

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO - UFOP  
ESCOLA DE FARMÁCIA – EFAR  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA (DEFAR)  
LABORATÓRIO DE TOXICOLOGIA**



Universidade Federal  
de Ouro Preto



**Tainá Vitória Umbelino de Paula**

**Avaliação da toxicidade do agrotóxico metomil utilizando o  
embrião de *Zebrafish* (*Danio rerio*)**

**Ouro Preto, MG**

**2020**



Universidade Federal  
de Ouro Preto

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP**  
**ESCOLA DE FARMÁCIA – EFAR**  
**DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA (DEFAR)**  
**LABORATÓRIO DE TOXICOLOGIA**



## **Avaliação da toxicidade do agrotóxico metomil utilizando o embrião de *Zebrafish* (*Danio rerio*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentando ao curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Maria Elvira Poleti Martucci

Co-Orientadora: Karina Taciana Santos Rubio

**Ouro Preto, Minas Gerais – Brasil**

**Dezembro de 2020**

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

P324a Paula, Taina Vitoria Umbelino de .  
Avaliação da toxicidade do agrotóxico Metomil utilizando o embrião de Zebrafish (Danio rerio). [manuscrito] / Taina Vitoria Umbelino de Paula. - 2020.  
49 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elvira Poleti Martucci.  
Coorientadora: Profa. Dra. Karina Taciana Santos Rubio.  
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto.  
Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Produtos químicos agrícolas. 2. Estruturas embrionárias. 3. Toxicidade . 4. Toxicologia. I. Martucci, Maria Elvira Poleti. II. Rubio, Karina Taciana Santos. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 615.9

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira - SIAPE: 1.763.787



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



### FOLHA DE APROVAÇÃO

**Tainá Vitória Umbelino de Paula**

**Avaliação da toxicidade do agrotóxico metomil utilizando o embrião de *Zebrafish* (*Danio rerio*)**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico

Aprovada em 09 de (dezembro) de 2020

#### Membros da banca

Dr<sup>a</sup> Maria Elvira Poleti Martucci - Orientador(a) Universidade Federal de Ouro Preto  
Dr<sup>a</sup> Vanessa de Almeida Belo - Universidade Federal de Ouro Preto  
Mestranda Raíssa Miranda Costa - (Nome da instituição por extenso)

Maria Elvira Poleti Martucci, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 12/12/2020



Documento assinado eletronicamente por **Maria Elvira Poleti Martucci, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 12/12/2020, às 12:18, 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](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0114633** e o código CRC **955453C4**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.009702/2020-06

SEI nº 0114633

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

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Edmar e Glória, pela força, amor e compreensão. Vocês são a fonte de todo o meu esforço e dedicação.

Às minhas irmãs, Yasmin e Chantal, pelo carinho e apoio durante todo o processo.

As minhas tias, Marilda, Mônica, Marisa e Edna, por estarem ao meu lado durante todo o processo.

Ao Caio, pelo amor e apoio.

À minha orientadora, Maria Elvira, pelos ensinamentos, dicas e correções. Obrigada por ter confiado em mim durante todo esse processo e por ter me acolhido e me ensinado tanto.

À minha coorientadora, Karina, pela dedicação e apoio.

À toda equipe do Laboratório de Toxicologia: obrigada por todo o aprendizado e companheirismo.

Aos colegas da Universidade Federal de Lavras, pelo apoio e atenção.

A todos os meus amigos, que estiveram ao meu lado durante todo esse processo: muito obrigada!

