



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA



Mariana Laiz Silva de Lima

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA EM EMBRIÕES DE *ZEBRAFISH* (*Danio rerio*) PARA AVALIAÇÃO DE RISCO ASSOCIADA À EXPOSIÇÃO AO AGROTÓXICO PROMETRINA

Ouro Preto, MG

2019



Mariana Laiz Silva de Lima



Ensaio de Toxicidade Aguda em Embriões de *Zebrafish* (*Danio rerio*) para Avaliação de Risco Associada à Exposição ao Agrotóxico Prometrina

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Orientadora: Dra. Karina T. Santos Rúbio
Coorientadora: Dra. Maria Elvira P. Martucci

Ouro Preto, MG

2019



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Mariana Laiz Silva de Lima

Ensaio de toxicidade aguda do agrotóxico prometrina em embriões de zebrafish (*Danio rerio*)

Membros da banca

André Luis Correa de Barros - Mestre - PROAMB/DECBI/UFOP
Aline de Souza - Graduada - Cipharm/EFAR/UFOP
Karina Taciana Santos Rubio - Doutora - DEFAR/UFOP

Versão final

Aprovado em 25 de novembro de 2019

De acordo

Karina Taciana Santos Rubio



Documento assinado eletronicamente por **Karina Taciana Santos Rubio**, **PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 07/12/2019, às 11:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0026622** e o código CRC **59A3AE96**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.203744/2019-90

SEI nº 0026622

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000
Telefone: 3135591649 - www.ufop.br

AGRADECIMENTOS

Agradeço a esta instituição pelo excelente ambiente oferecido aos seus alunos.

À querida orientadora, Profa. Dra. Karina, pelos cuidados e oportunidades de crescimento - acadêmico e pessoal.

À coorientadora Maria Elvira, pela dedicação e esforços.

A todos os professores, não somente por proporcionar conhecimento, mas pela ajuda na formação do caráter da educação no processo de formação profissional.

Agradeço também a minha família, pelo amor, carinho, paciência e ensinamentos.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte do projeto, o meu muito obrigada!

RESUMO

Os agrotóxicos têm sido extensivamente utilizados na agricultura com o objetivo de prevenir e controlar os efeitos danosos provocados por diversos tipos de pragas. Apesar de sua indiscutível utilidade, sabe-se que o uso indiscriminado de tais substâncias está associado ao desenvolvimento de diversas patologias em humanos e graves prejuízos ambientais. A prometrina é um herbicida s-triazínico utilizado no controle de gramíneas, ervas daninhas e algas. Embora seu uso esteja proibido pela União Européia desde 2014, em países em desenvolvimento como o Brasil, seu uso ainda é permitido e ela é largamente empregada. Apesar da permissão, a ANVISA não determina o valor de ingestão diária aceitável (IDA), o intervalo de segurança ideal entre as aplicações e a colheita e adota valores de LMR maiores que aqueles observados em países desenvolvidos.

Assim, o presente projeto propõe reforçar os dados relacionados à avaliação da toxicidade para o pesticida prometrina. Para tal, foi utilizado o protocolo OECD 236 – Toxicidade Aguda em Embriões de Peixe (FET) com adaptações. Nele, ovos fertilizados de *zebrafish* (*Danio rerio*) foram expostos a diferentes concentrações de prometrina (0; 0.01; 0.02; 0.04; 0.4; 4 mg/L) e observados a cada intervalo de 24 horas, durante cinco dias para avaliar as possíveis alterações no desenvolvimento embrionário normal e letalidade vinculada ao pesticida. Os *endpoints* edemas, isto é, atraso no desenvolvimento embrionário, na absorção do saco vitelínico e diminuição na frequência cardíaca não foram observados nestas concentrações. Os resultados obtidos mostram que a prometrina não afeta o modelo animal proposto nas recomendações permitidas, entretanto, outros organismos demonstraram toxicidade no desenvolvimento. Além disso, algumas variáveis podem alterar drasticamente a capacidade de permeabilidade e, portanto a toxicidade, como: presença de matéria orgânica natural (ex. ácidos húmicos), presença de tensoativos na formulação do agrotóxico, e efeitos sinérgicos.

A realização de estudos que avaliem a toxicidade da prometrina em todos os estágios de desenvolvimento de vertebrados é fundamental, uma vez que, no Brasil, a população pode se encontrar exposta a grandes quantidades deste agrotóxico, tanto pelo consumo de alimentos quanto de água potável contaminada.

Palavras-chave: Agrotóxicos, Prometrina, *Zebrafish*, Ensaio de Toxicidade.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Utilização de Agrotóxicos no Brasil	10
1.2 Controle e Regulação de Agrotóxicos	14
1.3 Prometrina	16
1.4 Características do Modelo Animal Utilizado	20
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos Específicos	26
4. METODOLOGIA	27
4.1 Criação e Manutenção do Novo Modelo Experimental	27
4.2 Exposição dos Ovos Fertilizados ao Agrotóxico	30
4.3 Análise das Alterações na Exposição dos Embriões ao Agrotóxico	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Avaliação do Modelo Implementado no Laboratório de Toxicologia	37
5.2 Avaliação das Alterações Provocadas em Embriões de <i>Zebrafish</i> pelo Agrotóxico Prometrina	39
5.3 Avaliação da Exposição ao Agrotóxico	39
6. CONCLUSÕES	43
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	44
8. ANEXO 1	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Frequência da notificação por intoxicação por agrotóxicos, por ano e por tipo de exposição – Brasil (2007 a 2015).	11
Figura 2: Classificação toxicológica da ANVISA para agrotóxicos utilizada até 2018.....	12
Figura 3: Classificação dos agrotóxicos da ANVISA implementadas em 2019 em comparação com a classificação adotada até 2018.	13
Figura 4: Estrutura da prometrina (N2, N4-di-isopropyl-6-methylthio-1,3,5-triazine-2,4-diamine).....	17
Figura 5: Demonstração dos principais estágios do desenvolvimento do peixe-zebra ao longo das primeiras 72 horas pós-fertilização (desenvolvimento embrionário) e ao mesmo dia (larva).....	21
Figura 6: Dimorfismo sexual. A fêmea (à direita) é maior e mais robusta, enquanto o macho (à esquerda) é menor e mais delgado.....	21
Figura 7: Número de genes análogos compartilhados em diferentes espécies.....	23
Figura 8: Aquários de manutenção dos animais – Lab. Toxicologia - UFOP.....	27
Figura 9: Aquário de reprodução – Lab. Toxicologia – UFOP.	29
Figura 10: Ovos de zebrafish recém-fertilizados são expostos à solução de prometrina em teste por um período de 96 horas, de acordo com OECD 236.	31
Figura 11: Placa 1 - Três grupos (grupos 5, 4 e 3) com as soluções de prometrina nas concentrações de 4 mg/L, 0,4 mg/L e 0,04 mg/L; Placa 2 - Dois grupos (grupo 2 e 1) com as soluções de prometrina nas concentrações de 0,02 mg/L, 0,01 mg/L e com o grupo 6 com controle de solvente; Placa 3 - O grupo 7, controle negativo com água.	32
Figura 12: Exemplo de Coagulação do Embrião.....	33
Figura 13: O embrião Zebrafish de 24 horas em (a) mostra somitos bem desenvolvidos, enquanto que o embrião em (b) não apresenta nenhum sinal de formação de somito, apesar de mostrar um edema pronunciado do saco vitelino (*). Já o embrião de 48 horas em (c) mostra formação distinta de somitos, enquanto que o embrião de 96 horas em (d) não apresenta qualquer sinal de formação de somito, entretanto este embrião apresentou curvatura espinhal (escoliose) e o edema pericárdico no embrião mostrado em (*).	34

Figura 14: A falta de batimentos cardíacos é indicada por não convulsões do coração (seta dupla). A imobilidade das células sanguíneas em, por exemplo, a aorta abdominal (em inserção) não é um indicador por falta de audição. Observe também a falta de formação de somito neste embrião (aparência homogênea, em vez de segmentar, dos tecidos musculares). Aumento de 80x.....	35
Figura 15: Embrião Danio Rerio no período de 24 h com desenvolvimento normal.....	36
Figura 16: Sistema anexado nas estruturas dos aquários que garante o controle automático da qualidade da água.	38
Figura 17: Porcentagem de eclosão dos embriões ao decorrer dos tempos de 48; 72; 96 e 120 horas pós fertilização.....	40
Figura 18: Porcentagem do desenvolvimento normal/vivo dos embriões ao decorrer dos tempos de 48; 72; 96 e 120 horas pós fertilização.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Limite Máximo de Resíduos (LMR) da prometrina nos produtos de prateleiras no Brasil – ANVISA.	19
Tabela 2: Parâmetros da qualidade d'água para o cultivo de <i>Zebrafish</i> adotados no Laboratório de Toxicologia – UFOP.....	28

LISTA DE SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AESA - Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
CL 50 - Concentração Média Letal
DL 50 - Dose Média Letal
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA - Ácido Desoxirribonucléico
EPA - Lista de Agência de Proteção Ambiental
EUA – Estados Unidos
FET – Ensaio de Toxicidade Aguda em Embriões de Peixe
IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
IDA - Ingestão Diária Aceitável
LMR - Limite Máximo de Resíduos
LOOH - Peróxido Lipídico
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OECD - Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico
PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PDP - Pesticide Data Program
SAA - Sistemas de Abastecimento de Água
SISAGUA - Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água
SOD - Superóxido Dismutase
EU – União Europeia
UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

1. INTRODUÇÃO

1.1 UTILIZAÇÃO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL

O Brasil lidera o ranking mundial de maior consumo de agrotóxicos há quase duas décadas (BOMBARDI, 2011). Nos últimos dez anos, o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, sendo que o mercado brasileiro teve um crescimento disparado de 190% (DUTRA e FERREIRA, 2017). Erroneamente também chamados de defensores agrícolas, esses compostos são utilizados com o intuito de prevenir e combater pragas que prejudicam o desenvolvimento das plantações. Sua utilização de maneira indiscriminada pode levar à contaminação da planta, do solo, da água e do ar; resultando em alterações na biodiversidade do solo e/ou intoxicações em organismos vivos (CARNEIRO *et al.*, 2015).

O crescimento exacerbado do consumo de agrotóxicos para o manejo da agricultura faz com que esses compostos tenham importância cada vez mais significativa no campo da saúde pública devido a seus efeitos em médio e longo prazo na saúde da população (DUTRA e FERREIRA, 2017). Sendo assim, diversas formas de intoxicação que podem ocorrer com a utilização desses produtos, além do que ocorre de forma direta, isto é, em contato direto com o agrotóxico, há intoxicações de forma indireta, como a ingestão do plantio em questão (JAGUARIBE, 2011). Uma das formas de exposição grave que ocorre no Brasil é pelo consumo de água (QUEIROZ, 2012), e pelo método de aplicação do agrotóxico por transporte aéreo em que só é permitido no país devido ao alto índice de toxicidade (BOMBARDI, 2017).

De acordo com relatório nacional do Ministério da Saúde publicado em fevereiro de 2016, o período de 2007 a 2015, houve um aumento do número de notificações por intoxicações por agrotóxicos, possivelmente em decorrência do aumento da comercialização dessas substâncias e da melhoria da atuação da vigilância e assistência à saúde para identificação, diagnóstico e notificação dos casos. Neste período, houve acréscimo de 139% das notificações, sendo o total acumulado de 84.206 casos. Em relação ao tipo de exposição, observou-se que: a maior parte dos casos de intoxicação (78,8%) ocorreu por exposição aguda única; seguida de 12,2% cujo tipo de exposição foi ignorado ou deixado em branco; 7,1% de exposição aguda repetida; 1,4% de exposição crônica; e, por fim, 0,4% de exposição aguda sobre crônica (Figura 1).

Tipo de exposição		2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Total
Aguda-única	Nº	4.038	4.925	5.550	6.187	7.691	8.752	10.031	9.971	9.243	66.388
	(%)	81,3	81,6	79,3	78	76,9	78,8	79,7	78,5	77,9	78,8
Ignorado/ Em branco	Nº	532	589	823	1.119	1.418	1.451	1.495	1.495	1.370	10.292
	(%)	10,7	9,8	11,8	14,1	14,2	13,1	11,9	11,8	11,5	12,2
Aguda-repetida	Nº	321	389	453	509	743	774	893	1038	887	6.007
	(%)	6,5	6,4	6,5	6,4	7,4	7	7,1	8,2	7,5	7,1
Crônica	Nº	55	106	146	80	104	95	122	122	311	1.141
	(%)	1,1	1,8	2,1	1	1	0,9	1	1	2,6	1,4
Aguda sobre crônica	Nº	18	30	29	41	51	40	48	69	52	378
	(%)	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4
Total		4.964	6.039	7.001	7.936	10.007	11.112	12.589	12.695	11.863	84.206

Figura 1: Frequência da notificação por intoxicação por agrotóxicos, por ano e por tipo de exposição – Brasil (2007 a 2015).

