

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 12/07/2025.

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

Bianca Camargo Penteado Sales

**EFEITOS DO DIURON E SEUS METABÓLITOS DCA E DCMPU
SOBRE O ZEBRAFISH: TOXICIDADE, COMPORTAMENTO E
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Lilian Cristina Pereira

**Botucatu
2024**

Bianca Camargo Penteado Sales

**EFEITOS DO DIURON E SEUS METABÓLITOS DCA E
DCPMU SOBRE O ZEBRAFISH: TOXICIDADE,
COMPORTAMENTO E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lilian Cristina Pereira

Botucatu
2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA ANDRADE CRUZ E SANTOS-CRB

Sales, Bianca Camargo Penteado.

Danos induzidos pelo diuron e seus metabólitos DCA e DCPMU sobre o zebrafish : comportamento e parâmetros bioquímicos / Bianca Camargo Penteado Sales. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Lilian Cristina Pereira

Capes: 40105008

1. Metabólitos. 2. Toxicologia. 3. Diuron. 4. Marcadores bioquímicos. 5. Herbicidas. 6. Zebrafish.

Palavras-chave: DCA; DCPMU; Diuron; Parametros bioquímicos; Zebrafish.

DEDICATÓRIA

Ao meu filho Diego, que chegou em minha vida e me mostrou o real sentido da vida.
Te amo muito.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

À minha orientadora Dra. Lílían Cristina Pereira, sempre tão atenciosa incentivadora e impulsionadora. Agradeço pelos anos de convivência, orientação, dedicação, compreensão e por todo o conhecimento transmitido durante esse período.

Ao Dr. Amadeu Mortágua Velho por aceitar minha ida até Portugal, onde realizei parte de meu doutoramento. Sou grata por toda confiança depositada e pelo grande aprendizado que tive na Universidade de Aveiro.

À Dra. Marta Monteiro e a Dra. Carla Quintadeiro pelos ensinamentos, disponibilidade, por toda a ajuda e acima de tudo pela paciência comigo durante meu doutorado sanduíche.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais José Antônio e Sonia e minha irmã Beatriz, que são meu porto seguro. Obrigada pelo apoio, amor incondicional e presença constante em minha vida. Vocês são meus exemplos, o verdadeiro significado da palavra família.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche (CAPES-PrInt - Processo nº 88887.569799/2020-00).

Aos todos os colegas do laboratório TOXICAM pela troca de conhecimentos e ajuda para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Ítalo, Paloma, Cris e Thania meus colegas de bancada e biotério, por toda disposição, trocas de conhecimento e apoio para conduzir esse estudo.

À Iza, Marquinhos e minhas colegas do departamento de Patologia, que sempre compreenderam minhas ausências e faziam o dia-a-dia de trabalho mais leve e divertido.

Ao Paulo e Vânia pelas orientações e apoio essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu namorado Lucas, que sempre acreditou no meu potencial e que para mim é um exemplo de dedicação e persistência.

Às amigas de verdade Preta e Monique, por estarem sempre presente na minha vida e me auxiliarem com a formatação do trabalho.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.

Marcel Proust

RESUMO

O aumento da demanda por alimentos intensificou os sistemas de produção em larga escala, tornando o uso dos praguicidas indispensável no meio rural. Entretanto, o elevado consumo desses químicos é motivo de preocupação, devido às contaminações e consequentes efeitos à saúde dos organismos expostos. Dentre os herbicidas, se destaca o diuron [3- (3,4-diclorofenil) -1,1- dimetilureia], por este ser amplamente usado na agricultura e por poder se degradar em solo e água, gerando metabólitos como DCA [3,4 dicloroanilina] e o DCPMU [3,4 diclorofenil-N-metilureia]. Existem estudos com roedores relatando o potencial nocivo dessas substâncias, mas são poucas pesquisas que mostraram sua toxicidade em organismos aquáticos. Nesse cenário, o teleósteo zebrafish (*Danio rerio*) é considerado um modelo eficaz para testes de toxicidade. A tese de doutorado objetivou avaliar em duas diferentes pesquisas os possíveis danos induzidos pelo diuron, DCA e DCPMU em adultos, embriões e larvas de zebrafish. Para o primeiro manuscrito utilizou-se diferentes concentrações do diuron 0.003, 0.012, 0.048, 0.189, 0.754, 3.000 mg/L, DCA 0.020, 0.112, 0.633, 0.047, 0.267, 1.500 mg/L e DCPMU 0.020, 0.051, 0.129, 0.326, 0.828, 2.1 mg/L. Foram monitorados biomarcadores com embriões quanto às atividades das enzimas acetilcolinesterase (AChE), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), lactato desidrogenase (LDH) e níveis de peroxidação lipídica (LPO). O comportamento locomotor foi avaliado na fase larval usando o Zebrabox® e os registros foram classificados pelo software ZebraLab® (Viewpoint, FR). Parâmetros adicionais como comprimento total e a frequência cardíaca larval foram mensurados usando o programa ImageJ e um estereomicroscópio. Para segundo manuscrito utilizou-se concentrações que variavam de 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0 e 100.0 µM do diuron, DCA e DCPMU. Avaliou-se a toxicidade com adultos seguindo o protocolo o OECD 203 “Fish Acute Toxicity Test”. Para o teste de toxicidade com embriões, utilizou-se o protocolo OCDE 236 “Fish Embryo Acute Toxicity” (FET). Por fim, a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi monitorados também utilizando embriões. No primeiro manuscrito, as atividade das enzimas estudadas e o comportamento natatório, foram detectadas alterações significativas nas diferentes concentrações estudadas de diuron, DCA e DCPMU. Além disso, as larvas expostas ao DCA tiveram redução em seu comprimento, e o batimento cardíaco das larvas mostrou-se diminuído pela exposição aos três químicos. No segundo manuscrito não foi possível observar alterações histológicas evidentes no cérebro, baço e fígado dos zebrafish adultos expostos ao diuron, DCA e DCPMU por 96 horas. No estudo com embriões, efeitos no desenvolvimento (malformações), como aparecimento de edemas e escoliose em zebrafish ocasionados pela ação dos contaminantes foram observados. A atividade de AChE foi alterada na maior concentração que houve sobrevivência (10.0 µM) nas análises com o metabólito DCA. Nossos resultados indicam que o herbicida diuron e seus metabólitos DCA e DCPMU são capazes de causar efeitos adversos para o zebrafish. Esses resultados podem ainda oferecer embasamento científico adicional, para a implementação de estratégias coerentes e eficazes de controle desses contaminantes no meio ambiente.

Palavras chaves: *Danio Rerio*; herbicidas; toxicidade; contaminantes; biomarcadores enzimáticos; toxicidade embrionária

ABSTRACT

The increase in demand for food has intensified large-scale production systems, making the use of pesticides essential in rural areas. However, the high consumption of these chemicals is a cause for concern, due to contamination and consequent health effects on exposed organisms. Among herbicides, diuron [3- (3,4-dichlorophenyl) -1,1- dimethylurea] stands out, as it is widely used in agriculture and can degrade in soil and water, generating metabolites such as DCA [3, 4 dichloroaniline] and DCPMU [3,4 dichlorophenyl-N-methylurea]. There are studies with rodents reporting the harmful potential of these substances, but little research has shown their toxicity in aquatic organisms. In this scenario, the teleost zebrafish (*Danio rerio*) is considered an effective model for toxicity testing. The doctoral thesis aimed to evaluate, in two different studies, the possible damage induced by diuron, DCA and DCPMU in zebrafish adults, embryos and larvae. For the first manuscript, different concentrations of diuron were used: 0.003, 0.012, 0.048, 0.189, 0.754, 3.000 mg/L, DCA 0.020, 0.112, 0.633, 0.047, 0.267, 1.500 mg/L and DCPMU 0.020, 0.051 , 0.129, 0.326 , 0.828, 2.1 mg/L. Biomarkers were monitored with embryos regarding the activities of the enzymes acetylcholinesterase (AChE), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), lactate dehydrogenase (LDH) and lipid peroxidation (LPO) levels. Locomotor behavior was evaluated in the larval stage using Zebabox® and records were classified by ZebraLab® software (Viewpoint, FR). Additional parameters such as total length and larval heart rate were measured using the ImageJ program and a stereomicroscope. For the second manuscript, concentrations ranging from 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0 and 100.0 µM of diuron, DCA and DCPMU were used. Toxicity was evaluated in adults following the OECD 203 “Fish Acute Toxicity Test” protocol. For the toxicity test with embryos, the OECD 236 “Fish Embryo Acute Toxicity” (FET) protocol was used. Finally, the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) was also monitored using embryos. In the first manuscript, the activity of the studied enzymes and the swimming behavior, significant changes were detected in the different studied concentrations of diuron, DCA and DCPMU. Furthermore, the larvae exposed to DCA had a reduction in their length, and the heart rate of the larvae was reduced by exposure to the three chemicals. In the second manuscript, it was not possible to observe evident histological changes in the brain, spleen and liver of adult zebrafish exposed to diuron, DCA and DCPMU for 96 hours. In the study with embryos, effects on development (malformations), such as the appearance of edema and scoliosis in zebrafish caused by the action of contaminants, were observed. AChE activity was altered at the highest concentration at which survival occurred (10.0 µM) in analyzes with the DCA metabolite. Our results indicate that the herbicide diuron and its metabolites DCA and DCPMU are capable of causing adverse effects on zebrafish. These results can also provide additional scientific support for the implementation of coherent and effective strategies to control these contaminants in the environment.

Key word: *Danio Rerio*; herbicides; toxicity; contaminants; enzyme biomarkers; embryo toxicity.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I. REVISÃO DE LITERATURA

1. Praguicidas: O que são e o uso no Brasil e no mundo.....	12
2. Impactos pela ação dos praguicidas	14
3. Herbicida diuron e seus metabólitos DCPMU, DCPU e DCA.....	15
4. A toxicidade do diuron e seus metabólitos DCA e DCPMU	17
5. Zebrafish como método alternativo aplicado em ensaios toxicológicos	20
5.1. Teste de toxicidade aguda em embrião (teste FET).....	23
5.2. Teste de toxicidade aguda em peixes adultos.....	24
5.3. Biomarcadores bioquímicos em zebrafish.....	27
5.4. Comportamento em zebrafish	32
5.5. Comprimento e frequência cardíaca em zebrafish	34
6. Justificativa.....	35
7. Objetivos	36
8. Referências	37

CAPÍTULO II. I MANUSCRIPT

1. Introduction	53
2. Material and Methods.....	55
2.1. Chemicals	55
2.2. Fish husbandry and embryo collection.....	55
2.3. Fish embryo exposure assays	56
2.4 Behavior analysis	57
2.5 Biochemical analysis.....	57
2.6 Statistical analysis	59
3. Results	59
3.1 Mortality, malformations and larvae length	59
3.2 Embryo heart rate	60
3.3 Zebrafish larvae behavior	61
3.4 Biochemical markers in zebrafish larvae	62
4. Discussion	64
5. Acknowledgments	70
6. References	70

CAPÍTULO II. II MANUSCRIPT

1. Introduction	84
2. Material and Methods.....	87
2.1. Chemicals	87
2.2. The fish embryo toxicity test (FET)	87
2.2.1 Fish maintenance	87
2.2.2 Experimental design	88
2.3 Oxygen Consumption Rate (OCR) test	88
2.4 Acetylcholinesterase (AChE) activity assay	89
2.5 Cometa assay	90
2.6 Fish, Acute Toxicity Test	91
2.6.1 Fish maintenance	91
2.6.2 Experimental design	91
2.6.3 Histological evaluation	91
2.6.4 Micronucleus and Nuclear Abnormalities Test	92
3. Statical Analyses	92
4. Results	93
4.1 Embryo analysis	93
4.2 Adult analysis	100
5 Discussion	103
6 References	109

CAPITULO I. REVISÃO DE LITERATURA

1. Praguicidas: O que são e o uso no Brasil e no mundo

O termo praguicida é definido como qualquer substância ou mistura de compostos de origem química ou biológica que tem como função a prevenção, destruição ou contenção de organismos considerados pragas (USEPA, 2017; Pathak et al., 2022). Os praguicidas são classificados, de acordo com seu espectro de ação, como herbicidas (substâncias que eliminam “ervas daninhas” que infestam a cultura no campo), inseticidas (compostos que controlam insetos no meio agrícola ou urbano), ou outros, como fungicidas (produtos que eliminam os fungos), bactericidas (produtos que eliminam bactérias), rodenticidas (produtos que combatem roedores). Os praguicidas também podem ser classificados pela sua estrutura química, é o caso dos organofosforados, feniluréias, carbamatos e piretróides (Zhang et al., 2022; Pathak et al., 2022). Na agricultura, os praguicidas são usados para elevar a produção do plantio, impedindo a proliferação de pragas, visando aumento de lucro e melhoria da qualidade dos produtos (OPAS/OMS, 2020; Zhang et al., 2022).

É relatado, desde 500 a.C o uso agrícola dos praguicidas para evitar perdas em suas colheitas. Porém, em meados de 1936 os compostos sintéticos como o inseticida diclorodifeniltricloroetano, conhecido como “DDT” foram desenvolvidos e usados indiscriminadamente para combater insetos. Na década de 1960 descobriu-se que a substância provocava severos danos à saúde dos seres vivos e ao meio ambiente, por essa razão teve seu uso banido em diversos países na década de 1970 (Abubakar et al., 2020).

