A focus on herbicides. *Toxicol. Ind. Health* 1999;15:241-276.

Cormier B, Batel A, Cachot J, Bégout M, Braunbeck T, Cousin X. Multi-Laboratory Hazard Assessment of Contaminated Microplastic Particles by Means of Enhanced Fish Embryo Test With the Zebrafish (*Danio rerio*). *Front. Environ. Sci.* 2019;7.

Cui S, Fu Q, Um L, Yu T, Zhang F, Gao S. Trophic transfer of cyclic methyl siloxanes in the marine food web in the Bohai Sea, China. *Ecotox. Environ. Safe.* 2019;178:86–93.

Decamethylcyclopentasiloxane (D5) [editorial]. *Toxicol Ind Health.* 2017;33(1):16-27.

Directive 2010/63/EU of the European Parliament 31ândid the Council on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*, L276:33–79, September 22, 2010. Disponível em: link: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32010L0063:ISSO:HTML>.

Directive 2018/35/EU of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards octamethylcyclotetrasiloxane ('D4') and decamethylcyclopentasiloxane ('D5'). *Official Journal of the European Union*, L:6/45-47, January 10, 2018. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0035&from=EN>

Domingues I, Oliveira R, Lourenço J, Grisolia CK, Mendo S, Soares AMVM. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): comparison of responses in zebrafish 31ândi life stages and adults. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Toxicology & Pharmacology* 2010;152(3):338-345.

Dow Elanco. Triclopyr, triethylamine salt: pharmacokinetics and metabolism in male Fischer 344 rats. Dow Elanco Confidential Report;1992.

Dryzga MD, Stewart HS, Freshour NL, Timchalk C, Mikula KJ. Plasma kinetics and tissue distribution of 14C-labeled Triclopyr and Triclopyr-BEE in Fischer 344 rats. Dow Elanco. EPA MRDI No. 433941-01;1994.

Ellman GL, Courtney KD, Junior VA, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 1961;7:88-95.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) [Internet]. [citado 22 Ago 2020]. Disponível em: < <http://old.cnpqg.embrapa.br/32&ndida32o32s/doc/doc117/07herbicidas.html>

Engeszer RE, Patterson LB, Rao AA, Parichy DM. *Zebrafish* in the Wild: A Review of Natural History and New Notes From the Field. *Zebrafish* 2007;4(1):21-40.

Environment Agency (EA). Environmental Risk Assessment Report: Decamethylcyclopentasiloxane. Report SCHO0309BPQX-E-P; Environment Agency: Rotherham, U.K., 2009. Disponível em: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/290561/scho0309bpqx-ee.pdf.

Environment Canada and Health Canada (EHC). Screening assessment for the challenge: decamethylcyclopentasiloxane; 2008.

Environmental Protection Agency (EPA). Siloxanes (D3, D4, D5, D6, HMDS): Evaluation of health hazards and proposal of a health-based quality criterion for ambient air. 2014; Environmental Project No. 1531.

Escher MAS, Américo-Pinheiro JHP, Torres NH, Ferreira LFR. The environmental problem of contamination of water resources by pharmaceuticals. *RBCIAMB* 2019;51:141-148.

European Chemicals Agency (ECHA). Background Document to the Opinion on the Annex XV dossier proposing restrictions on Octamethylcyclotetrasiloxane (D4) and Decamethylcyclopentasiloxane (D5), 2016. Disponível em: <https://echa.europa.eu/documents/10162/23ca076a-9cd8-4baf-8b76-15a0b71ad869>. Annex B-I Disponível em: <https://echa.europa.eu/documents/10162/da76aba7-ab92-4201-9989-5a130f0a54aa>

European Commission (EC). Review of Regulation No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products with regard to substances with endocrine-disrupting properties [Internet]. 2018. [citado 31 Ago 2020]. Disponível em: <https://ec.europa.eu/transparency/regdoc/rep/1/2018/EN/COM-2018-739-F1-EN-MAIN-PART-1.PDF>.

Fairbrother A, Burton GA, Klaine SJ, Powell DE, Staples CA, Mihaich EM, Woodburn KB, Gobas FAPC. Characterization of ecological risks from environmental releases of decamethylcyclopentasiloxane (D5). *Environ. Toxicol. Chem.* 2015;34:2715-2722.

Farasani A, Darbre PD. Exposure to cyclic volatile methylsiloxanes (CVMS) causes anchorage-independent growth and reduction of BRCA1 in non-transformed human breast epithelial cells. *J. Appl. Toxicol.* 2016;37(4):454-61.

Fontenele EGP, Martins MRA, Quidute ARP, Júnior RMMJ. Environmental contaminants and endocrine disruptores. *Arq. Bras. Endocrinol Metab.* 2010;54(1): 6-16.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Pesticides indicators. [Internet]. [citado 12 Jun 2020]. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/isso/#data/EP>

Fukuto TR. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ Health Perspect* 1990;87:245–54.

Fulton MH, Key PB. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ Toxicol Chem.* 2001;20(1):37–45.

Garcia GR, Noyes PD, Tanguay RL. Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology. *Pharmacol. Therapeut.* 2016;161:11–21.

Geissen V, Mol H, Klumpp E, Umlauf G, Nada M, Ploeg M, et al. Emerging Pollutants in the environment: A challenge for water resource management. *Int. Soil Water Conse.* 2015;3(1):57-65.

Gobas FAPC, Powell DE, Woodburn KB, Springer T, Huggett DB. Bioaccumulation of decamethylpentacyclosiloxane (D5): A review. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2015;34(12):2703–2714.

Gogoi A, Mazumder P, Tyagi VK, Chaminda GGT, An AK, Kumar M. Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. *Groundw. Sustent. Dev.* 2018;6:169-180.

Gonçalves FSG, Souza TM, Vieira LR, Marchi FC, Nascimento AP, Farias DF. Toxicity testing of pesticides in zebrafish – a systematic review on chemicals and associated toxicological endpoints. *Environ. Sci. Pollut. R.* 2020;27:10185-10204.

Goodwin N, Karp NA, Blackledge S, Clark B, Keeble R, Kovacs C. Standardized Welfare Terms for the Zebrafish Community. *Zebrafish* 2016; 13(Suplemento 1).

Graham C, Keyserlingk MAG, Franks B. Zebrafish welfare: Natural history, social motivation and behaviour. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2018;200:13-22.

Greve K, Nielsen E, Ladefoged O. Division of Toxicology and Risk Assessment. National Food Institute, Technical University of Denmark. Siloxanes (D3, D4, D5, D6, HMDS): Evaluation of health hazards and proposal of a health-based quality criterion for ambient air. The Danish Environmental Protection Agency Strandgade 29 1401 Copenhagen K Denmark. Environmental Project No. 1531, 2014.

Guilherme S, Santos MA, Gaivão I, Pacheco M. Genotoxicity Evaluation of the Herbicide Garlon® and Its Active Ingredient (Triclopyr) in Fish (*Anguilla anguilla* L.) Using the Comet Assay. *Environ. Toxicol.* 2015;30(9):1073-1081.

Gupta S, Gupta K. Bioaccumulation of Pesticides and Its Impact on Biological Systems. In: Srivastava PK, Singh VP, Singh A, Tripathi DK, Singh S, Prasad SM, Chauhan DK, 33^ª edição. *Pesticides in Crop Production: Physiological and Biochemical Action*. Wiley; 2020. P. 55-67.

Hanssen L, Warner NA, Braathen T, Odland J, Lund E, Nieboer E, et al. Plasma concentrations of cyclic volatile methylsiloxanes (cVMS) in pregnant and postmenopausal Norwegian women and self-reported use of personal care products (PCPs). *Environ Int* 2013;51:82–87.

Hazardous Substances Data Bank (HSDB) [Internet]. 2005. [citado 2 Abr 2020]. Disponível em: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>.

Hellfeld R, Brotzmann K, Baumann L, Strecker R, Braunbeck T. Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ Sci Eur* 2020;32:122.

Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicol. Sci.* 2005;86(1):6-19.

Holmes SB, Thompson DG, Wainio-Keiser KL, Capell SS, Staznik B. Effects of lethal and sublethal concentrations of the herbicide, triclopyr butoxyethyl ester, in the diet of zebra finches. *J. Wildlife Dis.* 1994;30(3):319-327.

Horii Y, Kannan K. Survey of organosiloxane compounds, including cyclic and linear siloxanes, in personal-care and household products. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2008;55:701-710.

Horzmann KA, Freeman JL. Making Waves: New Developments in Toxicology With the Zebrafish. *Toxicol. Sci.* 2018; 163 (1): 5-12.

Howard PH, Muir DCG. Identifying new persistent and bioaccumulative organics among chemicals in commerce. *Environ. Sci. Technol.* 2010;44:2277-2285.

Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 2013;496:498–503.

Johansen JA, Geen GH. Sublethal and acute toxicity of the ethylene glycol butyl ether ester formulation of triclopyr to juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Arch Environ Contam Toxicol* 1990;19:610-616.

Johnson WJ, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebleret DC. Safety Assessment of Cyclomethicone, Cyclotetrasiloxane, Cyclopentasiloxane, Cyclohexasiloxane, and Cycloheptasiloxane. *Int. J. Toxicol.* 2011;30(Suplemento 3):149S-227S.

Juliano C, Magrini GA. Cosmetic Ingredients as Emerging Pollutants of Environmental and Health Concern. A Mini-Review. *Cosmetics.* 2017;4(11).

Kawakami K, Patton EE, Orger M. Zebrafish Methods and Protocols 2^a ed. New York: Humana Press; 2016.

Kegley S, Conlisk E, Mose M. Marin Municipal Water District. Herbicide Risk Assessment. 2010.

Kent D, Fackler P, Hartley D, Hobson J. Interpretation of data from nonstandard studies: the fate of octamethylcyclotetrasiloxane in a sediment/ water microcosm system. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 1996;11:145–149.

Kierkegaard A, Bignert A, McLachlan MS. Bioaccumulation of decamethylcyclopentasiloxane in perch in Swedish lakes. *Aquat. Toxicol.* 2013;93:789-793.

Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 1995;203(3):253-310.

Kirk RGW. Recovering the Principles of Humane Experimental Technique: The 3Rs and the Human Essence of Animal Research. *Sci. Technol. Hum. Values* 2018;43(4):622-648.

Klaunig JE, Dekant W, Plotzke K, Scialli AR. Biological relevance of decamethylcyclopentasiloxane (D5) induced rat uterine endometrial adenocarcinoma tumorigenesis: Mode of action and relevance to humans. *Regul. Toxicol. Pharm.* 2016;74:44-56.

Knöbel M, Busser FJM, Rico-Rico A, Kramer NI, Hermens JLM, Hafner C, et al. Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. *Environ Sci Technol* 2012;46:9690–9700.

Kreutzweiser DP, Holmes SB, Eichenberg DC. Influence of Exposure Duration on the Toxicity of Triclopyr Ester to Fish and Aquatic Insects. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1994;26:124-129.

Krogseth IS, Kierkegaard A, McLachlan MS, Breivik K, Hansen KM, Schlabach, M. Occurrence and seasonality of cyclic volatile methyl siloxanes in Arctic air. *Environ. Sci. Technol.* 2013;47:502-509.

Kuster E, Altenburger R. Comparison of cholin- and carboxylesterase enzyme inhibition and visible effects in the zebra fish embryo bioassay under short-term paraoxon-methyl exposure. *Biomarkers.* 2006;11:341–354.

Loretz JL, Api MA, Babcock L, Barraj ML, Burdick J, Cater CK, Jarrett, G, et al. Exposure data for cosmetic products: facial cleanser, hair conditioner, and eyeshadow. *Food Chem. Toxicol.* 2008;46(5):1516-1524.

Loretz L, Api MA, Barraj L, Burdick J, Davis AD, Dressler W, Gilberti E, et al. Exposure data for personal care products: hairspray, spray perfume, liquid foundation, shampoo, body wash, and solid antiperspirant. *Food Chem. Toxicol.* 2006;44(12):2008-2018.

Lu Y, Yuan T, Wang WH, Kannan K. Concentrations and assessment of exposure to siloxanes and synthetic musks in personal care products from China. *Environ Pollut* 2011;159:3522–3528.

Mackay D, Cowan-Ellsberry CE, Powell DE, Woodburn KB, Shihe XU, GARY E. Kozerski GE, Kim J. Decamethylcyclopentasiloxane (D5) environmental sources, fate, transport, and routes of exposure. *Environ. Toxicol Chem.* 2015;34(12):2689–2702.

Marin Municipal Water District Vegetation Management Plan (MMWDVMP). Herbicide Risk Assessment. Chapter 4: Triclopyr. [Internet]. 2010. (citado 10 Mar 2020). Disponível em: https://sfforest.files.wordpress.com/2015/02/chap4_triclopyr_8_27_08.pdf

McCall PJ, Gavit PD. Aqueous photolysis of triclopyr and its butoxyethyl ester and calculated environmental photodecomposition rates. *Environ Toxicol Chem* 1986;5:879-885.

Metcalfe CD. Pharmaceutical contaminants of emerging concern in the environment. *Environ Toxicol Chem* 2013;32(8):1683–1684.

Meyers JR. Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* 2018;19:1-26.

Mojsiewicz-Pienkowska K, Jamrógiewicz M, Szymkowska K, Krenczkowska D. Direct Human Contact with Siloxanes (Silicones) – Safety or Risk Part 1. Characteristics of Siloxanes (Silicones). *Front. Pharmacol.* 2016;7:132.

Montagner CC, Sodré FF, Vidal C, Acayaba RD, Campestrini I, Locatelli MA. Ten Years-Snapshot of the Occurrence of Emerging Contaminants in Drinking, Surface and Ground Waters and Wastewaters from São Paulo State, Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* 2019;30(3):614-632.

Nagel R. DarT: the embryo test with the zebrafish *Danio rerio* e a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* 2002;19(Suplemento 1):38-48.

Nasiadka A, Clark MD. Zebrafish Breeding in the Laboratory Environment. *ILAR Journal* 2012;53(2):161-168.

Norwood WP, Alae M, Sverko E, Wang D, Brown M, Galici M. Decamethylcyclopentasiloxane (D5) spiked sediment: Bioaccumulation and toxicity to the benthic invertebrate *Hyalella* sp. *Chemosphere* 2013;93:805-812.

Oliveira DP, Dorta DJ. Contaminantes emergentes da água. In: Oga S, Camargo MMA, Batstuzzo JAO, editores. *Fundamentos de toxicologia*, 4ª ed. São Paulo: Atheneu; 2014. 685 p.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing. Paris; 2013.

Parlak V. Evaluation of apoptosis, oxidative stress responses, AchE activity and body malformations in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to deltamethrin. *Chemosphere* 2018;207:397-403.

Parrott JL, Alae M, Wang D, Sverko E. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryo to adult exposure to decamethylcyclopentasiloxane (D5). *Chemosphere* 2013;9:813-818.

Pereira AC, Gomes T, Machado MRF, Rocha TL. The zebrafish embryotoxicity test (ZET) for nanotoxicity assessment: from morphological to molecular approach. *Environmental Pollution* 2019;252:1841-1853.

Pereira LC, Souza AO, Bernardes MFF, Pazin M, Tasso MJ, Pereira PH, *et al.* A perspective on the potential risks of emerging contaminants to human and environmental health. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2015;22:13800-13823.

Petty DG, Gardner RC. Right-of-way terrestrial dissipation study of triclopyr in North Carolina. GH-C 3123. DowElanco, Indianapolis, IN; 1993.

Pontelli RCN, Nunes AA, Oliveira SVWB. Impact on human health of endocrine disruptors present in environmental water bodies: is there an association with obesity? *Cien. Saúde Colet.* 2016;21(3):753-766.

Poynton HC, Robinson WE. Contaminants of Emerging Concern, With isso Emphasis on Nanomaterials and Pharmaceuticals. In: Török B, Dransfield, editor. *Green Chemistry An Inclusive Approach*. Elsevier; 2018. P. 291-315.