Fonte: (Brasil. Ministério da Saúde, 2018).

Ressalta-se que, a partir dos dados supracitados, é possível que a exposição crônica esteja subnotificada, reflexo da baixa capacidade dos serviços de saúde em reconhecer e captar casos desse tipo (Brasil. Ministério da Saúde, 2018). Ainda sim, é evidente que o consumo desses produtos pode ser altamente maléfico ao corpo humano, quando não ocorre controle da sua utilização nas agriculturas (JAGUARIBE, 2011). O excesso de tais substâncias pode provocar em nosso organismo o desenvolvimento de certas patologias como: gastrointestinais, dérmicas, hepáticas, renais, neurológicas, alérgicas, bem como a redução da imunidade, alterações de humor, diabetes, hipotireoidismo, infertilidade, abortos, câncer, malformação do feto e até alterações na estrutura do DNA (CARNEIRO *et al.*, 2015). A falta de uso dos equipamentos de proteção coletiva e individual pelos trabalhadores, o uso indiscriminado nas plantações, a toxicidade dos produtos e a precariedade dos mecanismos de vigilância da saúde são os principais fatores associados ao desenvolvimento dessas patologias em humanos além de graves prejuízos ambientais (JAGUARIBE, 2011).

As exposições agudas sofridas por trabalhadores expostos a esses produtos são a maior causa de óbitos por intoxicações por agrotóxicos. Tal situação é explicada pelas relações de trabalho que se estabelecem na produção agropecuária em um estilo de

superexploração: seja pela imposição de jornadas excessivas, pelo manejo sem proteção ou por um longo período de contato com os agrotóxicos, pelas relações de precária contratação de trabalhadores migrantes nos picos da demanda sazonal das safras agropecuárias ou de famílias carentes que perderam suas terras pela hegemonia dos latifundiários e ampliam sua vulnerabilidade ao contexto e modo de produção químico-dependente (CARNEIRO *et al.*, 2015).

Em relação à toxicidade dos produtos, a intoxicação aguda ou crônica por agrotóxicos depende de fatores como o grau da toxicidade do produto, a quantidade absorvida, o tempo de absorção e o tempo e a via de exposição ao produto. A classificação dos agrotóxicos é baseada nos resultados de estudos de toxicidade oral aguda (DL50 oral), toxicidade cutânea aguda (DL50 cutânea) ou toxicidade inalatória aguda (CL50 inalatória). Os valores referentes à Dose Média Letal (DL₅₀) por via oral, representada em miligramas do ingrediente ativo do produto por quilograma de peso vivo são usados para estabelecer as medidas de segurança a serem seguidas para reduzir os riscos que o produto pode apresentar à saúde humana (MOUTINHO, 2016). A partir de tais estudos, os agrotóxicos são agrupados em faixas de classes toxicológicas utilizadas para fins de rotulagem e diferenciadas por cores em classes, de acordo com a sua toxicidade (expressa em termos de DL50) conforme apresentado na Figura 2.

Classificação	DL ₅₀ Oral (mg/kg)		DL ₅₀ Dérmica (mg/kg)		CL ₅₀ Inalatória (mg/L/4h)	Irritação Dérmica	Irritação Ocular
	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido			
Classe I Extremamente Tóxico	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40	≤ 0,2	Ulceração ou corrosão na pele	Opacidade da córnea reversível ou não dentro de 7 d ou irritação persistente nas mucosas oculares
Classe II Altamente Tóxico	> 5 ≤ 50	> 20 ≤ 200	> 10 ≤ 100	> 40 ≤ 400	> 0,2 ≤ 2	Irritação severa, Draize-Cools ≥ 5	Sem opacidade da córnea; irritação da mucosa ocular reversível em 7 dias.
Classe III Medianamente Tóxico	> 50 ≤ 500	> 200 ≤ 2000	> 100 ≤ 1000	> 400 ≤ 4000	> 2 ≤ 20	Irritação moderada, Draize-Cools ≥ 3 < 5	Sem opacidade da córnea; irritação da mucosa ocular reversível em 72 h.
Classe IV Pouco Tóxico	> 500	> 2000	> 1000	> 4000	> 20	Irritação leve, Draize-Cools < 3	Sem opacidade da córnea; irritação da mucosa ocular reversível em 24 h.

Figura 2: Classificação toxicológica da ANVISA para agrotóxicos utilizada até 2018.

Fonte: (MOUTINHO, 2016)

A ANVISA divulgou no dia 23 de julho de 2019 algumas mudanças na classificação toxicológica dos agrotóxicos (Figura 3). Segundo a Agência, o método internacional de classificação é mais restrito que o usado no Brasil atualmente, que trata o risco de morte e o de irritação grave da mesma maneira.

Como era	Como vai ser
Classe I	
 Extremamente tóxico Causa corrosão da pele. Nos olhos, causa opacidade da córnea reversível em 7 dias ou não, além de oferecer persistente irritação na área.	 Extremamente tóxico Fatal se ingerido, em contato com a pele ou inalado.
	 Altamente tóxico Idem. A diferença para o pior grau está na quantidade de exposição ao produto.
Classe II	
 Altamente tóxico Causa irritação severa na pele. Nos olhos, não causa opacidade da córnea, apenas irritação reversível em 7 dias.	 Moderadamente tóxico Causa intoxicação se ingerido, em contato com a pele ou inalado.
Classe III	
 Medianamente tóxico Causa irritação moderada na pele. Nos olhos, não causa opacidade da córnea, apenas irritação reversível em 72 horas.	Pouco tóxico Nocivo se ingerido, em contato com a pele ou inalado.
	Improvável de causar dano agudo Pode ser perigoso se ingerido, em contato com a pele ou inalado.
Classe IV	
 Pouco tóxico Pode causar irritação leve na pele. Nos olhos, não causa opacidade da córnea, apenas irritação reversível em 24 horas.	Não Classificado Sem riscos ou recomendações.

Figura 3: Classificação dos agrotóxicos da ANVISA implementadas em 2019 em comparação com a classificação adotada até 2018.

Fonte: (G1 Globo, 2019)

O *design* da estrutura química dos agrotóxicos busca alcançar uma interação específica com os organismos alvo, entretanto, alguns desses produtos possuem uma afinidade com receptores do nosso organismo, podendo causar quadros de toxicidade (OLIVEIRA, 2018).

Percebe-se, portanto, a necessidade de mais estudos a respeito das características da intoxicação associadas a tais produtos para que sejam tomadas decisões que permitam um melhor controle do uso por meio de ações de monitoramento das agências de vigilância no país.

1.2 CONTROLE E REGULAÇÃO DE AGROTÓXICOS

De acordo com a Lei 7.802, de 11 de julho de 1989, o registro de um agrotóxico é feito pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que verifica a eficiência no combate a pragas e doenças no campo. Mas o registro só é concedido quando o produto também é autorizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que avalia os riscos à saúde, e pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA), que analisa os perigos ambientais. Sem o aval dos três órgãos, O agrotóxico não é liberado.

Apesar disso, com o intuito de facilitar o uso indiscriminado dessas substâncias, a Câmara dos Deputados analisa uma nova proposta de lei, a PL 6299, que flexibiliza as regras de fiscalização e utilização de agrotóxicos no país. Pela proposta, o termo “agrotóxico” deixaria de existir. Entraria em seu lugar a expressão “produto fitossanitário”, o que dificultaria a percepção da população mais carente para o real perigo desses produtos. Além disso, a responsabilidade por conceder registros de novos agrotóxicos caberia ao Ministério da Agricultura que passaria a ter todo o poder decisório. O Ibama e o Ministério da Saúde teriam apenas a função de homologar pareceres técnicos, mas tais avaliações não seriam elaboradas por esses órgãos públicos. Caberia às próprias empresas interessadas em vender os agrotóxicos a missão de apresentar essas avaliações. Segundo o Ibama e a Anvisa, a proposta deixa brechas para que sejam vendidos no mercado nacional produtos já banidos em boa parte do mundo, causadores de distúrbios hormonais, danos ao sistema reprodutivo, entre outros (ASCOM, 2019).

Os pesticidas, aplicados em campos de produção, têm parte significativa absorvida pelas plantas tornando resíduo nos alimentos. Outra parte pode ir para os cursos d’água ou

atingir lençóis freáticos. Uma das principais preocupações a respeito do uso de agrotóxicos é saber se, e em que medida, os alimentos são contaminados com esses produtos químicos. Para estimar a contaminação por agrotóxicos dos alimentos comprados pelos consumidores, muitos países fazem análises sistemáticas. Cada Estado-Membro da União Europeia designa autoridades competentes à *Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESA)* afim de avaliar, anualmente, amostras de alimentos de origem vegetal coletados em cada Estado. Os relatórios da AESA analisam mais de 75.000 amostras de alimentos de todos Estados a cada ano. Em 2013 e 2014, os relatórios indicaram que mais de 98% das amostras respeitaram os limites legais de resíduos e que mais da metade sequer continha teores mensuráveis de resíduos (EFSA, 2014). De forma semelhante, nos Estados Unidos o *Pesticide Data Program (PDP)* é encarregado a coletar e analisar produtos agrícola prontos para ir à mesa do consumidor. Nos EUA, todos os anos, mais de 10.000 amostras têm sido analisadas, constantemente apresentando menos de 1% de amostras com resíduos acima dos toleráveis (Rocha, 2014). A

Agência Nacional de Vigilância Sanitária criada pela Lei nº 9.782, de 26 de janeiro 1999, têm por finalidade: “*Promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e consumo de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados, bem como o controle de portos, aeroportos, fronteiras e recintos alfandegados*” (ANVISA, 1999). Diante deste propósito, a ANVISA criou o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) para avaliar e controlar os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos de origem vegetal que chegam à mesa do consumidor. Até o momento, o último relatório publicado (2013 a 2015), mostra que sempre houve uma porcentagem considerável de amostras apresentando índices acima dos LMR. Na maioria dos casos a irregularidade se dá por presença de resíduos de agrotóxicos não autorizados para aquela determinada cultura (ANVISA, 2016).

Além de contaminar alimentos, resíduos de agrotóxicos podem contaminar os cursos d’água bem como a água que é fornecida à população. Diversos estudos feitos no Brasil e em outras partes do mundo detectaram agrotóxicos nos sistemas hídricos tanto superficiais quanto subterrâneos utilizados para consumo humano direto (BORSOI, 2019). Em 2008, o Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (SISAGUA), do Ministério da Saúde, demonstrou que somente 24% dos sistemas

de abastecimento de água (SAA) cadastrados (referentes às médias de 16 unidades da federação) apresentavam informações sobre o controle da qualidade da água para os parâmetros agrotóxicos. Além disso, 11 estados não realizaram tais análises e/ou não alimentaram o referido sistema de informações com dados em 2008 (QUEIROZ, 2012).

Portanto, é evidente a precariedade dos mecanismos de vigilância da saúde em que há poucas ações de monitoramento das agências de vigilância, seja pela grande extensão do país, o que dificulta um controle adequado, ou pela falta de punições pelo uso indiscriminado (CARNEIRO, 2015). Outro agravante que se deve mencionar é que em um estudo publicado pelo Atlas “Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia”, apontou que 79% dos agrotóxicos utilizados no Brasil estão concentrados em 4 tipos de plantas: soja (52%), milho e cana de açúcar (10%), e algodão (7%). O fato alarmante é que 30% dos agrotóxicos utilizados nesses produtos são proibidos na Europa, dentre eles, a prometrina (BOMBARDI, 2017).

1.3 PROMETRINA

Comercializada de forma mais comum sob o nome fantasia Gesagard®, a prometrina é um agrotóxico pertencente à classe química de herbicidas triazinas. Os herbicidas são agroquímicos utilizados para o controle de ervas daninhas, as quais competem com os vegetais por luz, água e nutrientes, interferindo na qualidade da plantação. As triazinas foram os herbicidas mais aplicados em todo o mundo na segunda metade do século XX por sua presumivelmente baixa toxicidade e persistência ambiental (OLIVEIRA, 2018).

