UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CÂMPUS DE DRACENA

Camila Araújo Miranda
Zootecnista

PROTEÇÃO DA TETRAHIDROCURCUMINA E VITAMINA C SOBRE A TOXICIDADE DA IVERMECTINA EM CÉLULAS HEPG2 E EFEITOS TÓXICOS DA AMETRINA E CLOMAZONA EM EMBRIÕES DE ZEBRAFISH

Dracena
2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CÂMPUS DE DRACENA

Camila Araújo Miranda
Zootecnista

PROTEÇÃO DA TETRAHIDROCURCUMINA E VITAMINA C SOBRE A TOXICIDADE DA IVERMECTINA EM CÉLULAS HEPG2 E EFEITOS TÓXICOS DA AMETRINA E CLOMAZONA EM EMBRIÕES DE ZEBRAFISH

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - Unesp, Câmpus de Dracena como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto
Coorientadora: Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira

Dracena
2024

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvida pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação
Campus de Dracena

M672p Miranda, Camila Araújo
Proteção da tetrahidrocurcumina e vitamina c sobre a toxicidade da ivermectina em células HepG2 e efeitos tóxicos da ametrina e clomazona em embriões de zebrafish / Camila Araújo Miranda. -- Dracena: [s.n.], 2024.
109 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2024.

Orientador: Fábio Erminio Mingatto
Coorientadora: Danielle Palma de Oliveira

1. Toxicologia. 2. Zebrafish. 3. Células hepáticas. 4. Antiparasitários. 5. Herbicidas. I. Título.

Bibliotecário Fábio S. Rosas
CRB 8/6665

IMPACTO ESPERADO NA SOCIEDADE

A interação entre praguicidas e organismos não alvos permanece parcialmente compreendida, assim como as discrepâncias entre as ações dos herbicidas isolados e combinados. Consequentemente, a utilização de novas abordagens metodológicas é crucial para garantir maior segurança e permitir avaliação de riscos associados a esses produtos.

EXPECTED IMPACT ON SOCIETY

The interaction between pesticides and non-target organisms remains partially understood, as well as the discrepancies between the actions of individual herbicides and their combinations. Therefore, the use of novel methodological approaches is crucial to ensure greater safety and enable risk assessment associated with these products.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Dracena

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: **PROTEÇÃO DA TETRAHIDROCURCUMINA E VITAMINA C SOBRE A TOXICIDADE DA IVERMECTINA EM CÉLULAS HEPG2 E EFEITOS TÓXICOS DA AMETRINA E CLOMAZONA EM EMBRIÕES DE ZEBRAFISH**

AUTORA: CAMILA ARAÚJO MIRANDA
ORIENTADOR: FÁBIO ERMINIO MINGATTO
COORIENTADORA: DANIELLE PALMA DE OLIVEIRA

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

Documento assinado digitalmente
FABIO ERMINIO MINGATTO
Data: 15/04/2024 08:34:33-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Titular FÁBIO ERMINIO MINGATTO (Participação Presencial)
Departamento de Produção Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - FCAT - Unesp - Câmpus de Dracena

Documento assinado digitalmente
JAQUELINE DALBELLO BILLER
Data: 11/04/2024 09:41:30-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. JAQUELINE DALBELLO BILLER (Participação Presencial)
Departamento de Produção Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - FCAT - Unesp - Câmpus de Dracena

Documento assinado digitalmente
LILIAN CRISTINA PEREIRA
Data: 10/04/2024 10:21:53-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. LÍLIAN CRISTINA PEREIRA (Participação Virtual)
Depto. de Bioprocessamento e Tecnologia / Faculdade de Ciências Agronômicas - Unesp - Câmpus de Botucatu

Dracena, 05 de março de 2024

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Camila Araújo Miranda, nascida em 19 de março de 1998, na cidade de Dracena. Possui graduação em Zootecnia pela Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Dracena. Participou das atividades do Laboratório de Bioquímica Metabólica e Toxicológica (LaBMeT) entre janeiro de 2018 e setembro de 2023 sob a orientação do Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto. Durante a graduação foi bolsista PIBIC nos períodos de 09/2018-08/2019 e 09/2020-02/2021, além de ser bolsista de iniciação científica pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) nos períodos de 09/2019-08/2020 e 03/2021-11/2021. Em março de 2022 iniciou o mestrado no Programa Interunidades de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Animal, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Câmpus de Dracena e Câmpus de Ilha Solteira. Foi bolsista da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no período de 03/2022-07/2023 e bolsista FAPESP no período de 08/2023-02/2024.

Dedico a Deus,

Tudo seja para honra e glória do Seu nome.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ser quem me sustenta, que toda honra seja dada a Ele pois em todas as etapas pude sentir Sua presença!

À minha família, em especial minha mãe Alessandra, minha irmã Tamires, meu sobrinho Arthur, minha tia Vânia, minha avó Anita e meu namorado Felipe por estarem ao meu lado em todos os momentos. O apoio e as palavras de conforto foram fundamentais para eu finalizar e conquistar mais esta etapa da minha vida acadêmica. Através da vida de vocês eu vejo o cuidado de Deus comigo!

Ao Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto por todo empenho em me orientar, você é uma referência de pesquisador e agradeço por toda paciência, compreensão e dedicação ao longo desse tempo!

Aos técnicos de laboratório da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Andréia, Edison, Heloisa e João Milton pelo auxílio ao longo das análises.

Ao laboratório TOXICAM - Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana, em especial à Profa. Dra. Lílian Cristina Pereira e suas orientandas Paloma Vitoria Lima Peixoto, Cristina Viriato, Luiza Aggio por toda ajuda no desenvolvimento das análises com zebrafish. Vocês fizeram diferença no tempo que estive em Botucatu, obrigada por todo conhecimento compartilhado e paciência para me auxiliar.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do presente trabalho (Processo 2022/05645-9) e pela bolsa de mestrado concedida (Processo 2022/14467-7).

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar” – Josué 1:9

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Comissão de Ética no Uso de Animais

Criada pela da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1437/2023 – CEUA

Certificamos que o projeto intitulado: **"USO DE ABORDAGENS ÔMICAS (PROTEÔMICA E METABOLÔMICA) PARA ELUCIDAÇÃO DO SINERGISMO OU ANTAGONISMO NA TOXICIDADE DA AMETRINA E DA CLOMAZONA EM ZEBRAFISH" –** conduzido pela Pesquisadora: **Camila Araújo Miranda** – Orientador: Prof. Fábio Erminio Mingatto – Colaboradores: Profa. Lilian Cristina Pereira e Paloma Vitoria Lima Peixoto, registrado com o **nº 1437/2023**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, 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 APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião ordinária de 29 de agosto de 2023.

Finalidade	( ) Ensino (**X**) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	28/08/2025
Espécie/Linhagem/Raça	Zebrafish
Nº Total de animais	18
Idade/Peso	Não se Aplica
Sexo	(06) Fêmeas (12) Machos

Profa. Associada Bertha Furlan Polegato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

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

The research project registered by the number 1437/2023 is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals of Botucatu Medical School – Sao Paulo State University (UNESP) on 29/August/2023.

Distrito Rubião Júnior, s/nº – Botucatu – SP. CEP: 18618-970 Fones: (14) 3880.1880 – E-mail Secretaria: ceua@fmb.unesp.br/sara.sampaio@unesp.br

RESUMO

Os praguicidas são compostos utilizados para prevenir, controlar ou reduzir a presença de pragas em culturas agrícolas ou em animais e o objetivo de cada composto é descrito na nomenclatura, podendo ser inseticidas (insetos), fungicidas (fungos), herbicidas (ervas daninhas), bactericidas (bactérias), nematicidas (nematóides) e outros. Estudos toxicológicos de efeitos de praguicidas em organismos não alvos são importantes, considerando que humanos e animais são susceptíveis ao contato direto ou indireto com resíduos após utilização. A ivermectina (IVM) é um parasiticida utilizado para o controle de endo e ectoparasitas em animais pets e de produção. Sua alta eficiência e fácil acesso faz com que este seja um dos produtos mais utilizados na medicina veterinária. No presente estudo foi avaliada a capacidade da tetrahidrocurcumina (THC) e da vitamina C de amenizarem os danos citotóxicos gerados pela IVM em células HepG2, considerando que são dois antioxidantes conhecidos na literatura científica e que o estresse oxidativo parece estar relacionado à indução da morte celular causada pela IVM, pois em uma etapa anterior observamos citotoxicidade e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) causados pela substância. Foram determinadas as concentrações de glutationa reduzida e oxidada e estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina em células expostas às concentrações de 5; 7,5; 10 e 25 µM de IVM e a proteção de 50 µM de THC e vitamina C em relação à atividade metabólica e produção de ERON pelas células. Um outro estudo foi realizado envolvendo dois herbicidas: ametrina (AMT) e clomazona (CLZ), os quais são amplamente utilizados para o controle de ervas daninhas em diversas plantações e se destacam principalmente pelo uso em canaviais. Ambos são potenciais poluidores ecológicos devido à alta solubilidade em água e a lixiviação causada pela chuva ou irrigação tornam os ambientes aquáticos os mais afetados pela sua bioacumulação. Devido à importância no entendimento de como os organismos aquáticos reagem à exposição à AMT e CLZ, isolados ou combinados, foram realizados ensaios experimentais utilizando embriões e larvas de zebrafish (*Danio rerio*) para elucidação dos efeitos subletais após a exposição por 96 ou 144 horas pós fecundação. Foram determinados parâmetros relacionados ao desenvolvimento embrionário, quantificação das enzimas acetilcolinesterase, fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase para entendimento dos danos gerados após a exposição a diferentes concentrações de AMT (0,1;3,7;6;20 e 60 µg/L), CLZ (0,1; 6; 20; 36 e167 µg/L) e da mistura das duas substâncias (0,1+0,1; 6+36 e 3,7+167 µg/L). Assim, no presente trabalho são apresentadas informações relevantes sobre os mecanismos de toxicidade dos praguicidas IVM, AMT e CLZ, utilizando modelos *in vivo* e *in vitro* e, ainda, identificadas substâncias que podem amenizar os danos gerados pela IVM, servindo como possível tratamento em casos de intoxicação.

Palavras-chave: Toxicologia. Zebrafish. Células hepáticas. Antiparasitários. Herbicidas.

ABSTRACT

Pesticides are compounds used to prevent, control, or reduce the presence of pests in agricultural crops or animals, and the objective of each compound is described in its nomenclature, which can include insecticides (insects), fungicides (fungi), herbicides (weeds), bactericides (bacteria), nematicides (nematodes), and others. Toxicological studies on the effects of pesticides on non-target organisms are important, considering that humans and animals are susceptible to direct or indirect contact with residues after use. Ivermectin (IVM) is a parasiticide used to control endo- and ectoparasites in pets and production animals. Its high efficiency and easy accessibility make it one of the most widely used products in veterinary medicine. The present study evaluated the ability of tetrahydrocurcumin (THC) and vitamin C to mitigate cytotoxic damage caused by IVM in HepG2 cells, considering that they are two antioxidants known in the scientific literature and that oxidative stress appears to be related to the induction of cell death caused by IVM, as cytotoxicity and increased production of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) caused by the substance were observed in a previous stage. The concentrations of reduced and oxidized glutathione and the oxidative state of pyridine nucleotides in cells exposed to concentrations of 5, 7.5, 10, and 25 µM of IVM were determined, as well as the protection of 50 µM of THC and vitamin C regarding the metabolic activity and production of RONS by the cells. Another study was conducted involving two herbicides: ametryn (AMT) and clomazone (CLZ), which are widely used to control weeds in various crops, especially in sugarcane fields. Both are potential ecological pollutants due to their high solubility in water, and leaching caused by rain or irrigation makes aquatic environments the most affected by their bioaccumulation. Due to the importance of understanding how aquatic organisms react to exposure to AMT and CLZ, alone or in combination, experimental assays were performed using zebrafish (Danio rerio) embryos and larvae to elucidate sublethal effects after exposure for 96 or 144 hours post-fertilization. Parameters related to embryonic development, quantification of the enzymes acetylcholinesterase, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase, and alanine aminotransferase were determined to understand the damage generated after exposure to different concentrations of AMT (0.1; 3.7; 6; 20; and 60 µg/L), CLZ (0.1; 6; 20; 36; and 167 µg/L), and the mixture of the two substances (0.1+0.1; 6+36 and 3.7+167 µg/L). Thus, this study provides relevant information on the toxicity mechanisms of the pesticides IVM, AMT, and CLZ, using in vivo and in vitro models, and also identifies substances that may mitigate the damage caused by IVM, serving as a possible treatment in cases of intoxication.

Keywords: Toxicology. Zebrafish. Liver cells. Antiparasitic agents. Herbicides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem microscópica das células HepG2.....35
Figura 2 - Esquema do sistema antioxidante enzimático.....37
Figura 3 - Zebrafish.....41
Figura 4 - Esquema representativo do cultivo celular.....59
Figura 5 - Esquema representativo da determinação de GSH e GSSG.....60
Figura 6 - Esquema representativo da determinação do estado redox de NAD(P)H..61
Figura 7 - Esquema representativo da avaliação do efeito da THC e da vitamina C sobre a atividade metabólica das células HepG2.....62
Figura 8 - Esquema representativo da avaliação do efeito da THC e da vitamina C sobre a produção de ERON nas células HepG2.....63
Figura 9 - Razão entre as concentrações de GSH e GSSG (GSH/GSSG) nas células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina.....64
Figura 10 - Estado oxidativo de NAD(P)H nas células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina.....65
Figura 11 - Efeito protetor da THC e vitamina C na atividade metabólica das células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina.....66
Figura 12 - Efeito protetor da THC e vitamina C no acúmulo de ERON das células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina.....67
Figura 13 - Esquema representativo da manutenção dos peixes adultos.....79
Figura 14 - Esquema representativo do FET test.....80
Figura 15 - Esquema representativo da determinação da atividade da AChE.....81
Figura 16 - Esquema representativo dos biomarcadores hepáticos.....82
Figura 17 - Desenvolvimento de embriões de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina, clomazona ou mistura.....83
Figura 18 - Análise comparativa do desenvolvimento de embriões de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina ou clomazona e da mistura dos dois herbicidas.....84
Figura 19 - Inflação da bexiga natatória de embriões de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina (0,1 a 60 µg/L), clomazona (0,1 a 167 µg/L) ou da mistura dos herbicidas (0,1-0,1, 6-36, 3,7-167 µg/L).....85
Figura 20 - Análise comparativa da inflação da bexiga natatória de embriões de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina ou clomazona e da mistura dos dois herbicidas.....86
Figura 21 - Microfografia com inflação da bexiga natatória no controle.....87
Figura 22 - Microfotografia com ausência da bexiga natatória inflada nas larvas expostas a ametrina.....88
Figura 23 - Microfotografia com ausência da bexiga natatória inflada nas larvas expostas a clomazona 36 e 167 µg/L.....89
Figura 24 - Formação de edema de pericárdio em embriões de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina (0,1 a 60 µg/L), clomazona (0,1 a 167 µg/L) ou mistura dos herbicidas (0,1-0,1, 6-36, 3,7-167 µg/L).....90
Figura 25 - Análise comparativa da formação de edema de pericárdio em embriões de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina ou clomazona e da mistura dos dois herbicidas.....91
Figura 26 - Formação de edema de saco vitelínico em embriões de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina (0,1 a 60 µg/L), clomazona (0,1 a 167 µg/L) ou mistura dos herbicidas (0,1-0,1, 6-36, 3,7-167 µg/L).....92

Figura 27 - Análise comparativa da formação de edema de saco vitelínico em embriões de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina ou clomazona e da mistura dos dois herbicidas.....93
Figura 28 - Atividade da acetilcolinesterase (AChE) em larvas de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina (0,1 a 60 µg/L), clomazona (0,1 a 167 µg/L) ou mistura dos herbicidas (0,1-0,1, 6-36, 3,7-167 µg/L).....94
Figura 29 - Análise comparativa da atividade da acetilcolinesterase em larvas de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina ou clomazona e da mistura dos dois herbicidas.....95
Figura 30 - Atividade da aspartato aminotransferase (AST) em larvas de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina (0,1 a 60 µg/L), clomazona (0,1 a 167 µg/L) ou mistura dos herbicidas (0,1-0,1, 6-36, 3,7-167 µg/L).....96
Figura 31 - Análise comparativa da atividade da alanina aminotransferase (AST) em larvas de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina ou clomazona e da mistura dos dois herbicidas.....97
Figura 32 - Atividade da alanina aminotransferase (ALT) em larvas de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina (0,1 a 60 µg/L), clomazona (0,1 a 167 µg/L) ou mistura dos herbicidas (0,1-0,1, 6-36, 3,7-167 µg/L).....98
Figura 33 - Análise comparativa da atividade da alanina aminotransferase (ALT) em larvas de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina ou clomazona e da mistura dos dois herbicidas.....99
Figura 34 - Atividade da fosfatase alcalina (ALP) em larvas de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina (0,1 a 60 µg/L), clomazona (0,1 a 167 µg/L) ou mistura dos herbicidas (0,1-0,1, 6-36, 3,7-167 µg/L).....100
Figura 35 - Análise comparativa da atividade da fosfatase alcalina (ALP em larvas de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina ou clomazona e da mistura dos dois herbicidas.....101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades da curcumina e tetrahidrocurcumina.....38
Tabela 2 - Revisão de literatura sobre a quantificação de ametrina e clomazona.....77

SUMÁRIO

Capítulo 1: Considerações gerais.....18
1.1 INTRODUÇÃO.....19
1.2 OBJETIVO.....22
1.2.1 Objetivo Geral.....22
1.2.2 Objetivos Específicos.....22
1.3 REVISÃO DE LITERATURA.....23
1.3.1 Praguicidas.....23
1.3.1.1 Ivermectina.....24
1.3.1.2 Ametrina.....27
1.3.1.3 Clomazona.....29
1.3.2 Toxicologia.....30
1.3.3 Toxicidade em organismos não alvos.....31
1.3.4 Generalidades sobre o fígado.....33
1.3.5 Uso de células HepG2.....34
1.3.6 Estresse oxidativo e estado redox.....36
1.3.7 Tetrahidrocurcumina.....38
1.3.8 Vitamina C.....39
1.3.9 Uso do zebrafish em estudos toxicológicos.....40
1.4 REFERÊCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....42
Capítulo 2: Avaliação do possível efeito protetor da tetrahidrocurcumina e da vitamina C nos danos oxidativos induzidos pela ivermectina em células HepG2.....56
2.1 INTRODUÇÃO.....57
2.2 MATERIAL E MÉTODOS......58
2.2.1 Reagentes.....58
2.2.2 Cultura das células HepG2.....58
2.2.3 Parâmetros associados ao estresse oxidativo.....59
2.2.3.1 Determinação das concentrações de GSH e GSSG.....59
2.2.3.2 Avaliação do estado redox dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H).....60
2.2.4 Potencial atividade protetora da tetrahidrocurcumina e da vitamina C contra os efeitos da IVM.....61
2.2.4.1 Efeito sobre a atividade metabólica.....61
2.2.4.2 Efeito sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON).....62
2.2.5 Análise estatística 63
2.3 RESULTADOS 63
2.3.1 Concentrações de GSH e GSSG.....63
2.3.2 Estado redox dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H).....64
2.3.3 Atividade metabólica das células.....65
2.3.4 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERON).....66
2.4 DISCUSSÃO.....67
2.5 CONCLUSÃO.....70
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 70
Capítulo 3: Toxicidade da ametrina e da clomazona, isoladas ou combinadas, em zebrafish.....74
3.1 INTRODUÇÃO.....76
3.2 MATERIAL E MÉTODOS......78
3.2.1 Reagentes.....78
3.2.2 Manutenção dos Peixes.....79
3.2.3 Teste de toxicidade aguda nos estágios embrio-larvais de zebrafish.....80
3.2.4 Ensaio da atividade da acetilcolinesterase (AChE).........80
3.2.5 Biomarcadores de hepatotoxicidade.....81
3.2.6 Análise estatística.....82
3.3 RESULTADO.....82

3.3.1 Teste de toxicidade aguda.....82
3.3.1.1 Desenvolvimento.....82
3.3.1.2 Bexiga inflada.....84
3.3.1.3 Edema de pericárdio.....90
3.3.1.4 Edema de saco vitelínico.....92
3.3.2 Ensaio da atividade da acetilcolinesterase (AChE).....94
3.3.3 Biomarcadores de hepatotoxicidade.....96
3.3.3.1 Aspartato aminotransferase (AST).....96
3.3.3.2 Alanina aminotransferase (ALT).....98
3.3.3.3 Fosfatase alcalina (ALP).....100
3.4 DISCUSSÃO.....102
3.5 CONCLUSÃO.....106
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....106

Capítulo 1: Considerações gerais

1.1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui condições favoráveis para o agronegócio, sendo que o clima e abundância de terras faz com que anualmente os investimentos em pesquisa e tecnologia agropecuária aumentem significativamente. Apesar da boa perspectiva de renda nacional para manter a alta produtividade se torna necessária a utilização de compostos químicos fazendo que em 2021 o Brasil tenha sido o maior importador de praguicidas do mundo (Delabona; Gonçalves, 2022).

De acordo com a FAO (Food and Agricultural Organization) praguicida é qualquer substância, pura ou misturada, utilizada para controlar, prevenir ou destruir pragas (Xia *et al.*, 2022). Os praguicidas variam de acordo com suas propriedades químicas e físicas e possuem especificações em relação a qual praga se destina, como inseticidas, fungicidas, herbicidas, parasiticidas, raticidas entre outros.

Na medicina veterinária a ivermectina é usada em gatos, cães, peixes, cavalos, bovinos, ovinos e caprinos para o controle de diversos nematoides, ácaros, piolhos e moscas que causam doenças como dirofilariose, sarna, infestação intestinal, miíase, infestações pulmonares, oncocercose, infestações oculares, miíase gástrica e a sua alta eficiência faz com que após décadas ela ainda seja amplamente utilizada como parasiticida (antiparasitário) (Sulik *et al.,* 2023).

O uso indiscriminado da ivermectina para o controle principalmente de helmintos gastrointestinais pode trazer riscos para a saúde do animal hospedeiro. Conforme descrito por Favare *et al.* (2023), o controle de helmintos em equinos no Brasil inclui tratamento de todos os animais do rebanho com alternância de medicamentos em intervalos regulares sem a necessidade de diagnóstico prévio. Esse protocolo faz com que animais saudáveis sejam expostos à ivermectina sem apresentarem evidência de infestação por parasitas.

Em condições normais, mesmo após exposição a xenobióticos o organismo equilibra a produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) por meio de sistemas de defesa antioxidante, mantendo as ERON em níveis seguros. A produção controlada de ERO desempenha funções essenciais, como crescimento celular e síntese de ATP por exemplo, no entanto, sob estresse, ocorre um desequilíbrio entre a produção e a eliminação de ERON, levando a danos oxidativos que podem induzir morte celular (Mansoor *et al.,* 2024).

A tetrahidrocurcumina (THC) é o principal metabólito ativo da curcumina e devido à eficiente regulação do estresse oxidativo e função mitocondrial tem atraído a

atenção de pesquisadores nos últimos anos demonstrando ser um antioxidante altamente eficiente contra distúrbios gerados pela ação de compostos químicos, possuindo ação antioxidante superior à curcumina e apresenta potencial aplicação em aditivos alimentares funcionais e farmacologia devido à sua boa solubilidade, estabilidade fisiológica e função protetora contra o estresse oxidativo (Miranda *et al*., 2023; Zhang *et al.,* 2023; Zhu *et al.,* 2023). Outro antioxidante amplamente conhecido é a vitamina C, que desempenha diversos papéis essenciais para o organismo devido à sua capacidade de doar elétrons e se tornar um agente redutor fisiologicamente essencial (Jakubek *et al.,* 2023). O fato de apresentar ótima solubilidade em água permite a atuação em todas as partes do organismo neutralizando os radicais livres que são produzidos durante o estresse oxidativo (Feng *et al.,* 2023). Baseado nas propriedades antioxidantes da THC e da vitamina C, no presente estudo foi avaliado o potencial terapêutico da THC e vitamina C sobre o estresse oxidativo induzido nas células HepG2 expostas a diferentes concentrações de ivermectina, como forma de entender e auxiliar na prevenção e/ou no tratamento de intoxicações em animais e humanos.

O uso frequente de diferentes praguicidas na agricultura convencional gera um acúmulo de resíduos no solo e afluentes, potencializando os efeitos tóxicos de algumas misturas (Panico *et al.*, 2022). Ametrina é um herbicida seletivo sistêmico com classificação II sendo considerada altamente tóxica e utilizada no combate de plantas daninhas anuais (folhas estreitas e largas), que está associada, principalmente, às culturas de abacaxi, banana, café, cana-de-açúcar, citros e milho. A ametrina está na lista divulgada em 2018 pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) como um dos 20 praguicidas mais utilizados no Brasil entre 2012 e 2017, sendo capaz de bioacumular, podendo ser altamente tóxica para o meio ambiente causando efeitos crônicos aos organismos não alvos (Gomes Júnior *et al.*, 2021).

O herbicida clomazona, representante da classe isoxazolidinona foi desenvolvido no início de 1980 para o controle de gramíneas anuais e ervas daninhas de folha larga em uma ampla variedade de culturas e localizações (Gunasekara et al., 2009). É considerado um pré-herbicida, uma vez que precisa ser ativado durante sua metabolização na planta em que foi aplicado, a qual transforma a molécula para a forma 5-ceto-clomazona, que é o metabólito com atividade herbicida (Tenbrook; Tjeerdema, 2006). Stevanovic *et al*. (2017) e Severo *et al.* (2020) descreveram

alterações nos movimentos espontâneos, frequência cardíaca, eclosão, comprimento e incidência de deformidades indicando a alta capacidade da clomazona para induzir efeitos de subletalidade, além da taxa de mortalidade próxima de 10% em peixes expostos ao herbicida.

Diariamente, todos os organismos entram em contato com diferentes concentrações de produtos químicos por meio de alimentos, ar e água tornando cada vez mais preocupante os efeitos dessas combinações. Apesar dos avanços em relação a essa temática, ainda existe uma quantidade limitada de informações devido à possibilidade de um número quase infinito de combinações, tornando um desafio entender como elas interagem e quais consequências essas associações geram (Bopp *et al*., 2019).

Martin *et al.* (2021) realizaram uma revisão sistêmica sobre misturas relevantes para parâmetros de toxicidade com o objetivo de preencher a falta de informações mais profundas sobre a frequência que antagonismos ou sinergismos acontecem no meio ambiente considerando que essas interações são cada vez mais questionadas pela comunidade científica já que a normalmente são avaliados parâmetros individuais. Os autores utilizaram 1220 artigos e chegaram à conclusão de que existem algumas interações toxicológicas importantes que são negligenciadas dificultando o entendimento dos seus reais danos causados nos organismos.

Os dados de toxicidade aquática são relevantes para avaliação dos riscos ambientais e ecológicos de resíduos de produtos químicos e por isso a utilização de biomarcadores ou espécies biomarcadoras fornecem informações relevantes sobre os poluentes. Nesse quesito o zebrafish se destaca por possibilitar a avaliação de efeitos biológicos e moleculares induzidos pela presença de substâncias (Falfushynska *et al.*, 2022).

O zebrafish (*Danio rerio*) é um excelente modelo para pesquisam, entre as vantagens da utilização deste peixe, temos seu desenvolvimento rápido, bem caracterizado e muito semelhante ao de outros vertebrados (incluindo os humanos e mamíferos); desenvolvimento embrionário externo ao útero materno e transparente protegido por um córion, o que permite a identificação e monitoramento das mudanças morfológicas por estereomicroscopia (Legradi *et al.*, 2015).

Portanto, no presente trabalho, também foram avaliados os efeitos tóxicos da ametrina e da clomazona no zebrafish, bem como o sinergismo ou antagonismo exercido pela mistura dos dois herbicidas.

1.2 OBJETIVO

1.2.1 Objetivo Geral

Elucidar os danos oxidativos induzidos pela ivermectina e identificar a possível proteção da tetrahidrocurcumina e da vitamina C contra as alterações no sistema antioxidante e a produção de radicais livres causadas nas células HepG2 após a exposição à ivermectina para a melhor compreensão dos mecanismos de ação tóxica do parasiticida.

Caracterizar os efeitos da exposição do zebrafish aos herbicidas ametrina e clomazona, bem elucidar a ação sinérgica ou antagônica da mistura dos herbicidas.

1.2.2 Objetivos Específicos

i) Determinar as concentrações de GSH e GSSG das células HepG2 após exposição à ivermectina;

ii) Avaliar o estado redox dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H) nas células HepG2 após exposição à ivermectina;

iii) Comparar a atividade metabólica e a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nas células HepG2 previamente incubadas com tetrahidrocurcumina e vitamina C e em seguida expostas à ivermectina.

iv) Avaliar os parâmetros de subletalidade e teratogenicidade dos embriões de zebrafish com 144 horas pós fecundação (hpf) expostos aos herbicidas ametrina e clomazona, isolados ou combinados;

v) Quantificar a atividade enzimática da AChE nas larvas de zebrafish expostas a ametrina e clomazona, isolados ou combinados;

vi) Avaliar a atividade de enzimas indicadoras de hepatotoxicidade em larvas de zebrafish expostas a diferentes concentrações dos herbicidas isolados ou combinados.

1.3 REVISÃO DE LITERATURA

1.3.1 Praguicidas

Os praguicidas são poluentes ecológicos, pois a aplicação constante nas plantações e nos animais propicia que resíduos sejam carregados pelo ar e água para outros ambientes (Fernandes *et al.*, 2023). São compostos químicos utilizados para restringir o desenvolvimento de organismos nocivos, sendo classificados de acordo com os organismos alvos em inseticidas (insetos), fungicidas (fungos), herbicidas (ervas daninhas), bactericidas (bactérias), larvicidas (larvas), parasiticidas (parasitas), nematicidas (nematoides), raticidas (roedores), algicidas (algas), piscicidas (peixes), avicidas (aves), moluscicidas (caracóis) (Rohani, 2023).

É importante levar em consideração a bioacumulação dos praguicidas através das cadeias biológicas, as substâncias em diferentes concentrações podem ser prejudiciais ou letais para organismos não alvos, pois geram complicações no sistema nervoso central a longo prazo (Van Cong; Phuong; Bayley, 2008). O grau de toxicidade dos praguicidas varia entre muito perigoso, altamente inseguro, moderadamente nocivo e improvável de apresentar risco e seu modo de ação pode ser classificado como: I) sistêmicos, ativados após o contato com diferentes tecidos ou sistema vascular; II) não sistêmicos, onde o contato é suficiente para surgir efeito ou III) após ingestão agindo principalmente no sistema nervoso central causando paralisia nas pragas-alvo ou morte das plantas (Rohani, 2023).

A alta disponibilidade de terra, clima tropical e abundância de recursos hídricos fazem com que o Brasil seja um dos maiores produtores agrícolas e pecuários do mundo, consequentemente o país é um dos principais consumidores de praguicidas. Gaboardi, Panis e Candiotto (2023) avaliaram o panorama atual do uso de praguicidas no Brasil e descreveram que, além de ser um país que incentiva a aquisição, produção e uso de componentes químicos desde a década de 1960, o Brasil nos últimos anos se destaca devido ao registro de novos praguicidas, principalmente genéricos, pois as políticas públicas não adotam medidas de precaução a longo prazo e mantém liberadas substâncias proibidas em outros países mesmo cientificamente estando associados a danos potencialmente irreversíveis.

Os impactos negativos do uso de praguicidas são há muito tempo questionados e investigados para entendimento melhor do que acontece após a exposição aos compostos considerando que a manipulação correta envolve todos os processos desde a saída do produto da indústria até o descarte das embalagens, por isso se faz

cada vez mais necessário o aumento da visibilidade da população em relação as consequências do mal uso (Daufenback *et al.,* 2022).

1.3.1.1 Ivermectina

A ivermectina (IVM) ($C_{48}H_{74}O_{14}$) é um anti-helmíntico e inseticida com eficácia conhecida quando administrada em ruminantes, porcos, cavalos, peixes e pets atuando contra nematóides parasitas gastrointestinais, vermes pulmonares, piolhos e sarna sendo amplamente utilizada por sua alta eficiência e pouca especificidade (Martin; Robertson; Choudhary, 2021). Sua ação acontece pela ativação dos canais de cloreto que causam hiperpolarização neural levando a liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA) induzindo a paralisia dos músculos somáticos e morte dos parasitas (Kane *et al.*, 2000).

Conforme descrito por Leathwick *et al.* (2020), a eficácia dos anti-helmínticos contra os nematoides varia bastante dependendo da forma como ele é aplicado e sabe-se que as concentrações do ativo que atingem o local de ação também dependem desse fator. Pensando nisso, o autor realizou estudo para medir as concentrações de IVM que atinge os diferentes tecidos e espécies de vermes-alvo em bovinos por via oral, tópica ou por injeção. Os resultados demonstram que a máxima exposição dos parasitas acontece através da administração por injeção, apesar da utilização por via oral proporcionar alta exposição ao medicamento.

Os sinais aparentes de toxicidade começam a aparecer após 24 horas e costumam estar relacionada à perda do controle motor e reflexos visuais, fraqueza, tremores, arritmia cardíaca e respiratória. Pimpão *et al.* (2005) desenvolveram pesquisa com o objetivo de avaliar a toxicidade da IVM em cães sem raça definida e assim como já descrito por outros autores, concluíram que o uso de IVM deve ser de maneira criteriosa pois a longo prazo os animais expostos podem apresentar lesões oculares e alterações significativas na reprodução.

Normalmente as evidências clínicas de intoxicação são semelhantes entre as espécies, mas devido à escassez de estudos com organismos aquáticos, Mladineo, Marsic-Lucic e Buzancic (2006) determinaram a toxicidade do tratamento com banho de IVM nos peixes para avaliar as alterações comportamentais e identificar os primeiros sinais de intoxicação. O *Ceratothoa oestroides* é um ectoparasita difícil de controlar em sistemas intensivo de criação de peixes, trazendo perdas significativas para a produção diminuindo o ganho de peso dos animais e em alguns casos

causando morte nas fases larvais e juvenis, eles descreveram que os sinais clínicos incluíam extra-sensibilidade a estímulos visuais ou sonoros, maior frequência respiratória, natação rápida e após o período de excitação a atividade sensorial diminuiu ao ponto de os animais ficarem deitados no fundo do aquário e 100% de mortalidade foi observado após exposição por 96h a concentração de 1,8 mg/L. No pós-mortem observaram hemorragia nos rins, fígado e brânquias.