Reddy TP, Manczak M, Calkins MJ, Mao P, Reddy AP, Shirendeb U, *et al.* Toxicity of Neurons Treated with Herbicides and Neuroprotection by MitochondriaTargeted Antioxidant SS31. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 2011;8(1):203-221.

Richardson SD, Kimura SY. Water Analysis Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.* 2020;92(1):473–505.

Richardson SD, Kimura SY. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.* 2016;88(1):546–582.

Rico EP, Rosemberg DB, Senger MR, Arizi MB, Bernardi GF, Bogo MR, Bonan CD. Methanol alters ecto-nucleotidases and acetylcholinesterase in zebrafish brain. *Neurotoxicol Teratol.* 2006;28:489-96.

Rousselle DC. Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) e Final version of the opinion on decamethylcyclopentasiloxane (cyclopentasiloxane, D5) in cosmetic products. *Regul. Toxicol. Pharm.* 2017;83:117-118.

Russel WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. London: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW); 1992.

Russom CL, Lalone CA, Villeneuve DL, Ankley GT. Development of isso adverse outcome pathway for acetylcholinesterase inhibition leading to acute mortality. *Environ Toxicol Chem.* 2014;33(10):2157-2169.

Sahlin S, Ågerstrand M. Decamethylcyclopentasiloxane (D5). EQS data overview. The Department of Environmental Science and Analytical Chemistry (ACES). Stockholm University. Stockholm; 2018.

Salimi M, Esrafil A, Gholami M, Jafari AJ, Kalantary RR, Farzadkia M, et al. Contaminants of emerging concern: a review of new approach in AOP Technologies. *Environ Monit Assess* 2017;189(414):1-22.

Sanchís J, Martínez E, Ginebreda A, Farré M, Barceló D. Occurrence of linear and cyclic volatile methylsiloxanes in wastewater, surface water and sediments from Catalonia. *Science of the Total Environment* 2013;443:530-538.

Sauvé S, Desrosiers M. A review of what is an emerging contaminant. *Chem. Cent. J.* 2014;8(15):1-7.

Schaider L, Rodgers K, Rudel R. Contaminants of Emerging Concern and Septic Systems: A Synthesis of Scientific Literature and Application to Groundwater Quality on Cape Cod. *Lent Spring Institute* Newton, MA, September 2013.

Scholz S, Fischer S, Gündel U, Küster E, Luckenbach T, Voelker D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. *Environ Sci Pollut Res.* 2008;15:394–404.

Senger M, Rosenberg D, Rico E, Arizzi M, Dias R, Bogo M, Bonan C. In Vitro Effect of Zinc and Cadmium on Acetylcholinesterase and Ectonucleotidase Activities in Zebrafish (*Danio rerio*) Brain. *Toxicol In Vitro* 2006;20:954-958.

Servizi JA, Gordon RW, Martens DW. Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, *Daphnia*, and trout. *Bull Environ Contam Toxicol* 1987;39:15-22.

Silva DD, Migliorini RB, Silva EC, Lima ZM, Moura IB. Lack of sanitation and groundwater in shallow aquifer: region of the neighborhood Pedra Noventa, Cuiaba (MT). *Eng Sanit Ambient.* 2014;19(1):43-52.

Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS). Diagnóstico Anual de Água e Esgotos. 2018. [citado 2020 Out 14]. Disponível em: <http://www.snis.gov.br/diagnostico-anual-agua-e-esgotos>

Sobanska M, Scholz S, Nyman A, Cesnaitis R, Alonso SG, Kluver N, et al. Applicability of the Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (OECD 236) in the Regulatory Context of Registration, Evaluation, Authorisation, and Restriction of Chemicals (REACH). *Environ. Toxicol. Chem.* 2018;37:657–670.

Solomon KR, Bowhey CS, Liber K, Stephenson GR. Persistence of hexazinone (Velpar), triclopyr (Garlon), and 2,4-D in a northern Ontario aquatic environment. *J Agric Food Chem* 1988;36:1314-1318.

Stanford BD, Weinberg HS. Evaluation of on-site wastewater treatment technology to remove estrogens, nonylphenols, and estrogenic activity from wastewater. *Environmental Science & Technology* 2010;44:2994-3001.

Starling MCV, Amorim CC, Leão MMD. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. *J Hazard Mater.* 2019;372:17-36.

Stehr CM, Linbo TL, Baldwin DH, Scholz NL, Incardona JP. Evaluating the Effects of Forestry Herbicides on Fish Development Using Rapid Phenotypic Screens. *N. Am. J. Fish Manage.* 2009;29:975-984.

Streit B. Bioaccumulation of contaminants in fish. In: Braunbeck T, Hinton DE, Streit B, 39^ândida. *Fish Ecotoxicology*. Birkhäuser: Basel; 1998. P. 353-387.

Suvarchala G, Philip GH. Toxicity of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol tested at multiple stages of zebrafish (*Danio rerio*) development. *Environ. Sci. Pollut. R.* 2016;23:15515-15523.

Szeto SY. Determination of kinetics of hydrolysis by high-pressure liquid chromatography: application to hydrolysis of the ethylene glycol butyl ether ester of tricIopyr. *J Agric Food Chem* 1993;41:1118-1121.

Taheran M, Naghdia M, Brar SK, Verma M, Surampalli RY. Emerging contaminants: Here today, there tomorrow! *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag.* 2018;10:122–126.

Teixidó E, Piqué E, Gómez-Catalán J, Llobet JM. Assessment of developmental delay in the zebrafish embryo teratogenicity assay. *Toxicology in Vitro* 2013; 27(1):469-478.

Thompson DG, Kreutzweiser DP, Capell SS, Thomas DR, Staznik B, Viinikka T. Fate and effects of tricIopyr ester in a first-order forest stream. *Environ Contam Toxicol* 1995;14:1307-1317.

Timchalk C, Finco DR, Quast JF. Evaluation of renal function in rhesus monkeys and comparison to beagle dogs following oral administration of the organic acid tricIopyr (3,5,6-trichloro-2-pyridinyloxyacetic acid). *Fundam. Appl. Toxicol.* 1997;36:47–53.

Tran TM, Abualnaja KO, Asimakopoulos AG, Covaci A, Gevao B, JohnsonRestrepo B, et al. A survey of cyclic and linear siloxanes in indoor dust and their implications for human exposures in twelve countries. *Environ. Int.* 2015;78:39-44.

Tran TM, Kannan K. Occurrence of cyclic and linear siloxanes in indoor air from Albany, New York, USA, and its implications for inhalation exposure. *Sci. Total Environ.* 2015;511:138-144.

Traver D, Yoder JA. Immunology. In: Cartner S, Eisen JS, Farmer SF, Guillemin KJ, Kent ML, Sanders GE, editors. *The Zebrafish in Biomedical Research: Biology, Husbandry, Diseases, and Research Applications* 1^a ed. Academic Press; 2020. P. 191-216.

United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO). Emerging pollutants in water and wastewater [Internet]. 2018. [citado 20 Abr 2020]. Disponível em: <http://en.unesco.org/emergingpollutants>

United Nations Environment Programme (UNEP). *Global Environment Outlook – GEO-6: Healthy Planet, Healthy People*. Nairobi; 2019.

United Nations Environment Programme (UNEP). *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: An Emerging Issue. Global Programme of Action for the Protection of the Marine Environment from Land-Based Activities*; 2017.

Vélez VPP, Esquivel-Hernández G, Cipriani-Avila I, Mora-Abril E, Cisneros JF, Alvarado A, Abril-Ulloa V. Emerging Contaminants in Trans-American Waters. *Isso. Ambient. Água* 2019;14(6):e2436.

Venkitaraman AR. Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *J. Cell Sci.* 2001;114:3591-3598.

Wan MT, Moul D J, Watts RG. Acute toxicity to juvenile Pacific salmonids of Garlon 3A, Garlon 4, triclopyr, triclopyr ester, and their transformation products: 3,5,6-trichloro-2-pyridinol and 2-methoxy-3,5,6-trichloropyridine. *Bull Environ Contam Toxicol* 1987;39:721-728.

Wang D, Norwood W, Alaei M, Byer JD, Brimble S. Review of recent advances in research on the toxicity, detection, occurrence and fate of cyclic volatile methyl siloxanes in the environment. *Chemosphere* 2013;93:711-725.

Wilken RL, Imanalieva A, MacAvoy S, Connaughton VP. Anatomical and Behavioral Assessment of Larval Zebrafish (*Danio rerio*) Reared in Anacostia River Water Samples. *Arch. Environ. Com. Tox.* 2020;78:525–535.

Wilkinson J, Hooda PS, Barker J, Barton S, Swinden J. Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field. *Environ. Pollut.* 2017;231:954-970.

Xu L, Shi Y, Liu N, Cai Y. Methyl siloxanes in environmental matrices and human plasma/fat from both general industries and residential areas in China. *Sci. Total Environ.* 2015.

Xue X, Jia H, Xue J. Bioaccumulation of Methyl Siloxanes in Common Carp (*Cyprinus carpio*) and in an Estuarine Food Web in Northeastern China. *Arch. Environ. Com. Tox.* 2019;76:496–507.

Zhang J, Begum A, Brännström K, Grundström C, Iakovleva I, Olofsson A, et al. Structure-Based Virtual Screening Protocol for in Silico Identification of Potential Thyroid Disrupting Chemicals Targeting Transthyretin. *Environ. Sci. Technol.* 2016;50(21):11984-11993.

Zhang J, Falany J, Xie X, Falany C. Induction of rat hepatic drug metabolizing enzymes by dimethylcyclodioxanes. *Chem. Biol. Interact.* 2000;124:133–147.

Zhang R, Wang M, Chen X, Yang C, Wu L. Combined toxicity of microplastics and candida on the zebrafish embryos (*Danio rerio*). *Science of the Total Environment* 2020;743:1-8.

Zhang ZF, Qi H, Ren NQ, Li YF, Gao DW, Kannan K. Survey of cyclic and linear siloxanes in sediment from the Songhua River and in sewage sludge from wastewater treatment plants, northeastern China. *Arch Environ Contam Toxicol* 2011;60:204–211.

CAPÍTULO II - Artigo científico

De modo a atender às normas do Programa de Pós-Graduação em Patologia, o capítulo II desta dissertação é composto por artigo científico, em forma de manuscrito, a ser publicado na Revista Ciência & Saúde Coletiva da Associação Brasileira de Saúde Coletiva. ISSN 1678-4561.

Toxicidade dos contaminantes de preocupação emergente decametilciclopentasiloxano e triclopir no desenvolvimento de embriões e larvas de zebrafish

Ítalo Bertoni Lopes de Andrade^{1,2}; Lílían Cristina Pereira^{2,3}

1 Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB, UNESP, Botucatu, Departamento de Patologia;

2 Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental Sobre a Saúde Humana (TOXICAM)

3 Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, Botucatu.

1 INTRODUÇÃO

Contaminantes de preocupação emergente (CPEs) é uma classe de contaminantes ou poluentes que tem recebido atenção considerável devido à sua ampla ocorrência no meio ambiente e sua toxicidade potencial (GONZÁLEZ-RUBIO *et al.*, 2021). Por definição, CPEs são materiais ou compostos químicos de origem sintética como praguicidas, produtos de cuidado pessoal (PCPs), retardantes de chamas, corantes sintéticos ou de origem natural, incluindo genes resistentes de microrganismos e algas tóxicas. A emergência em relação a esses contaminantes está ligada ao conhecimento toxicológico limitado e por representarem uma ameaça real ou potencial para a saúde humana e ou para o ambiente (GEISSEN *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2014; POYNTON, ROBINSON, 2018), o que impulsiona a necessidade de pesquisa para a melhor compreensão dos seus mecanismos de toxicidade e efeitos decorrentes da exposição (PEREIRA *et al.*, 2015; GEISSEN *et al.*, 2015; UNEP, 2017; TAHERAN *et al.*, 2018). A maioria dos efeitos de CPEs na saúde humana e no ecossistema são desconhecidos. Contudo, já foi demonstrado que, mesmo uma exposição muito baixa a certos CPEs pode resultar em impactos a sistemas biológicos (RAGHAV *et al.*, 2013).

Além de auxiliar no controle de pragas que afetam a produtividade agrícola (JESCHKE, 2016), alguns praguicidas têm figurado como CPEs. O triclopir é um herbicida de pré-emergência (Figura 1A), mimetizador do hormônio auxina, comumente utilizado para o controle de plantas infestantes em plantações de milho, arroz, soja, trigo e pastagens (ANVISA, 2020). No Brasil, só em 2019, seu consumo como princípio ativo (triclopir butotílico) foi de 1.926,89 toneladas em todo o país (IBAMA, 2019). Como resultado de seu uso volumoso, processo de lixiviação, descarte incorreto e, conseqüentemente, frequente

detecção no meio ambiente, o triclopir passou a ser considerado um CPE (RICHARDSON, KIMURA, 2016).

Entre os danos induzidos pela exposição ao triclopir podemos citar neurotoxicidade, observada pela diminuição de viabilidade de células neuronais primárias de camundongos C57BL/6 (REDDY *et al.*, 2011). Ainda, de acordo com Reddy *et al.* (2011), também foi observada diminuição na expressão de mRNA de genes neuroprotetores (peroxiredoxinas) e genes da cadeia de transporte de elétrons (CTE), codificados pela mitocôndria, em células de neuroblastoma de camundongo (N2a) expostas ao triclopir (3 mM por 48 horas), evidenciando a ocorrência de danos mitocondriais (REDDY *et al.*, 2011). Kreutzweiser *et al.* (1994) mostraram que há chance significativa de efeitos letais agudos em peixes expostos a resíduos de triclopir por mais de seis horas de exposição. Além disso, efeitos subletais como desorientação, tosse, alargamento das superfícies das guelras foram observados em truta arco-íris e salmão rei expostos a 30 e 120 µg/L por um curto período (1 e 3 dias) (Kreutzweiser *et al.*, 1994). Também, já foi evidenciada, através do ensaio do cometa, sua genotoxicidade em peixes (*Anguilla anguilla* L.), provocada tanto pela formulação comercial Garlon®, quanto pelo princípio ativo como triclopir em forma de ácido (GUILHERME *et al.*, 2015).

O decametilciclopentasiloxano (D5) é um siloxano cíclico (Figura 1B), incolor, volátil, amplamente usado em uma variedade de PCPs, incluindo shampoos, condicionadores, cremes para a pele, cosméticos e desodorantes, além do uso industrial, em produtos eletrônicos, materiais de construção, embalagens para alimentos, produtos de saúde e produtos farmacêuticos (WANG *et al.*, 2013; FLIEDNER *et al.*, 2020). Em formulações de PCPs, o D5 confere a tais produtos características como suavidade e viscosidade por longos períodos, o que o torna atrativo comercialmente e, conseqüentemente, o mais produzido dentre esse grupo químico (WANG *et al.*, 2013). Desde sua detecção cada vez mais frequente no meio ambiente, atribuído ao uso generalizado e descarte contínuo de PCPs, principalmente através de efluentes domiciliares (MACKAY *et al.*, 2015; FLIEDNER *et al.*, 2020), o D5 tornou-se alvo de considerável interesse científico e regulatório (MACKAY *et al.*, 2015). Suplementarmente, associado à sua baixa solubilidade em água (17 µg/L), alto coeficiente de partição octanol-água (log K_{ow} 8,09) e elevado Fator de Bioconcentração (BCF) (7060) (SAHLIN, ÅGERSTRAND, 2018), que excede aqueles valores aceitáveis relacionados à biocumulação estabelecidos pelas normas REACH (2000-5000) (ECHA, 2017), este composto também foi elencado como um CPE (RICHARDSON, KIMURA, 2016). De fato, estudos apontam um importante potencial de biomagnificação do D5 através da cadeia trófica de organismos aquáticos (XUE, JIA, XUE, 2019; CUI *et al.*, 2019). No contexto regulatório,

visto seu potencial de persistência no meio ambiente e bioacumulação em vários níveis tróficos, o D5 junto a outro siloxano, D4, passou a ter seu uso restringido em toda a União Europeia em janeiro de 2020 (DIRECTIVE35/2018/EU, 2018), como uma alternativa a minimizar seu impacto a longo prazo no ambiente.