A prometrina estava entre os 350 pesticidas mais usados nos Estados Unidos (Lista de Agência de Proteção Ambiental (EPA)) (EPA, 2019). No entanto, após a coleta de evidências significativas que apontavam que esta classe de agrotóxicos atua como contaminante das águas subterrâneas com diversas propriedades tóxicas (genotóxicas, desreguladoras endócrinas e imunotóxicas), seu uso passou a ser restrito e, posteriormente, passou a ser proibido totalmente em muitos países europeus. Acreditava-se que as triazinas com substituintes S-metil eram menos tóxicas (como a prometrina), mas os países da União Européia (UE) as proibiram juntamente com outros herbicidas triazínicos. Alguns outros países europeus (não membros da UE) seguiram a proibição em 2007, embora ainda

seja utilizada globalmente em outras áreas, como parte da Ásia, da África, Austrália e região do Pacífico, Canadá, China, Índia, Estados Unidos e Brasil (DIKIĆ, 2014).

A prometrina (N2,N4-di-isopropyl-6-methylthio-1,3,5-triazine-2,4-diamine). (figura 4) é um pó branco inodoro, não explosivo, não corrosivo e moderadamente volátil (peso molecular: 241,356 g.mol), estável por até 5 anos ou mais, se armazenado sob condições normais de temperatura e umidade. A meia-vida média no solo (degradação abiótica) é de 274 dias até 316 dias. Nas águas, pode ligar-se a sólidos em suspensão (especialmente orgânicos) ou sedimentos, além disso, sua meia-vida é mais longa em meios alcalinos do que em ácidos (52, 78 e 80 dias em pH de 4, 6 e 8, respectivamente) (DIKIĆ, 2014).

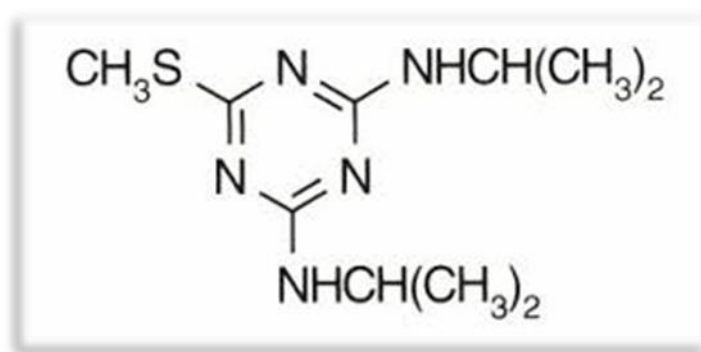


Figura 4: Estrutura da prometrina (N2, N4-di-isopropyl-6-methylthio-1,3,5-triazine-2,4-diamine).

Fonte: ANVISA, 2018. Monografia autorizada prometrina-P15

A aplicação na lavoura ocorre em vários estágios, antes da plantação da semente, imediatamente após a semeadura e antes do aparecimento de ervas daninhas (pré-emergente) ou após o surgimento de pragas e antes que essas interfiram no desenvolvimento da cultura (pós-emergente). Ela é utilizada no controle anual de ervas daninhas de folha larga e capim em culturas como milho, alho, cenoura, salsa, amendoim, algodão, cana de açúcar, cebola, soja, frutas, batata, feijão, arroz, ervilha e gladiolo (RUBINSTEIN, 2005).

Nas plantas alvo, a prometrina inibe o transporte de elétrons no local do receptor do fotossistema II na fotossíntese e na fosforilação oxidativa. As plantas afetadas pela prometrina desenvolvem, inicialmente, bordas amarelas nas folhas e clorose interveinal (pronunciadas nas folhas mais velhas e, em menor grau, nas folhas mais jovens). O quadro evolui com clorose, escurecimento e necrose das folhas e morte. A prometrina afeta o

metabolismo dos carboidratos e pode diminuir as concentrações de açúcar nas plantas tratadas (FERREIRA, LAMAS, PROCÓPIO, 2007).

A prometrina foi registrada pela primeira vez nos Estados Unidos em 1964. Estudos que utilizaram animais de laboratório demonstraram que este agrotóxico era levemente tóxico quando administrado pela via oral, cutânea e inalatória. Entretanto, estudos que empregaram doses mais altas, demonstraram toxicidade significativa (EPA, 2019).

Entre vários estudos, dois trabalhos de toxicidade com alta dosagem foram utilizados como base pela EPA para definição da DL 50 e devidas restrições do uso dos pesticidas (DIKIC, 2010). O primeiro estudo se baseou em teratogênese com ratos no desenvolvimento, a prometrina foi administrada por gavagem a grupos de 26 ratos Sprague-Dawley em doses de 0, 10, 50 ou 250 mg/kg/dia durante 6 a 15 dias gestacionais. O resultado obtido foi uma grave toxicidade materna e no desenvolvimento (WEIEISSENBORN; LEVY; GIKNIS; et al., 1987). O segundo experimento determinou alterações na capacidade reprodutiva em duas gerações de ratos. Foi administrada prometrina na dieta de 30 ratos Sprague-Dawley machos e 30 fêmeas nas doses de 0, 10 ppm (0,6 mg/kg/dia no sexo masculino, 0,7 mg/kg/dia no sexo feminino), 750 ppm (47,8 mg/kg/dia no sexo masculino, 53,6 mg/kg/dia no sexo feminino) ou 1500 ppm (96,7 mg/kg/dia no sexo masculino, 105,6 mg/kg/dia no sexo feminino). Os resultados mostraram redução no peso corporal e consumo alimentar correspondente em adultos. No entanto, a redução estatisticamente significativa no peso corporal do filhote foi considerada mais grave devido ao seu potencial impacto negativo em desenvolvimento pós-natal, como nos sistemas neurológico e imunológico (GIKNIS; YAU; et al., 1990).

Atualmente, também há estudos relacionados à toxicidade em ambientes aquáticos. Testes com o peixe dourado adulto, com exposição ao Gesagard 500 FW (correspondente a 0,1, 0,5 e 2,5 mg /L de prometrina) resultaram no aumento do nível da proteína carbonilada e na atividade da superóxido dismutase (SOD), mas reduziram o conteúdo de peróxido lipídico (LOOH) e a atividade da glutatona peroxidase no fígado. O rim mostrou maior número de parâmetros afetados mesmo sob baixas concentrações do herbicida. O tratamento também induziu várias alterações histológicas no fígado dos peixes, que podem estar relacionadas à sua disfunção (MOSIICHUK et al., 2015).

Infelizmente, a avaliação da toxicidade reprodutiva usando mamíferos é complexa, cara e demorada, com pouca possibilidade de alto rendimento ou análise em larga escala em experimentos. Além disso, a exposição oral e a alta dose necessária para testes em mamíferos os tornam inadequados para prever a toxicidade reprodutiva de produtos químicos ambientais, porque a concentração de poluentes é geralmente baixa e poluentes solúveis em água são difundidos no sistema aquático (HE et al., 2014).

No Brasil, a prometrina tem classificação toxicológica classe III (produtos perigosos ao meio ambiente), com DL50 entre 50 e 500 mg/kg (ANVISA, 2005; RUBINSTEIN, 2005) . Tal substância não apresenta alguns parâmetros estabelecidos para que se calcule a margem de segurança de maneira adequada. Esses parâmetros são os valores de IDA (Ingestão Diária Aceitável) e o intervalo de segurança para as aplicações/colheita das culturas em que é utilizada. Além disso, o limite máximo de resíduos permitido no Brasil é duas vezes maior do que o limite permitido em outros países, como nos países da União Europeia e nos Estados Unidos (EUA) em que o LMR é 0,01mg/L (ANVISA, 2016). Os valores de máximos permitidos de resíduos da prometrina no Brasil por cultura em que é aplicada são apresentados na tabela 1:

Tabela 1: Limite Máximo de Resíduos (LMR) da prometrina nos produtos de prateleiras no Brasil – ANVISA.

Culturas	Modalidade de emprego (Aplicação)	LMR (mg/kg)	Intervalo de segurança
Algodão	Pré/Pós-emergência	0,02	80 dias
Alho	Pré/Pós-emergência	0,02	(1)
Cebola	Pré/Pós-emergência	0,02	(1)
Cenoura	Pré/Pós-emergência	0,02	(1)
Ervilha	Pré/Pós-emergência	0,05	(1)

Fonte: ANVISA, 2018. Monografia autorizada prometrina-P15

De acordo com a tabela 1, o valor máximo de resíduos deste agrotóxico para a maioria dos alimentos é de 0,02 mg/kg. Para se adequar às normas aplicadas em países em que o LMR aceito para a prometrina é menor, os produtos exportados são aqueles com menor nível de contaminação, e o restante permanece para consumo dentro do Brasil ou para exportação em países menos rigorosos (*European Commission*; Art 18. Reg 396 / 2005). A falta de uma IDA associada ao LMR acima do que é permitido em outros países,

reforça a necessidade da realização de estudos que comprovem a segurança dos valores aceitos pelo governo brasileiro.

1.4 CARACTERÍSTICAS DO MODELO ANIMAL UTILIZADO

O *Danio rerio* conhecido popularmente como *Zebrafish* ou paulistinha é um peixe nativo do sul da Ásia, comum de água doce e mais encontrado nas partes rasas com baixas movimentações de água. Esta região geográfica é caracterizada pelo clima de monções, com estações secas e chuvosas bem definidas, o que exerce grande influência na sua adaptação e reprodução. Vive em uma região onde a temperatura varia de 25 a 30°C, sendo o período de chuva, em que a temperatura ambiente é de 28°C, a mais favorável para a sua reprodução. Em habitat natural eles se alimentam de uma variedade de zooplâncton e insetos, algas e outros materiais orgânicos. Dietas vivas, como paramécio, rotíferos e artêmias que nadam ativamente na água, são consideradas adequadas para alimentação, pois, proporcionam um estímulo de caça ideal e alto teor de proteína (DAMMSKI et al., 2011).

Assim como a alimentação e a nutrição, a qualidade da água tem grande impacto na saúde e produtividade do *zebrafish*, uma vez que influencia no seu desenvolvimento, imunidade, fisiologia, anatomia, comportamento e reprodução. Desta forma, os parâmetros de qualidade da água devem ser bem conhecidos e compreendidos, não apenas no seu aspecto geral, mas também em relação às preferências do peixe. O pH da água pode variar de 6,8 a 8,5; a temperatura entre 25 e 28°C; a alcalinidade do meio entre 50 e 100 mg/L; a oxigenação acima de 4mg/L e sem ou mínima concentração de nitrito e amônia (LÓPEZ. e SÁNCHEZ, 2011).

O *Zebrafish* é caracterizado pelo pequeno porte, com listras prateadas-amareladas intercaladas com listras azuis ao longo do seu corpo e das nadadeiras anal e caudal em fase adulta. Os estágios de vida são: larval, juvenil e adulto. A fase larval ocorre durante os primeiros 14 dias de vida após a eclosão dos ovos, que sucede em 72 horas pós a fertilização (Figura 5).

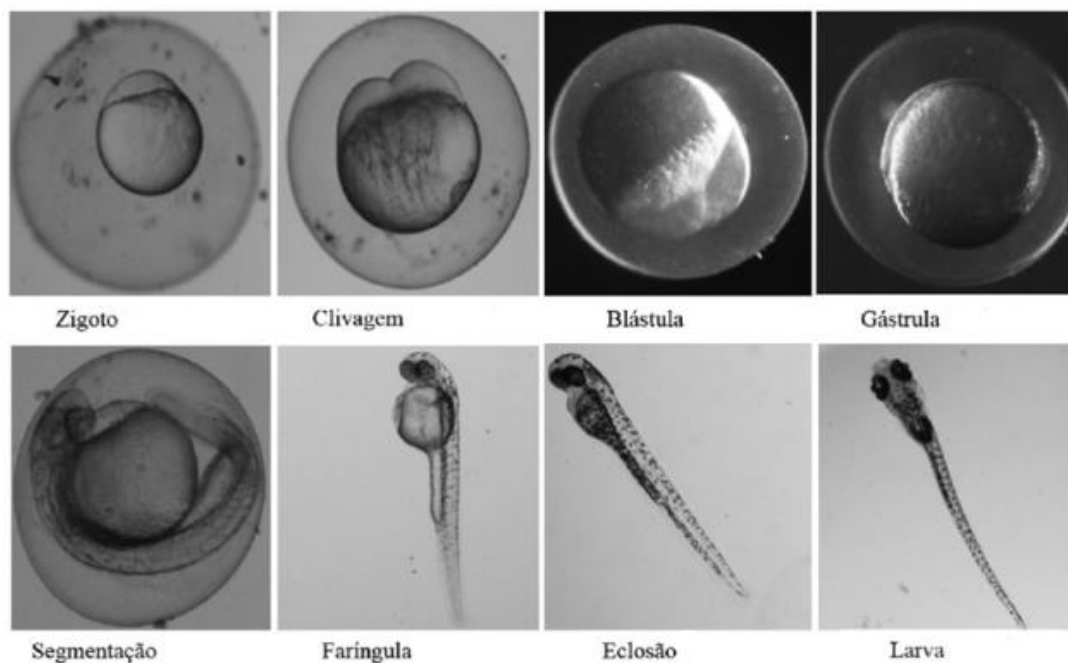


Figura 5: Demonstração dos principais estágios do desenvolvimento do peixe-zebra ao longo das primeiras 72 horas pós-fertilização (desenvolvimento embrionário) e ao mesmo dia (larva).

