

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

FERNANDA CRISTINA DA SILVA SANTOS

ESTUDO DA EMBRIOTOXICIDADE E MORFOMETRIA LARVAL EM *ZEBRAFISH*
(*Danio rerio*) APÓS EXPOSIÇÃO À UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL
CONTENDO O HERBICIDA METRIBUZIN

MACEIÓ - AL,

2023

FERNANDA CRISTINA DA SILVA SANTOS

**ESTUDO DA EMBRIOTOXICIDADE E MORFOMETRIA LARVAL EM ZEBRAFISH
(*Danio rerio*) APÓS EXPOSIÇÃO À UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL
CONTENDO O HERBICIDA METRIBUZIN**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Lázaro Wender
Oliveira de Jesus.

Co-orientadora: Profa. Dra. Jerusa Maria
de Oliveira

MACEIÓ – AL,

2023

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S237e Santos, Fernanda Cristina da Silva.

Estudo da embriotoxicidade e morfometria larval em zebrafish (*Danio rerio*) após exposição à uma formulação comercial contendo o herbicida metribuzin / Fernanda Cristina da Silva Santos. – Maceió, 2023.

36 f. : il.

Orientador: Lázaro Wender Oliveira de Jesus.

Co-orientadora Jerusa Maria de Oliveira.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas: bacharelado) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 33-36.

1. Ecotoxicologia. 2. Praguicidas. 3. Triazinonas. 4. Metribuzin. 5. Zebrafish.
I. Título.

CDU: 591.34:661.162.2

AGRADECIMENTOS

A Deus por me proporcionar o dom da vida e por ter me dado sabedoria para enfrentar os obstáculos ao longo da graduação.

Aos meus pais, Cicero e Cristina, que são exemplos em minha vida, de força, honestidade e amor, sempre me apoiando nos momentos em que mais precisei.

Ao meu filho Luan Guilherme que é a minha inspiração e o motivo para eu não desistir nos momentos difíceis, que mesmo na minha ausência sempre me amou incondicionalmente, a ele dedico o meu trabalho.

Ao meu esposo Cicero Carlos que me incentivou, foi compreensivo e não me deixou desistir quando fraquejei e precisei me dedicar a graduação e ao trabalho final.

A minha avó Maria Jose (*in memoria*) por ser exemplo de mulher forte e guerreira, me dar força, conselhos e por amar e cuidar do meu filho quando precisei.

A minhas tias, Solange e Maria Jose, por todo incentivo e ajuda.

Aos meus irmãos Fernando e Carlos, que apoiaram meu sonho mesmo diferente.

A minha cunhada Severina Maria, por sempre está disposta a cuidar de meu filho nos momentos em que mais precisei.

Por minhas amigas de turma que somaram nos trabalhos e fizeram parte do meu crescimento acadêmico, em especial Zaíne Marcyelle, Thuelly Rocha, Fernanda Souza, Aldilane Lays e Alícia Helena.

Aos colegas de laboratório e pelas amizades construídas do LMAA, em especial por Andressa Santos, Bianca Carnib, Marciliano Silva e Vivian Porto, por toda ajuda, motivação e conselhos tão importantes para a construção desse trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Lázaro Wender Oliveira de Jesus e minha coorientadora Profa.Dra. Jerusa Maria de Oliveira, pela oportunidade, paciência e dedicação e por todo tempo disponibilizados para o meu aprendizado e crescimento como bióloga e cientista.

Por fim a todos os professores e técnicos que contribuíram com meu aprendizado e para o meu crescimento também.

Resumo

Pesticidas são mundialmente usados para melhorar a produtividade das lavouras por meio da eliminação de insetos vetores de doenças ou ervas daninhas (pragas) das culturas agrícolas. O Brasil é um dos maiores consumidores de pesticidas no mundo. Porém, esses compostos podem causar impactos negativos para o meio ambiente e saúde humana. O metribuzin é um herbicida do grupo químico das triazinonas assimétricas, de amplo espectro de ação que age inibindo a fotossíntese. Utilizado principalmente nas culturas de cana-de-açúcar, tomate e soja ele é potencialmente tóxico e considerado perigoso para o meio ambiente, pois tem alta taxa de solubilidade em água (1,22 mg/L) e meia vida de aproximadamente sete dias em água e 30 dias no solo, tornando possível a contaminação do solo, águas superficiais e subterrâneas e dos organismos presentes, por meio de lixiviação dos campos agrícolas. Já é de conhecimento que o metribuzin e outros herbicidas do mesmo grupo químico são tóxicos para algumas espécies de peixes, podendo causar, perda de movimento e coordenação, aumento da respiração e alterações bioquímicas, hematológicas e histopatológicas nos tecidos de peixes. Entretanto, os efeitos tóxicos do metribuzin nas fases iniciais do desenvolvimento em peixes ainda não foram esclarecidos. Portanto, no presente trabalho, usando o *zebrafish* (*Danio rerio*) como espécie modelo, objetivou-se determinar, a embriotoxicidade e possíveis alterações morfométricas no desenvolvimento corporal após exposição a diferentes concentrações do herbicida a base de metribuzin (UNIMARK 700 WG). Os embriões/larvas de *zebrafish* foram expostos a concentrações do composto, previamente diluídas a partir da solução estoque (0,0002 mg/mL, 0,002 mg/mL, 0,02 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL), controle negativo (água reconstituída) e positivo DCA (Dichloroniline 3,4) durante 144 horas. Depois, destinados à avaliação a cada 24 horas, do movimento espontâneo (24h), batimento cardíaco (48h), mortalidade, eclosão e alterações morfológicas avaliados em (24, 48, 72, 96, 120 e 144h) de exposição. Os resultados do presente estudo indicaram toxicidade do composto ao longo das 144 horas concentração-dependente, apresentando alta taxa de mortalidade nas concentrações maiores, taquicardia, alterações morfológicas (com maior frequência de deformações na coluna) e diminuição da eclosão e movimentos espontâneos. Os dados obtidos evidenciam toxicidade do composto nas fases embriolarval e aponta a necessidade de estudos posteriores, incluindo histológicos e comportamentais para maior conhecimento sobre alterações e possíveis danos em outros sistemas e organismos diferentes.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; pesticidas; triazinonas; metribuzin; zebrafish.

Abstract

Pesticides are used worldwide to improve crop productivity by eliminating insect vectors of diseases or weeds (pests) from agricultural crops. Brazil is one of the largest consumers of pesticides in the world. However, these compounds can cause negative impacts on the environment and human health. Metribuzin is a herbicide from the chemical group of asymmetric triazinones, with a broad spectrum of action that acts by inhibiting photosynthesis. Used mainly in sugarcane, tomato and soybean crops, it is potentially toxic and considered dangerous for the environment, as it has a high solubility rate in water (1.22 mg/L) and a half-life of approximately seven days in water and 30 days in the soil, making it possible to contaminate the soil, surface and underground waters and the organisms present, through leaching from agricultural fields. It is already known that metribuzin and other herbicides of the same chemical group are toxic to some species of fish, causing loss of movement and coordination, increased breathing and biochemical, hematological and histopathological changes in fish tissues. However, the toxic effects of metribuzin in the early stages of development in fish have yet to be clarified. Therefore, in the present work, using zebrafish (*Danio rerio*) as a model species, the objective was to determine the embryotoxicity and possible morphometric changes in body development after exposure to different concentrations of the herbicide based on metribuzin (UNIMARK 700 WG). Zebrafish embryos/larvae were exposed to compound concentrations, previously diluted from the stock solution (0.0002 mg/mL, 0.002 mg/mL, 0.02 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL), negative control (reconstituted water) and DCA positive (Dichloroniline 3.4) for 144 hours. Afterwards, destined to the evaluation every 24 hours, of the spontaneous movement (24h), heartbeat (48h), mortality, hatching and morphological alterations evaluated in (24, 48, 72, 96, 120 and 144h) of exposure. The results of the present study indicated toxicity of the compound over the 144 hours concentration-dependent, with a high mortality rate at higher concentrations, tachycardia, morphological changes (with a higher frequency of deformations in the spine) and a decrease in hatching and spontaneous movements. The data obtained show the toxicity of the compound in the embryolarval stages and point to the need for further studies, including histological and behavioral ones, for greater knowledge about alterations and possible damages in other systems and different organisms.