Hoje, os praguicidas estão entre os principais instrumentos do modelo de agricultura atual. Ao quantificar o consumo médio mundial desses químicos, o uso dos herbicidas se destacou, com um consumo médio de aproximadamente 48%, seguido dos inseticidas, representando 29,5% e finalmente os fungicidas com 18% (Sharma et al., 2019). O consumo global de pesticidas em 2019 foi de aproximadamente 4,19 milhões de toneladas, onde a China foi o maior país consumidor de pesticidas (1,76 milhões de toneladas métricas), seguida pelos Estados Unidos (408 mil toneladas),

Brasil (377 mil toneladas) e Argentina (204 mil toneladas) (Fernández, 2021). No Brasil, a agricultura tem sido a principal atividade econômica ao longo dos séculos, devido às suas condições climáticas favoráveis, assim, o país desempenha hoje um importante papel no mercado agrícola, sendo considerado um dos maiores exportadores de alimentos em escala global (Pignati et al., 2017). Além do mais, o país possui aproximadamente 9% do seu território de área plantada, chegando a 76 milhões de hectares. Já produtividade aumenta, em média, 8% década (CEPEA, 2019; IBGE 2020). Por essas circunstâncias, o mercado brasileiro de praguicidas é estimado em US \$ 10,5 bilhões por ano, o que representa cerca 20% do mercado mundial (Pignati et al., 2017; Barizon, 2020). Outro ponto a ser destacado sobre produção agrícola, é que essa atividade corresponde, aproximadamente, a 5% dos US\$ 1,8 trilhão produto interno bruto (PIB) brasileiro, com uma variedade de produtos das cadeias de grãos e oleaginosas, fibras e frutas (MME, 2020).

Segundo a publicação de 2016 da Organização das Nações Unidas (ONU) para a Alimentação e Agricultura, o Brasil teve um consumo de 4,31 quilos de praguicidas por hectare (Kg/ha) cultivado, ficando atrás de países como Países Baixos (9,38 kg/ha), Bélgica (6,89 Kg/ha), Itália (6,66 Kg/ha), Irlanda (5,78 Kg/ha), Portugal (5,63 Kg/ha) e Suíça (5,07 Kg/ha) (FAO, 2020). Ainda, sabe-se que a soja (área plantada de 32,2 Mha), milho (área plantada de 15,8 Mha) e cana-de-açúcar (área plantada de 10,1 Mha) são as culturas de maiores safras brasileiras (Pignati et al., 2017), consumindo grandes quantidades de praguicidas por hectare (Pignati et al., 2017; Camargo et al., 2021). Estudos recentes indicam que o uso de praguicidas aumentará ao longo dos anos, acompanhando o crescimento da população, que provavelmente atingirá nove bilhões de pessoas em 2050 (Verger, 2020). Apesar de cumprirem o papel de proteger as culturas agrícolas, existe uma crescente preocupação com relação às consequências do uso indiscriminado de grande parte desses compostos e os possíveis danos que possam promover nos ecossistemas e na saúde humana.

2. Impactos pela ação dos praguicidas

O desenvolvimento industrial e o crescimento populacional, incentivou grande produção de inúmeros novos compostos (Pereira et al., 2015; Bambino et al., 2017; Starling et al., 2019). Desde então, esses químicos, incluindo os praguicidas estão presentes no ambiente, elevando a necessidade de conhecimento sobre sua toxicidade, assim como os possíveis riscos a saúde humana e as consequências do acúmulo desses compostos no ecossistema (Poynton; Robinson, 2018; Richardson e Kimura, 2020; Asgari et al 2023).

Especificamente sobre os praguicidas, após a aplicação, solo é o primeiro compartimento onde se dispersam, podendo ser absorvidos pelas raízes das plantas, lixiviados para estratos mais profundos do solo ou sofrer escoamento (Pathak, 2023). Por subsequência, o ambiente aquático também é destino desses resíduos (Hedlund et al., 2019; Bonifacio e Hued, 2019). Como agravante, a maioria dos compostos ativos desses produtos são moléculas quimicamente estáveis e persistentes, dispersando-se gradativamente no meio ambiente e contaminando os recursos hídricos (Storck et al., 2017). Hoje, é possível identificar quais praguicidas estão mais presentes no meio ambiente e em matrizes aquáticas (Escher et al., 2019). Outro dado relevante sobre os praguicidas, é que esses estão dentre os principais contaminantes presentes em águas brasileiras superficiais, subterrâneas, em sedimentos e até em água potável (Montagner et al., 2019). Publicações recentes relatam ingredientes ativos de praguicidas em 25% das águas superficiais do estado de São Paulo (CETESB, 2019). Por esses fatores, inúmeros trabalhos científicos vem sendo desenvolvidos para se conhecer os impactos gerados ambientais por essas substâncias.

Apesar dos dados sobre a presença desses poluentes nas águas e seus possíveis efeitos, sobre o meio biológico, alguns pesquisadores afirmam que as concentrações de contaminantes presentes no ambiente, como os praguicidas, estão em níveis muito abaixo das doses usualmente aplicadas em experimentos e consumidas diariamente (UNEP, 2019; Gupta et al., 2020). Assim, abordagens modernas têm alta sensibilidade, quando comparado a testes de toxicidade tradicionais ou testes que usam contaminantes em concentrações elevadas (Andrade et al., 2016; Domingues et al. 2010; Oliveira et al., 2013). Estudos evidenciaram que as alterações em marcadores bioquímicos e de comportamento locomotor, ocorrem nas concentrações dos praguicidas abaixo aquelas capazes

de alterar o desenvolvimento embrionário do modelo zebrafish (*Danio rerio*), fornecendo informações adicionais sobre esses compostos (Domingues et al., 2010; Zhang et al., 2012; Oliveira et al., 2013). Andrade e seus colaboradores (2016) avaliaram, em embriões de zebrafish, baixas concentrações do fungicida carbendazim, consideradas ambientalmente relevantes (0.16 a 500 µg/L). Foram observados pontos letais e de desenvolvimento como eclosão, edemas e malformações, mas também foram avaliados efeitos a nível bioquímico e comportamental. Como resultado, os marcadores bioquímicos (acetilcolinesterase, glutathione S-transferase e lactato desidrogenase) estavam alterados. No mesmo estudo, os autores evidenciaram que alterações comportamentais foram observadas em concentrações quase 9.000 vezes abaixo daquelas capazes de alterar o desenvolvimento do organismo (Andrade et al., 2016).

Por fim, é de suma importância a realização de avaliações toxicológicas experimentais dos praguicidas, que permitam uma melhor compreensão de impactos gerados por estes contaminantes, incluindo os estudos que avaliam as concentrações reais encontradas no ecossistema. Também é importante a realização de estudos mecanísticos para a compreensão do modo de ação (MoA) e identificação de endpoints desses químicos, para a detecção de seus possíveis efeitos deletérios, dentro deste contexto realista (Bahe et al., 2006; Pereira et al., 2015).

3. O herbicida diuron e seus metabólitos DCPMU, DCPU e DCA

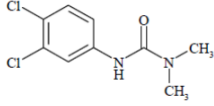
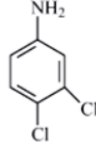
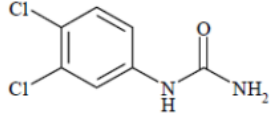
O diuron (3-(3,4-dichlorofenil)-1,1-dimetilureia) é um herbicida derivado da ureia, amplamente utilizado no meio agrícola que possui amplo espectro de ação em aplicações pré e pós-emergentes (Roque e Melo, 2000; USEPA, 2003; APVMA, 2005). É facilmente absorvido pelas raízes das plantas invasoras (ou ervas daninhas) e tem como função primordial bloquear a fotossíntese e inibir a produção de oxigênio (Iyer, 2002; APVMA, 2005; Ihlaseh et al., 2011). É muito utilizado no cultivo de cana-de-açúcar, mas também pode ser usado em culturas de frutas cítricas, banana e uva (Goldemberg, 2008; Tooge, 2019). Quanto às suas características, em sua forma pura, o diuron é um cristal, não iônico, com moderada solubilidade em água (42 mg/L a 20 °C) (Giacomazzi e Cochet, 2004).

Estima-se que 6,52 mil toneladas de diuron foram vendidas no Brasil, só no ano de 2021. De

acordo com o IBAMA (2023), o diuron é o 4º herbicida mais usado no país e o estado que faz mais uso desse produto é o de São Paulo, representando cerca de 3 mil toneladas das aquisições do herbicida. O diuron é altamente estável, persistente e sofre lenta degradação, sendo considerado um poluente biologicamente ativo no solo, em sedimentos e principalmente na água (Field et al., 2003; Giacomazzi e Cochet, 2004). Após as aplicações no solo, o herbicida sofre escoamento e lixiviação principalmente para os cursos de água e posteriormente cai nos rios e lagos. Em água, possui meia vida considerada longa, de aproximadamente 45 dias (Lamoree et al., 2002; Gooddy et al., 2002; Giacomazzi e Cochet, 2004; PUBCHEM, 2021a). Hoje, estima-se que suas concentrações em água variam entre 0,16 a 6742 ng/L na Europa, 3045 ng/L no Japão e entre 4 a 279 ng/L no Brasil (Konstantinou et al., 2004; Köck-Schulmeyer et al., 2013; Velki et al., 2017; Acayba et al., 2021).

No ambiente, o diuron também pode vir a se biotransformar, pela ação de fungos e bactérias ou pela hidrólise em água, em metabólitos conhecidos que exibem alta toxicidade (Pätzold; Brümmer 2003; Sørensen et al., 2003; Giacomazzi e Cochet, 2004). O DCPMU (3- (3,4-Diclorofenil) -1- Metilureia) é formado após um primeiro passo de desmetilação, que na sequência se transforma em DCPU (1- (3,4 - Diclorofenil) ureia) e finalmente é hidrolisado em 3,4 - DCA (3,4 - Dicloroanilina) (Hodge et al., 1967). Para Thomas e seus colaboradores (2002), o diuron e o DCA são considerados substâncias bastante persistentes. Já os metabólitos DCPMU e DCPU tem menor persistência em água. Apesar de o metabólito DCPU ser um potencial contaminante ambiental, atualmente não vem sendo desenvolvidos estudos com essa molécula. Uma vez que, não é possível encontrá-la no mercado para análises, há uma limitação das possibilidades de estudos com esse composto.

Tabela 1) Nomenclatura e estrutura química do diuron, DCA e DCPMU.

Nome da substância	Nomenclatura da substância	Estrutura química da substância
Diuron	3-(3,4-diclorofenil)- 1,1- dimetilureia	
DCA	3,4-dicloroanilina	
DCPMU	(3- (3,4-diclorofenil) -1-metilureia)	

Fonte: USEPA, 2003

4. A toxicidade do diuron e seus metabólitos DCA e DCPMU

De acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado de classificação e rotulagem de produtos químicos (GHS, sigla em inglês), o diuron pertence à classe III de periculosidade, esse praguicida tem potencial carcinogênico, é tóxico se ingerido, e causa danos para órgãos-alvo específicos. Para a Comissão Europeia, o herbicida diuron é um composto perigoso (CETESB, 2019; Mohammed et al, 2020). No Brasil, o diuron é encaixado à categoria 3 e à faixa amarela, considerado substância moderadamente tóxica (Anvisa, 2017). Pela classificação do GHS, o metabólito do herbicida diuron (3,4- DCA, ou somente DCA) é tóxico por via oral, inalatória e pode causar de lesões oculares (PUBCHEM, 2022). De acordo com Dupraz et al (2016), o DCA é classificado como um produto químico altamente tóxico. Já os escassos dados sobre o DCPMU relatam que o metabólito é nocivo se ingerido e pode causar irritação ocular (PUBCHEM, 2021).

Para Asgari (2013) o diuron, tem ameaçado o ambiente e a dos organismos, incluindo o ser humano. Estudos experimentais com roedores mostraram que os principais alvos de toxicidade do

diuron são o sistema hematopoiético e a mucosa urotelial (USEPA, 1997; Iyer, 2002). A Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA, 2011) relata que, em altas concentrações (2.500 ppm) o diuron induziu tumorização na bexiga e pelve renal de ratos. Frente a esses dados, a United States Environmental Protection Agency (USEPA, 1997) classificou a substância como um “provável cancerígeno para o homem”. Além disso, foi observado que o diuron também causou danos ao sistema hematopoiético e anemia em ratos (USEPA, 2003). Na busca por conteúdo sobre potencial nocivo do diuron, é possível encontrar estudos que priorizam métodos alternativos à experimentação animal, que incluem, por exemplo, os organismos aquáticos (Mhadhbi e Beiras, 2012; Pereira, et al 2015; Velki et al., 2017; Felicio et al., 2018; Velki et al 2019). De acordo com Eissa (2010), os peixes são organismos sensíveis do ponto de vista toxicológico, apresentam desenvolvimento rápido e vivem em um ecossistema que é o principal destino dos praguicidas. Um ponto relevante nos estudos que favorecem toxicologia alternativa, é que grande parte dessas pesquisas avaliam os possíveis danos dos químicos, como o diuron concentrações ambientalmente relevantes (Pereira et al., 2015; Velki et al., 2017; Velki et al., 2019).

No estudo de Velki et al (2017), o herbicida diuron nas concentrações de 1, 2 e 3.8 mg/L se mostrou tóxico aos estágios iniciais da vida do modelo zebrafish. Mudanças nos desfechos comportamentais, como diminuição nos movimentos de rolamento espontâneos de embriões e timotaxia foram frequentemente observadas. Em outro estudo com embriões de zebrafish, realizado com concentrações ambientais de 8.6, 4.3, 2.15, 0.43 e 0.086 μM de diuron, foram detectadas alterações bioquímicas nas enzimas Catalase (CAT), glutathione S-Transferase (GST) e Acetilcolinesterase (AChE), apontando a importância de monitorar o herbicida em diferentes níveis de organização biológica (Velki et al., 2019). Em estudos para avaliar efeitos teratogênicos, o diuron induziu malformações no desenvolvimento e aumento significativo da mortalidade embrionária em peixes robalo (*Psetta maxima*), em adição os organismos que sobreviveram sofreram diminuição significativa no sucesso da incubação, malformações e edema pericárdico (Mhadhbi e Beiras, 2012). A exposição do peixe medaka javanês (*Oryzias latipes*) a concentrações subletais (1, 50, 100, 500 e 1.000 $\mu\text{g/L}$) de diuron, por 21 dias, induziu alterações histopatológicas nas gônadas (ovário e testículo), diminuição no estadiamento gonadal e maturidade das células germinativas na oogênese e

espermatogênese (Kamarudin et al., 2020). Foram também observadas, por Kamarudin et al. (2020), em embriões desse peixe deformidades de desenvolvimento para concentrações ambientalmente relevantes (0.60, 1.25, 2.50mg/L) de diuron. Outros endpoints como a diminuição da frequência cardíaca, eclodibilidade e taxa de sobrevivência foram reduzidas para a concentração mais altas (5 e 10 mg/L (Ibrahim et al., 2020). Kao et al. (2019) testaram, por 24 e 48 horas, diferentes concentrações de diuron (12,5µg/ml e 25 µg/ml) em células da linhagem de hepatoblastoma humano (HepG2) e em embriões do teleósteo zebrafish. Os autores observaram embriotoxicidade para zebrafish e geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) para as células HepG2.