Fonte: (Siebel e Bonan, 2015)

A fase juvenil é definida pelo período entre a fase larval e adulta. Eles vivem de quatro a cinco anos, e iniciam sua maturidade sexual aos noventa dias de vida, indicativo do início da fase adulta. As fêmeas são maiores e mais robustas que os machos (Figura 6), o que facilita a sua identificação (DAMMSKI *et al.*, 2011).



Figura 6: Dimorfismo sexual. A fêmea (à direita) é maior e mais robusta, enquanto o macho (à esquerda) é menor e mais delgado.

Fonte: (Agricultura SP, 2016)

Esta espécie é formada por indivíduos bastante sociais, isto é, não gostam de viver sozinhos. Entretanto preferem formar cardumes pequenos. Entre as fêmeas podem ocorrer

brigas por meios de mordeduras para estabelecer dominância, o que afeta na criação e reprodução destes animais. Outra forma de uma fêmea determinar a hierarquia é liberando hormônios inibitórios na água, para outras fêmeas não liberarem feromônios durante ovulação. Essas substâncias estimulam o comportamento de acasalamento dos machos. Os machos também liberam hormônios na água para induzir a ovulação nas fêmeas, que mostram um aumento significativo nas frequências de desova, na quantidade e na viabilidade dos ovos, quando comparadas com fêmeas mantidas isoladamente (HARPER e LAWRENCE, 2016). São animais com padrão circadiano diurno, em que, suas atividades comportamentais e biológicas dependem de uma padronização rigorosa da manhã e da noite. O mais recomendado é que o controle da luz em cativeiro seja de 10 horas de escuridão e 14 horas de luz, ou 12 horas de escuridão e 12 horas de luz (LAWRENCE, 2007).

Suas características fisiológicas, tolerância à grandes variações ambientais, facilidade para manutenção e reprodução, geração de uma grande prole, e baixo custo foram incentivos à sua utilização em pesquisa (LAWRENCE, 2007). Hoje, diversos estudos se baseiam nesta espécie, pois além das vantagens citadas, ela possui um genoma sequenciado parecido ao dos mamíferos, ciclo curto de reprodução, fecundação externa e embriões transparentes. Um estudo do genoma do *zebrafish*, concluído em 2013, verificou que 71% dos genes que codificam proteínas no genoma humano são correlacionados a genes encontrados no genoma do *zebrafish*, e que destes, 84% dos genes conhecidos por serem associados a doenças humanas possuem um gene relacionado em *zebrafish*, demonstrado na figura abaixo (Howe et al., 2013).

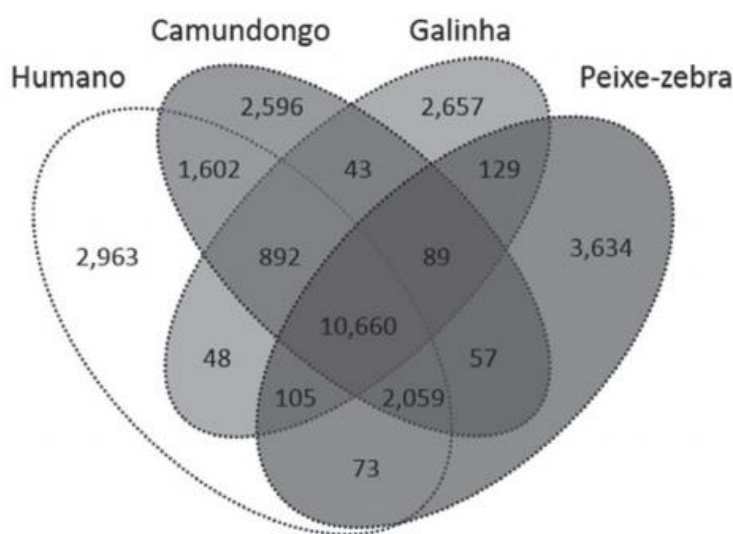


Figura 7: Número de genes análogos compartilhados em diferentes espécies.

Fonte: Howe et al., 2013

Os embriões transparentes proporcionam uma avaliação mais clara e detalhada em relação às modificações físicas que podem ocorrer por toxicidade do meio. Os avanços tecnológicos permitiram também uma caracterização detalhada do animal em nível genético, a fim de obter um vantajoso modelo animal que apresenta rápidas respostas aos diversos estudos (DAMMSKI *et al.*, 2011). Além disso, têm crescido também o número de estudos que avaliam alterações comportamentais vinculadas à influência de diversas drogas, como o álcool. Tais estudos permitem estabelecer comparações com o comportamento humano (BAGGIO, 2016). Apesar disso, percebemos que há poucos trabalhos publicados em relação à toxicidade do agrotóxico prometrina em embriões de vertebrados superiores.

2. JUSTIFICATIVA

A contaminação ambiental por agrotóxicos tem sido evidenciada por ações de monitoramento e pesquisas realizadas no país. Além do seu impacto direto sobre a saúde humana, altos níveis dessas substâncias geram incalculáveis danos ambientais (CARNEIRO, 2015).

A ANVISA (2018) relatou que atualmente são 380 agrotóxicos registrados e autorizados para utilização na agricultura. Desses, 210 possuem a ingestão diária aceitável (IDA) determinada pela ANVISA e apenas 13 estão relacionadas na portaria MS nº 2.914/2011 que determina padrões de qualidade para água potável (ASCOM, 2019).

O relatório do PARA realizado pela ANVISA que apresenta os resultados do monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos coletados no período de 2013 a 2015 analisou 12.051 amostras de 25 alimentos de origem vegetal representativos da dieta da população brasileira. Dentre estes alimentos 15 apresentaram resíduos de prometrina, no total de 5.905 amostras. Os alimentos que apresentaram resíduos de prometrina foram: arroz, feijão, tomate, banana, maçã, laranja, mamão, abacaxi, cebola, cenoura, couve, milho (fubá), repolho, beterraba e mandioca (farinha) (ANVISA, 2016).

No trabalho de Dikic et al. (2009) registraram que apesar do aumento do número de artigos científicos sobre a prometrina nos últimos anos, há apenas um pequeno número de publicações indicando seus efeitos tóxicos em organismos não direcionados (animais, humanos). Em 2008 foi relatado o primeiro caso de intoxicação aguda humana por prometrina. Um homem de 62 anos ingeriu 50 gramas de prometrina e etanol em uma tentativa de suicídio. Duas horas após a ingestão, ele estava sonolento e vomitou. Sete horas após a ingestão, os testes laboratoriais mostraram acidose metabólica com um gap aniônico calculado de 47,5 mmol / L e lactato de 23,4 mmol/L (BRVAR, M. et al., 2008).

A fertilização *in vitro* e a embriogênese tornam o *Zebrafish* um modelo animal mais simples e atraente para investigar a toxicidade reprodutiva. Esse sistema é utilizado como uma importante ferramenta para detectar toxinas em amostras de água e investigar os mecanismos de toxicidade aguda em vertebrados e doenças relacionadas. Entretanto, até hoje, não há trabalhos publicados que utilizam embriões de *Zebrafish* para avaliar toxicidade aguda da prometrina.

A fim de realizar avaliação de toxicidade da prometrina, o presente projeto utiliza embriões do animal *Zebrafish* (*Danio rerio*). Desta forma, espera-se que com a execução deste projeto possamos detectar a concentração mínima de efeito tóxico da prometrina na água e avaliar como as exposições ambientais a este agrotóxico podem afetar a saúde. Além disso, busca-se ressaltar a importância do estabelecimento de políticas públicas que visem priorizar a utilização segura de agrotóxicos por meio da autorização de substâncias que não ofereçam risco à saúde humana, expondo dados de toxicidade do agrotóxico em questão.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do trabalho é avaliar a toxicidade aguda do pesticida prometrina à embriões (ovos fertilizados) de *zebrafish* (*Danio rerio*) para subsidiar tomadas de decisão das agências governamentais responsáveis pela autorização de uso do mesmo em território nacional.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Criar e manter o novo modelo experimental ainda não estabelecido na UFOP;
- Expor ovos fertilizados de *zebrafish* às concentrações de 0.01; 0.02; 0.04; 0.4; 4 mg/L de prometrina;
- Analisar alterações no padrão de desenvolvimento normal do embrião e possíveis alterações morfológicas provocadas pela presença da prometrina em água.
- Relacionar os resultados com os valores de LMR estabelecidos pela legislação nacional e internacional para a prometrina com o objetivo de prover informações adicionais que auxiliem na tomada decisões quanto à utilização deste agrotóxico.

4. METODOLOGIA

O trabalho proposto, em que utilizamos o *Zebrafish* como um modelo animal na avaliação da toxicidade, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto protocolado sob o CEUA nº 4758151018. No entanto, os ensaios foram realizados no Biotério Central da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em colaboração com o Prof. Dr. Luis David Solis Murgas. A CEUA no cumprimento das suas atribuições analisou e aprovou a Emenda (versão de 06/08/2019) da proposta acima referenciada (ambos os documentos encontram-se no ANEXO 1).

4.1 CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DO NOVO MODELO EXPERIMENTAL

Setenta peixes adultos da espécie *Zebrafish* foram adquiridos na loja Lindoiá Peixes em Muriaé – MG, na mesma proporção entre fêmeas e machos. Como o transporte é fisiologicamente estressante, principalmente a longa distância, foi necessária a adição de oxigênio puro no saco fechado, e que ele fosse realizado utilizando uma caixa de isopor (impede a variação da temperatura).

Foram adquiridos aquários com a capacidade de quatro litros de água para suportar até vinte peixes em cada (5 peixes por litro de água). A temperatura para cada aquário foi mantida em 28 °C com o auxílio de termostato (Roxin HT), e a oxigenação da água foi realizada através de bomba (AquaOne) como ilustrado na Figura 8.

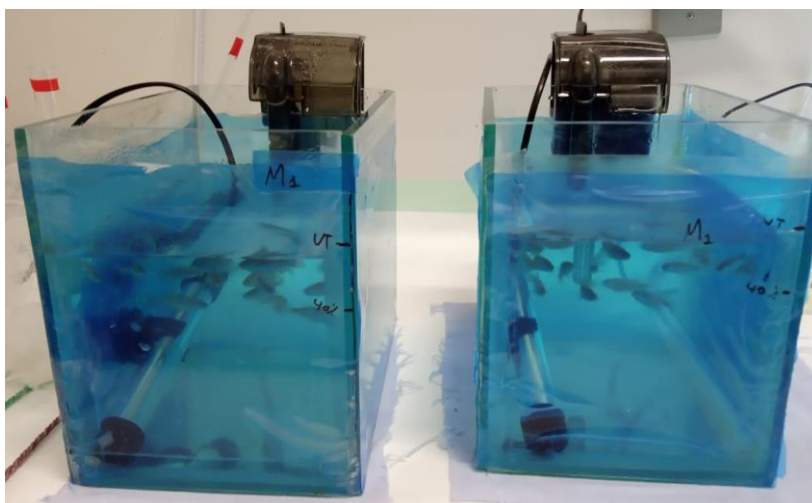


Figura 8: Aquários de manutenção dos animais – Lab. Toxicologia - UFOP

Fonte: Autoria Própria.

Os animais foram alimentados com ração floculada (Alcon Basic) 2 vezes ao dia, e com artêmias recentemente eclodidas e filtradas, na parte da tarde, sendo especificado a quantidade por dia e por animal na tabela 2. As artêmias são comercializadas em ovos, e para eclodir necessitam ser aeradas em água salgada durante 24 horas. O ciclo claro-escuro é garantido por temporizador que liga e desliga automaticamente as luzes do ambiente, com ciclo de luz de 14 horas (LAMMER, 2009).

Tabela 2: Parâmetros da qualidade d'água para o cultivo de *Zebrafish* adotados no Laboratório de Toxicologia – UFOP.