Keywords: Ecotoxicology; pesticides; triazinones; metribuzin; zebrafish.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação toxicológica dos pesticidas.....	16
Figura 2 – Estrutura química do metribuzin.....	17
Figura 3 – Foto de espécimes adultos de <i>zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>).....	19
Figura 4 – Biotério de peixes do ICBS-UFAL.....	19
Figura 5 – Procedimento de seleção dos embriões.....	20
Figura 6 – Gráficos de sobrevivência e eclosão.....	24
Figura 7 – Gráficos de movimento espontâneo e batimentos cardíaco.....	25
Figura 8 – Imagem das larvas com 96 e 144h.....	27
Figura 9 – Gráficos dos parâmetros morfométricos.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações de relevância ambiental.....	21
Tabela 2 - % de alterações teratogênicas.....	26

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	Pesticidas	13
2.2	O modelo animal zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	16
3	OBJETIVOS	18
3.1	Geral	18
3.2	Específicos	18
4	METODOLOGIA	19
4.1	Manutenção dos animais e coleta dos embriões	19
4.2	Preparo das concentrações de metribuzin	20
4.3	Exposição ao Metribuzin	21
4.4	Avaliação da Embriotoxicidade	22
4.5	Análises Biométricas	22
4.6	Análise estatística	23
5	RESULTADOS	24
6	DISCUSSÃO	30
7	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

Os pesticidas são substâncias químicas usadas continuamente nas lavouras agrícolas, para aumentar a produtividade, eliminando organismos vetores de doenças e ervas daninhas (DORES *et al.*, 1999; RODRIGUES, 2007). No Brasil o uso intensivo dessas substâncias na agricultura tem prejudicado a biodiversidade, causando redução na disponibilidade e qualidade da água, alterando a qualidade do ar e dos alimentos, resultando em desequilíbrio ecológico (NUNES, 2007).

No Brasil são registrados como pesticidas 405 ingredientes ativos, que dão origem a aproximadamente 2455 formulações para venda. Incluindo, 25% de herbicidas, 22% de fungicidas, 21% de inseticidas, e os demais integram acaricidas, adjuvantes e reguladores de crescimento (AGROFIT, 2020). O Brasil em 2019, vendeu grande porcentagem de pesticidas por classe de uso, entre eles os herbicidas com 59,6%, fungicidas com 15,2% e os inseticidas com 11,7% das vendas, totalizando cerca de 620 mil toneladas de ingredientes ativos comercializados (IBAMA, 2020).

No entanto esses compostos podem deixar resíduos no solo e por meio de processos como escoamento superficial, subsuperficial e lixiviação, os quais podem levar ao espalhamento, carregamentos lateral e vertical, respectivamente, desses resíduos no solo. Esses processos podem contaminar corpos hídricos e causar possíveis danos ambientais afetando a fauna aquática, bem como a saúde humana (CARVALHO, 2013). Estudos demonstram a presença de resíduos dos agrotóxicos no solo, sedimentos e em águas superficiais e subterrâneas em todo mundo (XING, *et al.*, 2012; RODRIGUES, *et al.*, 2019).

Os herbicidas do grupo químico das triazinas e triazinonas são compostos (não-enzimáticos) inibidores do fotossistema II (FSII), bases fracas usadas no controle da vegetação de folhas largas e folhas estreitas, aplicados em pré e pós-emergência com persistência média no solo (VELISEK, 2009; RODRIGUES; ALMEIDA, 2011; PLHALOVA *et al.*, 2012). No Brasil, os herbicidas que inibem o FSII estão classificados nos grupos químicos: Triazinas (atrazina); Triazinonas (metribuzin) e triazolinonas (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011 e CARVALHO, 2013).

O metribuzin (4-amino-6-terc-butil-4,5-di-hidro-3-metiltio-1,2,4-triazin-5-ona) é um herbicida do grupo químico das triazinonas assimétricas, bastante utilizado principalmente nas culturas de soja, de batata e de cana-de-açúcar (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011).

Desenvolvido para o controle de gramíneas e de ervas daninhas de folhas largas, é um composto seletivo, de ação sistêmica que inibe a fotossíntese bloqueando o fluxo de elétrons no FSII, pois liga-se na proteína D-1 no sítio de ligação onde se acopla à plastoquinona (Qb) impedindo a formação da plastohidroquinona (QbH₂) que transfere elétrons para o complexo citocromo. Com isso o fluxo de elétrons é interrompido entre os fotossistemas, diminuindo a produção de energia, na etapa fotoquímica da fotossíntese, o que resultará posteriormente na morte da planta (VELISEK *et al.*, 2009; RODRIGUES; ALMEIDA, 2011; Carvalho, 2013).

Para a realização do presente estudo selecionou-se como modelo experimental o peixe *zebrafish* (*Danio rerio*), um teleósteo de água doce pertencente à família Cyprinidae, que medi de 3 a 5 centímetros de comprimento quando adulto e possuem 70% de similaridade genética e fisiológica com humanos (DAMMISKI *et al.*, 2011; PORTO *et al.*, 2023).

O *zebrafish* expressa alta taxa de reprodução, embriões transparentes que facilita a observação de seu desenvolvimento, com desenvolvimento rápido onde o ovo evolui para larva entre 48 e 72 horas chegando a fase adulta em 3 meses (DAMMISKI *et al.*, 2011; PORTO *et al.*, 2023). Além disso, para manter um biotério de *zebrafish* não precisa-se de muito espaço, os animais tem baixo custo e possibilidade de atuação em diversas áreas da ciência como toxicologia, farmacologia, genética entre outras (DAMMISKI *et al.*, 2011).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PESTICIDAS

Os pesticidas são definidos e conceituados pela Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, as disposições dessa lei foram regulamentadas pelo Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002 (BRASIL, 1989). A classificação toxicológica dos pesticidas também é feita com base na mesma Lei 7.082/89, que estabelece a toxicidade dos produtos, a partir de seus efeitos agudos, distribuídos em quatro classes, com cores de alerta para serem estampadas nas embalagens: Classe I - extremamente tóxicos (vermelho), Classe II - altamente tóxicos (amarelo), Classe III - medianamente tóxicos (azul) e Classe IV - pouco ou muito pouco tóxicos (verde) (BRASIL, 1989 , 2002; REBELO *et al.*, 2010), como apresentado na Figura 1.

Figura 1. Classificação toxicológica e ambiental dos pesticidas.

CLASSIFICAÇÃO TOXICOLÓGICA		CLASSIFICAÇÃO AMBIENTAL
CLASSE I Extremamente tóxico		CLASSE I Altamente perigoso ao meio ambiente
CLASSE II Altamente tóxico		CLASSE II Muito perigoso ao meio ambiente
CLASSE III Medianamente tóxico		CLASSE III Perigoso ao meio ambiente
CLASSE IV Pouco tóxico		CLASSE IV Pouco perigoso ao meio ambiente

Fonte: (BRASIL, 2002), “gov.br/anvisa”.

Pesticidas causam impactos no meio ambiente e prejuízo sobre organismos presentes na água, no solo e ao seu entorno e mesmo distantes, como organismos naturais do local, insetos, plantas aquáticas e peixes, devido, principalmente, a alterações do habitat natural (LOPES *et al.*, 2018). Além disso, podem contaminar rios, reservatórios de água e bacias fluviais, sendo capaz de interferir nos organismos aquáticos presentes. Dentre os grupos de substâncias químicas usadas como pesticidas, os herbicidas foram a classe mais encontrada em águas doces brasileiras.

Herbicidas são usados na agricultura de forma técnica para o controle de pragas como ervas daninhas, porém vários desses compostos deixam resíduos que permanecem

ativos no solo por um longo período de tempo, o que ajuda na manutenção e no controle das ervas daninhas das plantações (MELO *et al.*, 2010).

O metribuzin, é um composto ativo presente em vários herbicidas como no Sencor, no Lexone, e no Sencorex, e está registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA nº 9415, com classificação toxicológica: III – medianamente tóxico, classificação do potencial de periculosidade ambiental: II- produto muito perigoso ao meio ambiente (VELISEK *et al.*, 2009; CARVALHO, 2013; ZHANG *et al.*, 2014).

A dose aplicada do produto depende do tipo culturas agrícolas (segundo bula UNIMARK 700 WG), como demonstrado no Quadro 1.

Quadro 1 – Dose do produto por cultura.

CULTURA	PLANTAS INFESTANTES Nome comum (Nome científico)	DOSE Produto Comercial (kg/ha)	VOLUME DE CALDA terrestre (L/ha)	NÚMERO, ÉPOCA E INTERVALO DE APLICAÇÃO
Batata	Caruru-de-mancha (<i>Amaranthus viridis</i>)	0,5 a 1,0 kg/ha (350 – 700 g i.a./ha)		Fazer a aplicação em pré-emergência ou em pós-emergência inicial das plantas daninhas e da cultura. Não aplicar sobre se a cultura da batata estiver com mais de 5 cm de altura. Realizar no máximo 2 (duas) aplicação por ciclo da cultura.
	Picão-preto (<i>Bidens pilosa</i>)			
	Beldroega (<i>Portulaca oleracea</i>)			
Cana-de-açúcar	Apaga-fogo (<i>Alternanthera tenella</i>)	2,0 – 2,7 kg/ha (1400 – 1890 g i.a./ha)	Pré- emergência 100 -150 L de calda/ha Pós- emergência 100 – 200 L de calda/ha	Aplicação em pré-emergência ou logo após a emergência das plantas daninhas e da cultura. Fazer um 1 (uma) aplicação por ciclo.
	Caruru-de-mancha (<i>Amaranthus viridis</i>)			
	Corda-de-viola (<i>Ipomoea triloba</i>)			
	Picão-preto (<i>Bidens pilosa</i>)			
	Braquiária (<i>Brachiaria decumbens</i>)			
	Desmódio (<i>Desmodium tortuosum</i>)			
	Catirina, Hortelã (<i>Hyptis lophanta</i>)			
Capim-colonião (<i>Panicum maximum</i>)				
Soja	Caruru-de-mancha (<i>Amaranthus viridis</i>)	0,5 – 0,7 kg/ha (350 – 490 g i.a./ha)		Aplicação em pré-emergência das plantas daninhas e da cultura no plantio convencional ou no plantio-direto. Realizar 1 (uma) aplicação por ciclo da cultura.
	Picão-preto (<i>Bidens pilosa</i>)			
	Beldroega (<i>Portulaca oleracea</i>)			
Tomate	Caruru-de-mancha (<i>Amaranthus viridis</i>)	0,7 k/ha (490 g i.a./ha)		Aplicação em pré-emergência ou pós-emergência inicial das plantas daninhas e pós-transplântio da cultura. Aplicar a partir de 2 semanas após transplante das mudas de tomate. Realizar 1 (uma) aplicação por ciclo da cultura.
	Picão-preto (<i>Bidens pilosa</i>)			
	Beldroega (<i>Portulaca oleracea</i>)			