Devido a sua fácil administração e alta eficácia, atualmente a IVM é o antiparasitário mais utilizado na Gujarat - Índia para o controle de carrapatos em animais leiteiros, por conta do aumento na utilização em longos períodos existe a possibilidade de os ácaros desenvolverem tolerância. Apesar de vários relatos na literatura de tolerância em relação a compostos químicos, até o momento não existia nada relacionado à IVM e pensando nisso Shyma *et al.* (2021) desenvolveram um estudo com acaricidas adultos de *H. anatolicum* e IVM. Os resultados demonstraram que os carrapatos desenvolveram tolerância ao composto indicando que esse pode vir a ser um problema futuramente.

A tolerância de nematoides também foi observada em equinos, conforme descrito por Flota-Burgos *et al.* (2023) que analisaram cinco fazendas com histórico de uso de IVM. Eles coletaram informações sobre protocolos de tratamentos realizados nos animais e fizeram contagem de ovos fecais e constatou-se que três das cinco fazendas foram classificadas como resistentes sendo semelhante entre elas a utilização de IVM mais de 4 vezes/ano. A co-infecção de vermes faz com que os produtores usem dois ou mais praguicidas simultaneamente, se por um lado eles cumprem o papel de controlar ou eliminar os parasitas por outros expõe os animais a concentrações elevadas de xenobióticos e com base nisso Idowu *et al.* (2015) avaliaram a combinação de Artemeter-Lumefantrina (antimalárico) com Albendazol (anti-helmintico) e IVM. A combinação das substâncias gerou disfunção hepática e estresse oxidativo induzindo a necrose celular.

Dey *et al.* (2020) avaliaram a tolerância anti-helmintica em diversas fazendas de ovinos e caprinos em Bangladesh analisando a contagem e eclosão de ovos fecais e amostras de larvas submetidas a coprocultura. Eles utilizaram PCR para determinar a tolerância e observou-se que os nematoides são resistentes a IVM, sugerindo uma condição alarmante para a região, pois a resistência dos parasitas está diretamente relacionada com a ineficiência do medicamento seguindo as recomendações e concentrações de uso.

O principal problema da tolerância dos parasitas a IVM está relacionado ao aumento das doses utilizadas para controle dos endo e ectoparasitas, entender como esse fármaco funciona no organismo é de fundamental importância e por isso Qabbus *et al*. (2022) realizaram um teste *in vitro* para investigar a citotoxicidade da IVM em células de câncer cervical utilizando concentração final de 0,1; 0,3; 1; 3; 10 ou 30 µM e descreveram que é preciso ter cautela em relação ao uso do medicamento pois o fato de ser hidrofóbico limita a solubilidade em água fazendo com que agregados do composto sejam formados após administração. Apesar de ser um desafio afirmar que os resultados observados *in vitro* são idênticos ao *in vivo*, é preciso considerar que as concentrações eficazes de IVM são próximas ou superiores ao limite de solubilidade aquosa (Qabbus *et al.,* 2022).

Sabendo que os valores de dose letal média (LD50) da IVM estão na faixa de 10-50 mg/kg quando utilizado de forma oral e acima de 660 mg/kg para aplicação dérmica em ratos, Dadarkar, Deore e Gatne (2007) avaliaram a toxicidade aguda da IVM em ratos após a administração subcutânea para determinar a LD50 através do método Classe Tóxica Aguda (CTA) e pelo método convencional usando análise probit. Foram utilizados 15 ratos para a CTA e 50 animais para a análise probit, em todos os ratos foi observado aumento de fluxo de sangue no fígado além de cambaleio, descoordenação, perda de endireitamento, prostração, bradicardia e morte, ao final dos 14 dias a LD50 da IMV ficou em 5-50 mg/kg para o método de CTA e 51,5 mg/kg pela análise convencional.

Silva, Ferreira e Miranda (2018) relataram o primeiro surto de intoxicação por IVM em suínos no Brasil, 32 animais de 6 kg foram vermifugados sete dias após o desmame com 1 mL de IVM para controle dos parasitas por via subcutânea. Considerando que a dose recomendada da IVM 10 mg/mL é de 300 µg/kg de peso corporal, 1 mL da solução seria para animais com peso próximo de 33 kg e no caso dos leitões o correto seria aplicar 0,181 mL. Os sinais clínicos incluíam tremores, diminuição da força dos membros posteriores, prostração, descoordenação e dos 32 animais, 31 vieram a óbito.

Alves *et al.* (2021) relataram a ocorrência de intoxicação por IVM em felino doméstico após administração via oral em dose 10 vezes acima do que foi preconizado para o peso do animal, os sinais clínicos foram observados descoordenação, contração muscular, hipotermia, reflexo pupilar lento. Os sintomas foram observados até 24h após o atendimento no Hospital Veterinário Prof. Mário Dias

Teixeira, Universidade Federal Rural da Amazônia e 20 dias depois o animal continuou apresentando episódios de incoordenação e crises convulsivas.

O mal uso e a facilidade de compra da IVM sem orientação de veterinários é algo comum entre os tutores e criadores de animais, como consequência a alta dosagem associada a aplicação inadequada leva tolerânica dos endoparasitas ou ectoparasitas e a intoxicação dos hospedeiros, devido a esses fatores é preciso observar os sinais clínicos após aplicação e intervir imediatamente nos primeiros sinais de alterações neurológicas e motoras (Mello; Franco, 2021).

1.3.1.2 Ametrina

A Ametrina é um herbicida que compõe uma s-triazina formada por um grupo tiometil, um grupo etil e um grupo isopropil, formando a estrutura que leva o nome de 2-N-etil-4-N-isopropil-6-tiometil1,3,5-triazina-2,4-diamino. Ela é um herbicida seletivo sistêmico com classificação II sendo considerada altamente tóxica e utilizada no combate de plantas daninhas anuais (folhas estreitas e largas), que está associada, principalmente, às culturas de abacaxi, banana, café, cana-de-açúcar, citros e milho (Gomes Júnior *et al*., 2021).

Amplamente utilizada para otimizar a produção de cana-de-açúcar as triazinas apresentam problema ambiental para organismos não alvos, por ser uma substância com alta mobilidade, persistência, solubilidade em água e infiltração fraca no solo, a soma desses fatores faz com que o composto se torne facilmente transportado por escoamento superficial e lixiviação gerando impactos na saúde de humanos e animais (Ramos *et al.,* 2023).

A aplicação extensiva e frequente de herbicidas leva ao acúmulo de resíduos no ambiente aquático, cada vez mais regiões e bacias hidrográficas relatam a presença de herbicidas nas águas superficiais e subterrâneas, esses compostos químicos podem ocasionar efeitos ecológicos irreversíveis além de apresentar risco a saúde (Li *et al*., 2023).

Conforme descrito por Machado *et al*. (2017), a poluição de rios próximos a áreas urbanas representa um risco para a saúde humana por conta da exposição direta aos produtos químicos ou ingestão de água e peixes contaminados. Após avaliação de amostras de água e sedimentos do rio Pardo, São Paulo, durante a estação chuvosa foi constatada a presença da ametrina, evidenciando a necessidade

de intensificação na fiscalização sobre a utilização deste composto químico nas lavouras.

A utilização de água subterrânea é uma alternativa para consumo de água potável em regiões onde a infraestrutura de abastecimento é precária, mas a qualidade da água depende diretamente da quantidade de nutrientes e resíduos de compostos oriundos da lixiviação. Portal *et al*. (2019) desenvolveram estudo para mensurar a qualidade da água de poços construídos por famílias agricultoras na região do assentamento Zumbi dos Palmares no norte do Rio de Janeiro, em todas as amostras de água coletadas foram detectados resíduos de ametrina oriundos das plantações de mandioca, abacaxi e cana-de-açúcar localizadas dentro do assentamento.

Stefano *et al*. (2022) realizaram estudo em Porto Alegre para identificar a ocorrência de contaminação por praguicidas em águas subterrâneas, pois na zona sul da cidade é onde se predomina a agricultura e a água oriunda de poções e nascentes são utilizadas para abastecer aproximadamente 25% da população da cidade. Em mais de 90% das amostras foram detectados resíduos de praguicidas, incluindo ametrina, e grande parte dos resíduos foram transportados após lixiviação ou dispersão do ar durante o processo de aplicação na lavoura.

O rio Aquidauna é um importante corredor ecológico do bioma Pantanal, mas o aumento das áreas agrícolas próximas a sua margem tem contribuído para alterações na qualidade da água afetando negativamente a biota aquática tornando os organismos mais vulneráveis aos danos tóxicos dos resíduos dos praguicidas, no estudo realizado por Viana *et al.* (2023) os autores avaliaram seis locais ao longo do rio para identificação da qualidade da água. Os autores realizaram as amostragens em novembro de 2020, durante o período chuvoso e além de observar a conversão da vegetação da mata ciliar em extensas áreas de pastagens, entre os contaminantes emergentes detectados a ametrina representa um potencial poluidor ecotoxicológico.

Sabendo da necessidade do tratamento eficiente de efluentes contaminados por resíduos de praguicidas, Gomes Júnior *et al*. (2021) avaliaram a funcionalidade do tratamento com multiestágio de processos de coagulação-floculação-decantação e irradiação artificial como alternativa para tratamento de um afluente industrial não biodegradável contendo ametrina. Após avaliação dos dados, os autores concluíram que esta é uma alternativa promissora para o tratamento de água, pois ao finalizar os processos observou-se alta remoção de matéria orgânica e diminuição da toxicidade.

1.3.1.3 Clomazona

A clomazona (CLZ), $C_{12}H_{14}ClNO_2$ cujo nome químico é 2-(2- clorobenzil)-4,4-dimetil-1,2-oxazolidin-3-ona, é um herbicida que pertence à família das isoxazolidinonas, utilizado para controlar gramíneas anuais e ervas daninhas de folhas largas nas plantações de algodão, ervilha, abóbora, soja, batata, cana-de-açúcar, mandioca, trigo e arroz sendo aplicado no pré-plantio ou pré-emergência (Wang *et al.,* 2022). A CLZ é altamente solúvel em água com características hidrofílicas, considerando que mais de 95% da aplicação dos herbicidas se espalha para além do controle das ervas daninhas, a utilização generalizada da CLZ reflete seu alto potencial de impacto ambiental (Stevanović *et al.,* 2021).

Seben *et al.* (2021) realizaram a quantificação e qualidade da água de mananciais utilizados para consumo humano localizados em propriedades rurais no Rio Grande do Sul, os autores coletaram cinco amostras de quatro locais diferentes. A clomazona esteve presente em 95% das águas estudadas, sendo 19 das 20 amostras coletadas, demonstrando potencial risco a saúde humana e dos animais aquáticos a curto e longo prazo.

O ambiente aquático e o solo são extensos reservatórios de contaminantes, principalmente os localizados próximos as áreas agrícolas devido à alta utilização de praguicidas com diferentes finalidades, no nordeste do Brasil a cana-de-açucar é a principal commodity agrícola, devido a isto, Barreto *et al.* (2020) caracterizaram o risco ambiental no município de Igarassu, Pernambuco. Onze praguicidas foram aplicados na área de estudo no período de agosto de 2016 e julho de 2017, entre eles a clomazona de destacou como um dos que produziram maiores cargas poluentes.

Considerando que a clomazona é um potencial poluente dos recursos hídricos por ser amplamente utilizada na agricultura, López-Piñeiro *et al*. (2022) avaliaram a eficiência da adição de biocarvão de azinheira para correção orgânica do solo nas propriedades produtoras de arroz. Eles observaram que a presença do biocarvão aumentou a persistência de clomazona no solo irrigado por aspersão, possibilitando que um maior índice de clomazona sofresse lixiviação independentemente de como havia sido o preparo do solo antes do plantio.

O modo de ação do clomazona em organismos segue sendo estudado para desvendar o mecanismo de toxicidade causada pela presença do composto. Pereira; Fernandes; Martinez (2013) avaliaram parâmetros hematológicos e bioquímicos em

peixes *Prochilodus lineatus* (Curimba) expostos 96 horas ao clomazona e os resultados indicaram alterações hematológicas que podem causar anemia e interferir na captação de oxigênio pelas hemácias. Em relação às alterações bioquímicas, foi constatado que o processo de desintoxicação acontece pela ação da enzima glutationa S-transferase, havendo aumento da atividade da enzima catalase e considerando a atuação dessa enzima na eliminação de H_2O_2, esse fato indica um possível estresse oxidativo causado pelo clomazona. Também foi observada a redução da atividade da enzima acetilcolinesterase cerebral e muscular, causando alterações comportamentais nos animais.

1.3.2 Toxicologia

Conceitualmente, toxicologia é conhecida como a ciência dos agentes toxicantes, pois por meio dela são estudadas as propriedades químicas e físicas das substâncias e seus efeitos fisiológicos e/ou comportamentais nos organismos. Agentes toxicantes são todas substâncias que quando ingeridas ou em contato com a pele, em quantidades suficientes, causam doenças ou morte (Langman; Kapur, 2006).

Conforme descrito por Kaplan e Pesce (1984) a toxicologia abrange diversas áreas e por isso é dividida em:

I-) toxicologia ambiental, que tem como objetivo avaliar os efeitos nocivos da presença de compostos químicos no meio ambiente através das cadeias biológicas;

II-) toxicologia clínica, relacionada a utilização de produtos com finalidades benéficas para o tratamento de determinadas patologias, porém com efeitos adversos em outros órgãos ou sistemas não relacionados;

III-) toxicologia forense, voltada para aspectos nocivos de produtos químicos ou venenos.

A toxicologia visa determinar os valores seguros para exposição de produtos químicos e deliberar a margem de segurança em relação a concentração limite de uso, neste processo são considerados sinais clínicos e alterações no organismo ponderando as características químicas e fatores que influenciam a toxicidade como temperatura, umidade, contato direto ou indireto com os compostos e biotransformação após entrada do xenobiótico no corpo (Villatte, 2020).

Os bioensaios toxicológicos caracterizam os perigos de exposição dos organismos a compostos químicos, utilizando um grupo controle e outros grupos com

tratamentos para identificar os riscos a fim de ter uma referência quantitativa das doses e seus efeitos colaterais (Kluxen *et al*., 2021). Na literatura existem diversos relatos da avaliação dos mecanismos de toxicidade de xenobióticos em animais como ratos (Carvalho *et al.,* 2013; Mazzo *et al.,* 2018), camundongos (Dávila; Li; Bagchi, 2018), peixes (Khan *et al*., 2021), abelhas (Balieira *et al.,* 2018; Botina *et al.*, 2020), ovinos (Fagundes *et al*., 2015), entre outros.

1.3.3 Toxicidade em organismos não alvos

A maioria das intoxicações se dá pelas vias respiratória e dérmica e em menor quantidade pela via oral, a aplicação incorreta dos produtos aumentam significativamente as chances de problemas a curto e longo prazo. A exposição por um curto período causa efeitos agudos como tontura, vômito e desorientação, já a exposição prolongada a baixas concentrações causa efeitos crônicos como alterações imunológicas e reduções na eficiência do sistema respiratório (Scharmach; Silva; Campos, 2020; Silva; Novato-Silva; Faria; Pinheiro, 2005).

Além da exposição humana, também precisamos levar em consideração os efeitos causados direta ou indiretamente nos animais. Na literatura não faltam exemplos de efeitos tóxicos provocados pela exposição de diversos compostos.

Yokoyama *et al.* (2019) avaliaram as alterações hepatológicas causadas pela exposição de cães a 206 praguicidas liberados para uso entre 2007 e 2013 no Japão, 108 animais apresentaram hepatotoxicidade causando necrose, alterações hepatobiliares, desordem do metabolismo lipídico ou mudança na pigmentação, todos os casos estavam associados a coexistência de hipertrofia hepática.

Demartelaere *et al.* (2021) relataram em seu trabalho que é preciso ter muita atenção na utilização de praguicidas próximo aos animais de produção pois eles ficam mais suscetíveis à contaminação ao consumirem água e alimentos com resíduos desses compostos como milho ou pastagem que foram submetidas direta ou indiretamente à utilização de substâncias químicas para o controle de alguma praga.

Em 2010 foi relatado um surto de intoxicação por inseticidas em vacas leiteiras em Cuiabá - Mato Grosso. Os animais apresentaram anorexia, diarréia, tremores e dificuldade para respirar; das 25 vacas da propriedade 11 vieram a óbito e após necropsia os autores observaram edema pulmonar, enfisema subpleural e hemorragias de intensidade e formas diversas em vários órgãos (Mendonça *et al.*, 2010). Outro relato na literatura descreve a intoxicação causada em bovinos ao

consumir água contaminada com mancozebe (fungicida) e forato (inseticida, acaricida e nematicida), sendo que dos 49 animais da propriedade 20 vieram a óbito poucas horas após apresentarem sinais clínicos de agressividade, tremores musculares, diarréia e alterações na coordenação motora (Oliveira-Filho *et al.*, 2010).

No Laboratório de Bioquímica Metabólica e Toxicológica, localizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – Unesp, Câmpus de Dracena, já foram realizados estudos em parceria com o Prof. Dr. Daniel Nicodemo para avaliar os efeitos de alguns praguicidas nas abelhas. Em estudo realizado para avaliar os danos causados pelos inseticidas fipronil e imidacloprido na atividade de mitocôndrias isoladas da cabeça e do tórax de abelhas africanizadas, os dois inseticidas demonstraram ser capazes de inibir a bioenergética mitocondrial resultando também na diminuição da síntese de ATP (Nicodemo *et al.*, 2018). Nicodemo *et al.* (2020) também relataram alterações nas mitocôndrias isoladas do tórax de abelhas causadas pela piraclostrobina (fungicida), os autores observaram diminuição do consumo de oxigênio, dissipação do potencial de membrana mitocondrial e esses fatores associados resultaram na redução da concentração de ATP nas mitocôndrias, o que pode alterar a capacidade de voo das abelhas.

A piraclostrobina também afetou a bioenergética mitocondrial do bicho-da-seda, interferindo na produção de seda pelo inseto (Nicodemo *et al.,* 2018). Ainda, Li *et al.* (2020) examinaram os efeitos do phoxim (inseticida) no sistema imunológico do bicho-da-seda e observaram que a utilização desse praguicida representa um risco para a sericicultura pois o contato dos animais com a substância diminuiu os mecanismos de imunidade associados à defesa de patógenos infectados por via oral.

Radin e Wellman (2023) apresentaram alguns casos de intoxicação de animais pets para demonstrar a importância de estar atento aos sinais clínicos, os casos estão descritos a seguir: 1) cão sem raça definida, macho, apresentou descoordenação, convulsão e espasmos faciais; 2) cão sem raça definida, macho, com vômito, taquicardíaco, pupilas contraídas e fraqueza; 3) cão sem raça definida, macho, apresentou apatia, mucosas pálidas, taquicardia e sons pulmonares abafados; 4) Dachshund (popularmente conhecido como Salsicha), macho, manifestou vômito, desidratação, taquicardia e abdômen tenso; 5) Rottweiler, fêmea, mostrou-se apática, com salivação e vômito; 6) gato sem raça definida, macho, apresentou letargia, vômito, mucosas vermelho-escuras e rim esquerdo aumentado.

A toxicologia veterinária é uma área fundamental para entendimento da origem da intoxicação dos animais, pois na maior parte dos casos a intoxicação acontece após uso prolongado ou inadequado dos produtos podendo ser de forma acidental ou intencional pelo tutor ou proprietário do animal (Bulhões, 2022). O princípio da toxicologia veterinária inclui o uso de conhecimentos da toxicologia clínica associado a química analítica para diagnosticar, intervir e prevenir as intoxicações (Wilson-Frank, 2023). Um dos meios não invasivos que prevenção e intervenção das intoxicações é o uso de plantas medicinais como alternativa para a não utilização de medicamentos, em todo o mundo acredita-se que mais de 40.000 espécies de plantas são utilizadas medicinalmente, porém apenas 5.000 foram estudadas em relação as suas propriedades químicas (Schlittenlacher *et al.,* 2022).

1.3.4 Generalidades sobre o fígado

O fígado é um órgão que desempenha diversas funções vitais, como por exempli sintetizar colesterol, realizar o metabolismo de proteínas, armazenar glicose, secretar bile, neutralizar e eliminar substâncias exógenas, e qualquer alteração na sua funcionalidade compromete o comportamento do organismo, as doenças neste órgão englobam vários aspectos como hepatotoxicidade, hepatite, cirrose e câncer (Marinho, 2021).

O fígado é o maior órgão do corpo, constituído de duas estruturas lobares com coloração castanho escuro variando até preto em animais com disfunção ou algum dano causado por fatores externos. É responsável pela transformação de proteína em carboidratos ou gordura sendo importante para o armazenamento de lipídeos (Paganotto *et al.*, 2020). Outras funções hepáticas incluem a produção e metabolismo de várias substâncias e hormônios, participa da síntese e secreção de sais biliares e promove a metabolização dos compostos (Vasconcelos, 2022).

Além disso, o fígado é responsável pela desintoxicação reduzindo os impactos negativos causados por xenobióticos ao organismo, por ser o primeiro órgão que entra em contato com substâncias exógenas transportadas pela veia porta após absorção via cutânea, respiratória ou oral (Piñeiro-Carrero; Piñeiro, 2004; Ferreira, 2020).

Os hepatócitos são as principais células funcionais do fígado e qualquer substância capaz de alterar sua funcionalidade é denominada hepatotoxicante, essas lesões hepáticas dependem da capacidade das substâncias influenciarem a atividade

das enzimas metabólicas, receptores nucleares ou moléculas de sinalização (Vasconcelos, 2022; Pan *et al.,* 2020).

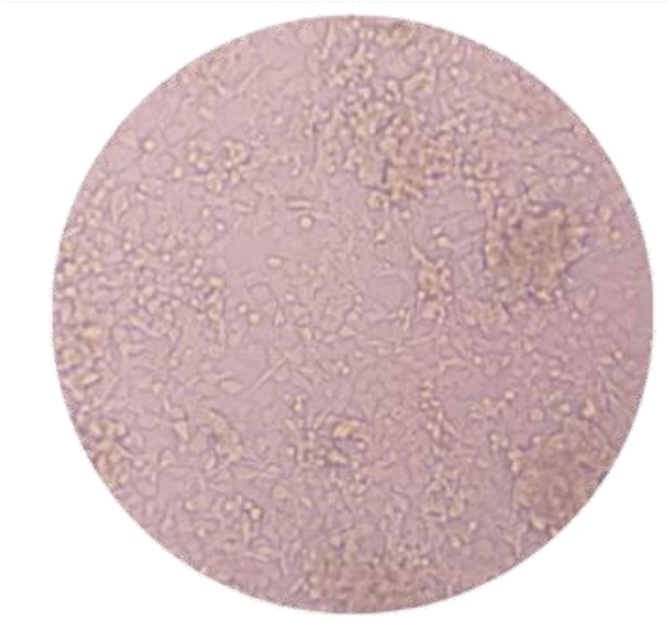
Pan *et al.* (2020) descreveram que a hepatotoxicidade pode ser decorrente de lesão hepáticas induzidas por compostos ativos que agem nos hepatócitos gerando congestão e necrose do fígado, disfunção mitocondrial, danos vasculares hepático, inibição de enzimas reguladoras entre outros.

1.3.5 Uso de células HepG2

As células HepG2 (Figura 1) correspondem a uma linhagem celular derivada de um hepatoblastoma humano e tem sido comumente utilizada como ferramenta na avaliação de metabolismo de xenobióticos e toxicidade hepática, por manter muitas funções especializadas dos hepatócitos normais incluindo enzimas de fase I e II semelhante ao de hepatócitos recém isolados (Liebel, 2015). Este modelo experimental está entre os sistemas *in vitro* mais sofisticados que constituem fatores-chave para predizer a toxicidade induzida por xenobióticos e permitem uma compreensão sobre o transporte, metabolismo e eliminação de substâncias tóxicas pelo fígado, além da interação e indução de hepatotoxicidade (Silva *et al.,* 2022; Pereira, 2016).

É uma linhagem estável e reconhecida pela OECD - GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS como um modelo confiável e renomado para pesquisa *in vitro.*

Figura 1 - Imagem microscópica das células HepG2



Fonte: Elaborada pela autora.

As células possuem facilidade de manuseio e expressam uma ampla variedade de funções metabólicas do fígado sendo uma alternativa para substituição de uso de animais durante o processo de avaliação das alterações hepáticas induzidas por substâncias (Queiroz, 2017). Podem ser cultivadas em: I-) monocamadas aderidas em um substrato, onde é preciso acontecer a fixação celular para posteriormente acontecer a proliferação celular ou II-) suspensas no meio de cultura, no qual as células possuem capacidade de sobreviverem e proliferarem sem a necessidade de fixação (Freshney, 2016).

A morte celular causada por substâncias exógenas compromete o funcionamento dos organismos, alterando processos metabólicos e desregulando a homeostase. Os tipos de morte celular se diferenciam pela forma em que as vias de sinalização são estimuladas e entendidas pelas células, podendo ser por: I-) apoptose ou morte celular programada, conhecida por ser uma resposta fisiológica que fragmenta o núcleo celular, forma bolhas na membrana e condensa a cromatina; II-) autofagia, onde o autofagossomo se funde ao lisossomo para degradar o conteúdo celular; e III-) necrose, causada por indutores não fisiológicos que danificam fisicamente as células (Patil; Bhor; Rhee, 2020). Silva *et al*. (2022) relataram vantagens na utilização de células HepG2 em estudos de toxicidade que envolvem

alterações dos fatores que estão correlacionados com parâmetros físico-químicos que induzem a disfuncionalidade das células induzindo morte celular.

Por ser o principal órgão de desintoxicação de substâncias que entram no corpo, o entendimento dos efeitos tóxicos no fígado é de fundamental importância, pensando nisso Wang *et al.* (2023) avaliaram a toxicidade de Clorpirifós (inseticida), Carbofurano (inseticida), Acetamiprida (inseticida) de forma isolada e combinada em células HepG2. As evidências demonstram que os praguicidas exercem efeitos tóxicos e que ao misturar acontece uma potencialização dos danos celulares indicando sinergismos entre os compostos, através do estresse oxidativo, aumento da liberação de lactato desidrogenase e apoptose.

Hojatipour *et al.* (2023) utilizaram células HepG2 para avaliar atividade citotóxica de um derivado do ácido mefenâmico (anti-inflamatório), eles relataram redução na viabilidade celular e aumento na taxa de apoptose nos tempos de 24 e 48 horas de exposição, indicando que o uso prolongado de medicamentos deve acontecer de forma cautelosa devido aos danos hepáticos oriundos.

O fígado é o órgão de armazenamento de ferro e por isso se torna susceptível a lesões induzidas pelo estresse oxidativo devido ao excesso de ferro, Kose *et al.* (2023) avaliaram os efeitos do uso de ácidos fenólicos como protetores da toxicidade causada pelo acúmulo de ferro. O estudo revelou redução na produção de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica, indicando que os ácidos possuem capacidade de regular genes que atuam nas enzimas antioxidantes.

1.3.6 Estresse oxidativo e estado redox

O estresse oxidativo desempenha papel importante na toxicidade induzida por compostos, ele tem sido considerado um dos mecanismos que desencadeiam a morte celular, normalmente acontece pelo desbalanço entre a geração de compostos oxidantes e a capacidade de ação dos sistemas de defesa antioxidante (Yamashita *et al.,* 2019).

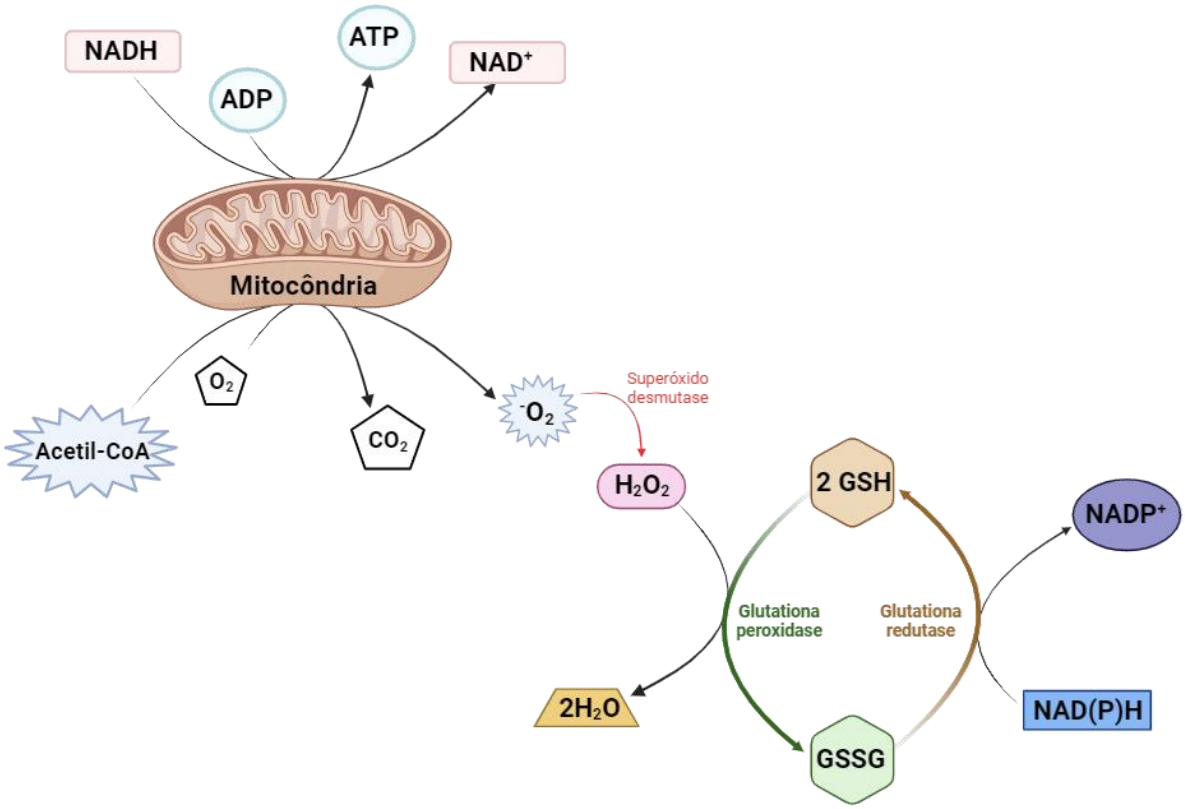
A geração de radicais livres é um processo contínuo e fisiológico para que algumas funções biológicas, como a produção de ATP pela cadeia transportadora de elétrons, sejam mantidas eficientemente, mas o principal problema está relacionado ao desequilíbrio, pois a produção excessiva induz danos oxidativos. Os mecanismos de formação de radicais livres estão normalmente associados a mitocôndrias, membranas celulares e citoplasma (Barbosa *et al.,* 2010). As Espécies Reativas de

Oxigênio (ERO) é um termo coletivo que inclui moléculas altamente reativas derivadas de O_2 como superóxidos, peróxido de hidrogênio, radicais de hidroxila, ozônio e oxigênio singleto (Liu *et al*., 2023).

Os antioxidantes são divididos em não enzimáticos, por exemplo vitamina E e glutationa, ou enzimáticos, incluindo catalase, glutationa peroxidase, glutationa redutase, que atuam diretamente na ação dos oxidantes nos lipídeos, proteínas e DNA. A produção de oxidantes e indução ao estresse oxidativo prejudica uma ampla gama de vias bioquímicas e por isso é fundamental seu entendimento (Razavi *et al.,* 2023; Zheng *et al.,* 2020).

A modulação e equilíbrio do estado redox nas mitocôndrias (Figura 2) é necessário pois as alterações geradas pelo desequilíbrio fazem com que ocorra alteração na fosforilação oxidativa, na morfologia mitocondrial, aumento produção ERON, indução na transição de permeabilidade mitocondrial e esses fatores servem de sinalização para morte celular (Weiser *et al.,* 2023).

Figura 2 - Esquema do sistema antioxidante enzimático



Fonte: BioRender.com, adaptado de Donadio (2011).

1.3.7 Tetrahidrocurcumina

A tetrahidrocurcumina (THC) é um metabólito derivado da curcumina, popularmente conhecido como açafrão da Índia, possui excelente ação antioxidante atuando na eliminação de radicais livres e apresenta melhor disponibilidade, estabilidade fisiológica e facilidade de absorção que o composto de origem (Miranda *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2022). A THC possui melhor solubilidade aquosa do que a curcumina, diferente do produto de origem que apresenta coloração amarela a THC é incolor e isso permite que seja compatível a utilização com aditivos funcionais, outras diferenças estão descritas na Tabela 1 (Zhu *et al.,* 2023).

Tabela 1 - Propriedades da curcumina e tetrahidrocurcumina

	Curcumina	**Tetrahidrocurcumina**
Estabilidade	Instável em pH fisiológico	Estável em pH fisiológico
Auto-oxidação	Sofre auto-oxidação rápida e apresenta efeitos pró-oxidantes	A auto-oxidação acontece de forma muito lenta
Atividade antioxidante	Reduzida	Elevada (1,5 vezes maior que a curcumina)
Absorção	Ruim	Boa

Fonte: Adaptado de Zhu *et al.* (2023).

Muthumani e Miltonprabu (2015) exploraram o papel protetor do THC na prevenção do estresse oxidativo induzido por arsênico em relação aos danos mitocondriais hepáticos e complicações lipídicas em ratos. Os resultados mostraram que a THC reduziu significativamente os danos hepáticos e que o possível mecanismo para os efeitos observados pode ser devido à supressão dos radicais livres e melhora nas atividades das enzimas antioxidantes.

Miranda *et al.* (2023) demonstraram que a THC é eficiente na proteção de células HepG2 expostas ao inseticida diazinon, pois nas células incubadas previamente com THC houve melhora na viabilidade celular e menor produção e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio demonstrando que os danos celulares induzidos pelo diazinon podem ser amenizados significativamente com a associação do composto com THC. Este fato reforça que o mecanismo de ação da THC seja na captura dos radiais livres, principalmente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Park *et al.* (2018) avaliaram a proteção da THC em relação a nefrotoxicidade induzida pelo antibiótico Tacrolimus (FK506) em células LLC-PK1, após 2 horas de tratamento com THC as células foram expostas FK506 e ao completar 24 horas de exposição observou-se melhora na viabilidade celular, diminuição da glutationa reduzida e morte apoptótica inibindo a atividade das caspases 3 e 9.

A disfunção miocárdica acontece em animais com sepse, originada de uma disfunção no organismo causada por alguma infecção. Bendas e Lima (2020) relataram um caso de um canino, fêmea, de 10 anos que deu entrada no hospital veterinário devido a prostração e perda de apetite, ao realizar anamnese e exames foi diagnostica com disfunção miocárdica, uma das principais causas de morte na sepse. Pensando na importância de intervenções eficientes em casos de sepse, Zhu *et al.* (2022) trataram ratos sépticos durante 5 dias com THC e observaram melhora na cardiopatia séptica pois a ação antioxidante foi capaz de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias e o estresse oxidativo.