## RESUMO

Os agrotóxicos, substâncias amplamente utilizadas na agricultura, são capazes de se acumularem e permanecerem no ambiente, contaminando o solo e as águas superficiais e subterrâneas. O metomil, agrotóxico altamente solúvel em água e com baixa adsorção no solo, pertence à classe dos carbamatos, os quais inibem a acetilcolinesterase e também atuam como disruptores endócrinos. No Brasil, o metomil é amplamente utilizado na agricultura, incluindo culturas de arroz, café e feijão, alimentos muito consumidos pela população brasileira. Entretanto, o mesmo não possui ingestão diária aceitável (IDA), que deve ser estabelecida pela ANVISA, tampouco o valor máximo permitido (VMP) em água potável, que deve ser determinado pelo Ministério da Saúde, enquanto que a União Europeia, apesar de também autorizar seu uso na agricultura, restringe, delimitando a IDA de 0,0025mg/kg, e permitindo a concentração máxima de 0,1ug/L em água potável. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda do metomil, visando contribuir para o estabelecimento de políticas públicas que priorizem o uso seguro de agrotóxicos e, conseqüentemente, determinem tanto a IDA quanto o VMP do metomil. Para isso foram utilizados embriões de Zebrafish (*Danio rerio*) expostos a diferentes concentrações de metomil (0,1;10;20;200 e 500 ng/mL), analisados a cada 24 horas, durante cinco dias, para que fossem avaliadas as possíveis alterações morfológicas e mortalidade. Os resultados obtidos mostraram que, nas concentrações mais altas, o metomil possui um alto potencial tóxico, uma vez na concentração de 500 ng/mL, 75% dos embriões morreu e 25% apresentou alterações morfológicas, e na concentração de 200 ng/mL 55% dos embriões veio a óbito, enquanto que na concentração de 0,1 ng/mL, nenhum embrião apresentou alteração e/ou morreu durante o ensaio. Sendo assim, tornam-se necessários a realização de estudos complementares de toxicidade aguda e crônica do metomil, a fim de possibilitar o estabelecimento da IDA e do VMP.

**Palavras-chave:** agrotóxicos, *Danio rerio*, embrião, toxicidade aguda, Zebrafish.

## ABSTRACT

The pesticides, substances widely used in agriculture, are capable of accumulating and remain in the environment, contaminating the soil, surface water, and ground water. Methomyl, a pesticide highly water-soluble and with low soil adsorption, belongs to the class of carbamates, insecticides that inhibit acetylcholinesterase and also act as endocrine disruptors. In Brazil, methomyl is widely used in agriculture, including rice, coffee, and beans crops, foods widely consumed by the Brazilian population. However, that pesticide does not have an acceptable daily intake (ADI), which must be established by ANVISA, nor the maximum residue level (MRL) in drinking water, which must be determined by the Ministry of Health. The European Union, although authorizes its use in agriculture, restricts, delimiting the ADI of 0.0025 mg/kg, and allowing the maximum concentration of 0.1 µg / L in drinking water. In this regard, the present work aimed to evaluate the acute toxicity of methomyl in order to contribute to the establishment of public policies that prioritize the safe use of pesticides, and, consequently, determine both the ADI and the MRL of methomyl. For that purpose, Zebrafish embryos (*Danio rerio*) were exposed to different concentrations of methomyl (0.1; 10; 20; 200 and 500 ng / mL) and were analyzed every 24 hours for five days to evaluate possible morphological changes and mortality. The results obtained showed that at a concentration of 500 ng / ml, the pesticide has a high toxic potential since most of the embryos died and the rest showed morphological changes, while at the concentration of 0.1 ng / ml, no embryo changed and/or died during the trial. Therefore, it is necessary to carry out complementary studies on the acute and chronic toxicity of methomyl, in order to enable the establishment of ADI and MRL.

**Keywords:** pesticides, embryo, *Danio rerio*, acute toxicity, Zebrafish.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural da substância metomil, que se apresenta com fórmula molecular $C_5H_{10}N_2O_2S$ .	21
Figura 2: Zebrafish adulto.	24
Figura 3: Etapas de desenvolvimento do Zebrafish desde a fertilização até as primeiras 72h de vida, onde tem início a sua fase larva.	24
Figura 4: Dimorfismo sexual. O macho (à esquerda) se apresenta notavelmente mais esguio que a fêmea (à direita), que se apresenta mais robusta e com a parte inferior visivelmente mais arredondada.	25
Figura 5: Escala de cores para determinação do teor de nitrito e de oxigênio dissolvida.	29
Figura 6: Escala de cores e tabela de leitura para determinação do teor de amônia tóxica.	30
Figura 7: Embrião coagulado exposto a 500ng/mL decorridas 48h de ensaio.	35
Figura 8: Mortalidade dos embriões expostos às diferentes concentrações de metomil em relação ao tempo de ensaio.	35
Figura 9: Embrião exposto à concentração de 0,1 ng/mL sem alteração e anterior à eclosão decorridas 24h de ensaio (A). Embrião exposto à concentração de 0,1 ng/mL após eclosão decorridas 96h de ensaio (B). Podemos perceber, em ambas as fotos, que não houve alteração visível.	37
Figura 10: Taxa de eclosão de acordo com o tempo da análise.	38
Figura 11: Ocorrência de má formação nos embriões expostos às soluções de metomil no decorrer do ensaio de toxicidade (24h a 120h).	39
Figura 12: Embrião exposto à concentração de 20ng/mL em 96h, com eclosão incompleta.	39
Figura 13: Ocorrência de lordose nos embriões expostos às soluções metomil em relação ao tempo de ensaio.	40
Figura 14: Taxa de lordose de acordo com o tempo da análise.	41
Figura 15: Embriões expostos a 10 ng/mL (A) e 20 ng/mL (B) de metomil com lordose após 96h de ensaio.	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação da importação e exportação de produtos técnicos e formulados entre os anos de 2018 e 2019. ....	12
Tabela 2: Os 10 ingredientes ativos mais vendidos no Brasil no ano de 2014, em toneladas.....	13
Tabela 3: Comparativo de limites máximos de resíduos de diferentes agrotóxicos, permitidos no milho, em diferentes países.....	16
Tabela 4: Comparativo de limites máximos de resíduos de diferentes agrotóxicos, permitidos na água, em diferentes países. ....	17
Tabela 5: Frequência da notificação por intoxicação por agrotóxicos, por ano e por tipo de exposição, entre os anos de 2007 e 2015, no Brasil.....	18
Tabela 6: Relação entre classe toxicológica, toxicidade e cor da faixa do rótulo presente nas embalagens dos agrotóxicos, de acordo com a ANVISA. ....	19
Tabela 7: Algumas das culturas nas quais o metomil é amplamente utilizado no Brasil. Algumas culturas, como o milho, tem a aplicação feita no pré-plantio. .	22

## LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASCOM	Assessoria de Comunicação
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
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
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
RET	Registro Especial Temporário
SI	Solução Intermediária
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
SUS	Sistema Único de Saúde
UE	União Europeia
UFLA	Universidade Federal de Lavras
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
VMP	Valor Máximo Permitido

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE SIGLAS</b>	<b>viii</b>
<b>SUMÁRIO</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
1.1 Utilização de Agrotóxicos no Brasil	11
1.2 Legislação Brasileira para agrotóxicos	13
1.3 Exposição aos agrotóxicos	17
1.4 Metomil	20
1.5 Modelo animal Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> )	22
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>3. METODOLOGIA</b>	<b>28</b>
3.1 Ética em Experimentação Animal	28
3.2 Cultivo dos Animais Utilizados para obtenção dos embriões	28
3.2.1 Avaliação da Qualidade da água	28
3.3 Reprodução dos peixes adultos	30
3.4 Preparo da solução de metomil	30
3.5 Ensaio de toxicidade aguda com embrião de Zebrafish exposto ao metomil	31
3.6 Avaliação da toxicidade aguda do metomil	31
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>33</b>
4.1 Estabelecimento do cultivo e da reprodução do modelo animal	33
4.2 Ensaio de toxicidade aguda com o embrião de Zebrafish	34
4.2.1 Mortalidade	34
4.2.2 Eclosão	36
4.2.3 Alterações Morfológicas	38
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>43</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>44</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Utilização de Agrotóxicos no Brasil**

O Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos, consumindo 20% de todo agrotóxico comercializado mundialmente e tem atualmente, cerca de 500 produtos autorizados para utilização na agricultura. De acordo com dados obtidos pela ANVISA, em 2017, haviam as seguintes quantidades de agrotóxicos autorizados no Brasil, baseados em sua função e atividade biológica: inseticidas (147), herbicidas (126), fungicidas/bactericidas (114), acaricidas (63), reguladores de crescimento (36), feromônios (34), formicidas (17), nematocidas (16), raticidas (10), cupinicidas (7), moluscicidas (3) e repelentes de insetos (2), contabilizando até então 575 substâncias autorizadas no país, número este que vem sofrendo alteração constante, como citado anteriormente (HESS, 2018). Desses agrotóxicos, 210 possuem a ingestão diária aceitável (IDA) determinada pela ANVISA e apenas 13 estão relacionadas no Anexo XX da Portaria de Consolidação nº5 de 28 de setembro de 2017, o qual determina padrões de qualidade para água potável (ANVISA; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Atualmente, no portal da ANVISA podem ser encontradas cerca de 509 monografias de diferentes ingredientes ativos, sendo que 66 dessas substâncias não têm uso autorizado no país, e 4 delas têm como finalidade apenas a exportação (ANVISA; 2020).