Em relação a sua toxicidade, em ratos o D5 foi capaz de induzir danos hepáticos (aumento do peso do fígado), pulmonares (aumento do peso pulmonar, inflamação da submucosa no pulmão, proliferação de células calciformes) e até mesmo aumento na incidência de adenocarcinoma uterino após exposições repetidas (DEKANT, KLAUNING, 2016). Em embriões e larvas de zebrafish expostas por até 14 dias, concentrações de 1nM e 1 fM o D5 também provocaram taxas significativas de mortalidade, alterações comportamentais ligadas ao stress e respostas reduzidas de sobressalto (WIEGAND, 2019). Efeitos como redução no desenvolvimento em larvas de mosquitos e diminuição da sobrevivência de vermes de água doce foram relatados para concentrações ambientais de D5 (160 µg/g e 1.272 µg/g, respectivamente) (WANG *et al.*, 2013). Outro estudo de toxicidade com D5 também apontou que em pequenas concentrações (209 mg/Kg a 4054 mg/Kg) o composto foi capaz de causar 50% de inibição da reprodução em organismos artrópodes terrestres (colêmbolo ou *springtail*) e plantas (cevada) (VELICOGNA *et al.*, 2012). Em adição, nenhum estudo revelou potencial de genotoxicidade para o D5.

Enquanto algumas agências internacionais de regulação e registro de substâncias químicas têm restringido e até mesmo proibido o uso desses dois CPEs (RICHARDSON, KIMURA, 2016; DIRECTIVE2018/35, 2018), em países como o Brasil não há programas ou o monitoramento contínuo dos resíduos desses produtos, assim como a avaliação do seu potencial risco à saúde ambiental. Por esta razão, mesmo baixas concentrações no meio ambiente devem ser consideradas.

Apresentando 70% de homologia ao genoma humano (HOWE *et al.*, 2013), o zebrafish (*Danio rerio*) tem emergido como um modelo experimental preditivo de alto rendimento (HORZMANN, FREEMAN, 2018; TEAME *et al.*, 2019). O pequeno tamanho, alta taxa reprodutiva, desenvolvimento rápido e semelhante ao de mamíferos superiores (KIMMEL *et al.*, 1995), além do baixo custo de manutenção e pequena ocupação espacial, quando comparado a modelos de mamíferos, como roedores e cães, são características vantajosas deste modelo de peixe teleósteo para a condução de estudos toxicológicos (GARCIA *et al.*, 2016; PADILLA, GLABERMAN, 2020). Praguicidas (GONÇALVES *et al.*, 2020), PCPs (TORRES *et al.*, 2016), fármacos (NOWAKOWSKA *et al.*, 2020), metais pesados (LEFAUVE *et al.*, 2017), corantes (de OLIVEIRA *et al.*, 2016) e nanomateriais

(PEREIRA *et al.*, 2019) são exemplos de compostos, alguns considerados CPEs, que tiveram sua toxicidade avaliada em embriões de zebrafish de acordo com protocolos experimentais internacionalmente validados, como o *Fish Embryo Toxicity (FET) test*, um método alternativo ao uso de peixes adultos (OECD, 2013). De forma complementar, os testes de toxicidade durante as janelas críticas iniciais do desenvolvimento de peixes são usados para avaliar as respostas de todo o organismo e os resultados desses ensaios de curto prazo são frequentemente usados para prever a toxicidade aguda para estágios de desenvolvimento juvenil, adulto e mais tardios (BRAUNBECK *et al.*, 2015).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do desenvolvimento de embriões e larvas de zebrafish expostos aos CPEs triclopir e decametilciclopentasiloxano, a fim de prever o impacto real destes contaminantes a organismos aquáticos não alvo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estratégia de estudo

Com o objetivo de avaliar os efeitos letais e subletais dos CPEs, D5 e triclopir no desenvolvimento do zebrafish, nossa estratégia foi expor embriões de peixes a concentrações que foram detectadas no meio ambiente. Primeiramente, determinamos a CL50 (concentração letal 50%) Concentração Efetiva 50% (CE50) em 96 e 144 horas de cada CPE. O Índice de Teratogenicidade (IT), também foi calculado para os compostos avaliados. Em seguida, avaliamos os efeitos subletais induzidos pelos CPEs em um período de até 144 horas. De forma complementar, analisamos o potencial dos CPEs em induzirem neurotoxicidade em larvas de zebrafish em 96 horas de exposição.

2.2 Substâncias químicas

Soluções padrões de Decametilciclopentasiloxano (D5) (CAS: 541-02-6, pureza $\geq 97\%$) e Triclopir (CAS: 55335-06-3, pureza 99,9%) foram adquiridos de Sigma-Aldrich. As soluções estoques de D5 e triclopir foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e mistura de DMSO com Tween20®, respectivamente. Todas as soluções foram posteriormente diluídas em meio embrionário Água ISO (2 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgSO_4 , 0,75 mM NaHCO_3 , 0,07 mM KCl) para as concentrações testadas (0,01% DMSO). Água ISO e DMSO 0,01% em meio embrionário foram usados como controles negativos e controle de solvente. Para o controle positivo utilizamos 4,0 mg/L 3,4-dicloroanilina (DCA, CAS: 95-76-1, 98% de pureza, Sigma-Aldrich) como descrito pelo protocolo OECD TG236.

2.3 Peixes

As matrizes utilizadas para obtenção dos ovos foram fornecidas pelo biotério de zebrafish da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB). Os animais machos e fêmeas foram mantidos em aquários de vidro (6 Litros) sob condições controladas. Sendo assim, temperatura a 26 ± 1 °C, pH $7,5 \pm 0,5$, oxigênio dissolvido a 95% de saturação, condutividade 750 ± 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$, iluminação variando 14 horas claro e 10 horas escuro. Os animais foram alimentados três vezes ao dia com Maramar[®] Tropical Granules, Alcon[®] Ração de Spirulina e Maramar[®] e Ovos de Artêmia de alta eclosão uma vez ao dia.

Para a obtenção dos ovos, os animais machos e fêmeas permaneceram separados no aquário de desova até a manhã do dia seguinte. Na manhã seguinte, às 9 horas, a separação dos aquários foi removida e, com o estímulo da luz, foi iniciado o acasalamento para a obtenção dos embriões de zebrafish. Os ovos foram coletados aproximadamente 40 minutos após a desova usando peneiras com poros de $0,6 \mu\text{m}^2$ e lavados com água destilada para a remoção de impurezas. Os ovos foram transferidos para placas de Petri contendo Água ISO. A seleção dos ovos viáveis (fecundados) foi feita com o auxílio de um microscópio invertido (Motic[®], AE2000). Os ovos não fecundados, coagulados ou inviáveis, foram descartados em microtubos de acordo com as Boas Práticas em Laboratório (BPL) e diretriz do CONCEA (9.7.8.5.2, 2018). Os ovos fecundados e saudáveis, ainda na fase de clivagem, foram admitidos para o ensaio de embriotoxicidade.

2.4 Toxicidade aguda em embrião de peixe (FET test)

O teste de toxicidade aguda em embriões e larvas de zebrafish foi conduzido de acordo com o protocolo do *Fish Embryo Toxicity (FET) test* (TG 236, 2013) da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), Nagel (2002) e Kimmel *et al.* (1995).

Para o teste FET foram utilizados 20 embriões de zebrafish por concentração testada de cada substância, incluindo controle negativo (Água ISO), positivo (DCA 24 M) e controle de solvente. Os embriões foram distribuídos em placas estéreis de 24 poços. As concentrações utilizadas para o teste FET foram de 0,5, 1, 5, 10, 100 e 500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ para D5 e de 0,5, 1, 5, 10, 50 e 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ para triclopir e 4 poços contendo apenas água ISO como controle interno. O ensaio FET test foi realizado em triplicata ($n = 3$) com ensaios independentes.

Os embriões foram acompanhados e avaliados inicialmente no período de 8, 24, 48, 96, 120 e 144 horas pós-fertilização (hpf) sob um microscópio invertido (Motic, AE2000). O

ensaio FET foi estendido para analisar até 144 hpf em vez de 96 hpf como descrito pelo protocolo OECD TG236. Assim, foi possível a observação de desfechos que normalmente não seriam observadas dentro de 96 horas. A Concentração Letal de 50% (CL50) e Concentração Efetiva de 50% (CE50) de cada substância foram determinadas após 96 e 144 horas, posteriormente as classificamos de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos - GHS (GHS, 2019).

Para a comparação com os organismos tratados utilizamos como referência a descrição do desenvolvimento normal de zebrafish por Kimmel *et al.* (1995). Além dos quatro parâmetros (1) coagulação dos ovos, (2) ausência de somitos, (3) não desprendimento da cauda e (4) ausência de batimento cardíaco em embriões e larvas de zebrafish, foram adotados parâmetros adicionais, descritos por Nagel (2002), categorizados em: subletalidade (conclusão da gástrula, formação de somitos, edema de saco vitelínico, edema de pericárdio, absorção anormal de saco vitelínico, alteração do batimento cardíaco/circulação sanguínea, movimentação espontânea, desenvolvimento de cabeça e olhos, alterações de pigmentação e bexiga natatória não inflada) e teratogenicidade (escoliose, cauda curva, cauda encurtada, comprimento de cauda, crescimento retardado, malformação de cabeça e olhos, deformação de notocorda). Imagens dos embriões e larvas em diferentes momentos pós-fertilização foram capturadas por uma câmera digital (Olympus MVX10).

Ao final do ensaio de embriotoxicidade, as larvas sobreviventes foram eutanasiadas por imersão em água com gelo (0°C a 4°C) por 20 minutos, conforme Resolução Normativa Nº 37, de 15 de fevereiro de 2018 (9.7.8.5.2, 2018), do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.5 Ensaio da atividade da acetilcolinesterase (AChE)

Um *pool* de 30 larvas por concentração de tratamento após 96 hpf foi utilizado para realizar a medição da atividade da AChE. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), adaptado para placa 96 poços. A avaliação da atividade da AChE foi realizada de acordo com o método de Ellman *et al.* (1961), também adaptado para placa de 96 poços. Como controle positivo foi utilizado o organofosforado Diclorvós (CAS: 62-73-7, pureza 98,9%) a 50 $\mu\text{mol/L}$. A atividade da AChE foi analisada adicionando à 50 μL de amostra 250 μL da solução de reação, contendo tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,2), solução de 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) (4,7 mM) e NaHCO_3 em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,2), e solução de iodeto de acetiltiocolina (0,075 M) em água ultrapura. O aumento em absorbância foi medido em triplicatas a 414 nm por 10 min a 37°C usando um leitor de microplacas Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader, BioTek (Winooski, Vermont, U.S.A). A atividade enzimática foi expressa em nmol de acetiltiocolina hidrolisada por minuto por mg de proteína e para cálculos foi usado o coeficiente de extinção molar de $13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.6 Análise estatística

Para analisar se houve diferenças significativas entre os tratamentos e seu respectivo controle foi feita a Análise de Variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Dunnet. As análises foram feitas por meio do *software* GraphPad Prism versão 8.0.2. (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os resultados com $p < 0,05$ (*) foram considerados estatisticamente significativos. Os cálculos para a obtenção dos valores da CL_{50} e CE_{50} dos dois contaminantes, D5 e triclopir, foram realizados utilizando o método estatístico de Trimmed Spearman-Kärber (TSK) (Hamilton *et al.*, 1977).

2.7 Aspectos Éticos

Todos os experimentos realizados neste estudo foram previamente analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu, sob o certificado nº 1300/2019.

3 RESULTADOS

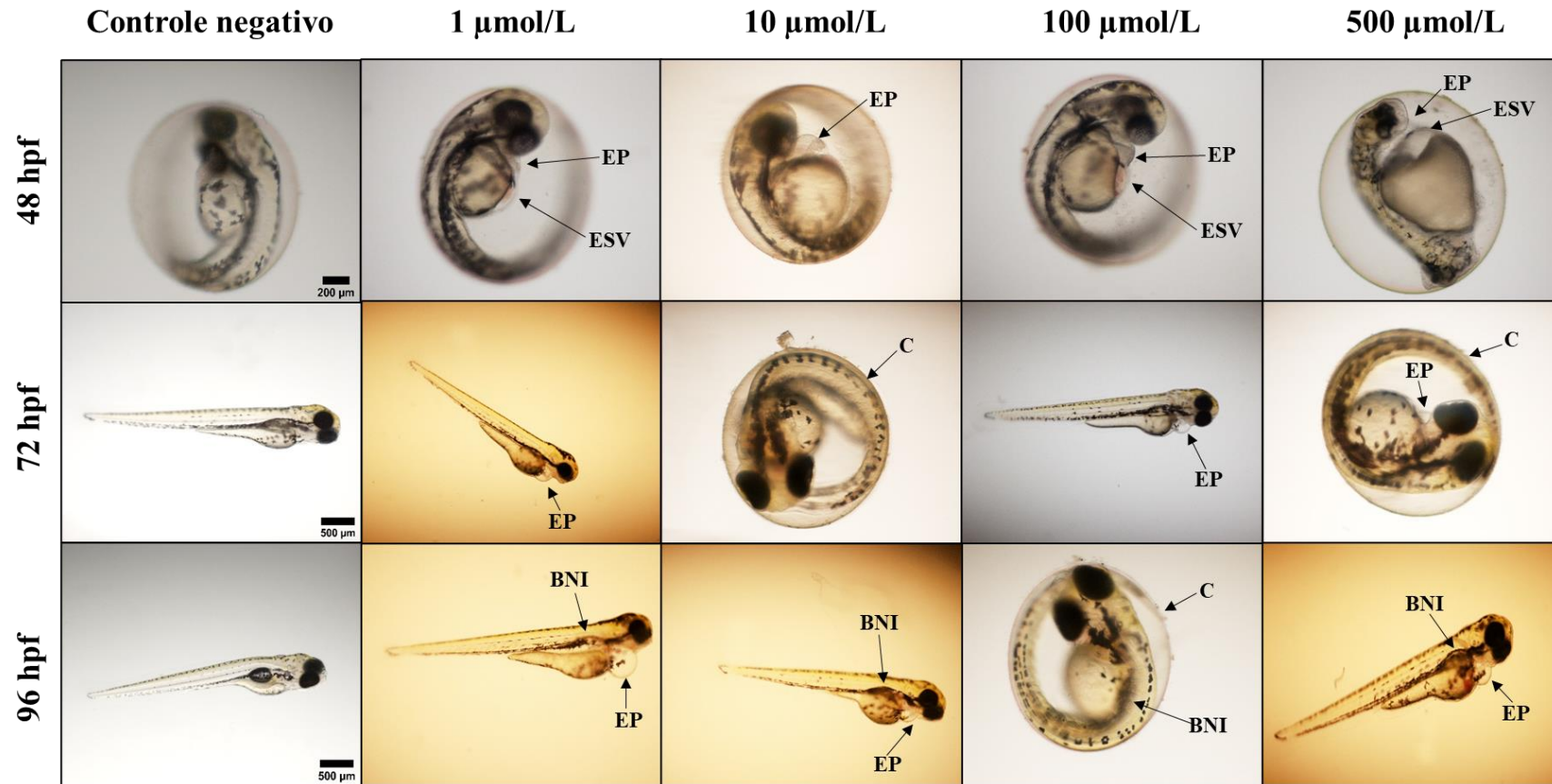
3.1 Ensaio de embriotoxicidade (FET test)

Durante as 144 horas de teste, os organismos dos grupos controle negativo e controle de solvente (DMSO 0,01%) apresentaram desenvolvimento normal conforme descrito por Kimmel *et al.* (1995). No controle positivo, a exposição a 4,0 mg/L de 3,4-dicloroanilina resultou em mortalidade de embriões e larvas superior a 30% em até 96 hpf, o que valida a eficácia do nosso teste de acordo com o protocolo OECD TG 236.