PARÂMETROS	NÍVEIS ADEQUADOS	FREQUÊNCIA DE TESTE
Temperatura	24 a 28°C	Diariamente
pH	6,8 a 8	Diariamente
Sifonação	50% d'água	Diariamente
Alimentação com ração	15mg/peixe/dia	Segunda a sexta
Alimentação com artêmias	2000 artêmias/peixe	Segunda a sexta
Teste de Amônia	Até 0,018 ppm	Semanalmente
Teste de Oxigenação	Acima de 4mg/L	Semanalmente
Teste de Nitrito	Até 0,25 ppm	Semanalmente

Fonte: Autoria Própria

O resto da alimentação dos peixes e o acúmulo de suas excreções resultam no excesso de matéria orgânica no fundo do aquário. Esta matéria orgânica excessiva gera níveis altos dos compostos nitrogenados amônia e nitrito, substâncias tóxicas aos peixes. Utilizou-se, semanalmente, Labcon Test Amônia Tóxica e Labcon Test Nitrito/NO₂ para monitorar a concentração destes compostos. Quando teores elevados eram detectados, verificava eficiência da filtragem e aumentava a proporção das sifonagens. Também foi preciso avaliar a possibilidade de excesso da alimentação ou população de peixes acima do recomendado. Além disso, utilizou-se o teste com Labcon Test O₂ semanalmente para verificar os níveis de oxigenação. Tais testes foram realizados com reagentes específicos, que são indicadores de íons livres na solução para cada composto, mudando a coloração da

água avaliada. De acordo com a intensidade da coloração classificam-se em qual faixa se encontra as concentrações dos parâmetros analisados com uma tabela de leitura.

Os peixes para reprodução foram mantidos em grupos de 5 animais, separados pelo gênero (2 fêmeas e 3 machos) por uma divisória transparente de acrílico gradeada que permite a troca de água contendo feromônios entre eles, estimulando o acasalamento. No aquário de reprodução é fixou plantinhas de plásticos para simular o ambiente natural (Figura 10). A reprodução é mais favorável para ocorrer durante o início do dia. A luz era programada para acender às 08:00 da manhã, sendo este o melhor horário para a retirada da divisória. Por fim, para simular o período de chuva (época mais propícia para a reprodução em habitat natural), assim que se retirava a divisória, esguichava um pouco de água fria com o auxílio de uma pisseta.

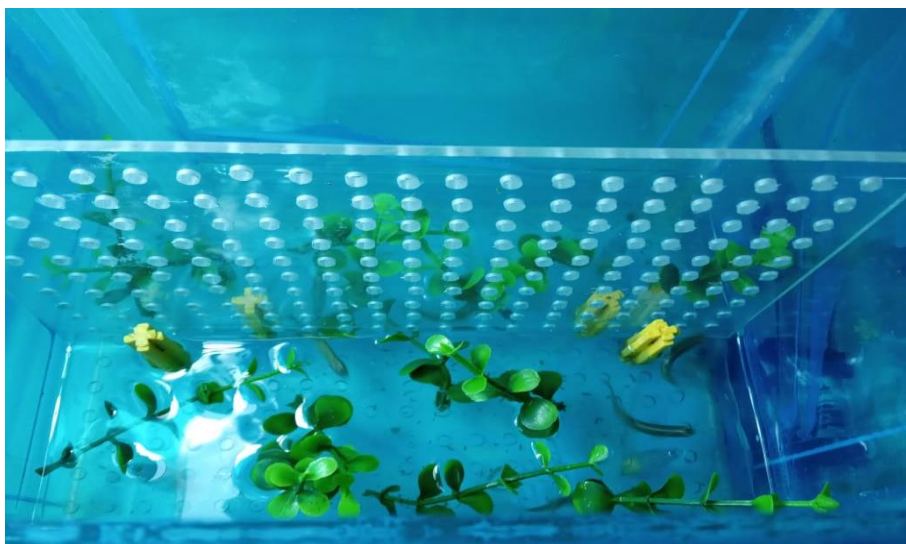


Figura 9: Aquário de reprodução – Lab. Toxicologia – UFOP.

Fonte: Autoria Própria

As tentativas para reprodução ocorreram semanalmente e com diferentes grupos separados. Os ensaios foram realizados em aquários separados para reprodução. Quando um teste não obtinha resultados esperados, mantínhamos os peixes no mesmo grupo de 5 animais para estimular a criação de um vínculo entre eles durante diferentes intervalos de tempo, de 15 dias até meses, antes de testar uma nova reprodução. À medida que, uma das fêmeas demonstrava dominância por meio de mordeduras, era separada do grupo e posta outra no grupo separado.

4.2 EXPOSIÇÃO DOS OVOS FERTILIZADOS AO AGROTÓXICO

Antes da reprodução preparou-se soluções de prometrina nas seguintes concentrações: 0.01; 0.02; 0.04; 0.4; 4 mg/L, sendo representados como grupo 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente. As menores concentrações, 0,01 e 0,02 mg/L, foram determinadas a fim de representar a margem de segurança dos LMR's permitidos na UE e no Brasil, respectivamente. Já as concentrações dos grupos 3, 4 e 5 foram estipuladas a partir da DL50 aguda de prometrina para peixes adultos (4mg/Kg), na proporção de 1%, 10% e 100% da dose letal, respectivamente (ANVISA, 2010). Como a prometrina apresenta baixa solubilidade em água, utilizou-se DMSO (concentração final máxima de 100 µl/L) para auxiliar no preparo da solução estoque, portanto, devido ao uso do solvente necessário criar um controle de solvente (grupo 6) adicional (OECD, 2013). Além disso, como controle negativo (grupo 7) utilizou-se água como meio, e a solução de solvente utiliza o dimetilsulfóxido (DMSO) na mesma concentração utilizada para o preparo das soluções teste.

Para determinação da toxicidade aguda ou dose letal de produtos químicos em estágios embrionários de peixes (*Danio rerio*) seguiu-se o protocolo da OECD nº236 com adaptações.

Os testes com os ovos fertilizados foram realizados no biotério central da Universidade Federal de Lavras – MG, devido à dificuldade em reproduzir o *Zebrafish* no laboratório de toxicologia da UFOP e curto tempo para apresentar os resultados. Os peixes eram separados em grandes aquários de acordo com a idade. Uma vez atingida a idade adulta, eram mantidos todos no mesmo aquário. A reprodução era testada em aquários separados para 4 a 5 peixes (2 fêmeas e 2 machos, ou 3 fêmeas e 2 machos). Os peixes eram escolhidos nos aquários de manutenção, acomodados no aquário de reprodução e separados pelo gênero por uma divisória transparente de acrílico gradeada por uma semana. No dia da reprodução essa divisória é retirada na parte da manhã e é realizado um esguicho de água fria. Caso ocorra a reprodução, eram coletados os ovos e repostos a barreira. Quando ocorre a reprodução, esses peixes eram mantidos como uma família, em um aquário somente com eles.

Os ovos fertilizados foram coletados e transferidos para uma placa de petri contendo *egg water* (sol. NaHCO₃, CaCO₃, H₂O, azul de metileno 1%) até uma hora no máximo pós fertilização. A *egg water* é uma solução utilizada para manutenção dos

embriões obtidos a partir da reprodução dos peixes adultos, auxiliando na separação dos ovos para os experimentos. Para identificar ovos fertilizados, utilizou-se um microscópio invertido. Ovos recém-fertilizados eram caracterizados por um espaço perivitelino totalmente transparente, cercado pela membrana do ovo e contendo a gema e o disco germinativo, que já se formou no polo do animal.

As placas eram inseridas em uma estufa (Thermo scientific) de 27,8°C. Após 24 horas de incubação na estufa, utilizou-se uma pipeta de Pasteur para transferir os embriões viáveis da placa petri para as placas de ELISA com 96 poços. Normalmente são usadas placas de 24 poços, sendo 20 para cada concentração e 4 para grupo controle como é observado na figura 11, contudo, utilizou-se três placas com 96 poços. Em cada placa eram mantidos três grupos: 20 poços para cada concentração da prometrina e para os grupos controles, contendo 200 µL de solução por poço. A cada poço foi adicionado um embrião.

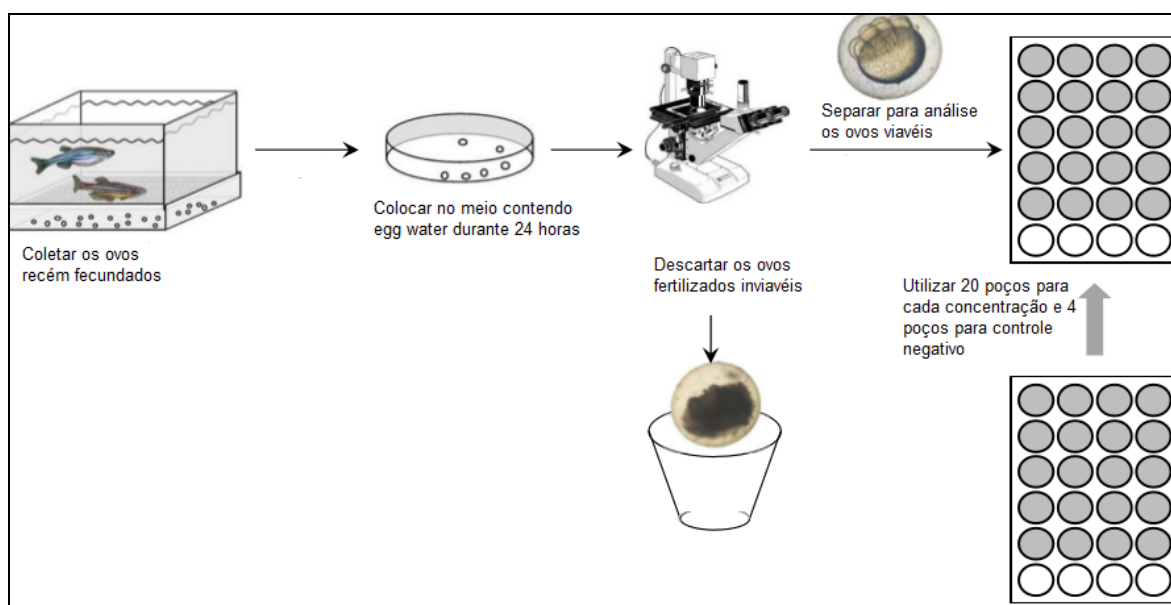


Figura 10: Ovos de zebrafish recém-fertilizados são expostos à solução de prometrina em teste por um período de 96 horas, de acordo com OECD 236.

Fonte: (OECD, 2013)

Foram avaliados cinco grupos para as diferentes concentrações de prometrina, um grupo para o controle do solvente, e um grupo para o controle negativo, conforme os parâmetros apresentados na Figura 9.

Placa 1	X	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A	4 mg/L	4 mg/L	4 mg/L		0.4 mg/L	0.4 mg/L	0.4 mg/L		0.04 mg/L	0.04 mg/L	0.04 mg/L	
	B	4 mg/L	4 mg/L	4 mg/L		0.4 mg/L	0.4 mg/L	0.4 mg/L		0.04 mg/L	0.04 mg/L	0.04 mg/L	
	C	4 mg/L	4 mg/L	4 mg/L		0.4 mg/L	0.4 mg/L	0.4 mg/L		0.04 mg/L	0.04 mg/L	0.04 mg/L	
	D	4 mg/L	4 mg/L	4 mg/L		0.4 mg/L	0.4 mg/L	0.4 mg/L		0.04 mg/L	0.04 mg/L	0.04 mg/L	
	E	4 mg/L	4 mg/L			0.4 mg/L	0.4 mg/L			0.04 mg/L	0.04 mg/L		
	F	4 mg/L	4 mg/L			0.4 mg/L	0.4 mg/L			0.04 mg/L	0.04 mg/L		
	G	4 mg/L	4 mg/L			0.4 mg/L	0.4 mg/L			0.04 mg/L	0.04 mg/L		
	H	4 mg/L	4 mg/L			0.4 mg/L	0.4 mg/L			0.04 mg/L	0.04 mg/L		
Placa 2	X	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A	0.02 mg/L	0.02 mg/L	0.02 mg/L		0.01 mg/L	0.01 mg/L	0.01 mg/L		DMSO	DMSO	DMSO	
	B	0.02 mg/L	0.02 mg/L	0.02 mg/L		0.01 mg/L	0.01 mg/L	0.01 mg/L		DMSO	DMSO	DMSO	
	C	0.02 mg/L	0.02 mg/L	0.02 mg/L		0.01 mg/L	0.01 mg/L	0.01 mg/L		DMSO	DMSO	DMSO	
	D	0.02 mg/L	0.02 mg/L	0.02 mg/L		0.01 mg/L	0.01 mg/L	0.01 mg/L		DMSO	DMSO	DMSO	
	E	0.02 mg/L	0.02 mg/L			0.01 mg/L	0.01 mg/L			DMSO	DMSO		
	F	0.02 mg/L	0.02 mg/L			0.01 mg/L	0.01 mg/L			DMSO	DMSO		
	G	0.02 mg/L	0.02 mg/L			0.01 mg/L	0.01 mg/L			DMSO	DMSO		
	H	0.02 mg/L	0.02 mg/L			0.01 mg/L	0.01 mg/L			DMSO	DMSO		
Placa 3	X	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A	H2O	H2O	H2O									
	B	H2O	H2O	H2O									
	C	H2O	H2O	H2O									
	D	H2O	H2O	H2O									
	E	H2O	H2O										
	F	H2O	H2O										
	G	H2O	H2O										
	H	H2O	H2O										

Figura 11: Placa 1 - Três grupos (grupos 5, 4 e 3) com as soluções de prometrina nas concentrações de 4 mg/L, 0,4 mg/L e 0,04 mg/L; Placa 2 - Dois grupos (grupo 2 e 1) com as soluções de prometrina nas concentrações de 0,02 mg/L, 0,01 mg/L e com o grupo 6 com controle de solvente; Placa 3 - O grupo 7, controle negativo com água.