Gao *et al.* (2022) relataram o efeito da THC como um potente antioxidante contra doenças hepáticas, eles utilizaram ratos alimentados com dietas contendo variações no nível de gordura associadas a administração oral de THC. Eles observaram redução no peso corporal dos animais, melhora na glicemia em jejum, redução nos níveis séricos de lipídeos, menor quantidade de gordura no fígado e diminuição da lipoperoxidação.

1.3.8 Vitamina C

A vitamina C está presente em alimentos cítricos e é um renomado antioxidante com ação contra inflamação, estresse oxidativo, autofagia e disfunção imunológica atuando para o bom funcionamento do organismo (Bhuiyan *et al.*, 2023).

Sabendo que o rim tem papel importante na imunidade e que qualquer alteração tóxica resulta na disfunção imunológica, Mehany *et al.* (2023) avaliaram a capacidade da suplementação de vitamina C melhorar a resposta imune de ratos com insuficiência renal. Os autores constataram que essa é uma alternativa eficiente para o tratamento de rins comprometidos, pois auxilia na melhora da função renal e diminui parâmetros relacionados ao estresse oxidativo.

Çiçek (2023) descreveu que a presença de vitamina C diminui os danos causados em trutas arco-íris expostas a nanopartículas de óxido de cobre, pois a principal via de morte celular e danos no DNA acontecem por meio do estresse

oxidativo. A ação antioxidante foi capaz de reverter à morte celular e alterações nas expressões gênicas das trutas tratadas com o antioxidante.

Tuteja *et al.* (2021) investigaram a ação antioxidante da vitamina C com o intuito de neutralizar a toxicidade induzida pela presença de arsênio em carpas, a suplementação de vitamina C resultou na menor absorção de arsênio nas brânquias, fígado e rim dos peixes e diminuição das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase, glutationa peroxidase, glutationa redutase e glutationa-S-transferase.

Chen *et al.* (2022) utilizaram monócitos, macrófagos e células IgM^{+B} de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para abordar e comparar se a vitamina C neutraliza os efeitos imunotoxicológicos da exposição ao cobre, eles descreveram vitamina C modula a ação antioxidante diminuindo o estresse oxidativo permitindo que as funções celulares voltem ser normais em relação a viabilidade celular, resposta inflamatória e capacidade de realizar fagocitose.

Poli *et al.* (2022) avaliaram o efeito protetor da vitamina C em relação a toxicidade do cádmio, um metal usado em baterias, refinarias e indústria de plástico, utilizando ratos Wistar machos. Os resultados demonstraram uma eficiente proteção nos níveis celulares e tecidual, pois a presença da vitamina C reduziu os danos hepáticos, estresse oxidativo e a apoptose

1.3.9 Uso do zebrafish em estudos toxicológicos

O zebrafish (*Danio rerio*) (figura 3) tem emergido como um excelente modelo para pesquisa em várias áreas, dentre elas a farmacogenética, a neurologia e a embriologia. Dentre as vantagens da utilização deste peixe, podemos citar seu desenvolvimento rápido, bem caracterizado e muito similar ao de outros vertebrados (incluindo os humanos); desenvolvimento embrionário externo e transparente protegido por um córion também transparente, o que permite o fácil monitoramento das mudanças morfológicas por estereomicroscopia (Legradi *et al*., 2015). Adicionalmente, destaca-se o baixo custo de manutenção dos animais e reduzido tamanho dos embriões, bem como alta taxa de reprodução, o que o torna adequado para experimentos de alto desempenho (Zon; Peterson, 2005). O genoma completamente sequenciado do zebrafish, a similaridade genética e metabólica aos camundongos e humanos também se destacam quanto a possíveis extrapolações para modelos vertebrados (Barbazuk *et al*., 2000).

Figura 3 - Zebrafish

Fonte: Toledo (2015).

Os dados de toxicidade aquática são relevantes para avaliação dos riscos ambientais e ecológicos de resíduos de produtos químicos e por isso a utilização de biomarcadores ou espécies biomarcadores fornecem informações relevantes sobre os poluentes. Nesse quesito o zebrafish se destaca por possibilitar a avaliação de efeitos biológicos e moleculares induzidos pela presença de substâncias (Falfushynska *et al*., 2022).

Utilizando essa espécie, podem-se realizar ensaios de toxicidade cardíaca, hepática e neurológica (Sittaramane *et al*., 2015; Yang *et al*., 2017). A composição hepática do zebrafish após 5 dias de desenvolvimento (estado larval) é semelhante ao dos seres humanos. Com exceção das células de Kupffer, todas as outras células do fígado são encontradas no zebrafish e essas células realizam as mesmas funções em comparação com os mamíferos, incluindo a secreção biliar, síntese de glicogênio, insulina e armazenamento de lipídios. Os genes do zebrafish possuem muita semelhança com os humanos, tornando esse modelo animal útil para estudar os mecanismos de toxicidade hepática (Goessling; Sadler, 2015).

As análises morfológicas dos estágios iniciais de desenvolvimento de zebrafish, avaliados pelo Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (OECD, 2013), são também observações importantes na avaliação da toxicidade, pois possibilitam a detecção de possíveis alterações no desenvolvimento normal do organismo após exposição a diferentes compostos. Durante todo o processo de embriogênese, é possível avaliar alterações no desenvolvimento, aproveitando a vantagem da transparência do córion, que facilita a visualização das estruturas em formação. Nesse ensaio são avaliados

parâmetros de letalidade, subletarlidade e teratogencidade, seguindo o protocolo 236 OECD (2013).

Nas últimas décadas a utilização de zebrafish para avaliação toxicológica possibilitou estudos que auxiliaram na compreensão dos efeitos causados pela exposição de organismos às substâncias químicas. Cui *et al*. (2022) avaliaram de forma toxicidade letal e de desenvolvimento causada por Mefentrifluconazol em embriões, larvas e adultos de zebrafish. Os autores descreveram que a presença do composto altera a funcionalidade fisiológica dos animais em todos os estágios de vida, alteração na frequência de batimentos cardíacos e diminuição do crescimento interferem diretamente na sobrevivência dos animais limitando sua capacidade natural de fugir de predadores.

Huang *et al*. (2022) investigaram a toxicidade no desenvolvimento de embriões de zebrafish expostos a concentrações ambientais do fungicida imazalil e o seu principal metabólito da imazalil-M afim de desvendar os mecanismos que ocasionam a intoxicação pelas substâncias. A presença das concentrações dos fungicidas causou impacto significativo no movimento espontâneo, diminuição na taxa de eclosão, menor frequência cardíaca e elevada presença de cistos pericárdicos indicando que estes praguicidas representam riscos para a saúde de organismos aquáticos.

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SHUDIEFAT, A. A. S.; AMALZYOUD, J.; NAJJAR, S. A. A.; TALAT, S.; BUSTANJI, Y.; ABU-IRMAILEH, B. The effects of some natural products compared to synthetic products on the metabolic activity, proliferation, viability, migration, and wound healing in sheep tenocytes. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [*S.l.*], v. 29, n. 9, p. 103391, 2022.

ALVES, W. F. S.; BURLAMAQUI, E. P. A. S.; SOUZA, L. C. K.; FIGUEIREDO, M. J. F. M.; SILVA, R. C. V. Intoxicação por ivermectina em felino para tratamento de lynxacarus radovskyi. *In:* CONGRESSO ON-LINE NACIONAL DE CLÍNICA VETERINÁRIA DE PEQUENOS ANIMAIS, 1., 2021. **Anais** [...]. [S*.l.: s.n.*], p. 1, 2021.

BALIEIRA, K. V. B.; MAZZO, M.; BIZERRA, P. F. V.; GUIMARÃES, A. R. J. S.; NICODEMO, D.; MINGATTO, F. E. Imidacloprid-induced oxidative stress in honey bees and the antioxidant action of caffeine. **Apidologie**, [S*.l.*], v. 49, p. 562-572, 2018.

BARBAZUK, W. B.; KORF, I.; KADAVI. C.; HEYEN, J.; TATE, S.; WUN, E.; BEDELL, J. A.; MCPHERSON, J. D.; JOHNSON, S. L. The syntenic relationship of the

zebrafish and human genomes. **Genome Research**, [S*.l*.], v. 10, p. 1351-1358, 2000.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFNAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, [S*.l*.], v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARRETO, M. L. P.; NETTO, A. M.; SILVA, J. P. S.; AMARAL, A.; BORGES, E.; FRANÇA, E. J.; VALE, R. L. Gray water footprint assessment for pesticide mixtures applied to a sugarcane crop in Brazil: a comparison between two models. **Journal of Cleaner Production**, [S*.l*.], v. 276, p. 124254, 2020.

BENDAS, A. J. R.; LIMA, N. C. Disfunção miocárdica secundária a sepse em cão: relato de caso. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, [S*.l*.], v. 27, n. 2, p. 45-48, 2020.

BHUIYAN, E. J.; HOSSAIN, G.; SAHA, A.; ISLAM, K.; BARI, F. Y.; KHAN, A. H.N. A.; AKTER, S. Protective roles of vitamin C and 5-aminosalicylic acid on reproduction in acrylamide intoxicated male mice. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S*.l*.], v. 30, n. 8, p. 103738, 2023.

BOPP, S. K.; KIENZLER, A.; RICHARZ, A.-N.; LINDEN, S. C. D; PAINI, A.; PARISSIS, N.; WORTH, A. P. Regulatory assessment and risk management of chemical mixtures: challenges and ways forward. **Critical Reviews in Toxicology**, [S*.l*.], v. 49, n. 2, p. 174-189, 2019.

BORKAR, P.; YADAV, V.; TIWARI, R; SAMARTH, R. A systematic review of potential candidates of herbal medicine in treatment of chronic kidney disease. **Phytomedicine Plus**, [S*.l*.], v. 2, n. 4, p. 100361, 2022.

BOTINA, L. L.; BERNARDES, R. C.; BARBOSA, W. F.; LIMA, M. A. P; GUEDES, R. N. C.; MARTINS, G. F. Toxicological assessments of agrochemical effects on stingless bees (Apidae, Meliponini). **MethodsX**, [S*.l*.], v. 7, p. 100906, 2020.

BULHÕES, R. S. **Revisão de literatura:** uso da toxicologia na medicina veterinária forense. [S*.l.: s.n*]: Universidade Federal da Paraíba, 2022. p. 40.

CANUTO, G. A. B.; COSTA, J. L.; CRUZ, P. L. R.; E SOUZA A. R. L.; FACCIO A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, [S*.l*.], v. 41, n. 1, p. 75-91, 2018.

CARVALHO, W. L.; MAIOLI, MARCOS ANTONIO; MENDES, L. C. N.; ROZZA, D. B.; MINGATTO, F. E. Mecanismos da intoxicação do fígado de rato causada pelo gossipol. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S*.l*.], v. 33, p. 339-344, 2013.

CERDEIRA, A. L.; SANTOS, N. A. G.; PESSOA, M. C. P. Y.; GOMES, M. A. F.; LANCHOTE, V. L. Herbicide leaching on a recharge area of the Guarany Aquifer in Brazil. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, [S*.l*.], v. 40, p. 159-165, 2005.

CHEN, J.; DONG, Z.; LEI, Y.; LI, L.; GAO, A.; WU, L.; YE, J. Vitamin C suppresses toxicological effects in MO/MΦ and IgM+ B cells of Nile tilapia (Oreochromis niloticus) upon copper exposure. **Aquatic Toxicology**, [S.*l.*], v. 244, p. 106100, 2022.

ÇIÇEK, S. Influences of l-ascorbic acid on cytotoxic, biochemical, and genotoxic damages caused by copper II oxide nanoparticles in the rainbow trout gonad cells-2. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [S.*l.*], v. 266, p. 109559, 2023.

CUI, F.; CHAI, T.; DI, S.; QI, P.; WANG, X. Toxicity of mefentrifluconazole enantiomers on multiple stages of zebrafish (Danio rerio). **Journal of Environmental Chemical Engineering,** [S.*l.*], v. 10, n. 3, p. 107653, 2022.

DADARKAR, S. S.; DEORE, M. D.; GATNE, M. M. Comparative evaluation of acute toxicity of ivermectin by two methods after single subcutaneous administration in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [S.*l.*], v. 47, n. 3, p. 257-260, 2007.

DAMALAS, C. A.; ELEFTHEROHORINOS, I. G. Dicamba and atrazine antagonism on sulfonylurea herbicides used for Johnsongrass (Sorghum halepense) control in corn (Zea mays). **Weed Technology**, [S.*l.*], v. 15, n. 1, p. 62-67, 2001.

DAUFENBACK, V.; ADELL, A.; MUSSOI, M. R.; FURTADO, A. C. F.; SANTOS, S. A.; VEIGA, D. P. B. Agrotóxicos, desfechos em saúde e agroecologia no Brasil: uma revisão de escopo. **Saúde em Debate**, [S.*l.*], v. 46, n. 2, p. 482-500, 2022.

DÁVILA, J.; LI, Q.; BAGCHI, I. C. Genetic Mouse Models for Female Reproductive Toxicology Studies. **Comprehensive Toxicology**, [S.*l.: s.n*], p. 470-494, 2018.

DEKKER, J. Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance. *In*: LYR., H. (ed.). **Modern selective fungicides:** properties, applications, mechanisms of action. New York: [S.*l.: s.n.*], 1995. p. 23-38.

DELABONA, P. S.; GONÇALVES, C. R. Strategies for bioremediation of pesticides: challenges and perspectives of the Brazilian scenario for global application: a review. **Environmental Advances**, Goiânia, v. 8, p. 1-10, 2022.

DEMARTELAERE, A. C. F.; COUTINHO, P. W. R.; SILVA, T. P. P.; ESTEVES JUNIOR, F. C.; SILVA, N. S. G.; SILVA, A. P.; SOUZA, J. B.; MATA, T. C.; LORENZETTI, E.; CONCEIÇÃO, A. G. Cu. Damage caused environment, animals and man with the use pesticides: bibliographic review. **Brazilian Journal of Development**, [S.*l.*], v. 7, n. 9, p. 94668-94695, 2021.

DEY, A. R.; BEGUM, N.; ANISUZZAMAN; ALIM, A.; ALAM, M. Z. Multiple anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of small ruminants in Bangladesh. **Parasitology International**, [S.*l.*], v. 77, p. 102105, 2020.

DONADIO, J. L. S. **Polimorfismo nos genes da enzima peroxidase e biomarcadores do estado nutricional relativo ao selênio em população adulta de São Paulo**. 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

FAGUNDES, M. Z.; GONÇALVES, M. A.; SOARES, M. P.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R.; RIET-CORREA, F.; ANJOS, B.L. Clinico-pathological and toxicological aspects of poisoning by the clomazone herbicide in sheep. **Small Ruminant Research**, [S*.l*.], v. 124, p. 120-126, 2015.

FALFUSHYNSKA, H.; KHATIB, I.; KASIANCHUK, N.; LUSHCHAK, O.; HORYN, O.; SOKOLOVA, I.M. Toxic effects and mechanisms of common pesticides (Roundup and chlorpyrifos) and their mixtures in a zebrafish model (Danio rerio). **Science of the Total Environment**, [S*.l*.], v. 833, p. 155236, 2022.

FAVARE, G. M.; CIPRIANO, I. A.; CARMO, T. A.; MENA, M. Ol.; GUELPA, G. J.; AMARANTE, A. F. T.; SOUTELLO, R. V. G. Anthelmintic resistance of horse strongyle nematodes to ivermectin in São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, [S*.l*.], v. 41, p. 100864, 2023.

FENG, J.; ZHENG, Y.; GUO, M.; ARES, I.; MARTÍNEZ, M.; LOPEZ-TORRES, B.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.; WANG, X.; ANADÓN, A.; MARTÍNEZ, M. Oxidative stress, the blood–brain barrier and neurodegenerative diseases: the critical beneficial role of dietary antioxidants. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [S*.l*.], v. 13, n. 10, p. 3988-4024, 2023.

FERNANDES, I. A. A.; MACIEL, G. M.; BORTOLINI, D. G.; PEDRO, A. C.; RUBIO, F. T. V.; CARVALHO, K. Q.; HAMINIUK, C. W. I. The bitter side of teas: pesticide residues and their impact on human health. **Food and Chemical Toxicology**, [S*.l.: s.n*], p. 113955, 2023.

FERREIRA, S. C. R. **Efeitos histopatológicos em fígado de pregado (Scophthalmus maximus) exposto cronicamente a concentrações ambientalmente realísticas de metais pesados**. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, p. 56, 2020.

FLOTA-BURGOS, G. J.; ROSADO-AGUILAR, J. A.; ROJAS-BECERRIL, R.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; TRINIDAD-MARTÍNEZ, I. Evidence of resistance to ivermectin in the gastrointestinal nematodes of horses from Mexican southeast. **Veterinary Parasitology**: **Regional Studies and Reports**, [S*.l*.], v. 44, p. 100907, 2023.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells**: a manual of basic technique and specialized applications. New Jersey: [*s.n.*], 2016.

GABOARDI, S. C.; PANIS, C.; CANDIOTTO, L. Z. P. Agribusiness in Brazil and its dependence on the use pesticides. **Hygiene and Environmental Health Advances**, [S*.l.: s.n*], p. 100080, 2023.

GAO, F.; CHEN, M.; YU, J.; XU, L.; YU, L.; JIANG, H.; GU, Z. Tetrahydrocurcumin protects against nonalcoholic fatty liver disease by improving lipid metabolism and redox homeostasis. **Journal of Functional Foods**, [S*.l*.], v. 89, p. 104957, 2022.

GOESSLING, W.; SADLER, K.C. Zebrafish: an important tool for liver disease research. **Gastroenterology**, [S*.l*.], v. 149, p. 1361-1377, 2015.

GRESSEL, J. Synergizing herbicides. **Reviews of Weed Science**, [S*.l*.], v. 5, p. 49-82, 1990.

GUNASEKARA, A. S.; DELA CRUZ, I. D.; CURTIS, M. J.; CLAASSEN, V. P.; TJEERDEMA, R. S. The behavior of clomazone in the soil environment. **Pest Management Science**, [S*.l*.], v. 65, n. 6, p. 711-716, 2009.

HOJATIPOUR, T.; PASHAPOUR, S.; ALMASIRAD, A.; MOUSAVI, Z. The cytotoxic activity evaluation of an arylhydrazone derivative of mefenamic acid on HEPG2 liver cancer cells and normal gingival HGF cells. **Gene Reports**, [S*.l*.], v. 33, p. 101810, 2023.

HUANG, S.; HUANG, M.; TIAN, S.; MENG, Z.; YAN, S.; TENG, M.; ZHOU, Z.; DIAO, J.; ZHU, W. Imazalil and its metabolite imazalil-M caused developmental toxicity in zebrafish (Danio rerio) embryos via cell apoptosis mediated by metabolic disorders. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S*.l*.], v. 184, p. 105113, 2022.

IDOWU, E. T.; ALIMBA, C. G.; OLOWU, E. A.; OTUBANJO, A. O. Artemether-Lumefantrine treatment combined with albendazole and ivermectin induced genotoxicity and hepatotoxicity through oxidative stress in Wistar rats. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, [S*.l*.], v. 2, n. 2, p. 110-119, 2015.

ISSAQ, H. J.; ABBOTT, E.; VEENSTRA, T. D. Utility of separation science in metabolomic studies. **Journal of Separation Science**, [S*.l*.], v. 31, p. 1936-1947, 2008.

JAKUBEK, P.; SULIBORSKA, K.; KUCZYńSKA, M.; PARCHEM, K.; KOSS-MIKOłAJCZYK, I.; KUSZNIEREWICZ, B.; CHRZANOWSKI, W.; NAMIEśNIK, J.; BARTOSZEK, A. The comparison of antioxidant properties and nutrigenomic redox-related activities of vitamin C, C-vitamers, and other common ascorbic acid derivatives. **Free Radical Biology and Medicine**, [S*.l*.], v. 209, p. 239-251, 2023.

GOMES JÚNIOR, O.; SANTOS, M. G. B.; NOSSOL, A. B.; STARLING, M. C. V.M.; TROVÓ, A. G. Decontamination and toxicity removal of an industrial effluent containing pesticides via multistage treatment: coagulation-flocculation-settling and photo-fenton process. **Process Safety and Environmental Protection**, [S*.l*.], v. 147, p. 674-683, 2021.

KANE, N. S.; HIRSCHBERG, B.; QIAN, S.; HUNT, D.; THOMAS, B.; BROCHU, R.; LUDMERER, S. W.; ZHENG, Y.; SMITH, M.; ARENA, J. P. Drug-resistant Drosophila indicate glutamate-gated chloride channels are targets for the antiparasitics nodulisporic acid and ivermectin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S*.l*.], v. 97, n. 25, p. 13949-13954, 2000.

KAPLAN, L. A.; PESCE, A. J. **Clinical chemistry**: theory, analysis, correlations. [S*.l*.: s.n.], 1984. p. 1476.

KHAN, G. B.; AKHTAR, N.; KHAN, M. F.; ULLAH, Z.; TABASSUM, S.; TEDESSE, Z. Toxicological impact of Zinc Nano Particles on tilapia fish (Oreochromis mossambicus). **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S*.l*.], v. 29, n. 2, p. 1221-1226, 2021.

KLUXEN, F. M.; WEBER, K.; STRUPP, C.; JENSEN, S. M.; HOTHORN, L. A.; GARCIN, J-C.; HOFMANN, T. Using historical control data in bioassays for regulatory toxicology. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [S*.l*.], v. 125, p. 105024, 2021.

KOSE, T.; MORENO-FERNANDEZ, J.; VERA-AVILES, M.; SHARP, P. A.; LATUNDE-DADA, G. O. Ferulic acid protects HepG2 cells and mouse liver from iron-induced damage. **Biochemistry and Biophysics Reports**, [S*.l*.], v. 35, p. 101521, 2023.

KURALKAR, P.; KURALKAR, S. V. Role of herbal products in animal production – An updated review. **Journal of Ethnopharmacology**, [S*.l*.], v. 278, p. 114246, 2021.

LANGMAN, L. J.; KAPUR, B. M. Toxicology: then and now. **Clinical Biochemistry**, [S*.l*.], v. 39, n. 5, p. 498-510, 2006.

LEATHWICK, D. M.; MILLER, C. M.; WAGHORN, T.; SCHWENDEL, H.; LIFSCHITZ, A. Route of administration influences the concentration of ivermectin reaching nematode parasites in the gastrointestinal tract of cattle. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, *[S.l],* v. 14, p. 152-158, 2020.

LEGRADI, J.; EL ABDELLAOUI, N.; VAN POMEREN, M.; LEGLER, J. Comparability of behavioural assays using zebrafish larvae to assess neurotoxicity. **Environmental Science and Pollution Research International**, [S*.l*.], v. 22, p. 16277-16289, 2015.

LI, C.; PANG, M.; LI, Y.; HAN, L.; FAN, Y.; XIN, X.; ZHANG, X.; ZHANG, N.; QIN, Y. Protective effect of vitamin C against tetrachlorobenzoquinone-induced 5-hydroxymethylation-dependent apoptosis in HepG2 cells mainly via the mitochondrial apoptosis pathway. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S*.l*.], v. 260, p. 115097, 2023.

LI, F.; LI, M.; WANG, H.; MAO, T.; CHEN, J.; LU, Z.; QU, J.; FANG, Y.; LI, B. Effects of phoxim pesticide on the immune system of silkworm midgut. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S*.l*.], v. 164, p. 58-64, 2020.

LI, F.; WANG, L.; JI, C.; WU, H.; ZHAO, J.; TANG, J. Toxicological effects of tris (2-chloropropyl) phosphate in human hepatic cells**. Chemosphere**. *[S.l],* v. 187, p. 88-96, 2017.

LIEBEL, S. **Respostas de células de hepatocarcinoma humano (Hepg2) expostas à cilindrospermopsina**. 2015. 76 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

LIU, Z.; SONG, K.; TU, B.; LIN, L.; SUN, H.; ZHOU, Y.; LI, R.; SHI, Y.; YANG, J.; ZHANG, Y. Crosstalk between oxidative stress and epigenetic marks: new roles and therapeutic implications in cardiac fibrosis. **Redox Biology**, [S*.l*.], v. 65, p. 102820, 2023.

LÓPEZ-PIÑEIRO, A.; SÁNCHEZ-TERRÓN, J.; MARTÍN-FRANCO, C.; PEÑA, D.; VICENTE, L. A.; GÓMEZ, S.; FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, D.; ALBARRÁN, Á. Impacts of fresh and aged holm-oak biochar on clomazone behaviour in rice cropping soils after transition to sprinkler irrigation. **Geoderma**, [S*.l*.], v. 413, p. 115768, 2022.

LUPWAYI, N. Z.; FLOATE, K. D.; SCHWINGHAMER, T. D.; HAO, X.; KANASHIRO, D. A. Trickle-down effects of the cattle parasiticide ivermectin on soil microfauna on a prairie grassland. **Applied Soil Ecology**, [S*.l*.], v. 190, p. 105021, 2023.

MACHADO, C. S.; FREGONESI, B. M.; ALVES, R. I. S.; TONANI, K. A. A.; SIERRA, J.; MARTINIS, B. S.; CELERE, B. S.; MARI, M.; SCHUHMACHER, M.; NADAL, M. Health risks of environmental exposure to metals and herbicides in the Pardo River, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, [S*.l*.], v. 24, n. 25, p. 20160-20172, 2017.

MANGAN, E.; XIE, H. Clinical Application of Chinese Herbal Medicine in Equine Practice. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, [S*.l*.], v. 38, n. 3, p. 541-555, 2022.

MARINHO, R. T. Liver Going Global. **Lusiadas Scientific Journal**, [S*.l*.], v. 2, n. 4, p. 126-128, 2021.

MARTIN, O.; SCHOLZE, M.; ERMLER, Sibylle; MCPHIE, Joanne; BOPP, Stephanie K.; KIENZLER, Aude; PARISSIS, Nikolaos; KORTENKAMP, Andreas. Ten years of research on synergisms and antagonisms in chemical mixtures: a systematic review and quantitative reappraisal of mixture studies. **Environment International**, [S*.l*.], v. 146, p. 106206, 2021.

MARTIN, R. J.; ROBERTSON, A. P.; CHOUDHARY, S. Ivermectin: an anthelmintic, an insecticide, and much more. **Trends in Parasitology**, [S*.l*.], v. 37, n. 1, p. 48-64, 2021.

MANSOOR, S.; MIR, M. A.; KARUNATHILAKE, E. M. B. M.; RASOOL, A.; ŞTEFăNESCU, D. M.; CHUNG, Y. S.; SUN, H.-J. Strigolactones as promising biomolecule for oxidative stress management: a comprehensive review. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S*.l*.], v. 206, p. 108282, jan. 2024

MAZZO, M.; BALIEIRA, K. V. B.; BIZERRA, P. F. V.; MINGATTO, F. E. Fipronil-induced decrease in the epididymal sperm count: oxidative effect and protection by vitamin E. **Animal Reproduction**, [S*.l*.], v. 15, p. 1223-1230, 2018.

MEHANY, A. B. M.; FARRAG, I. M.; DIAB, M.; GHONEIM, M. M.; EL-SHERBINY, M.; AL-SERWI, R. H.; AMIN, A. H.; BELAL, A.; SHAABAN, S.; ABDELHADY, A. A. Curcumin and vitamin C improve immunity of kidney via gene expression against diethyl nitrosamine induced nephrotoxicity in rats: in vivo and molecular docking studies. **Heliyon**, [S*.l*.], v. 9, n. 3, p. 14126, 2023

MELLO, A. F.; FRANCO, D. C. Z. Ivermectin: the global problem of antiparasitic misuse. **Journal Archives of Health**, [S*.l*.], v. 4, n. 2, p. 1316-1318, 2021.

MENDONÇA, F. S.; FREITAS, S. H.; DÓRIA, R. G. S.; CAMARGO, L. M.; EVÊNCIO-NETO, J. Intoxicação por dicçorvós e cipermetrina em bovinos no Mato Grosso – relato de caso. **Ciência Animal Brasileira**, [S*.l*.], v. 11, n. 3, p. 1-3, 2010.

MILLER, M. G. Environmental metabolomics: a SWOT analysis (strengths, weaknesses, opportunities, and threats). **Journal of Proteome Research**, [S*.l*.], v. 6, p. 540-545, 2007.

MIRAHMAD, M.; MOHSENI, S.; TABATABAEI-MALAZY, O.; ESMAEILI, F.; ALATAB, S.; BAHRAMSOLTANI, R.; EJTAHED, H.-S.; QULAMI, H.; BITARAFAN, Z.; ARJMAND, B. Antioxidative hypoglycemic herbal medicines with in vivo and in vitro activity against C-reactive protein; a systematic review. **Phytomedicine**, [S.*l.*], v. 109, p. 154615, 2023.

MIRANDA, C. A.; BERETTA, E. M.; FERREIRA, L. A.; SILVA, E. S.; COIMBRA, B. Z.; PEREIRA, P. T.; MIRANDA, R. G.; DORTA, D. J.; RODRIGUES, F. T. V.; MINGATTO, F. E. Role of biotransformation in the diazinon-induced toxicity in HepG2 cells and antioxidant protection by tetrahydrocurcumin. **Toxicology Reports**, [S.*l.*], v. 10, p. 32-39, 2023.

MLADINEO, I.; MARSIC-LUCIC, J.; BUZANCIC, M. Toxicity and gross pathology of ivermectin bath treatment in sea bream Sparus aurata, L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S.*l.*], v. 63, n. 3, p. 438-442, 2006.

MUTHUMANI, M.; MILTONPRABU, S. Ameliorative efficacy of tetrahydrocurcumin against arsenic induced oxidative damage, dyslipidemia and hepatic mitochondrial toxicity in rats. **Chemico-Biological Interactions**, [S.*l.*], v. 235, p. 95-105, 2015.

NG, J. Y.; ANANT, S.; PARAKH, N. D. Characteristics of the research literature on herbal medicines corresponding with herbal supplements yielding the highest total sales: a bibliometric analysis. **Advances in Integrative Medicine**, [S.*l.*], v. 10, n. 2, p. 64-79, 2023.

NICODEMO, D.; MINGATTO, F. E.; CARVALHO, A.; BIZERRA, P. F. V.; TAVARES, M. A.; BALIEIRA, K. V. B.; BELLINI, W. C. Pyraclostrobin Impairs Energetic Mitochondrial Metabolism and Productive Performance of Silkworm (Lepidoptera: bombycidae) caterpillars. **Journal of Economic Entomology**, [S.*l.*], v. 111, n. 3, p. 1369-1375, 2018.

NICODEMO, D.; MINGATTO, F. E.; JONG, D.; BIZERRA, P. F. V.; TAVARES, M. A.; BELLINI, W. C.; VICENTE, E. F.; CARVALHO, A. Mitochondrial Respiratory Inhibition Promoted by Pyraclostrobin in Fungi is Also Observed in Honey Bees. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [S.*l.*], v. 39, n. 6, p. 1267-1272, 2020.

NICODEMO, D.; MINGATTO, F. E.; CARVALHO, A.; BIZERRA, P. F. V.; TAVARES, M. A.; BALIEIRA, K. V. B.; BELLINI, W. C. Pyraclostrobin impairs energetic mitochondrial metabolism and productive performance of silkworm (Lepidoptera: Bombycidae) caterpillars. **Journal of Economic Entomology**, [S.*l.*], v. 111, p. 1369-1375, 2018.

OECD - ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No. 236**: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test: OECD guidelines for the testing of chemicals. Section 2. Paris: OECD Publishing, 2013.

OLIVEIRA-FILHO, J. C.; CARMO, P. M. S.; PIEREZAN, F.; TOCHETTO, C.; LUCENA, R. B.; RISSI, D. R.; BARROS, C. S. L. Intoxicação por organofosforado em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S.*l.*], v. 30, n. 10, p. 803-806, 2010.

PAGANOTTO, H. F.; MELO, A. P. F.; MORAIS-PINTO, L.; RODRIGUES, R. F. Morfologia do fígado e o sistema porta-hepático em Trachemys scripta elegans (Testudinata). **Pubvet**, [S*.l*.], v. 14, n. 2, p. 1-7, 2020.

PAN, X.; ZHOU, J.; CHEN, Y.; XIE, X.; RAO, C.; LIANG, J.; ZHANG, Y.; PENG, C. Classification, hepatotoxic mechanisms, and targets of the risk ingredients in traditional Chinese medicine-induced liver injury. **Toxicology Letters**, [S*.l*.], v. 232, n. 1, p. 96580, 2020.

PANICO, S. C.; VAN GESTEL, C. A. M.; VERWEIJ, R. A.; RAULT, M.; BERTRAND, C.; BARRIGA, C. A. M.; COEURDASSIER, M. l; FRITSCH, C.; GIMBERT, F.; PELOSI, C. Field mixtures of currently used pesticides in agricultural soil pose a risk to soil invertebrates. **Environmental Pollution,** [S*.l*.], v. 305, p. 119290, 2022.

PARK, C. S.; JANG, H. J.; LEE, J. H.; OH, M. Y.; KIM, H. J. Tetrahydrocurcumin Ameliorates Tacrolimus-Induced Nephrotoxicity Via Inhibiting Apoptosis. **Transplantation Proceedings**, [S*.l*.], v. 50, n. 9, p. 2854-2859, 2018.

PATIL, A. A.; BHOR, S. A.; RHEE, W. J. Cell death in culture: molecular mechanisms, detections, and inhibition strategies. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, [S*.l*.], v. 91, p. 37-53, 2020.

PEREIRA, L. C. **Avaliação dos congêneres BDE-100 e BDE-153 de éteres difenílicos polibromados sobre a linhagem celular HepG2 e linfócitos humanos**: efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos. 2016. 210 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

PEREIRA, L.; FERNANDES, M. N.; MARTINEZ, C. B. R. Hematological and biochemical alterations in the fish Prochilodus lineatus caused by the herbicide clomazone**. Environmental Toxicology and Pharmacology**, [S*.l*.], v. 36, n. 1, 2013.

PIMPÃO, C. T.; ROCHA, R. M. V. M.; SCHAEFER, R.; WOUK, A. F. P. F.; CIRIO, S. M.; BENATO, E. M.; GURGEL, L. G. A. l.; FRONCZAK, M. A. Avaliação dos efeitos toxicológicas da ivermectina em cães. **Revista Acadêmica**: **Ciência Animal**, [S*.l*.], v. 3, n. 4, p. 19, 2005.