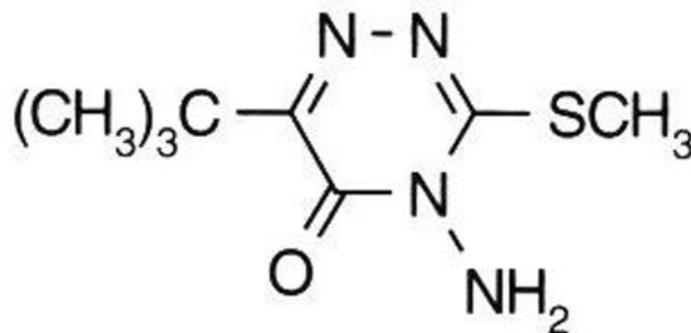
Fonte: Bula UNIMARK 700 WG

O metribuzin é um herbicida seletivo, de ação sistêmica, aplicado em pré ou pós-emergência inicial, geralmente absorvido pelo sistema radicular das plantas infestantes, translocando-se no xilema, e acumulando-se nas folhas, caules e raízes. Interferi no processo da fotossíntese, apresenta mecanismo de ação Inibidor da fotossíntese no fotossistema II,

pertencente ao grupo triazinonas, segundo classificação internacional do Comitê de Ação à Resistência de Herbicidas (HRAC), (BULA, ANVISA., 2020; UNIMARK 700 WG).

O metribuzin, atende pelo nome químico, 4-amino- 6-terc-butil-4,5-di-hidro-3-metiltio-1,2,4-triazin-5-ona, foi desenvolvido em 1971 na Alemanha. É um herbicida de base fraca, do grupo químico das triazinonas assimétricas, possui dois átomos de nitrogênio e dois átomos de carbono adjacentes (Figura 2) (VELISEK *et al.*, 2009; CARVALHO, 2013; ZHANG *et al.*, 2014).

Figura 2 - Estrutura química do metribuzin.



Fonte: gov.br/ ANVISA, 2021.

Este composto possui uma alta taxa de solubilidade em água, sendo suscetível à lixiviação através dos campos agrícolas, dependendo do volume de chuvas, umidade e matéria orgânica presente no solo (PLHALOVA *et al.*, 2012). Esse efeito residual aumenta o risco de contaminação tanto no próprio solo como em mananciais hídricos superficiais e subterrâneos, devido às características físicas e químicas da substância, como fraca adsorção ao solo e alta solubilidade em água. A fotólise aquosa deste composto é rápida e possui meia vida em ambiente aquático natural de aproximadamente sete dias podendo se estender e, no solo por 30 dias, dependendo da qualidade e quantidade de matéria orgânica, essa meia vida também pode ser estendida (VELISEK *et al.*, 2009; CARVALHO, 2013; ZHANG *et al.*, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2019).

Estudo relatou a presença de herbicidas nas águas subterrâneas que são utilizadas para consumo humano, o metribuzin foi detectado (com concentração de $0,351 \mu\text{g} - \text{L}$), (DORES *et al.*, 2006). Os pesticidas possuem longa persistência no meio ambiente e alta atividade biológica, o que pode causar efeitos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente (MARONI. M *et al.*, 2006; DAMALAS, KOUTROBAS., 2016). Neste contexto, ocorre a exposição ocupacional geralmente em trabalhadores envolvidos na fabricação de pesticidas e no setor agrícola, entre agricultores e aplicadores profissionais de pesticidas (GLASS.CR,

MACHERA. K., 2009; Ye. M., 2013). Já os indivíduos da população comum podem se expor a resíduos de pesticidas em alimentos e água potável ou por resíduos pesticidas em áreas residenciais próximas a áreas de pulverização, podendo causar intoxicação grave (DAMALAS, KOUTROBAS., 2016).

De acordo com estudo promovido por (MONDRA *et al.*, 2008), após a exposição da carpa comum (*Cyprinus Carpio*) ao metribuzin na concentração de (1,75 mg – L), durante 28 dias, estas apresentaram alterações hematológicas, como aumento da contagem de glóbulos vermelhos e do hematócrito em relação aos peixes controles.

A atrazina, herbicida com ação semelhante ao metribuzin, também mostra resultados potencialmente tóxicos, incluindo toxicidade reprodutiva e do Desenvolvimento, neurotoxicidade e câncer, geralmente, via desregulação endócrina (MOSTAFALOU, ABDOLLAHI., 2017; AHKIN, FREEMAN., 2021). Relatos de outros estudos, evidenciam o aparecimento de defeitos congênitos em filhos de mulheres que vivem em áreas de uso de atrazina (WALLER *et al.*, 2010; AGOPIAN *et al.*, 2013).

Nesse contexto, uma vez que o metribuzin é amplamente utilizado em plantações de grande interesse econômico, como a da cana-de-açúcar, sendo o Brasil um dos maiores produtor de cana-de-açúcar do mundo (CONAB., 2007). Com o potencial poder de lixiviação e contaminação de ambientes e organismos, não alvo, torna-se importante mais estudos para comprovar ou não seus possíveis efeitos a curto e longo prazo na biota exposta a ele de forma indireta.

2.2 O modelo animal *Zebrafish* (*Danio rerio*)

O *zebrafish* é um peixe teleósteo, pertence à família Cyprinidae, nativo do sul e sudeste da Ásia, região com estações climáticas definidas, ambientes alagados, com alterações nos parâmetros de qualidade da água, o que torna o *zebrafish*, tolerante e resistente as mudanças no habitat e em biotério (DAMMSKI *et al.*, 2011). Seu desenvolvimento rápido e função metabólica se desenvolve em aproximadamente 72 horas após fertilização (hpf).

Torna-se adulto em cerca de três meses (90 dias), possui ciclo de vida curto ($\pm 2,5$ anos), reprodução e fecundação externa produzindo, entre, (100 a 250 \pm) ovos por dia, (DAMMSKI *et al.*, 2011). Dentre as vantagens do seu uso como sistema modelo, está o fato de ter embriões e larvas transparentes o que permite que todo o processo de desenvolvimento seja observado, além de alta taxa de reprodução e fertilização, um tamanho pequeno podendo ser mantido em biotério menor, baixo custo e fácil manutenção em condições de laboratório

comparado aos modelos de mamíferos, genoma sequenciado, semelhança genética com humanos de 70% e comportamento complexo (ROCHA *et al.*, 2017; CANEDO *et al.*, 2022).

Figura 3 - Foto ilustrativa de espécimes de *zebrafish* (*Danio rerio*) adultos.



Fonte: “Rede zebrafish.com.br”.

O zebrafish como sistema modelo é utilizado em vários campos de pesquisa, como nas áreas da biologia do desenvolvimento, ecotoxicologia, farmacologia e toxicologia, biologia da evolução, ciências veterinárias, nanotecnologia, (CANEDO *et al.*, 2022).

Deste modo, os estudos relatados anteriormente, apontam para indícios que os herbicidas causam danos ao ambiente aquático e a sua biota (VELISEK *et al.*, 2009). Porém, há necessidade de se conhecer mais sobre a toxicidade do metribuzin em diferentes espécies de peixes e outros organismos presentes no ambiente aquático. O *zebrafish* (*D. rerio*) já é usado para testes toxicológicos, no entanto pouco se sabe sobre os efeitos que a exposição ao metribuzin causam no zebrafish principalmente quando se trata do desenvolvimento inicial, fase em que é possível ocorrer alterações teratogênicas.

O composto metribuzin foi selecionado para o presente estudo, por sua alta relevância no uso em lavouras, principalmente da cana-de-açúcar, onde o estado de Alagoas é um dos grandes produtores. Portanto se faz necessário investigar possíveis impactos causados pela exposição deste composto nos estágios iniciais de vida, para determinar o grau de toxicidade e eventuais alterações no crescimento e desenvolvimento.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a potencial toxicidade do herbicida a base de Metribuzin para o desenvolvimento inicial do *zebrafish* (*Danio rerio*).

3.2 Objetivo Específico

- Analisar os efeitos toxicológicos e teratogênicos do metribuzin nos embriões de *zebrafish*.
- Avaliar se o metribuzin pode alterar o crescimento e o desenvolvimento das larvas.