Fonte: Autoria Própria.

Para se observar as possíveis alterações estruturais nos embriões foi utilizado um estereomicroscópio. As análises foram realizadas nos seguintes intervalos: 48 horas, 72 horas, 96 horas e 120 horas após a fertilização. As placas de 96 poços ficaram acomodadas em uma estufa a temperatura de 27.8 °C sob as mesmas condições de luminosidade utilizadas para os peixes adultos. Durante todo o experimento, as placas de ELISA eram cobertas com o intuito de evitar perdas das soluções ao longo das análises.

4.3 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES NA EXPOSIÇÃO DOS EMBRIÕES AO AGROTÓXICO

Para validação do método, seguiu-se o protocolo estabelecido por OECD 236 à observação dos seguintes critérios:

- O total de ovos viáveis coletados deve ser de no mínimo 70% do total;

- A sobrevivência dos ovos colocados no grupo controle negativo deve ser de no mínimo 90% até o final de todos os testes;
- Ao menos 80% dos ovos colocados no grupo de controle interno devem eclodir ao final das 96 horas de exposição;

A análise da toxicidade baseou-se na observação de alterações no desenvolvimento do peixe, *zebrafish*. Sendo assim, os parâmetros para análise foram os seguintes: presença de edema; coagulação; ausência de formação de somito; não deslocamento da cauda; ausência de batimento cardíaco; má formação dos olhos; ausência de pigmentação; eclosão; desenvolvimento normal/vivo e morte.

O edema tem sido uma das malformações mais observadas nos testes de toxicidade com *Danio rerio* (TESOLIN et al., 2014). Ele é caracterizado por acúmulo anormal de líquido no tecido e pode ocorrer em órgãos específicos ou em qualquer parte do corpo. O aparecimento do edema pericárdio deve-se à disfunção cardíaca, funcionando como indicador de disfunção osmótica ou metabólica, frequentemente associada a extravasamento dos vasos endoteliais ou deve-se a uma disfunção renal, pois o sistema de regulação depende do envolvimento renal (CAVALCANTE, 2017).

Os embriões coagulados são brancos leitosos e aparecem escuros sob o microscópio, demonstrado na figura 14.

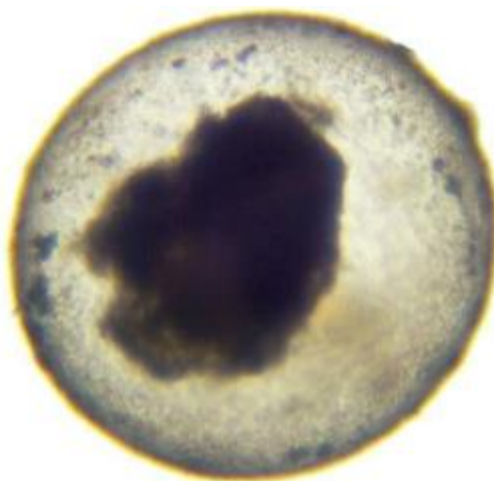


Figura 12: Exemplo de Coagulação do Embrião

Fonte: (OECD, 236)

Em um embrião saudável cerca de 20 somitos formam-se após 24 horas (Fig. 15 – a), além disso, normalmente mostra movimentos espontâneos (contrações lado a lado), que

indicam a formação de somitos. A ausência de somitos é registrada após 24, 48, 72 e 96 horas. Não formação de somitos após 24 horas, como mostrado na Fig.15 – b, pode ocorrer devido a um atraso geral do desenvolvimento. No máximo, após 48 horas, a formação de somitos deve ocorrer, caso contrário o embrião é considerado como morto.

As deformações da coluna vertebral podem ser associadas à depleção ou desregulação de íons como cálcio e fósforo, ou com redução da miosina, ambos necessários para o desenvolvimento normal do organismo (CAVALCANTE, 2017).

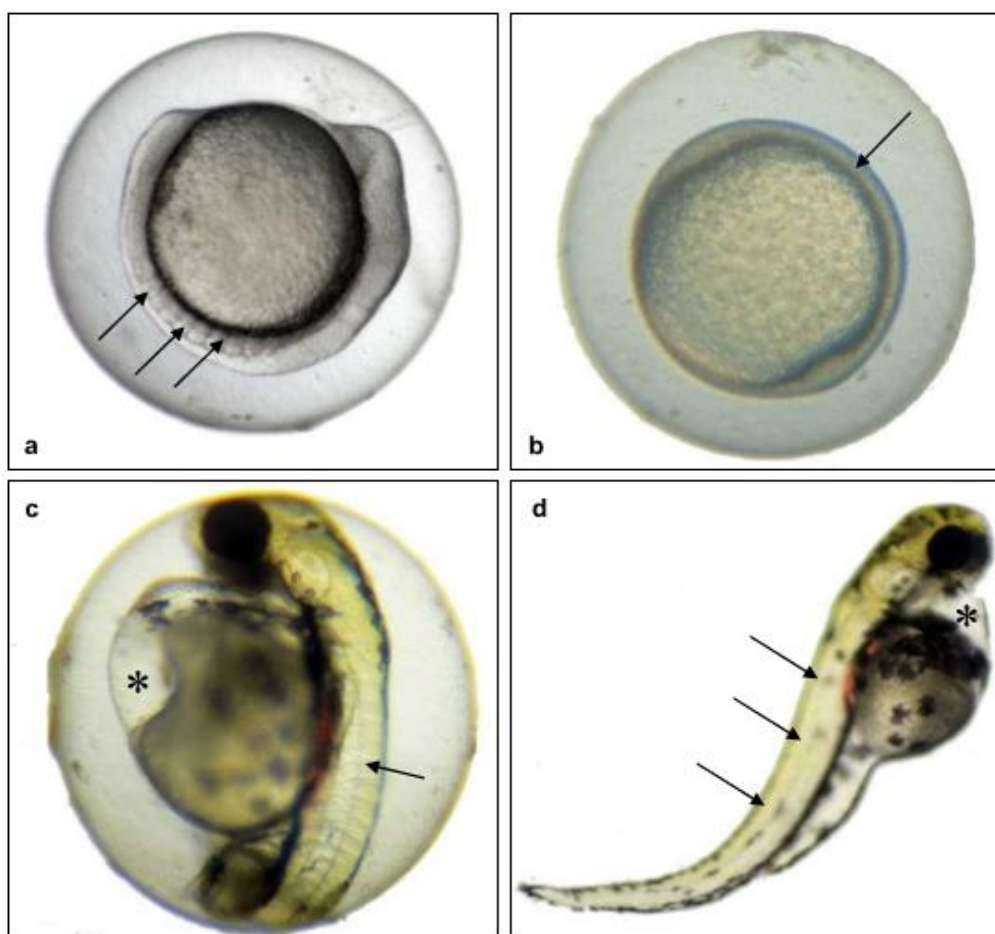


Figura 13: O embrião *Zebrafish* de 24 horas em (a) mostra somitos bem desenvolvidos, enquanto que o embrião em (b) não apresenta nenhum sinal de formação de somito, apesar de mostrar um edema pronunciado do saco vitelino (*). Já o embrião de 48 horas em (c) mostra formação distinta de somitos, enquanto que o embrião de 96 horas em (d) não apresenta qualquer sinal de formação de somito, entretanto este embrião apresentou curvatura espinhal (escoliose) e o edema pericárdico no embrião mostrado em (*).

Fonte: (OECD, 236)

Neste estágio também, é bem perceptível a formação dos olhos e a pigmentação do embrião, apresentando em condições normais na figura 15.

No embrião de *Zebrafish* o descolamento da cauda da gema é observado após o alongamento posterior do corpo embrionário. A ausência de descolamento da cauda será registrada em intervalos de 24 horas até o sexto dia.

A falta do batimento cardíaco é registrada após 48, 72 e 96 horas (figura 16). Em um embrião que se desenvolve normalmente, o batimento cardíaco é perceptível após 48 horas. Além disso, batimento cardíaco visível sem a circulação na aorta abdominal é considerada não letal. Para registrar este ponto final, os embriões não mostram batimento cardíaco deve ser observado sob uma ampliação mínima de 80x por pelo menos um minuto.

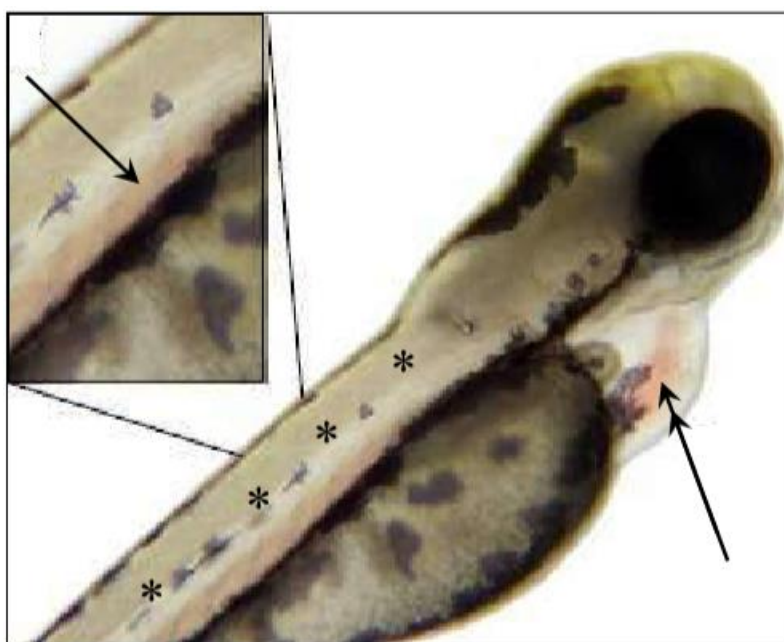


Figura 14: A falta de batimentos cardíacos é indicada por não convulsões do coração (seta dupla). A imobilidade das células sanguíneas em, por exemplo, a aorta abdominal (em inserção) não é um indicador por falta de audição. Observe também a falta de formação de somito neste embrião (aparência homogênea, em vez de segmentar, dos tecidos musculares). Aumento de 80x.

Fonte: (OECD, 236)

Os resultados apresentados no ensaio de 24 horas demonstraram desenvolvimento normal nos embriões dos grupos controles e para as diferentes concentrações de prometrina. Os embriões apresentaram cabeça, o corpo e a cauda bem desenvolvidos, além dos batimentos cardíacos, pigmentação dos olhos e do corpo, formação de somitos e desprendimento da cauda (figura17).

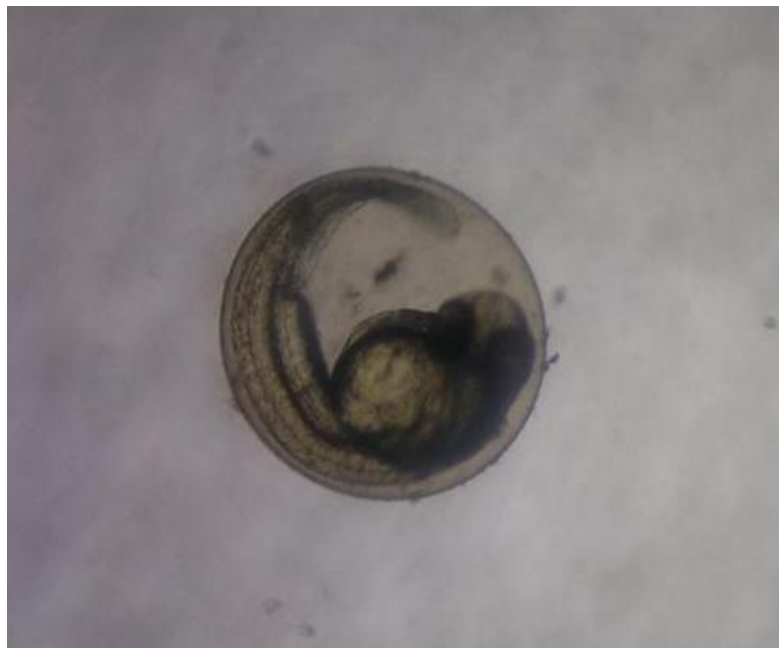


Figura 15: Embrião Danio Rerio no período de 24 h com desenvolvimento normal.