Em tese, esse uso indiscriminado se justifica pelo fato de que o Brasil é um dos maiores produtores agropecuários do mundo, além de possuir uma extensa área de plantio, contribuindo para esse consumo (HESS, 2018). De acordo com dados fornecidos pelo IBAMA, pode-se perceber um aumento crescente na comercialização dessas substâncias, com destaque para a importação de produtos, uma vez que tanto a importação de produtos técnicos quanto de produtos formulados teve um aumento entre os anos de 2018 e 2019, como podemos perceber pela Tabela 1.

**Tabela 1: Relação da importação e exportação de produtos técnicos e formulados entre os anos de 2018 e 2019.**

<b>ATIVIDADE</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>
IMPORTAÇÃO (PT)	272.571,49	275.550,65
IMPORTAÇÃO (PF)	144.436,47	171.931,39
EXPORTAÇÃO (PT)	9.582,81	6.692,79
EXPORTAÇÃO (PF)	7.617,66	7.909,38

**FONTE:** Dados obtidos do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente),

Entende-se como produto técnico aquele obtido diretamente de matérias-primas através de um processo químico, físico ou biológico, sendo destinado à obtenção de pré-misturas ou de um produto formulado, que é a substância final obtida (IBAMA; 2019).

O agrotóxico mais utilizado nas lavouras brasileiras é o glifosato (BOMBARDI, 2019), do qual foram comercializadas quase 196 toneladas em 2017, de acordo com o registro do IBAMA. Esse agrotóxico pertence à classe dos organofosforados, atuando como um herbicida, principalmente contra ervas-daninhas anuais e perenes. Atualmente, o estado responsável pelo maior índice de vendas deste agrotóxico no país é o Mato Grosso, sendo responsável por quase 40 toneladas de glifosato, sendo seguido pelos estados do Paraná, São Paulo e Bahia, respectivamente (AMARANTE *et al.*,2002; BOMBARDI, 2017).

O segundo agrotóxico mais vendido no país é o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) que, assim como o glifosato, é amplamente utilizado no combate às ervas-daninhas, e cuja venda, em 2017, chegou a quase 50 toneladas, de acordo com os registros do IBAMA. Esse herbicida ácido pertence à classe dos compostos clorofenoxiacéticos, sendo assim considerado um herbicida hormonal (AMARANTE *et al.*,2003). Ainda de acordo com dados obtidos pelo IBAMA, em 2019 o fungicida mancozebe, pertencente à família dos carbamatos, foi o terceiro mais vendido no país e o inseticida acefato foi o quarto mais vendido (IBAMA, 2019).

No Brasil, o metomil foi um dos 20 princípios ativos mais frequentemente utilizados entre os anos de 2012-2016 (PIGNATI *et al.*, 2017), sendo ainda o 9º princípio ativo mais vendido no Brasil no ano de 2014, de acordo com relatório fornecido pelo IBAMA mostrado na Tabela 2.

**Tabela 2: Os 10 ingredientes ativos mais vendidos no Brasil no ano de 2014, em toneladas.**

<b>Os 10 ingredientes ativos mais vendidos – 2014 (Unidade de medida: toneladas de IA.)</b>		
<b>Ingrediente Ativo</b>	<b>Vendas (ton. IA)</b>	<b>Ranking</b>
<b>Glifosato e seus sais</b>	194.877,84	1 <sup>o</sup>
<b>2,4-D</b>	36.513,55	2 <sup>o</sup>
<b>Acefato</b>	26.190,52	3 <sup>o</sup>
<b>Óleo mineral</b>	25.632,86	4 <sup>o</sup>
<b>Clorpirifós</b>	16.452,77	5 <sup>o</sup>
<b>Óleo vegetal</b>	16.126,71	6 <sup>o</sup>
<b>Atrazina</b>	13.911,37	7 <sup>o</sup>
<b>Mancozebe</b>	12.273,86	8 <sup>o</sup>
<b>Metomil</b>	9.801,11	9 <sup>a</sup>
<b>Diurom</b>	8.579,52	10 <sup>o</sup>

FONTE: IBAMA

De acordo com dados obtidos pelo IBAMA, em 2019, apesar do mesmo não configurar na lista dos 10 mais vendidos no país neste ano, as vendas do princípio ativo foram bem altas, totalizando quase 5,4 toneladas em todo o país, sendo que, apenas no Mato Grosso, sua venda foi equivalente a quase 1,5 toneladas (IBAMA; 2019).

## **1.2 Legislação Brasileira para agrotóxicos**

De acordo com a Lei 7.802 de 1989, são definidos como agrotóxicos:

“Os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos.”

E também

“Substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

Ainda de acordo com essa legislação, que dispõe sobre a pesquisa, experimentação, produção, armazenamento, comercialização, entre outros aspectos do uso e aprovação dessas substâncias químicas, para que um agrotóxico tenha seu uso liberado no país, é necessário o aval de três órgãos: a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), criada pela Lei nº9.782 de 26 de janeiro de 1999, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) (GOVERNO FEDERAL, 1989).

Visando a avaliação e o controle da quantidade de resíduos de agrotóxicos presentes nos alimentos, em 2001 a ANVISA criou o Programa de Análise de Resíduos em Alimentos (PARA), com o objetivo de controlar as substâncias que chegam à mesa do consumidor, minimizando o risco de contaminação por essas substâncias e os danos causados pela mesma. Sendo de livre acesso à população, o PARA fornece constantemente relatórios de análise, sendo o último relatório referente às coletas realizadas no período de 2017-2018, mostrando em seu resultado que, 23% das amostras se mostravam insatisfatórias (uma amostra insatisfatória pode se enquadrar em nas seguintes opções: conter ingrediente ativo em concentração acima do LMR estabelecido; conter ingrediente ativo não permitido para cultura, ou seja, sem um LMR (Limite Máximo de Resíduo) estabelecido para o alimento analisado; conter ingrediente ativo proibido, ou seja, não permitido no Brasil) (ANVISA, 2019).

Em 2002 ainda foi oficializado o Decreto Nº4.074, que regulamentou a lei 7.802, frisando e corroborando as competências dos órgãos citados anteriormente, enfatizando as proibições e testes necessários para a aprovação e liberação dos agrotóxicos no país .O decreto também dispõe sobre a produção, embalagem, rotulagem, transporte, comercialização, propaganda, utilização, importação, exportação, destino final dos resíduos e embalagens, registro, controle, classificação, controle, inspeção e fiscalização. Em 2005, a Instrução Normativa nº 25 estabeleceu quais os procedimentos devem ser adotados, juntamente com os órgãos fiscalizadores MAPA, ANVISA e IBAMA, para que sejam feitas as avaliações preliminares e de obtenção do Registro Especial Temporário (RET) de substâncias químicas como, pré-misturas, agrotóxicos e afins, que serão destinados à pesquisa e experimentação. Essa Instrução tem como objetivo estudar, e assim minimizar, os possíveis danos causados por

essas substâncias, tanto em relação ao meio ambiente quanto em relação aos danos fisiológicos em animais.

Como um modo de se estabelecer melhores métodos de avaliação dos agrotóxicos e seus ingredientes ativos, em 2018 foi elaborada pela ANVISA a RDCº221 de 28 de março. Essa publicação dispõe sobre os critérios e os procedimentos para que ocorram os processos para a reavaliação toxicológica, onde foram estabelecidos novos critérios a serem considerados 'evidências de risco à saúde humana', entre eles: extrapolação de parâmetros de referência dietéticos e a relevância da exposição ao agrotóxico para os seres humanos. Esse regulamento tem como principal objetivo conferir uma maior objetividade, clareza, transparência e objetividade a esses processos, buscando alcançar melhores resultados (ANVISA;2019).

Em 2019 a ANVISA publicou quatro novas normas regulatórias, sendo três RDC's e uma Instrução Normativa, buscando melhores resultados e alinhar os requisitos brasileiros às melhores práticas regulatórias e de análises, em um âmbito internacional, nessa área. Foram elas: a RDC nº294, que dispõe sobre os critérios de avaliação e classificação toxicológica; RDC nº 295, que dispõe sobre os critérios para avaliação do risco dietético decorrente da exposição humana aos resíduos de agrotóxicos; RDC nº216, que dispõe sobre as informações toxicológicas para rótulos e bulas de agrotóxicos, afins e preservativos de madeira; IN nº 34, que publicou a lista de componentes de uso não autorizado para uso em agrotóxicos (ANVISA, 2019). Essas novas regras almejam realizar uma melhor comunicação entre o uso dos agrotóxicos e os perigos provenientes do mesmo, uma vez que, em sua maioria, estão presentes em diversos alimentos consumidos pela população brasileira.

Em contrapartida às legislações já vigentes, a Câmara dos Deputados analisa uma nova proposta de lei, a PL 6299, que busca tornar mais flexível a aprovação, fiscalização e controle dos agrotóxicos no território brasileiro. A proposta ainda retira da ANVISA a competência de realizar reavaliação toxicológica e ambiental desses produtos, delegando as mesmas apenas ao Ministério da Agricultura. Medidas como essas tornam a legislação vigente ainda mais frágil, facilitando a aprovação e a distribuição de substâncias químicas potencialmente tóxicas que, além de trazerem diversos e maiores danos ao meio ambiente, trazem prejuízos também à saúde humana (ASCOM/ANVISA, 2018).

Ao se fazer um comparativo entre a legislação brasileira e a da União Europeia, pode-se perceber uma menor exigência e maior permissividade da primeira, tanto em relação aos níveis quanto com a permissão de utilização de agrotóxicos (EUROPEAN UNION, 1998). Isso pode ser claramente observado ao constatarmos que em 2018, 30% dos agrotóxicos autorizados para utilização no Brasil eram proibidos na União Europeia (COSTA *et al.*, 2018).

Outro exemplo de maior permissividade da legislação brasileira, é o fato de que no Brasil, a concentração permitida para algumas substâncias na água potável é 5000 vezes superior à permitida na União Europeia (COSTA *et al.*, 2018). De acordo com a Portaria de Consolidação nº5 de 2017, o valor máximo permitido (VMP) de algumas substâncias, na água potável, pode chegar até a 180 µg/L, como é o caso do mancozebe, fungicida pertencente ao grupo dos carbamatos, sendo que na União Europeia, apesar de também ser aprovado, o seu VMP é de 0,1 µg/L, uma vez que é considerado como uma provável substância cancerígena (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; EUROPEAN COMMISSION).

Dentre as diferenças na regulação, sabe-se que entre os dez agrotóxicos mais utilizados no Brasil, três deles, acefato, atrazina e paraquate, são de uso proibido na União Europeia, entretanto, possuem uso autorizado nos EUA, China, Japão, demais países do Mercosul. Existem também diferentes variações nos limites máximos de resíduos permitidos tanto nos alimentos quanto na água em diversas substâncias (MORAES, 2019), como podemos perceber nas Tabelas 3 e 4 a seguir.

**Tabela 3: Comparativo de limites máximos de resíduos de diferentes agrotóxicos, permitidos no milho, em diferentes países.**

<b>Limites máximos de resíduos permitidos em alimentos – milho (Em ppm)</b>						
<b>Ingrediente ativo</b>	<b>Codex</b>	<b>Brasil</b>	<b>China</b>	<b>Estados Unidos</b>	<b>Japão</b>	<b>União Europeia</b>
<b>2,4-D</b>	0,05	0,2	-	0,05	0,05	0,05
<b>Clorpirifós</b>	0,05	0,1	0,05	0,05	0,1	0,05
<b>Delta metrina</b>	2	1	0,5	1	1	0,05
<b>Malationa</b>	0,05	8	1	8	1	8
<b>Glifosato</b>	5	1	1	5	1	1

**FONTE:** MORAES, (2019).

**Tabela 4: Comparativo de limites máximos de resíduos de diferentes agrotóxicos, permitidos na água, em diferentes países.**

Limites máximos de resíduos permitidos na água (Em mg/l)						
Ingrediente ativo	Codex	Brasil	China	Estados Unidos	Japão	União Europeia
<b>2,4-D</b>	0,03	0,03	0,03	0,07	0,03	0,0001
<b>Clorpirifós</b>	0,03	-	0,03	-	0,03	0,0001
<b>Delta metrina</b>	-	-	0,02	-	-	0,0001
<b>Malationa</b>	-	-	0,25	-	-	0,0001
<b>Glifosato</b>	-	0,50	0,7	0,7	-	0,0001
<b>Total de agrotóxicos</b>	-	-	-	-	-	0,0005

FONTE: MORAES, (2019).

Em relação à utilização do metomil, as diferenças entre as legislações que gerem seu uso também são discrepantes. Enquanto no Brasil o limite máximo de resíduo (LMR) possui uma ampla variação, dependendo da cultura em que é utilizado, podendo chegar a até 3,0 mg/kg na cultura de brócolis e não possui IDA determinada (ANVISA, 2020), na União Europeia a IDA é de 0,0025 mg/Kg, a concentração máxima permitida na água potável é de 0,1 ug/L e a LMR é de 0,01 a 0,05 mg/kg na maior parte das culturas (EUROPEAN COMMISSION). (EUROPEAN UNION, 1998)

### 1.3 Exposição aos agrotóxicos

Os agrotóxicos são utilizados com o intuito de controlar insetos, fungos ou outros patógenos que possam afetar culturas de vegetais. Entretanto, essas substâncias também podem se acumular e permanecer no ambiente, contaminando não apenas o solo, mas também a água superficial e subterrânea (MENG *et al.*, 2014).

Atualmente, a exposição dos seres humanos a agrotóxicos constitui um problema de saúde pública. Isso se dá pelo fato de que, de acordo com dados obtidos pelo Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), em 2014, houve o maior índice de notificações por agrotóxicos no país: foram registrados cerca de 6,26 casos para cada 100mil habitantes. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Além disso, o Brasil apresentou um crescimento expressivo de intoxicação pelos mesmos, o qual está diretamente relacionado ao aumento da sua utilização, uma vez que o mercado nacional de

agrotóxicos cresceu 190% na última década (QUEIROZ *et al.*, 2019). Entretanto, sabe-se que a subnotificação é constante nos dados obtidos, principalmente em situações de intoxicação crônica, tornando ainda mais dificultoso dimensionar a realidade do problema, além de impossibilitar o atendimento dessas situações pelo SUS, uma vez que as manifestações clínicas podem ser variadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

As intoxicações por agrotóxicos podem ser provenientes de diferentes tipos de intoxicação, sendo caracterizadas principalmente pelo tipo e frequência da exposição as quais o paciente foi submetido. De acordo com dados fornecidos pelo Ministério da Saúde em 2018, a maior parte das intoxicações relatadas entre os anos de 2007 a 2015, foram provenientes de exposição aguda a uma dose única, como podemos perceber na Tabela 5.

**Tabela 5: Frequência da notificação por intoxicação por agrotóxicos, por ano e por tipo de exposição, entre os anos de 2007 e 2015, no Brasil.**

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
<b>Total</b>		4.964	6.039	7.001	7.936	10.007	11.112	12.589	12.695	11.863	84.206

**FONTE:** Ministério da Saúde, (2018).

Este tipo de intoxicação é, por definição, aquele que ocorre devido à uma única exposição ao agente tóxico, em um período de tempo de 24 horas, tendo como alguns dos seus principais sintomas diarreia, entre outros.

A intoxicação aguda pode variar de leve à moderada ou grave, nestes casos podendo evoluir para coma ou morte. Seguida da mesma, estão as intoxicações que não tiveram o seu tipo de exposição notificadas, exposição aguda repetida (ocorre devido às múltiplas exposições ao mesmo agente tóxico, em um período de 15 dias), exposição crônica (exposição prolongada a um

mesmo agente tóxico, de forma contínua ou intermitente, por um período maior que 15 dias) e exposição aguda sobre crônica (ocorre quando casos de exposição crônica sofrem uma exposição aguda ao mesmo agente tóxico, causando sintomas como náuseas, vômitos, tontura, desorientação, sudorese e dificuldade respiratória) (DE LARA *et al.*, 2019), (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Os agrotóxicos também podem ser classificados de acordo com a sua toxicidade, que leva em consideração os efeitos agudos causados pelo mesmo após uma exposição (MELLO, 2019), sendo os mesmos divididos em classes de I a IV, onde cada classe é representada por uma cor, como podemos perceber na Tabela 6. Essa classificação é de responsabilidade do Ministério da Saúde e, por determinação legal, deve estar sempre presente nos rótulos das embalagens (SILVA *et al.*, 2019; TAVARES *et al.*, 2020). Tal toxicidade está diretamente relacionada à composição química dessas substâncias (JAMHOUR, 2014).

**Tabela 6: Relação entre classe toxicológica, toxicidade e cor da faixa do rótulo presente nas embalagens dos agrotóxicos, de acordo com a ANVISA.**

<b>CLASSE</b>	<b>TOXICIDADE</b>	<b>COR DA FAIXA DO RÓTULO</b>
<b>I</b>	Produto extremamente tóxico	Vermelha
<b>II</b>	Produto altamente tóxico	Amarela
<b>III</b>	Produto moderadamente tóxico	Azul
<b>IV</b>	Produto pouco tóxico	Verde

FONTE: TAVARES (2020).