4 METODOLOGIA

4.1 Manejo dos animais, cuidados e coleta dos embriões

Os peixes adultos (3 meses) do *zebrafish* (*Danio rerio*) foram mantidos no Biotério de Peixes do Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada (LMAA) no Setor de Histologia e Embriologia, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), em aquários de polietileno com capacidade de 5 litros, com 4 peixes para cada litro, separados machos e fêmeas, em um sistema de recirculação de água a $(\pm) 26^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro, com controle dos parâmetros de qualidade da água como pH, amônia e nitrato tóxico, conforme as recomendações de (DAMMSKI *et al.*, 2011). Os animais foram alimentados três vezes ao dia com ração em flocos e náuplios de artêmia alimento vivo para estimular o instinto de caça dos animais. Todos os protocolos adotados foram realizados de acordo com a autorização da Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA/ UFAL) com registro nº 25/2020.

Figura 4 - Biotério de peixes do ICBS-UFAL. (Imagens ilustrativas) estante com aquários em sistema de recirculação de água a esquerda e ração em flocos e náuplios de artêmia em eclosão para alimentação dos peixes a direita.



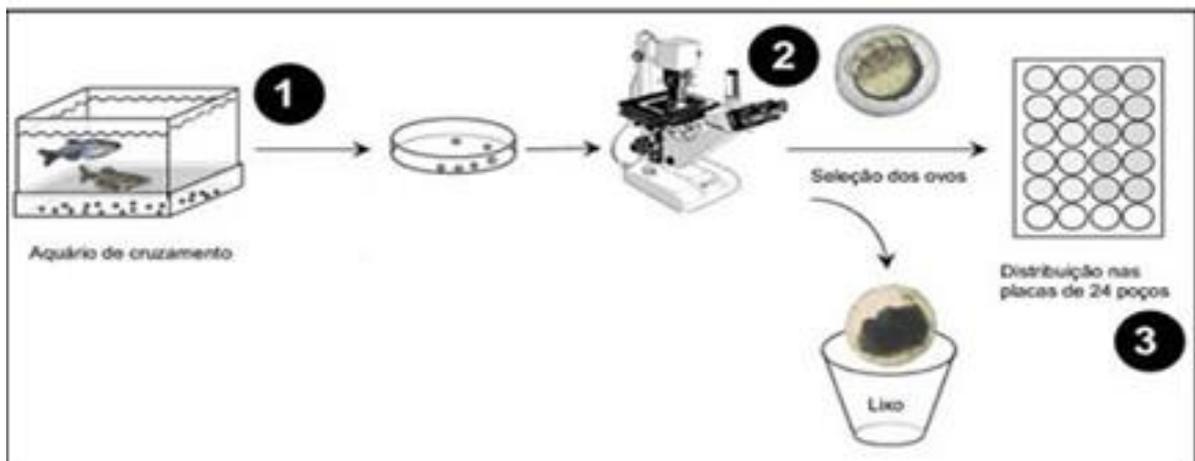
Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Para a reprodução, os peixes zebrafish foram transferidos para criadeiras específicas com água reconstituída que é a mistura de água deionizada com sais essenciais, como cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCL), cloreto de cálcio (CaCl₂.2H₂O), sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O), para a o bem esta e sobrevivência dos peixes, simulando nutrientes encontrados na natureza, e distribuídos na proporção de 1 fêmea para 2 machos, em cada criadeira separados por uma divisória transparente, foram adicionados três (3) fêmeas e seis (6) machos durante a tarde, no total doze (12) fêmeas e vinte e quatro (24) machos divididos em quatro (4) criadeiras por reprodução.

Na manhã do dia seguinte, no início do ciclo de luz, foram retiradas as divisórias para iniciar a reprodução. Os peixes foram deixados nas criadeiras cerca de 40 minutos. Em seguida com a reprodução finalizada os peixes foram separados e colocados em aquários de descanso e os embriões coletados, lavados com solução de 0,1% de Azul de Metileno para evitar a proliferação de microrganismos como fungos seguido pela lavagem em água reconstituída.

Posteriormente os ovos viáveis foram contados e separados com auxílio de um estereomicroscópio, após essa etapa concluída os embriões viáveis selecionados foram expostos aos diferentes tratamentos e os inviáveis descartados (Figura 5).

Figura 5 - Procedimento de seleção dos embriões, 1 coleta dos óvulos e limpeza, 2 seleções dos óvulos, viáveis seguiram para experimento e inviáveis foram descartados, 3 distribuições dos óvulos nas placas de 24 poços e início do ensaio.



Fonte: Adaptado de Lammer et al. (2009)

4.2 Preparo das concentrações de metribuzin

Para facilitar a exposição dos peixes as concentrações de interesse deste estudo, uma solução estoque foi feita na concentração de 20,8 mg/mL diluída em água ultra-pura com

auxílio de um agitador magnético a partir da formulação comercial do metribuzin, UNIMARK 700 WG (sólido e granuloso) com composição química nas proporções de 70% de metribuzin e 30% de moléculas inertes (Bula ANVISA., 2020 – UNIMARK 700 WG). A partir da solução estoque foram diluídas em água reconstituída as concentrações, 0,0002; 0,002; 0,02; 0,1; 0,2; 0,4 mg/mL, que foram usadas para a exposição dos embriões, utilizando micropipetas de diferentes volumes.

Para obtenção das concentrações testadas no experimento foram realizadas buscas de dados de relevância ambiental na literatura e a partir dessas concentrações calculadas as de uso no experimento. A (Tabela 1) mostra as concentrações de relevância ambiental encontradas no solo, sedimento e ambiente aquático.

Tabela 1 - Concentrações de relevância ambiental de metribuzin encontradas em diferentes matrizes e localidades.

Local	Água	Sedimento	Peixe	Autor/ano
Baima River watershed (China)	0,01; 0,16 µg/L ⁻¹ ; 0; 0,09 µg/L ⁻¹ ; 0,08 µg/L ⁻¹		5600 ug/L ⁻¹	SUN, X <i>et al.</i> , 2019
Estuário do rio Sado, (Portugal), em 2017	0,88 ug/L ⁻¹	0,027 ug/g ⁻¹		RODRIGUES <i>et al.</i> , 2019
Região marítima, Canadá, de 2003-2007 2005	0,35 µg L ⁻¹ ; 0,63 µg L ⁻¹ ; 0,041 µg L ⁻¹ ; 35;1 µg L ⁻¹ ; 1 µg L ⁻¹ 2,0 - 75,00 µg L ⁻¹			XING, Z <i>et al.</i> 2012
Rio Samambaia, Brasil	0,0017; 0,8217; 0,0007; 0,2897 ug/L ⁻¹			CORREIA <i>et al.</i> , 2020

Fonte: Elaborado pela Autora 2023.

4.3 Exposição ao Metribuzin

A exposição as concentrações, 0,0002; 0,002; 0,02; 0,1; 0,2; 0,4 mg/mL, do herbicida a base de metribuzin foi realizada até o limite de 3 horas pós fertilização (hpf), segundo as normas da (OECD, 2013) que foi adaptada e estendida de 96 horas para 144 hpf, para uma

melhor observação das possíveis alterações expressas nas larvas do zebrafish, uma vez que os embriões até aproximadamente 72 horas têm o coreo que conferi proteção. Os embriões foram alocados em placas de 24 poços, distribuídos 10 embriões (1 embrião por poço) para cada um dos tratamentos com diferentes concentrações de metribuzin (formulação comercial UNIMARK 700 WG), totalizando 30 embriões por concentração que foram expostos de forma semi-estática, e realizaram-se as trocas das soluções a cada 48 horas. Em paralelo também foram incubados embriões (n=10) dos grupos controle negativo (água reconstituída 0,0) e (n=10) controle positivo DCA 4mg/mL (Dichloroniline 3,4).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, utilizando lotes de embriões oriundos de diferentes reprodutores. Posteriormente os embriões foram incubados em estufa com demanda bioquímica de oxigênio (BOD), na temperatura de aproximadamente 26°C.

4.4 Avaliação da Embriotoxicidade

Os embriões foram expostos até 144 horas pós fertilização, segundo as normas da (OECD., 2013), avaliou-se parâmetros letais e não letais e embriotoxicidade a cada 24 horas. Nos parâmetros de letalidade analisaram-se a coagulação do embrião (0, 24 h), cauda não isolada (24, 48, 96, 120, 144 h), não formação de somitos (24, 48, 96, 120, 144 h). Os parâmetros não letais que foram analisados incluíram taxa de eclosão (24, 48, 72, 96, 120, 144 h), os movimentos espontâneos (24h), batimentos cardíacos (48h) e pigmentação do embrião/larva (24, 48, 72, 96, 120, 144 h), ocorrência de efeitos teratogênicos, que compreende a presença de escoliose, raquitismo, deformações do vitelo e retardo do crescimento em geral, foram analisados nos tempos de exposição até 144 horas pós fertilização. As condições que foram adotadas para a realização dos experimentos, foram adaptadas a partir das normas da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico 236 (OECD, 2013).