Fonte: Autoria Própria

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DO MODELO IMPLEMENTADO NO LABORATÓRIO DE TOXICOLOGIA

A criação do novo modelo animal foi bem-sucedida. Para um controle adequado dos parâmetros de qualidade de água descritos no item 4.1, foram realizados testes semanalmente, e quando necessário, foram adotadas medidas para solucionar as possíveis alterações, como o aumento no número de vezes em que era realizada a sifonação.

A estrutura oferecida pelo laboratório de toxicologia ainda se encontra em fase de adaptações, a fim de oferecer melhores condições para a manutenção destes animais. Contudo, é um modelo implementado há um ano, que já demonstra resultados positivos, a maior dificuldade encontrada até agora foi na reprodução.

O grupo de pesquisa em *Zebrafish* localizado na Universidade Federal de Lavras, coordenado pelo Dr. Murgas, possui ampla experiência há 20 anos com manejo e reprodução de peixes de água doce, dentre os quais se inclui a espécie *Danio rerio* (*zebrafish*). Esse tempo é de grande relevância na adaptação dos animais às condições de vida no biotério. Outros fatores importantes que contribuem na facilidade de reprodução, comparados com as condições fornecidas pela UFOP, foram: água filtrada por osmose reversa, garantindo um grau de pureza maior da água; processo de limpeza do aquário de forma padronizada por tubulações, diminuindo a necessidade de manuseio manual nos aquários, desta forma evitando um grande empecilho, o estresse. Além disso, a reprodução ocorre em uma sala separada e aclimatada somente para o manejo do *Zebrafish*, e todos os controles dos parâmetros como pH, oxigenação, nível do nitrito e amônia são realizados de forma automática por um sistema anexado a estrutura dos aquários, conforme é representado na Figura 13.



Figura 16: Sistema anexado nas estruturas dos aquários que garante o controle automático da qualidade da água.

Fonte: Autoria Própria

5.2 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES PROVOCADAS EM EMBRIÕES DE ZEBRAFISH PELO AGROTÓXICO PROMETRINA

A análise da toxicidade baseou-se na observação de alterações no desenvolvimento do peixe, *zebrafish*. Sendo assim, os parâmetros para análise foram os seguintes: edema; coagulação; ausência de formação de somito; não deslocamento da cauda; ausência de batimento cardíaco; má formação dos olhos; ausência de pigmentação; desenvolvimento normal/vivo; morte e eclosão.

Nas primeiras 48h após a fertilização foi observado na concentração mais alta da solução com prometrina, que o saco vitelino dos embriões estava maior que o normal. Apesar disso, na análise de 72h, após eclosão, o saco vitelino se desenvolveu normalmente, estando dentro dos parâmetros estabelecidos pela OECD 236.

5.3 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO AGROTÓXICO

Não houve sinais discerníveis de alterações, contudo, foram pontuadas em porcentagem a eclosão dos embriões (independentemente do tempo necessário para eclodir) e o desenvolvimento normal.

A figura 17 mostra a taxa de eclosão dos embriões ao longo do período do experimento de 120 horas. As eclosões iniciaram, em todos os grupos, a partir das 48 horas até às 120 horas sem uma variação constante ao aumento da concentração de prometrina.

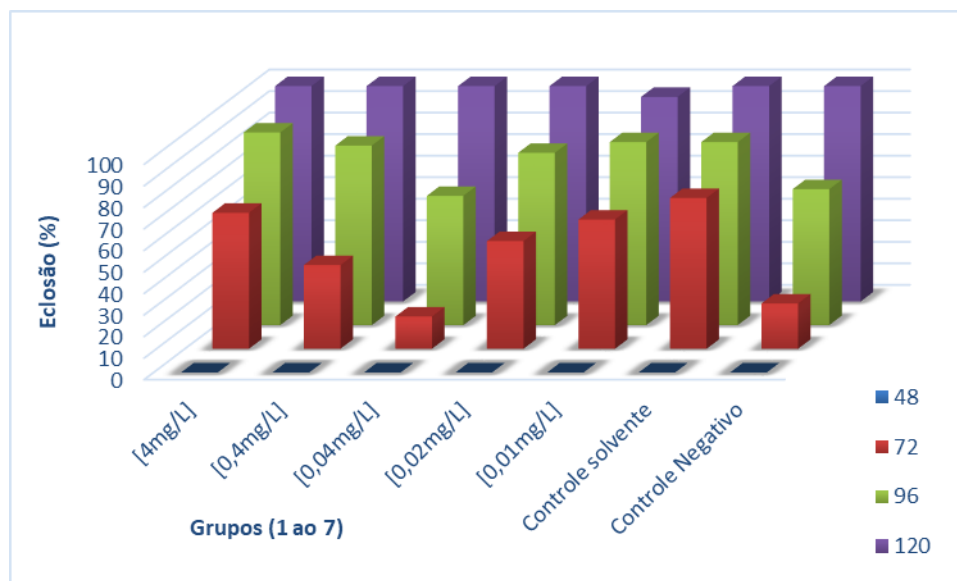


Figura 17: Porcentagem de eclosão dos embriões ao decorrer dos tempos de 48; 72; 96 e 120 horas pós fertilização.

Fonte: Autoria Própria.

A figura 18 indica a porcentagem de desenvolvimento normal dos embriões ao longo do teste. Somente na menor concentração de prometrina (0,01 mg/L) houve uma taxa de natalidade de 5 %, sendo considerado como morte natural e dentro dos parâmetros de validação.

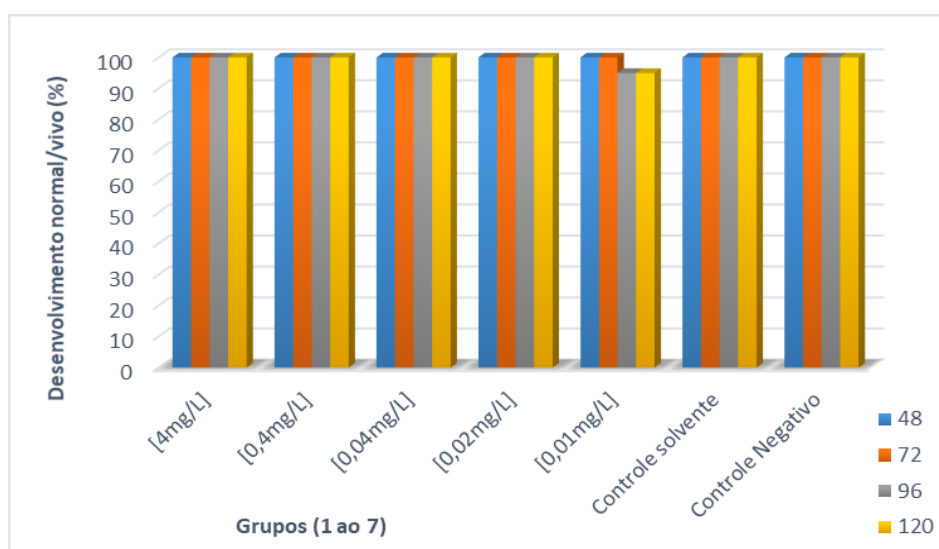


Figura 18: Porcentagem do desenvolvimento normal/vivo dos embriões ao decorrer dos tempos de 48; 72; 96 e 120 horas pós fertilização.

Fonte: Autoria Própria.

Como pode ser observado nas figuras 18-24 não houveram diferenças significativas entre o desenvolvimento dos embriões expostos ao agrotóxico prometrina (em todas as concentrações) e os embriões expostos à água (controle negativo) ou ao solvente (controle solvente). Apesar de ter sido utilizada uma concentração estipulada pela DL50 como letal para peixes adultos, não foi observado uma taxa de mortalidade ou alterações significativas para os embriões do *zebrafish*.

Uma das objeções ao uso dos embriões para experimentos de análise da toxicidade de substâncias químicas é baseada principalmente na suposta falta de capacidade de biotransformação e na suposição de que substâncias altamente lipofílicas e de alto peso molecular podem não ter acesso ao embrião devido ao papel protetor do córion, ou o alcancem em menor concentração quando comparada à concentração ambiental (HILL et al., 2004). No entanto, a presença de solventes, como o DMSO, cadeias laterais e possíveis cargas elétricas das moléculas modificam ainda mais a absorção de produtos químicos no embrião (BRAUNBECK et al., 2014).

O dimetilssulfóxido é um solvente com características importantes para a química, pois apresenta como atividade biológica muito importante a capacidade de atravessar as membranas celulares e baixa toxicidade. Quanto maior a sua concentração em água, maior a capacidade penetrante. Isso pode ser explicado por ser um solvente aprótico altamente polar, apresentando alta afinidade por hidrogênios em ligações polares, formando ligações com estes hidrogênios mais fortes que as formadas entre as moléculas de água. Assim, consegue se ligar com proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, substâncias iônicas e outros componentes dos organismos vivos, podendo substituir algumas moléculas de água, sem alterar de forma irreversível a conformação molecular dessas substâncias (CARDOSO, 2011).

De acordo com a EPA (2019), a prometrina é uma substância lipofílica que necessita da presença de solventes orgânicos para ser solubilizada em água. Isso pode estar relacionado com as dificuldades que ela encontra para atuar no organismo do embrião devido a barreira do córion. Mesmo com as características do DMSO, como a facilidade de transpor membranas, o solvente utilizado não consegue atravessar o córion quando ligado a molécula da prometrina.

Para confirmar a relação dos resultados obtidos com o grau de toxicidade do agrotóxico em questão, é de grande relevância uma relação da prometrina comparada com outros estudos toxicológicos de agrotóxicos nos embriões de *Zebrafish*.

Há trabalhos que mostram a toxicidade no embrião pela associação de outros herbicidas. No trabalho de TENSOLIN et al., (2014) foi avaliado o efeito combinado da mistura dos Gesapax 500® (ametrina 500 g/L) e Velpar K® (diuron 468 g/kg + hexazinone 132 g/kg) sobre os embriões do *Danio rerio*. O ensaio foi baseado no teste FET da OECD, com duração de 96 horas. As concentrações testadas foram 0; 21,22; 29,52; 41,08; 57,17 e 79,56 mg/L de Gesapax 500 vs. 0; 15,21; 21,17; 29,46; 40,99 e 57,04 mg/L de Velpar K. O Velpar K® demonstrou maior toxicidade que o Gesapax 500 em embriões e larvas de *Danio rerio*.

Concluiu-se que a mistura dos herbicidas Gesapax 500 e Velpar K apresenta um efeito tóxico mais potente que o efeito isolado de cada agrotóxico. Entretanto, a menor toxicidade da ametrina, herbicida pertencente a classe da prometrina, colabora para justificar a falta de toxicidade da prometrina no estudo realizado neste projeto.

6. CONCLUSÕES

Podemos concluir que o trabalho obteve sucesso no que se refere ao estabelecimento do cultivo do modelo experimental *Zebrafish* na Universidade Federal de Ouro Preto. Os animais adultos apresentaram condições estáveis indicativas de crescimento normal. Em relação à reprodução do mesmo, não foi possível obter embriões viáveis indicando que os parâmetros vinculados à reprodução ainda necessitam de modificações.

Apesar de terem sido utilizadas doses relativamente altas do herbicida prometrina na avaliação da toxicidade em embriões de *zebrafish*, quando avaliado individualmente, nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,04; 0,4 e 4 mg/L, o mesmo não demonstrou ser capaz de promover alterações que indicassem toxicidade. Tal fato pode estar relacionado à incapacidade do herbicida em atravessar o córion ou ainda, ao fato de ele necessitar da presença de um indutor enzimático ou de um sistema de metabolização ainda não presente no organismo utilizado.

De acordo com a revisão da literatura realizada durante a escrita deste trabalho, não foram encontradas publicações que demonstrassem a toxicidade do agrotóxico em questão em embriões de peixes, o que reforça a importância do estudo realizado.