Outros estudos demonstram que além do diuron, seus metabólitos, exercem efeitos tóxicos em organismos aquáticos (Guilhermino et al., 1998; Tixier et al., 2001; Osano et al., 2002). Em peixes da espécie Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) a exposição ao diuron ou aos seus metabolitos DCA, DCPMU e DCPU, induziram diminuição dos níveis de testosterona e 11-ketotestosterona sérica, do índice gonadossomático, do diâmetro dos túbulos seminíferos e das porcentagens médias de células germinativas, caracterizando-os como anti-androgênicos para o sistema reprodutivo (Pereira et al., 2015). Parâmetros endócrinos e de biomarcadores enzimáticos CAT, GST e SOD (superóxido dismutase) foram estudados também *in vitro*, no fígado, cérebro e brânquias de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas ao diuron DCA, DCPMU e DCPU. O estudo detectou alterações nos parâmetros analisados, confirmando que podem ser considerados possíveis desreguladores endócrinos (Felicio, 2017). Ainda em peixes de diferentes espécies, o diuron e os seus metabólitos DCA, DCPU e DCPMU causaram alterações a nível morfológicas (Mhadhbi e Beiras, 2012), bioquímicas (Sanchez-Muros et al., 2013), e fisiológicas (Scheil et al., 2009).

Em um estudo avaliando o DCA, o composto mostrou-se tóxico para fêmeas do peixe menaka javanês expostas a 250µg/L de diuron. Foram observados índice gonadossomático significativamente baixo, a estrutura das células ovarianas foram interrompidas e houve redução significativa no desenvolvimento das gônadas femininas, mostrando que o DCA pode interferir na reprodução desses organismos aquáticos, mor meio de efeitos sobre a fecundidade e alteração dos tecidos gonadais (Ibrahim et al., 2021). De acordo com Groshart e Okkerman (2000), o DCA é

reconhecido desregulador endócrino para a vida selvagem e à saúde humana. No entanto, dados sobre o potencial nocivo do DCA sobre os marcadores biológicos e comportamental, não são comuns, tornando esse tipo de avaliação a necessária. Já as informações sobre o DCPMU, que participa da formação do DCA são raros na literatura, embora alguns estudos apontam sua maior toxicidade em relação ao diuron (Tixier et al., 2000).

5. Zebrafish como método alternativo aplicado em ensaios toxicológicos

Os estudos toxicológicos in vivo são fundamentais para análise dos compostos químicos e para a avaliação dos efeitos adversos dos praguicidas (Koeter, 1993; Stokes, 2002; Meyer, 2003; Klaassen e Watkins, 2012). Apesar dos mamíferos serem os animais tradicionalmente utilizados em experimentações, eles possuem alto custo para manutenção e necessidade de grandes espaços para o seu cultivo (Zon e Perterso, 2005). Além do mais, o uso disseminado dos animais experimentais tradicionais na pesquisa tem sido causa de discussões, principalmente sob o caráter ético, em função do grande número de animais requerido e do sofrimento causado durante alguns tipos de experimento (Russel e Burch, 1992; Schechtman, 2002).

Na proposta de introduzir novos métodos de experimentação o programa denominado 3R's (Reduction, Replacement, Refinement), objetiva reduzir o uso de animais de laboratório, substituir ensaios experimentais e refinar, minimizando o sofrimento dos modelos utilizados nas pesquisas (Russel e Burch, 1992; Schechtman, 2002). Nesse cenário, existe uma busca intensa por métodos alternativos a serem aplicados na área da toxicologia, para avaliação dos riscos potenciais de produtos químicos. Dentre a ampla gama de métodos alternativos que surgiram, o modelo experimental zebrafish, em substituição aos mamíferos, é um organismo experimental de baixo custo, com alta taxa de reprodução e amplamente utilizado em pesquisas ecotoxicológicas para avaliação de risco de contaminantes ambientais (Kimmel et al., 1995; Scholz et al., 2008; Cassar et al., 2019). Na fase embrionária é considerado método de substituição que se encaixa nos 3R's, pois pela diretiva europeia 2010/63/EU, sobre a proteção de animais para fins científicos, os embriões da espécie se alimentam unicamente pelo conteúdo do saco vitelínico, sem necessidade de regulamentação em procedimentos experimentais, pois não tem a alimentação exógena durante esse

período (Scholz et al., 2008; Directive, 2010/63/EU; Teixidó et al., 2013).

O peixe zebrafish (*Danio rerio*), ou paulistinha, é um teleósteo de origem Asiática e tem aproximadamente quatro centímetros na fase adulta (Eaton e Farley, 1974; Scholz et al., 2008) (Figura 1). O peixe apresenta características fenotípicas diferentes em relação ao seu sexo. Geralmente os peixes machos têm uma barriga mais lisa, enquanto que as fêmeas mostram uma barriga arredondada e prateada (Nasiadka et al., 2012; Meyers, 2018). Esta espécie foi descrita pela primeira vez em meados de 1822 pelo britânico Francis Hamilton e se tornou modelo científico em 1983 pelo biologista George Streisinger (Spence et al., 2008). Atualmente, é um importante modelo vertebrado nas pesquisas científicas, sendo explorado em diversas áreas, mas com grande destaque na área da toxicologia, por possuir alta sensibilidade quando exposto a compostos químicos, devido à rápida absorção (Scholz et al., 2008; Carlsson et al., 2013). O peixe é um notável modelo para avaliação de neutotoxicidade, pois tem sistema nervoso central parecido ao humano, contendo os mesmos neurotransmissores, receptores e genes envolvidos nas alterações neuronais (Migliarini e Carnevali, 2009; Panula et al., 2010). Com as análises das funções motoras, sensoriais, autonômicas e cognitivas é possível também a compreender os efeitos dos compostos químicos no sistema neurológico, o que tem grande relevância, já que muitas das alterações comportamentais têm correlação com as dos humanos (Klaassen e Watkins, 2013).

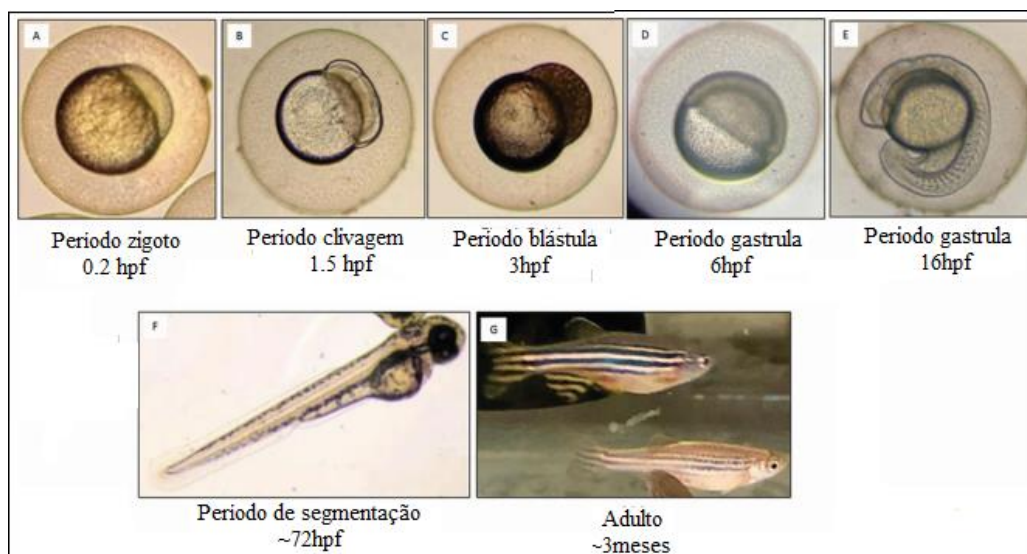
Sua importância como modelo para pesquisas também se dá principalmente por possuir grande parte do genoma sequenciado e pelas semelhanças com outros vertebrados, inclusive humanos, com cerca de 70% de genes semelhantes (Kimmel et al., 1995; Scholz et al., 2008; Carlsson et al., 2013; Teixidó et al., 2013) e cerca de 84% de ortologia com genes de doenças humanas (Howe et al., 2013). O peixe compartilha características anatômicas com os mamíferos (rins, cérebro, fígado, intestino, coração, coluna vertebral) que, embora tenham adaptações específicas à vida aquática, possui funções e fisiologia conservadas (Macrae e Peterson, 2015). As reações metabólicas em humanos acontecem semelhante no zebrafish, devido a genes ortólogos duplicados de um ancestral comum que continuam a ter uma função correspondente nas duas espécies, tornando o zebrafish um modelo na previsão do metabolismo de inúmeros compostos (De Souza et al., 2018). As vias (metabolismo e excreção) também funcionalmente semelhantes às dos

mamíferos. Já a bioconversão dos diferentes compostos, como os químicos, ocorrem principalmente no fígado em ambas as espécies (Macrae e Peterson, 2015; Hahn et al., 2015). Ainda dentro do contexto, o fígado é considerado biomarcador. O zebrafish possui processos moleculares e celulares, desenvolvimento hepático, maturação e função de enzimas metabólicas semelhantes quando comparados aos humanos, sendo reconhecido como organismo respeitável para análise hepática (Barros et al., 2008; Vliegenthart et al., 2014). Assim, por esse tecido, é possível visualizar os efeitos das exposições a xenobióticos, sendo considerado uma importante ferramenta na avaliação de alterações patológicas e caracterizado como indicador de toxicidade de compostos do ambiente aquático (Johnson et al. 1993; Van Der Oost et al. 1996; Bernet, et al. 1999, Boran, 2010).

Dentre outras características que enaltecem o zebrafish, é que o organismo tem rápido desenvolvimento e manipulação acessível, tornando-o um modelo fácil para avaliação experimental (Mcgrath, 2008). Seu ciclo de vida tem quatro estágios distintos (embrionária, larval, juvenil e adulta). Durante a fase embrionária, o organismo se desenvolve em um ovo translúcido que possibilita a avaliação do seu desenvolvimento. A fase larval ocorre após a eclosão do ovo, com aproximadamente 72 hpf, e as fases juvenil/adulta são atingidas com apenas três meses, etapa que a maturidade sexual é alcançada (Hill et al., 2005; Scholz, 2008). No desenvolvimento embrionário e larval, é possível se observar várias malformações resultadas da exposição a contaminantes (Hill et al., 2005). Além do mais, os estágios iniciais da vida (ovos, embriões e larvas) de peixes e invertebrados aquáticos demonstraram ser particularmente sensíveis a estressores ambientais (Hutchinson et al., 1998; Mohammed, 2013).

Por fim, métodos toxicológicos alternativos, como os que utilizam o zebrafish, têm grande potencial, uma vez que o organismo em questão compartilha inúmeras características genéticas, anatômicas e fisiológicas com os mamíferos, tornando possível a extrapolação dos resultados obtidos com este peixe para o ser humano (Ali et al., 2011; Garcia; Noves; Tanguay, 2016). E ainda, o organismo é um biomodelo promissor para análises comportamentais e ecotoxicológicas, principalmente para o biomonitoramento de ecossistemas aquáticos e contaminantes ambientais, tornando-o um importante aliado da ciência (Quiniou et al., 2007; Vethaak et al., 2015).

Figura 1) Esquema das fases de desenvolvimento do zebrafish (*Danio rerio*).



Fonte: Adaptado de Lima et al., 2020.

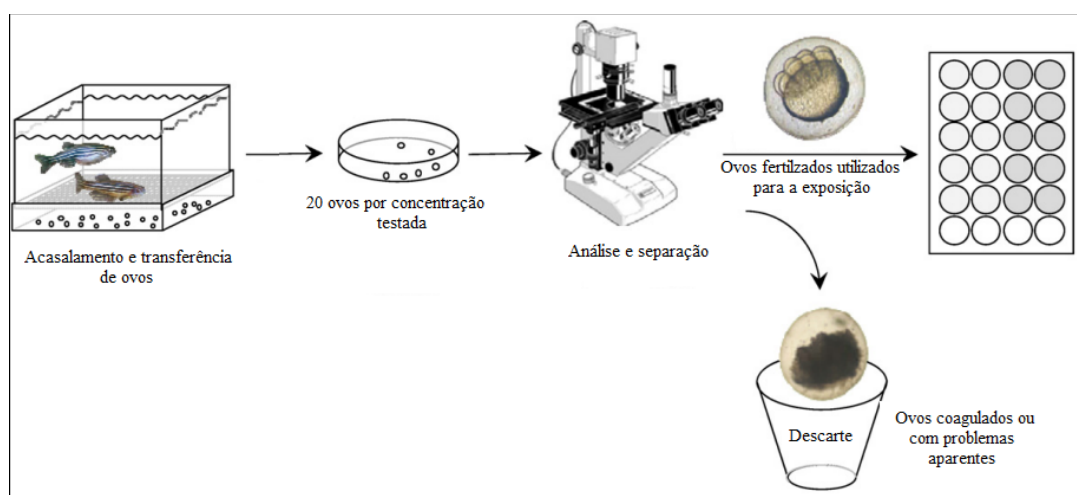
De A até E: embrião (Até 48 hpf), F: larval (48-72 hpf) e G: adultos (3 meses).

5.1 Teste de toxicidade aguda em embrião (teste FET)

O ensaio de toxicidade com os estágios embrio-larval de zebrafish (Fish Embryo Toxicity - FET) emergiu como análise promissora para investigação da toxicidade de compostos químicos (Braunbeck et al., 2005; Knöbel et al., 2012; Nagel, 2002). Estabelecido no ano de 2013 pela OECD, o teste FET objetiva acasalar adultos, obter ovos, expor os embriões e larvas de zebrafish recém-fertilizados ao composto-teste e analisar, a cada 24 horas, os parâmetros dos indicadores de toxicidade (Figura 2). De acordo com Kimmel et al., (1995) os indicadores de letalidade incluem a coagulação dos ovos fertilizados, falta de formação de somitos, falta de destacamento da cauda do saco vitelino e ausência de batimento cardíaco. Dentre os indicadores de subletalidade, destacam-se as malformações no saco vitelino, olhos e cabeça; embrião sem movimento, deformidades esqueléticas (cauda curvada, cauda encurtada, escoliose) e crescimento retardado (Carlsson et al., 2013). Inicialmente, o teste FET foi proposto como método toxicológico alternativo ao uso de peixes adultos, como o protocolo OECD 203 (2019), e apresentou grande potencial para sua aplicação em toxicologia regulatória. Desde sua implementação, tem se observado uma gradual adesão do teste FET dentro do contexto regulatório, resultado da associação entre um modelo robusto com um método alternativo eficiente Braunbeck et al., 2015). Em geral, os embriões de zebrafish são capazes

de metabolizar a maioria das substâncias da mesma maneira que os peixes adultos (Braunbek et al., 2014). Além do mais, a maioria dos ensaios FET ocorrem durante o período de 96 – 120 hpf, se encaixando no conceito de bem-estar animal (refinamento) e substituição dos modelos tradicionais de experimentação. Tais conceitos estão encaixados dentro dos 3Rs, outro motivo de serem também tão utilizados nos experimentos atuais (Astrogildo et al., 2018). É importante notar que, fatores como características físico-químicas e peso molecular das substâncias a serem testadas devem ser consideradas, uma vez que o córion do embrião de zebrafish possui poros com aproximadamente 0,5 µm de diâmetro, podendo limitar o alcance do composto em estudo ao organismo (Cheng et al., 2007). Contudo, apesar dessa restrição, em geral, a utilização de do FET teste para análises de substâncias químicas na toxicologia mostra-se uma tecnologia eficaz e de alto rendimento.

Figura 2) Esquema do procedimento do FET teste.



Fonte: Adaptado de Lammer et al., 2009

5.2 Teste de toxicidade aguda em peixes adultos

Para poder estimar os efeitos deletérios de compostos químicos ao meio ambiente e para os diferentes organismos, é necessário obter respostas rápidas (Barbieri et al., 1998; Barbieri et al., 2007; Phan et al., 2023). Os testes de toxicidade aguda são considerados métodos para determinar qual a concentração de uma substância produz efeito tóxico a um organismo por um curto tempo de exposição (Pankratz, 2011). São definidos como efeitos, em geral, severos e rápidos, sofridos pelos

organismos expostos ao agente químico, em um curto período de tempo (toxicidade aguda) (Aragão e Araújo, 2006).

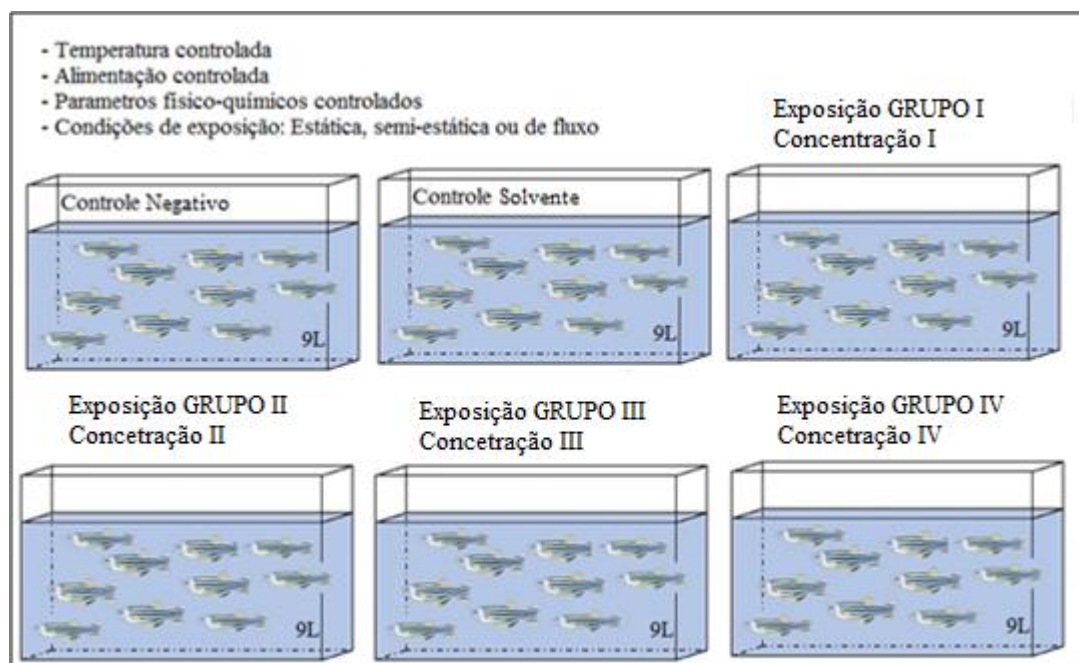
No Brasil, os testes toxicológicos também utilizam peixes como organismo teste. Esses testes são padronizados de acordo com a ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), que estabelece os possíveis modelos experimentais para avaliação de contaminantes, dentre os quais se inclui o zebrafish. A norma ABNT-NBR 15088 é a responsável pela normatização dos ensaios de toxicidade aguda (ABNT, 2011). Nesse contexto, as análises de toxicidade com peixes adultos são fundamentais, pois avaliam os possíveis efeitos tóxicos das substâncias químicas sobre o ecossistema aquático, uma vez que o ambiente é uma das principais rotas dos contaminantes (Rand et al., 1995, Kendaall et al., 2021). Outro ponto importante para utilização de peixes nos ensaios de toxicidade é que, os organismos são os principais representantes dos consumidores secundários na cadeia alimentar aquática (Costa et al., 2008). Além do mais, os peixes são considerados bioindicadores da qualidade da água. Uma vez expostos, podem ter alterações na taxa crescimento, maturação sexual e os danos em tecidos, que auxiliam na predição dos efeitos dos poluentes (Martinez e Souza, 2014). Por fim, a utilização de peixes para avaliação dos possíveis efeitos tóxicos de substâncias presentes no ecossistema aquático é de suma importância para conhecer o potencial nocivo de químicos, amparando a tomada de decisões, pelo do conhecimento das consequências do composto para o ambiente, e à saúde do homem.

O guideline de 2019, OECD TG 203 (Fish, Acute Toxicity Testing), é destaque para análise com peixes expostos a um curto período de tempo. Tem como interesse o bem-estar animal e a utilização eficiente de recursos. O princípio do teste se baseia em expor os peixes ao produto químico, durante um período agudo de até 96 horas, sob qualquer condição estática, semi-estáticas ou de fluxo (Figura 3). Durante o período de exposição à substância teste, são registradas a mortalidade e as anormalidades visíveis, relacionados à aparência e ao comportamento do organismo testado. O princípio do teste considera outros pontos relevantes, que devem ser seguidos durante a experimentação, com a presença de grupos controles, onde a mortalidade deve não exceder 10%, utilizar sempre recipiente de vidro, aço inoxidável ou outros recipientes quimicamente inertes e realizar sempre o controle dos parâmetros físico-químicos da água onde os animais estarão expostos

(OECD, 2019).

Apesar da importância destacada na utilização de adultos para avaliação toxicológica, alguns autores relatam que embriões e larvas são mais sensíveis que os animais adultos, o que pode ocasionar sensibilidades diferenciadas entre as fases descritas no método mencionado. Segundo Xiu e colaboradores (1991), os embriões e larvas de zebrafish são geralmente mais sensíveis a diversos poluentes do que os adultos. Em função desta sensibilidade diferenciada, o Órgão Ambiental Norte Americano, USEPA (USEPA, 2002) orienta que, os ensaios de toxicidade sejam também conduzidos com organismos diferentes fases vida.

Figura 3) Esquema da exposição do teste de toxicidade aguda com peixes adultos, contendo controles negativo, controle solvente e grupos de exposição com diferentes concentração dos contaminates.



Fonte: Adaptado de Ribeiro et al., 2022

5.3 Biomarcadores bioquímicos em Zebrafish

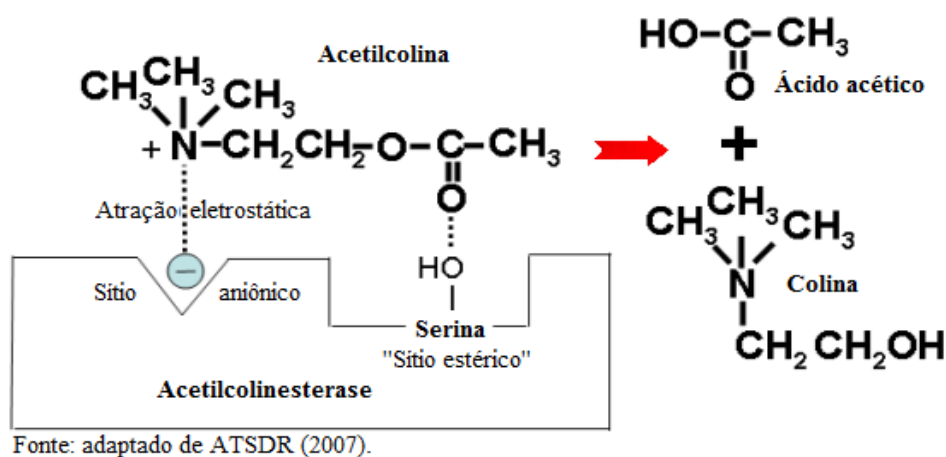
Biomarcadores são, por definição, alterações do organismo exposto a um produto (xenobiótico) em um nível sub-individual, medido por sinais bioquímicos, moleculares, genéticos, imunológicos e/ ou fisiológicos (VanGestel e VanBrummelen, 1996; Regoli et al., 2002). As alterações desses componentes indicam um comprometimento do estado normal do organismo, mostrando que, o contaminante em questão foi absorvido e distribuído sistemicamente, provocando toxicidade para o indivíduo. (Van Der Oost et al., 2003). Essas informações são importantes, pois auxiliam na compreensão dos efeitos e modo de ação de diferentes químicos e na prevenção de seus possíveis perigos (Domingues et al., 2019). Além do mais, análises de biomarcadores também podem auxiliar na detecção precoce da existência de substâncias tóxicas no ambiente, o que contribui para identificar espécies ou populações em risco, avaliar a contaminação e determinar o grau de severidade dos efeitos causados pelos xenobióticos (Stegeman et al., 1992; De Caprio, 1997; Van Der Oost et al., 2003).

Diferentes tipos de biomarcadores podem ser analisados em organismos expostos a agentes estressores presentes no meio ambiente, para avaliar impactos de compostos químicos (Van der Oost et al., 2003). As alterações das atividades enzimáticas, da concentração de compostos não enzimáticos e antioxidantes, e da toxicidade de oxidante mediada por oxidação/carbonilação proteica, peroxidação lipídica e danos ao DNA, são exemplos de biomarcadores (Printes, 2004). Geralmente, os biomarcadores mais sensíveis são aqueles que indicam alterações nos níveis e nas atividades de enzimas de biotransformação, sendo que, em peixes, a atividade destas enzimas pode ser induzida ou inibida por xenobióticos (Bucheli e Fent, 2018). Dentre os biomarcadores escolhidos para essa análise destacam-se a Acetilcolinesterase (AChE), uma importante enzima na manutenção da função nervosa (Olsen et al., 2001); Catalase (CAT), enzima que promove a detoxificação das células; Glutathione S-transferase (GST), uma família de enzimas com um papel fundamental na biotransformação de xenobióticos (Hyne e Maher, 2003); Lactato desidrogenase (LDH), envolvida na fisiologia muscular (Diamantino et al., 2001) e a peroxidação lipídica LPO, processo relacionado aos radicais livres nas membranas celulares (Esterbauer et al., 2001).

- 1) Acetilcolinesterase (AChE), é uma enzima envolvida no sistema nervoso central, em

funções neurais e musculares (Araújo et al., 2016). A AChE participa na hidrólise de acetilcolina (ACh) (Figura 4), cuja função primordial é transmitindo sinapses neuronais (Purves et al., 2008; Fischer et al 2015). Essa enzima é de suma importância, pois sua inibição pode acarretar no acúmulo do neurotransmissor ACh na fenda sináptica, levando a hiperestimulação dos receptores nos neurônios, portanto, à ativação da transdução de sinal constante pelas sinapses colinérgicas (Fukuto, 1990; Fulton et al., 2001; Russom et al., 2014). A mudança na atividade de AChE, também pode causar alterações no comportamento e na atividade neuromuscular, sendo considerada como um importante biomarcador de neurotoxicidade (Gagné, 2014). Determinados contaminantes podem causar a alteração/inibição de AChE, que causa a hiperestimulação de receptores de acetilcolina, ocasionando alterações fisiológicas e neurológicas (Haverrot et al., 2015). Normalmente, em ecotoxicologia a quantificação da atividade da AChE é utilizada para avaliar organofosforados e inseticidas (Jadhav e Rajini 1994; Drobne et al., 2018), herbicidas (Moraes et al., 2009), antibióticos (Tu et al., 2009) e metais (Elumalai et al., 2002; Calisi et al., 2009).

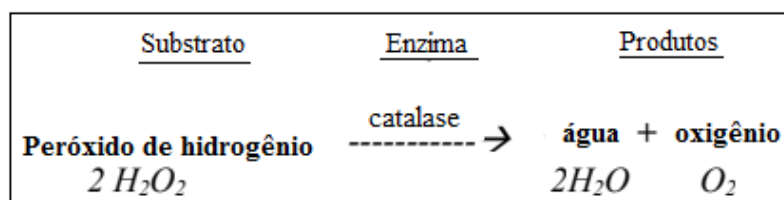
Figura 4) Esquema da quebra enzimática da acetilcolina



2) As Catalases (CAT) são enzimas que participam dos sistemas de defesa, principalmente contra as moléculas geradas durante o estresse oxidativo, conhecidas como espécies reativas de oxigênio (ERO), catalisando o peróxido de hidrogênio (composto tóxico), em água e oxigênio (compostos não nocivos) (Scibior e Czczot, 2016) (Figura 5). A principal atividade da CAT

está associada aos peroxissomos (presentes principalmente no fígado) ou microcorpos que atuam no metabolismo dos ácidos graxos (Huggett et al., 1992). CAT está conectada a atividade da glutathione peroxidase (GPx) para combater a exposição ao estresse oxidativo causada por contaminantes ambientais (Diesseroth e Dounce 1970). A CAT desempenha um papel importante no processo de detoxificação de xenobióticos em peixes (Oliveira et al., 2009). É comum observar aumento de CAT em modelos experimentais expostos a diferentes químicos potencialmente tóxicos (Oliveira et al., 2009).

Figura 5) Esquema da da catalização da enzima catalase (CAT).

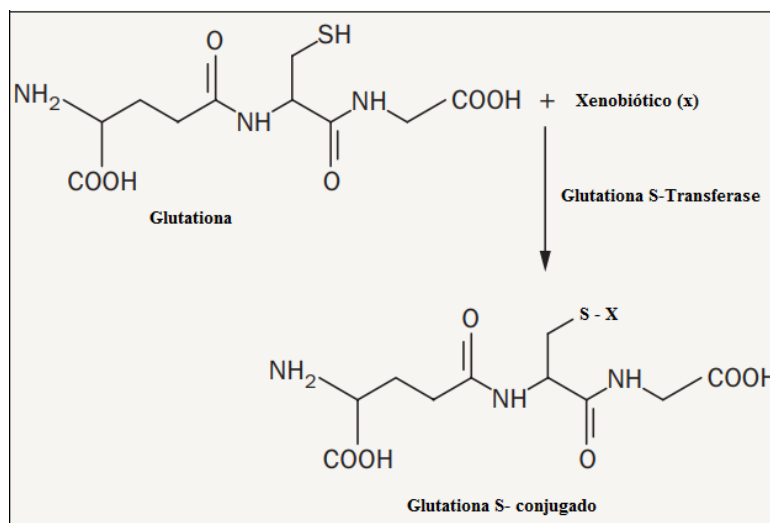


Fonte: <https://bio.libretexts.org/>

3) A Glutathione S-transferase (GST), é considerada a principal enzima de fase II. Resumidamente os sistemas de detoxificação de xenobióticos convertem compostos lipofílicos em produtos mais facilmente excretados, por meio da ação de uma variedade de proteínas e enzimas. Na fase I, reações de oxidação, redução e hidrólise resultam em metabólitos mais polares do que as substâncias originais. Essas mudanças aumentam a polaridade dos xenobióticos, criando sítios moleculares que facilitam sua conjugação durante a fase II. Na fase II, os metabólitos da primeira fase e os xenobióticos polares ligam-se a substratos endógenos, produzindo conjugados mais solúveis em água, os quais podem ser facilmente excretados da célula (Van Der Oost et al., 2003). Os xenobióticos são conjugados com diversas substâncias e, dentre as reações importantes da fase II, tem-se a conjugação da glutathione (GSH) aos compostos químicos (xenobióticos). A conjugação de agentes tóxicos com o tripeptídeo GSH é catalisada, na sua fase inicial, pela GST, que atua na fase II da biotransformação, prevenindo danos à membrana celular e a outras macromoléculas (Figura 6) (Hayes et al, 1995; Dybing et al., 2002; Van Der Oost et al., 2003; Malmezzat et al., 2000).

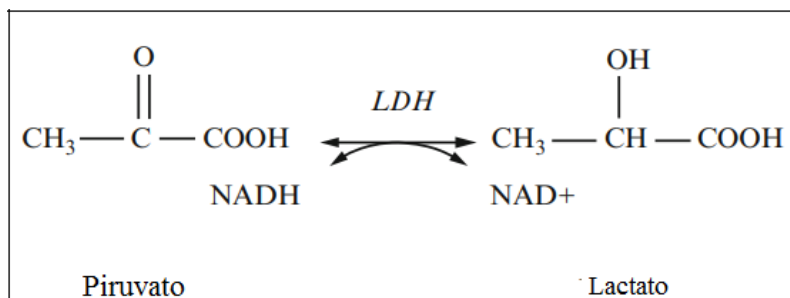
Para Gagné (2014), a conjugação de xenobióticos polares à glutatona (GSH) representa uma importante via da fase II de invertebrados e peixes. Esta reação ocorre pela da ligação de compostos eletrofílicos ao grupo nucleofílico tiol do aminoácido cisteína da GSH, sendo catalisada pela glutatona S-transferase (GST) (Torres et al., 2004; Nascimento, 2008). Assim, as GST estão envolvidas na biotransformação de poluentes, sendo utilizada como biomarcador ambiental (Monteiro et al., 2006). Por fim, o aumento de GST no organismo pode estar relacionado à ação de compostos nocivos no organismo (Schelin et al., 1983).

Figura 6) Esquema da Ação das glutatonas S-transferases.



Fonte: Adaptado de Simic et al. (2009).

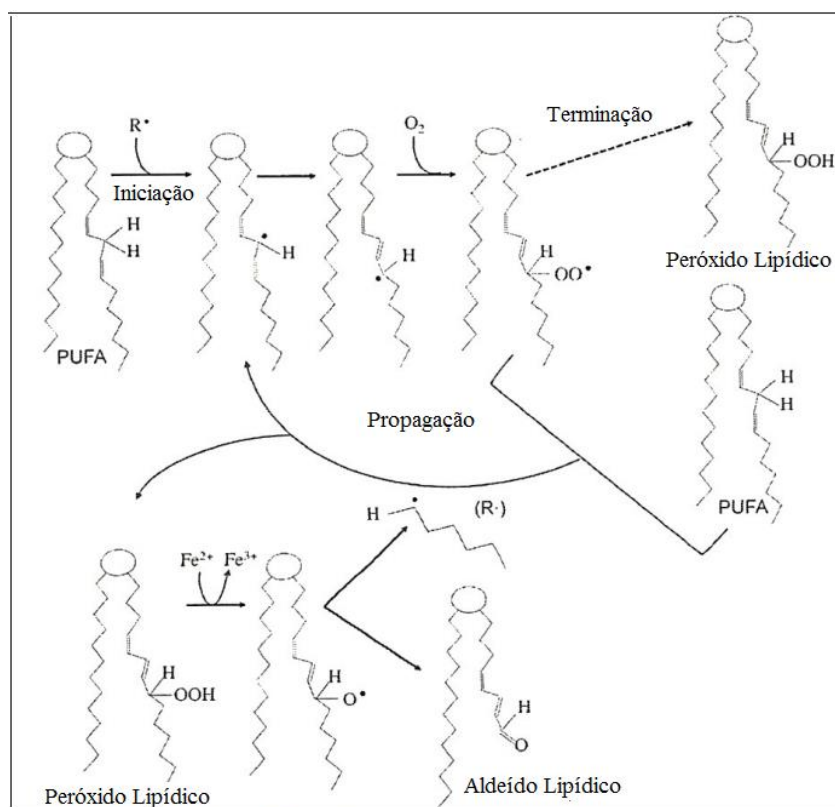
4) Lactato desidrogenase (LDH), faz parte do metabolismo celular, que participa do processo de transformação da glicose em energia nas células. Esta enzima está no processo de conversão de piruvato em lactato, pela via anaeróbia nos processos de produção de energia celular, e, simultaneamente, converte o NADH em NAD⁺ (Neves, 2012; Silva, 2015) (Figura 7). Tem grande relevância em condições de estresse induzidos por contaminantes ambientais, quando a energia pode ser necessária em um curto período de tempo (De Coen et al., 2001; Monteiro et al., 2016). As mudanças na atividade de LDH são usadas como um indicador de exposição a produtos químicos (Gupta et al., 1991). Geralmente, aumentos de atividade de LDH são comumente relatadas em invertebrados expostos a xenobióticos (Ribeiro 1999; Diamantino et al., 2001).

Figura 7) Esquema de catalização do lactato desidrogenase (LDH)

Fonte: Adaptado de Maes et al. (2014).

5) Peroxidação lipídica (LPO), é a degradação oxidativa dos lípidos. O excesso de ERO não removido pelo sistema antioxidante pode causar danos aos lipídeos pela sua oxidação por via enzimática ou por interação com radicais livres (Smart e Hodgson, 2008; Gagné, 2014). Quando as ERO apresentam reatividade suficiente para extrair um átomo de hidrogênio de um lipídeo intacto, inicia-se a lipoperoxidação ou peroxidação lipídica, que levam a degradação das membranas (Filipak, 2014). Este processo é iniciado por um mecanismo de reação em cadeia de um radical livre (R), que remove um hidrogênio de um ácido graxo poli-insaturado (PUFA). A fase de terminação é quando o radical lipídico formado pode reagir com oxigênio (O₂), produzindo um radical de peróxido lipídico. Caso o PUFA contenha mais de três insaturações, o radical gerado reage com outro radical de peróxido lipídico, formando um peróxido cíclico. Este radical pode ainda reagir com outro ácido graxo, produzindo outro radical lipídico e um peróxido lipídico, fase denominada de propagação (Smart e Hodgson, 2008; Filipak, 2014) (Figura 8). Estudos demonstraram aumento da LPO em tecidos como consequência de toxicidade de compostos (Franco-Bernardes et al., 2015; Felício et al., 2018). Filipak (2014) cita que, a quantificação da lipoperoxidação é uma das técnicas mais comumente empregadas na determinação de estresse oxidativo em peixes, organismos estes que têm quantidades elevadas de lipídios com resíduos de ácidos graxos poli-insaturados.

Figura 8) Esquema do mecanismo de peroxidação lipídica (LPO).



Fonte: Adaptado de Boelsterli (2007).

5.4 Comportamento em zebrafish

A caracterização comportamental no modelo zebrafish é importante como biomarcador de toxicidade de compostos químicos. Estes testes podem aumentar a compreensão sobre toxicidade e o mecanismo de ação de xenobióticos (Siebel et al., 2015). Embriões e larvas de zebrafish são considerados modelos adequados para essas avaliações comportamentais, devido ao seu pequeno tamanho, facilidade de manuseio e rápido desenvolvimento (Portugues e Engert, 2009). Estudos realizados com zebrafish têm mostrado que esse organismo é um modelo experimental eficaz e sensível para ser usado em análise comportamental (Scheil et al., 2008; Vieira et al., 2009; Portugues e Engert, 2009; Colwill e Creton, 2011; Baley et al., 2016). Ensaios como os que utilizam mudanças alternadas de claro e escuro, com a finalidade de detectar alteração na atividade natatória, são comumente usados para avaliar a resposta do organismo ao estresse, mediante a exposição à xenobióticos (Burgues e Granato, 2007; Andrade et al., 2006). Um ponto comumente usado em

análises toxicológicas, dentro do contexto dos parâmetros comportamentais, é a locomoção, cuja maioria das análises utiliza a tecnologia automatizada. Análises de locomoção de larvas de zebrafish são indicadores comumente descritos na literatura científica para estudos dos efeitos de agentes tóxicos (Bichara et al., 2013). No caso do zebrafish, a locomoção, também pode ter correlação com danos neurológicos no sistema nervoso central (SNC), provocado pela ação de químicos nos estágios iniciais da vida do organismo (Irons et al., 2010; Padilla et al., 2011; Selderslaghs et al., 2010) e a toxicidade subletal de poluentes (Ulhaq et al., 2013). As alterações na neurogênese e na concentração de neurotransmissores no SNC, são correlacionáveis às alterações comportamentais. Silva et al (2008) relatam que o sistema colinérgico (referente ao sistema que depende da liberação de acetilcolina para atuar) é parâmetro para avaliar a ação de xenobióticos e alterações de padrões comportamentais.

Como já mencionado, com a inibição de AChE, a acetilcolina não é degradada, causando um acúmulo deste neurotransmissor nas sinapses nervosas e junções musculares. Esses comprometimentos levam a alterações comportamentais, como por exemplo, hiperatividade, asfixia e até a morte (Silva et al, 2008). Estudos sobre a ação de inseticidas organofosforados demonstraram a inibição de AChE, causando um efeito sobre a atividade locomotora (Baynes e Dominiczak, 2007). Dentre as possíveis alterações no comportamento locomotor, as principais delas incluem alteração na distância total percorrida, a velocidade média, o ângulo de giro, a frequência de movimento e a duração total de movimento, permitindo a identificação de nocividade de diferentes compostos químicos (Selderslaghs et al., 2013). Análises comportamentais são importantes também dentro de um contexto ecológico, pois muitos contaminantes perturbam a locomoção normal dos peixes em concentrações muito inferiores às aquelas que causam a mortalidade dos organismos. Há registros na literatura de alteração de comportamento de embriões de peixes em concentrações 375 vezes menores que a LC10 (Klüver et al., 2015). Ainda quanto à relação ecotoxicológica e comportamental de peixes, larvas e embriões, o comprometimento da função locomotora influencia, principalmente, a busca por alimentos, reprodução e, conseqüentemente a sobrevivência do organismo (Lovern et al., 2007). Por fim, as análises de comportamento podem fornecer medidas sensíveis de exposição a contaminantes. Estas respostas têm alta relevância ecológica, pois os efeitos podem ser traduzidos,

em longo prazo, à saúde e na sobrevivência das populações (Scott e Sloman, 2004). Uma vez que o comportamento é medido por respostas fisiológicas dos organismos em condições estressantes, os usos desses marcadores biológicos contribuem para elucidação do modo de ação de compostos químicos, elevando a fidelidade dos resultados observados (Lovern et al., 2007).

5.5 Comprimento e frequência cardíaca em zebrafish

Os estágios de desenvolvimento embrionários são demonstrados por Kimmel et al (1995). Embriões com 120 hpf têm medidas aproximadas pré-estabelecidas de comprimento total do corpo. São caracterizados como xenobióticos que afetaram o desenvolvimento embrionário, qualquer poluente capaz de provocar alteração na estrutura embrionária. Para Nagel (2002), alterações no comprimento e frequência cardíaca de zebrafish expostos aos químicos são parâmetros categorizados como de subletalidade e teratogenicidade. As alterações relacionadas ao comprimento larval em zebrafish estão fortemente associadas a deformidades morfológicas, assim como malformações esqueléticas, saco vitelino e edema do pericárdio. Já a avaliação dos batimentos cardíacos tem grande relevância, pois as alterações neste tecido podem representar condições patológicas do organismo (De Luca et al., 2014). Para Mcgrath (2008), o zebrafish é um modelo útil para se estudar doenças e alterações cardíacas, devido à semelhança ao coração de mamíferos, desenvolvimento rápido, e métodos genéticos disponíveis. Estes organismos possuem mecanismos moleculares subjacentes à formação de vasos e morfogênese semelhantes aos dos vertebrados superiores, mostrando um notável grau de conservação anatômica e funcional (Isogai et al., 2001).

Outra característica importante das análises cardíacas de zebrafish é que o embrião se desenvolve em um ovo translúcido que possibilita a visualização das fases embrionárias, superando o problema da acessibilidade limitada de órgãos em outros organismos. A clareza óptica permite a observação, *in vivo*, de eventos fisiológicos ou patológicos durante o desenvolvimento do coração (Stainer et al., 1994). Como o desenvolvimento cardíaco embrionário é rápido é também rápido observar e quantificar a função cardíaca dos embriões (Narumanchi, et al., 2021). Um outro ponto importante relacionado ao zebrafish, é que o modelo possui um sistema cardíaco e vascular

relativamente simples, fácil de ser entendido, observado e estudado (Isogai et al., 2001). Além do que, é um dos modelos mais importantes para a biologia de desenvolvimento e regeneração do coração. Por estas facilidades de uso desse modelo biológico e pelo zebrafish possuir semelhanças genéticas com doenças humanas, ele vem sendo cada vez mais importante para estudos de doenças cardíacas humanas, na busca de novas terapias para a prevenção e tratamento da insuficiência cardíaca (Beffagna, 2019). As mudanças cardíacas são facilmente observadas por análises simples de microscópios, durante as primeiras etapas de vida deste bioindicador (Zhu et al., 2013; Ibrahim et al., 2020). O diuron em altas concentrações (2,50 mg/L e 10,00 mg/L) é capaz de diminuir a frequência cardíaca em peixe (Medaka japonês), após 7 e 13 dias de exposição (Ibrahim et al., 2020). Zhu e colaboradores (2013) também encontraram diminuição da frequência cardíaca de embriões (*Gobiocypris rarus*) expostos a altas concentrações (2.901, 4.138, 5.902, 8.418 e 12.000 mg/L) de DCA.

Por fim, o mal funcionamento cardíaco de embriões de zebrafish, principalmente durante o período embrio-larval, pode impedir o indivíduo de chegar a fase adulta. Análises como essas, mostram as consequências da contaminação do ambiente aquático por praguicidas (Ibrahim et al., 2020). Por isso, é de extrema importância o desenvolvimento de estudos que visam avaliar as consequências diretas de contaminantes ambientais sobre o sistema cardíaco e vascular dos organismos endêmicos de locais impactados por esses compostos.

6 Justificativa

O uso de praguicidas está entre os principais instrumentos do modelo de agricultura. Na classe dos herbicidas, o diuron se destaca como um dos mais utilizados no território brasileiro, com cerca de 6,5 mil de toneladas aplicadas na agricultura, somente no ano de 2021 (IBAMA, 2023).

A problemática do diuron se estende além do herbicida, uma vez que, seus metabólitos DCA e DCPMU, também são persistentes no ambiente, potencialmente tóxicos e a legislação brasileira não prevê o monitoramento destes químicos nos compartimentos ambientais. Assim, o uso intensivo do diuron na agricultura, agregado aos seus próprios efeitos danosos, bem como de seus metabólitos, mostram a necessidade da continuidade de desenvolvimento de pesquisas que

identifiquem a toxicidade desse composto. Nesse cenário, análises modernas, como as que utilizam marcadores bioquímicos e comportamentais, se destacam pela sensibilidade de avaliar e identificar o perigo potencial de xenobióticos, além de permitir uma melhor compreensão do modo de ação e prevenir riscos de praguicidas amplamente utilizados na agricultura (Domingues et al., 2010).

Hoje, sabe-se que os animais aquáticos são fundamentais na identificação dos perigos ao meio ambiente e para avaliação do risco de agentes químicos contaminantes. Para Eissa (2010), análises em organismos aquáticos expostos a poluentes tem grande destaque para explorar os efeitos dos contaminantes e estressores ambientais, uma vez que o ambiente aquático é o principal destino desses produtos. Assim, o modelo escolhido, o peixe zebrafish, tem características adequadas para serem usados como organismo-teste de toxicidade (Nagel, 2002; Scholz et al., 2008). Outro fator de interesse ligado à escolha a do *Danio rerio*, é devido às implicações éticas, baseadas nos conceitos dos 3R's, que substituem os testes tradicionais para métodos alternativos na avaliação de substâncias químicas. E por fim, não existem estudos que avaliam o potencial tóxico do diuron, DCA e DCPMU sobre o aspecto bioquímico e comportamental, com concentrações encontradas no meio ambiente, utilizando o modelo experimental zebrafish em sua fase embrio-larval.

7 Objetivos

Essa tese propõe uma avaliação dos possíveis danos induzidos pelos xenobióticos diuron, DCA e DCPMU em embriões e larvas de zebrafish. Para tanto, são apresentados os seguintes objetivos:

- Avaliar se as exposições ao diuron, DCA e DCMPU provocam alterações nos parâmetros bioquímicos de larvas de zebrafish, por meio de análises das atividades das enzimas acetilcolinesterase (AChE), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), lactato desidrogenase (LDH) e peroxidação lipídica (LPO);
- Avaliar se a exposições ao diuron, DCA e DCMPU causam mudanças de comportamento de larvas de zebrafish;

Avaliar se as exposições ao diuron, DCA e DCMPU causam alterações letais, subletais e teratogênicas em larvas de zebrafish;

- Avaliar se as exposições ao diuron, DCA e DCMPU alteram o comprimento e a frequência cardíaca de embriões e larvas de zebrafish;
- Avaliar se as exposições ao diuron, DCA e DCMPU provocam alterações histopatológicas no fígado, baço e cérebro em adultos de zebrafish;

8 Referências

ABNT. NBR 15088: ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda: método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro, 2011.

Abubakar Y, Tijjani H, Egbuna C, Adetunji C. O, Kala S., Kryeziu T. L. 2020. “Pesticides, history, and classification,” in Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control, eds Egbuna C., Sawicka B. (Amsterdam: Academic Press;), 29–42.

Acayaba RD, de Albuquerque AF, Ribessi RL, Umbuzeiro G de A, Montagner CC. Occurrence of pesticides in waters from the largest sugar cane plantation region in the world. Environmental Science and Pollution Research. 2021; 28: 9824–9835.

Ali S, Harald GJ, Richardson MK. Large-scale assessment of the zebrafish embryo as a possible predictive model in toxicity testing. PloS one, 6: 21076, 2011.

Andrade TS, Henriques JF, Almeida AR, Machado AL, Koba O, Giang PT, Domingues, I. Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. Aquatic Toxicology. 2016; 390–399.

ANVISA. Diuron. Índice Monográfico de Ingredientes Ativos, 2017. [citado 01 de junho de 2023]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/ptbr/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/d/4283json-file1>.

APVMA. The reconsideration of approvals of the active constituent diuron, registrations of products containing diuron and their associated labels. Tech. Assess; 2005.

APVMA. Review of the mammalian toxicology and metabolism/toxicokinetics of diuron. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority; 2011.

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

Aragão MA, Araújo, RPA. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. Cap. 6, p: 117 – 152. 2006. In: Zagato, P.A. e Bertoletti, E. 2006. Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações. Zagatto e Bertoletti (org.) São Carlos: Rima; 2006.

Asgari G, Abdipour H, Shadjou AM. A review of novel methods for Diuron removal from aqueous environments. Heliyon. 2023; 23134.

Astrogildo T, Considerações sobre o conceito dos 3Rs e o potencial conflito com novas compreensões do animal experimental. Revista Brasileira de Zootecias, 2018, 19(2), 97-113.

Bahe AR. Emerging environmental contaminants and antibiotic resistance: science & policy

concerns. 2005. Animal waste management symposium. [citado 21 de Junho]. Disponível em: http://www.cals.ncsu.edu/waste_mgt/05wastesymposium/PDFS/Bahe.pdf.

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

Barros TP, Alderton WK, Reynolds HM, Roach AG, Berghmans, S. Zebrafish: an emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. Br. J. Pharmacol. 2008; 154 (7), 1400-1413.

Barizon RRM, Figueiredo RO, Dutra DRCS, Regitano JB, Ferracini VL. Pesticides in the surface waters of the Camanducaia River watershed, Brazil. Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes. 2020; 283–292.

Barbieri E, Phan VN, Gomes V. Efeito do DSS, dodecil sulfato de sódio, no metabolismo e na capacidade de natação de *Cyprinus carpio*. Rev Bras Biol. 1998; 58(2):263-71.

Barbieri E. Use of oxygen consumption and ammonium excretion to evaluate the sublethal toxicity of cadmium and zinc on *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936, Crustacea). W Environ Res. 2007; 79(6): 641-6.

Baynes, J. Dominiczak, M. Bioquímica Médica. 2009. Elsevier, médica. Elsevier, RJ.

Beffagna G. Zebrafish as a Smart Model to Understand Regeneration After Heart Injury: How Fish Could Help Humans. Frontiers in Cardiovascular Medicine. 2019; 6.

Bernet D, Schmith H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahli, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. Journal of Fish Diseases. 1999; 22, 1: 25-34.

Bichara D, Calcaterra NB, Arranz S, Armas P, Simonetta SH. Set-up of an infrared fast behavioral assay using zebrafish (*Danio rerio*) larvae, and its application in compound biotoxicity screening. J Appl Toxicol. 2013; 45-66.

Bonifacio AF, Hued AC. Single and joint effects of chronic exposure to chlorpyrifos and glyphosate based pesticides on structural biomarkers in *Cnesterodon decemmaculatus* Chemosphere. 2019; 236. 124311.

Boran H, Altinok I, Capkin E. Histopathological changes induced by maneb and carbaryl on some tissues of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Tissue Cell. 2010; 42:158-64.

Braunbeck T, Böttcher M, Hollert H, Kosmehl T, Lammer E, Leist E, Rudolf M, Seitz, A. Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species – an update. ALTEX, 2005; v.22, 87–102.

Braunbeck T, Kais B, Lammer E, Otte J, Schneider K, Stengel D, Strecker R. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. Environmental Science and Pollution Research, 2014. 22(21), 16247–16261.

Brasil, Ministério da Agricultura, P. e A. de D.A. Portaria No. 43, de 21 de Fevereiro de 2020. Available

<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumosagropecuarios/insumosagricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas> (accessed on 11 October 2023).

Bucheli TD, Fent K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination

in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2018; 25, 201-268.

Burgess HA, Granato M. Modulation of locomotor activity in larval zebrafish during light adaptation. *J. Exp. Biol.* 2007; 210, 2526–2539.

Calisi A, Lionetto MG, Schettino T. Pollutant-induced alterations of granulocyte morphology in the earthworm *Eisenia foetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2009; 72, 1369-1377.

Camargo FAO, Silva LS, Merten GH, Baveye, EW. Triplett Brazilian agriculture in perspective. *Adv. Agron.* 2021; pp. 53-114, 10.1016/bs.agron.2016;10.003.

Carlsson G, Patring J, Kreuger J, Norrgren L, Oskarsson A. Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquatic Toxicology*. 2013; v.15, p.126:30-41.

CETESB. Diagnóstico da contaminação de águas superficiais, subterrâneas e sedimentos por agrotóxicos. São Paulo: [s.n.]. [citado 25 de junho de 2023]. Disponível em: https://cetesb.sp.gov.br/publicacoes-relatorios/projetos-fehidro/relatorio-agrotoxicos_28_11_2019_concluido_pdf-1/.

Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada/Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” PIB do Agronegócio Brasileiro. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>.

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

Colwill RM, Creton R. Locomotor behaviors in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Behavioural Processes*. 2011; 86(2), 222–229.

CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA. Directiva 98/83/CE relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, n. 330, p. 32–54, 1998

Costa CR, Olivi P, Botta CMR, Espinolla ELG. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*. V.31, n.7, 1820-1830, 2008.

De Caprio AP. Biomarkers: coming age for environmental health and risk assessment. *Critical review. Environ. Sci. Technol.* 1997; 31, 1837-1848.

De Coen WN, Janssen CR. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 1997; volume 6, 43–55.

De Luca E, Zaccaria GM, Hadhoud M, Rizzo G, Ponzini R, Morbiducci U, Santoro MM. ZebraBeat: a flexible platform for the analysis of the cardiac rate in zebrafish embryos. *Scientific Reports*. 2014; 4(1).

Diamantino TC, Almeida E, Soares A, Guilhermino L. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* straus. *Chemosphere*. 2001; 45, 553-560.

Diesseroth A, Dounce AL. Catalase: Physical and Chemical Properties, Mechanisms of Catalysis and Physiological Role *Physiol. Rev.* 1970; 50, 319-375.

DIRECTIVE. 63.EU Of The European Parliament and of The Council on The protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of The European Union*. 2010; L276;33-79

Domingues I, Oliveira R, Lourenço J, Grisolia CK, Mendo S, Soares AMVM. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): comparison of responses in zebrafish 31ândi life stages and adults. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Toxicology & Pharmacology* 2019; 152(3):338-345.

Drobne D, Hopkin SP. The Toxicity of Zinc to Terrestrial Isopods in a "Standard" Laboratory Test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018; 31, 1-6.

Dupraz V, Coquillé N, Ménard D, Sussarellu R, Haugarreau ., Stachowski-Haberkorn S. Microalgal sensitivity varies between a diuron-resistant strain and two wild strains when exposed to diuron and irgarol, alone and in mixtures. *Chemosphere*. 2016; 151:241–252.

Dybing E, Doe J, Groten J, Kleiner, J, O' brien J, Renwick AG, Schlatter J, Steinberg, P, Tritscher A, Wlaker R, Younes M. Hazard characterization of chemicals in food and diet. *Food Chemical and Toxicology*. 2002; 237-282.

Eaton RC, Farley RD. Spawning cycle and egg production of zebrafioh, *Rrachvdanio rerio*, in the laboratory. *Copeia*. 1974; 1,195-209.

Eissa BL, Ossana NA, Ferrari L, Salibian A. Quantitative behavioral parameters as toxicity biomarkers: fish responses to waterborne cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 2010; 58, 1032-1039.

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

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 2001; 11:81-128.

Elumalai M, Antunes C, Guilhermino L. Effects of single metals and their mixtures on selected enzymes of *Carcinus maenas*. *Water Air Soil Pollut*. 2002; 141, 273-280.

FAO. Ranking of the United Nations Food and Agriculture Organization (FAO) on the use of pesticides. [citado 1 de Junho de 2023]. Disponível em: <https://www.fao.org/statistics/en/>.

Felício AA, Freitas JS, Scarin JB, Ondeí LS, Teresa FB, Schlenk D, Almeida EA. Isolated and mixed effects of diuron and its metabolites on biotransformation enzymes and oxidative stress response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018; 149, 248-256.

Fernández L. 2021. Global pesticide use by country | Statista. Available online at: <https://www.statista.com/statistics/1263069/global-pesticide-use-by-country/> (accessed Nov 30, 2023).

Field JA, Reed RJ, Sawyer TE, Griffith SM, Wigington PJ. Diuron occurrence and distribution in soil and surface and ground ware associated with grass seed production. *J Environ Qual*. 2003; 32:171-9.

Filipak FN. Pollutants and Oxidative Stress. In: Almeida, E. A.; Ribeiro, C. A. O. (Ed.). *Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems*. Boca Raton: CRC Press, 2014.

Fischer A, Wolman M, Granato, M, Parsons M, McCallion A S, Proescher J, English E. Carbamate nerve agent prophylactics exhibit distinct toxicological effects in the zebrafish embryo model. *Neurotoxicology and Teratology*. 2015; 50, 1–10.

Franco-Bernardes MF, Maschio LR, Azeredo-Oliveira MTV, AlmeidaEA. The use of biomarkers to

study the effects of the mixture of diuron and hexazinone on small and large *O. Niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*. 2015; 10, 83-92.

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

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

Gagné, F. *Biochemical Ecotoxicology: principles and methods*. London, Waltham, San Diego: Elsevier, 2014; 257 p.

Giacomazzi S, Cochet N. Environmental impact of diuron transformation: a review. 2004; *Chemosphere*. 56, 1021-1032.

Guilhermino L, Lopes MC, Donato AM, Silveira L, Carvalho A P, Soares AMVM. Comparative study between the toxicity of 3,4-dichloroaniline and sodium bromide with 21-days chronic test and using lactate dehydrogenase activity of *Daphnia magna* Straus. *Chemosphere*. 1994; 28(11), 2021–2027.

Goldemberg J, Coelho ST, Guardabassi P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. *Energy Policy* 2008; v. 36 (4).

Goody DC, Chilton P.J, Harrison I. A field study to assess the degradation and transport of diuron and its metabolites in a calcareous soil. *Sci. Total Environ*. 2002; 297, 67–83.

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

Hahn ME, Timme-laragy AR, Karchner SI, Stegeman JJ. Free radical biology and medicine Nrf2 and Nrf2-related proteins in development and developmental toxicity: Insights from studies in zebrafish (*Danio rerio*). *Free Radic Biol Med*. 2015; 88:275–89.

Haverroth GMB, Welang C, Mocelin RN, Postay D, Bertoncetto K T, Francescon F, Dalla Corte CL. Copper acutely impairs behavioral function and muscle acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2015; 122, 440–447.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey I. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2005; 45: 51-88, 2005.

Hayes, W.J. *Pesticides studied in man*. Williams and Wilkins. 1982, Baltimore, MD, p. 672.

Hedlund J, Longo SB, York R. Agriculture, pesticide use, and economic development: a global examination (1990-2014). *Rural Sociology*. 2019; v. 85, n. 2, p. 519-544.

Hill A, Teraoka H, Heideman W, Peterson R. Zebrafish as a model vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicological Sciences*. 2005; 86, 6-19.

Hodge HC, Downs WL, Panner B, Smith D, Maynard E, Clayton J Jr, Rhodes R. Oral toxicity and metabolism of Diuron in rats and dogs. *Food Cosmet. Toxicol*. 1967; 5: 513.

Huggett RJ, Kimerle RA, Mehrle-Jr. PM, Bergman HL. *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*, 1992; Lewis Publisher, Chelsea.

Hutchinson TH, Solbé J, Kloepper-Sams PJ. Analysis of the ECETOC Aquatic Toxicity (EAT) database. III - Comparative toxicity of chemical substances to different life stages of aquatic organisms. *Chemosphere*. 1998; 36(1), pp.129–142.

Hyne RV, Maher WA. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003; 54, 366-374.

IBAMA. Painéis de informações de agrotóxicos — Ibama. [citado em 8 de Junho]. Disponível em: <<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos#Painel-comercializacao>>

IBGE. Produção Agrícola Municipal - Tabela 1612 - Área plantada, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras temporárias 2020. [citado 11 de Julho]. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1612..>

Ibrahim MA, Zulkifli SZ, Azmai MNA, Mohamat-Yusuff F, Ismail, A. Embryonic toxicity of 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) on Javanese medaka (*Oryzias javanicus* Bleeker, 1854). *Toxicology Reports*. 2020; 7, 1039–1045.

Ibrahim MA, Zulkifli SZ, Azmai MNA, Mohamat-Yusuff F, Ismail A. Reproductive Toxicity of 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) on Javanese Medaka (*Oryzias javanicus*, Bleeker, 1854). *Animals*. 2021; 11(3), 798.

Ihlaheh-Catalano SM, Bailey KA, Hester SD, Jones C, Ren H, Cardoso AP, de Camargo JLV, de Oliveira MLCS. Transcriptional profile of diuron-induced toxicity on the urinary bladder of male Wistar rats to inform mode of action. *Toxicol. Sci*. 2011; 122, 330-338.

Irons TD, MacPhail RC, Hunter DL, Padilla, S. Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*. 2010; 32(1), 84–90.

Isogai S, Horiguchi M, Weinstein BM. The Vascular Anatomy of the Developing Zebrafish: An Atlas of Embryonic and Early Larval Development. *Developmental Biology*. 2001; 230 (2), 278–301.

Iyer P. Evidence on the development and reproductive toxicity of diuron. Draft. Reproductive and Cancer Hazard Assessment Section. Office of Environmental Health Hazard Assessment. 2002.

Jadhav KB, Rajini PS. Neurophysiological alterations in *Caenorhabditis elegans* exposed to dichlorvos, an organophosphorus insecticide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2009; 94, 79-85.

Johnson, L L, Stehr CM, Olson OP, Myers M S, Pierce SM, Wigren C A, McCain B B, Varanasi U. Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the northeast coast of the United States. *Environmental Science and Technology*. 1993; 27 (13): 2759-277.

Kamarudin N A, Zulkifli SZ, Azmai MNA, Abdul-Aziz F Z, Ismail A. Herbicide Diuron as Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) through Histopathological Analysis in Gonads of Javanese Medaka (*Oryzias javanicus*, Bleeker 1854). *Animals*. 2020; 10(3), 525.

Kao CM, Ou WJ, Lin HD, Eva AW, Wang TL, Chen SC. Toxicity of diuron in HepG2 cells and zebrafish embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019; 172, 432–438.

Kendall RJ, Anderson TA, Baker RJ, Bens CM. In: Klaassen CD. Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons, New York. v.6, n.1. cap 29, 2021.

Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*. 1995; v.203, n.3, p.253-310.

Klassen CO, Watkins JB. *Toxicologia, A Ciência Básica Dos Tóxicos de Casarett e Doull's*. 5ª ed, 2001.

Klüver N, König M, Ortmann J, Massei R, Paschke A, Kühne R, Scholz S. Fish Embryo Toxicity Test: Identification of Compounds with Weak Toxicity and Analysis of Behavioral Effects To Improve Prediction of Acute Toxicity for Neurotoxic Compounds. *Environmental Science & Technology*. 2015; 49(11), 7002–7011.

Köck-Schulmeyer M, Villagrasa M, López de Alda M, Céspedes-Sánchez R, Ventura F, Barceló D. Occurrence and behavior of pesticides in wastewater treatment plants and their environmental impact. *Science of The Total Environment*. 2013; 458-460, 466–476.

Koeter, HBWM. Development, implementation and use of alternative test methods in regulatory hazard assessment in OECD member countries. *Environment, health and safety division*. 2002; 32, 55-59.

Konstantinou, IK, Albanis TA. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environment International*. 2004; 30 (2), 235–248.

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

Lammer E, Carr GJ, Wendler K, Rawlings J M, Belanger SE, Braunbeck T. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2009; 149(2), 196–209.

Lamoree MH, Swart CP, Van der Horst A, Van Hattum B. Determination of diuron and the antifouling paint biocide Irgarol 1051 in Dutch marinas and coastal waters. *J. Chromatogr*. 2002; A 970, 183–190.

Lima TRR, Sales BCP, Pereira LC. Oxidative Stress Monitoring in In Vitro and In Vivo Models. In: Mayura PK. *Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Diseases*. 1ed. Singapore: Springer; 2020.

Lovern S B, Strickler JR, Klaper R. Behavioral and Physiological Changes in *Daphnia magna* when Exposed to Nanoparticle Suspensions (Titanium Dioxide, Nano-C60, and C60HxC70Hx). *Environmental Science & Technology*. 2007; 41(12), 4465–4470.

Macrae CA, Peterson RT. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2015; 14: 721, 2015.

Maes M, Vanhaecke T, Cogliati B, Yanguas SC, Willebrords J, Rogiers V, Vinken, M. Measurement of Apoptotic and Necrotic Cell Death in Primary Hepatocyte Cultures. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*. 2014; 349–361.

- Malmezat D, Breuille P, Capitan P, Miranda P, Obled C. Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. *Journal of Nutrition, Philadelphia*. 2000;130: 1239-1246.
- Martinez CBR, Souza MM. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2014. 151-160.
- Mcgrath P, Li CQ. Zebrafish: a predictive model for assessing druginduced toxicity. *Drug Discov Today*. 2008; 13: 394–40.
- Mhadhbi L, Beiras L. Acute toxicity of seven selected pesticides (Alachlor, Atrazine, Dieldrin, Diuron, Pirimiphos-Methyl, Chlorpyrifos, Diazinon) to the marine fish (Turbot, *Psetta maxima*). *Water Air Soil Pollut*. 2012; 223:5917-30.
- Meyer, O. Testing and assessment strategies, including -alternative and new approaches. *Toxicol. Letters*. 2003; 140: 21-30.
- Meyers JR. Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* 2018;19:1-26.
- Migliarini B, Carnevali O. A novel role for the endocannabinoid system duringzebrafish development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2009; 299; 172–177.
- Mohammed A. Why are Early Life Stages of Aquatic Organisms more Sensitive to Toxicants than Adults? *New Insights into Toxicity and Drug Testing*. 2013; pp.49–62.
- Mohammed AM, Huovinen M, Vähäkangas K H. Toxicity of diuron metabolites in human cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2020, 78, 103409.
- Monteiro DA, Almeida JAA, Rantin F T, Kalinin AL. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2006; 143:141-149.
- Monteiro M, Quintaneiro C, Pastorinho M, Pereira ML, Morgado F, Guilhermino L, Soares AMVM. Acute effects of 3, 4- dichloroaniline on biomarkers and spleen histology of the common goby *Pomatoschistus microps*. *Chemosphere*. 2016; 62:1333–1339.
- Montagner CC, Sodré FF, Vidal C, Acayaba RD, Campestrini I, Locatelli MA. Ten Years Snapshot of the Occurrence of Emerging Contaminants in Drinking, Surface and Ground Waters and Wastewaters from São Paulo State, Brazil. *J. Braz. Chem. Soc*. 2019; 30(3):614- 632.
- Moraes BS, Loro VL, Pretto A, da Fonseca MB, Menezes C, Marchesan E, Reimche GB, de Avila LA. Toxicological and metabolic parameters of the teleost fish (*Leporinus obtusidens*) in response to commercial herbicides containing clomazone and propanil. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2009; 95(2), 57–62.
- Nagel R. DarT: the embryo test with the zebrafish *Danio rerio* e a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* 2002; 19(Suplemento 1): 38-48.
- Narumanchi S, Wang H, Perttunen S, Tikkanen I, Lakkisto P, Paavola J. Zebrafish Heart Failure Models. *Front Cell Dev Biol*. 2012; 9: 662583.
- Nascimento, E. Mecanismos bioquímicos dos agentes químicos: biotransformação. In: Zagatto PA.; Bertoletti E. (Ed.). *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2008. p. 39-54.

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

Neves, HMP. Avaliação ecotoxicológica da Barrina de Esmoriz, utilizando uma análise integrada de biomarcadores enzimáticos e histopatológicos. 2012. 131 f. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciência e Tecnologia, Porto, Portugal, 2012.

Oliveira R, McDonough S, Ladewig JCL, Soares AMVM, Nogueira AJA, Domingues I. Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2013; 36(3), 903–912.

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

Oliveira R, Domingues I, Grisolia CK, Soares AMVM. Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. *Environmental Science and Pollution Research*. 2009; 16, 679–688.

Osano O , Admiraal W , Klammer HJC, Pastor D, Bleeker EAJ. Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*. *Environmental Pollution*. 2002; 119(2), 195–202.

Olsen T, Ellerbeck L, Fisher T, Callaghan A, Crane M. Variability in acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in *Chironomus riparius* meigen deployed in situ at uncontaminated field sites. *Environ. Toxicol. Chem*. 2001; 20, 1725-1732.

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

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test No. 206: Fish, Acute Toxicity Testing, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD Publishing. 2019.

OPAS. OMS. Manual de vigilância de saúde de populações expostas a agrotóxicos Brasília. 2020; [acesso 4 Feb 2023]. [Disponível em: <http://www.opas.org.br/sistema/arquivos/livro22.pdf>].

Padilla S, Hunter DL, Padnos B, Frady S, MacPhail RC. Assessing locomotor activity in larval zebrafish: Influence of extrinsic and intrinsic variables. *Neurotoxicology and Teratology*. 2011; 33(6), 624–630.

Pathak VM, Verma VK, Rawat BS, Kaur B, Babu N. Current status of pesticide effects on environment, human health and its eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review. *Frontiers in Microbiology*. 2022; 13: 962619.

Phan VN, Gomes V. Avaliação prévia da toxicidade de um efluente simulado derivado de petróleo sobre *Promysis atlantica* (Crustacea, Mysidacea). *Bolm Inst Oceanogra S Paulo*. 2023; 42(1/2):129-41.

Panula P, Chen YC, Priyadarshini M, Kudo H, Semenova S, Sundvik M, Sallinen V. The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiology of disease*. 2010 ; 40; 46–57.

Pankratz, Tom M. Environmental engineering dictionary and directory. Thomas M. Pankratz. Lewis Publishers, Boca Raton; Florida. 2011.

Pätzold S, Brümmer GW. Influence of microbial activity and soil moisture on 23 herbicide

immobilization in soils. - Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 2003; 166(- 3), pp.336–344.

Pereira TSB, Boscolo CNP, da Silva DGH, Batlouni SR, Schlenk D, Almeida EA. Anti-androgenic activities of diuron and its metabolites in male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquatic Toxicologic: 2015; 164:10-15.

Pereira, TSB, Boscolo CNP, Felício AA, Batlouni SR, Schlenk D, Alves AE. Estrogenic activities of diuron metabolites in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Chemosphere: 2016; 146, 497–502.

Pereira LC, De Souza AO, Franco-bernardes MF, Pazin M, Tasso MJ, Pereira PH, Dorta DJ. A perspective on the potencial of emerging contaminants to human and environmental health. Env. Sci and Poll.2015; 22; 13800-23.

Pignati WA, Lima FANSE, Lara SS, Correa MLM, Barbosa JR, Leao LHDC, Pignatti M G. Spatial distribution of pesticide use in Brazil: A strategy for health surveillance. Cienc. Saude Coletiva. 2017; 22, 3281–3293.

Portugues R, Engert F. The neural basis of visual behaviors in the larval zebrafish. Current opinion in neurobiology. 2009; 19(6), 644-647.

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

PUBCHEM. Diuron. National Center of Biotechnology Information, , 2021a. [citado em 01 de Junho]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diuron>.

PUBCHEM. 3,4-dicloroanilina. National Center of Biotechnology Information, , 2022a.[citado em [22 de Maio de 2023]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7257>.

PUBCHEM. 1-(3,4-Diclorofenil)-3-metilureia. Na, , 2022b. [citado em 25 de Maio de 2023]. Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-3_4-Dichlorophenyl-3-methylurea.

Purves D, George JA, David F, Hall WC, LaMantia A-S, McNamara JO, White LE. Neuroscience. 2008; 4th ed. Sinauer Associates.

Quiniou F, Damiens G, Gnassia-Barelli M, Geffard A, Mouneyrac C, Budzinski H, Roméo M. Marine water quality assessment using transplanted oyster larvae. Environment International. 2007; 33(1), 27–33.

Rand GM, Wells PG, McCarty LS. In: Rand GM. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment. Washington: ed. Taylor & Francis.v.2, 1995.

Regoli F, Principato G. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals in different field and laboratory conditions: implication for a proper use of biochemical biomarkers. Aquat. Toxicol. 1995; 31,143-164.

Ribeiro S, Guilhermino L, Sousa JP, Soares A. Novel bioassay based on acetylcholinesterase and lactate dehydrogenase activities to evaluate the toxicity of chemicals to soil isopods. Ecotoxicology and Environmental Safety.1999; 44, 287- 293.

Ribeiro O, Pinto MQ, Félix L, Monteiro SM, Fontainhas-Fernandes A, Carrola JS. O peixe-zebra (*Danio rerio*) como modelo emergente na ecotoxicologia. Revista de Ciencia Elementar. 2022; V10(02):021.

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

Roque MRA, Melo IS. Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras do herbicida diuron. *Sci Agric.* 2000;57:723-72.

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

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

Sánchez-Muros MJ, Villacreces S, Miranda-de la Lama G, de Haro C, García-Barroso F. Effects of chemical and handling exposure on fatty acids, oxidative stress and morphological welfare indicators in gilt-head sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry.* 2012; 39 (3), 581–591.

Schechtman LM. Implementation of the 3Rs (Refinement, reduction, and replacement): Validation and regulatory acceptance considerations for alternative toxicological test methods. *ILAR Journal.* 2002; 85-94.

Schelin C, Tunek A, Jergil B. Covalent binding of benzo[a]pyrene to rat liver cytosolic proteins and its effect on the binding to microsomal proteins. *Biochemical Pharmacology.* 1983; 32, 1501-1506.

Scheil, V, Kienle C, Osterauer R, Gerhardt A, Köhler H R. (2009). Effects of 3,4-dichloroaniline and diazinon on different biological organisation levels of zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. *Ecotoxicology.* 2009; 18(3), 355–363.

Scholz S, Fischer S, Gündel U, Küster E, Luckenbach T, Voelker D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment--applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research International.* 2008; v. 15, n.5, p.394-404.

Scibior D, Czczot H. Catalase: structure, properties, functions. *Postepy Hig Med Dosw.* 2006; 60: 170-180.

Scott GR, Sloman KA. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology.* 2004; 68(4), 369–392.

Selderslaghs IWT, Hooyberghs J, De Coen W, Witters H E. Locomotor activity in zebrafish embryos: A new method to assess developmental neurotoxicity. *Neurotoxicology and Teratology.* 2010; 32(4), 460–471.

Selderslaghs IW, Hooyberghs J, Blust R, Witters HE. Assessment of the developmental neurotoxicity of compounds by measuring locomotor activity in zebrafish embryos and larvae. *Neurotoxicol Teratol.* 2013; 37:44-56.

Siebel AM, Bonan CD, Silva RS. Zebrafish como Modelo para Estudos Comportamentais. *RESENDE. RR Biotecnologia aplicada à saúde: Fundamentos e aplicações.* 2015; São Paulo, Ed. Blucher, v. 1, p. 1-611.

Silva SR. Quantificação de substâncias com atividade estrogênica e caracterização da toxicidade embrionária em zebrafish (*Danio rerio*) nos efluentes das Estações de Tratamento de Esgotos Sul e Norte e no Lago Paranoá, Brasília/DF. 2015. Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências

Biológicas, Universidade de Brasília, 2015.

Simic T, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Matic M., Mimic-Oka J. Glutathione S-transferases in kidney and urinary bladder tumors. *Nature Reviews Urology*. 2009; 6(5), 281–289.

Silva R, Richetti S, Silveira V, Battastini A, Bogó M, Lara D, Bonan C. Maternal caffeine intake affects acetylcholinesterase in hippocampus of neonate rats. *Int. J. Devl Neuroscience*. 2008; 26, 339–343.

Smart RC, Hodgson E. *Molecular and biochemical toxicology*. 4th ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. 2008.

Sørensen SR, Bending GD, Jacobsen CS, Walker A, Aamad J. Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. *FEMS Microbiology Ecology*. 2003; 45(1), pp.1– 11.

Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behavior and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev*. 2008; 83:13-34.

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

Stegeman JJ, Brower M, Di Giulio RT, Förlin L, Fowler B A, Sanders B M, Van Veld P A. Molecular Responses to Environmental Contamination: Enzyme and Protein Systems as Indicators of Chemical Exposure and Effect. In: *Biomarkers. Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. 1992.

Storck V, Karpouzas DG, Martin-laurent F. Towards a better pesticide policy for the European Union. *Sci. Total Environ* 2017; v. 575, p.1027-1033.

Teixidó E, Piqué E, Gómez-catalán J, Llobet JM. Assessment of developmental delay in the zebrafish embryo teratogenicity assay. *Toxicology in Vitro*. 2013; 1 ; 469-78.

Thomas KV, McHugh M, Waldock M. Antifouling paint booster biocides in UK coastal waters: Inputs, occurrence and environmental fate. *Science of the Total Environment*. 2002; 293, pp.117– 127.

Tixier C, Sancelme M, Bonnemoy F, Cuet A, Veschambre H. Degradation products of phenylurea herbicide, diuron: synthesis, ecotoxicity, and biotransformation. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 2001; 20 (7), 1381-1389.

Tooge, P. R. LISTA: quais são e para que servem os ingredientes dos agrotóxicos mais vendidos. *Agronegócios* . G1. p. 1–20, 2019.

Torres MCL, Soares NFF, Maia JF. Parâmetros cinéticos da glutathione S-transferase e sua ativação por extratos de vegetais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2004; 24: 243-248.

Tu TH, Silvestre F, Scippo ML, Thome JP, Phuong NP, Kestemont P. Acetylcholinesterase activity as a biomarker of exposure to antibiotics and pesticides in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2009; 72, 1463-1470.

Ulhaq M , Örn S, Carlsson G, Morrison DA, Norrgren L. Locomotor behavior in zebrafish (*Danio rerio*) larvae exposed to perfluoroalkyl acids. *Aquatic Toxicology*. 2013; 144-145, 332–340.

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

USEPA. Carcinogenicity peer review of diuron: office of prevention, pesticides and toxic substances. Cincinnati: United States Environmental Protection Agency; 1997.

USEPA. Registration eligibility decision for diuron. List A. Case 0046. Office of prevention, pesticides and toxic substances. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency; 2003.

USEPA. What is endocrine disruption [Internet]. Washington: USEPA; 2017. [citado em 20 de maio de 2023]. Disponível em: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/what-endocrine-disruption>.

USEPA. Seeks Public Comment on Measures to Address Human Health and Ecological Risks Posed by Diuron | US EPA. Disponível em: <<https://www.epa.gov/pesticides/epa-seeks-public-comment-measures-address-human-health-and-ecological-risks-posed-diuron>>. Acesso em: 30 junho. 2023.

Van Der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2003; 57-149.

VanGestel CAM, VanBrummelen TC. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*. 1996; 5, 217-225.

Velki M, Di Paolo C, Nelles J, Seiler TB, Hollert H. Diuron and diazinon alter the behavior of zebrafish embryos and larvae in the absence of acute toxicity. *Chemosphere*. 2017; 180, 65–76.

Velki M, Lackmann C, Barranco A, Ereño Artabe A, Rainieri S, Hollert H, Seiler TB. Pesticides diazinon and diuron increase glutathione levels and affect multixenobiotic resistance activity and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. *Environmental Sciences Europe*. 2019; 31(1).

Vergar PJP, Boobis AR. Reevaluate pesticides for food security and safety. *Science*. 2020; 341 (6147) pp. 717-718.

Vethaak AD, Davies IM, Thain JE, Gubbins MJ, Martínez-Gómez C, Robinson CD, Hylland K. Integrated indicator framework and methodology for monitoring and assessment of hazardous substances and their effects in the marine environment. *Marine Environmental Research*. 2017; 124, 11–20.

Vieira, LR, Gravato C, Soares AMVM, Morgado F, Guilhermino L. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behavior. *Chemosphere*. 2009; 76, 1416–1427.

Vliegthart, A.D., Tucker, C.S., Del Pozo, J., Dear, J.W. (2014). Zebrafish as model organisms for studying drug-induced liver injury. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 78 (6), 1217.

Xiu R. Toxicity of Mercury, Copper, Nickel, Lead, and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Archives Of Environmental Contamination And Toxicology*, New York. 1991. v. 21, n.1, p.126 -134.

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

Zhang W., Li J., Zhang Y., Wu X., Zhou Z., Huang Y., et al. (2022). Characterization of a novel glyphosate-degrading bacterial species, *chryseobacterium* sp. Y16C, and evaluation of its effects on microbial communities in glyphosate-contaminated soil. *J. Haz. Mat.* 432:128689.

Zhu B, Liu T, Hu X, Wang G. Developmental toxicity of 3,4-dichloroaniline on rare minnow (*Gobiocypris rarus*) embryos and larvae. *Chemosphere*. 2013; 90(3), 1132–1139.

Zon LI, Peterson RT. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nature reviews drug discovery*. 2005; 4, 35–44.