4.5 Análises Morfométricas

As análises foram realizadas após 144 hpf onde os espécimes foram submetidos à eutanásia por imersão em solução de benzocaína 0,1% e fixados em paraformaldeído (PFA) a 4% por 24 horas. Após a fixação os espécimes foram retirados do PFA e mantidos em álcool 70% a temperatura 4°C, até a realização da biometria. As análises morfométricas dos espécimes foram realizadas com auxílio de um microscópio com sistema de captura de imagem (Opticam OPZTS - O400S), nos quais foram fotografados dorsal e lateralmente. As imagens foram analisadas com o software ImageJ, para os parâmetros (em milímetros): Área

da bexiga natatória (ABN), Área do saco vitelínico (ASV), Largura da cabeça (LC) e Profundidade da cabeça (PC), Diâmetro ocular (DO), Distância interocular (DI), Distância da boca ao ânus (DBA).

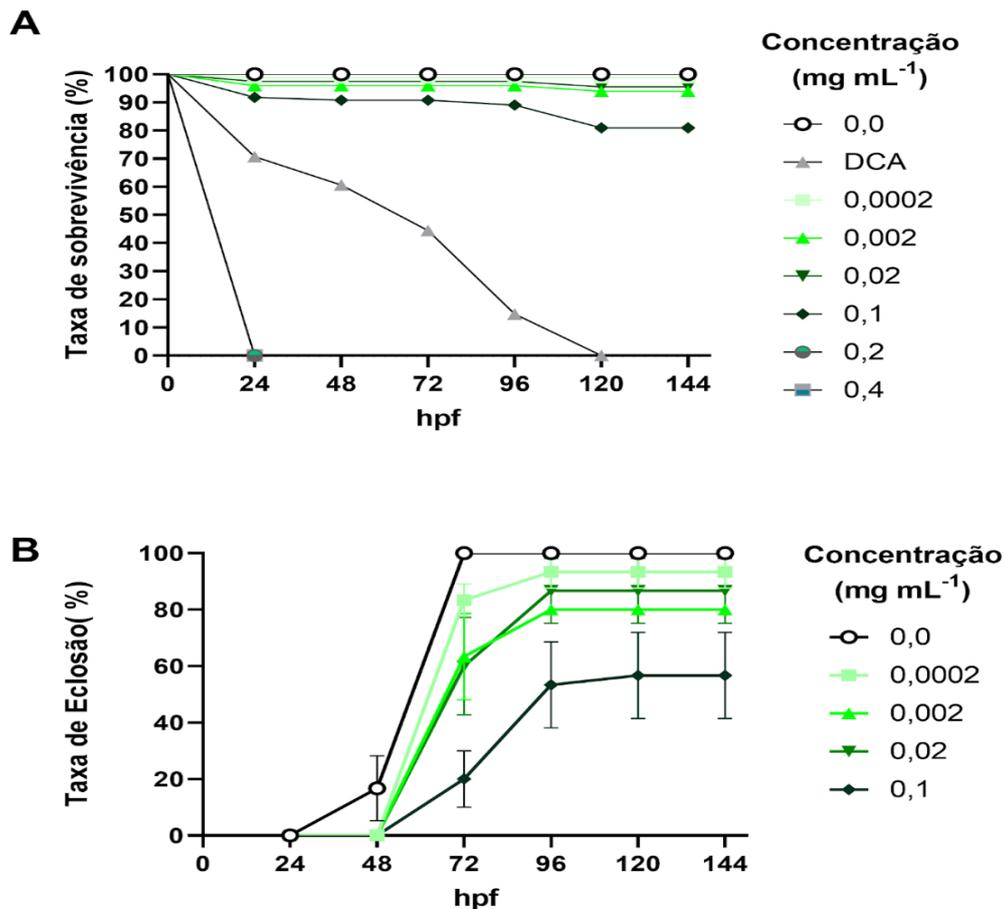
4.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram processadas com software Graphpad Prisma 8.0. Os dados paramétricos obtidos passaram pelos testes one-way ANOVA, seguido do teste de Tukey com nível de significância de 5%. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, de Shapiro-Wilk e o teste de Bartlett. resultados de sobrevivência foram testados de acordo com o teste de LogHank. Considerou-se diferença significativa entres os grupos resultados quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Observou-se que, após 144h de exposição dos embriões de *D. rerio*, de 0,2 e 0,4 mg/mL de metribuzin foram as mais tóxicas provocando a letalidade de 100% dos embriões em 24 horas, seguida da concentração 0,1 mg/mL, que teve a maior mortalidade em 144 horas cerca de 43,7%, comparando ao controle (0,0) que sobreviveram 100% dos embriões, validado o experimento como mostra a Figura 6 (A).

Figura 6 - Análise de sobrevivência (A) e da taxa eclosão (B) das fases embrionária e larval do zebrafish (*Danio rerio*) exposto à formulação comercial do herbicida metribuzin por 144h.



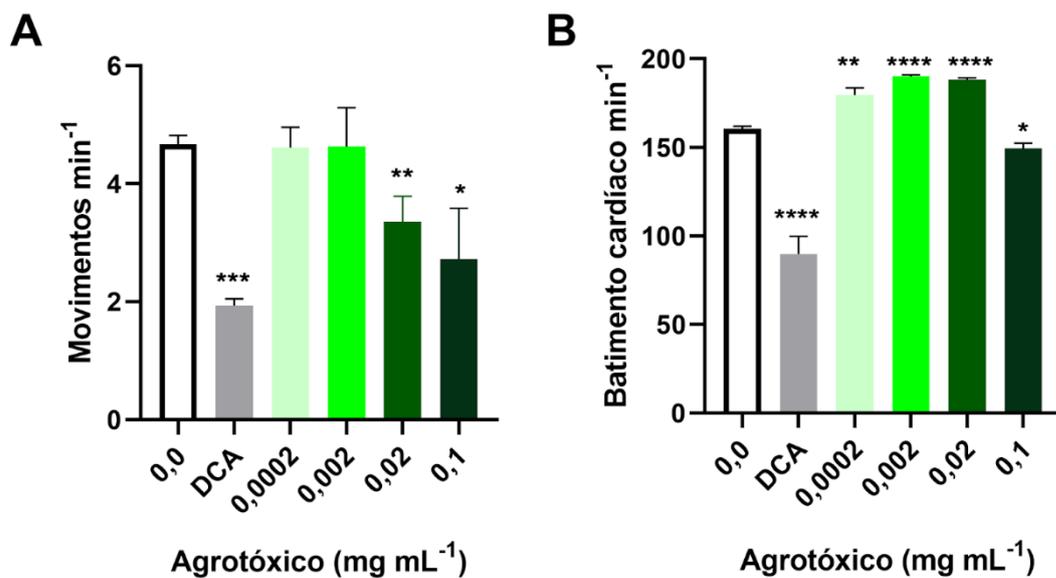
Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Os resultados observados nas alterações das taxas de sobrevivência, consequentemente também alteraram as taxas de eclosão no decorrer das 144h, principalmente nas maiores concentrações que apresentaram taxas de sobrevivência menores, dependente dos tratamentos 0,2 e 0,4 mg/mL, não apresentaram sobreviventes após 24 horas, de experimento e foram descartados do restante das análises, uma vez que só são feitas análises em indivíduos vivos. No grupo controle (0,0), não foi observada mortalidade dos

embriões e larvas durante o período experimental validando assim o experimento. Ao longo das 144h, notou-se retardo de eclosão com embriões eclodindo em até 120h na concentração de 0,1 mg/mL, visto que os embriões começam a eclodir normalmente a partir de 48 horas pós fertilização em até 96 hpf.

A taxa de eclosão do grupo controle foi de 100% seguida da concentração 0,0002 mg/mL com 93.3% de eclosão, das concentrações subletais usadas a de 0,1 mg/mL foi a mais toxica chegando à eclosão de 56,6% dos embriões demonstrado na Figura 6 (B). As concentrações 0,2 e 0,4 mg/mL foram consideradas letais e o DCA já era esperado a letalidade em até 96 horas.

Figura 7 - Frequência de movimentos espontâneos (A) e batimentos cardíacos por minuto (B) expostos ao herbicida a base de metribuzin durante 144 horas. Os * representam diferença estatística entre o grupo controle e concentrações de Metribuzin, pela Anova- One Way seguido de teste Tukey ($p < 0,05$). Dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Nos dados obtidos dos movimentos espontâneos (Figura 7 A), analisados as 24 horas pós fertilização, nota-se que as maiores concentrações de (0,02 mg/mL, 0,1 mg/mL) apresentaram redução de movimentos ($p < 0,05$), (0,02 mg/mL $p < 0,0304$ e 0,1 mg/mL $p < 0,0020$) comparado ao controle, as concentrações 0,0002 e 0,002 mg/mL, não apresentaram diferenças significativas.

Os resultados dos batimentos cardíacos (Figura 7 B) com análises a partir de 48h após a exposição todas as concentrações apresentaram alterações significativas ($p < 0,05$), comparadas ao controle em todas as concentrações. O ensaio apresentou aumento da

frequência cardíaca (taquicardia) em todas as concentrações com maior frequência nos tratamentos 0,002 mg/mL, 0,02 mg/mL, ($p < 0,0001$), para as duas concentrações e DCA comparado ao controle, as demais concentrações apresentaram diferenças significativas de ($p < 0,0500$) para 0,1 mg/mL e ($p < 0,0013$) para 0,0002 mg/mL.

No presente estudo observou-se que nas maiores concentrações subletais usadas no experimento de 0,02 e 0,1 mg/mL, as larvas com idade a partir de 96 horas apresentaram comportamento diferentes como posição lateral no fundo da placa de poços e nado lateral, seguido de agitação e em alguns indivíduos nado em círculo, evidenciando que a toxicidade do composto pode desencadear possíveis alterações nos órgãos sensoriais e no sistema nervoso, baseado no comportamento diferente comparado ao controle.

Nos dados das análises morfológicas foram identificadas alterações teratogênicas nos embriões e larvas no decorrer das 144h de exposição herbicida. O grupo controle (0,0) não apresentou alterações teratogênicas (Tabela 2 e Figura 7, A), porém nos demais grupos expostos ao metribuzin foram observadas algumas alterações ao longo do tempo e dependente de concentração (Figura 7).

Tabela 2 - % de aparecimento de parâmetros teratogênicos e alterações morfológicas aparentes, o experimento foi realizado com número amostral de (n=3) 30 embriões por concentração.

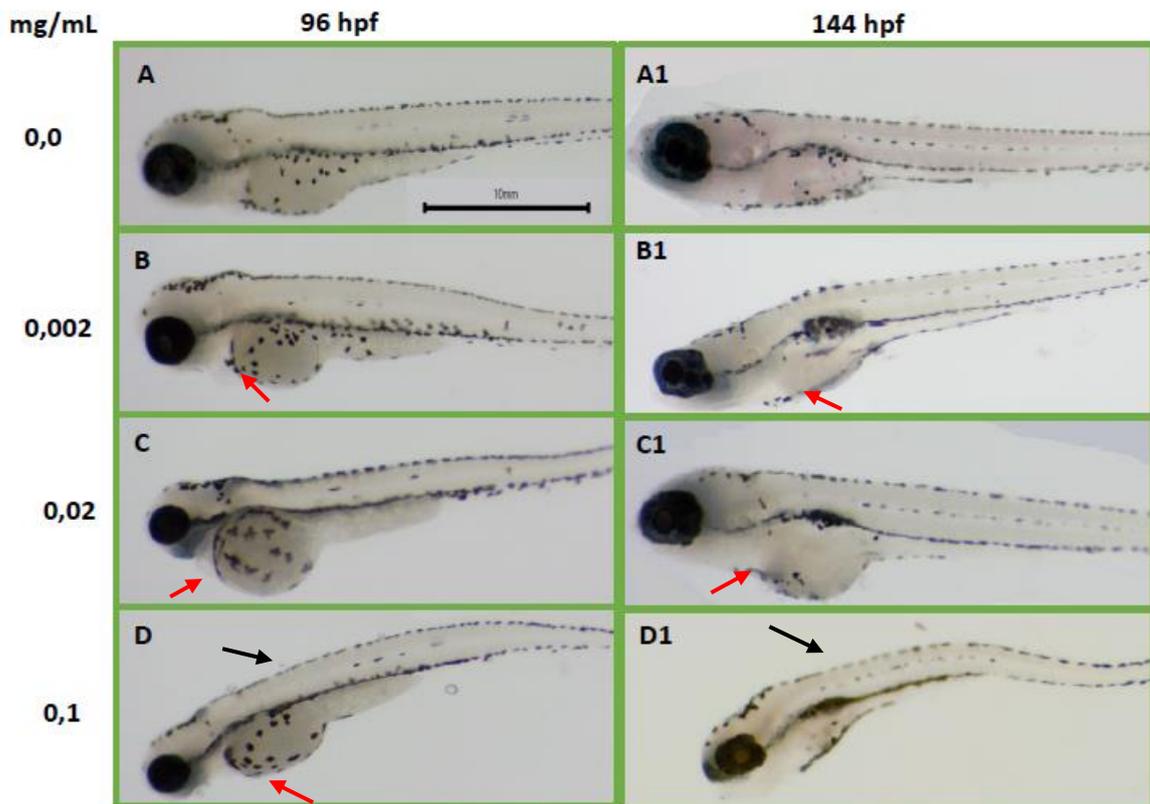
Parâmetros teratogênicos	Metribuzin mg/mL				
	0,0	0,0002	0,002	0,02	0,1
Alteração na pigmentação	0%	0%	0%	0%	16,65%
Deformações da coluna	0%	3,33%	13,35%	13,35%	20,00%
Formação de edema	0%	3,33%	0%	0%	23,33%
Retardo no crescimento	0%	0%	0%	0%	16,65%

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Amostras do grupo controle não apresentaram alterações teratogênicas ao longo do tempo, nas demais concentrações observou-se anormalidade com maior ou menor frequência

dependendo da concentração comparado ao grupo controle. Nas concentrações menores foram observados poucas teratogênias e uma menor frequência desse aparecimento. Já a concentração 0,0002 mg/mL apresentou deformidade da coluna e formação de edema pericárdico, ambos na porcentagem de 3,33%, o efeito da toxicidade do composto foi aumentado nas concentrações maiores observado na frequência e porcentagem do aparecimento de alterações como visto nas concentrações 0,002 mg/mL e 0,02mg/mL que mostraram deformações da coluna de 13,35% e na concentração 0,1 mg/mL que apresentou maior quantidade de teratogênias, como, Alteração na pigmentação 16,65%,deformação na coluna 20,00%, formação de edema do pericárdio 23,33% e retardo geral no crescimento 16,65%, evidenciando a toxicidade do herbicida.

Figura 8 - Imagens representativas de larvas de zebrafish com 96h e 144h. parâmetros teratogênicos, grupo A (controle), B (0,0002 mg/mL), C (0,002 mg/mL), D (0,02 mg/mL), E (0,1 mg/mL) setas vermelhas indicam defeitos na área do pericárdio e do saco vitelínico e setas pretas, defeitos na coluna.

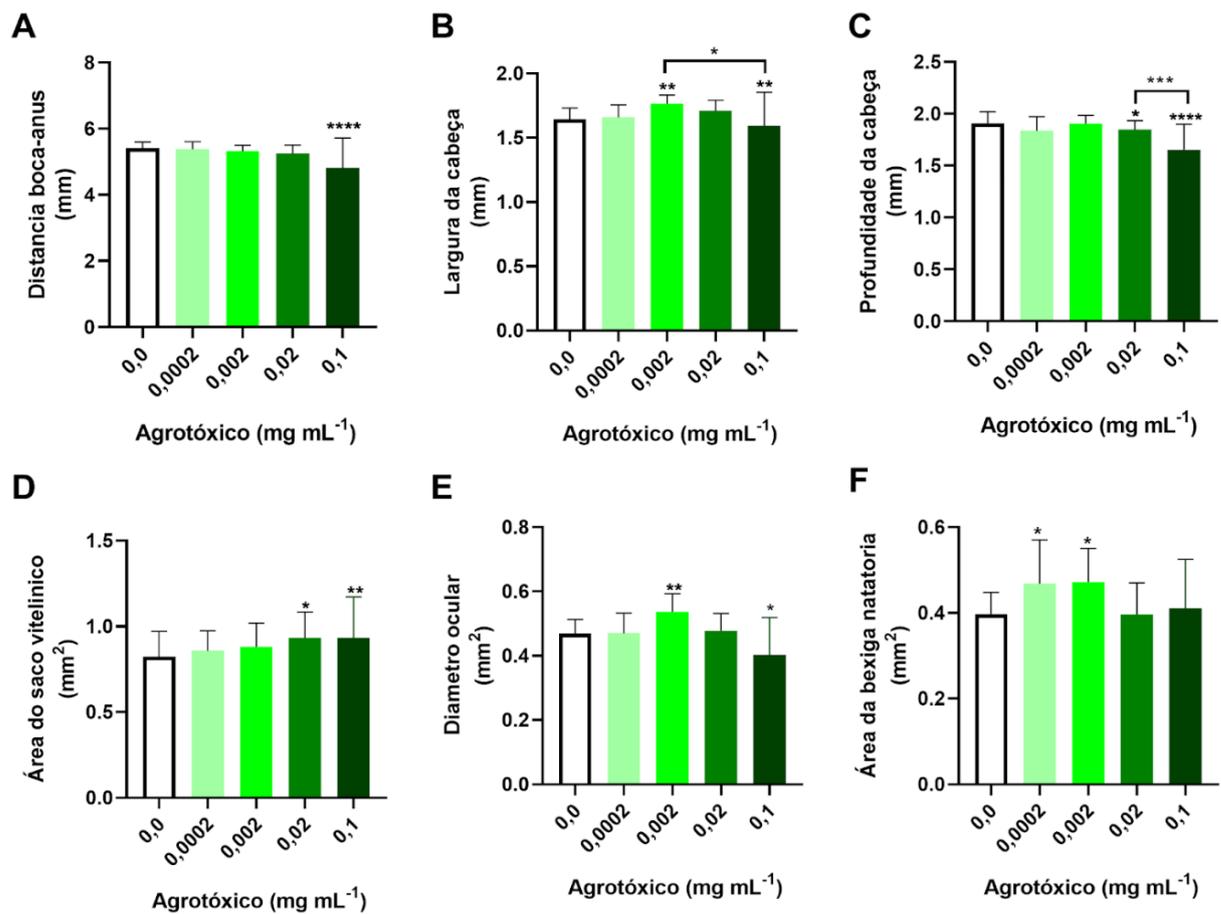


Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Nos dados da (Figura 8), observou-se em (B, B1, C, C1 e D, D1) formação de edema do pericárdio e defeitos no saco vitelínico, apontados por setas vermelhas e defeitos na coluna em setas pretas comparados ao controle (A, A1) em diferentes idades das lavas, com 96 e 144

horas. Além das alterações descritas nas imagens, também se observou alterações na cabeça, em 0,002, 0,02 e 0,1 mg/mL, nos olhos em, 0,002 e 0,1 mg/mL e o retardo total do desenvolvimento da larva em 0,1 mg/mL. Proporcionando mais evidências que somadas as já relatadas no presente trabalho, corrobora a hipótese de toxicidade da substância.