Embora os desfechos ausência de somitos, não desprendimento da cauda e outros propostos por Nagel (2002) não tenham sido observados, foi possível observar ovos coagulados, ausência de batimento cardíaco, edema de pericárdio, edema de saco vitelínico e não inflação da bexiga natatória, durante a exposição a cada um dos dois contaminantes. Desta forma, destacamos os efeitos observados nos organismos expostos aos dois contaminantes triclopir e D5 nos quadros 4 e 5, respectivamente.

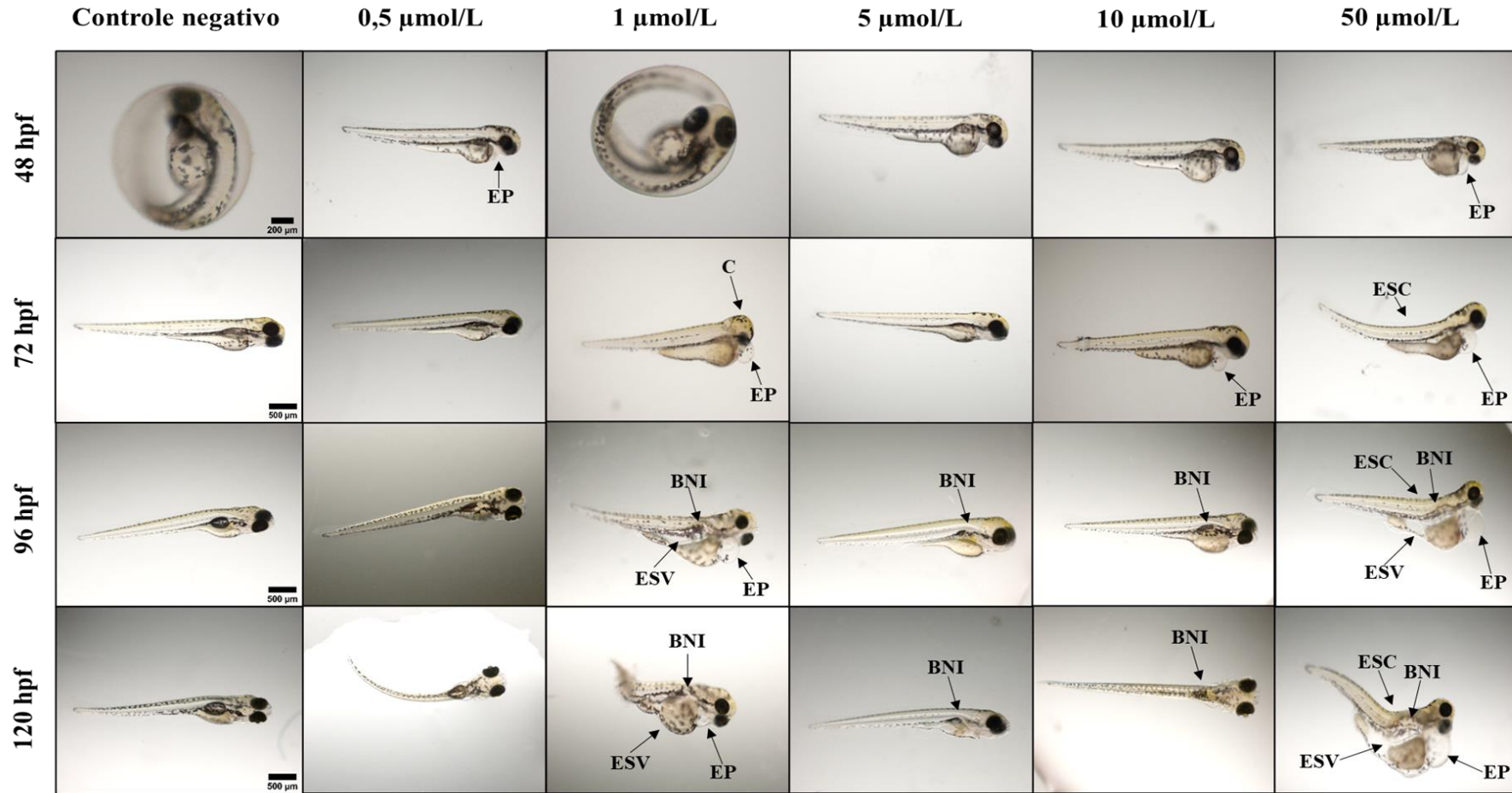
Os efeitos subletais e teratogênicos observados nos grupos tratados com D5 e triclopir estão destacados nas Figuras 3 e 4, respectivamente. As micrografias referentes a exposição ao D5 nas concentrações de 1, 10, 100 e 500 $\mu\text{mol/L}$ nos mostram efeitos subletais como edema de pericárdio e não inflação da bexiga natatória e a não eclosão dos ovos em até 96 hpf (Figura 1). A exposição ao triclopir esteve associada a edemas de pericárdio e de saco vitelínico, não inflação da bexiga natatória, e não eclosão de ovos nas concentrações de 0,5 até 50 $\mu\text{mol/L}$, e escoliose em 50 $\mu\text{mol/L}$, evidenciados até 120hpf (Figura 2).

Figura 1. Efeitos observados na exposição ao D5 por 96hpf.



Legenda: Micrografias com os efeitos observados em embriões e larvas de zebrafish expostos ao D5 por até 96 hpf. (Aumento de 1,6x para larvas e 2x para embriões em microscópio Olympus MVX10). As alterações observadas foram registradas após 48, 72 e 96 horas pós fertilização (hpf) de acordo com as concentrações de exposição. Os embriões apresentaram edema de pericárdio (**EP**); edema de saco vitelínico (**ESV**); não liberação do córion (**C**); bexiga não inflada (**BNI**). As fotos são representativas de 6n experimentais independentes.

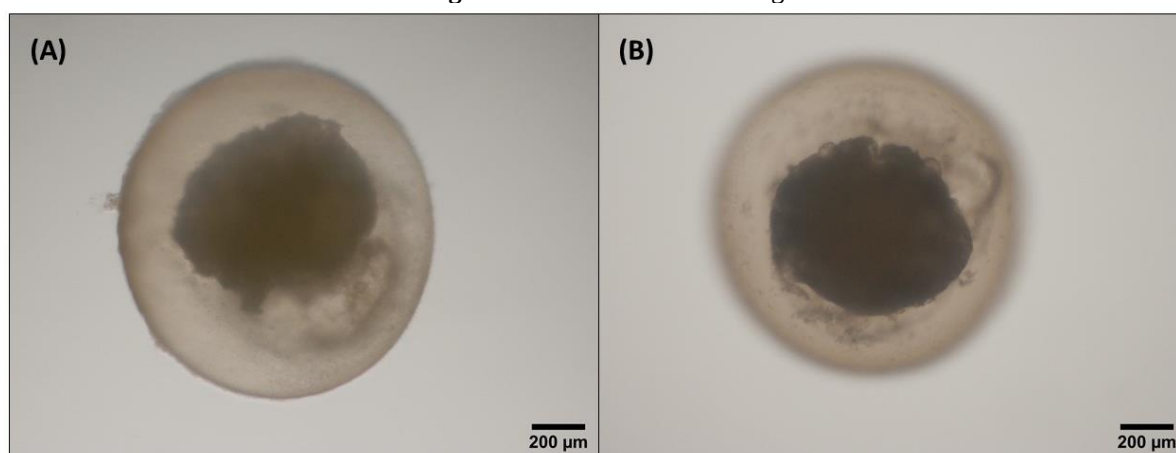
Figura 2. Efeitos observados na exposição ao triclopir por 96hpf.



Legenda: Micrografia com os efeitos observados em embriões e larvas de zebrafish expostos ao triclopir por até 120 hpf. (Aumento de 1,6x para larvas e 2x para embriões em microscópio Olympus MVX10). As alterações observadas foram registradas após 48, 72, 96 e 120 hpf de acordo com as concentrações de exposição. Os embriões e larvas apresentaram edema de pericárdio (**EP**), edema de saco vitelínico (**ESV**); bexiga natatória não inflada (**BNI**); escoliose (**ESC**). As fotos são representativas de 5n experimentais independentes.

Embora a taxa de ovos coagulados observada em embriões expostos ao contaminante D5 não tenha sido significativa quando comparada ao controle negativo, ovos coagulados foram observados já nas menores concentrações (0,5; 5 e 10 $\mu\text{mol/L}$) logo em 8 hpf, indicando mortalidade dos embriões (Figura 3A). Para o controle positivo, foi observada mortalidade superior a 30% dentro de 96 hpf, como esperado de acordo com a OECD TG 236, 2013. Em contraste com o D5, o triclopir apresentou maior frequência de ovos coagulados. Mortalidade de 100% foi observada em embriões expostos a 100 $\mu\text{mol/L}$ de triclopir em apenas 8 horas de exposição (Figura 3B).

Figura 3. Ovos de zebrafish coagulados.

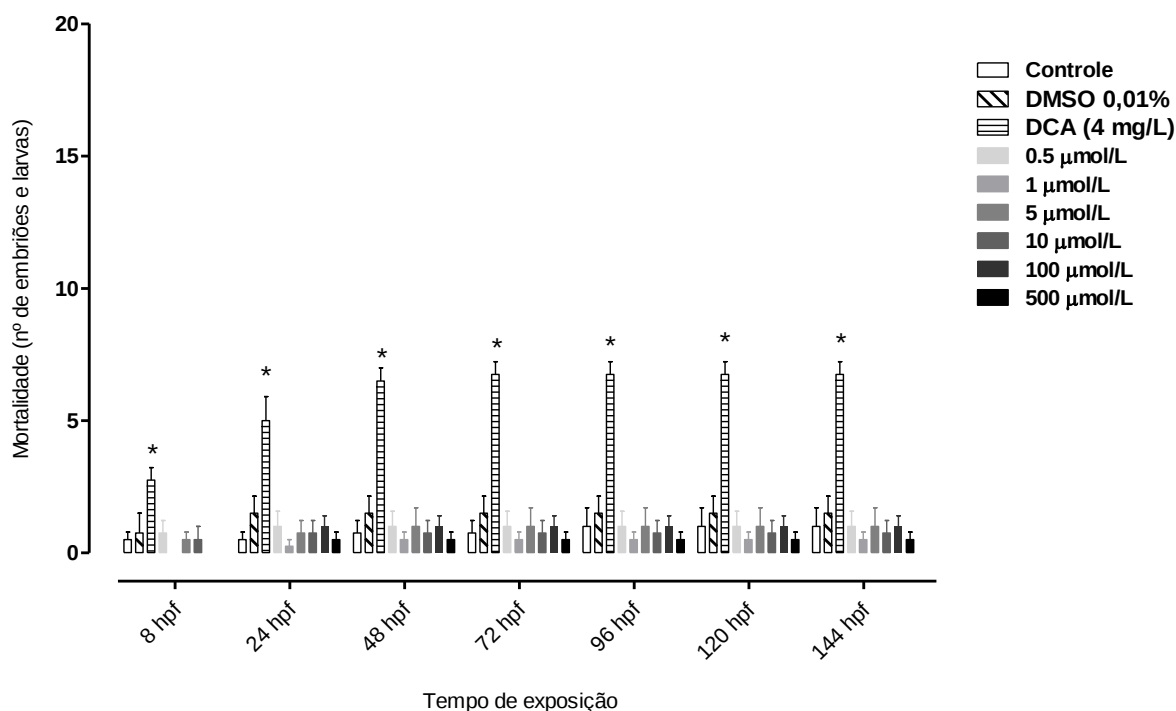


Legenda: Ovos de zebrafish coagulados expostos a D5 (A) e triclopir (B) em 8 hpf.

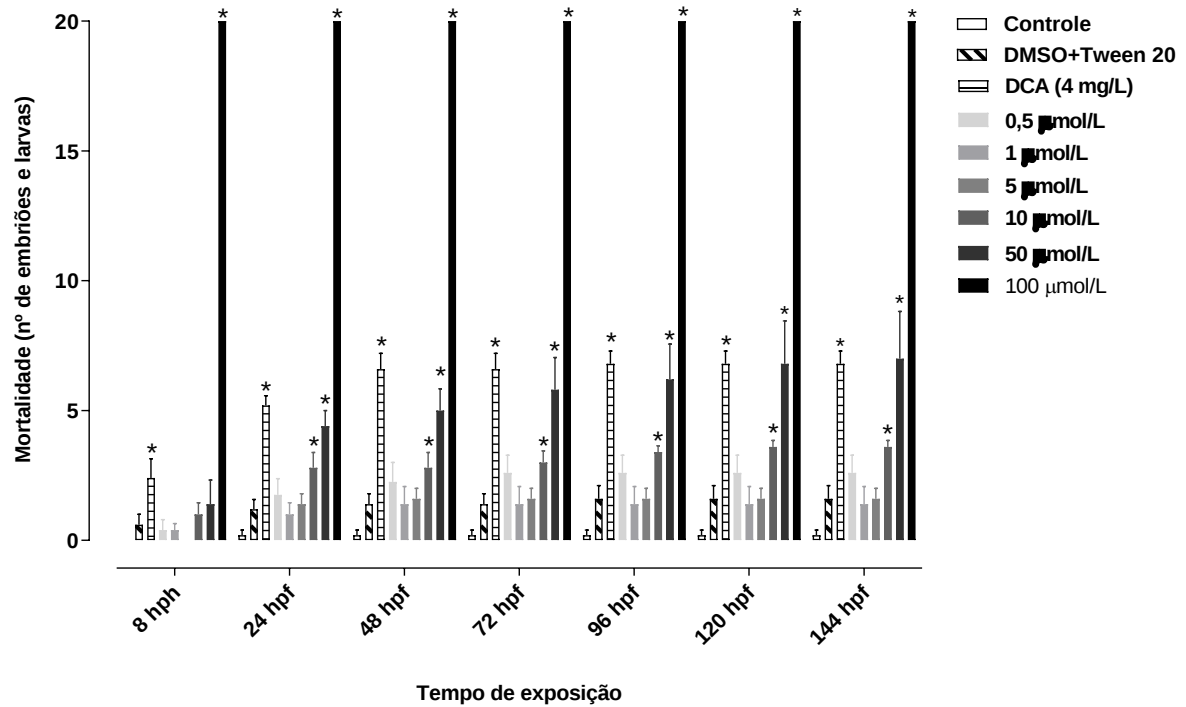
Fonte: Próprio autor.

A Figura 4 mostra também que a exposição ao D5 em todas as concentrações por até 144 horas não foi capaz de induzir mortalidade (ovos coagulados) de forma significativa quando comparada ao controle negativo. Por outro lado, a exposição ao herbicida triclopir nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ apresentou mortalidade significativa de 24 a 144 hpf (Figura 5).

Figura 4. Mortalidade de embriões por D5.