PIÑEIRO-CARRERO, V.; PIÑEIRO, E. **Liver. Pediatrics**. [S*.l*.], v. 113, p. 1097-1106, 2004.

POLI, V.; APARNA, Y.; MADDURU, R.; MOTIREDDY, S. R. Protective effect of Vitamin C and E on enzymatic and antioxidant system in liver and kidney toxicity of Cadmium in rats. **Applied Food Research**, [S*.l*.], v. 2, n. 1, p. 100098, 2022.

PORTAL, T. P.; PEDLOWSKI, M. A.; ALMEIDA, C. M. S.; CANELA, M. C. An integrated assessment of water quality in a land reform settlement in northern Rio de Janeiro state, Brazil. **Heliyon,** [S*.l*.], v. 5, n. 3, p. 1-2, 2019.

QABBUS, M. B.; HUNT, K. S.; DYNKA, J.; WOODWORTH, C. D.; SUR, S.; SAMWAYS, D. S. K. Ivermectin-induced cell death of cervical cancer cells in vitro a consequence of precipitate formation in culture media. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S*.l*.], v. 449, p. 116073, 2022.

QUEIROZ, T. B. **Estudo do potencial citotóxico e genotóxico do geraniol em células mononucleares do sangue periférico e de hepatocarcinoma humano HepG2**. 2017. 614 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2017.

RABILLOUD, T.; LESCUYER, P. Proteomics in mechanistic toxicology: history, concepts, achievements, caveats, and potential. **Proteomics**. [S*.l*.], v. 15, p. 1051-1074, 2015.

RADIN, M. J.; WELLMAN, M. L. Toxicology case presentations. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, [S*.l*.], v. 53, n. 1, p. 175-190, 2023.

RAMIREZ, T.; STRIGUN, A.; VERLOHNER, A.; HUENER, H.A.; PETER, E.; HEROLD, M.; BORDAG, N.; MELLERT, W.; WALK, T.; SPITZER, M.; JIANG, X.; SPERBER, S.; HOFMANN, T.; HARTUNG, T.; KAMP, H.; VAN RAVENZWAAY, B. Prediction of liver toxicity and mode of action using metabolomics in vitro in HepG2 cells. **Archives of Toxicology**, [S*.l*.], v. 92, p. 893-906, 2018.

RAMOS, B.; VAZ, W. F.; DINIZ, L. F.; SANCHES, F. O. N.; RIBEIRO, J. C.O.; CARVALHO-SILVA, V. H.; TEIXEIRA, A. C. S. C.; RIBEIRO, C.; NAPOLITANO, H. B.; CARVALHO, P. S. Kinetics, mechanism, and tautomerism in ametryn acid hydrolysis: from molecular structure to environmental impacts. **Chemosphere,** [S*.l*.], v. 324, p. 138278, 2023.

RAZAVI, S. M.; SOLTAN, M. S.; ABBASIAN, K.; KARAMI, A.; NAZIFI, S. Host oxidative stress in piroplasmosis: a review in domestic animals. **Veterinary Parasitology**, [S*.l*.], v. 322, p. 110011, 2023.

REN, J.-L.; YANG, L.; QIU, S.; ZHANG, A.-H.; WANG, XI-J. Efficacy evaluation, active ingredients, and multitarget exploration of herbal medicine. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, [S*.l*.], v. 34, n. 3, p. 146-157, 2023.

ROHANI, F. Pesticides toxicity in fish: histopathological and hemato-biochemical aspects: a review. **Emerging Contaminants**, [S*.l*.], v. 9, n. 3, p. 100234, 2023.

SCHARMACH, C.; SILVA, J.C.; CAMPOS, R. Toxicity of pesticides in respiratory function of farmers. **Brazilian Journal of Development**, [S*.l*.], v. 6, n. 6, p. 33740-33756, 2020.

SCHLITTENLACHER, T.; KNUBBEN-SCHWEIZER, G.; CERO, M.; VOGL, Christian R.; MAESCHLI, A.; HAMBURGER, M.; WALKENHORST, M. What can we learn from past and recent Bavarian knowledge for the future development of European veterinary herbal medicine? An ethnoveterinary study. **Journal of Ethnopharmacology**, [S*.l*.], v. 288, p. 114933, 2022.

SEBEN, D.; TOEBE, M.; WASTOWSKI, A. D.; HOFSTÄTTER, K.; VOLPATTO, F.; ZANELLA, R.; PRESTES, O. D.; GOLOMBIESKI, J. I. Water quality variables and emerging environmental contaminant in water for human consumption in Rio Grande do Sul, Brazil. **Environmental Challenges**, [S*.l*.], v. 5, p. 100266, 2021.

SEVERO, E. S.; MARINS, A. T.; CEREZER, C.; COSTA, D.; NUNES, M.; PRESTES, O. D.; ZANELLA, R.; LORO, V. L. Ecological risk of pesticide contamination in a

Brazilian river located near a rural area: A study of biomarkers using zebrafish embryos**. Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S*.l*.], v. 190, p. 110071, 2020.

SHYMA, K. P.; GUPTA, J. P.; PARSANI, H. R.; ANKUYA, K. J.; SINGH, Veer. Ivermectin resistance in the multi-host tick Hyalomma anatolicum (Acari: ixodidae) in Índia. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, [S*.l*.], v. 12, n. 6, p. 101791, 2021.

SILVA, A. M.; MARTINS-GOMES, C.; FERREIRA, S. S.; SOUTO, E. B.; ANDREANI, T. Molecular physicochemical properties of selected pesticides as predictive factors for oxidative stress and apoptosis-dependent cell death in Caco-2 and HepG2 cells. **International Journal of Molecular Sciences**, [S*.l*.], v. 23, n. 15, p. 8107, 2022.

SILVA, J. M.; NOVATO-SILVA, E.; FARIA, H. P.; PINHEIRO, T. M. M. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 4, p. 891-903, 2005.

SILVA, N. S.; FERREIRA, J. S.; MIRANDA, E. G. Aspectos clínico-patológicos da intoxicação por ivermectina em suínos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, [S*.l*.], v. 25, n. 1, p. 3-5, 2018.

SITTARAMANE, V.; PADGETT, J.; SALTER, P.; WILLIAMS, A.; LUKE, S.; MCCALL, R.; ARAMBULA, J.F.; GRAVES, V.B.; BLOCKER, M.; VAN LEUVEN, D.; BOWE, K.; HEIMBERGER, J.; CADE, H.C.; IMMANENI, S.; SHAIKH, A. Discovery of quinoline-derived trifluoromethyl alcohols, determination of their in vivo toxicity and anticancer activity in a zebrafish embryo model. **ChemMedChem**., [S*.l*.], v. 10, p. 1802-1807, 2015

STEFANO, P. H. P.; ROISENBERG, A.; SANTOS, M. R.; DIAS, M. A.; MONTAGNER, C. C. Unraveling the occurrence of contaminants of emerging concern in groundwater from urban setting: a combined multidisciplinary approach and self-organizing maps. **Chemosphere,** [S*.l*.], v. 299, p. 134395, 2022.

STEVANOVIć, M.; BRKIć, D.; TOMIć, T.; MIHAJLOVIć, V.; ĐORđEVIć, T.; GAŁIć, S. Effects of the technical ingredient clomazone and its two formulated products on aquatic macrophytes. **Environmental Pollution**, [S*.l*.], v. 277, p. 116753, 2021.

STEVANOVIC, M.; GASIC, S.; PIPAL, M.; BLAHOVA, L.; BRKIC, D.; NESKOVIC, N.; HILSCHEROVA, K. Toxicity of clomazone and its formulations to zebrafish embryos (Danio rerio). **Aquatic Toxicology**, [S*.l*.], v. 188, p. 54-63, 2017.

SULIK, M.; ANTOSZCZAK, M.; HUCZYńSKI, A.; STEVERDING, D. Antiparasitic activity of ivermectin: four decades of research into a wonder drug. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S*.l*.], v. 261, p. 115838, 2023.

TENBROOK, P. L.; TJEERDEMA, R. S. Biotransformation of clomazone in rice (Oryza sativa) and early watergrass (Echinochloa oryzoides). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S*.l*.], v. 85, n. 1, p. 38-45, 2006.

TOLEDO, K. **Plataforma Zebrafish é inaugurada no Instituto Butantan**. 2015. Disponível em: https://agencia.fapesp.br/plataforma-zebrafish-e-inaugurada-no-instituto-butantan/22071. Acesso em: 01 mar. 2024.

TUTEJA, C.; A.H, S.; HUNDAL, S. S.; DHALIWAL, S. S. Antioxidative role of dietary ascorbic acid against arsenic induced haematological, biochemical and histomorphological alterations in Cyprinus carpio. Comparative **Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [S*.l*.], v. 241, p. 108973, 2021.

VAN CONG, N.; PHUONG, N. T.; BAYLEY, M. Brain cholinesterase response in the snakehead fish (Channa striata) after field exposure to diazinon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S*.l*.], v. 71, n. 2, p. 314-318, 2008.

VASCONCELOS, R. B. **Função hepática**: marcadores bioquímicos da função hepática. Distrito Federal: [s*.n.*], 2022.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H.; MUSTAFA, N.R.; KIM, H.K. Metabolomics: back to basics**. Phytochemistry Reviews**, [S*.l*.], v. 7, p. 525-537, 2008.

VIANA, L. F.; CRISPIM, B. A.; KUMMROW, F.; LIMA, N. A.; DIAS, M. A.; MONTAGNER, C. C.; PEREIRA, R. H. G.; BARROS, A.; BARUFATTI, A. Occurrence of contaminants of emerging concern and their risks to the Pantanal Sul-Mato-Grossense aquatic biota, Brazil. **Chemosphere**, [S*.l*.], v. 337, p. 139429, 2023.

VILLATTE, R. Toxicologia e ergonomia. **Laboreal**, [S*.l*.], v. 16, n. 2, 2020.

WANG, P.; XU, X.; SONG, S.; LIU, L.; KUANG, H.; XU, C. Rapid and sensitive detection of clomazone in potato and pumpkin samples using a gold nanoparticle-based lateral-flow strip. **Food Chemistry**, [S*.l*.], v. 375, p. 131888, 2022.

WANG, R.; YANG, X.; WANG, T.; KOU, R.; LIU, P.; HUANG, Y.; CHEN, C. Synergistic effects on oxidative stress, apoptosis and necrosis resulting from combined toxicity of three commonly used pesticides on HepG2 cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S*.l*.], v. 263, p. 115237, 2023.

WEISER, A.; HERMANT, A.; BERMONT, F.; SIZZANO, F.; KARAZ, S.; ALVAREZ-ILLERA, P.; SANTO-DOMINGO, J.; SORRENTINO, V.; FEIGE, J. N.; MARCHI, U. The mitochondrial calcium uniporter (MCU) activates mitochondrial respiration and enhances mobility by regulating mitochondrial redox state**. Redox Biology**, [S*.l*.], v. 64, p. 102759, 2023.

WILSON-FRANK, C. Toxicology and Analytical Chemistry. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, [S*.l*.], v. 39, n. 1, p. 157-164, 2023.

XIA, J.; XU, W.; LI, Y.; LI, G.; WANG, X.; XIONG, Y.; MIN, S. Quality control of pesticide using infrared spectroscopic coupled with fingerprint analysis. **Infrared Physics & Technology**, [S*.l*.], v. 122, p. 104052, 2022.

XU, C.; XIONG, Q.-W.; LI, Y.; ZHAO, J.-N.; ZHANG, L.; LI, X.-L. Explore the multitarget mechanism of tetrahydrocurcumin preventing on UV-induced photoaging mouse skin. **Heliyon**, [S*.l*.], v. 8, n. 8, p. 9888, 2022.

YAMASHITA, A.; DEGUCHI, J.; HONDA, Y.; YAMADA, T.; MIYAWAKI, I.; NISHIMURA, Y.; TANAKA, T. Increased susceptibility to oxidative stress-induced toxicological evaluation by genetically modified nrf2a-deficient zebrafish. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, [S*.l*.], v. 96, p. 34-45, 2019.

YANG, S.; OOKA, M.; MARGOLIS, R. J.; XIA, M. Liver three-dimensional cellular models for high-throughput chemical testing. **Cell Reports Methods**, [S.*l.*], v. 3, n. 3, p. 100432, 2023.

YOKOYAMA, Y.; ONO, A.; YOSHIDA, M.; MATSUMOTO, K.; SAITO, M. Toxicological significance of increased serum alkaline phosphatase activity in dog studies of pesticides: analysis of toxicological data evaluated in japan. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [S.*l.*], v. 109, p. 104482, 2019.

ZHANG, B.; YANG, J.; LI, X.; ZHU, H.; SUN, J.; JIANG, L.; XUE, C.; ZHANG, L.; XU, C.; XING, S. Tetrahydrocurcumin ameliorates postinfarction cardiac dysfunction and remodeling by inhibiting oxidative stress and preserving mitochondrial function via SIRT3 signaling pathway. **Phytomedicine**, [S.*l.*], v. 121, p. 155127, 2023.

ZHAO, C.; JIA, Z.; LI, E.; ZHAO, X.; HAN, T.; TIAN, J.; LI, F.; ZOU, D.; LIN, R. Hepatotoxicity evaluation of Euphorbia kansui on zebrafish larvae in vivo. **Phytomedicine**, [S.*l.*], v. 62, p. 152959, 2019.

ZHENG, F.; GONÇALVES, F. M.; ABIKO, Y.; LI, H.; KUMAGAI, Y.; ASCHNER, M. Redox toxicology of environmental chemicals causing oxidative stress. **Redox Biology,** [S.*l.*], v. 34, p. 101475, 2020.

ZHENG, R.-X.; YU, Z.-Y.; SHEN, C.; WILLCOX, M.; TRILL, J.; MOORE, M.; HU, X.-Y.; LIU, J.-P. Chinese Herb Patrinia Herba (Bai Jiang Cao) for Acute Respiratory Tract Infections: a systematic review of clinical studies. **Journal of Herbal Medicine**, [S.*l.*], v. 42, p. 100791, 2023.

ZHU, F. A review on the application of herbal medicines in the disease control of aquatic animals. **Aquaculture**, [S.*l.*], v. 526, p. 735422, 2020.

ZHU, H.; ZHANG, L.; JIA, H.; XU, L.; CAO, Y.; ZHAI, M.; LI, K.; XIA, L.; JIANG, L.; LI, X. Tetrahydrocurcumin improves lipopolysaccharide-induced myocardial dysfunction by inhibiting oxidative stress and inflammation via JNK/ERK signaling pathway regulation. **Phytomedicine**, [S.*l.*], v. 104, p. 154283, 2022.

ZHU, L.; XUE, Y.; FENG, J.; WANG, Y.; LU, Y.; CHEN, X. Tetrahydrocurcumin as a stable and highly active curcumin derivative: a review of synthesis, bioconversion, detection and application. **Food Bioscience**, [S.*l.*], v. 53, p. 102591, 2023.

ZON, L. I.; PETERSON, R. T. In vivo drug discovery in the zebrafish. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.*l.*], v. 4, p. 35-44, 2005.

Capítulo 2: Avaliação do possível efeito protetor da tetrahidrocurcumina e da vitamina C nos danos oxidativos induzidos pela ivermectina em células HepG2

RESUMO

A ivermectina é um parasiticida de pouca especificidade, que atua contra ampla gama de endo e ectoparasitas em animais domésticos e de produção. Seu modo de ação acontece pela interação com o sistema nervoso central dos parasitas induzindo a paralisia, seguida de morte. O fato de ser lipofílica faz com que resíduos do composto sejam armazenados no fígado dos animais após absorção cutânea, oral ou intravenosa. A presença de xenobióticos no organismo desencadeia uma série de respostas fisiológicas e metabólicas e o estresse oxidativo, resultante da produção excessiva de radicais livres associada à redução da capacidade antioxidante, é um dos danos mais sérios causados por essas substâncias, podendo levar à morte celular. A utilização de substâncias antioxidantes para amenizar os danos causados por químicos vem sendo cada vez mais estudada e aplicada nas pesquisas científicas. Entre os antioxidantes mais estudados temos a curcumina, o seu metabólito tetrahidrocurcumina e a vitamina C. As células HepG2 são derivadas de um hepatoblastoma e representam um modelo eficiente para estudos hepáticos, pois mantém características semelhantes aos hepatócitos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os danos oxidativos induzidos pela IVM nas células HepG2 e a possível proteção pela tetrahidrocurcumina (THC) e vitamina C. As células foram tratadas com diferentes concentrações de IVM (5 a 25 µM) e após 24 ou 48h foram determinadas as concentrações de glutationa reduzida (GSH) e glutationa oxidada (GSSG) e o estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina [NAD(P)H]. Para avaliar a ação dos antioxidantes, as células foram previamente incubadas por 30 minutos com 50 µM de THC ou vitamina C e, em seguida, expostas à IVM. Após 24 ou 48h foram avaliadas a atividade metabólica (MTT) e a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON). A razão entre as concentrações de GSH e GSSG foi afetada pela presença de IVM, sendo que no tempo de 24h houve redução significativa a partir de 10 µM de IVM e ao estender o tempo para 48h essa redução foi observada a partir de 7,5 µM de IVM. Não houve alteração no estado oxidativo de NAD(P)H. A citotoxicidade e a produção de ERON induzidas pela IVM foram reduzidas pelo tratamento prévio com a THC e a vitamina C. Os resultados demonstram que o dano oxidativo induzido pela IVM é um fator determinante para a sua toxicidade e que a THC e a vitamina C possuem capacidade de amenizar os efeitos causados pelo praguicida nas células HepG2.

2.1 INTRODUÇÃO

A IVM, um medicamento que atua contra várias espécies de parasitas e vermes, é considerado um modulador alostérico positivo que abre os canais de íons cloreto e inibe o canal do ácido y-aminobutírico (GABA) ocasionando a paralisia seguida pela morte dos parasitas (Martin; Robertson; Choidhary, 2021).

O efeito citotóxico exercido pela IVM em células trofoblásticas humanas foi descrito por Melo *et al.* (2022). Os autores utilizaram as concentrações de 25, 50 e 100 ng/mL com exposições de 24 ou 48 horas. Os autores descreveram alterações na atividade metabólica das células indicando que o uso de IVM pode afetar parâmetros relacionados à manutenção e eficiente sinalização das células tornando mais frágil a barreira materno-fetal.

Yang *et al.* (2019) utilizaram células HepG2 para avaliar a hepatotoxicidade da IVM por meio da determinação do potencial de membrana, quantificação do conteúdo de triglicerídeos, imunoblotting e expressão de mRNA. Os resultados demonstraram que a IVM pode alterar o metabolismo lipídico hepático caracterizando o fígado como um dos órgãos mais afetados pelo uso prolongado ou inadequado da substância.

Zhou *et al.* (2021) utilizaram células cancerígenas colorretais para avaliar a influência da IVM em relação a parâmetros de citotoxicidade e estresse oxidativo e descreveram em seus resultados a inibição na proliferação celular, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e indução de apoptose.

A tetrahidrocurcumina (THC) é um metabólito ativo da curcumina, um polifenol extraído do açafrão da Índia (*Curcuma longa* L.) e que possui muitas atividades fisiológicas e farmacológicas como ação antidiabética, prevenção de carcinogênese, melhora no sistema imunológico, neuroproteção, efeito anti-inflamatório e atividade antioxidante capturando os radicais livres (Zhu *et al.,* 2023). Seu alto potencial antioxidante ainda não foi totalmente descrito e busca-se informações sobre seu modo de ação.

Sabendo que as mitocôndrias são as principais organelas envolvidas nas reações biológicas oxidativas e que os cardiomiócitos (células musculares cardíacas) são ricos em mitocôndrias, Chen *et al.* (2021) avaliaram o efeito cardioprotetor da THC e observaram inibição da autofagia e apoptose no músculo cardíaco, demonstrando de o fitoterápico é um candidato potencial para o tratamento das lesões no miocárdio.

A vitamina C, também conhecida como ácido L-ascórbico, desempenha papel importante em muitas reações bioquímicas incluindo a proteção contra o estresse

oxidativo, doando elétrons para os radicais livres ou regenerando outros antioxidantes como a GSH, além de desempenhar papel de proteção celular contra lesões oxidativas (Mason *et al.,* 2023). Nikjoo *et al.* (2023) descreveram que a suplementação de vitamina C melhorou a taxa de conversão alimentar, melhorou o sistema imunológico e a resistência dos peixes expostos ao inseticida diazinon demonstrando que sua capacidade de proteção não se limita apenas à ação antioxidante.

A utilização de modelos alternativos ao uso de animais vem crescendo no meio científico nos últimos anos e, devido ao seu baixo custo e facilidade de uso, as células HepG2 se tornaram um modelo experimental ideal para avaliação da hepatotoxicidade induzida por compostos químicos, possibilitando estudos toxicológicos e de alternativas para a redução dos danos gerados ao fígado (Yang *et al.,* 2023).

Desse modo, neste capítulo avaliamos o potencial efeito protetor da THC e da vitamina C sobre a citotoxicidade e os danos oxidativos induzidos pela IVM utilizando como modelo experimental as células HepG2.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Reagentes

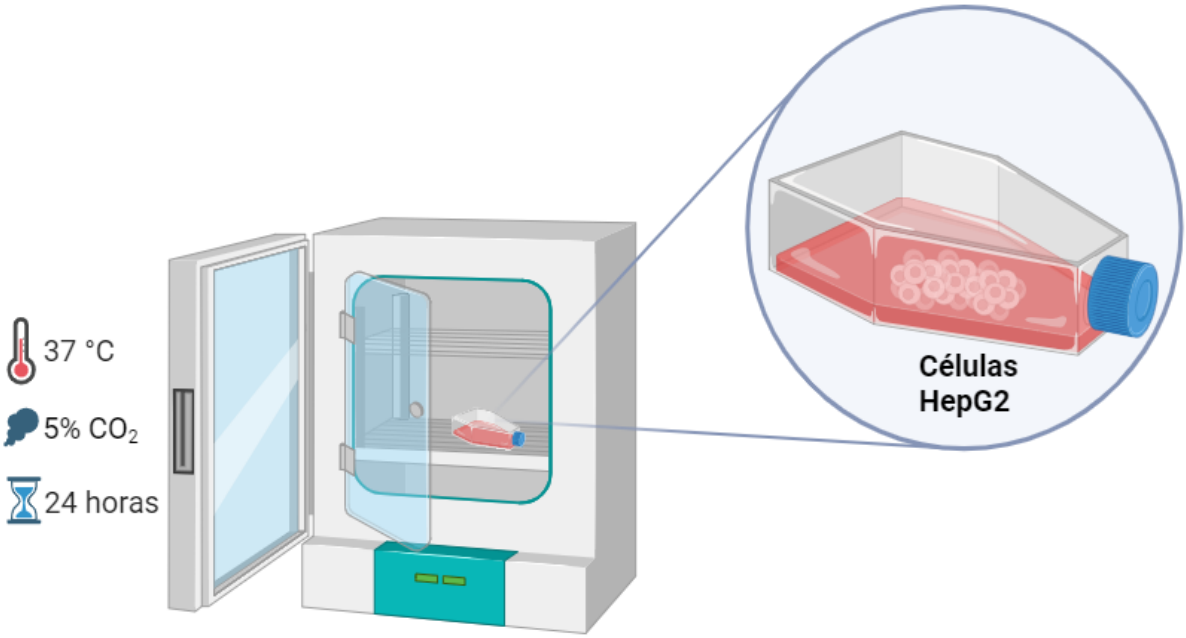
A IVM (I8898), THC (SMB00370) e a vitamina C (A92902) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda e todos os demais reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos com o mais alto grau de pureza. As concentrações de IVM utilizadas foram de 5; 7,5; 10 e 25 µM e para os antioxidantes THC e vitamina C a concentração foi padronizada em 50 µM.

2.2.2 Cultura das células HepG2

As células HepG2 (American Type Culture Collection, n° HB8065) foram mantidas em Meio "Minimum Essential Medium" (MEM) contendo L-glutamina 2 mM e sais de Earle ajustado com 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, aminoácidos não-essenciais 0,1 mM e piruvato de sódio 1 mM, suplementado com 10% de soro bovino fetal, penicilina G 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL, em frascos de cultura, em estufa climatizada com atmosfera contendo 5% de CO_2 e temperatura de 37°C.

Antes do plaqueamento das células foi realizada a avaliação da viabilidade celular pelo teste de exclusão com o corante Azul de Tripan a 0,25%, sendo que os experimentos foram realizados com cultivo de células que apresentavam uma viabilidade ≥ 90% no momento do plaqueamento (Figura 4).

Figura 4 - Esquema representativo do cultivo celular.



Fonte: BioRender.com, elaborada pela autora.

2.2.3 Parâmetros associados ao estresse oxidativo

2.2.3.1 Determinação das concentrações de GSH e GSSG

A concentração de GSH foi determinada por uma reação fluorimétrica com o-ftalaldialdeído (OPT), conforme representado na Figura 5 (Hissin; Hilf, 1976). As células HepG2 foram cultivadas a uma densidade de 1 x 10^5 células/mL e então incubadas com as diferentes concentrações de IVM. Após o tratamento, o meio de cultura foi removido e as células suspensas em 1 mL de DMEM e tratadas com 0,5 mL de ácido tricloroacético a 13% (v/v). A mistura foi agitada e centrifugada a 10.000 × g por 5 min. Alíquotas (100 µL) do sobrenadante foram misturadas com 1,8 mL de tampão NaH_2PO_4 100 mM, pH 8,0 contendo EDTA 5 mM. Em seguida, 100 µL de uma solução de OPT (1 mg/mL) foram adicionados, a mistura foi mantida no escuro e a fluorescência medida 15 min mais tarde nos comprimentos de onda de 350 e 420 nm, para excitação e emissão, respectivamente, usando um Espectrofluorímetro RF-5301PC (Shimadzu, Tokyo, Japan).

Para a determinação da concentração de GSSG, 250 µL do sobrenadante inicial foram tratados com 250 µL de N-etilmaleimida 0,04 M e a mistura submetida ao mesmo procedimento usado acima para o ensaio de GSH, exceto que uma solução de NaOH 1 M foi usada como diluente. As concentrações de GSH e GSSG foram determinadas por meio de uma curva padrão.

Em ambos os casos foi utilizado o terc-butil-hidroperóxido (t-BOOH) (250 µM) para induzir a produção de ERON (controle positivo), pois conforme descrito por Cesquini *et al.* (2003) o t-BOOH é capaz de causar danos oxidativos.

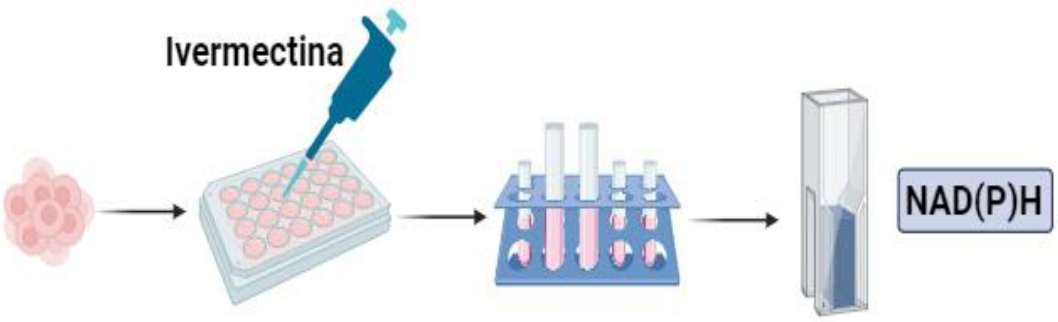
Figura 5 - Esquema representativo da determinação das concentrações de GSH e GSSG.

Fonte: BioRender.com, elaborada pela autora.

2.2.3.2 Avaliação do estado redox dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H)

As células HepG2 foram cultivadas a uma densidade de 1 x 10^5 células/mL e então incubadas IVM. O meio de cultura foi removido e as células suspensas em 2 mL de meio composto de sacarose 125 mM, KCl 65 mM e Hepes-KOH 10 mM, pH 7,2. Em seguida, as amostras foram monitoras fluorimetricamente usando comprimentos de onda de 366 e 450 nm, para excitação e emissão respectivamente, em fenda de 5 nm (Figura 6).

Figura 6 - Esquema representativo da determinação do estado redox de NAD(P)H.



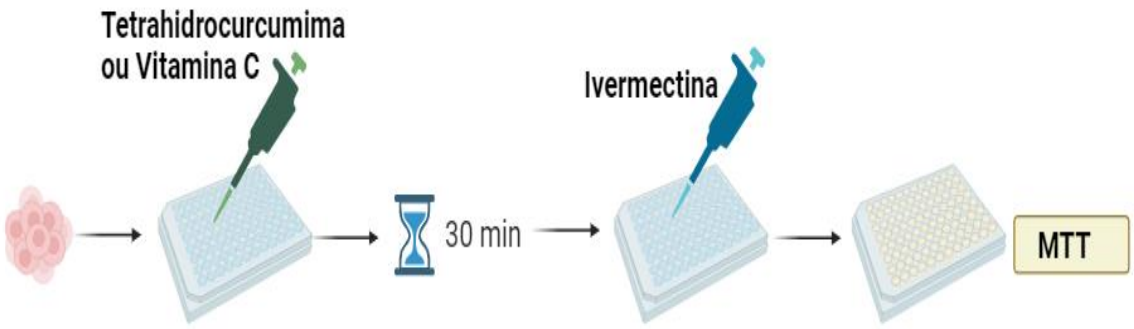
Fonte: BioRender.com, elaborada pela autora.

2.2.4 Potencial atividade protetora da tetrahidrocurcumina e da vitamina C contra os efeitos da IVM

2.2.4.1 Efeito sobre a atividade metabólica

A viabilidade celular foi avaliada por meio da medida da atividade metabólica das células usando o corante brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5 difenil tetrazólio (MTT), de acordo com Denizot e Lang (1986) (Figura 7). As células HepG2 foram plaqueadas a uma densidade de 2×10^3 células/mL e expostas a 50 µM de THC ou vitamina C 30 minutos antes do tratamento com a IVM. As células foram subsequentemente incubadas com uma solução de MTT a 0,5% (5 mg/mL) numa atmosfera contendo 5% de CO_2 a 37°C durante 3 h. Após este período, o meio nos poços foi descartado e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em uma solução de DMSO em tampão de glicina 0,2 M, pH 10,2. A absorvância final foi avaliada a 570 nm de comprimento de onda num leitor de microplacas. Os resultados foram apresentados como a diferença percentual em relação ao grupo controle.

Figura 7 - Esquema representativo da avaliação do efeito da THC e da vitamina C sobre a atividade metabólica das células HepG2.

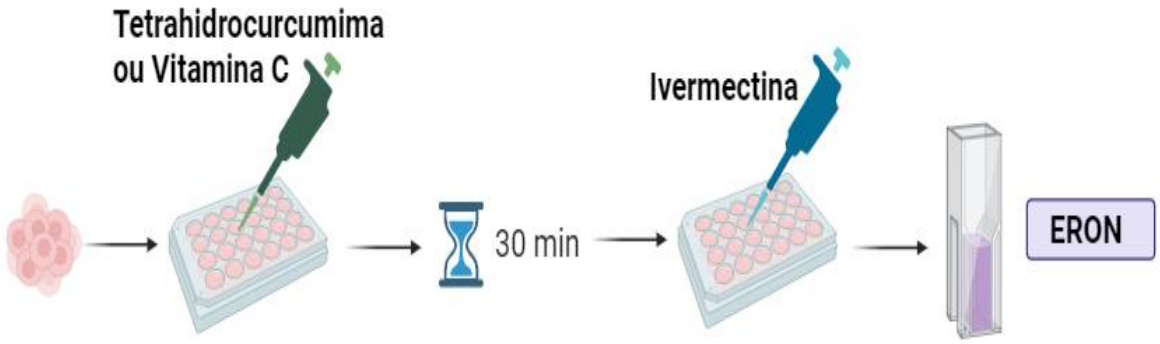


Fonte: BioRender.com, elaborada pela autora.

2.2.4.2 Efeito sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON)

A produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) foi avaliada usando a sonda fluorescente 5,6-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceina diacetato, acetil éster (CM-H_2DCFDA) (Chernyak *et al.*, 2006) (Figura 8). As células HepG2 foram cultivadas a uma densidade de 1×10^5 células/mL e expostas a 50 µM de THC ou vitamina C 30 minutos antes do tratamento com a IVM. Ao completar o período de exposição, as células foram incubadas com uma solução de CM-H_2DCFDA 2 mM, a 37°C durante 1 h. A fluorescência do CM-H_2DCFDA foi medida utilizando um espectrofluorímetro modelo RFPC 5301 (Shimadzu, Tóquio, Japão), nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 503 e 528 nm, respectivamente. Os resultados foram apresentados como a diferença em relação ao grupo controle. Uma solução de terc-butil-hidroperóxido (250 µM) foi usada para induzir a produção de ERON (controle positivo).

Figura 8 - Esquema representativo da avaliação do efeito da THC e da vitamina C sobre a produção de ERON nas células HepG2.



Fonte: BioRender.com, elaborada pela autora.

2.2.5 Análise estatística

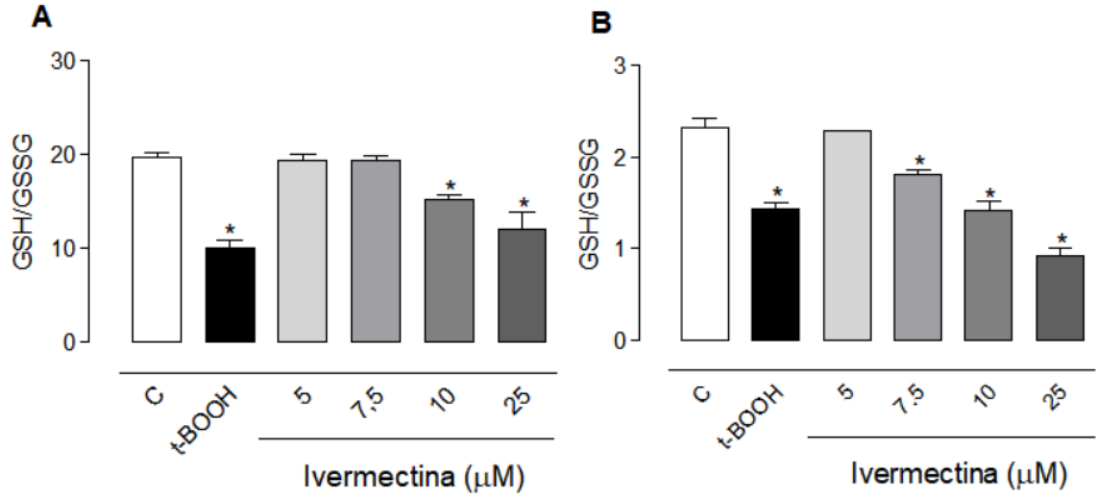
Todos os experimentos foram conduzidos com pelo menos 3 repetições biológicas de cada modelo experimental. A significância estatística dos dados experimentais foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas por meio do teste de Dunnet ou Tukey. Os resultados com valor de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. O programa utilizado foi o Graphpad Prism, versão 5.0 para o Windows, da Graphpad Software (San Diego, CA, USA).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Concentrações de GSH e GSSG

Como pode ser observado, a IVM reduziu a quantidade de GSH na exposição das células a 25 µM no tempo de 24h e ao aumentar o tempo para 48 h a redução iniciou em 7,5 µM, permanecendo menor nas concentrações de 10 e 25 µM. Em relação a GSSG, não houve diferença em nenhuma das condições testadas. Ao determinar a razão entre as concentrações de GSH e GSSG, observa-se que após 24h de exposição a IVM induziu dano oxidativo a partir da concentração de 10 µM e ao aumentar o tempo de exposição para 48h o dano oxidativo começou a partir de 7,5 µM, conforme demonstrado na Figura 9. Nos dois tempos analisados observamos um efeito dose-dependente, pois ao aumentar concentração de IVM os efeitos citotóxicos foram maiores.