Figura 9 - Análises dos parâmetros morfométricos com larvas de 144h. Os asteriscos representam diferença estatística entre o grupo controle e concentrações de Metribuzin, pela Anova- One Way seguido de teste Tukey ($p < 0,05$). Dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.



Nas análises morfométricas houve diferenças significativas em todos os parâmetros observados, na Figura (A) distância boca-anus (DBA), houve alteração ($p < 0,05$) na concentração 0,1 mg/mL, em (B) largura da cabeça (LC), as concentrações 0,002 e 0,1 mg/mL apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), em (C) profundidade da cabeça (PC), nos tratamentos 0,02, 0,1 mg/mL foram relevantes, principalmente em 0,1mg/mL que se mostrou mais toxica, em (D) área do saco vitelínico (ASV), as alterações foram nas maiores concentrações 0,02 e 0,1mg/mL ($p < 0,05$), em (E) diâmetro ocular (DO), há diferenças significativas de ($p < 0,05$) em 0,002 e 0,1 mg/mL, já em (F) área da bexiga natatória (ABN), os tratamentos 0,0002 e 0,002 mg/mL também apresentaram diferenças significativas

($p < 0,05$), comparados ao controle (0,0). Os resultados obtidos ao fim do experimento evidenciam que o metribuzin em concentrações subletais possui ação tóxica à ponto de promover alterações morfológicas nos estágios iniciais de desenvolvimento de *zebrafish*, retardo no desenvolvimento, comprometimento da área da bexiga natatória e saco vitelínico e alterações na cabeça e olhos aliados a comportamento observado ao longo dos experimentos, evidenciam a toxicidade do composto para os organismos em concentrações subletais.

No entanto esses resultados, também abre questionamentos sobre a qualidade de vida e sobrevivência desses peixes, considerando que as doses usadas são relativamente baixas, pois foram baseadas em concentrações encontradas no meio ambiente, demonstrando que o composto é tóxico e pode trazer prejuízo aos organismos presentes em locais contaminados.

6 DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos ao longo do trabalho observou-se inúmeras evidências da toxicidade do herbicida de formulação comercial a base de metribuzin. Estudos anteriores também relataram que o metribuzin é uma substância química potencialmente tóxica. Estudo com zebrafish adulto foi demonstrado que a mortalidade em concentrações altas (53 mg/mL) foi maior, chegando a 53% (PLHALOVA *et al.*, 2012). Esses resultados em peixes adultos são semelhantes aos obtidos no presente estudo com indivíduos na fase embriolarval levando em consideração a mortalidade das maiores doses letais e maiores não letais usadas nesse trabalho.

Em trabalho com exposição de *Daphnia magna* à atrazina, herbicida pertencente ao grupo do metribuzin com mecanismo de ação semelhantes, demonstraram que na concentração de 40 mg/L em 24 horas, houve 50% de letalidade dos indivíduos expostos e que a concentração de 7 mg/L também matou 50% porém após 48 horas (HUSAK *et al.*, 2022).

Em estudos de (VELISEK *et al.*, 2008, 2009) foram descritos o comportamento da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (62,51 mg/L de metribuzin) e da carpa comum (*Cyprinus carpio*), e em ambos os estudos as ações comportamentais dos peixes eram parecidas, deitados no fundo do tanque e se movendo em círculos, seguido por um curto estágio de excitação (convulsões, saltos acima da superfície da água, movimento em círculos) respiração acelerada; perda de coordenação do movimento; peixes deitados de lado e se movendo nessa mesma posição.

PLHALOVA *et al.*, (2012) analisou juvenis de zebrafish, em seu ensaio os peixes nadavam apenas no meio do tanque com diminuição significativa no interesse por alimentos comparados ao grupo controle. No mesmo estudo, os animais também apresentaram mudanças de comportamento quando expostos às concentrações de 33 mg/mL e 53 mg/mL de metribuzin comparados ao grupo controle (PLHALOVA *et al.*, 2012).

Assim sendo a taquicardia observada nesse estudo pode estar associada ao hormônio tireoidiano uma vez que em estudos anteriores há relatos que o metribuzin é uma substância que pode desregular o sistema endócrino, principalmente a tireoide (BLEEKE *et al.*, 1985; CHIALI *et al.*, 2013; G, LI *et al.*, 2022).

Estudos anteriores relataram, redução no ganho de peso e massa corporal, necrose hepática, alterações histopatológicas no fígado e nas glândulas supra-renais e tireoide, podem

estar associada a problemas metabólicos, por causa presença de moléculas tóxicas e da peroxidação de lipídeos celulares pelos componentes tóxicos presentes na formulação do herbicida (BLEEKE *et al.*, 1985; BOTELHO *et al.*, 2009; CHIALI *et al.*, 2013; G, LI *et al.*, 2022).

Em trabalho utilizando atrazina, foi relatada a diminuição da ingestão alimentar e alterações no comportamento natatório e coordenação motora que podem ser causadas pelo efeito do composto nos órgãos sensoriais e no sistema nervoso (STEINBERG *et al.*, 1995). Já (YU *et al.*, 2013) demonstrou em seu estudo que o metribuzin promove alteração dos níveis de hormônio tireoidiano em larvas de zebrafish.

No presente estudo as larvas a partir de 96 horas nas concentrações 0,02 e 0,1 mg/mL, também apresentaram comportamentos erráticos como os descritos nos estudos acima, em relação ao peso como as larvas do experimento ainda não comiam não se pode relacionar os resultados, porém foram observadas que em algumas larvas da concentração 0,1 mg/mL houve retardo total no desenvolvimento corporal, o que pode está associado também ao comprometimento do sistema metabólico.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam que a exposição embrionária de *zebrafish* a diferentes concentrações de relevância ambiental do herbicida a base de Metribuzin Unimark 700 WG, promoveu toxicidade, observada pela presença de alterações letais, subletais e morfofisiológicas.

O estudo demonstrou que o composto mesmo em concentrações de relevância ambiental desencadeia alterações fisiológicas e morfológicas a curto prazo que atrapalha o funcionamento normal do organismo. Com o uso exagerado desses agrotóxicos no Brasil e as novas descobertas sobre os danos causados por tais compostos ao ambiente e indivíduos, se faz necessário outros estudos que avaliem parâmetros a nível celular, tecidual, comportamental com análise a longo prazo para uma maior compreensão sobre os danos causados pelo composto.

REFERÊNCIAS

- ABREU; SILVA; TEODORO; HOLANDA; SAMPAIO. Crescimento e produtividade de cana-de-açúcar em função da disponibilidade hídrica dos Tabuleiros Costeiros de Alagoas. *Bragantia [Internet]*. 2013;72(3):262–70. Available from: <https://doi.org/10.1590/brag.2013.028>.
- AGROFIT. Sistema de registro de agrotóxicos do Ministério da Agricultura. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons
- BAILEY; TODT; BURCHFIEL; PRESSLEY; DENNEY; SNAPP. A exposição crônica a um pesticida contendo glifosato leva à disfunção mitocondrial e ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio em *Caenorhabditis elegans*. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2018; 57 :46–52.
- BELCHIOR *et al.* Impactos de agrotóxicos sobre o meio ambiente e a saúde humana, *Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília*, v. 34, n. 1, p. 135-151, jan./abr. 2014.
- BLEEKE; SMITH. Metabolismo e toxicidade da metribuzina no fígado de camundongos *Pestic. Bioquim. Physiol.*, 23 (1985), pp. 123 – 130.
- BULA; METRIBUZIN UNIMARK 700 WG. Disponível em: https://br.uplonline.com/download_links/7NmMkw6uz5hjn14oMNkePCJ8CqMyJYPSsSzpuJm.pdf>. Acesso em 16 mai. 2023.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - **ANVISA**. Uso agrícola para metribuzin, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/m-no/4425json-file-1>. Acesso em: 20.mai.2023.
- CANEDO, A; SAIKI, P; SANTOS, A. L; CARNEIRO, K. DA S; SOUZA, A. M. DE; QUALHATO, G; BRITO, R. DA S; MELLO-ANDRADE, F; ROCHA, T. L. *Zebrafish (Danio rerio) meets bioethics: the 10rs ethical principles in research*. *Ciência Animal Brasileira*, 23, E–70884., 2022. Acesso em: 25.jun.2023.
- CARVALHO, L.B. Herbicidas. 1, *ed. Lages, SC*, 2013, 62 p.
- CARVALHO; CASTRO; OTSUBO; PEREIRA. Controle de dez espécies daninhas em cana-de-açúcar com o herbicida mesotrione em mistura com ametryn e metribuzin. *Planta daninha [Internet]*. 2010;28(3):585–90. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582010000300015>.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. *Acompanhamento da Safra Brasileira - Cana-de-Açúcar - Safra 2007/2008 - Primeiro Levantamento - Maio/2007*. Disponível em: http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/11evan_cana07.pdf
- CORREIA, N. M; CARBONARI, C. A; VELINI, E. D. Detection of herbicides in water bodies of the Samambaia River sub-basin in the Federal District and eastern Goiás. *Journal*

of *Environmental Science and Health, Part B*, v. 55, n. 6, p. 574-582, 19 mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03601234.2020.1742000>. Acesso em: 4 fev. 2023.

CHIALI; MERZOUK; MEDIDOUB; NAECE. Chronic low level metribuzin exposure induces metabolic alterations in rats Pestic. *Biochem. Physiol.*, 106 (2013), pp. 38-44.

DAMMSKI, A. P; MULLER, B. R; GAYA, C; REGONATO, D. *Zebrafish - Manual de Criação em Biotério*. Curitiba, *UFPR- Universidade Federal do Paraná*. 1. ed, 2011.

DORES, E; NAVICKIENE, S; CUNHA, M; CARBO, L; RIBEIRO, M; DE-LAMONICA-FREIRE, E. Multiresidue determination of herbicides in environmental waters from Primavera do Leste Region (Middle West of Brazil) by SPE-GC-NPD. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 17, n. 5, p. 866-873, out. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0103-50532006000500008>. Acesso em: 4. FEV.2023.

GANG, LI; DONGXUE, LI; HUIXIAN, R; XINJU, LIU. Potential neurotoxicity, immunotoxicity, and carcinogenicity induced by metribuzin and tebuconazole exposure in earthworms (*Eisenia fetida*) revealed by transcriptome analysis. *Science of the Total Environment*, 2021.

GUIMARÃES; MENDES; CAMPION; CHRISTOFFOLETI; TORNISIELO. Lixiviação de Herbicidas Comumente Aplicados à Cana-de-Açúcar em Cinco Solos Agrícolas. *Planta daninha [Internet]*. 2019;37:e019181505. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582019370100029>

HOSTOVSKY, M; BLAHOVA, A; PLHALOVA, L; STEPANOVA, S; PRASKOVA, E; MARSALEK, P; SVOBODOVA, Z. Oxidative stress parameters in early developmental stages of common carp (*Cyprinus carpio*) after subchronic exposure to terbuthylazine and metribuzin. *Neuroendocrinology Letters*; 33(Supp.3):124–129, 2012. Acesso em: 08 nov. 2022.

HUSAK; STUTYNSKA; BURDYLIUK; PITUKH; BUBAL; FALFUSHYNSKA; STRILBYTSKA; LUSHCHAK. Low-toxic herbicides Roundup and Atrazine disturb free radical processes in *Daphnia* in environmentally relevant concentrations. *EXCLI J*. 2022 Mar 9;21:595-609. doi: 10.17179/excli2022-4690. PMID: 35651660; PMCID: PMC9150014.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. *Relatórios de comercialização de agrotóxicos*. 2019. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>

LOPES; ALBUQUERQUE. Agrochemicals and their impacts on human and environmental health: a systematic review. *Saúde Em Debate*, 42(117), 518–534, 2018.

MANUAL de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. (OPAS/ OMS) Brasília 1997. <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livro2.pdf>.

MODRA, H; HALZOVA, I; BLAHOVA, J et al. Effects of subchronic metribuzin exposure on common carp (*Cyprinus carpio*). *Neuroendocrinology Letters*. 2008;29(5):669–674.

NUNES. Desenvolvimento da agricultura brasileira e mundial e a idéia de Desenvolvimento Rural. *Conjuntura Agrícola*, v. 157, mar. 2007. Disponível em: <<http://www.deser.org.br/documentos/doc/DesenvolvimentoRural.pdf>>. Acesso em: 13 jun. 2015.

OECD, 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. *OECD Publishing, Paris*.

PALMA, D. Y; LOURENCETTI, C; UECKER, M. E; MELLO, P. R; PIGNATI, W. A; DORES, E. F. Simultaneous determination of different classes of pesticides in breast milk by solid-phase dispersion and GC/ECD. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 25, n. 8, p. 1419-1430, Aug. 2014. DOI: 10.5935/0103-5053.20140124.

PATHAK; DIKSHIT. Várias técnicas para remoção de atrazina. *Conferência Internacional de 2011 sobre Ciência e Tecnologia da Vida; Singapura*: IACSIT Press; 2011. pp. 19–22.

PELAE; TERRA; SILVA. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. *Revista de Economia*, v. 36, n. 1, p. 27-48, jan./abr. 2010. DOI: 10.5380/rev36i1.20523.

PIGNATI; MACHADO; CABRAL. Acidente rural ampliado: o caso das “chuvas” de agrotóxicos sobre a cidade de Lucas do Rio Verde. *Ciência & Saúde & Coletiva*, v. 12, n. 1, p. 105-114, jan./mar. 2012. DOI: 10.1590/S1413-81232007000100014.

PLHALOVA; STEPANOVA; PRASKOVA; CHROMCOVA; ZELNICKOVA; DIVISOVA; SKORIC; PISTEKOVA; BEDANOVA; SVOBODOVA. The Effects of Subchronic Exposure to Metribuzin on *Danio rerio*. *The Scientific World Journal*, v. 2012, p. 1-6, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1100/2012/728189>. Acesso em: 15 dez. 2022.

POLETTI; COLLETTE; OMOTO. Compatibilidade de agrotóxicos com os ácaros predadores *Neoseiulus californicus* (McGregor) e *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (*Acari: Phytoseiidae*). *BioAssay*, v. 3, n. 3, p. 1-14, 2008.

REBELO, R. M. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental. Brasília, DF: *Ibama*, 2010.

RODRIGUES; ALPENDURADA; GUIMARÃES; AVÓ; FERREIRA; PARDAL. The environmental condition of na estuarine ecosystem disturbed by pesticides. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 26, n. 23, p. 24075-24087, 21 jun. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05751-5>. Acesso em: 5 fev. 2023.

RODRIGUES; ALMEIDA. Guia de herbicidas. *IAPAR*, 6. ed, Londrina, p. 697, 2011.

ROCHA; OLIVEIRA. Investigation of a Brazilian tannery effluent by means of zebrafish (*Danio rerio*) embryo acute toxicity (FET) test. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2017.

STEINBERG; LORENZ; SPIESER. Efeitos da atrazina no comportamento natatório do zebrafish, (*danio rerio*). *BrachyPesquisa de Água*. 1995; 29 (3):981–985.

SUN; LIU; SHAN; FAN. Spatiotemporal distributions of Cu, Zn, metribuzin, atrazine, and their transformation products in the surface water of a small plain stream in eastern China. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 191, n. 7, 13 jun. 2019b. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7556-3>. Acesso em: 14 fev.2023.

VELISEK; SVOBODOVA; PIACKOVA; NOVOTNY; BLAHOVA; SUDOVA. Effects of metribuzin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinární Medicína*, v. 53, No. 6, p. 324-332, jun. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.17221/1857-vetmed>. Acesso em: 9 dez. 2022.

VELISEK; SVOBODOVA; PIACKOVA; SUDOVA. Effects of Acute Exposure to Metribuzin on Some Hematological, Biochemical and Histopathological Parameters of Common Carp (*Cyprinus carpio L.*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 82, n. 4, p. 492-495, jan. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9648-1>. Acesso em: 19 dez. 2022.

VIKTOR, V; HUSAKA, M; MOSIICHUKA, V; MAKSYMIVA, Y; SLUCHYKI, M; STOREYC, B; STOREYC, I; LUSHCHAKA. Histopathological and biochemical changes in goldfish kidney due to exposure to the herbicide Sencor may be related to induction of oxidative stress. *Aquatic Toxicology* 155 (2014) 181–189.

XING; CHOW; COOK; BENOY; REES; ERNST; MENG; LI; ZHA; MURPHY; BATCHELOR; HEWITT, L. Mark. Pesticide Application and Detection in Variable Agricultural Intensity Watersheds and Their River Systems in the Maritime Region of Canada. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 63, n. 4, p. 471-483, 19 ago. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9789-9>. Acesso em: 14 mar. 2023.

YU, L; CHEN, M; LIU, Y; GUI, W; ZHU, G. Desregulação endócrina da tireoide em larvas de *zebrafish* após exposição a hexaconazol e tebuconazol. *Aquat. Tóxico.*, 138–139 (2013), pp. 35-42 ,10.