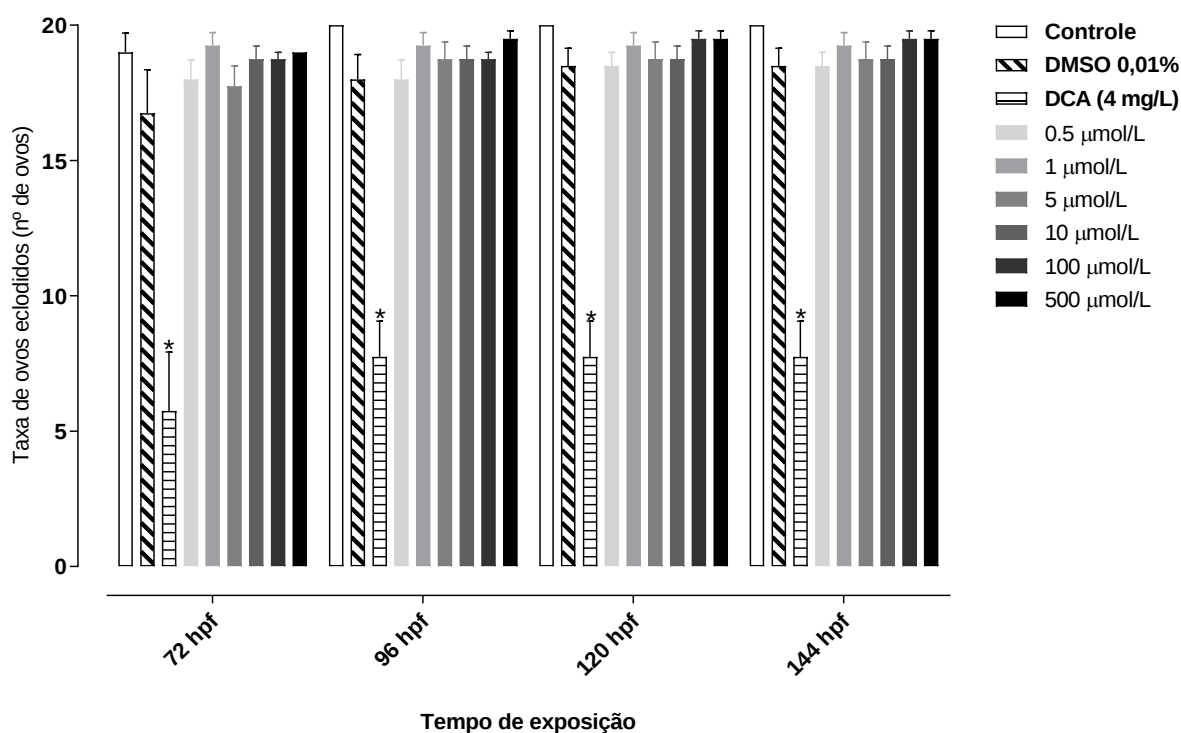
Legenda: Representação gráfica da mortalidade de embriões e larvas de zebrafish, expressa pela proporção de ovos coagulados e ausência de batimentos cardíacos por concentração e tempo de exposição ao D5. A proporção de ovos coagulados e ausência de batimentos cardíacos por tempo e concentração está representada por diferentes escalas de cinza. A mortalidade dos organismos expostos foi significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle quando indicado com (*).

Figura 5. Mortalidade de embriões por triclopir.

Legenda: Representação gráfica da mortalidade de embriões e larvas de zebrafish, expressa pela proporção de ovos coagulados e ausência de batimentos cardíacos por concentração e tempo de exposição ao triclopir. A proporção de ovos coagulados e ausência de batimentos cardíacos por tempo e concentração está representada por diferentes escalas de cinza. A mortalidade dos organismos expostos foi significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle quando indicado com (*).

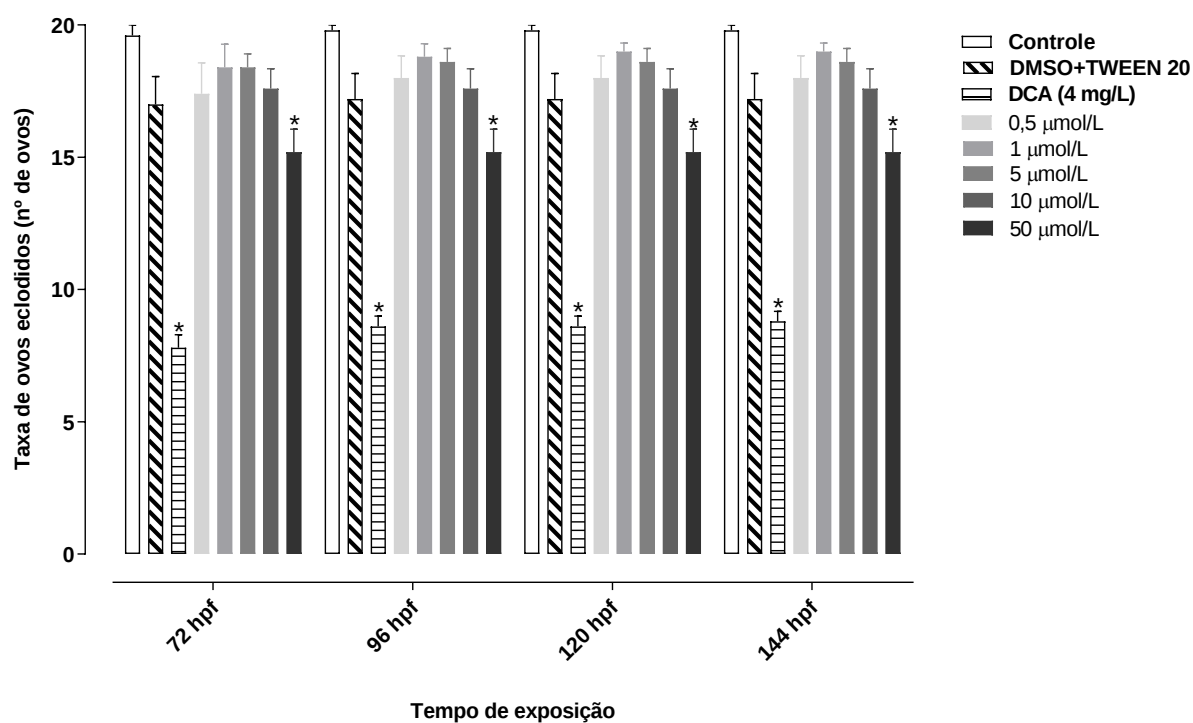
Não foram observados efeitos adversos sobre a eclosão de ovos de zebrafish expostos ao D5 em relação ao grupo controle negativo para este parâmetro (Figura 6). Em 72, 96, 120 e 144 hpf as taxas de ovos eclodidos nos grupos tratados 0,5; 1; 5 e 10 $\mu\text{mol/L}$ com triclopir foram semelhantes ao controle negativo. No entanto, o grupo tratado com 50 $\mu\text{mol/L}$ de triclopir apresentou uma diminuição significativa de 24% mantendo-se neste nível de redução entre 72 e 144 hpf (Figura 7). A representação gráfica dos ovos eclodidos no grupo exposto a 100 $\mu\text{mol/L}$ de triclopir não foi expressa, devido a mortalidade total, verificada já em 8 hpf.

Figura 6. Taxa de ovos eclodidos expostos ao D5.



Legenda: Efeito na taxa de eclosão de ovos de zebrafish após exposição ao D5 em relação ao tempo de exposição. A proporção de ovos eclodidos por tempo e concentração está representada por diferentes escalas de cinza. A diminuição na taxa de eclosão dos ovos foi significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle quando indicado com (*).

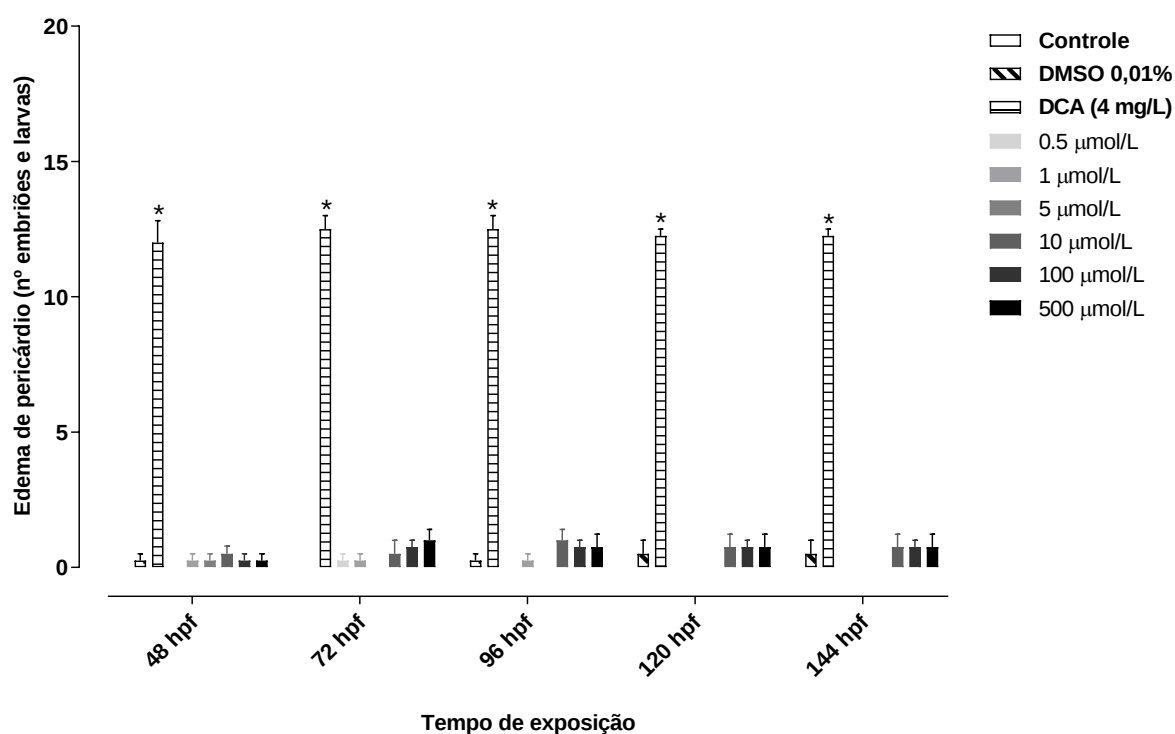
Figura 7. Taxa de ovos eclodidos expostos ao triclopir.



Legenda: Efeito na taxa de eclosão de ovos de zebrafish após exposição ao triclopir em relação ao tempo de exposição. A proporção de ovos eclodidos por tempo e concentração está representada por diferentes escalas de cinza. A diminuição na taxa de eclosão dos ovos foi significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle quando indicado com (*).

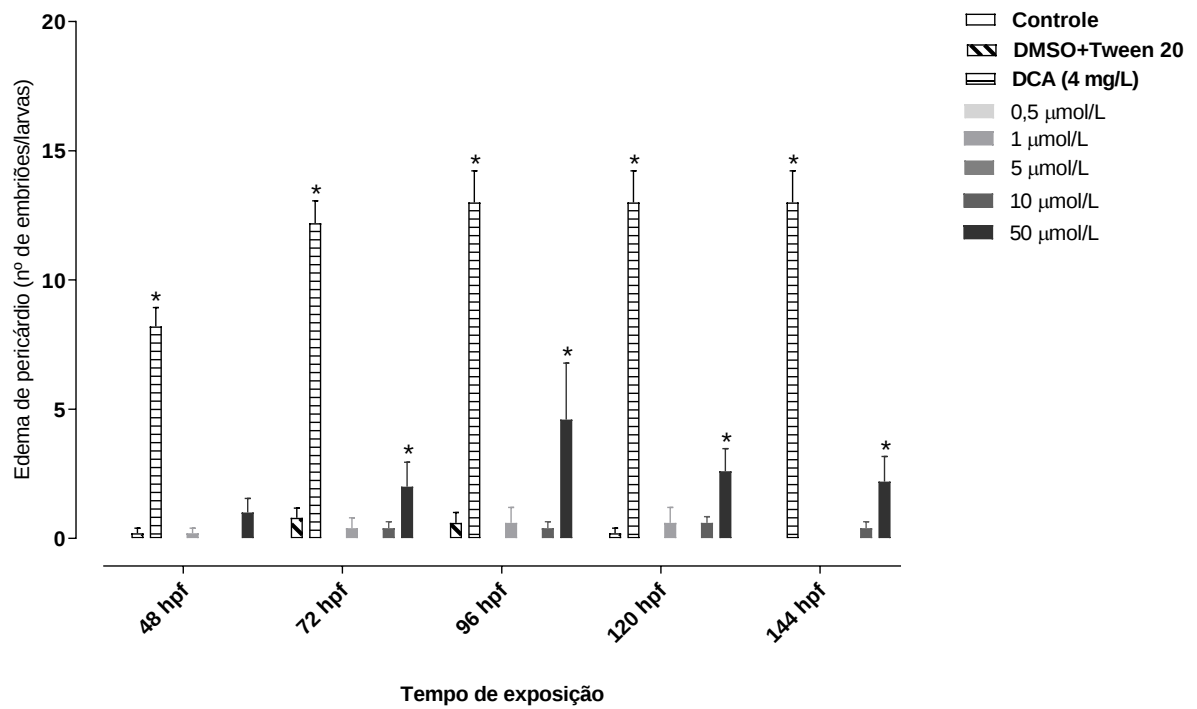
A indução de edema, efeito subletal, pôde ser observada também no pericárdio dos embriões e larvas de zebrafish. Os organismos expostos ao D5 não apresentaram edema de pericárdio de forma significativa, em relação ao grupo controle negativo (Figura 8). No entanto, a incidência deste mesmo efeito apresentou aumento significativo na concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$, em larvas expostas ao triclopir a partir de 72 até 144 hpf (Figura 9).

Figura 8. Taxa de edema de pericárdio em embriões e larvas de zebrafish expostos ao D5.



Legenda: Representação gráfica da taxa de edema de pericárdio em embriões e larvas de zebrafish por concentração e tempo de exposição ao D5. A incidência de edema de pericárdio por tempo e concentração está representada por diferentes escalas de cinza. A incidência de edema de pericárdio foi significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle quando indicado com (*).

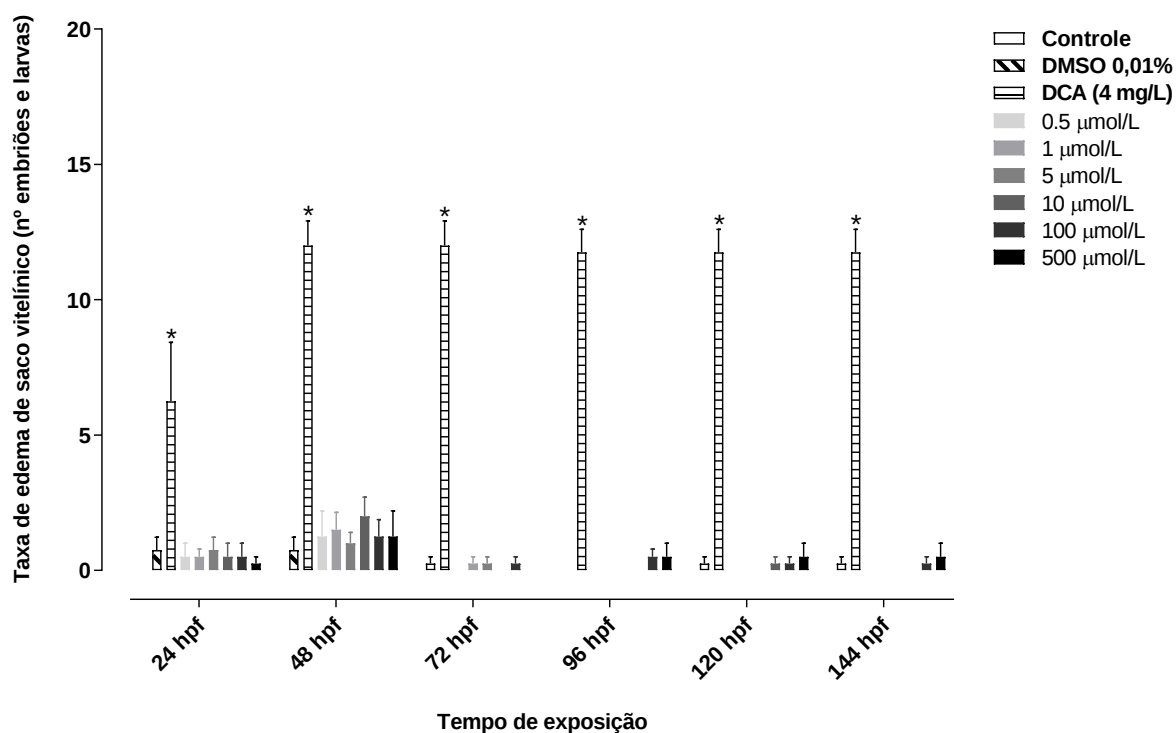
Figura 9. Taxa de edema de pericárdio em embriões e larvas de zebrafish expostos ao triclopir.



Legenda: Representação gráfica da taxa de edema de pericárdio em embriões e larvas de zebrafish por concentração e tempo de exposição ao triclopir. A proporção de edema de pericárdio por tempo e concentração está representada por diferentes escalas de cinza. O aumento da incidência de edema de pericárdio foi significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle quando indicado com (*).

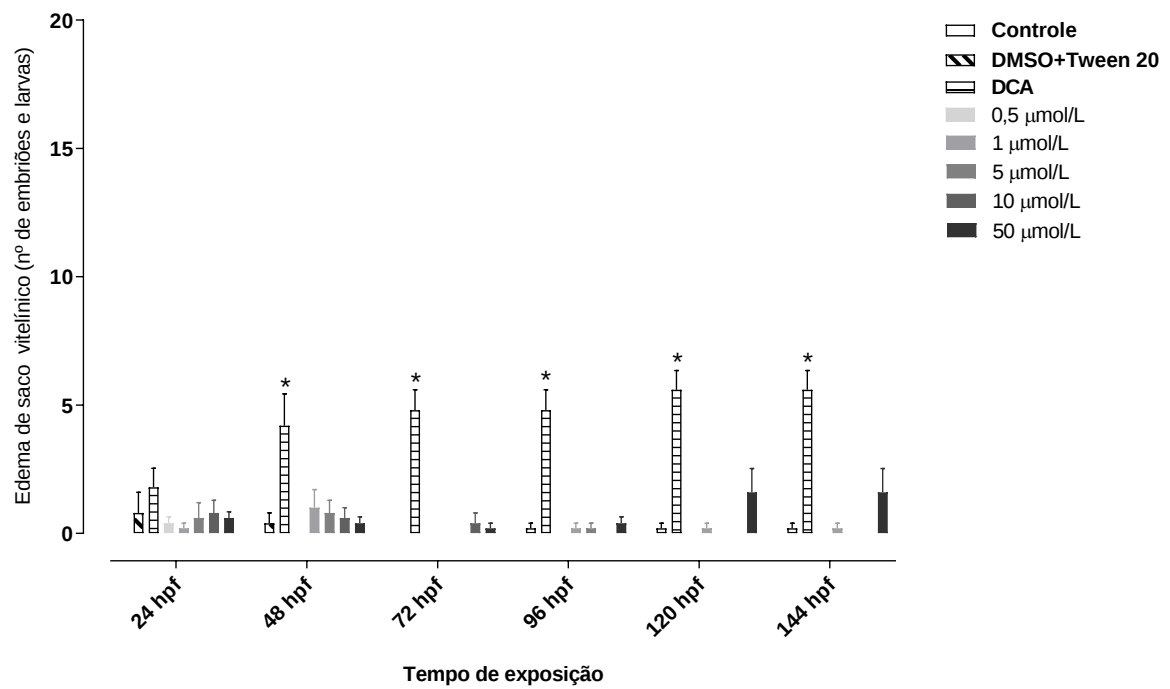
A taxa de edema de saco vitelínico não mostrou diferença significativa nos grupos tratados com D5 e triclopir quando comparada à do controle negativo após 144hpf (Figuras 10 e 11, respectivamente).

Figura 10. Taxa de edema de saco vitelínico em embriões e larvas de zebrafish expostos ao D5.



Legenda: Representação gráfica da taxa de edema de saco vitelínico de embriões e larvas de zebrafish por concentração e tempo de exposição ao D5. A proporção de saco vitelínico com edema por tempo e concentração está representada por diferentes escalas de cinza. A incidência de edema de saco vitelínico foi significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle quando indicado com (*).

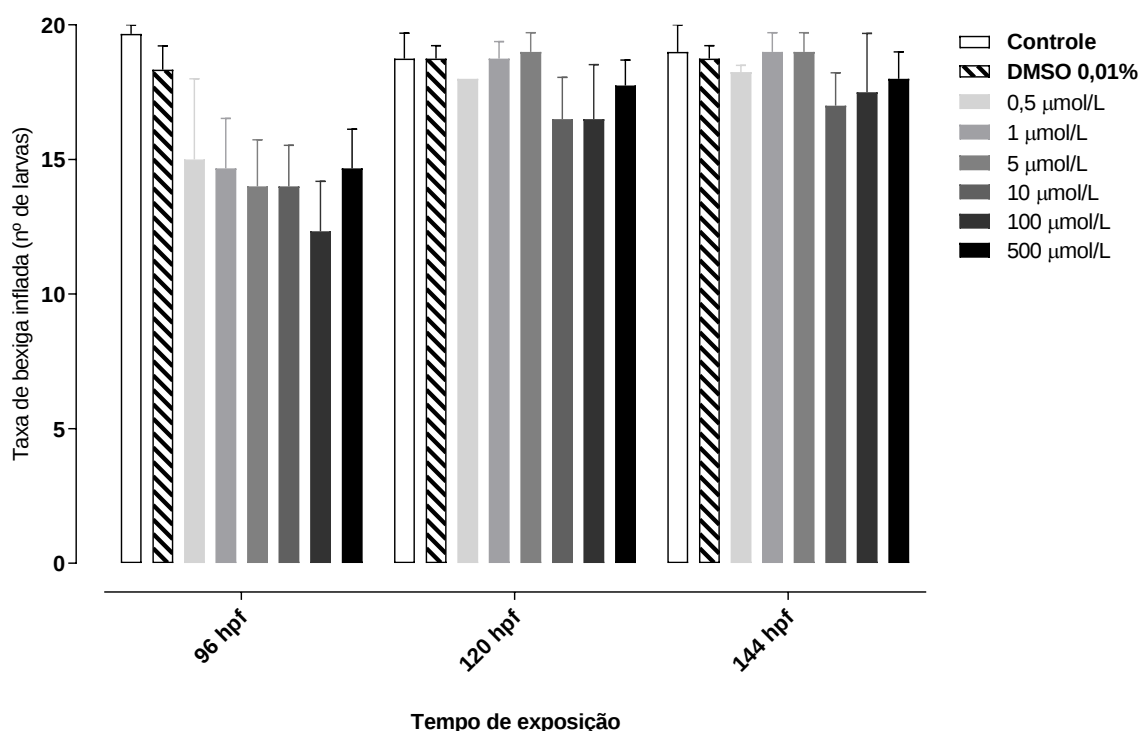
Figura 11. Taxa de edema de saco vitelínico em embriões e larvas de zebrafish expostos ao triclopir.



Legenda: Representação gráfica da taxa de edema de saco vitelínico de embriões e larvas de zebrafish por concentração e tempo de exposição ao triclopir. A proporção de saco vitelínico com edema por tempo e concentração está representada por diferentes escalas de cinza. A incidência de edema de saco vitelínico foi significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle quando indicado com (*).

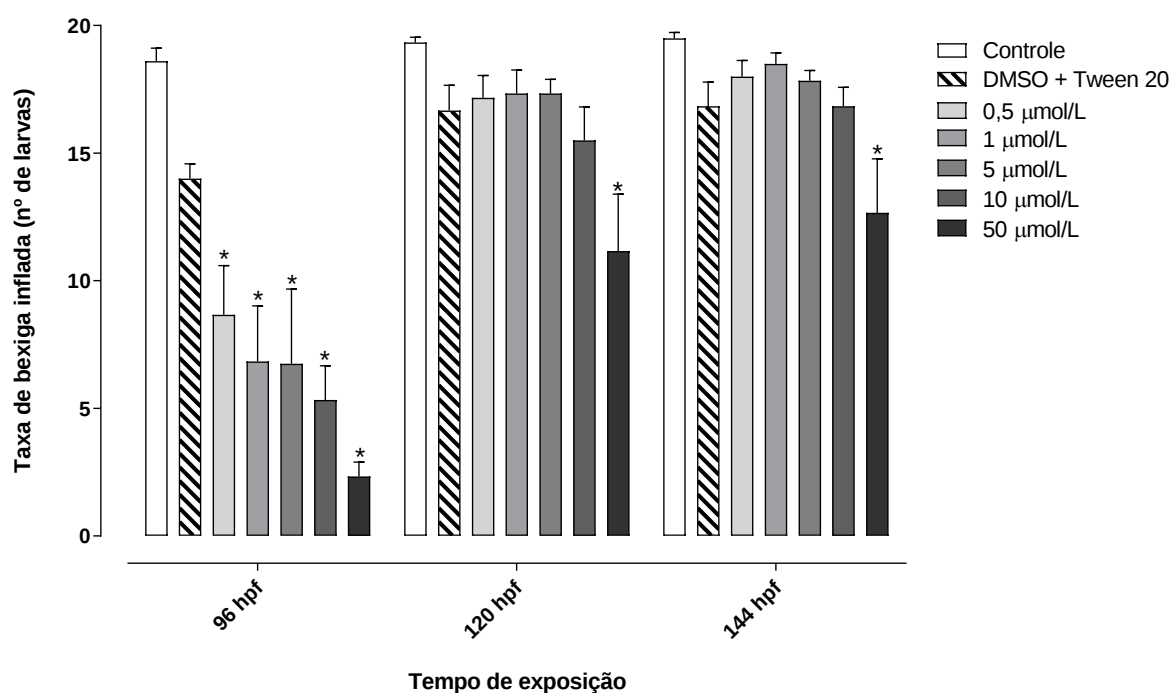
Na sequência, avaliamos o tempo de inflação da bexiga natatória. Os grupos controle negativo e solvente (DMSO 0,01%), apresentaram inflação normal da bexiga natatória entre 96 e 144 hpf. Da mesma forma, não foram observadas alterações significativas em relação a bexiga natatória nos grupos expostos ao D5 (Figura 12). Por outro lado, a exposição dos organismos a 1, 10 e 50 $\mu\text{mol/L}$ de triclopir associou-se a atraso significativo na inflação da bexiga natatória, registrado em 96 hpf. Entretanto, quando as larvas alcançaram 120 ou 144 hpf, esse atraso só se manteve significativo na concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$ (Figura 13). Quanto ao controle positivo, nenhuma larva apresentou inflação da bexiga natatória até o término do teste (dados não demonstrados).

Figura 12. Taxa de inflação da bexiga natatória em larvas de zebrafish expostas ao D5.



Legenda: Representação gráfica da taxa de bexiga natatória inflada em larvas de zebrafish expostas a D5. A proporção de bexiga natatória inflada por tempo e concentração está representada por diferentes escalas de cinza. A não inflação da bexiga natatória foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle quando indicado com (*).

Figura 13. Taxa de inflação da bexiga natatória em larvas de zebrafish expostas ao triclopir.

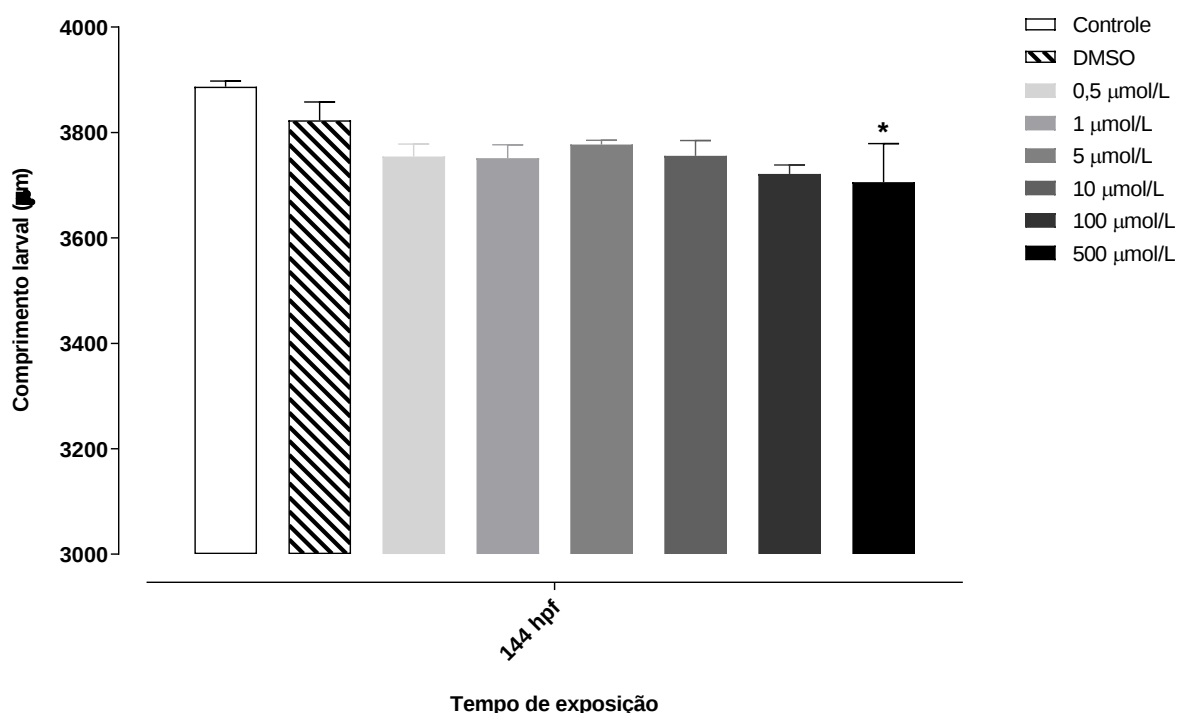


Legenda: Representação gráfica da taxa de bexiga natatória inflada em larvas de zebrafish por tempo de exposição ao triclopir. A proporção de bexiga natatória inflada por tempo e concentração está representada por diferentes escalas de cinza. A não inflação da bexiga natatória foi significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle quando indicado com (*).

A escoliose, efeito classificado como teratogênico, não foi observada nos grupos expostos ao D5. No entanto, foi observada escoliose nos organismos expostos ao triclopir, nas concentrações de 10 e 50 µmol/L de 24 até 144 hpf (dados não demonstrados).

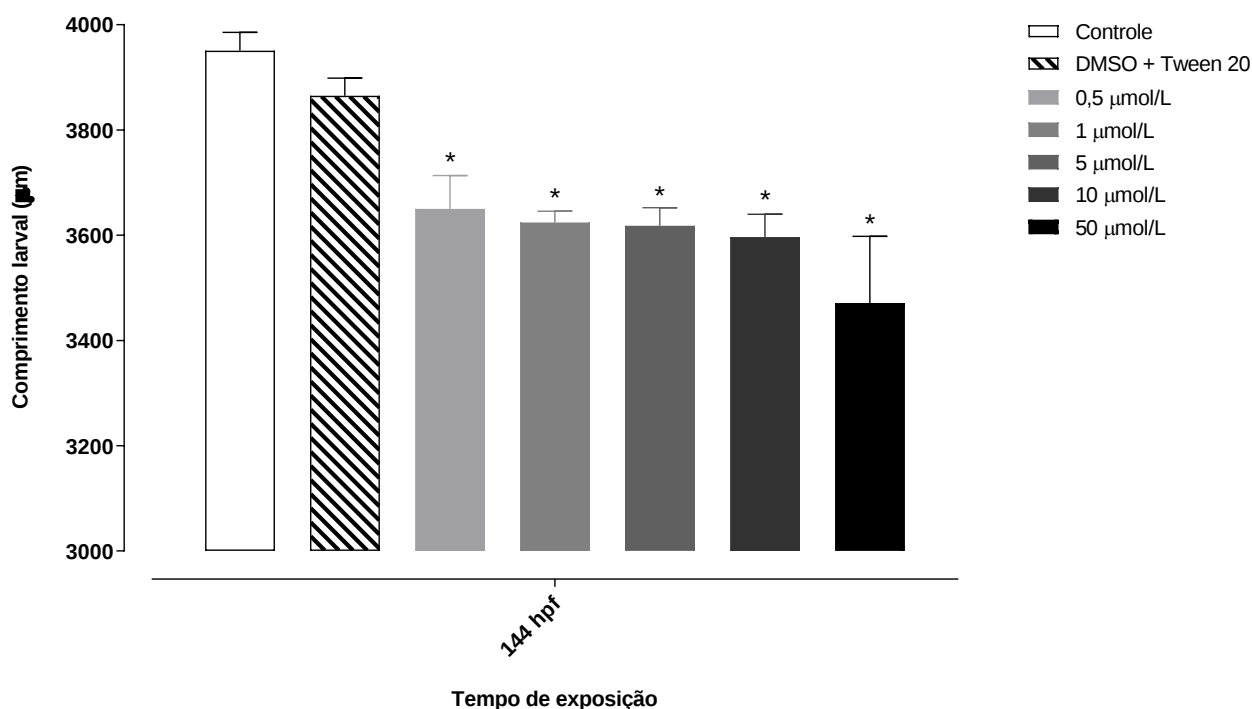
Ao final de 144 hpf, o comprimento das larvas foi medido com o software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Apenas as larvas expostas ao D5 na concentração de 500 $\mu\text{mol/L}$ mostraram comprimento reduzido de forma significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao controle negativo (Figura 14). Por outro lado, as larvas expostas ao triclopir, em todas as concentrações, mostraram tamanho reduzido significativamente ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle negativo (Figura 15).

Figura 14. Comprimento de larvas de zebrafish expostas ao D5 por 144hpf.



Legenda: Representação gráfica do comprimento de larvas expostas as concentrações testadas de D5 por até 144 hpf. O comprimento larval por concentração de exposição está representado por diferentes escalas de cinza. O comprimento das larvas dos grupos tratados foi significativamente menor ($p < 0,05$) em relação ao controle quando indicado com (*).

Figura 15. Comprimento de larvas de zebrafish expostas ao triclopir por 144hpf.



Legenda: Representação gráfica do comprimento de larvas expostas as concentrações testadas de triclopir por até 144 hpf. O comprimento larval por concentração de exposição está representado por diferentes escalas de cinza. O comprimento das larvas dos grupos tratados foi significativamente menor ($p < 0,05$) em relação ao controle quando indicado com (*).

A determinação dos indicadores de toxicidade foi baseada nos efeitos observados durante o ensaio FET e calculados através do método de TSK. Desta forma, determinamos a $CL_{50-96hpf}$ 50,07 $\mu\text{mol/L}$, e $CL_{50-144hpf}$ 47,74 $\mu\text{mol/L}$ para triclopir, de acordo com a mortalidade cumulativa observada (ovo coagulado e ausência de batimento cardíaco). A CE_{50} 38,77 para triclopir foi determinada de acordo com os efeitos induzidos a partir da exposição. Em contraste, os valores de $CL_{50-96-144hpf}$ para D5 não puderam ser determinados devido à falta de mortalidade até a concentração mais alta testada (2 mM/L). Outros estudos com D5 em peixes também não relataram efeitos sobre a sobrevivência em concentrações de exposição até sua solubilidade em água (17 $\mu\text{g/L}$) (PARROT *et al.*, 2013). Desta forma, o valor de CE_{50} , baseado nas alterações observadas, também não pôde ser determinado. Adicionalmente, calculamos o IT baseado no ensaio FETAX para dimensionar o potencial teratogênico do triclopir. Este índice foi obtido dividindo a CL_{50} (mortalidade) pela CE_{50} (malformações), assim:

$$CL_{50} / CE_{50} = IT$$

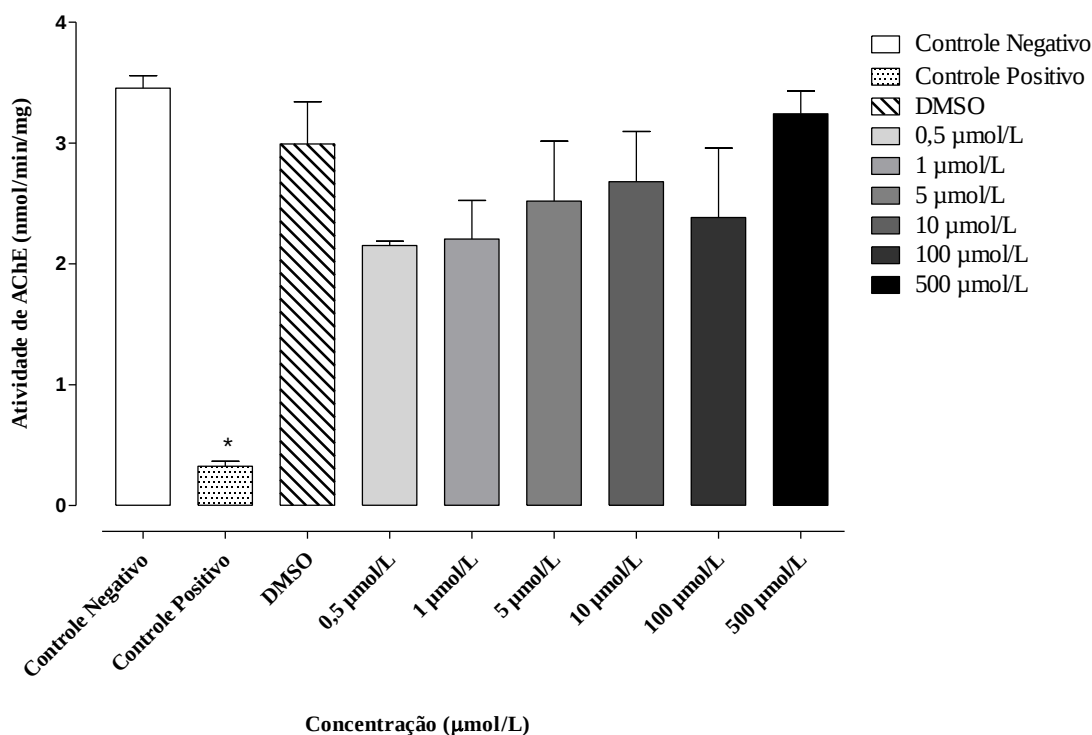
$$50,07 \mu\text{mol/L} / 38,77 \mu\text{mol/L} = 1,29$$

O ponto de corte de $IT = 1,5$ é estabelecido para classificar as substâncias em teratogênicas ($IT \geq 1,5$), ou não teratogênicas ($IT \leq 1,5$) para as espécies expostas (ASTM, 2012; Bantle *et al.*, 1996). O valor do IT obtido de 1,29 indica que o triclopir não é um composto teratogênico.

3.2. Atividade da Acetilcolinesterase

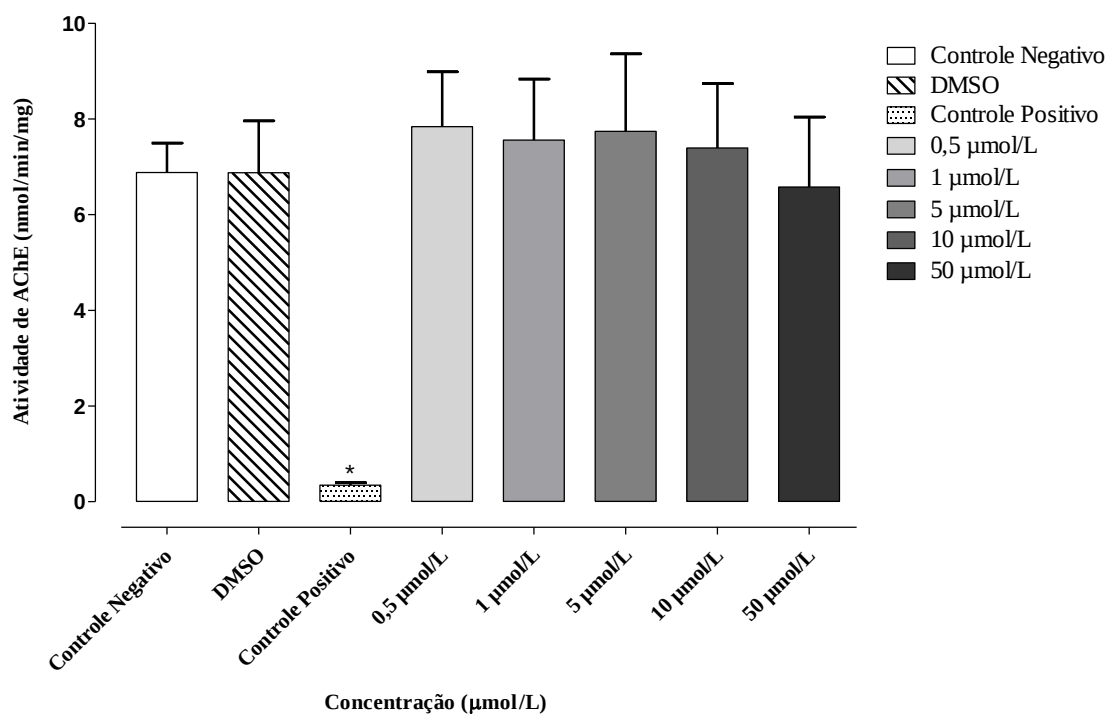
Neste estudo avaliamos a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em larvas de zebrafish em 96hpf. Nenhum dos grupos tratados com ambos os compostos mostraram resultados significativos em relação ao grupo controle negativo. Os resultados da atividade de AChE dos grupos tratados com D5 e triclopir estão representados pelas Figuras 16 e 17, respectivamente.

Figura 16. Atividade da AChE de embriões e larvas expostos ao D5.



Legenda: Atividade de acetilcolinesterase em 96hpf decorrente a exposição ao D5. A atividade da AChE foi determinada em nmol por minutos por miligrama de proteína. Consideramos valores significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle quando indicado com (*).

Figura 17. Atividade da AChE de embriões e larvas expostos ao triclopir.



Legenda: Atividade de acetilcolinesterase em 96hpf decorrente a exposição a triclopir. A atividade da AChE foi determinada em nmol por minutos por miligrama de proteína. Consideramos valores significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle quando indicado com (*).

4. DISCUSSÃO

Embora alguns estudos já tenham avaliado a toxicidade do triclopir e D5 em peixes (juvenis e adultos), pouco foi explorado sobre os efeitos desses CPEs em fases iniciais do desenvolvimento do zebrafish.

Ao final das 144 horas de exposição aos compostos, apenas as larvas de zebrafish tratadas com triclopir apresentaram efeitos letais de forma significativa, além de desenvolverem alterações subletais, incluindo edemas de saco vitelínico e de pericárdio, atraso na eclosão, não inflação da bexiga natatória. Esses efeitos representam respostas generalizadas a toxicidade decorrente da exposição aos contaminantes testados.

A toxicidade do triclopir para zebrafish foi determinada a 96 horas de exposição como concentração letal CL50_{96h} 13 mg/L (13 ppm). Essa toxicidade já era esperada, pois o mesmo composto apresentou valores de CL50_{96h} (entre 5.3 e 9.7 ppm) para cinco espécies de salmonídeos juvenis do Pacífico (WAN *et al.*, 1987), próximos ao determinado em nosso estudo. Além disso, o a formulação de TBEE também apresentou toxicidade com CL50_{96h} 0,1-10,0 ppm para salmonídeos (USEPA, 1998). Ainda, baseado em sua CL50_{96h} 13 mg/L, de acordo com a classificação GHS (2019), o triclopir é considerado perigoso para o ambiente aquático (>10 mg/L, mas ≤100 mg/L). Em contraste, não foi observado efeitos letais de forma significativa (comparado ao grupo controle negativo) em nenhum grupo tratado com D5, durante o ensaio do FET test.

De acordo com a revisão de Sahlin e Ågerstrand (2018), nenhum dos estudos de ecotoxicidade aquática disponíveis mostraram efeitos adversos de exposições ao D5, próximos da sua solubilidade em água (17 µg/L). Embora tenhamos exposto os organismos a concentrações acima deste valor de solubilidade, compreendendo concentrações presentes no ambiente (SAHLIN, ÅGERSTRAND, 2018), nossos resultados não demonstraram de forma significativa, a toxicidade do D5 na exposição aguda. Desta forma, devido a seu alto potencial de bioacumulação (GOBAS *et al.*, 2015), sugere-se que a abordagem da toxicidade crônica do D5, seja levada em consideração.

Desde a fecundação, o córion fornece uma proteção para o embrião do zebrafish, contra agentes do ambiente externo, até o momento da eclosão (KIMMEL *et al.*, 1995). Esta estrutura apresenta poros (aproximadamente 0,5 µm de diâmetro), os quais permitem a passagem de pequenas moléculas para o ambiente interno do ovo, favorecendo o contato direto com o embrião. No entanto, os mesmos poros podem reter moléculas com tamanho >3 kDa (CHENG *et al.* 2007). Neste contexto, baseado nas características físico-químicas (peso molecular e log K_{ow}) do D5 e do triclopir, podemos inferir que, houve a passagem, seguida do

contato direto dos dois compostos com o embrião do zebrafish, o que resultou nos efeitos observados em menos de 24hpf, antes mesmo da eclosão (48-72hpf) (KIMMEL *et al.*, 1995).

O atraso no processo de eclosão dos ovos de zebrafish também foi observado. Apenas os embriões expostos ao herbicida triclopir, na concentração de 50 µmol/L, apresentaram uma diminuição na taxa de eclosão de 24% em 72 até 144hpf. De forma semelhante, uma diminuição significativa na taxa de eclosão também foi observada por Ahmad *et al.* (2020), na exposição à 39 µmol/L de triclopir por 96 horas.

O processo de eclosão é crucial no desenvolvimento do zebrafish. Este processo inclui a ação proteolítica da enzima ZHE1, a qual é inteiramente responsável pela digestão interna do córion, e pela força mecânica exercida pelos movimentos dos embriões dentro do córion (SANO *et al.*, 2008; ALMOND, TROMBETA *et al.*, 2016). De acordo com nossos resultados obtidos, sugerimos que a exposição ao triclopir tenha induzido distúrbios estruturais ou funcionais durante o desenvolvimento do embrião do zebrafish, o que pode estar associado ao atraso no desenvolvimento embrionário resultando na alteração da força mecânica exercida pelos embriões para a eclosão do ovo (HAENDEL *et al.*, 2004). Neste contexto, a alteração dos níveis de neurotransmissores também poderia estar relacionada com o enfraquecimento do movimento muscular espontâneo pelos embriões, implicando no processo de eclosão (WARKENTIN, 2007; SAMAE *et al.*, 2015). No entanto, a atividade da AChE não apresentou alterações significativas na exposição ao triclopir. Por outro lado, Gaaied *et al.* (2020) demonstrou que a atividade da AChE foi reduzida de forma significativa na exposição de embriões de zebrafish ao ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) na faixa de 0,090 a 3 µmol/L por 96hpf (GAAIED *et al.*, 2020). Desta forma, como hipótese alternativa, a provável perturbação no processo de eclosão observado em nosso estudo, seja a diminuição ou inibição da atividade das glândulas secretoras de enzimas digestivas do córion, induzidas pelo triclopir (DE LA PAZ *et al.*, 2017).

Embora não tenham sido significativos, edemas de pericárdio e de saco vitelínico foram os efeitos subletais mais observados em todas as concentrações de ambos os contaminantes avaliados. No entanto, de acordo com Hellfeld *et al.* (2020) edemas de pericárdio e saco vitelínico são efeitos subletais inespecíficos, e em alguns casos podem ser reversíveis, como observado em seu estudo com 48 substâncias testadas (HELLFELD *et al.* 2020).

Os defeitos no desenvolvimento da bexiga natatória podem indicar risco ambiental relacionado a exposição a contaminantes (CAIONI *et al.*, 2021). A não inflação da bexiga natatória foi observada tanto na exposição ao D5 quanto ao triclopir. No zebrafish, a bexiga

natatória tem sua inflação iniciada logo em 96hpf (KIMMEL *et al.*, 1995). Embora a não inflação da bexiga natatória seja um efeito subletal, esse desfecho afeta aspectos relevantes para a avaliação de riscos ambientais, como comportamento alimentar, fuga de predadores, crescimento e reprodução em peixes (GEE, 1984). O comprometimento desses aspectos pela não inflação da bexiga natatória diminui a probabilidade de sobrevivência, especialmente em habitats naturais onde os recursos alimentares são limitados (VILLENEUVE *et al.*, 2014). Os mecanismos que levam a este desfecho foram pouco explorados. No entanto, acreditasse que a pressão do aumento do tamanho do saco vitelino, assim como observado na exposição ao triclocarban (TCC), pode afetar o a bexiga natatória, causando prejuízo da inflação (CAIONI *et al.*, 2021). Adicionalmente, escoliose foi observada nos organismos expostos apenas as concentrações de 10 a 50 $\mu\text{mol/L}$ de triclopir e, assim como a não inflação da bexiga natatória, este desfecho teratogênico pode afetar diretamente o sucesso na busca de alimentos e predação dos organismos afetados.

Por fim, os estudos de toxicidade de CPEs são de grande valia e fornecem informações que possibilitam a predição dos possíveis impactos desses contaminantes a curto e longo prazo, tanto para a saúde ambiental, quanto para a saúde animal e humana. Neste contexto, o presente estudo, tendo utilizado o zebrafish como modelo experimental, apresenta dados toxicológicos importantes sobre dois contaminantes de preocupação emergente, triclopir e D5. Desta forma, dados como os obtidos nesse trabalho podem embasar as tomadas de decisões de agências regulatórias, no sentido de determinação dos potenciais impactos, no desenvolvimento de estratégias para o gerenciamento de riscos, além da criação de programas de monitoramento contínuo desses contaminantes.

5. CONCLUSÃO

Efeitos letais e subletais foram induzidos nas primeiras fases de desenvolvimento do zebrafish pelo herbicida triclopir na faixa de concentração testada (0,5-100 $\mu\text{mol/L}$). Por outro lado, os efeitos observados na exposição aguda ao D5 não se mostraram significativos, sugerindo que este siloxano, nas concentrações testadas (0,5-500 $\mu\text{mol/L}$), não é tóxico para as primeiras fases de desenvolvimento do zebrafish. Ainda, concluímos que, ambos compostos não apresentam neurotoxicidade em embriões e larvas de zebrafish até 96 horas de exposição. Ainda, de uma perspectiva ecotoxicológica e uma vez que peixes são componentes importantes da cadeia alimentar, esses efeitos observados nos organismos expostos aos contaminantes avaliados, têm implicações para sua sobrevivência e consequente manutenção populacional. Além disso, tais efeitos podem ser estendidos a outros organismos, principalmente ao homem, dada a alta conservação genética e metabólica entre estas espécies.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP: Processo nº 18/00229-1, São Paulo, Brasil).

REFERÊNCIAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Regularization of Products – Pesticides: Reassessment of Pesticides [Internet]. Brasília; 2020. [citado 8 Jun 2020]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/andidaos/produtos/andidaos-de-agrotoxicos#:~:text=Com%20%20reavalia%C3%A7%C3%A3o%20de%20agrot%C3%B3xicos,riscos%20relacionados%20%20agrot%C3%B3xicos%20com>
- Ahmad F, Ali S, Richardson MK. Effect of pesticides and metals on zebrafish embryo development and larval locomotor activity. *bioRxiv* 2020.10.05.326066; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.05.326066>
- Almond KM, Trombetta LD. The effects of copper pyrithione, an antifouling agent, on developing zebrafish embryos. *Ecotoxicology* 2016;25:389–398.
- Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248-254.
- Braunbeck T, Kais B, Lammer E, Otte J, Schneider K, Stengel D, *et al.* The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environ Sci Pollut Res* 2015;22:16247–16261.
- Caioni G, d'Angelo M, Panella G, Merola C, Cimini A, Amorena M, *et al.* Environmentally relevant concentrations of triclocarban affect morphological traits and melanogenesis in zebrafish larvae. *Aquatic Toxicology* 2021;236:105842.
- Cui, S. *et al.* Trophic transfer of cyclic methyl siloxanes in the marine food web in the Bohai Sea, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2019;178:86–93.
- De la Paz JF, Beiza N, Paredes-Zúñiga S, Hoare MS, Allende ML. Triazole Fungicides Inhibit Zebrafish Hatching by Blocking the Secretory Function of Hatching Gland Cells. *Int J Mol Sci.* 2017;18(4):710.
- de Oliveira GA, de Lapuente J, Teixidó E, Porredón C, Borràs M, de Oliveira DP. Textile dyes induce toxicity on zebrafish early life stages. *Environ Toxicol Chem.* 2016;35(2):429-34
- Directive 2018/35/EU of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards octamethylcyclotetrasiloxane ('D4') and decamethylcyclopentasiloxane ('D5'). Official Journal of the European Union, L:6/45-47, January 10, 2018. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0035&from=EN>
- ECHA. 2017. REACH Registration Dossier: Decamethylcyclopentasiloxane. Last modified 12-Apr-2017. First published 02-Mar-2011. European Chemicals Agency. <https://echa.europa.eu/sv/registration-dossier/-/registered-dossier/14807> (Accessed February 02, 2021).
- Ellman GL, Courtney KD, Junior VA, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 1961;7:88-95.
- Environmental Protection Agency (EPA). Siloxanes (D3, D4, D5, D6, HMDS): Evaluation of health hazards and proposal of a health-based quality criterion for ambient air. 2014; Environmental Project No. 1531.

Fairbrother A, Burton GA, Klaine SJ, Powell DE, Staples CA, Mihaich EM, Woodburn KB, Gobas FAPC. Characterization of ecological risks from environmental releases of decamethylcyclopentasiloxane (D5). *Environ. Toxicol. Chem.* 2015;34:2715-2722.

Fliedner A, Rüdel H, Dreyer A, Pirntke U, Koschorreck J. Chemicals of emerging concern in marine specimens of the German Environmental Specimen Bank. *Environ Sci Eur.* 2020;32(36):1-17.

Gaaied S, Oliveira M, Domingues I, Banni M. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid herbicide effects on zebrafish larvae: development, neurotransmission and behavior as sensitive endpoints. *Environmental Science and Pollution Research* 2020;27:3686–3696.

Garcia GR, Noyes PD, Tanguay RL. Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology. *Pharmacol. Therapeut.* 2016;161:11–21.

Gee JH. Ecological implications of buoyancy control in fish. In: Webb PW, Weihs D, editors. *Fish Biomechanics*. New York: Praeger-Scientific; 1984. p. 140-176.

Geissen V, Mol H, Klumpp E, Umlauf G, Nada M, Ploeg M, et al. Emerging Pollutants in the environment: A challenge for water resource management. *Int. Soil Water Conse.* 2015;3(1):57-65

Gonçalves ÍFS, Souza TM, Vieira LR, Marchi FC, Nascimento AP, Farias DF. Toxicity testing of pesticides in zebrafish-a systematic review on chemicals and associated toxicological endpoints. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2020;27(10):10185-10204.

González-Rubio S, Ballesteros-Gómez A, Asimakopoulos AG, Jaspers VLB, A review on contaminants of emerging concern in European raptors (2002–2020). *Science of The Total Environment* 2021;760.

Guilherme S, Santos MA, Gaivão I, Pacheco M. Genotoxicity Evaluation of the Herbicide Garlon® and Its Active Ingredient (Triclopyr) in Fish (*Anguilla anguilla* L.) Using the Comet Assay. *Environ. Toxicol.* 2015; 30(9): 1073-81.

Haendel MA, Tilton F, Bailey GS, Tanguay RL. Developmental toxicity of the dithiocarbamate pesticide sodium metam in Zebrafish. *Fundamental and Applied Toxicology* 2004;81(2):390-400.

Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 1977;714-719.

Hellfeld R, Brotzmann K, Baumann L, Strecker R, Braunbeck T. Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ Sci Eur* 2020;32:122.

Horzmann KA, Freeman JL. Making Waves: New Developments in Toxicology With the Zebrafish. *Toxicol. Sci.* 2018;163(1):5-12.

Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 2013;496:498–503.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA). Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais> Acesso em: 27/02/2021.

Jeschke P. Progress of modern agricultural chemistry and future prospects. *Pest Manag. Sci.* 2016;72:433–455.

Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 1995;203(3):253-310.

Klaunig JE, Dekant W, Plotzke K, Scialli AR. Biological relevance of decamethylcyclopentasiloxane (D5) induced rat uterine endometrial adenocarcinoma tumorigenesis: Mode of action and relevance to humans. *Regul. Toxicol. Pharm.* 2016;74:44-56.

Kreutzweiser DP, Holmes SB, Eichenberg DC. Influence of Exposure Duration on the Toxicity of Triclopyr Ester to Fish and Aquatic Insects. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1994;26:124-129.

LeFauve MK, Connaughton VP. Developmental exposure to heavy metals alters visually-guided behaviors in zebrafish. *Curr Zool.* 2017;63(2):221-227.

Mackay D, Cowan-Ellsberry CE, Powell DE, Woodburn KB, Shihe XU, GARY E. Kozerski GE, Kim J. Decamethylcyclopentasiloxane (D5) environmental sources, fate, transport, and routes of exposure. *Environ. Toxicol Chem.* 2015;34(12):2689–2702.

Nagel R. DarT: the embryo test with the zebrafish *Danio rerio* e a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* 2002;19(Suplemento 1):38-48.

Nowakowska K, Giebułtowicz J, Kamaszewski M, Adamski A, Szudrowicz H, Ostaszewska T, et al. Acute exposure of zebrafish (*Danio rerio*) larvae to environmental concentrations of selected antidepressants: Bioaccumulation, physiological and histological changes, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2020;229.

Oliveira DP, Dorta DJ. Contaminantes emergentes da água. In: Oga S, Camargo MMA, Batstuzzo JAO, editores. *Fundamentos de toxicologia*, 4ª ed. São Paulo: Atheneu; 2014. 685 p.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing. Paris; 2013.

Padilla S, Glaberman S. The zebrafish (*Danio rerio*) model in toxicity testing. In: Pope CN, Liu J, editores. *An Introduction to Interdisciplinary Toxicology, From Molecules to Man*. Academic Press: 2020. p. 525-532.

Parrott JL, Alaei M, Wang D, Sverko E. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryo to adult exposure to decamethylcyclopentasiloxane (D5). *Chemosphere* 2013;9:813-818.

Pereira AC, Gomes T, Machado MRF, Rocha TL. The zebrafish embryotoxicity test (ZET) for nanotoxicity assessment: from morphological to molecular approach. *Environmental Pollution*, 2019;252(Part B):1841-1853.

Pereira LC, Souza AO, Bernardes MFF, Pazin M, Tasso MJ, Pereira PH, et al. A perspective on the potential risks of emerging contaminants to human and environmental health. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2015;22:13800-13823

Poynton HC, Robinson WE. Contaminants of Emerging Concern, With isso Emphasis on Nanomaterials and Pharmaceuticals. In: Török B, Dransfield, editor. *Green Chemistry An Inclusive Approach*. Elsevier; 2018. P. 291-315.

Raghav M, Eden S, Mitchell K, Witte B. Contaminants of Emerging Concern in Water. *Water Resources Research Center. College of Agriculture and Life Sciences: The University of Arizona*; 2013.

Reddy TP, Manczak M, Calkins MJ, Mao P, Reddy AP, Shirendeb U, et al. Toxicity of Neurons Treated with Herbicides and Neuroprotection by MitochondriaTargeted Antioxidant SS31. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 2011;8(1):203-221.

Richardson SD, Kimura SY. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.* 2016;88(1):546–582.

Sahlin S, Ågerstrand M. Decamethylcyclopentasiloxane (D5). EQS data overview. The Department of Environmental Science and Analytical Chemistry (ACES). Stockholm University. Stockholm; 2018.

Samaee SM, Rabbani S, Jovanovic B, MohajeriTehrani MR, Haghpanah V. Efficacy of the hatching event in assessing the embryo toxicity of the nano-sized TiO(2) particles in zebrafish: a comparison between two different classes of hatching-derived variables, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2015;116:121–128

Sano K, Inohaya K, Kawaguchi M, Yoshizaki N, Iuchi I, Yasumasu S. Purification and characterization of zebrafish hatching enzyme – an evolutionary aspect of the mechanism of egg envelope digestion. *FEBS J.* 2008;275:5934-5946.

Scholz S, Fischer S, Gündel U, Küster E, Luckenbach T, Voelker D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment–applications beyond acute toxicity testing. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2008;15(5):394–404.

Suvarchala G, Philip GH. Toxicity of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol tested at multiple stages of zebrafish (*Danio rerio*) development. *Environ. Sci. Pollut. R.* 2016;23:15515-15523.

Taheran M, Naghdia M, Brar SK, Verma M, Surampalli RY. Emerging contaminants: Here today, there tomorrow! *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag.* 2018;10:122–126.

Teame T, Zhang Z, Ran C, Zhang H, Yang Y, Ding Q, et al. The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Animal Frontiers* 2019;9(3):68-77.

Torres T, Cunha I, Martins R, Santos MM. Screening the Toxicity of Selected Personal Care Products Using Embryo Bioassays: 4-MBC, Propylparaben and Triclocarban. *Int J Mol Sci.* 2016;17(10):1762.

United Nations Environment Programme (UNEP). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: An Emerging Issue. Global Programme of Action for the Protection of the Marine Environment from Land-Based Activities; 2017.

USEPA. 1998. Triclopyr reregistration eligibility decision (RED). USEPA 38-R-98-011, Washington, D.C.

Velicogna J, Ritchie E, Princz J, Lessard M, Scroggins R. Ecotoxicity of siloxane D5 in soil. *Chemosphere* 2012;87:77–83.

Villeneuve D, Volz DC. Embryo, M.R., Ankley, G.T., Belanger, S.E., Léonard, M, et al. Investigating alternatives to the fish early-life stage test: a strategy for discovering and annotating adverse outcome pathways for early fish development. *Environ. Toxicol. Chem.* 2014;33:158-169.

Wan, MT, Moul DJ, Watts RG. Acute toxicity to juvenile pacific salmonids of Garlon 3A, triclopyr, triclopyr ester and their transformation products; 3,5,6- trichloro-2-pyridinol and 2-methoxy-3,5,6-trichloropyridine. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 1987;39:721–728.

Wang D, Norwood W, Alae M, Byer JD, Brimble S. Review of recent advances in research on the toxicity, detection, occurrence and fate of cyclic volatile methyl siloxanes in the environment. *Chemosphere* 2013;93:711-725.

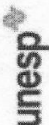
Warkentin KM. Oxygen, gills, and embryo behavior: mechanisms of adaptive plasticity in hatching, *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* 2007;148:720–731.

Wiegand, J. (2019). “Anatomical and behavioral effects of developmental exposure to decamethylcyclopentasiloxane (D5) and 2, 4, 6, 8-tetramethylcyclotetrasiloxane.” American University, i-37.

Xue X, Jia H, Xue J. Bioaccumulation of Methyl Siloxanes in Common Carp (*Cyprinus carpio*) and in an Estuarine Food Web in Northeastern China. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 2019;76:496–507.

ANEXO

Anexo 1. Certificado de aprovação de projeto experimental pelo CEUA da Faculdade de Medicina de Botucatu.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA



FACULDADE DE MEDICINA
FMB
BOTUCATU



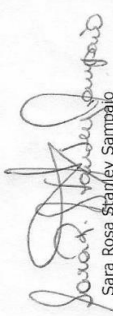
CEUA
Ética

Comissão de Ética no Uso de Animais
Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1300/2019-CEUA

Certificamos que o projeto intitulado: **"Efeitos letais e sub-letais sobre desenvolvimento embrio-larval de Zebrafish decorrente da exposição aos contaminantes ambientais: Decametildiclopentasiloxane e Tricloprir."**, conduzido pelo Pesquisador: **Ítalo Berton Lopes de Andrade** – Orientadora: Prof^{da}. Dra. Lillian Cristina Pereira, registrada com o nº **1300/2019**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião de 19 de junho de 2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	09 de janeiro de 2022
Espécie/Linhagem/Raça	Peixe – Zebrafish
Nº de animais	30
Idade/Peso	0,4817 gramas
Sexo	Fêmea / Macho
Origem	Biotério – UPEA



Sara Rosa Stanley Samúdio
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP



Prof. Bertila Fuhlen-Polegato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Distrito Rubião Junior, s/nº – Botucatu – S.P. CEP: 18.618-970 Fones: (14) 3680.18.80 – E-mail: Secretaria.ceua@fmb.unesp.br