Figura 9 - Razão entre as concentrações de GSH e GSSG (GSH/GSSG) nas células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina (5 a 25 µM) por 24 h (A) e 48 h (B). Os gráficos representam a média ± EPM de 3 repetições do experimento com diferentes culturas de células. *Estatisticamente significante em relação ao controle (P < 0,05). C = controle com adição de 0,1% (v/v) de DMSO; t-BOOH = controle positivo com adição de terc-butil-hidroperóxido 250 µM, atuando como agente indutor do estresse oxidativo.

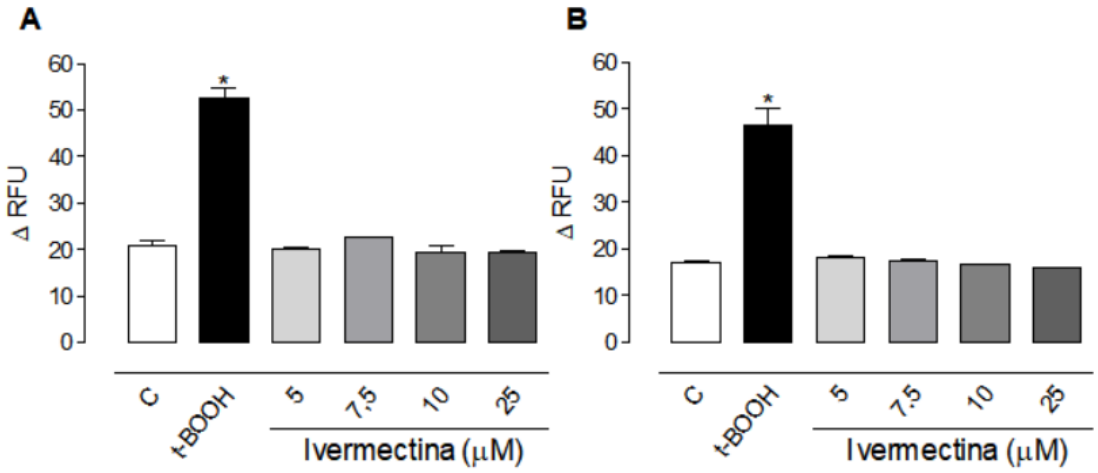


Fonte: elaborada pela autora.

2.3.2 Estado redox dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H)

De acordo com os resultados apresentados na Figura 10, a IVM não induziu a oxidação de NAD(P)H, independente da concentração de IVM e do tempo de incubação.

Figura 10 - Estado oxidativo de NAD(P)H nas células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina (5 a 25 µM) por 24 h (A) e 48 h (B). Os gráficos representam a média ± EPM de 3 repetições do experimento com diferentes culturas de células. *Estatisticamente significante em relação ao controle (P < 0,05). C = controle com adição de 0,1% (v/v) de DMSO; t-BOOH = controle positivo com adição de terc-butil-hidroperóxido 250 µM.

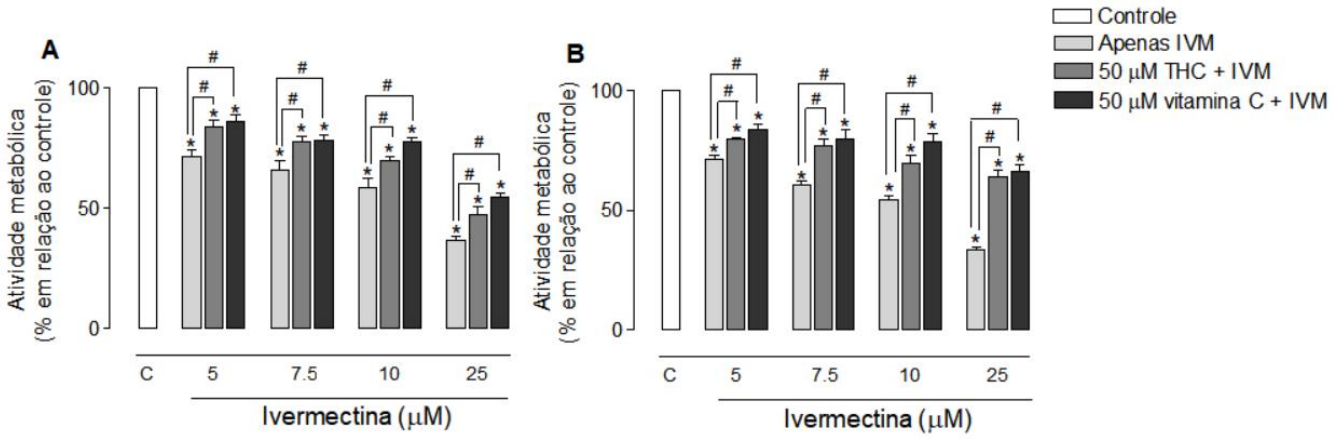


Fonte: elaborada pela autora.

2.3.3 Atividade metabólica das células

A atividade metabólica das células foi monitorada utilizando o ensaio de MTT, onde a quantidade de sal de formazam formado ao final do ensaio é proporcional ao metabolismo celular. Conforme demonstrado na Figura 11, a IVM reduziu a atividade metabólica das células em todas as concentrações e tempos de incubação testados, enquanto a THC e a vitamina C foram capazes de proteger as células contra a citotoxicidade induzida pela IVM.

Figura 11 - Efeito protetor da THC e vitamina C na atividade metabólica das células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina (5 a 25 µM) por 24 h (A) e 48 h (B). Os gráficos representam a média ± EPM de 4 repetições do experimento com diferentes culturas de células. *Estatisticamente significante em relação ao controle; #Estatisticamente diferente da ivermectina (P < 0,05). C = controle, apenas 0,1% (v/v) de DMSO.

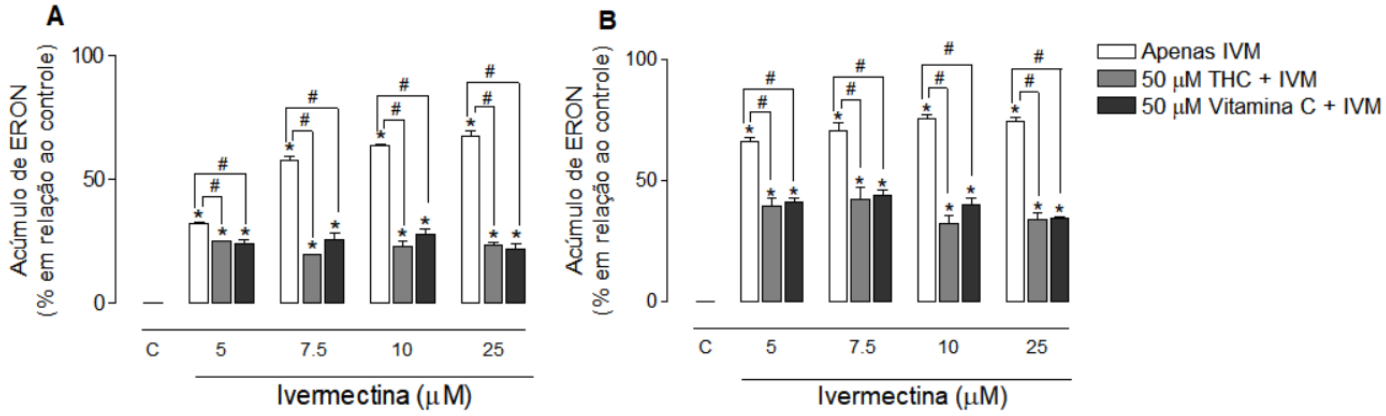


Fonte: elaborada pela autora.

2.3.4 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERON)

A IVM induziu um aumento na produção de ERON em todas as concentrações e tempos de incubação testados (Figura 12). Observa-se que a THC e vitamina C foram capazes de reduzir significantemente o acúmulo de ERON induzido pela IVM.

Figura 12 - Efeito protetor da THC e vitamina C no acúmulo de ERON das células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina (5 a 25 µM) por 24 h (A) e 48 h (B). Os gráficos representam a média ± EPM de 3 repetições do experimento com diferentes culturas de células. *Estatisticamente significante em relação ao controle; #Estatisticamente diferente da ivermectina (P < 0,05). C = controle, apenas 0,1% (v/v) de DMSO.



Fonte: elaborada pela autora.

2.4 DISCUSSÃO

Mansano (2022) descreveu em seu trabalho que a exposição das células HepG2 a diferentes concentrações de IVM é capaz de causar diminuição da proliferação celular e da atividade metabólica, alterações na integridade da membrana celular e mudanças nos parâmetros mitocondriais como redução da síntese de ATP e dissipação do potencial de membrana, além do acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON). Nossos resultados sugerem que o estresse oxidativo é uma das vias que geram a citotoxicidade nas células HepG2 expostas à IVM, pois a razão entre GSH e GSSG apresentou diminuição após exposição durante 24 e 48 h às maiores concentrações de IVM, demonstrando sua ação direta no sistema antioxidante. Ao avaliar a capacidade da THC e vitamina C atuarem na proteção celular, constatamos que as células previamente incubadas com os antioxidantes por 30 minutos antes da exposição à IVM apresentaram melhor atividade metabólica e menor produção de ERON amenizando os danos citotóxicos.

As mitocôndrias são organelas dinâmicas, com diversas funções celulares incluindo controle do metabolismo, homeostase, morte celular, inflamação e o equilíbrio da funcionalidade mitocondrial é importante pois qualquer disfunção leva ao acúmulo de mitocôndrias defeituosas que produzem ERON altamente reativas e instáveis que induzem o estresse oxidativo pelo desbalanceio entre a quantidade de

radicais livres e a capacidade de atuação do sistema antioxidante (Prajapati *et al.,* 2020).

Os resultados deste trabalho indicam que a toxicidade induzida pela IVM está associada ao dano sobre o sistema antioxidante celular pois observou-se a redução na razão GSH/GSSG a partir de 10 µM nas células expostas ao praguicida durante 24 horas e ao aumentar o tempo de exposição para 48 horas a redução foi significativa a partir de 7,5 µM. A GSH é uma biomolécula constituinte do sistema de homeostase redox intracelular, sendo a primeira linha de defesa contra a produção de radicais livres provenientes da presença de xenobióticos, uma vez que a enzima glutationa peroxidase é responsável pela remoção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) de forma direta usando como substrato a GSH, que por sua vez é oxidada originando a GSSG (Zhu *et al*., 2021).

Lozano *et al*. (2021) utilizaram *Prochilodus lineatus*, popularmente conhecido como Curimbatá, para investigar alterações bioquímicas em peixes expostos a baixas concentrações de IVM e constataram que a ação enzimática da glutationa S-transferase (GST) nas brânquias foi reduzida de maneira significativa. Este efeito pode estar relacionado à diminuição da quantidade de GSH considerando que durante o processo de desintoxicação a GSH é convertida em GSSG e a menor disponibilidade de GSH reduz automaticamente a ação da GST. Nossos resultados estão de acordo com o descrito pelos autores pois os níveis de GSSG foram 10x maiores nas células expostas ao tempo de 48h quando comparado com 24h indicando maior conversão de GSH em GSSG e isso fez com que a razão GSH/GSSG fosse 10x menor após 48h.

Ogueji *et al.* (2020) confirmam parcialmente o que observamos nas células HepG2, pois em estudo utilizando *Clarias gariepinus*, conhecido como Bagre-africano, para avaliar os parâmetros bioquímicos para determinar as consequências da exposição aguda a IVM, eles avaliaram a atividade das enzimas antioxidantes glutationa redutase (GR), superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx), catalase (CAT) e biomarcadores gerais de estresse, como glicose sérica, proteína, fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Eles descreveram aumento na atividade em todas as enzimas antioxidantes, indicando a capacidade da SOD de conter a atividade dos radicais e ajudar a manter a integridade da membrana celular através de captação de $^{-}O2$ formando H_2O_2, a GPx catalisa a reação no combate de radicais livres utilizando

o H_2O_2 reduzindo-o a 2 H_2O em que duas moléculas de GSH são oxidadas formando a molécula de GSSG ligadas por uma ponte dissulfeto. Entretanto, o aumento da GR deveria completar a ação cíclica do sistema antioxidante convertendo GSSG em GSH utilizando NAD(P)H mas não foi isso que observamos, pois nossos resultados não foram significativamente diferentes do controle em nenhum tempo e concentrações testadas.

Em estudo prévio realizado em pelo nosso grupo de pesquisa, foi avaliada a capacidade da THC em amenizar a toxicidade induzida pelo inseticida diazinon (DZN) em células HepG2 (Miranda *et al*., 2023). Os resultados demonstraram que a prévia incubação com THC reduziu a quantidade de ERON produzidas e consequentemente a viabilidade das células foi melhorada.

A ação antioxidante da THC é estudada e descrita na literatura por diversos autores (Okada *et al*., 2001; Karthikesan; Pari; Menon, 2010; Sangartit *et al.,* 2016; Kim *et al.,* 2020; Zhu *et al*., 2022) demonstrando a importância da utilização deste composto natural para minimizar os danos gerados pelo estresse oxidativo. A ação protetora da THC também foi confirmada em relação a citotoxicidade induzida pela IVM, pois a redução da atividade metabólica das células HepG2 foi amenizada com a incubação da THC antes da exposição às diferentes concentrações de IVM nos tempos de 24 e 48h. Essa proteção pode estar relacionada à ação antioxidante da THC, constatada pela redução na produção de ERON estimulada pela IVM.

O efeito hepatoprotetor exercido pela vitamina C é descrito por Aumailley *et al.* (2022), Ali *et al.* (2022), Zeng *et al.* (2020), Han *et al*. (2019) indicando que a ação antioxidante é eficiente em relação a diferentes compostos e tempos de exposição. Ao analisar a capacidade protetora em relação às concentrações testadas de IVM, observamos que houve melhora na atividade metabólica celular e redução no acúmulo de ERON nas células tratadas previamente com vitamina C nos tempos de 24 e 48h.

Nossos resultados vão ao encontro ao que foi descrito por Li *et al.* (2023), os quais utilizaram tetraclorobenzoquinona, um metabólito ativo do pentaclorofenol, que estimula o acúmulo de ERON, para desencadear a apoptose e identificar e estabelecer uma base teórica sobre a eficiência da vitamina C. Eles observaram que a vitamina C foi capaz de atenuar a apoptose em células HepG2, pois a geração de radicais livres foi menor e houve melhora na viabilidade celular.

De modo geral, os resultados apresentados neste trabalho indicam que a utilização dos antioxidantes THC e vitamina C são capazes de amenizar os danos

celulares causados pela exposição à IVM sugerindo que ambos possam ser utilizados estrategicamente como forma de prevenção aos efeitos hepáticos induzidos pela IVM.

2.5 CONCLUSÃO

As descobertas deste trabalho revelam que o dano oxidativo causado pela presença de IVM pode estar relacionado à toxicidade induzida pela substância nas células HepG2. Ainda, que a THC e a vitamina C podem amenizar a produção de ERON e a citotoxicidade induzidas pela IVM.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, M. A.; EL-TAHAN, R. A.; KAMEL, M. A.; MATAR, N. A.; MAHMOUD, S. A. The diabetogenic effects of chronic supplementation of vitamin C or E in rats: interplay between liver and adipose tissues transcriptional machinery of lipid metabolism. **Life Sciences**, [*S.l.*], v. 306, p. 120812, 2022.

AUMAILLEY, L.; BOURASSA, S.; GOTTI, C.; DROIT, A.; LEBEL, M. Vitamin C modulates the levels of several proteins of the mitochondrial complex III and its activity in the mouse liver. **Redox Biology**, [S*.l.*], v. 57, p. 102491, 2022.

CHEN, X.; XIE, Q.; ZHU, Y.; XU, J.; LIN, G.; LIU, S.; SU, Z.; LAI, X.; LI, Q.; XIE, J. Cardio-protective effect of tetrahydrocurcumin, the primary hydrogenated metabolite of curcumin in vivo and in vitro: induction of apoptosis and autophagy via pi3k/akt/mtor pathways. **European Journal of Pharmacology**, [S*.l.*], v. 911, p. 174495, 2021.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid Colorimetric Assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reability, **Immunological. Methods**, [S*.l.*], v. 22, p. 271-277, 1986.

HAN, Q.; FAN, H.; PENG, J.; ZHOU, L.; GAN, L. Pleiotropic function of vitamin C on fatty acids in liver and muscle of juvenile grass carp (Ctenopharyngodon idella). **Aquaculture**, [S*.l.*], v. 512, p. 734352, 2019.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, [S*.l.*], v.74, p.214-226, 1976.

IDOWU, E. T.; ALIMBA, C. G.; OLOWU, E. A.; OTUBANJO, A. O. Artemether-Lumefantrine treatment combined with albendazole and ivermectin induced genotoxicity and hepatotoxicity through oxidative stress in Wistar rats. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, [S*.l.*], v. 2, n. 2, p. 110-119, 2015.

KARTHIKESAN, K.; PARI, L.; MENON, V. P. Protective effect of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid against streptozotocin–nicotinamide generated oxidative stress induced diabetes. **Journal of Functional Foods**, [S*.l.*], v. 2, n. 2, p. 134-142, 2010.

KIM, J.; KIM, H.; CHUNG, B.; HONG, J.; CHUNG, E.; LEE, J.; LEE, S. 326 Tetrahydrocurcumin ameliorates skin inflammation and oxidative stress and induces autophagy in mice fed a high-fat diet. **Journal of Investigative Dermatology**, [S.*l.*], v. 140, n. 7, p. 40, 2020.

LEE, J.; LIM, W.; HAM, J.; KIM, J.; YOU, S.; SONG, G. Ivermectin induces apoptosis of porcine trophectoderm and uterine luminal epithelial cells through loss of mitochondrial membrane potential, mitochondrial calcium ion overload, and reactive oxygen species generation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S.*l.*], v. 159, p. 144-153, 2019.

LI, C.; PANG, M.; LI, Y.; HAN, L.; FAN, Y.; XIN, X.; ZHANG, X.; ZHANG, N.; QIN, Y. Protective effect of vitamin C against tetrachlorobenzoquinone-induced 5-hydroxymethylation-dependent apoptosis in HepG2 cells mainly via the mitochondrial apoptosis pathway. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S.*l.*], v. 260, p. 115097, 2023.

LOZANO, I. E.; PIAZZA, G.; BABAY, P.; SAGER, E.; LATORRE, F. R.; LONOSTRO, F. L. Ivermectin: a multilevel approach to evaluate effects in prochilodus lineatus (valenciennes, 1836) (characiformes, prochilodontidae), an inland fishery species. **Science of the Total Environment**, [S.*l.*], v. 800, p. 149515, 2021.

MANSANO, J. R. D. **TOXICIDADE DA IVERMECTINA EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2**). Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Dracena, p. 62, 2022.

MARTIN, Richard J.; ROBERTSON, Alan P.; CHOUDHARY, Shivani. Ivermectin: an anthelmintic, an insecticide, and much more. **Trends in Parasitology**, [S.*l.*], v. 37, n. 1, p. 48-64, jan. 2021.

MASON, S. A.; PARKER, L.; PLIGT, P. D.; WADLEY, G. D. Vitamin C supplementation for diabetes management: a comprehensive narrative review. **Free Radical Biology and Medicine**, [S.*l.*], v. 194, p. 255-283, 2023.

MELO, J.; AMADEU, M. A.; DONÁ, G.; BEVILACQUA, E. Cytotoxic effects of ivermectin on human trophoblast cells. **Placenta**, [S.*l.*], v. 122, p. 32, 2022.

MIRANDA, C. A.; BERETTA, E. M.; FERREIRA, L. A.; SILVA, E. S.; COIMBRA, B. Z.; PEREIRA, P. T.; MIRANDA, R. G.; DORTA, D. J.; RODRIGUES, F. T. V.; MINGATTO, F. E. Role of biotransformation in the diazinon-induced toxicity in HepG2 cells and antioxidant protection by tetrahydrocurcumin. **Toxicology Reports**, [S.*l.*], v. 10, p. 32-39, 2023.

NG, J. Y.; ANANT, S.; PARAKH, N. D. Characteristics of the research literature on herbal medicines corresponding with herbal supplements yielding the highest total sales: a bibliometric analysis. **Advances in Integrative Medicine**, [S.*l.*], v. 10, n. 2, p. 64-79, 2023.

NIKJOO, M.; FARHANGI, M.; PATIMAR, R.; ADINEH, H.; ALIZADEH, M. The protective effect of vitamin C on growth, digestive enzymes, immune response, and

gill histology in Caspian roach (Rutilus rutilus caspicus) under diazinon stress. **Aquaculture Reports**, [S.*l.*], v. 32, p. 101698, 2023.

OGUEJI, E.; NWANI, C.; MBAH, C.; IHEANACHO, S.; NWEKE, F. Oxidative stress, biochemical, lipid peroxidation, and antioxidant responses in Clarias gariepinus exposed to acute concentrations of ivermectin. **Environmental Science and Pollution Research**, [S.*l.*], v. 27, n. 14, p. 16806-16815, 2020.

OKADA, K.; WANGPOENGTRAKUL, C.; TANAKA, T.; TOYOKUNI, S.; UCHIDA, K.; OSAWA, T. Curcumin and Especially Tetrahydrocurcumin Ameliorate Oxidative Stress-Induced Renal Injury in Mice. **The Journal of Nutrition**, [S.*l.*], v. 131, n. 8, p. 2090-2095, 2001.

PARK, H.; SONG, G.; LIM, W. Ivermectin-induced programmed cell death and disruption of mitochondrial membrane potential in bovine mammary gland epithelial cells. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S.*l.*], v. 163, p. 84-93, 2020.

PRAJAPATI, P.; GOHEL, D.; SHINDE, A.; ROY, M.; SINGH, K.; SINGH, R. TRIM32 regulates mitochondrial mediated ROS levels and sensitizes the oxidative stress induced cell death. **Cellular Signalling**, [S.*l.*], v. 76, p. 109777, 2020.

SANGARTIT, W.; PAKDEECHOTE, P.; KUKONGVIRIYAPAN, V.; DONPUNHA, W.; SHIBAHARA, S.; KUKONGVIRIYAPAN, U. Tetrahydrocurcumin in combination with deferiprone attenuates hypertension, vascular dysfunction, baroreflex dysfunction, and oxidative stress in iron-overloaded mice. **Vascular Pharmacology**, [S.*l.*], v. 87, p. 199-208, 2016.

YANG, J. S.; QI, W.; FARIAS-PEREIRA, R.; CHOI, S.; CLARK, J. M.; KIM, D.; PARK, Y. Permethrin and ivermectin modulate lipid metabolism in steatosis-induced HepG2 hepatocyte. **Food and Chemical Toxicology**, [S.*l.*], v. 125, p. 595-604, 2019.

YANG, S.; OOKA, M.; MARGOLIS, R. J.; XIA, M. Liver three-dimensional cellular models for high-throughput chemical testing. **Cell Reports Methods**, [S.*l.*], v. 3, n. 3, p. 100432, 2023.

ZENG, Q.; ZHAO, L.; MENG, C.; ZHAO, X.; LIU, Y.; SHI, R.; HAN, X.; WANG, T.; LI, J. Prophylactic and therapeutic effects of different doses of vitamin C on high-fat-diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.*l.*], v. 131, p. 110792, 2020.

ZHOU, S; WU, H; NING, W; WU, X; XU, X; MA, Y; LI, X; HU, J; WANG, C; WANG, J. Ivermectin has New Application in Inhibiting Colorectal Cancer Cell Growth. **Front Pharmacol**, [S.*l.*], v. 12, 2021.

ZHU, L.; XUE, Y.; FENG, J.; WANG, Y.; LU, Y.; CHEN, X. Tetrahydrocurcumin as a stable and highly active curcumin derivative: a review of synthesis, bioconversion, detection and application. **Food Bioscience**, [S.*l.*], v. 53, p. 102591, 2023.

ZHU, M.; LI, Y.; ZHOU, Z. Antibiotic ivermectin preferentially targets renal cancer through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative damage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S.*l.*], v. 492, n. 3, p. 373-378, 2017.

ZHU, Y.; WU, J.; WANG, K.; XU, H.; QU, M.; GAO, Z.; GUO, L.; XIE, J. Facile and sensitive measurement of GSH/GSSG in cells by surface-enhanced Raman spectroscopy. **Talanta,** [S.*l.*], v. 224, p. 121852, 2021.

Capítulo 3: Toxicidade da ametrina e da clomazona, isoladas ou combinadas, em zebrafish

RESUMO

A ametrina (AMT) e a clomazona (CLZ) são herbicidas utilizados para o controle de ervas daninhas em diversas plantações e se destacam principalmente pelo uso em canaviais. Devido à alta solubilidade em água ambos são potenciais poluidores ecológicos, sendo os ambientes aquáticos os mais afetados. O objetivo deste estudo foi avaliar as possíveis alterações no desenvolvimento de embriões e nas atividades das enzimas acetilcolinesterase (AChE), fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) durante o desenvolvimento embrio-larval de zebrafish, para elucidar os mecanismos de toxicidade dos herbicidas isolados e o efeito da mistura entre os dois. O desenvolvimento embrionário foi avaliado utilizando o protocolo Fish Embryo Toxicity (FET), com 20 embriões expostos a concentrações de 0,1; 3,7; 6; 20 ou 60 µg/L de AMT, 0,1; 6; 20; 36 ou 167 µg/L de CLZ ou uma combinação de ambos (AMT 0,1 µg/L + CLZ 0,1 µg/L, AMT 6 µg/L + CLZ 36 µg/L, AMT 3,7 µg/L + CLZ 167 µg/L) e a incidência de anomalias foi avaliada por meio da análise de microfotografias. Os ensaios enzimáticos foram realizados com 30 larvas expostas durante 96 horas pós fecundação a ametrina, clomazona ou mistura nas concentrações citadas anteriormente. A significância estatística dos dados experimentais foi avaliada pela análise de variância e as médias foram comparadas por meio do teste de Dunnet ou Tukey. Foi observada uma redução significante na inflação da bexiga natatória das larvas em concentrações a partir de 0,1 µg/L de AMT e 36 µg/L de CLZ, enquanto a mistura dos herbicidas apresentou efeito antagônico, minimizando os danos induzidos pelos herbicidas isolados. Não foram observadas diferenças significantes em outros parâmetros avaliados, incluindo coagulação do ovo, edema pericárdico e edema do saco vitelínico. Houve redução significante na atividade da AChE em larvas expostas aos herbicidas isoladamente, porém a mistura dos dois minimizou os danos neurológicos. Observou-se um aumento significante na atividade das enzimas AST e ALT a partir de 6 µg/L de AMT e 20 µg/L de CLZ, enquanto para a ALP o aumento foi observado a partir de 3,7 µg/L de AMT e 20 µg/L de CLZ. A mistura dos dois herbicidas também apresentou efeito antagônico sobre as atividades das enzimas hepáticas. Nossos resultados demonstram que os danos neurológicos e hepáticos são vias importantes da toxicidade exercida pelos herbicidas AMT e CLZ e que a exposição aos dois simultaneamente causa antagonismos reduzindo os efeitos tóxicos gerados. Apesar da mistura entre os dois minimizar as alterações enzimáticas, as consequências do uso dos herbicidas AMT e CLZ ainda são preocupantes.

3.1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem uma extensa área territorial com muita variabilidade nas condições climáticas, sendo sua área produtiva de mais de 72 milhões de hectares e um volume total de 284,4 milhões de toneladas de grãos para a safra 2021/2022, porém, associado à alta produtividade, temos a utilização de uma ampla e constante gama de praguicidas (Souza *et al.,* 2023).

É comum a utilização de herbicidas para minimizar as perdas agrícolas oriundas da competição das ervas daninhas com a cultura produzida, apesar do Brasil ser referência em boas práticas no uso de praguicidas, em diversos locais é realizado o uso inapropriado dos herbicidas devido ao desconhecimento dos protocolos adequados e necessidade de controle das pragas. Como consequência do uso inadequado há o risco de poluição dos sistemas aquáticos, uma vez que o destino dos resíduos de praguicidas são influenciados por diversos fatores e esses entram em contato com a água por meio de deriva, escoamento superficial, lixiviação ou aplicação direta na água (Shuman-Goodier; Propper, 2016; Souza *et al.,* 2024).

A ametrina (AMT) é um dos herbicidas mais utilizados nas culturas canavieiras brasileiras, podendo ser aplicada pré e pós emergência inicial para o controle de ervas daninhas mono e dicotiledônias (Silva *et al.*, 2016). A Agência de Proteção Ambiental classifica a AMT como praguicida de Toxicidade III, que é levemente tóxica, sendo moderadamente tóxica para peixes, altamente tóxica para crustáceos e moderada a altamente tóxica para moluscos (Jacomini *et al.,* 2009).

O herbicida clomazona (CLZ), utilizado no controle de plantas daninhas e gramíneas anuais de folha larga, é altamente solúvel em água refletindo seu potencial impacto de contaminação de rios e afluentes (Stevanovic *et al.,* 2021). No corpo da planta, tem ação sistêmica e é absorvida pelas raízes inibindo a formação de pigmentos fotossintéticos induzindo a morte das plantas daninhas. Acredita-se que a toxicidade da CLZ em animais esteja associada à sua capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase (Fagundes *et al.,* 2015).

Estudos revelam que diferentes quantidades de resíduos de ametrina e clomazona foram detectadas em água de rios, conforme descrito na Tabela 2:

Tabela 2 - Revisão de literatura sobre a quantificação de ametrina e clomazona.

Ametrina				
Autor	**Ano**	**Local**	**Quantidade**	**Tempo após aplicação**
Botelho *et al.*	2015	Americana	0,1 e 0,5 µg/L	Não identificado
Botelho *et al.*	2015	Piracicaba	1 e 1,5 µg/L	Não identificado
Machado *et al.*	2016	São Paulo	0,27 µg/L	Não identificado
Junior e Rodrigues	2021	Norte de Pernambuco	0,7 µg/L	Não identificado
United States Environmental Protection Agency	2014	Estados Unidos	3,7 µg/L	Não identificado
Echeverría-Sáenz, Spínola-Parallada e Soto	2021	Costa Rica	20 µg/L	Não identificado
CETESB	2019	São Paulo	0,1 µg/L	Não identificado
Fio Cruz	2020	Sugere um valor máximo permitido de 6 µg/L		
Ministério da Saúde	2017	Limite máximo permitido 120 µg/L		
Ministério da Saúde	2021	Limite máximo permitido 60 µg/L		
Clomazona				
Autor	**Ano**	**Local**	**Quantidade**	**Tempo após aplicação**
Brum *et al.*	2013	Santa Catarina	6 µg/L	Não identificado
Zanella *et al.*	2002	Rio Grande do Sul	441 µg/L	1 hora
Zanella *et al.*	2002	Rio Grande do Sul	250 µg/L	7 dias
Zanella *et al.*	2002	Rio Grande do Sul	20 µg/L	14 dias
Zanella *et al.*	2002	Rio Grande do Sul	3,1 µg/L	21 dias
Zanella *et al.*	2002	Rio Grande do Sul	1,9 µg/L	28 dias
Correia, Carbonari e Velini	2020	Distrito Federal	4,1 µg/L	Não identificado
United States Environmental Protection Agency	2009	Estados Unidos	167 µg/L	Não identificado
CETESB	2019	São Paulo	0,1 µg/L	Não identificado
Fio Cruz	2020	Sugere um valor máximo permitido de 36 µg/L		
Ministério da Saúde	-	Não define limite máximo permitido		

*Em destaque as concentrações utilizadas neste estudo.

Fonte: Elaborado pela autora.

Nos últimos anos, tem-se observado um aumento significativo na preocupação com os impactos ambientais decorrentes do uso de praguicidas. A poluição dos ecossistemas aquáticos resultante da aplicação excessiva desses produtos químicos, representa uma ameaça à saúde humana e animal (Wang *et al.,* 2024). Neste contexto, o zebrafish se destaca como um modelo biológico para estudos toxicológicos sendo frequentemente utilizado para identificar os danos gerados após exposição a resíduos de compostos de diferentes classes, pois, em comparação com os mamíferos, o ciclo de investigação é reduzido considerando que em cada acasalamento são produzidos entre 50-200 embriões e se tornam adultos com apenas 3 meses (Wan *et al.,* 2024). Outro fator importante é a semelhança de até 87% do genoma e órgãos humanos, permitindo estudo embrionário *in vivo* devido à transparência dos embriões que podem ser observados utilizando microscópio (Konantz *et al*., 2019).

As larvas do zebrafish possuem os principais órgãos desenvolvidos e funcionais com apenas cinco dias de vida, sendo a fisiologia das larvas semelhantes as características do metabolismo dos mamíferos desde absorção, metabolismo e excreção de substâncias exógenas, propiciando um conjunto experimental completo capaz de gerar dados biologicamente relevantes com maior rapidez (Fukushima *et al.,* 2020).

Desse modo, neste capítulo avaliamos as alterações no desenvolvimento embrionário e na atividade enzimática da acetilcolinesterase, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina induzidas pelos herbicidas ametrina e clomazona, de forma isolada ou misturados, utilizando como modelo experimental embriões e larvas de zebrafish para elucidação da capacidade embriotóxica, além dos danos neurais e hepáticos ocasionados pela presença dos herbicidas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Reagentes

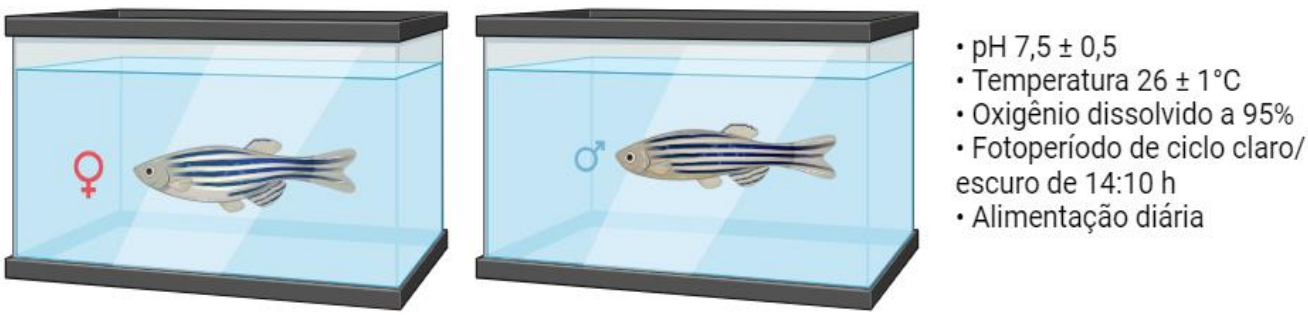
Os herbicidas ametrina (45321) e clomazona (46120) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda. Todos os demais reagentes a serem utilizados neste estudo serão adquiridos com o mais alto grau de pureza.

3.2.2 Manutenção dos Peixes

Os ensaios empregando zebrafish propostos neste projeto foram submetidos à aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-Unesp). O zebrafish (*D. rerio*) foi mantido no Biotério de Zebrafish da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX). Os adultos foram mantidos em sistema com água em condições padrão (pH 7,5 ± 0,5, temperatura 26 ± 1°C, oxigênio dissolvido a 95%, saturação e condutividade 750 ± 50 µs/cm, fotoperíodo de ciclo claro / escuro de 14:10 h), alimentados diariamente com ração comercial (Figura 13). Os ovos foram rotineiramente obtidos e os criadores de zebrafish foram montados em aquário de 1 L na proporção de 2:1 de macho / fêmea e quando a luz se acendia de manhã (início de fotoperíodo claro), os peixes eram deixados a desovar por período de aproximadamente 1 h, em seguida os ovos foram coletados e lavados em água de osmose reversa autoclavada. Ovos fertilizados durante o estágio de blástula (4-64 / célula) foram selecionados aleatoriamente em estereomicroscópio para os experimentos subsequentes.

A eutanásia dos animais foi realizada de acordo com o “Guideline for Use of Zebrafish” do National Institute of Health (2009) e Resolução Normativa n° 37 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), 2018. Para os animais entre 1 e 4 dias pós-fertilização, a eutanásia foi realizada por imersão em nitrogênio líquido. Segundo a Resolução Normativa n° 37 do CONCEA, o congelamento pela imersão em nitrogênio líquido é uma forma de eutanásia recomendada para peixes de pequeno porte (que não ultrapassam 200 mg).

Figura 13 - Esquema representativo da manutenção dos peixes adultos.

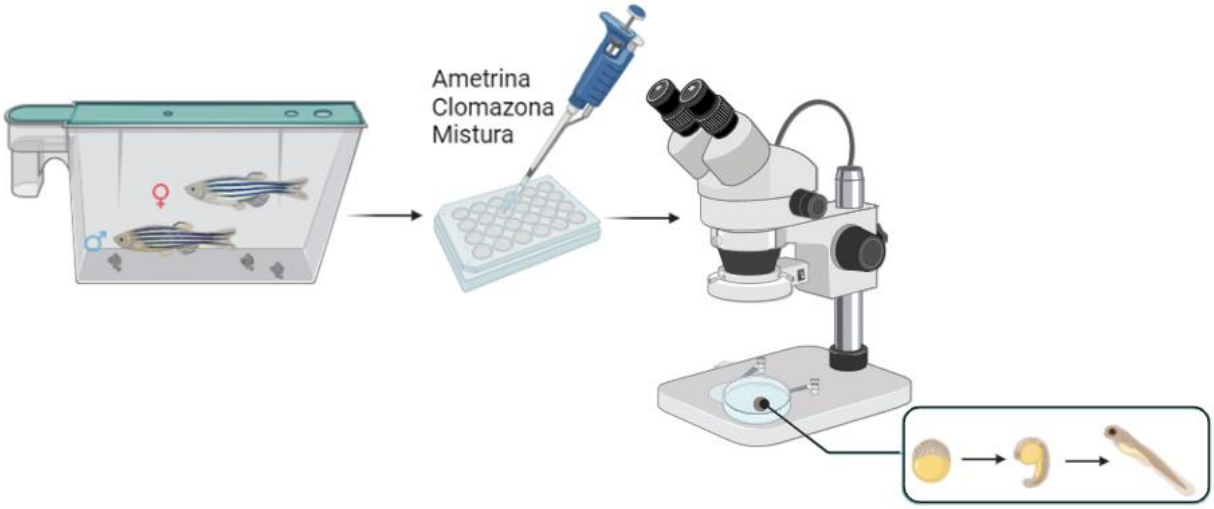


Fonte: BioRender.com, elaborada pela autora.

3.2.3 Teste de toxicidade aguda nos estágios embrio-larvais de zebrafish

O teste preliminar de toxicidade aguda seguiu as instruções do Fish Embryo Toxicity (FET) test, OECD (2013) e Nagel (2002). Os ovos viáveis foram selecionados e dispostos em placas de 24 poços, sendo um ovo por poço contendo 1 mL da solução-teste e dos controles positivo (3,4-dicloroanilina 4 mg/L), negativo (água de diluição) ou de solvente (se necessário), totalizando 24 embriões por placa e 1 placa por tratamento. As placas foram mantidas em incubadora a 27,5ºC (fotoperíodo ciclo claro/escuro 13:11h); todos os dias os embriões foram observados em microscópio invertido (Motic®, AE2000) com câmera e avaliados os indicadores de letalidade e subletalidade até atingirem 144 horas pós-fertilização (hpf). Para isso, após 144 hpf, os embriões utilizados no FET, foram anestesiados em banho de imersão com 168 µg/mL de benzocaína (preparada em água destilada) por 4 min ou até completa imobilização e imediatamente fotografados para avaliação da incidência de anomalias, utilizando a lupa Olympus mvx10 com o auxílio de lentes X-citem120 LED e do software Olympys cellsens dimentions. A distinção entre desenvolvimento embrionário normal e anormal foi estabelecida pela embriogênese de *Danio rerio* descrita por Kimmel *et al.* (1995). Conforme demonstrado na Figura 14.

Figura 14 - Esquema representativo do FET test.



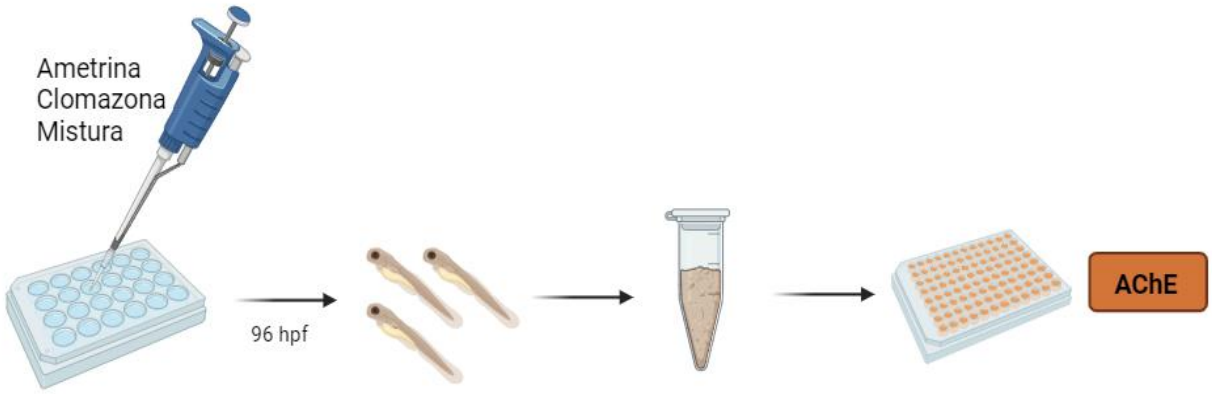
Fonte: BioRender.com, elaborada pela autora.

3.2.4 Ensaio da atividade da acetilcolinesterase (AChE)

Para cada substância testada, foram utilizados homogenatos de 30 embriões previamente expostos à ametrina e clomazona, isoladas ou combinadas, por 96 hpf.

O procedimento utilizado desenvolvido por Ellman *et al.* (1961) e adaptado posteriormente para microplacas (Gravato *et al.*, 2014) e está brevemente descrito a seguir: inicialmente foi realizada a homogeneização com 500 µL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) a 4ºC e posterior centrifugação a 3.300 *g* por 3 min a 4ºC. O sobrenadante foi incubado com o substrato acetilcolina e a atividade enzimática avaliada por espectrofotometria no comprimento de onda de 412 nm, utilizando o espectrofotômetro com leitor de microplacas (Synergy™ HTX, BioTek) (Figura 15). Como controle positivo foi utilizado o organofosforado Diclorvós (CAS: 62-73-7, pureza 98,9%) a 50 µM.

Figura 15 - Esquema representativo da determinação da atividade da AChE.



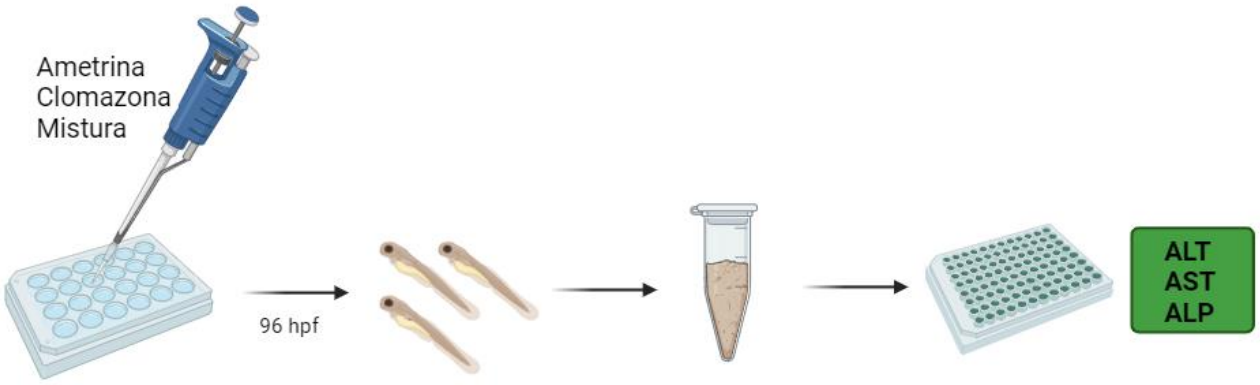
Fonte: BioRender.com, elaborada pela autora.

3.2.5 Biomarcadores de hepatotoxicidade

Os níveis de atividade das enzimas marcadoras de dano hepático foram medidos de acordo com a metodologia descrita por Zhao *et al.* (2019), com adaptações realizadas por Muniz *et al.*, 2021. Grupos de embriões de zebrafish foram expostos a diferentes concentrações dos herbicidas em placas de 24 poços (1 mL/poço) por 96h. Após a exposição, as larvas foram coletadas e distribuídas em microtubos contendo água destilada gelada, na proporção de 1 larva para cada 50 µL de água. Posteriormente, as larvas foram maceradas mecanicamente com um pistilo e centrifugadas (10.000 *g*, por 20 min) para obtenção do sobrenadante pós-mitocondrial, que foi utilizado para determinar o teor de proteínas solúveis e a atividade das enzimas. O teor de proteínas solúveis foi medido seguindo o método de Bradford (1976) e as atividades das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP), medidas usando kits de

diagnóstico baseados em espectrofotometria (Bioclin, Belo Horizonte, MG) de acordo com as instruções do fabricante (Figura 16).

Figura 16 - Esquema representativo dos biomarcadores hepáticos.



Fonte: BioRender.com, elaborada pela autora.

3.2.6 Análise estatística

Todos os experimentos foram conduzidos com pelo menos 3 repetições biológicas de cada modelo experimental. A significância estatística dos dados experimentais foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas por meio do teste de Dunnet ou Tukey. Os resultados com valor de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. O programa utilizado foi o Graphpad Prism, versão 5.0 para o Windows, da Graphpad Software (San Diego, CA, USA).

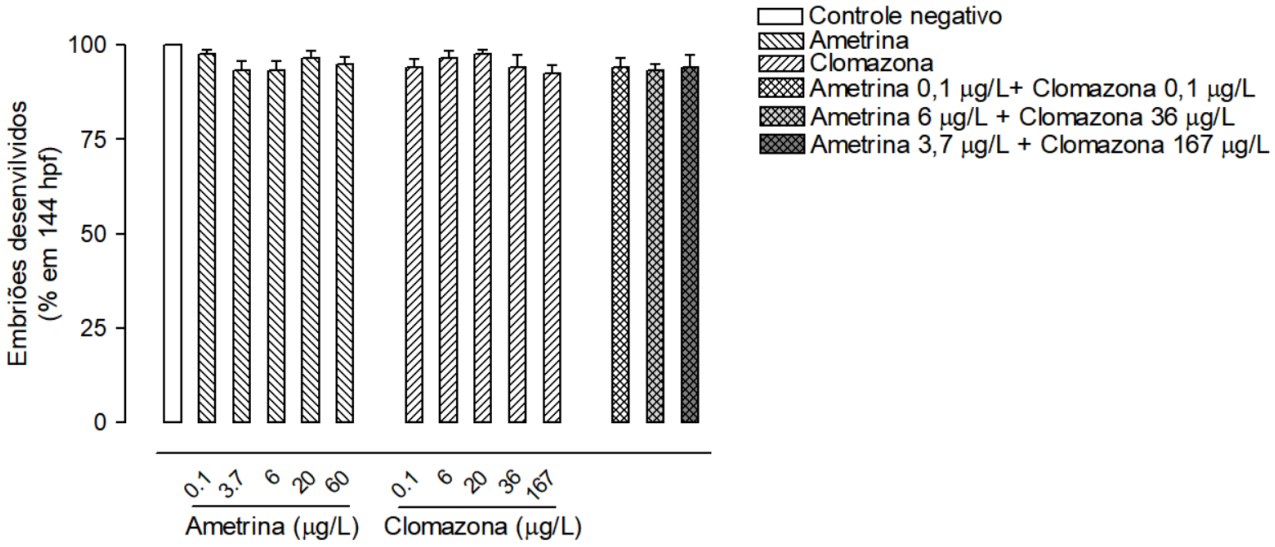
3.3 RESULTADO

3.3.1 Teste de toxicidade aguda

3.3.1.1 Desenvolvimento

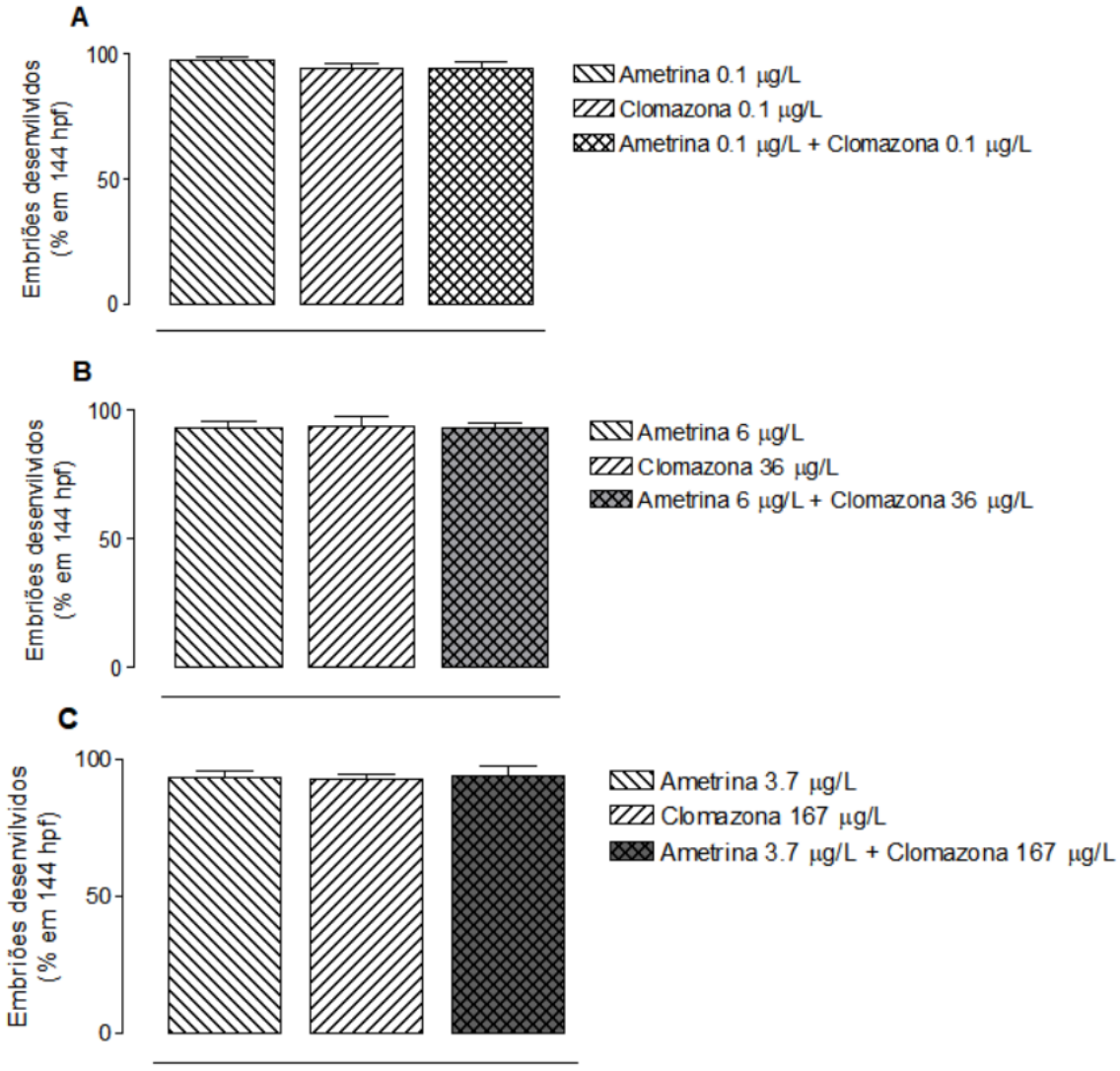
O índice de desenvolvimento pode ser calculado por meio da porcentagem de desenvolvimento dos embriões após a fecundação. O desenvolvimento dos embriões expostos às diferentes concentrações de ametrina, clomazona ou da mistura não foi afetado negativamente, pois não houve diferença significante em relação ao controle negativo, conforme demonstrado nas Figuras 17 e 18.

Figura 17 - Desenvolvimento de embriões de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina (0,1 a 60 µg/L), clomazona (0,1 a 167 µg/L) ou mistura dos dois herbicidas (0,1-0,1, 6-36, 3,7-167 µg/L) durante 144 horas pós fecundação (hpf). Os gráficos representam a média ± EPM de 6 repetições do experimento com diferentes embriões. Controle negativo = apenas água.



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 18 - Análise comparativa do desenvolvimento de embriões de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina ou clomazona e da mistura dos dois herbicidas durante 144 horas pós fecundação (hpf). (A) ametrina (0,1 µg/L), clomazona (0,1 µg/L) e mistura (0,1 µg/L de ametrina + 0,1 µg/L de clomazona); (B), ametrina (6 µg/L), clomazona (36 µg/L) e mistura (6 µg/L de ametrina + 36 µg/L de clomazona); (C) ametrina (3,7 µg/L), clomazona (167 µg/L) e mistura (3,7 µg/L de ametrina + 167 µg/L de clomazona). Os gráficos representam a média ± EPM de 6 repetições do experimento com diferentes embriões.



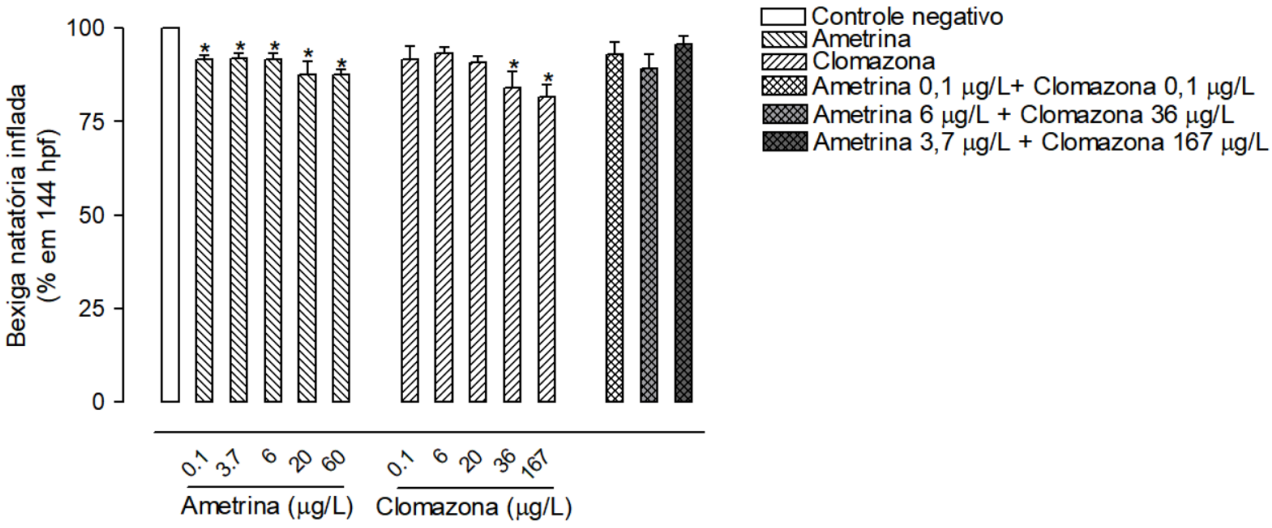
Fonte: elaborada pela autora.

3.3.1.2 Bexiga inflada

A bexiga natatória nos peixes é de fundamental importância, pois permite que realizem nado eficiente para obtenção de alimento e fuga de predadores sendo a não inflação um indício de ecotoxicidade. Ao analisar a inflação da bexiga em larvas com

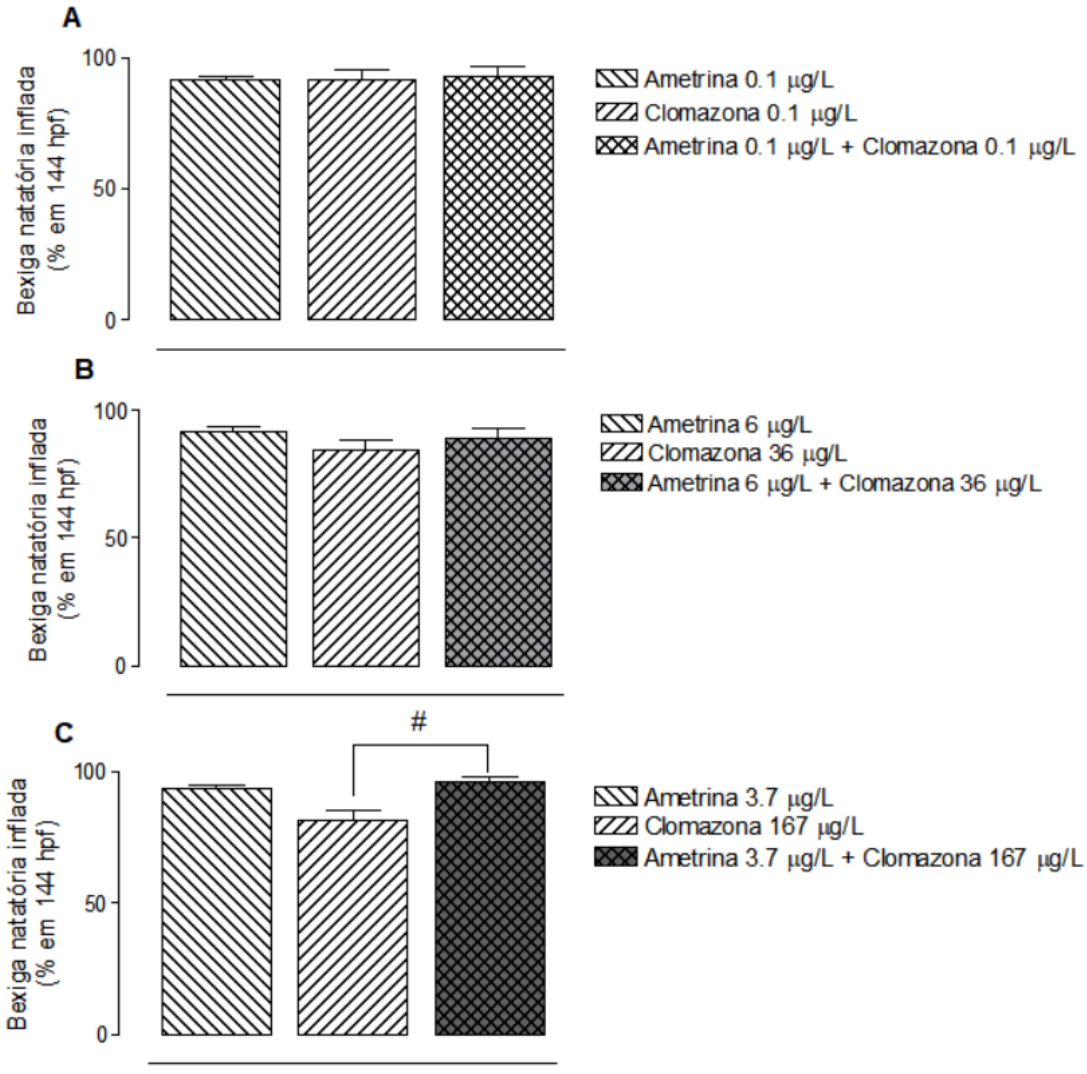
144 hpf observou-se redução significante nos embriões expostos à ametrina em todas as concentrações testadas (0,1; 3,7; 6; 20 e 60 µg/L). Efeitos semelhantes foram observados nos embriões expostos às concentrações de 36 e 167 µg/L de clomazona, enquanto a mistura dos herbicidas não afeitou este parâmetro (Figuras 19 a 23).

Figura 19 - Inflação da bexiga natatória de embriões de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina (0,1 a 60 µg/L), clomazona (0,1 a 167 µg/L) ou da mistura dos herbicidas (0,1-0,1, 6-36, 3,7-167 µg/L) durante 144 horas pós fecundação (hpf). Os gráficos representam a média ± EPM de 6 repetições do experimento com diferentes embriões. *Estatisticamente significante em relação ao controle (P < 0,05). Controle negativo = apenas água.



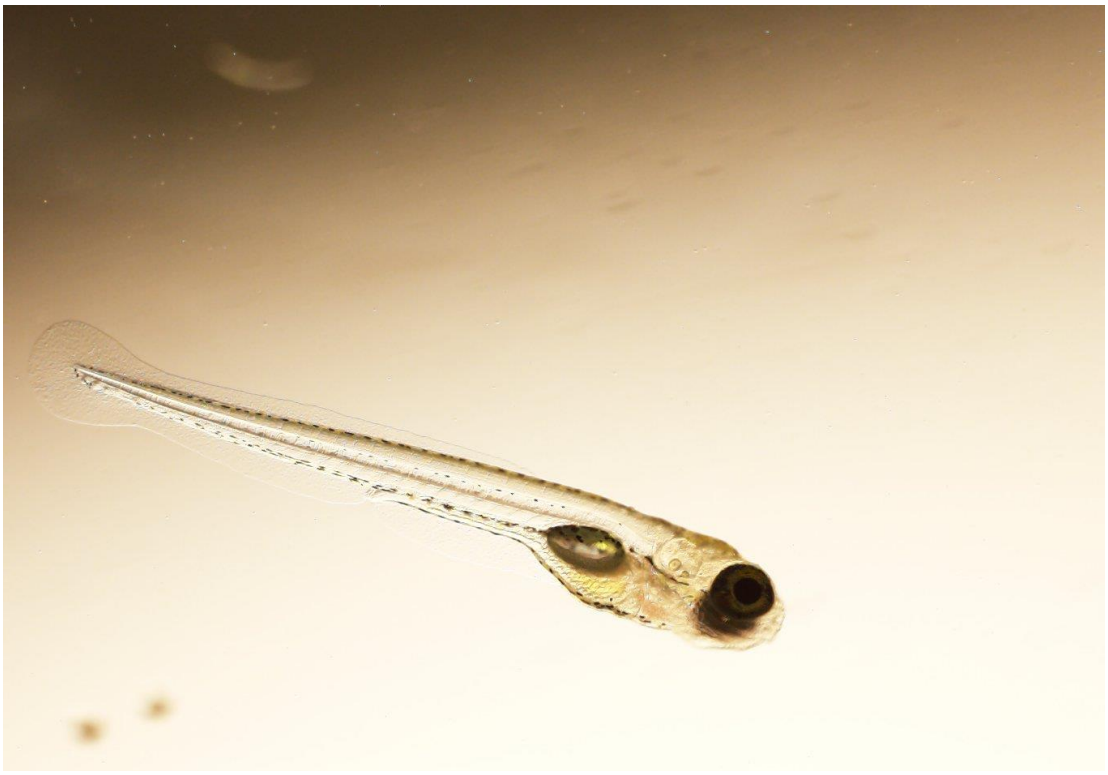
Fonte: elaborada pela autora.

Figura 20 - Análise comparativa da inflação da bexiga natatória de embriões de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina ou clomazona e da mistura dos dois herbicidas durante 144 horas pós fecundação (hpf). (A) ametrina (0,1 µg/L), clomazona (0,1 µg/L) e mistura (0,1 µg/L de ametrina + 0,1 µg/L de clomazona); (B), ametrina (6 µg/L), clomazona (36 µg/L) e mistura (6 µg/L de ametrina + 36 µg/L de clomazona); (C) ametrina (3,7 µg/L), clomazona (167 µg/L) e mistura (3,7 µg/L de ametrina + 167 µg/L de clomazona). Os gráficos representam a média ± EPM de 6 repetições do experimento com diferentes embriões. #Estatisticamente significante em relação às substâncias isoladas (P < 0,05).



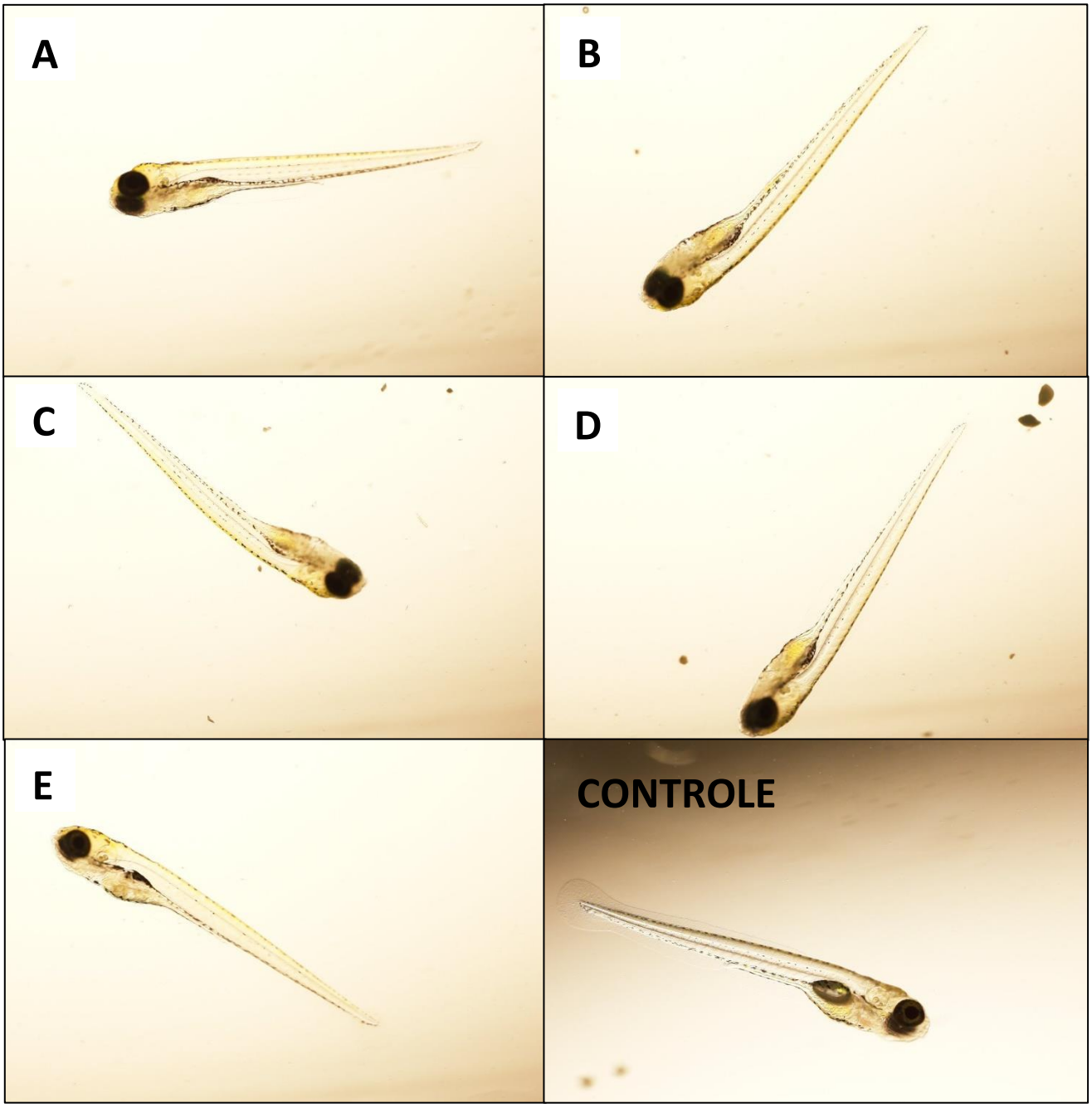
Fonte: elaborada pela autora.

Figura 21 - Microfografia com inflação da bexiga natatória no controle.