Uma vez que as doses mais baixas avaliadas durante este trabalho (0,01 e 0,02mg/L) encontram-se dentro da faixa de LMR para prometrina permitido pela União Europeia e Brasil respectivamente, podemos inferir que desde que a utilização seja realizada conforme as recomendações, permitindo a manutenção de concentrações ambientais baixas deste agrotóxico, os riscos vinculados à toxicidade em embriões de peixes serão nulos. Entretanto, uma vez que outros organismos ou estágios de desenvolvimento demonstraram maior sensibilidade às mesmas concentrações testadas, não pode-se afirmar, que não há risco para outros seres vivos.

Portanto, são necessários estudos mais aprofundados a fim de verificar a segurança desse agrotóxico. A continuidade deste projeto em embriões após a eclosão, seria de grande importância para análise da toxicidade da prometrina em seres vivos, sem a presença de barreiras como o córion.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AGRICULTURA,t (2016) Institutos de Pesca e Butantan negociam parceria para criar peixe paulistinha, 2016. Foto: NC State University. Disponível em: <<https://www.agricultura.sp.gov.br/noticias/institutos-de-pesca-e-butantan-negociam-parceria-para-criar-peixe-paulistinha>>. Acesso em: março de 2019.

ALCON. (2019) Produtos por Categoria - Peixes – Testes. Disponível em: <<http://alconpet.com.br/produtos-por-categoria/testes/peixes>>. Acesso em: out. 2019.

ANVISA. Agencia Nacional De Vigilância Sanitária. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro 1999. Disponível em:< [portal.anvisa.gov.br › documents › lei_9782_99.pdf](http://portal.anvisa.gov.br/documents/lei_9782_99.pdf)>. Acessado em: 20 abr. 2019.

ANVISA, (2016) Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - PARA. . Brasília: ANVISA.

ANVISA, (2010) Agencia Nacional De Vigilância Sanitária. RDC Nº 34, DE 16 DE AGOSTO DE 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_34_2010.pdf/0259adb1-e660-467c-be79-b1e165fd9e71>. Acesso em: outubro de 2019.

ARAGÃO, A. (2012) Agrotóxicos: A nossa saúde e o meio ambiente em questão. Aspectos técnicos, jurídicos e éticos. Florianópolis: Funjab.

ASCOM ANVISA (2019). Agrotóxicos: Anvisa é contrária ao PL 6299/02 - Notícias. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/agrotoxicos-anvisa-e-contraria-ao-pl-6299-02-/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=pt_BR>. Acesso em: 5 nov. 2019.

BAGGIO, S. (2016). Avaliação Neuroquímica e Comportamental em Peixe-zebra Adulto Após a Exposição ao Etanol nos Estágios Iniciais do Desenvolvimento. Dissertação apresentada em cumprimento parcial dos requisitos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para título de mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica. Porto Alegre.

BOMBARDI, et al. (2017) Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Europeia. . São Paulo: FFLCH - USP.

BOMBARDI, et al. (2011) Intoxicação e morte por agrotóxicos no Brasil: a nova

versão do capitalismo olipolizado. . São Paulo: Boletim DATALUTA.

BORSOI, Z.M.F; TORRES, S.D.A. A política de recursos hídricos no Brasil. Disponível em: < http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/revista/rev806.pdf > Acesso em: outubro 2019.

Brasil. Ministério da Saúde. (2018) Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. Agrotóxicos na ótica do Sistema Único de Saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. – Brasília: *Ministério da Saúde*.

BRAUNBECK, T. et al. (2014) The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environ Sci Pollut Res* 22: 16247-16261.

Brvar, M. et al. (2008). Metabolic acidosis in prometryn (triazine herbicide) self-poisoning. *Clinical toxicology* (Philadelphia, Pa.). 46. 270-3. 10.1080/15563650701665126.

CARDOSO, M. (2011) Métodos de Preparação Industrial de Solventes e Reagentes Químicos. *Revista Virtual de Química*. ISSN 1984-6835. Dimetilssulfóxido cas n° 67-68-5.

CARNEIRO, et al. (2015) Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. RJ/SP: EPSJV - Expressão Popular.

CAVALCANTE, (2017) Avaliação Da Ecotoxicidade Do Resveratrol No Estágio Embriolarval De Peixes Da Espécie Danio Rerio Avaliação Da Ecotoxicidade Do Resveratrol No Estágio Embriolarval De Peixes Da Espécie Danio Rerio. 110 f. USP, 2017. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85134/tde-03082017-074403>. Acesso em: agosto 2019.

DAMMSKI, et al. (2011) Zebrafish - Manual de criação em biotério. 1ª edição. Curitiba - PR: Universidade Federal do Paraná.

DIKIC, D, et al.(2010) Brain Toxicokinetics Of Prometryne In Mice. *Arh Hig Rada Toksikol*; 61:19-27.

DIKIĆ, D. et al. (2009) Subchronic Oral Exposure to Prometryne Changes Relations of Blood Biochemistry Indicators in Mice. *ACTA VET. BRNO* 2009, 78: 243–251.

DIKIĆ, D. (2014) *Encyclopedia of Toxicology*. Zagreb, Croatia: University of Zagreb, v. 3.

DUTRA, L.; FERREIRA, A. (2017) Associação entre malformações congênitas e a utilização de agrotóxicos em monoculturas no Paraná, Brasil. *Saúde em Debate*, v. 41, p. 241–253.

EUROPEAN COMMISSION. (2009) Directorate-General for Health and Consumers. European Union on Pesticides: our food has become greener. Bruxelas. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/>>. Acesso em: outubro 2019.

EPA. (2019) Lista A: Produtos antimicrobianos registrados na EPA como esterilizadores. Disponível em: <<https://www.epa.gov/pesticide-registration/list-antimicrobial-products-registered-epa-sterilizers>>. Acesso em: outubro 2019.

FERREIRA, A., LAMAS, F., PROCÓPIO, S., (2007) Circular Técnica: Sintomas de Fitotoxicidade de Herbicidas no Algodoeiro.

G1 GLOBO. (2019) O que muda com o novo marco regulatório de agrotóxicos da Anvisa-Foto: Wagner Magalhães/ G1. Disponível em: <<https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2019/07/24/entenda-o-que-muda-na-classificacao-dos-agrotoxicos-pela-anvisa.ghtml>>. Acesso em: agosto 2019.

GIKNIS, M.; YAU, E. (1990) Prometryn Technical: Two-generation Reproductive Toxicology Study in Rats: Lab Project Number: 872222. Unpublished study prepared by Ciba-Geigy Corp. 1531 p.

HARPER, Claudia; LAWRENCE, Christian. (2016) *The Laboratory Zebrafish*. Massachusetts, USA: CRC Press.

HE, JIAN-HUI et al. (2014) Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. *Neurotoxicology and Teratology* v.42, p. 35-42.

HILL, Adrian J. et al. (2004) Water permeability and TCDD-induced edema in Zebrafish early-life stages. *Toxicological Sciences*, v. 78, n. 1, p. 78–87.

HOWE, DG. et al. (2013). ZFIN, the Zebrafish Model Organism Database:

increased support for mutants and transgenics. *Nucleic acids research*, 41(D1):D854-D860

JAGUARIBE, Baixo. (2011) Agrotóxicos, trabalho e saúde. Fortaleza: Edições UFC.

LAMMER, E. et al. (2009) 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 - C*, v. 149, p. 196–209.

LAWRENCE, Christian. (2007) The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, v. 269, n. 1–4, p. 1–20.

Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L7802.htm>. Acesso em outubro 2019.

LÓPEZ-OLMEDA, J. F.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. (2011) Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Thermal Biology*, v. 36, n. 2, p. 91–104.

MOUTINHO, José Carlos. (2016) Proposta de Consulta Pública nº 262. . Brasil: ANVISA.

MOSIICHUK, N. et al. (2015) Toxicity of Environmental Gesagard to Goldfish May Be Connected With Induction of Low Intensity Oxidative Stress in Concentration- and Tissue-Related Manners. *Toxicologia Aquática*, v. 163, p. 249-258.

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

OLIVEIRA, Bárbara. (2018) Avaliação da toxicidade dos herbicidas trifluralina e tebutiurum utilizando ensaios mitocondriais Bárbara de Oliveira Avaliação da toxicidade dos herbicidas trifluralina e tebutiurum utilizando ensaios mitocondriais. USP, Ribeirão Preto - SP.

QUEIROZ, Ana Carolina Lanza et al. (2012) Programa nacional de vigilância em saúde ambiental relacionada à qualidade da água para consumo humano (vigiagua): Lacunas entre a formulação do programa e sua implantação na instância municipal. *Saude*

e Sociedade, v. 21, p. 465–478.

ROCHA, A. G. (2014) Agrotóxicos: uma análise comparativa da legislação entre Brasil, União Europeia e Estados Unidos da América. Monografia apresentada em cumprimento parcial dos requisitos da Universidade de São Paulo (USP) para título de graduado em Engenharia Ambiental. São Paulo.

RUBINSTEIN, Franklin. (2005) Proposta de Consulta Pública. Brasil: ANVISA.

SIEBEL, ANNA & BONAN, CARLA. (2015). Zebrafish como Modelo para Estudos Comportamentais.

TESOLIN, Gabrielli Aparecida Sanches et al. (2014) Avaliação da toxicidade de herbicidas usados em cana-de-açúcar para o Paulistinha (*Danio rerio*). *Mundo da Saude*, v. 38, n. 1, p. 86–97.

TREVIS, Daniela et al. (2010) Toxicidade aguda do praguicida organofosforado diclorvos e da mistura com o piretróide deltametrina em *Danio rerio* e *Hyphessobrycon bifasciatus*. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 36, n. 1, p. 53–59.

United States Department Of Agriculture. (2012) USDA. Pesticide Data Program. Annual summary, calendar year. Disponível em: <
<http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=SETELPRD5106521>>. Acesso em: outubro 2019.

WEISSENBORN, J.; LEVY, E.; GIKNIS, M.; et al. (1987) Prometryn Technical: Teratology Study in Rats: Study Number 862228. Unpublished study prepared by Ciba-Geigy Corporation. 453 p.

8. ANEXO 1

Segue em anexo, os documentos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto protocolado sob o CEUA nº 4758151018 e a Emenda (versão de 06/08/2019).



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS AGROTÓXICOS METOMIL E PROMETRINA UTILIZANDO O EMBRIÃO DE ZEBRAFISH (DANIO RERIO)", protocolada sob o CEUA nº 4758151018 (ID 000161), sob a responsabilidade de **Maria Elvira Poleti Martucci** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 15/03/2019.

We certify that the proposal "Toxicity Evaluation of pesticides methomyl and prometryn using Zebrafish embryo (Danio rerio)", utilizing 172 Fishes (males and females), protocol number CEUA 4758151018 (ID 000161), under the responsibility of **Maria Elvira Poleti Martucci** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 03/15/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [11/2018](#) a [11/2020](#)

Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem: [Animais provenientes de estabelecimentos comerciais](#)

Espécie: [Peixes](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [1 a 6 meses](#)

N: [172](#)

Linhagem: [Danio rerio](#)

Peso: [020 a 035 g](#)

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no laboratório de toxicologia da Escola de Farmácia

Ouro Preto, 06 de novembro de 2019

Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto



Ouro Preto, 16 de agosto de 2019
CEUA N 4758151018

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Maria Elvira Poleti Martucci

Área: Ciências Biológicas

Título da proposta: "AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS AGROTÓXICOS METOMIL E PROMETRINA UTILIZANDO O EMBRIÃO DE ZEBRAFISH (DANIO RERIO)".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFOP (ID 000034)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 06/agosto/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "No projeto original, foi proposto que os ensaios de toxicidade com os agrotóxicos metomil e prometrina, utilizando os embriões de Zebrafish, seriam realizados no Laboratório de Toxicologia da Escola de Farmácia/UFOP, no entanto, os ensaios serão realizados no Biotério Central da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em colaboração com o Prof. Dr. Luis David Solis Murgas. O Dr. Luis David Solis Murgas é professor da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras desde 1994 e tem 20 anos de experiência com manejo e reprodução de peixes de água doce, dentre os quais se inclui a espécie Danio rerio (zebrafish). O grupo de pesquisa coordenado pelo Dr. Murgas também possui ampla experiência com ensaios toxicológicos utilizando o modelo animal zebrafish (Danio rerio). No início deste ano, estabelecemos uma parceria com o Dr. Murgas, com o intuito de realizarmos colaborações em projetos de pesquisa, melhorias e otimizações nos protocolos de manejo e reprodução dos animais, além de possibilitar treinamentos aos nossos alunos. Portanto, como parte da iniciativa de fomentar a melhoria dos nossos protocolos e propiciar treinamento contínuo de nossos alunos, os ensaios - previstos no projeto acima discriminado e aprovado na CEUA sob o número de protocolo 4758151018 - serão realizados no Biotério Central da Universidade Federal de Lavras (UFLA).".

Comentário da CEUA: "".

Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto