

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste documento será disponibilizado somente a partir de 17/12/2026.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Instituto de Biociências - Campus de Botucatu

CRISTINA VIRIATO DE FREITAS

**EFEITOS DO HERBICIDA 2,4-D (ÁCIDO 2,4-DICLOROFENÓXIACÉTICO) E SEU
PRODUTO FORMULADO (SAL DE DIMETILAMINA) SOBRE EMBRIÕES,
LARVAS E ADULTOS DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Botucatu

2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"

**EFEITOS DO HERBICIDA 2,4-D (ÁCIDO 2,4-DICLOROFENÓXIACÉTICO) E SEU
PRODUTO FORMULADO (SAL DE DIMETILAMINA) SOBRE EMBRIÕES,
LARVAS E ADULTOS DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Cristina Viriato de Freitas

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor, junto ao Programa de Pós-
Graduação em BIOTECNOLOGIA.

Profa. Dra. Lílian Cristina Pereira

Botucatu - SP

2025

SÃO PAULO STATE UNIVERSITY "JULIO DE MESQUITA FILHO"

**EFFECTS OF THE HERBICIDE 2,4-D (2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID)
AND ITS FORMULATED PRODUCT (DIMETHYLAMINE SALT) ON EMBRYOS,
LARVAE, AND ADULTS OF ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Cristina Viriato de Freitas

Thesis presented to the Institute of
Biosciences, Botucatu Campus, UNESP, to
obtain the title of Doctor, along with the
Graduate Program in BIOTECHNOLOGY.

Profa. Dra. LÍlian Cristina Pereira

Botucatu - SP

2025

V818e

Viriato, Cristina

Efeitos do herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenóxiacético) e seu produto formulado (sal de dimetilamina) sobre embriões, larvas e adultos de zebrafish (*Danio rerio*) / Cristina Viriato. -- Botucatu, 2025
135 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências, Botucatu
Orientadora: Lílían Cristina Pereira

1. Toxicologia ambiental. 2. Aquicultura. 3. Organismos aquáticos.
4. Agricultura. 5. Produtos químicos agrícolas. I. Título.

Contextualização biotecnológica e social

Impacto potencial desta pesquisa:

O estudo tem impacto direto na ciência, na saúde ambiental, na regulação e nas práticas agrícolas. Possui potencial para a melhoria do conhecimento toxicológico desses produtos químicos, uma vez que são amplamente utilizados em nosso país e no mundo. Elucida mecanismos de ação, diferencia o ingrediente ativo do produto formulado, e valida protocolos experimentais em zebrafish, com importância para a ecotoxicologia, avaliando o risco ecológico. Também está inserido na ciência translacional, atuando na conscientização pública, por meio de publicações reconhecidas internacionalmente e orientando a melhor utilização desses produtos químicos.

Potential impact of this research:

This study has a direct impact on science, environmental health, regulation, and agricultural practices. It has the potential to improve the toxicological knowledge of these chemicals, since they are widely used in our country and worldwide. It elucidates mechanisms of action, differentiates the active ingredient from the formulated product, validates experimental protocols with zebrafish, which is important for ecotoxicology, and assesses ecological risk. It is also part of translational science, contributing to public awareness through internationally recognized publications, guiding the better use of these chemicals.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Efeitos do herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenóxiacético) e seu produto formulado (sal de dimetilamina) sobre embriões, larvas e adultos de zebrafish (*Danio rerio*)

AUTORA: CRISTINA VIRIATO DE FREITAS

ORIENTADORA: LÍLIAN CRISTINA PEREIRA ORIENTADOR DE MOBILIDADE: CHANTAL LANCTOT (Internacional)

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LÍLIAN CRISTINA PEREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / UNESP / Câmpus de Botucatu - FCA

Dra. FLÁVIA YOSHIE YAMAMOTO (Participação Virtual)
NEPEA - UNESP

Prof. Dr. BRUNO FIORELINI PEREIRA (Participação Virtual)
x / Universidade Federal do Oeste da Bahia

Prof. Dr. LÁZARO WENDER OLIVEIRA DE JESUS (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / UNESP / Câmpus de Botucatu - IBB

Prof. Dr. FÁBIO KUMMROW (Participação Virtual)
Ciências Farmacêuticas / UNIFESP

Botucatu, 17 de dezembro de 2025.



Renan Codeco da Silva

Assistente Técnico Administrativo I da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu

*Aos meus pais, Airton e Marina
e à minha irmã Viviany.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

À minha orientadora, Profa. Dra. LÍlian Cristina Pereira, pela receptibilidade e confiança desde o início, mesmo antes de entrar no programa de biotecnologia, por toda ajuda, dedicação, esforço, carinho e por todos os conselhos e ensinamentos, não só sobre o mundo acadêmico, mas sobre a vida.

Aos meus orientadores da Austrália, Dra. Chantal Lanctot e Dr. Steve Melvin por todo apoio, carinho, recepção e disposição. Por transferir seus conhecimentos tão atenciosamente e além do mundo acadêmico, agradeço os bons momentos vivenciados fora dos estudos.

Aos queridos Professores Didier Quevedo, José Pantoja, Cristiano Funari e Martin Leme por toda ajuda e esforço para a realização do manuscrito e análises.

Aos nossos queridos técnicos, Paulo Roberto Cardoso, por todo apoio e auxílio durante esses quatro anos, ao Diego Generoso, José Roberto, Paula Kawashi e Wilma Alves por toda ajuda. Vocês foram muito importantes pra mim.

Aos meus queridos amigos do laboratório TOXICAM, Paloma Peixoto, Ítalo Bertoni, Natália Akemi, Luiza Aggio, Emanuelle Gomes, Joyce Rizzi e Danielle Seloto, pelo apoio e amizade de sempre nos momentos mais difíceis.

Aos meus queridos amigos da Austrália, Felicia, Matt, Ryan, Vito, Nikol, Shritika, Rameesha, Elissa, Meg, Marteen, Gab, Taryn, Racha, Clarissa, Jhon, Linda, Alison, Chen, Kim, James, Marcela e Guilherme por todo apoio e amizade além dos estudos.

Aos meus queridos amigos da vida, Jhúlia de Abreu Nogueira, Ramon Alves da Cunha, Janaina Oliveira, Claudia Oliveira, Thais Tavares, Ana Carla, Larissa Malise Marques, Larissa Sposito, Fernanda Menezes, Cláudia Maris, Bhrenda, Carlos e Bruno, pela amizade de sempre, apoio e incentivo.

À minha família, Airton Viriato, Marina Viriato, Viviany Viriato, Roberta Santos, Roseli Avanti, Luiz Antonio Avanti, Rubens Avanti (*in memorian*), Arlindo Avanti (*in memorian*), Mariza Lourenço Victor Santos e à toda família, pelo apoio e incentivo nos bons momentos e também nos mais difíceis. Vocês são muito importantes pra mim.

Ao laboratório TOXICAM, à UNIPEX (Unidade de Pesquisa Experimental) e à Griffith University (Austrália) pelo suporte financeiro e apoio aos experimentos realizados.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo nº: 2020/07363-5 e 2024/01989-0) pelo suporte financeiro indispensável para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	i
Abreviaturas.....	v
Resumo Geral.....	vi
General Abstract.....	vii
1. Introdução Geral.....	1
1.1. Praguicidas.....	1
1.2. Métodos Alternativos em avaliação toxicológica.....	5
1.3. Zebrafish.....	7
1.4. Referências Bibliográficas.....	14

CAPÍTULO 1:

Multi-biomarker for integrated assessment of the toxicity of the herbicide 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and its commercial formulation (DMA® 806) in zebrafish (*Danio rerio*)

Abstract.....	27
1. Introduction.....	28
2. Materials and methods.....	30
2.1. Test organism: maintenance and acquisition of eggs.....	30
2.2. Substances and concentrations to be tested.....	31
2.3. Toxicity tests utilizing the embryonic and larval stages of zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	32
2.4.1. <i>FET (Fish Embryo Toxicity) test</i>	32
2.4.2. <i>Exposure at 144 hours post-fertilization (hpf)</i>	33
2.4.3. <i>Neurotoxicity Analysis via Acetylcholinesterase (AChE) Enzyme Activity</i>	34
2.4.4. <i>Detection of Genotoxicity via Comet Assay in Zebrafish Larvae</i>	34
2.5. Short-term Toxicity Test Using Adult Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	35
2.5.1. <i>Micronucleus (MN) and Nuclear Abnormalities (NA) Test</i>	36
2.5.2. <i>Histopathological Analysis</i>	37
2.6. Statistical Analysis.....	38
3. Results.....	39
4. Discussion.....	49
5. References.....	53

CAPÍTULO 2:

Bioenergetics, metabolomics and behavioral analysis to assess the toxicity of the herbicide 2,4-D (dichlorophenoxyacetic acid and dimethylamine salt) in zebrafish (*Danio rerio*) embryos

Abstract.....	64
1. Introduction.....	65
2. Materials and methods.....	67
2.1. Test organism: maintenance and egg acquisition	67
2.2. Substances and concentrations to be tested.....	67
2.3. Metabolomics.....	68
2.3.1. <i>Extraction of zebrafish larvae metabolites</i>	68
2.3.2. <i>Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy</i>	69
2.3.3. <i>Peak assignments and processing of ¹H NMR spectra</i>	69
2.4. Analysis of induced neurotoxicity in zebrafish larvae.....	70
2.5. Larvae length and mass analysis.....	70
2.6. Chemical analysis for verification of exposure concentrations.....	70
2.7. Evaluation of mitochondrial respiration on zebrafish embryos by using seahorse assay....	71
2.8. Statistical Analysis.....	71
3. Results.....	72
4. Discussion.....	86
5. References.....	92

CAPÍTULO 3:

Evaluation of the mutagenicity, genotoxicity, and histopathology of adult zebrafish (*Danio rerio*) chronically exposed to the herbicide 2,4-D and its commercial formula DMA® 806

Abstract.....	100
1. Introduction.....	101
2. Materials and methods.....	102
2.1. Test organism.....	102
2.2. Substances and concentrations to be tested.....	102
2.3. Chemical analysis for verification of exposure concentrations.....	103
2.4. Chronic Toxicity Test Using Adult Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	104
2.4.1. <i>Micronucleus (MN) and Nuclear Abnormalities (NA) Test</i>	105
2.4.2. <i>Histopathological Analysis</i>	106
2.5. Statistical Analysis.....	107
3. Results.....	107
4. Discussion.....	116
5. References.....	119

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenóxiacético
AChE	Enzima Acetilcolinesterase
AOP	Adverse Outcome Pathway
CE ₅₀	Concentração Efetiva Mediana
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CIH	Conselho Internacional de Harmonização
CL ₅₀	Concentração Letal Mediana
CS	Nuclear Constrictions
DMA	Sal de Dimetilmina
ECAR	Extracellular Acidification Rate
FET	Fish Embryo Toxicity
FETAX	Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus
hpf	horas pós-fertilização
IA	Ingrediente Ativo
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IT	Índice Teratogênico
MN	Micronúcleo
MoA	Modo de ação
NA	Anormalidades Nucleares
NAMs	Metodologias de Nova Abordagem
NK	Núcleos em formato de rim
NL	Núcleos Lobados
OCR	Mitochondrial Oxygen Consumption
POP	Poluente Orgânico Persistente
RNM	Ressonância Nuclear Magnética

RESUMO GERAL

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um dos herbicidas mais utilizados mundialmente na agricultura, apesar de sua classificação pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) como “possivelmente cancerígeno para a espécie humana”. Esse praguicida é classificado como pouco tóxico para humanos e pouco tóxico para organismos aquáticos. Porém, em baixas concentrações, ambientalmente relevantes, pode afetar o desenvolvimento dos peixes e aumentar sua suscetibilidade a outros estressores ambientais. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi elucidar os mecanismos de toxicidade do ingrediente ativo do herbicida 2,4-D e de sua formulação comercial DMA[®] 806 BR, utilizando o zebrafish (*Danio rerio*) como organismo-modelo. Em embriões, foi avaliado a toxicidade aguda e teratogenicidade pela determinação do índice teratogênico (IT), a genotoxicidade pelo ensaio cometa, instabilidade cromossômica pela quantificação de anormalidades nucleares, a mutagenicidade pelo teste do micronúcleo, a neurotoxicidade pelo teste de comportamento locomotor e da atividade da enzima acetilcolinesterase, a bioenergética, a metabolômica e lipidômica e também foram mensurados a massa e o comprimento das larvas. Em adultos, foram avaliadas a toxicidade aguda (96 h) e crônica (3 meses). Para isso, foi realizado o teste de mutagenicidade e genotoxicidade pelo teste do micronúcleo e anormalidades nucleares, e também foram realizadas análises histopatológicas no fígado e rim dos peixes. Os animais foram expostos a uma faixa entre 0 (controle negativo e solvente) a 200 µM de cada produto químico. Os resultados indicam que ambos os produtos químicos, em curto prazo, são pouco tóxicos para embriões de *D. rerio*; contudo, ambos possuem potencial teratogênico (IT > 1,5). Não houve impactos significativos na massa, no comprimento, nos comportamentos de natação e na bioenergética, mas observamos alterações significativas no aumento da genotoxicidade e na abundância de metabólitos e lipídios extraídos de embriões. Para adultos de zebrafish, os dois produtos químicos não induziram mutagenicidade, porém, apresentaram genotoxicidade e alterações histopatológicas. O herbicida ácido 2,4-D foi mais tóxico do que sua formulação comercial para os embriões de zebrafish (*D. rerio*), porém, para os adultos, o DMA 806 (formulação comercial) foi mais tóxico, mesmo em baixas concentrações. O presente estudo demonstrou que ambos os produtos químicos podem causar efeitos fisiológicos e metabólicos nos animais e possuem potencial genotóxico, não-mutagênico e teratogênico, sugerindo um uso cauteloso desse herbicida, principalmente para organismos aquáticos.

Palavras-chave: Agrotóxico, ecotoxicologia, peixe-zebra, FET test, embrião, biomarcadores

GENERAL ABSTRACT

2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is one of the most widely used herbicides in agriculture worldwide, despite its classification by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as "possibly carcinogenic to humans." This pesticide is classified as having low toxicity to humans and low toxicity to aquatic organisms. However, at low, environmentally relevant concentrations, it can affect fish development and increase their susceptibility to other environmental stressors. In this context, the objective of this study was to elucidate the toxicity mechanisms of the active ingredient of the herbicide 2,4-D and its commercial formulation DMA® 806 BR, using zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism. In embryos, acute toxicity and teratogenicity were evaluated by determining the teratogenic index (TI), genotoxicity by the comet assay, chromosomal instability by quantifying nuclear abnormalities, mutagenicity by the micronucleus test, neurotoxicity by the locomotor behavior test and acetylcholinesterase enzyme activity, bioenergetics, metabolomics, and lipidomics, and larval mass and length were also measured. In adults, acute (96 h) and chronic (3 months) toxicity were evaluated using the mutagenicity and genotoxicity test by the micronucleus test and nuclear abnormalities, and histopathological analyses were performed on the liver and kidney of the fish. The animals were exposed to a range of 0 (negative control and solvent) to 200 µM of each chemical. The results indicate that both chemicals are only slightly toxic to *D. rerio* embryos in the short term; however, both have teratogenic potential (TI > 1.5). There were no significant impacts on mass, length, swimming behavior, or bioenergetics. Still, we observed significant changes in increased genotoxicity and in the abundance of metabolites and lipids extracted from embryos. For adult zebrafish, neither chemical induced mutagenicity, but both showed genotoxicity and histopathological alterations. The herbicide 2,4-D acid was more toxic than its commercial formulation to zebrafish embryos (*D. rerio*), whereas DMA 806 (commercial formulation) was more toxic to adults, even at low concentrations. This study demonstrated that both chemicals can cause physiological and metabolic effects in animals and have non-mutagenic genotoxic and teratogenic potential, suggesting cautious use of this herbicide, especially for aquatic organisms.

Keywords: Pesticide, ecotoxicology, fish, FET test, embryo, biomarkers

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Praguicidas

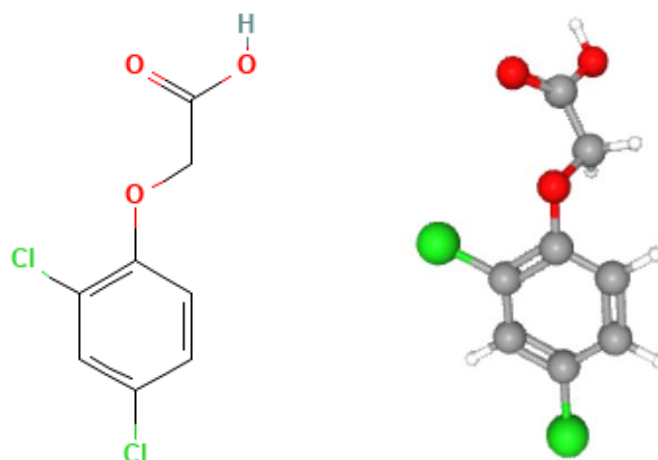
O uso intensivo de praguicidas, definidos como substâncias ou misturas de substâncias químicas responsáveis por eliminar, repelir ou controlar pragas, está entre os principais instrumentos do modelo de agricultura no Brasil (MMA, 2013). Em 2023, o consumo de ingredientes ativos (IA) no país correspondeu a mais de 755 mil toneladas. Dentre as classes de praguicidas que apresentaram maior volume de vendas nesse mesmo ano, destacam-se os herbicidas, com um total de 422 mil toneladas de IA, sendo que, somente no estado de São Paulo, esse valor chegou a 98 mil toneladas. Do total de praguicidas comercializados no estado, 51 % pertencem à classe de periculosidade ambiental III (produto perigoso ao meio ambiente), na qual está inserido o herbicida 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (IBAMA, 2025).

2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e DMA (sal de dimetilamina)

O herbicida 2,4-D tem sido amplamente utilizado e está entre os herbicidas mais comuns no mundo (Devault and Karolak, 2020; George et al., 2025). É utilizado para controlar ervas daninhas de folhas largas, incluindo as aquáticas, como o angiquinho (*Aeschynomene rudis*) em cultivos de grãos como soja, milho e arroz. A tendência é que a demanda por este IA continue alta devido à sua eficiência e baixo custo (EPA, 2005; USACE, 2012). No Brasil, o herbicida 2,4-D se destaca como o terceiro IA mais utilizado no território (atrás do glifosato e mancozeb), vendendo mais de 51 toneladas em 2023 (IBAMA, 2025).

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (CAS N° 94-75-7) é um ácido forte, possui fórmula molecular $C_8H_6Cl_2O_3$ (Figura 01), peso molecular de 221,04 g/mol, ponto de fusão de 140,5 °C, ponto de ebulição de 130 °C, coeficiente de partição (log Kow) de 2,81, índice de ionização (pKa) de 2,73, densidade de 1,42 a 25 °C e solubilidade em água de 900 mg/L a 25 °C (Kennepohl e Munro, 2001; NCBI, 2025).

Figura 01 - Estrutura molecular 2D e 3D do ácido 2,4-Diclorofenóxiacético.



Fonte: NCBI, 2025.

Existem diferentes produtos comerciais que são derivados do ácido 2,4-D, sendo que, entre os mais usados, representando aproximadamente 90% a 95% do uso total, estão: o sal de dimetilamina e o éster isooctil, devido à sua forte atividade herbicida (Islam et al., 2017; Turek et al., 2020). O sal de dimetilamina do 2,4-D (CAS Nº 2008-39-1) é uma formulação derivada do ácido 2,4 diclorofenoxiacético. Sua fórmula molecular é $C_{10}H_{13}Cl_2NO_3$, com peso molecular de 266,12 g/mol, ponto de fusão de 86,0 °C, ponto de ebulição de 88 °C e solubilidade em água de 729,39 mg/L a 25 °C (NPIC, 2008).

O praguicida 2,4-D é uma auxina sintética, ou seja, um hormônio vegetal de um grupo de plantas-alvo (ervas daninhas de folhas largas), que, ao ser pulverizado nas diversas culturas agrícolas, leva ao crescimento descontrolado desse grupo de plantas, causando, assim, a mortalidade. Quanto à exposição dos humanos a esse herbicida, ao aplicar nas culturas, se não for utilizado o devido equipamento de proteção individual (EPI), pode ocasionar absorção do 2,4-D pelas vias nasais, pela pele e também pela ingestão oral, podendo causar irritações dérmicas, oculares e no trato respiratório (WHO, 1984). A distribuição do 2,4-D ocorre em todo o corpo, mas não há evidências de que seja acumulado. A biotransformação em mamíferos parece ocorrer apenas em pequena escala e envolve principalmente a produção de conjugados

de 2,4-D com açúcares ou aminoácidos. Uma única dose é excretada em poucos dias, principalmente pela urina e, em menor extensão, pela bile e pelas fezes. Os seres humanos excretam 2,4-D principalmente na urina, e os tempos de depuração plasmática dependem da dose, das características individuais e da presença ou ausência de compostos que podem inibir competitivamente a excreção de 2,4-D. Para doses orais únicas de 2,4-D, a meia-vida biológica no plasma sanguíneo é de cerca de um dia, dependendo das circunstâncias (WHO, 1984; NCBI, 2025).

1.4. Referências bibliográficas

- ANVISA. Reavaliação toxicológica do ingrediente ativo 2,4-D. 2020. <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/arquivos-noticias-anvisa/1943json-file-1/@@download/file/1943json-file.1.pdf>> Acesso em Jan 2021.
- APPCO. Association of American Pesticide Control Officials. Pesticide drift enforcement survey. 2015. Available from: <http://aapco.org/documents/surveys/DriftEnforce05Rpt.html>.
- AYDIN, H.; OZDEMIR, N.; UZUNÖREN, N. Investigation of the accumulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in rat kidneys. *Forensic Sci Int.* Oct 4;153(1):53-7. 2005. doi: 10.1016/j.forsciint.2005.04.018.
- BALL, N. *et al.* A framework for chemical safety assessment incorporating new approach methodologies within REACH. *Arch Toxicol* 96(3):743–766. doi: 10.1007/s00204-021-03215-9. 2022.
- BAMBINO, K.; CHU, J. Zebrafish in toxicology and environmental health. *Curr. Top. Dev. Biol.* 124, 331–367. 2017.

- BASNET, R. M. *et al.* Zebrafish Larvae as a Behavioral Model in Neuropharmacology. *Biomedicines*, 7(1), 23. 2019. doi: 10.3390/biomedicines7010023
- BENCHOULA, K. *et al.* The promise of zebrafish as a model of metabolic syndrome. *Exp Anim*. Nov 6;68(4):407-416. 2019. doi: 10.1538/expanim.18-0168.
- BOOBIS, A. R. *et al.* IPCS framework for analyzing the relevance of a cancer mode of action for humans. *Crit Rev Toxicol*. Nov-Dec;36(10):781-92. 2006. doi: 10.1080/10408440600977677.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. National Environmental Council: Resolução 357. 2005. <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>> Acesso em 17 Jan 2021.
- CANEDO, A. *et al.* Micronucleus test and nuclear abnormality assay in zebrafish (*Danio rerio*): Past, present, and future trends. *Environ Pollut. (Barking, Essex : 1987)*, 290, 118019. 2021. doi: 10.1016/j.envpol.2021.118019.
- CANEDO, A.; ROCHA, T. L. Zebrafish (*Danio rerio*) using as model for genotoxicity and DNA repair assessments: Historical review, current status and trends *Sci Total Environ*. 762, 144084. 2021. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144084.
- CANNY, S. G. T. *et al.* Graphic production by Leisa McCord. Embryo staging and developmental timing as described in Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B., Schilling T.F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. 203:253-310. 2009.
- CASSAR, S. *et al.* Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chem. Res. Toxicol*. 33, 95–118. 2020.
- CAYUELA, M. L. *et al.* The zebrafish as an emerging model to study DNA damage in aging, cancer and other diseases. *Front Cell Dev Biol*. 6, 178. 2019. doi: 10.3389/fcell.2018.00178.
- CHAKRAVARTHY, S. *et al.* Zebrafish as an in vivo high-throughput model for genotoxicity. *Zebrafish*. Apr;11(2):154-66. 2014. doi: 10.1089/zeb.2013.0924.
- CHINGOMBE, P.; SAHA, B.; WAKEMAN, R. J. Effect of surface modification of an engineered activated carbon on the sorption of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and benazolin from water. *J Colloid Interface Sci*. May 15;297(2):434-42. 2006. doi: 10.1016/j.jcis.2005.10.054.
- COLLIER, A. D.; KALUEFF, A. V.; ECHEVARRIA, D. J. Zebrafish Models of Anxiety-Like Behaviors. In: Kalueff, A. (eds) *The rights and wrongs of zebrafish: Behavioral phenotyping of zebrafish*. Springer, Cham. 2017. doi: 10.1007/978-3-319-33774-6_3.

- CONCEA. Resolução Normativa nº 37/2018 - Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. 2018. Disponível em http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia_site-concea.pdf.
- CORKINS, M. E. *et al.* Aquatic models of human ciliary diseases. *Genesis*. Feb;59(1-2):e23410. 2021. doi: 10.1002/dvg.23410.
- CUNHA CARVALHO, A. E. *et al.* Benzophenone-3 (oxybenzone) in zebrafish: histopathological and oxidative stress analysis. *Xenobiotica*. 2025;55(2):71-77. doi:10.1080/00498254.2025.2494655
- DE CASTRO LIMA, J. A. M. *et al.* "Modern agriculture" transfers many pesticides to watercourses: a case study of a representative rural catchment of southern Brazil. *Environ Sci Pollut Res Int*. Apr;27(10):10581-10598. 2020. doi: 10.1007/s11356-019-06550-8.
- DEHNERT, G. K.; KARASOV, W. H.; WOLMAN, M. A. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid containing herbicide impairs essential visually guided behaviors of larval fish. *Aquat. Toxicol*. 209, 1–12. 2019. doi: 10.1016/j.aquatox.2019.01.015.
- DEQUATTRO, Z. A.; KARASOV, W. H. Impacts of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid aquatic herbicide formulations on reproduction and development of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem*. Jun;35(6):1478-88. 2016. doi: 10.1002/etc.3293.
- DEVAULT, D. A.; KAROLAK, S. Wastewater-based epidemiology approach to assess population exposure to pesticides: a review of a pesticide pharmacokinetic dataset. *Environ. Sci. Pollut. Res*. Feb;27(5):4695-4702. 2020. doi: 10.1007/s11356-019-07521-9.
- DIOGO GONÇALVES, S. *et al.* Use of artificial intelligence in animal experimentation: A review. *Toxicol Lett*. Aug;411:89-100. 2025. doi: 10.1016/j.toxlet.2025.07.1417.
- ECHA. New approach methodologies in regulatory science. Proceedings of a scientific workshop, 19–20 April 2016. Luxembourg: Publications Office of the European Union. 2016. doi: 10.2823/543644.
- EPA. United States Environmental Protection Agency. Reregistration Eligibility Decision for 2,4-D. 2005. https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/24d_red.pdf.
- ES RUIZ DE ARCAUTE, C. *et al.* Auxinic herbicides induce oxidative stress on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae). *Environ Sci Pollut Res Int*. Jul;26(20):20485-20498. 2019. doi: 10.1007/s11356-019-05169-z.

- FERNÁNDEZ-BERTÓLEZ, N. *et al.* Toxicity of zinc oxide nanoparticles: Cellular and behavioural effects. *Chemosphere*, 363, 142993. 2024. doi: 10.1016/j.chemosphere.2024.142993.
- FRANTZ, W. T., CEOL, C. J. From tank to treatment: modeling melanoma in zebrafish. *Cells* 9, 1289. 2020.
- FRIEDRICH, T. *et al.* Mutation of zebrafish dihydrolipoamide branched-chain transacylase E2 results in motor dysfunction and models maple syrup urine disease. *Disease models & mechanisms*, 5(2), 248–258. 2012. doi: 10.1242/dmm.008383.
- GAAIED, S. *et al.* 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid herbicide effects on zebrafish larvae: development, neurotransmission and behavior as sensitive endpoints. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2019. doi: 10.1007/s11356-019-04488-5.
- GAJSKI, G. *et al.* The comet assay in animal models: from bugs to whales – (part 2 vertebrates). *Mutat. Res.* 781, 130–164. 2019. doi: 10.1016/j.mrrev.2019.04.002.
- GARCIA, G. R.; NOYES, P. D.; TANGUAY, R. L. Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology. *Pharmacol. Ther.* 161, 11–21. 2016.
- GEORGE, S. E.; KEIL STIETZ, K.; DEHNERT, G. *In vivo* verification of fish keratocyte explant culture for use as innate immunotoxicity screening assay: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid effects in fathead minnow (*Pimephales promelas*) keratocyte cell sheet migration. *Chemosphere*. May;376:144276. 2025. doi: 10.1016/j.chemosphere.2025.144276.
- GOESSLING, W.; SADLER, K. C. Zebrafish: an important tool for liver disease research. *Gastroenterology*. Nov;149(6):1361-77. 2015. doi: 10.1053/j.gastro.2015.08.034.
- GORZINSKI, S. J. *et al.* Acute, pharmacokinetic, and subchronic toxicological studies of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Fundam Appl Toxicol.* Oct;9(3):423-35. 1987. doi: 10.1016/0272-0590(87)90025-x.
- GRISOLIA, C. K. *et al.* Genotoxic evaluation of different delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis* on zebrafish adults and development in early life stages. *Mutation research*, 672(2), 119–123. 2009. doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.10.017.
- HARAMIS, A. P. *et al.* Adenomatous polyposis coli-deficient zebrafish are susceptible to digestive tract neoplasia. *EMBO Rep* 2006;7:444–449. 2006.
- HERALDE, F. M. *et al.* UPLC-QTOF Mass Spectrometry Detection of Four Endocrine Disrupting Chemicals (Methyl Paraben, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, Monobutyl Phthalate, and Bisphenol A) in Urine of Filipino Women. *Acta Med Philipp.* Feb 28;59(3):70-79. 2025. doi: 10.47895/amp.vi0.9007.

- HOFFMANN, S. *et al.* A Systematic Review to Compare Chemical Hazard Predictions of the Zebrafish Embryotoxicity Test With Mammalian Prenatal Developmental Toxicity. *Toxicol Sci.* 2021 Aug 30;183(1):14-35. 2021. doi: 10.1093/toxsci/kfab072.
- HOOGSTRAATEN, M. J. *et al.* Animal-free safety assessment of chemicals: an innovation system perspective. *Arch Toxicol.* 2025 Jan;99(1):43-56. 2025. doi: 10.1007/s00204-024-03878-0.
- HORZMANN, K. A.; AND FREEMAN, J. L. Making waves: New developments in toxicology with the zebrafish. *Toxicol. Sci.* 163, 5–12. 2018.
- HOWE, K. *et al.* 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature.* 496, 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>.
- IARC. DDT, Lindane, and 2,4-D / International Agency for Research on Cancer Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Vol 113. Lyon, France. 2018.
- IBAMA. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. 2025. Acessível em <<http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>
- ICH. ICH S5 (R3) guideline on reproductive toxicology: Detection of toxicity to reproduction for human pharmaceuticals - step 5. 2020. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-s5-r3-guideline-reproductive-toxicology-detection-toxicity-reproduction-human-pharmaceuticals>. Accessed June 15, 2021.
- ICH. ICH S5 (R3) guideline on reproductive toxicology: Detection of toxicity to reproduction for human pharmaceuticals - step 5. 2020. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-s5-r3-guideline-reproductive-toxicology-detection-toxicity-reproduction-human-pharmaceuticals>. Accessed June 15, 2021.
- ISLAM, F. *et al.* Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. *Environ Int.* Feb;111:332-351. 2018. doi: 10.1016/j.envint.2017.10.020.
- ISO. 7346-1:1996 Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] — Part 1: Static method. 1996.
- ISO. 7346-2:1996 Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] — Part 2: Semi-static method. 1996.
- JARVIS, R. B.; KNOWLES, J. F. DNA damage in zebrafish larvae induced by exposure to low-dose rate gamma-radiation: detection by the alkaline comet assay. *Mut. Res.*, 541(1-2), 63–69. 2003. doi: 10.1016/s1383-5718(03)00182-7.

- KALUEFF, A. V. *et al.* Zebrafish Neuroscience Research Consortium. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, 10(1), 70–86. 2013. doi: 10.1089/zeb.2012.0861.
- KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends in pharmacological sciences*, 35(2), 63–75. 2014. doi: 10.1016/j.tips.2013.12.002.
- KELLER, R. M. *et al.* Nitrate Exposure Reprograms Hepatic Amino Acid and Nutrient Sensing Pathways Prior to Exercise: A Metabolomic and Transcriptomic Investigation in Zebrafish (*Danio rerio*). *Frontiers in Molecular Biosciences* 9: 903130. 2022. doi: 10.3389/FMOLB.2022.903130/FULL.
- KENNEPOHL, E.; MUNRO, I. C. Phenoxy herbicides (2,4-D). In R. I. Krieger & W. C. Krieger (Eds.), *Handbook of pesticide toxicology* (pp. 1623–1638). San Diego: Academic. 2001.
- KIM, C. S.; BINIENDA, Z.; SANDBERG, J. A. Construction of a physiologically based pharmacokinetic model for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dosimetry in the developing rabbit brain. *Toxicol Appl Pharmacol.* Feb;136(2):250-9. 1996. doi: 10.1006/taap.1996.0032.
- KIMMEL, C. B. *et al.* Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. 203: 253-310. 1995.
- KING, K. W.; BALOGH, J. C. Chlorothalonil and 2,4-D losses in surface water discharge from a managed turf watershed. *J. Environ. Monit.* Aug 5;12(8):1601-12. 2010. doi: 10.1039/c0em00030b.
- KOSMEHL, T. *et al.* A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos. *Environ Toxicol Chem.* Aug;25(8):2097-106. 2006. doi: 10.1897/05-460r.1.
- KOSMEHL, T. *et al.* DNA damage induced by genotoxins in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Philippines) as measured by the comet assay. *Mutat Res.* Jan 31;650(1):1-14. 2008. doi: 10.1016/j.mrgentox.2007.09.009.
- LAM, S. H. *et al.* Conservation of gene expression signatures between zebrafish and human liver tumors and tumor progression. *Nat Biotechnol.* 24:73–75. 2006. doi: 10.1038/nbt1169.

- LANGE, M. *et al.* The ADHD-susceptibility gene *lphn3.1* modulates dopaminergic neuron formation and locomotor activity during zebrafish development. *Molecular psychiatry*, 17(9), 946–954. 2012. doi: 10.1038/mp.2012.29.
- LAWSON, N. D. “Decoding the Zebrafish Genome.” *Nature Genetics* 54, no. 7: 917–919. 2022. doi: 10.1038/s41588-022-01080-5.
- LEAL, M. C. *et al.* Zebrafish primary testis tissue culture: An approach to study testis function *ex vivo*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 162, 134-138. 2009.
- LEVITAS-DJERBI, T.; APPELBAUM, L. Modeling sleep and neuropsychiatric disorders in zebrafish. *Current opinion in neurobiology*, 44, 89–93. 2017. doi: 10.1016/j.conb.2017.02.017.
- LIN, K. A. *et al.* The herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces pancreatic β -cell death via oxidative stress-activated AMPK α signal downstream-regulated apoptotic pathway. *Toxicol Lett.* Mar;405:16-29. 2025. doi: 10.1016/j.toxlet.2025.01.009.
- LIU, J. *et al.* Associations of maternal exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid during early pregnancy with steroid hormones among one-month-old infants. *Sci Total Environ.* Feb 20;912:169414. 2024. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.169414.
- MACRAE, C.; PETERSON, R. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 14: 721–731. 2015.
- MAŁKOWSKA, A. *et al.* New insight into teratogenic effects of (S)-thalidomide in zebrafish embryos growing inside the chorion and subjected to electric pulses. *Sci. rep.* 15(1), 17052. 2025. doi: 10.1038/s41598-025-00641-y.
- MATHISEN, G.H. *et al.* 2024. Time for CHANGE: system-level interventions for bringing forward the date of effective use of NAMs in regulatory toxicology. *Arch Toxicol.* doi: 10.1007/s00204-024-03802-6.
- MESAK, C. *et al.* Mutagenic assessment of *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to the 2,4-D herbicide in a simulated realistic scenario. *Environ Sci Pollut Res Int.* May;25(15):15235-15244. 2018. doi: 10.1007/s11356-018-1979-1.
- MMA. Perfil nacional da gestão de substâncias químicas. Ministério do Meio Ambiente. 2013. <<https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/meio-ambiente-urbano-recursos-hidricos-qualidade-ambiental/seguranca-quimica/gestao-de-substancias-quimicas>>
- MOHANTY, B. *et al.* 2025. Biomedical Models: Use of Zebrafish as a Multi-Utility In Vivo Tool Box. *WIREs Mech Dis.* 17(4), e70002. doi: 10.1002/wsbm.70002.

- MORRIS, J. A. Zebrafish: a model system to examine the neurodevelopmental basis of schizophrenia. *Progress in brain research*, 179, 97–106. 2009. doi: 10.1016/S0079-6123(09)17911-6
- NAGEL, R. DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*--a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex*. (Suppl. 1) 19: 38-48. 2002.
- NASIADKA, A., CLARK, M. D. Zebrafish breeding in the laboratory environment. *ILAR J.* 53(2):161-8. 2012. doi: 10.1093/ilar.53.2.161.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 1486, 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. Retrieved July 8. 2025. from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4-Dichlorophenoxyacetic-Acid
- NIH. National Institutes of Health - Guidelines for Use of Zebrafish in the NIH Intramural Research Program. Bethesda. 2009.
- NORTH, D. C. Institutions. *J Econ Perspect* 5(1):97–112. 1991.
- NORTON, W. H. Toward developmental models of psychiatric disorders in zebrafish. *Front neural circuits*, 7, 79. 2013. doi: 10.3389/fncir.2013.00079.
- NPIC. 2,4-D Technical Fact Sheet. National Pesticide Information Center, Oregon State University. 2008. Available from: <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/2,4-DTech.html>.
- NRC. National Research Council. Toxicity testing for assessment of environmental agents: interim report. press Tna. National Research Council. Report No.: 978-0-309-10092-2, 270. 10.17226/11523. 2006.
- NRC. National Research Council. Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. Committee on Toxicity Testing and Assessment of Environmental Agents Washington, DC: The National Academic Press. 2007.
- NTP. National Toxicology Program. Toxicology in the 21st Century (Tox21). 2021. disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/tox21/index.html#Toxicology-in-the-21st-Century-Tox21->
- OBIAKOR, M. O. *et al.* Aquatic genetic biomarkers of exposure and effect in Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell, 1822). *American-Eurasian J. Toxicol. Sci.* 2(4): 196–202. 2010.
- OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Publishing. 2013.
- PANULA, P. *et al.* The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiology of disease*, 40(1), 46–57. 2010. doi: 10.1016/j.nbd.2010.05.010

- PASTOOR, T.P. *et al.* A 21st century roadmap for human health risk assessment. *Crit Rev Toxicol.* Aug;44 Suppl 3:1-5. 2014. doi: 10.3109/10408444.2014.931923.
- PATLEWICZ, G. *et al.* Proposing a scientific confidence framework to help support the application of adverse outcome pathways for regulatory purposes. *Regul Toxicol Pharmacol.* Apr;71(3):463-77. 2015. doi: 10.1016/j.yrtph.2015.02.011.
- PATTON, E. E.; ZON, L. I.; LANGENAU, D. M. Zebrafish disease models in drug discovery: from preclinical modelling to clinical trials. *Nat Rev Drug Discov.* Aug;20(8):611-628. 2021. doi: 10.1038/s41573-021-00210-8.
- PINHEIRO, A.; MORAES, J. C. S.; DA SILVA, M. R. Pesticidas no perfil de solos em áreas de plantação de cebolas em Ituporanga, SC. *Rev. Bras. Eng. Agrícola Ambient.* 15(5): 533-538. 2011. doi: 10.1590/S1415-43662011000500015.
- PUNT, A. *et al.* Evaluation of research activities and research needs to increase the impact and applicability of alternative testing strategies in risk assessment practice. *Regul Toxicol Pharmacol* 61(1):105–114. 2011. doi: 10.1016/j.yrtph.2011.06.007.
- ROCCO, L.; PELUSO, C.; STINGO, V. Micronucleus test and comet assay for the evaluation of zebrafish genomic damage induced by erythromycin and lincomycin. *Environ Toxicol.* Oct;27(10):598-604. 2012. doi: 10.1002/tox.20685.
- RUSSEL, W. M., BURCH, R. L. Recovering The Principles of Humane Experimental Technique: The 3Rs and the Human Essence of Animal Research. 1959. Disponível em: <http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/addendum>.
- RUSSO, C. *et al.* Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicol Environ Saf.* Feb;57(2):168-74. 2004. doi: 10.1016/S0147-6513(03)00027-7.
- SCHOLZ, S. *et al.* The zebrafish embryo model in environmental risk assessment--applications beyond acute toxicity testing. *Environ Sci Pollut Res Int.* Jul;15(5):394-404. 2008. doi: 10.1007/s11356-008-0018-z.
- SHI, X. *et al.* Zebrafish heart failure models: opportunities and challenges. *Amino Acids.* Jul;50(7):787-798. 2018. doi: 10.1007/s00726-018-2578-7
- SHIM, J. *et al.* Triclosan is a mitochondrial uncoupler in live zebrafish. *J Appl Toxicol.* Dec;36(12):1662-1667. 2016. doi: 10.1002/jat.3311.
- SPENCE, R. *et al.* The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc.* Feb;83(1):13-34. 2008. doi: 10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x.

- SPITSBERGEN, J. M. *et al.* Neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*) treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine by three exposure routes at different developmental stages. *Toxicol Pathol* 2000;28:716–725. 2000a.
- SPITSBERGEN, J. M. *et al.* Neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*) treated with 7,12-dimethylbenz[a] anthracene by two exposure routes at different developmental stages. *Toxicol Pathol* 2000;28:705–715. 2000b.
- STEWART, A. M.; KALUEFF, A. V. The behavioral effects of acute Δ^9 -tetrahydrocannabinol and heroin (diacetylmorphine) exposure in adult zebrafish. *Brain research*, 1543, 109–119. 2014. doi: 10.1016/j.brainres.2013.11.002.
- TAYANLOO-BEIK, A. *et al.* Zebrafish Modeling of Autism Spectrum Disorders, Current Status and Future Prospective. *Frontiers in psychiatry*, 13, 911770. 2022. doi: 10.3389/fpsy.2022.911770.
- TEGELENBOSCH, R. A. J. *et al.* Zebrafish embryos and larvae in behavioural assays. *Behaviour* 149, 1241–1281. 2012. doi: 10.1163/1568539X-00003020.
- TEIXIDÓ, E. *et al.* Assessment of developmental delay in the zebrafish embryo teratogenicity assay. *Toxicol In Vitro*. Feb;27(1):469-78. 2013. doi: 10.1016/j.tiv.2012.07.010.
- TUREK, M. *et al.* Ecotoxicity of ammonium chlorophenoxyacetate derivatives towards aquatic organisms: Unexpected enhanced toxicity upon oxygen by sulfur replacement. *J Hazard Mater*. Jan 15;382:121086. 2020. doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.121086.
- US EPA. Strategic plan to promote the development and implementation of alternative test methods within the TSCA program. 2018. https://www.epa.gov/sites/default/files/2018-06/documents/epa_alt_strat_plan_6-20-18_clean_final.pdf. Accessed 14 Feb 2023.
- USACE. US Army Corps of Engineers, Aquatic herbicides. Washington, DC. 2012. Disponível em <[http://glmris.anl.gov/documents/docs/anscontrol/Aquatic Herbicides.pdf](http://glmris.anl.gov/documents/docs/anscontrol/Aquatic%20Herbicides.pdf)>
- USGS. Appendix 7A. Statistical summaries of pesticide compounds in stream water, 1992–2001. In: *Pesticides in the nation's streams and ground water, 1992–2001*. USGS Circular 1291. United States Geological Survey. 2006. Disponível em: <http://water.usgs.gov/nawqa/pnsp/pubs/circ1291/appendix7/7a.html>.
- VARSHNEY, G.K. *et al.* A large-scale zebrafish gene knockout resource for the genome-wide study of gene function. *Genome research*. 23, 727–735. 2013. doi: 10.1101/gr.151464.112.
- VIRIATO, C. *et al.* Evaluation of the potential teratogenic and toxic effect of the herbicide 2,4-D (DMA® 806) in bullfrog embryos and tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Chemosphere*. Mar;266:129018. 2021. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.129018.

- WALTERS, J. Environmental Fate of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. Environmental Monitoring and Pest Management, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA, USA. 2011.
- WAN-MOHTAR, W. A. A. Q. I. *et al.* Use of Zebrafish Embryo Assay to Evaluate Toxicity and Safety of Bioreactor-Grown Exopolysaccharides and Endopolysaccharides from European *Ganoderma applanatum* Mycelium for Future Aquaculture Applications. *Int J Mol Sci.* Feb 7;22(4):1675. 2021. doi: 10.3390/ijms22041675.
- WESTMORELAND, C. *et al.* Use of new approach methodologies (NAMs) in regulatory decisions for chemical safety: report from an EPAA deep dive workshop. *Regul Toxicol Pharmacol* 135:105261. 2022. doi: 10.1016/j.yrtph.2022.105261.
- WHO. World Health Organization. Environ Health Criteria 29: 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) p.12. 1984.
- WOUDNEH, M. B. *et al.* Acidic herbicides in surface waters of Lower Fraser Valley, British Columbia, Canada. *J Chromatogr A.* Jan 12;1139(1):121-9. 2007. doi: 10.1016/j.chroma.2006.10.081.
- XU, M. *et al.* Gut-brain axis dysfunction mediates neurotoxicity of embryonic p-phenylenediamine exposure in zebrafish. *J Hazard Mater.* 2025. 497:139650. doi:10.1016/j.jhazmat.2025.139650
- YANG, B. *et al.* Zebrafish models: Charting promising platform and illuminating the depths of depression. *Pharmacol Biochem Behav.* Sep 16;257:174097. 2025. doi: 10.1016/j.pbb.2025.174097.
- ŽEGURA, B.; FILIPIČ, M. The application of the Comet assay in fish cell lines. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 842, 72–84. 2019. doi: 10.1016/j.mrgentox.2019.01.011.
- ZHDANOV, A. V. *et al.* Modeling Stress-Related Disorders in Zebrafish Using Prolonged Predator Exposure and Prolonged Unpredictable Stress. *J Neurosci Res.* Jun;103(6):e70048. 2025. doi: 10.1002/jnr.70048.
- ZHENG, W. Z. *et al.* “Comparative Transcriptome Analyses Indicate Molecular Homology of Zebrafish Swimbladder and Mammalian Lung.” *PLoS One* 6, no. 8: e24019. 2011. Doi: 10.1371/journal.pone.0024019.