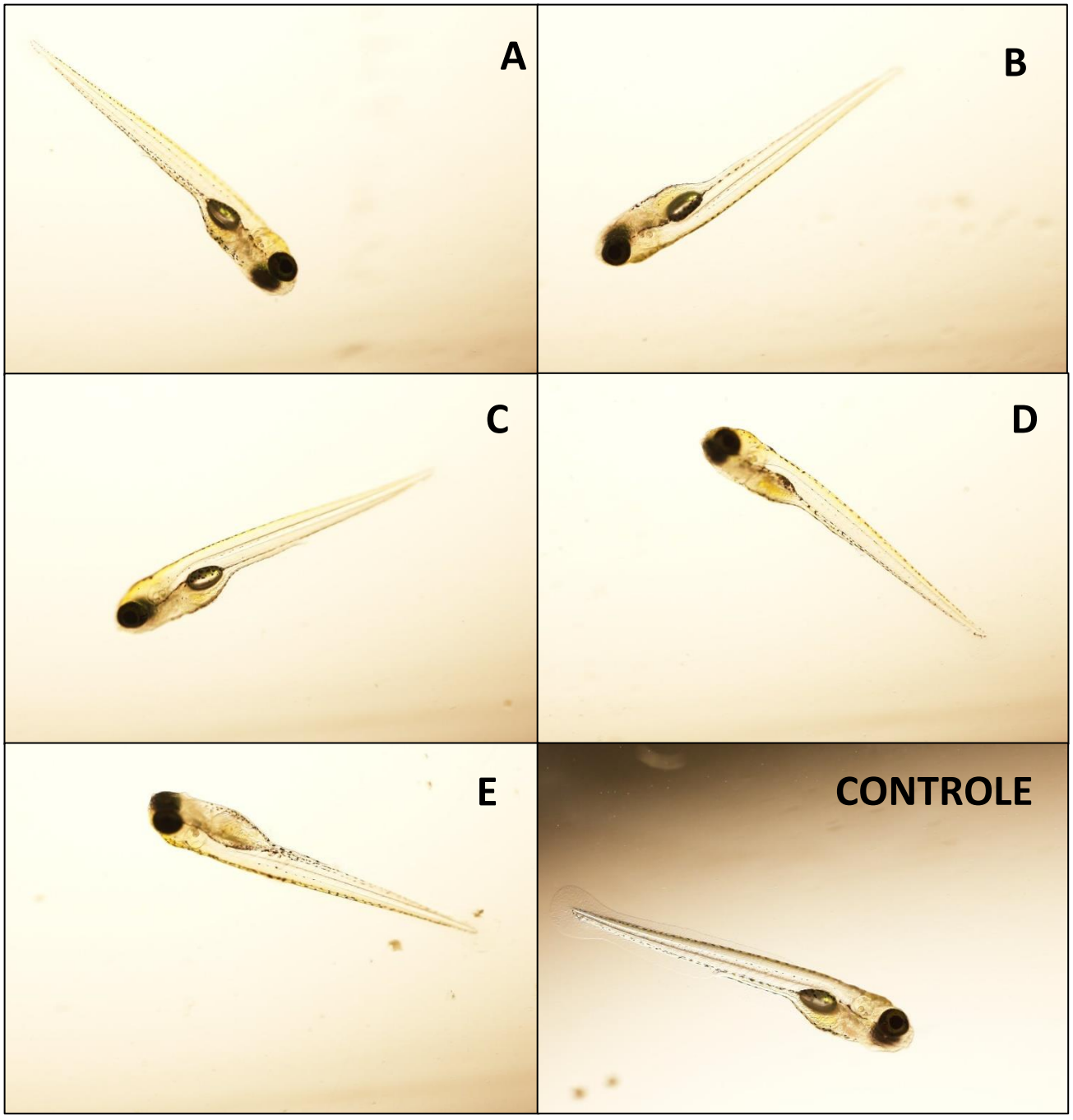
Fonte: elaborada pela autora.

Figura 22 - Microfotografia com ausência da bexiga natatória inflada nas larvas expostas a ametrina. A: 0,1 µg/L; B: 3,7 µg/L; C: 6 µg/L; D: 20 µg/L; E: 60 µg/L.



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 23 - Microfotografia com ausência da bexiga natatória inflada nas larvas expostas a clomazona 36 e 167 µg/L. A: 0,1 µg/L; B: 6 µg/L; C: 20 µg/L; D: 36 µg/L; E: 167 µg/L.

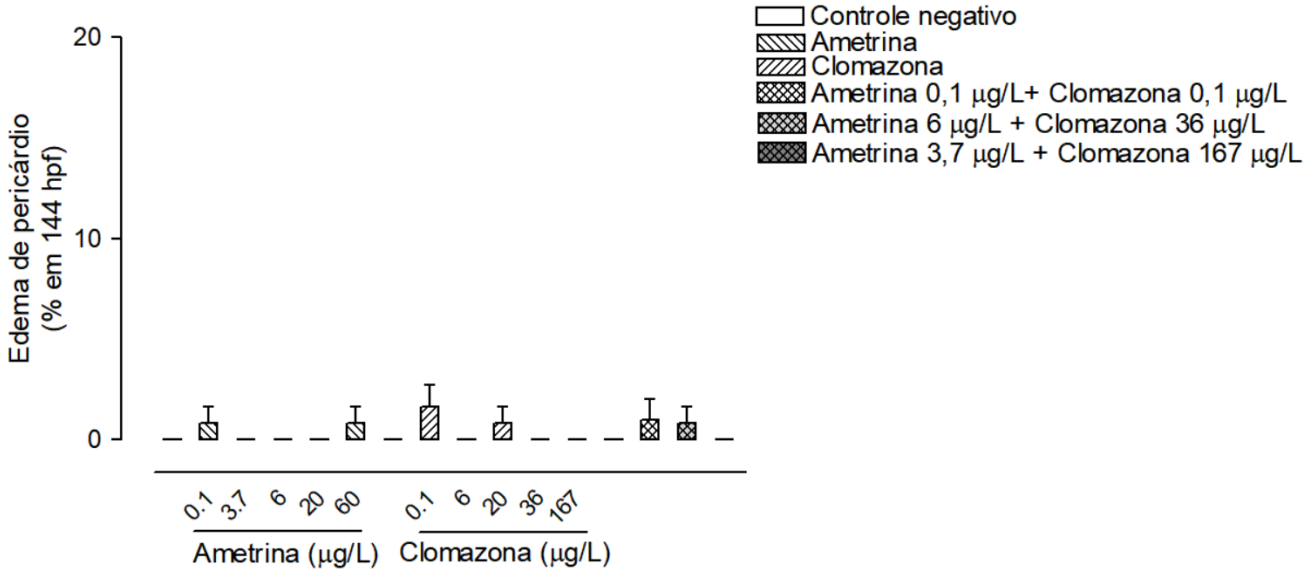


Fonte: elaborada pela autora.

3.3.1.3 Edema de pericárdio

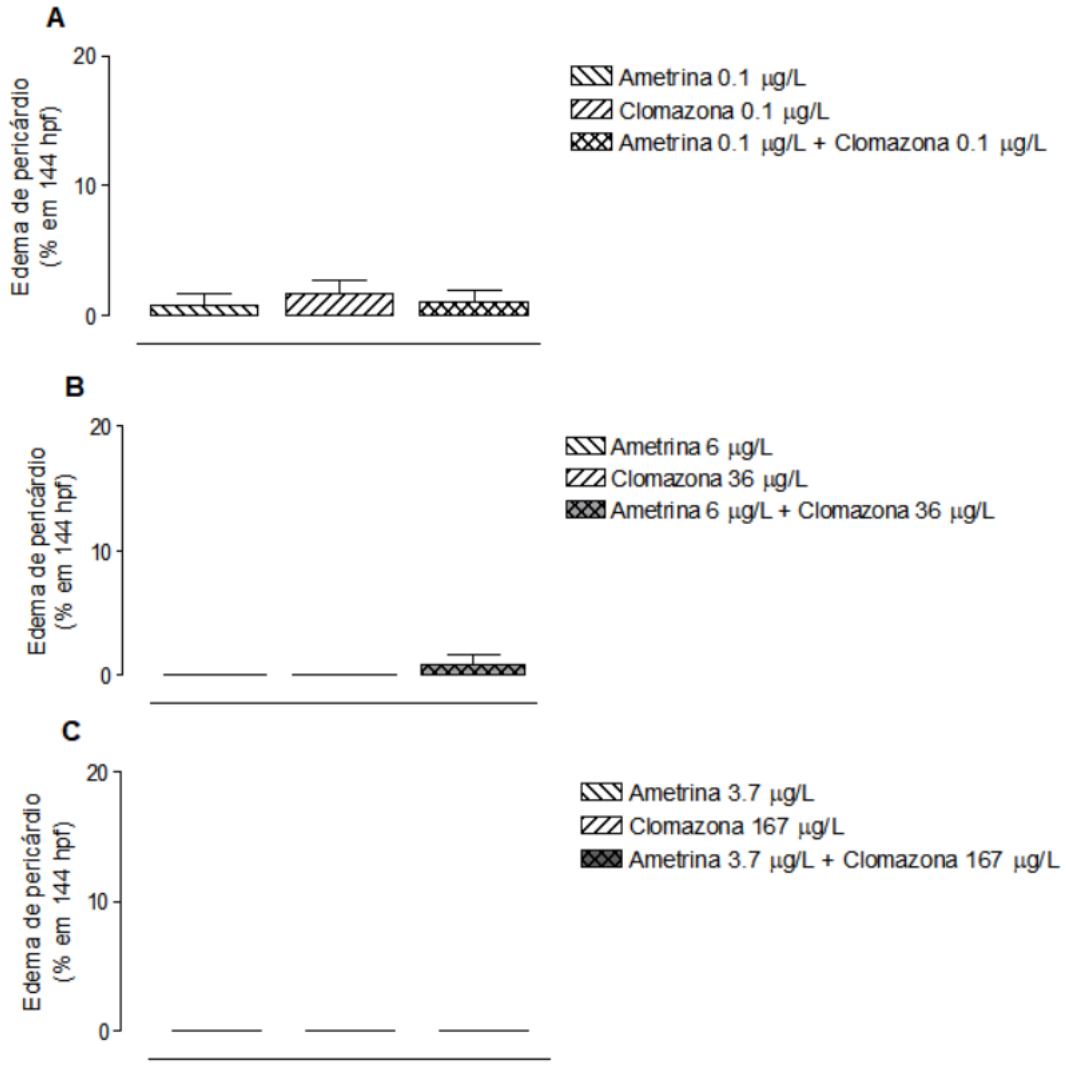
Não foi observada diferença significante na formação de edema de pericárdio nos embriões expostos à ametrina (0,1 a 60 µg/L), clomazona (0,1 a 167 µg/L) ou mistura dos herbicidas (0,1-0,1, 6-36, 3,7-167 µg/L), conforme representado nas Figuras 24 e 25.

Figura 24 - Formação de edema de pericárdio em embriões de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina (0,1 a 60 µg/L), clomazona (0,1 a 167 µg/L) ou mistura dos herbicidas (0,1-0,1, 6-36, 3,7-167 µg/L) durante 144 horas pós fecundação (hpf). Os gráficos representam a média ± EPM de 6 repetições do experimento com diferentes embriões. Controle negativo = apenas água.



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 25 - Análise comparativa da formação de edema de pericárdio em embriões de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina ou clomazona e da mistura dos dois herbicidas durante 144 horas pós fecundação (hpf). (A) ametrina (0,1 µg/L), clomazona (0,1 µg/L) e mistura (0,1 µg/L de ametrina + 0,1 µg/L de clomazona); (B), ametrina (6 µg/L), clomazona (36 µg/L) e mistura (6 µg/L de ametrina + 36 µg/L de clomazona); (C) ametrina (3,7 µg/L), clomazona (167 µg/L) e mistura (3,7 µg/L de ametrina + 167 µg/L de clomazona). Os gráficos representam a média ± EPM de 6 repetições do experimento com diferentes embriões.

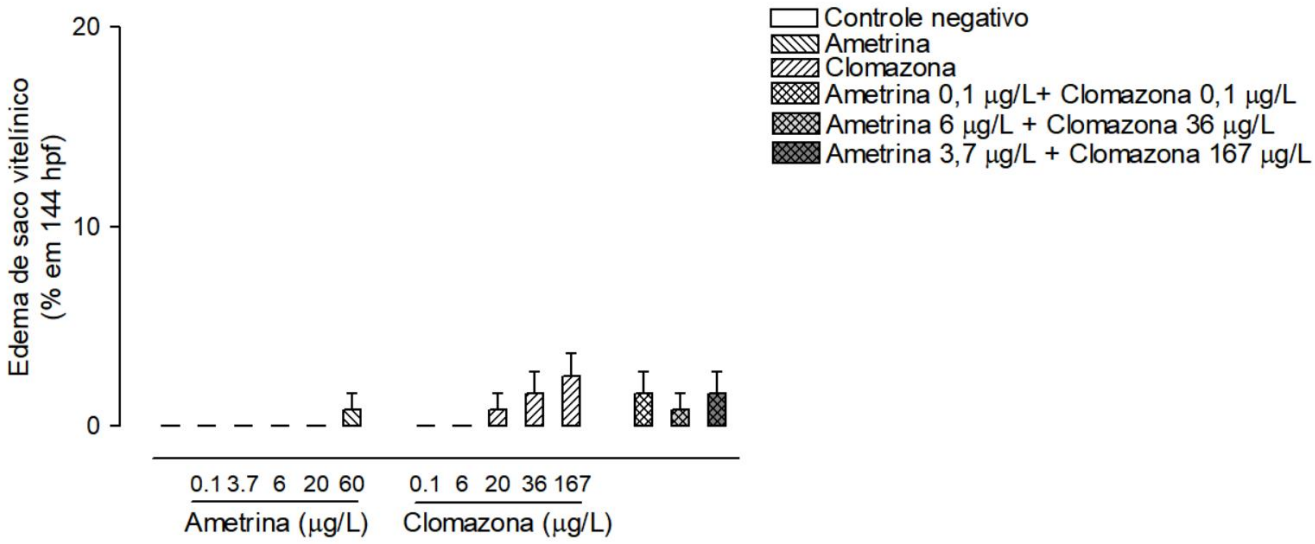


Fonte: elaborada pela autora.

3.3.1.4 Edema de saco vitelínico

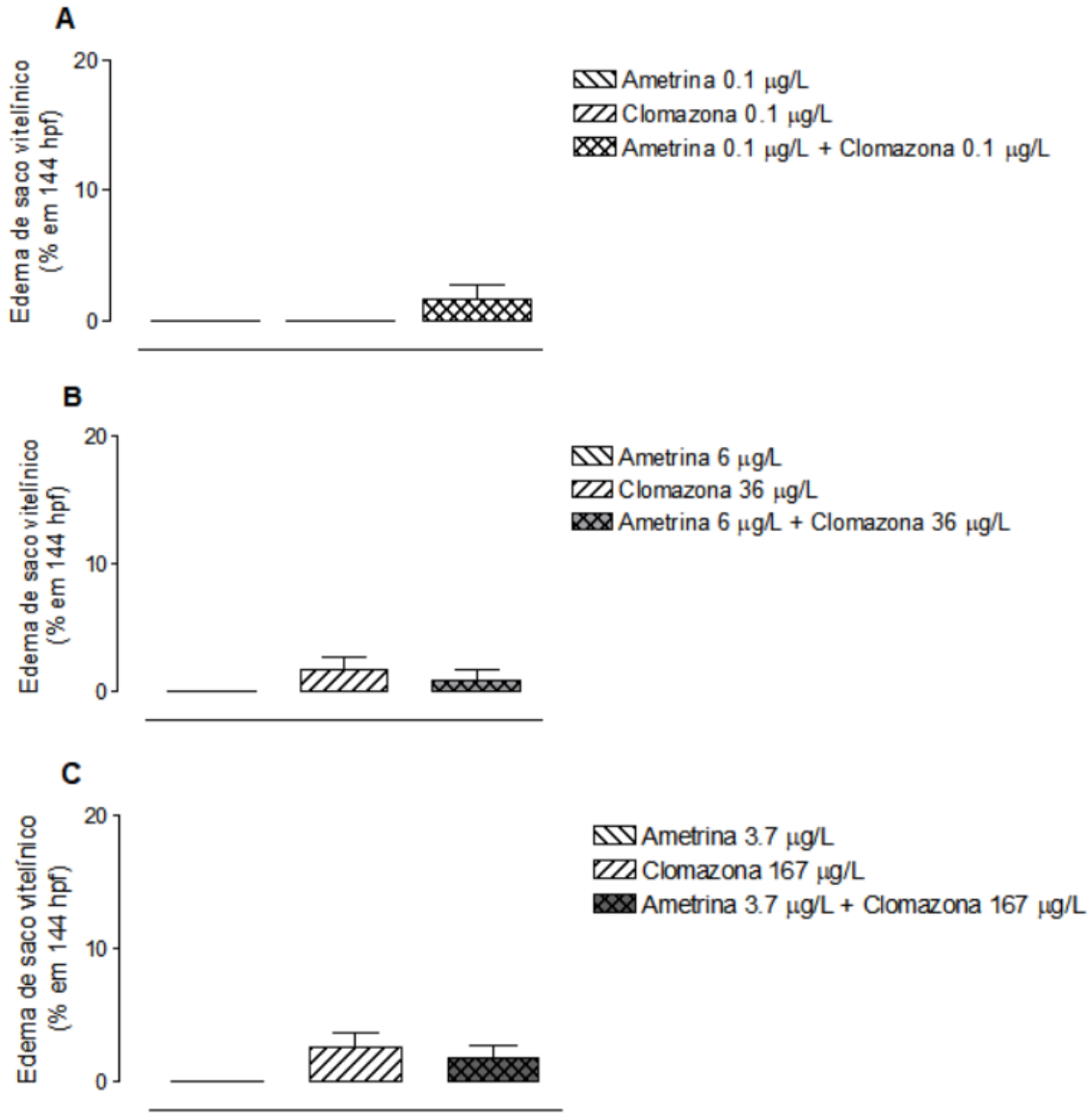
Não houve diferença significante na formação de edema de saco vitelínico nos embriões expostos à ametrina (0,1 a 60 µg/L), clomazona (0,1 a 167 µg/L) ou mistura dos herbicidas (0,1-0,1, 6-36, 3,7-167 µg/L), conforme representado nas Figuras 26 e 27.

Figura 26 - Formação de edema de saco vitelínico em embriões de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina (0,1 a 60 µg/L), clomazona (0,1 a 167 µg/L) ou mistura dos herbicidas (0,1-0,1, 6-36, 3,7-167 µg/L) durante 144 horas pós fecundação (hpf). Os gráficos representam a média ± EPM de 6 repetições do experimento com diferentes embriões. Controle negativo = apenas água.



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 27 - Análise comparativa da formação de edema de saco vitelínico em embriões de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina ou clomazona e da mistura dos dois herbicidas durante 144 horas pós fecundação (hpf). (A) ametrina (0,1 µg/L), clomazona (0,1 µg/L) e mistura (0,1 µg/L de ametrina + 0,1 µg/L de clomazona); (B), ametrina (6 µg/L), clomazona (36 µg/L) e mistura (6 µg/L de ametrina + 36 µg/L de clomazona); (C) ametrina (3,7 µg/L), clomazona (167 µg/L) e mistura (3,7 µg/L de ametrina + 167 µg/L de clomazona). Os gráficos representam a média ± EPM de 6 repetições do experimento com diferentes embriões.

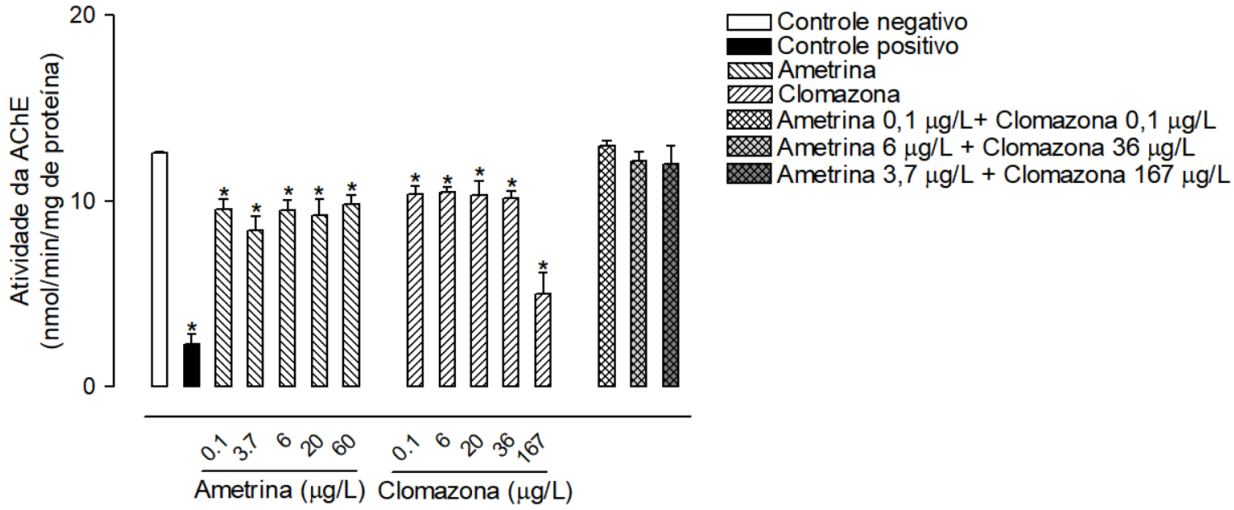


Fonte: elaborada pela autora.

3.3.2 Ensaio da atividade da acetilcolinesterase (AChE)

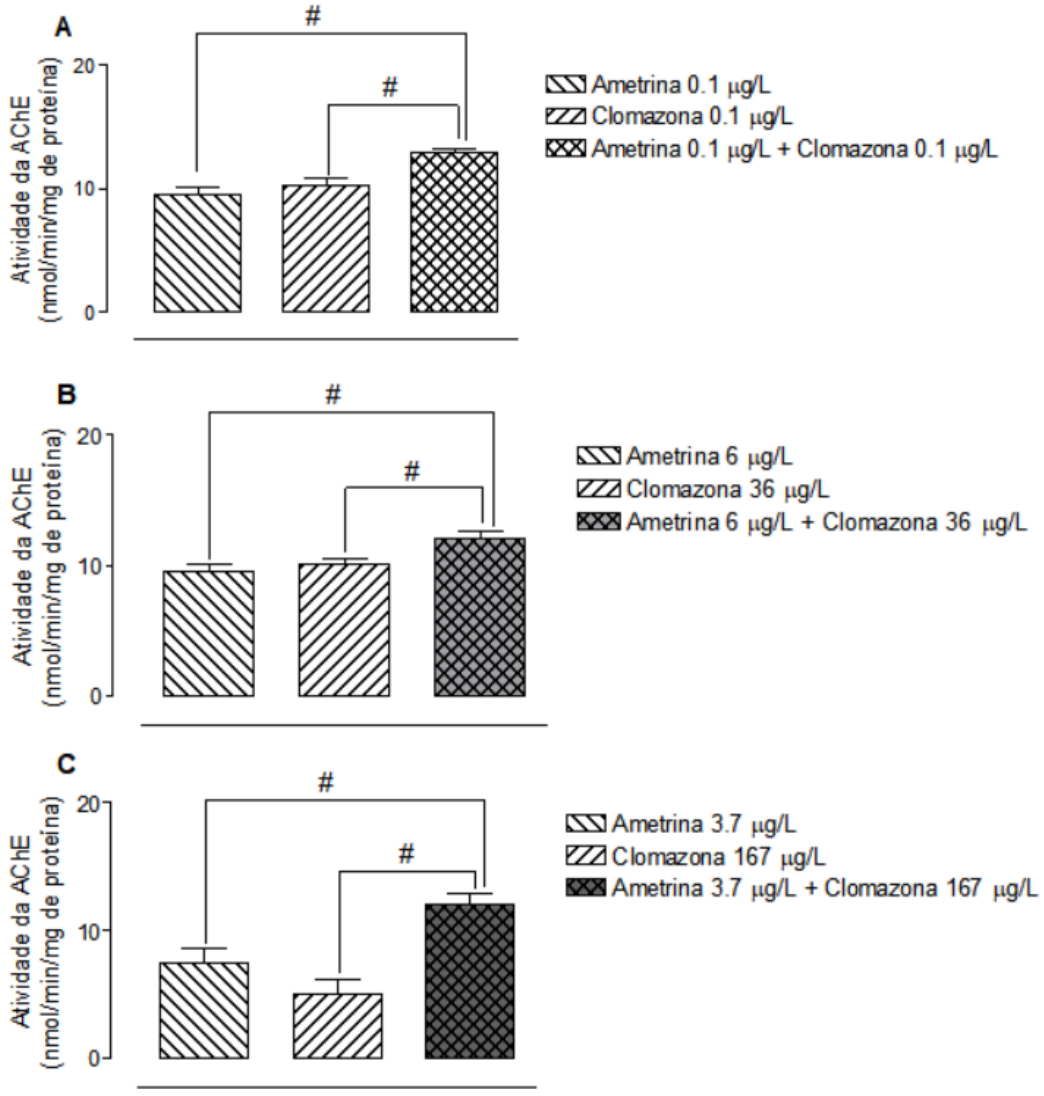
As larvas expostas a todas as concentrações de ametrina (0,1 a 60 µg/L) e clomazona (0,1 a 167 µg/L) apresentaram redução na atividade da AChE, entretanto a mistura dos herbicidas não afetou a atividade da enzima (Figuras 28 e 29).

Figura 28 - Atividade da acetilcolinesterase (AChE) em larvas de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina (0,1 a 60 µg/L), clomazona (0,1 a 167 µg/L) ou mistura dos herbicidas (0,1-0,1, 6-36, 3,7-167 µg/L) durante 96 horas pós fecundação (hpf). Os gráficos representam a média ± EPM de 5 repetições do experimento com diferentes larvas. *Estatisticamente significante em relação ao controle (P < 0,05). Controle negativo = apenas água; Controle positivo = diclorvós 50 µM.



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 29 - Análise comparativa da atividade da acetilcolinesterase em larvas de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina ou clomazona e da mistura dos dois herbicidas durante 96 horas pós fecundação (hpf). (A) ametrina (0,1 µg/L), clomazona (0,1 µg/L) e mistura (0,1 µg/L de ametrina + 0,1 µg/L de clomazona); (B), ametrina (6 µg/L), clomazona (36 µg/L) e mistura (6 µg/L de ametrina + 36 µg/L de clomazona); (C) ametrina (3,7 µg/L), clomazona (167 µg/L) e mistura (3,7 µg/L de ametrina + 167 µg/L de clomazona). Os gráficos representam a média ± EPM de 5 repetições do experimento com diferentes larvas. #Estatisticamente significante em relação às substâncias isoladas (P < 0,05).



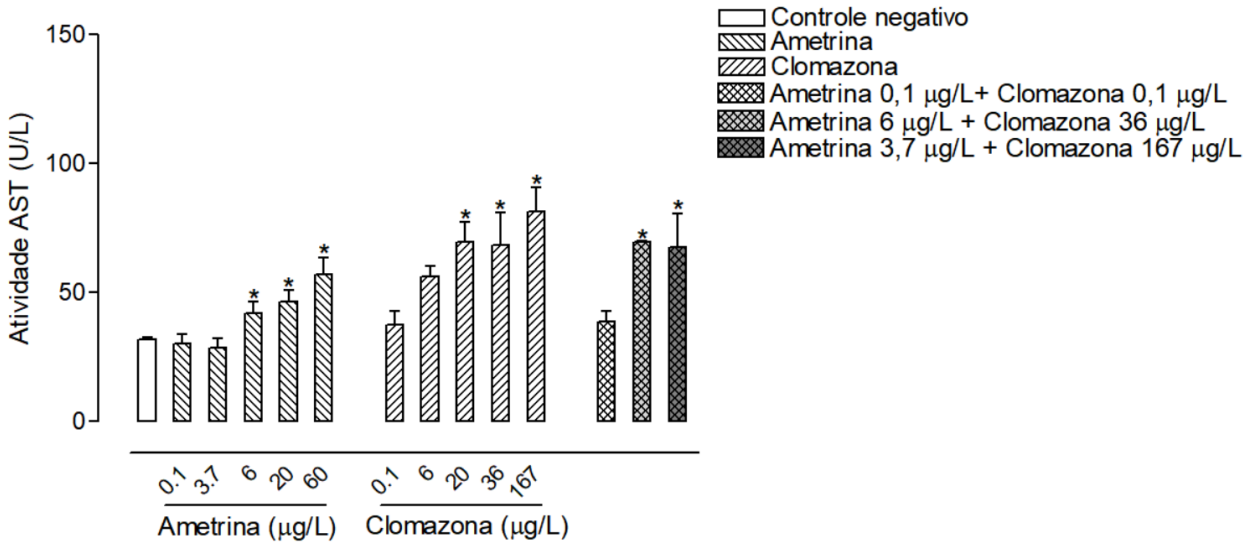
Fonte: elaborada pela autora.

3.3.3 Biomarcadores de hepatotoxicidade

3.3.3.1 Aspartato aminotransferase (AST)

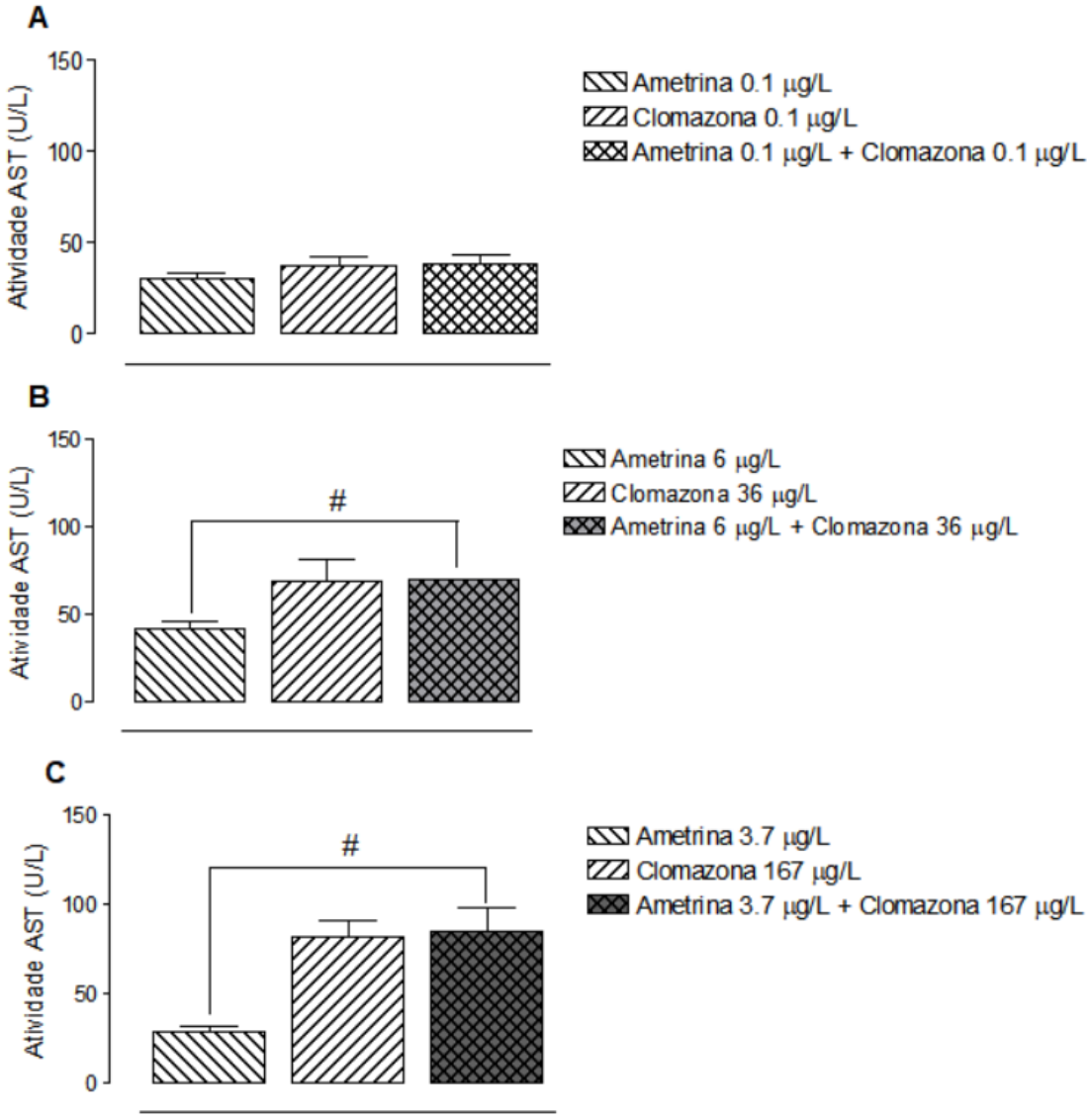
Observou-se aumento significante da atividade da AST nas larvas expostas a 6, 20 e 60 µg/L de ametrina, 20, 36 e 167 µg/L de clomazona e nas maiores concentrações da mistura (3-36 e 3,7-167 µg/L), conforme demonstrado nas Figuras 30 e 31.

Figura 30 - Atividade da aspartato aminotransferase (AST) em larvas de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina (0,1 a 60 µg/L), clomazona (0,1 a 167 µg/L) ou mistura dos herbicidas (0,1-0,1, 6-36, 3,7-167 µg/L) durante 96 horas pós fecundação (hpf). Os gráficos representam a média ± EPM de 5 repetições do experimento com diferentes larvas. *Estatisticamente significante em relação ao controle (P < 0,05). Controle negativo = apenas água.



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 31 - Análise comparativa da atividade da alanina aminotransferase (AST) em larvas de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina ou clomazona e da mistura dos dois herbicidas durante 96 horas pós fecundação (hpf). (A) ametrina (0,1 µg/L), clomazona (0,1 µg/L) e mistura (0,1 µg/L de ametrina + 0,1 µg/L de clomazona); (B), ametrina (6 µg/L), clomazona (36 µg/L) e mistura (6 µg/L de ametrina + 36 µg/L de clomazona); (C) ametrina (3,7 µg/L), clomazona (167 µg/L) e mistura (3,7 µg/L de ametrina + 167 µg/L de clomazona). Os gráficos representam a média ± EPM de 5 repetições do experimento com diferentes larvas. #Estatisticamente significante em relação às substâncias isoladas (P < 0,05).

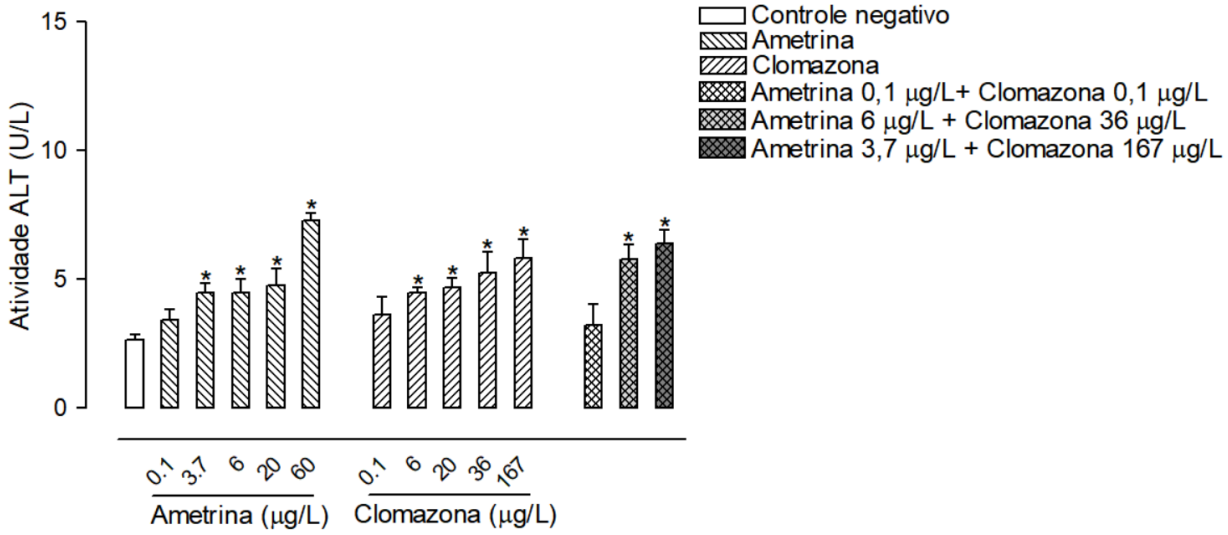


Fonte: elaborada pela autora.

3.3.3.2 Alanina aminotransferase (ALT)

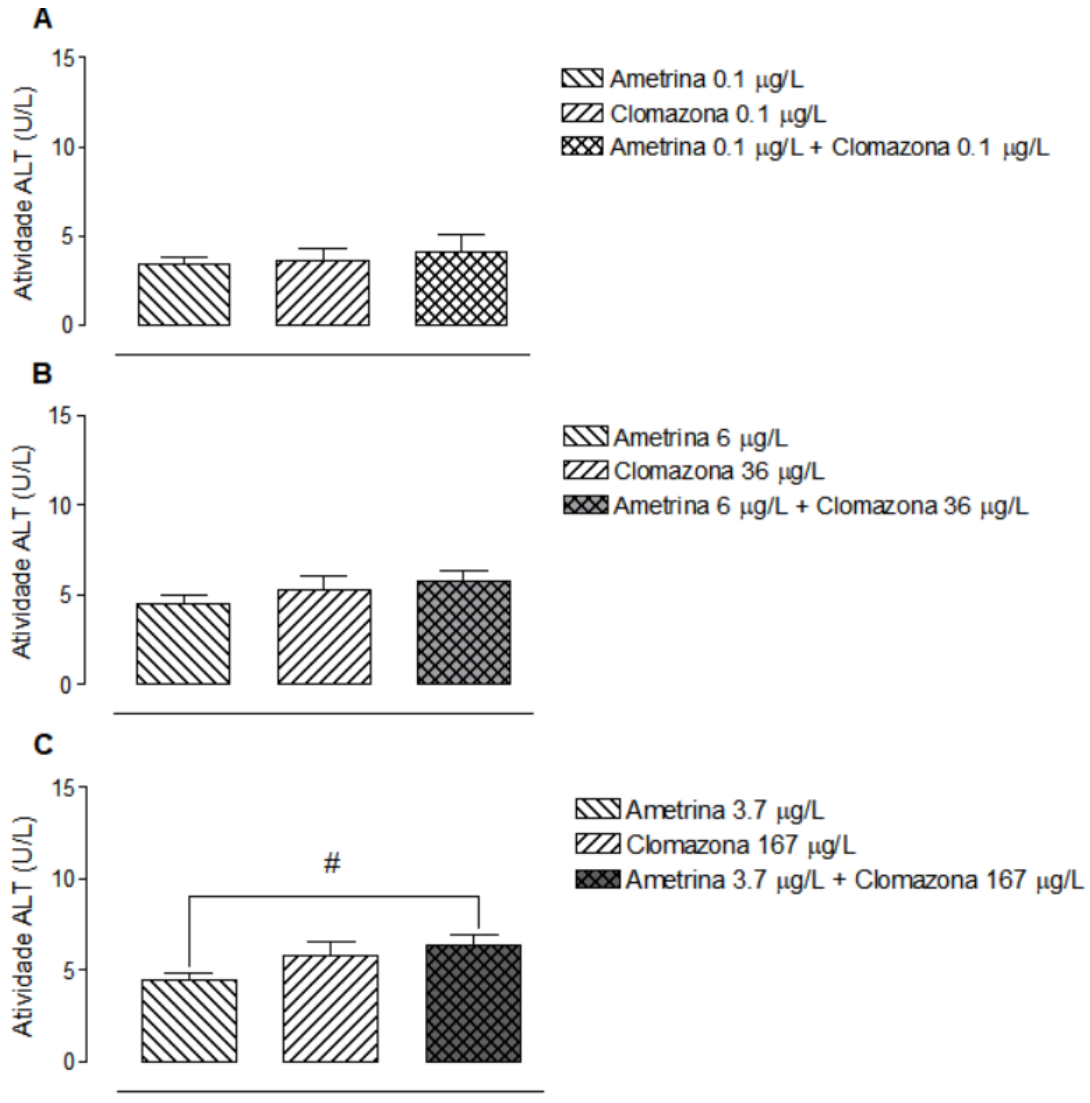
Ao avaliar os níveis de ALT nas larvas que foram expostas à ametrina, observou-se aumento significante nas concentrações de 3,7, 6, 20 e 60 µg/L. Em relação à exposição à clomazona, este aumento aconteceu nas concentrações de 20, 36 e 167 µg/L e as misturas apresentaram significância apenas nas duas maiores concentrações (3-36 e 3,7-167 µg/L), conforme demonstrado nas Figuras 32 e 33.

Figura 32 - Atividade da alanina aminotransferase (ALT) em larvas de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina (0,1 a 60 µg/L), clomazona (0,1 a 167 µg/L) ou mistura dos herbicidas (0,1-0,1, 6-36, 3,7-167 µg/L) durante 96 horas pós fecundação (hpf). Os gráficos representam a média ± EPM de 5 repetições do experimento com diferentes larvas. *Estatisticamente significante em relação ao controle (P < 0,05). Controle negativo = apenas água.



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 33 - Análise comparativa da atividade da alanina aminotransferase (ALT) em larvas de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina ou clomazona e da mistura dos dois herbicidas durante 96 horas pós fecundação (hpf). (A) ametrina (0,1 µg/L), clomazona (0,1 µg/L) e mistura (0,1 µg/L de ametrina + 0,1 µg/L de clomazona); (B), ametrina (6 µg/L), clomazona (36 µg/L) e mistura (6 µg/L de ametrina + 36 µg/L de clomazona); (C) ametrina (3,7 µg/L), clomazona (167 µg/L) e mistura (3,7 µg/L de ametrina + 167 µg/L de clomazona). Os gráficos representam a média ± EPM de 5 repetições do experimento com diferentes larvas. #Estatisticamente significante em relação às substâncias isoladas (P < 0,05).

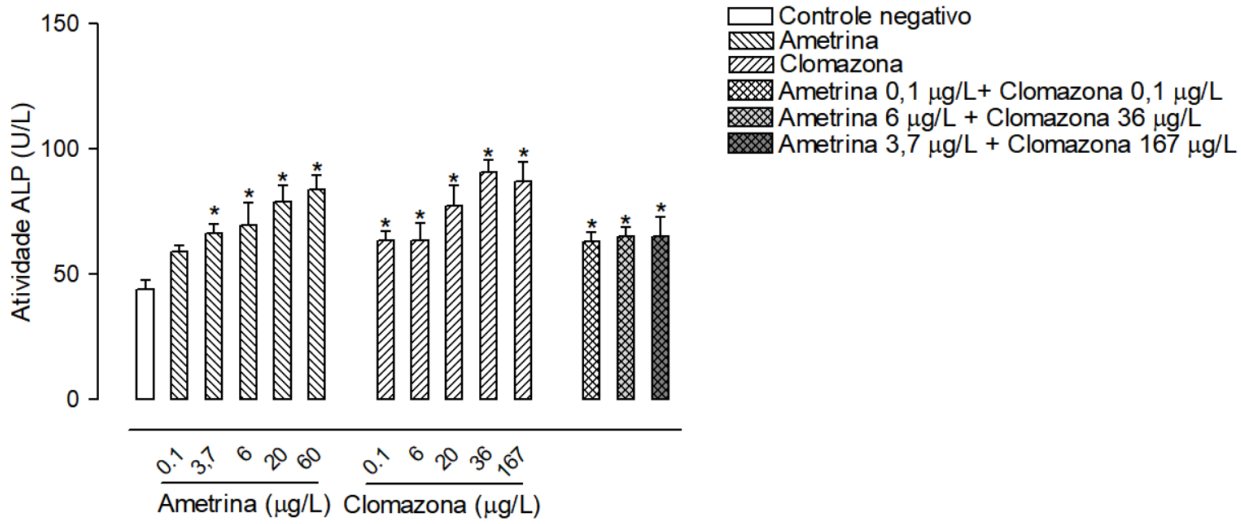


Fonte: elaborada pela autora.

3.3.3.3 Fosfatase alcalina (ALP)

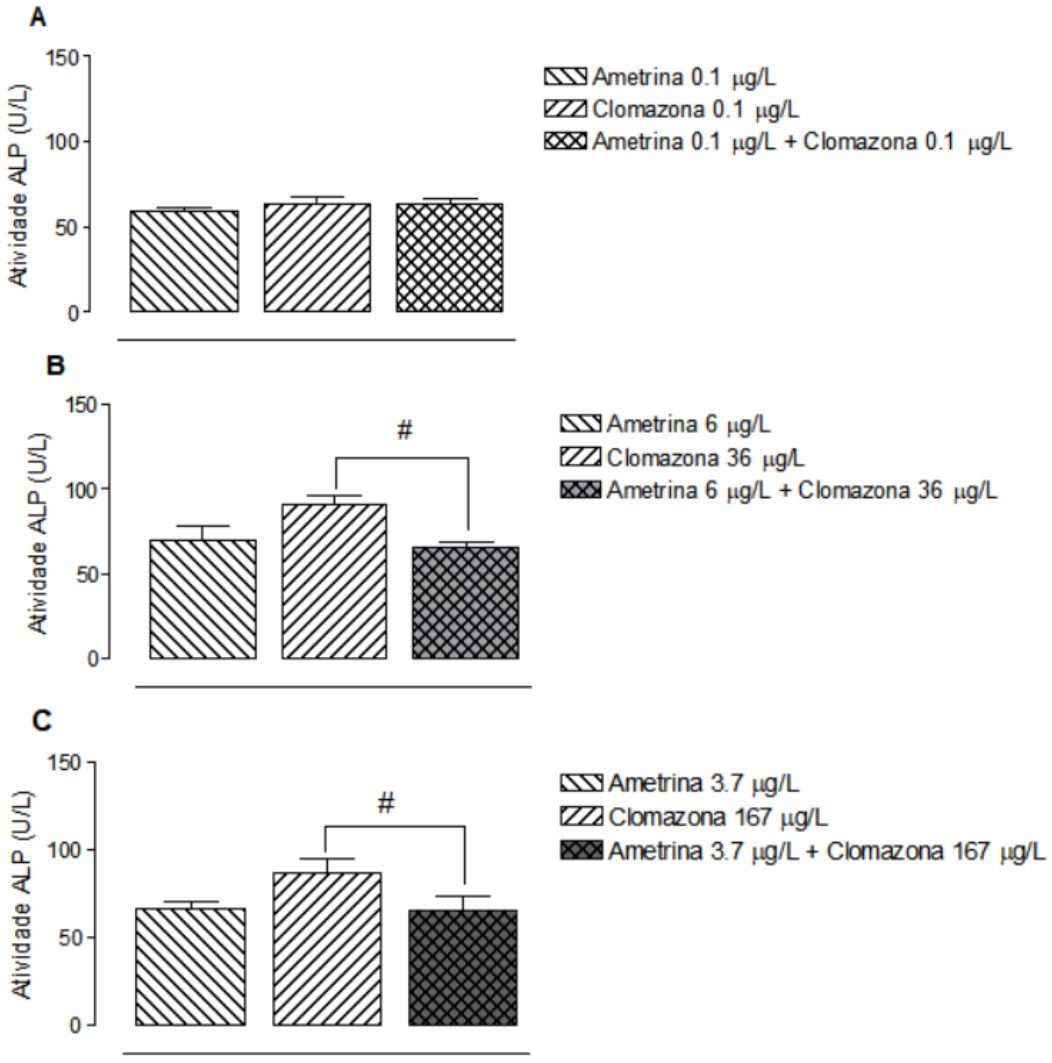
Houve aumento significante na atividade da ALP nas larvas expostas à ametrina a partir de 3,7 µg/L, enquanto a exposição à clomazona e à mistura dos dois herbicidas aumentou a atividade da enzima em todas as concentrações testadas (Figuras 34 e 35).

Figura 34 - Atividade da fosfatase alcalina (ALP) em larvas de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina (0,1 a 60 µg/L), clomazona (0,1 a 167 µg/L) ou mistura dos herbicidas (0,1-0,1, 6-36, 3,7-167 µg/L) durante 96 horas pós fecundação (hpf). Os gráficos representam a média ± EPM de 5 repetições do experimento com diferentes larvas. *Estatisticamente significante em relação ao controle (P < 0,05). Controle negativo = apenas água.



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 35 - Análise comparativa da atividade da fosfatase alcalina (ALP em larvas de zebrafish após exposição a diferentes concentrações de ametrina ou clomazona e da mistura dos dois herbicidas durante 96 horas pós fecundação (hpf). (A) ametrina (0,1 µg/L), clomazona (0,1 µg/L) e mistura (0,1 µg/L de ametrina + 0,1 µg/L de clomazona); (B), ametrina (6 µg/L), clomazona (36 µg/L) e mistura (6 µg/L de ametrina + 36 µg/L de clomazona); (C) ametrina (3,7 µg/L), clomazona (167 µg/L) e mistura (3,7 µg/L de ametrina + 167 µg/L de clomazona). Os gráficos representam a média ± EPM de 5 repetições do experimento com diferentes larvas. #Estatisticamente significante em relação às substâncias isoladas (P < 0,05).



Fonte: elaborada pela autora.

3.4 DISCUSSÃO

Os praguicidas são um grupo de compostos químicos utilizado para prevenir, controlar ou acabar com a presença de pragas em lavouras e animais. Entre os praguicidas estão os herbicidas, cujo uso não se restringe apenas a grandes produções, mas também são aplicados em hortas caseiras e áreas residências para plantas daninhas (Konig *et al.,* 2023). Os impactos do uso de praguicidas nos ecossistemas aquáticos têm recebido ampla atenção nos últimos anos, principalmente pelo fato de apresentarem efeitos adversos nos organismos induzindo má formação, retardo no crescimento e desenvolvimento, estresse oxidativo, alterações no sistema endócrino, redução na reprodução e viabilidade dos embriões afetando gravemente a população aquática (Cui *et al.,* 2023).

Neste contexto, investigamos os efeitos da AMT, CLZ e da mistura dos herbicidas sobre os parâmetros relacionados ao desenvolvimento de embriões de zebrafish expostos por 96 ou 144 hpf, visando contribuir para a identificação dos mecanismos subjacentes à embriotoxicidade desencadeada por estes herbicidas e para elucidar o possível sinergismo ou antagonismo exercido pela exposição simultânea.

O teste de toxicidade aguda em embriões (FET) tem grande potencial para compreensão de como substâncias químicas afetam o desenvolvimento de peixes, seguindo as diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), é possível utilizar ovos recentemente fertilizados para exposição a diferentes concentrações dos compostos que se deseja estudar (Xiong *et al.,* 2023). Aplicando as recomendações da OCDE, os ovos fecundados e em boa qualidade de desenvolvimento foram utilizados para realização do FET test e ao observar o desenvolvimento diariamente até 144 hpf observamos alterações importantes em relação a diminuição da presença da bexiga natatória inflada em todas as concentrações de ametrina (0,1 a 60 µg/L) e nas maiores concentrações de clomazona (36 e 167 µg/L), mas a mistura dos dois herbicidas não afetou a inflação. Os resultados mostram que em relação ao desenvolvimento dos embriões este é o principal efeito tóxico da exposição a AMT e CLZ, considerando que inflação completa deveria acontecer até 120 hpf e que a flutuação exercida pela bexiga natatória é essencial para o movimento e predação das larvas tornando mais susceptível ao ataque de predadores e menos ágil para procura de alimentos gerando deficiência

nutricional (Tao *et al.,* 2023). Os parâmetros relacionados a coagulação, formação de edema de pericárdio e saco vitelínico não apresentaram diferença significativa.

Stevanovic *et al.* (2017) caracterizaram a embriotoxicidade da CLZ e duas formulações diferentes, os ovos recém fecundados foram expostos ao ingrediente técnico nas concentrações de 3,4; 6,7; 13,4; 26,8; 53,5 e 107 mg/L sendo a concentração letal mediana (CL50) dos embriões 61,5 mg/L. Os autores descreveram que a exposição durante 120 hpf induziu a formação de edemas, deformação da coluna, deformação craniofacial, ausência de bexiga natatória, deformação da cauda e redução no comprimento.

Apesar nas concentrações utilizadas neste estudo serem menores do que as exposições feitas por Stevanovic *et al.* (2017), nossos resultados demonstram uma tendencia relevante de aumento da toxicidade em relação ao aumento da concentração pois até em ug/L houve formação de edemas e coagulação mesmo os valores não sendo significantes. O fato mais preocupante é em relação a inflação da bexiga natatória pois a partir da concentração de 36 µg/L a redução foi significativa indicando que a incapacidade de locomoção adequada gerada pela ausência da bexiga natatória pode ser a chave para morte das larvas a longo prazo, pois afeta a capacidade de obtenção de nutrientes exógenos (Tao *et al.,* 2023).

Daam *et al*. (2019) avaliaram a toxicidade letal mediana da AMT para larvas de duas espécies de rãs tropicais (*Physalaemus cuvieri* e *Hypsiboas pardalis*), os bioensaios agudos foram realizados durante 96 h para identificar a sensibilidade da exposição as concentrações de 10, 13, 13, 20 e 25 mg/L. Para *Physalaemus cuvieri* houve mortalidade significativa em todas as concentrações sendo 10 mg/L apenas 15% e 25 mg/L próximo de 100% e ao mudar o organismo teste para *Hypsiboas pardalis* a mortalidade foi acima de 90% em todas as concentrações de AMT.

Nossos resultados da exposição aos embriões de zebrafish indicam alto potencial de embriotoxicidade da AMT, apesar dos parâmetros de formação de edemas e coagulação não terem sido significativos, a ausência da bexiga natatória foi significativa desde a menor concentração de AMT (0,1 µg/L) se mantendo nas concentrações maiores (3,7; 6; 20 e 60 µg/L). Nossa faixa de estudo não induziu mortalidade significativa durante exposição de 144 hpf, mas o fato de não ter sido inflada a bexiga natatória indica um risco ecológico para os organismos que entram em contrato com pequenas quantidades de AMT.

Além do FET, é comum a utilização de biomarcadores para avaliar a atividade de enzimas importantes para o organismo e identificar possíveis danos enzimáticos induzidos pela presença de substâncias exógenas. As funções neurais e hepáticas costumam ser as mais afetadas pelos praguicidas sendo o monitoramento da atividade da AChE, AST, ALT e ALP parâmetros confiáveis para avaliação da toxicidade.

A AChE é moduladora do neurotransmissor acetilcolina nos tecidos cerebrais e é um importante biomarcador sendo sua atividade suprimida pela presença de substâncias neurotóxicas (Abraham *et al.,* 2024). A atividade cerebral das larvas foi reduzida de maneira significante em todas as concentrações de AMT (0,1 a 60 µg/L) e CLZ (0,1 a 167 µg/L), sendo a redução mais evidente na maior concentração.

Análises semelhantes foram realizadas por outros autores utilizando modelos experimentais diferentes, Pereira (2012) avaliou alterações neurais em jovens *Prochilodus lineatus*, popularmente conhecido como Curimbatá, expostos por 96h ao produto comercial Gamit (formulado com CLZ) nas concentrações de 1, 5 e 10 mg/L, ao final do experimento o tecido cerebral dos peixes apresentou redução na atividade da AChE nas duas maiores concentrações. Miron *et al.* (2005) utilizaram alevinos do bagre prateado (*Rhamdia quelen*) para avaliar a atividade de AChE depois da exposição a 5, 10 e 20 mg/L de CLZ, após 96h houve redução significativa em todas as concentrações testadas sendo inibição enzimática de 63 a 83% indicando que a CLZ é um potente inibidor da AChE. Nossos resultados estão de acordo com os encontrados na literatura, os organismos aquáticos são os mais susceptíveis ao contato direto com resíduos de clomazona e observamos que até mesmo concentrações de µg/L são capazes de gerar neurotoxicidade.

Pereira (2012) também utilizou AMT pura e o produto comercial Gesapax para identificar alterações induzidas em jovens *Prochilodus lineatus*, as exposições foram feitas durante 96h nas concentrações de 2,5 e 5 mg/L mas diferente dos nossos resultados não houve diferença significativa em relação ao controle.

O fígado é o primeiro órgão que entra em contato com substâncias exógenas e as atividades enzimáticas hepáticas são sensíveis a toxicidade química tornando um indicador confiável de estresse oxidativo (Ramesh *et al.,* 2020). Devido à sua função de biotransformação de compostos químicos e por ser um órgão-alvo em avaliações toxicológicas, Crestani *et al.* (2007) investigou efeitos da CLZ em juvenis de *Rhamdia quelen* (bagre prateado) usando parâmetros bioquímicos após exposição dos animais

a 0,5 e 1 mg/L por 96h resultou na supressão da enzima catalase e aumento nos níveis de radicais livres indicando estresse oxidativo severo capaz de causar danos oxidativos e redução nos mecanismos compensatórios. Nossos resultados corroboram a hipótese de que o fígado é um órgão-alvo da toxicidade da CLZ, pois ao quantificar as enzimas hepáticas observamos aumento da atividade da AST a partir de 20 µg/L, da ALT nas exposições de 20, 36 e 167 µg/L e da ALP em todas as concentrações, indicando lesão hepática nas larvas que ficaram expostas 96 hpf pois essas são enzimas intracelulares.

Considerando os danos hepáticos induzidos pela AMT, houve aumento significativo na atividade da AST nas concentrações de 6, 20 e 60 µg/L, e nas atividades da ALT e ALP na faixa entre 3,7 e 60 µg/L feitas durante 96 hpf.

A falta de informações toxicológicas abrangentes sobre misturas cria uma lacuna no conhecimento sobre como as substâncias realmente afetam os organismos, este é o primeiro trabalho que avalia AMT e CLZ de forma combinada comparando com os herbicidas isolados. Nossos resultados indicam que a associação causa antagonismo em relação a toxicidade exercida pelos compostos isolados, as larvas expostas as combinações de 0,1 µg/L de AMT + 0,1 µg/L de CLZ, 6 µg/L de AMT + 36 µg/L de CLZ e 3,7 µg/L de AMT + 167 µg/L de CLZ não afetou nenhum dos parâmetros avaliados no FET test (coagulação, edemas e inflação da bexiga natatória) em relação ao controle. Analisando o parâmetro de inflação da bexiga natatória, em comparação com as concentrações isoladas houve antagonismo na última combinação (3,7-167 µg/L) em relação a toxicidade da CLZ 167.

Comparando as misturas com suas respectivas concentrações de AMT e CLZ isoladas, observamos antagonismo em relação a neurotoxicidade pois a atividade da AChE se manteve semelhante com o controle, indicando redução da capacidade das substâncias afetarem a atividade enzimática pois as exposições individuais apresentaram redução significativa. Antagonismo também foi observado ao avaliar a atividade da ALP, pois em relação a CLZ 36 e 167 µg/L isoladas, a mistura com AMT reduziu os danos hepáticos.

Apesar de demonstrar padrão de antagonismo, a atividade das enzimas AST e ALT nas larvas expostas as misturas apresentaram sinergismos em relação às alterações induzidas pela AMT isolada. Para AST, a combinação de 3,7 e 6 µg/L de AMT com CLZ aumentou a atividade enzimática indicando maior dano hepático considerando que essa enzima em estado normal está localizada intracelular. Quando

analisada a atividade da ALT, houve aumento significante quando foi usada a mistura de 3,7 µg/L de AMT com 167 µg/L de CLZ.

3.5 CONCLUSÃO

Os herbicidas AMT e CLZ afetam o desenvolvimento de embriões de zebrafish induzindo ausência da bexiga natatória na fase larval e alterações enzimáticas importantes relacionadas a danos neurais e hepáticos.

A associação dos dois herbicidas causa antagonismo, amenizando os efeitos de embrio e neurotoxicidade, mas induz sinergismo em relação aos efeitos danosos sobre a função hepática.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, T. J.; SINGHA, J.; BARDHAN, A.; KARMAKAR, S.; RAJISHA, R.; PANDA, S. K.; PATIL, P. K. In-feed antiparasitic veterinary drug emamectin benzoate impairs acetylcholinesterase activity and brain tissue histoarchitecture of Oreochromis niloticus fry. **Emerging Animal Species**, *[S.l.],* v. 10, p. 100042, 2024.

ACOMINI, A. E.; CAMARGO, P. B.; AVELAR, W. E. P.; BONATO, P. S. Determination of ametryn in river water, river sediment and bivalve mussels by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, *[S.l.],* v. 20, n. 1, p. 107-116, 2009.

BRUM, A.; DOTTA, G.; ROUMBEDAKIS, K.; GONÇALVES, E. L. T.; GARCIA, L.P.; GARCIA, P.; SCUSSEL, V. M.; MARTINS, M. L. Hematological and histopathological changes in silver catfishRhamdia quelen(Siluriformes) exposed to clomazone herbicide in the Madre River, Santa Catarina State, Southern Brazil. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, *[S.l.],* v. 49, n. 3, p. 169-175, 31 2013.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado do São Paulo. **DIAGNÓSTICO DA CONTAMINAÇÃO DE ÁGUAS SUPERFICIAIS, SUBTERRÂNEAS E SEDIMENTOS POR AGROTÓXICOS**. São Paulo: 2019. [s. n], 152 p.

CORREIA, N. M.; CARBONARI, C. A.; VELINI, E. D. Detection of herbicides in water bodies of the Samambaia River sub-basin in the Federal District and eastern Goiás. **Journal Of Environmental Science and Health, Part B**, *[S.l.],* v. 55, n. 6, p. 574-582, 2020.

CRESTANI, M.; MENEZES, C.; GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; SPANEVELLO, R.; SILVEIRA, A.; GONÇALVES, F. F.; ZANELLA, R.; LORO, V. L. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (Rhamdia quelen) and recovery pattern. **Chemosphere**, *[S.l.],* v. 67, n. 11, p. 2305-2311, 2007.

CUI, J.; TIAN, S.; GU, Y.; WU, X.; WANG, L.; WANG, J.; CHEN, X.; MENG, Z. Toxicity effects of pesticides based on zebrafish (Danio rerio) models: advances and perspectives. **Chemosphere,** *[S.l.]*, v. 340, p. 139825, 2023.

DAAM, M. A.; MOUTINHO, M. F.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; SCHIESARI, L. Lethal toxicity of the herbicides acetochlor, ametryn, glyphosate and metribuzin to tropical frog larvae. **Ecotoxicology***, [S.l.],* v. 28, n. 6, p. 707-715, 2019.

FAGUNDES, M. Z.; GONÇALVES, M. A.; SOARES, M. P.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R.; RIET-CORREA, F.; ANJOS, B. L. Clinicopathological and toxicological aspects of poisoning by the clomazone herbicide in sheep. **Small Ruminant Research**, *[S.l.],* v. 124, p. 120-126, 2015.

FIO CRUZ - Fundação Osvaldo Cruz. ROSA, Ana Cristina Simões; GURGEL, Aline do Monte; FRIEDRICH., Karen. **Presença de agrotóxicos em água potável no Brasil: Parecer técnico do GT de Agrotóxicos da Fiocruz para a Revisão do Anexo XX da Portaria de Consolidação nº 05, de 28 de setembro de 2017 do Ministério da Saúde, para o parâmetro "agrotóxicos"**. Rio de Janeiro: 2020. *[s. n].*

FUKUSHIMA, H.; BAILONE, R. L.; BAUMGARTNER, I.; BORRA, R. C.; CORREA, T.; AGUIAR, L. K.; JANKE, H.; ROÇA, R.; SETTI, P. G. Potenciais usos do modelo animal Zebrafish Danio rerio em pesquisas na Medicina Veterinária. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do Crmv-Sp,** [*S.l.*], v. 18, n. 1, jun. 2020.

JACOMINI, A. E.; CAMARGO, P. B.; AVELAR, W. E. P.; BONATO, P. S. Determination of ametryn in river water, river sediment and bivalve mussels by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society,** [*S.l.*], v. 20, p. 107-116, 2009.

JUNIOR, E. C. A.; RODRIGUES, H. O. S. Ametrina em corpos hídricos da bacia do botafogo, litoral norte de Pernambuco. **Revista de Biotecnologia & Ciência**, Ipameri, v. 10, n. 2, p. 54-60, 2021.

KONANTZ, M.; SCHÜRCH, C.; HANNS, P.; MÜLLER, J. S.; SAUTEUR, L.; LENGERKE, C. Modeling hematopoietic disorders in zebrafish. **Disease Models & Mechanisms**, [*S.l.*], v. 12, n. 9, p. 1, 2019.

KONIG, I.; IFTIKHAR, N.; HENRY, E.; ENGLISH, C.; IVANTSOVA, E.; SOUDERS, C. L.; MARCUSSI, S.; MARTYNIUK, C. J. Toxicity assessment of carvacrol and its acetylated derivative in early staged zebrafish (Danio rerio): safer alternatives to fipronil-based pesticides?. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [*S.l.*], v. 274, p. 109762, 2023.

MACHADO, C.S.; ALVES, R. I. S.; FREGONESI, B. M.; TONANI, K. A. A.; MARTINIS, B. S.; SIERRA, J.; NADAL, M.; DOMINGO, J. L.; SEGURA-MUÑOZ, S. Chemical Contamination of Water and Sediments in the Pardo River, São Paulo, Brazil**. Procedia Engineering**, [*S.l.*], v. 162, p. 230-237, 2016.

MIRON, D. S.; CRESTANI, M.; SHETTINGER, M. R.; MORSCH, V. M.; BALDISSEROTTO, B.; TIERNO, M. A.; MORAES, G.; VIEIRA, V. L. P. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (Rhamdia quelen) (Heptapteridae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [*S.l.*], v. 61, n. 3, p. 398-403, 2005.

PEREIRA, L. Efeitos dos herbicidas clomazone e ametryn sobre parâmetros funcionais de espécies neotropicais de peixes Prochilodus lineatus. 2012. 100f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, [*s. n*.], 2012.

RAMESH, M.; ANGITHA, S.; HARITHA, S.; POOPAL, R.-K.; REN, Z.; UMAMAHESWARI, S. Organophosphorus flame retardant induced hepatotoxicity and brain AChE inhibition on zebrafish (Danio rerio). **Neurotoxicology and Teratology**, [*S.l.*], v. 82, p. 106919, 2020.

SHUMAN-GOODIER, M. E.; PROPPER, C. R. A meta-analysis synthesizing the effects of pesticides on swim speed and activity of aquatic vertebrates**. Science of the Total Environment**, [*S.l.*], v. 565, p. 758-766, 2016.

SILVA, K. S.; FREITAS, F. C. L.; BRAGA, D. F.; DOMBROSKI, J. L. D.; SANTOS, A. F. B. Ametryn Leaching in Soils from the Sugarcane Region in Northeastern Brazilian. **Planta Daninha**, [*S.l.*], v. 34, n. 4, p. 839-848, 2016.

SOUZA, A. M.; MACIEL, J. C.; BARROSO, G. M.; SILVA, R. S.; GARRAFFONI, A. R. S.; NEVES, C. A.; SOARES, M. A.; SANTOS, J. B. Ecotoxicological effects of commercial herbicides on the reproductive system of aquatic arthropod Limnocoris submontandoni (Hemiptera: naucoridae). **Brazilian Journal of Biology**, [*S.l.*], v. 84, 2024.

SOUZA, M. C. O.; CRUZ, J. C.; CESILA, C. A.; GONZALEZ, N.; ROCHA, B. A.; ADEYEMI, J. A.; NADAL, M.; DOMINGO, J. L.; BARBOSA, F. Recent trends in pesticides in crops: a critical review of the duality of risks-benefits and the brazilian legislation issue. **Environmental Research**, [*S.l.*], v. 228, p. 115811, 2023.

STEVANOVIC, M.; GASIC, S.; PIPAL, M.; BLAHOVA, L.; BRKIC, D.; NESKOVIC, N.; HILSCHEROVA, K. Toxicity of clomazone and its formulations to zebrafish embryos (Danio rerio). **Aquatic Toxicology**, [*S.l.*], v. 188, p. 54-63, 2017.

TAO, Y.; DU, C.; DUAN, B.; WANG, W.; GUO, H.; FENG, J.; XU, H.; LI, Y. Eugenol exposure inhibits embryonic development and swim bladder formation in zebrafish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [*S.l.*], v. 268, p. 109602, 2023.

WAN, M.; LIU, J.; YANG, D.; XIAO, Z.; LI, X.; LIU, J.; HUANG, L.; LIU, F.; ZHANG, S.; TAO, Q. Dimethyl fumarate induces cardiac developmental toxicity in zebrafish via down-regulation of oxidative stress. **Toxicology**, [*S.l.*], p. 153735, 2024.

WANG, Y.; WU, J.; WAN, M.; YANG, D.; LIU, F.; LI, K.; HU, M.; TANG, Y.; LU, H.; ZHANG, S. M-Cresol,a pesticide intermediate, induces hepatotoxicity and behavioral abnormalities in zebrafish larvae through oxidative stress, apoptosis. **Toxicology in Vitro**, [*S.l.*], v. 94, p. 105723, 2024.

XIONG, Y.; CHEN, X.; LI, F.; CHEN, Z.; QIN, Z0. Zebrafish larvae acute toxicity test: a promising alternative to the fish acute toxicity test. **Aquatic Toxicology**, [*S.l.*], v. 246, p. 106143, 2022.

ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G.; MACHADO, S. L. O.; GONÇALVES, F. F.; MARCHEZAN, E. Monitoring of the herbicide clomazone in environmental water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Chromatographia**, [*S.l.*], v. 55, n. 9-10, p. 573-577, 2002.