A exposição e a contaminação por essas substâncias químicas ocorrem por diferentes vias, sendo a inalatória e a dérmica as mais comuns, principalmente em indivíduos que trabalham com o manuseio das mesmas, no entanto, esses agrotóxicos também podem entrar no corpo pelas vias oral e ocular (KIM *et al.*, 2017). A contaminação ocupacional é caracterizada como sendo a que ocorre, principalmente, em trabalhadores rurais e agricultores, uma vez que são indivíduos que lidam diariamente com o manuseio destes produtos. No entanto, ainda temos a contaminação alimentar, que ocorre pela ingestão de alimentos contaminados por essas substâncias, e a contaminação ambiental, que ocorre principalmente em acidentes relacionados à produção e a aplicação dos agrotóxicos na natureza (DUTRA, 2017).

Os sinais e sintomas decorrentes da intoxicação por agrotóxicos são extremamente variáveis, uma vez que são diretamente relacionados tanto à via de contaminação quanto à substância responsável pela mesma, além do tipo de intoxicação ao qual o indivíduo foi submetido, podendo afetar a saúde a curto, médio e longo prazo, variando também nos sistemas fisiológicos e nos órgãos que podem ser afetados: nervoso, endócrino, hematopoiético e reprodutivo, e órgãos como olhos, pele, rins e fígado, além de estarem diretamente relacionados a diferentes patologias, tais como câncer, perturbação hormonal, asma, alergia e hipersensibilidade. Além disso, também existem evidências que apontam que essa exposição pode acarretar em teratogenicidade, redução de peso do recém-nascido, aborto, entre outras consequências (DE LARA *et al.*; 2019) (KIM *et al.*, 2017;).

#### **1.4 Metomil**

Podendo ser comercializado com diversos nomes, como Lannate® ou Methomex, o metomil é um agrotóxico com ação inseticida e acaricida, pertencente à classe dos carbamatos, os quais inibem a acetilcolinesterase e também atuam como disruptores endócrinos, que são substâncias exógenas que promovem alterações no sistema endócrino e nas funções fisiológicas, uma vez que conseguem agir como hormônios no organismo (JAMHOUR, 2016). Os carbamatos são um dos principais tipos de inseticidas, sendo produzidos em 25 diferentes compostos e constantemente associados a diferentes situações de intoxicação, sendo um grande problema de saúde pública a nível mundial (DE SOUZA, 2005).

O metomil (S-methyl N-methylcarbamoyloxy-thioacetimidate), cuja molécula é representada na Figura 1 é um sólido cristalino branco, que apresenta um leve odor de enxofre, com peso molecular de 162,21 g/mol. É altamente solúvel em água, não corrosivo e inflamável, liberando vapores tóxicos de nitrogênio e óxido de enxofre quando aquecido até a sua completa decomposição. Possui ponto de fusão entre 78-79°C e a sua taxa de degradação aumenta com a temperatura, alcalinidade, aeração e luz solar (EPA, 1998) (PubChem). Além disso, possui uma adsorção que varia de fraca a moderada no solo e, portanto, possui alto risco de contaminar tanto água superficial quanto

água subterrânea (MENG *et al.*, 2014).

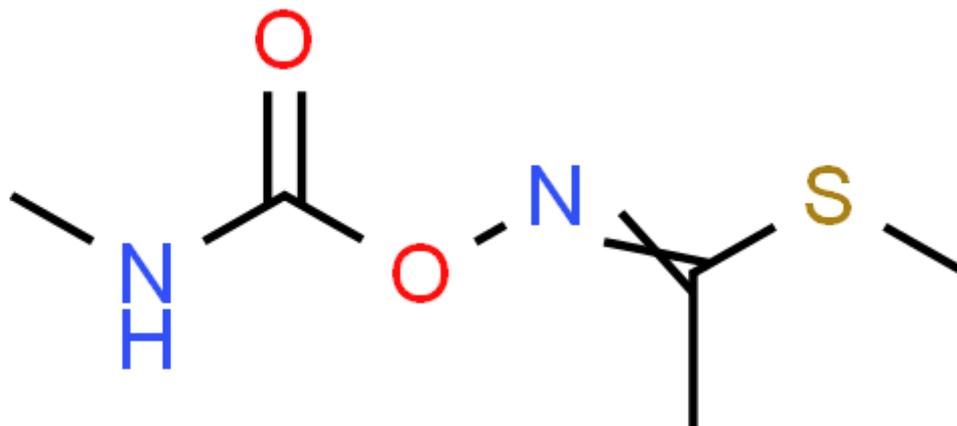


Figura 1: Fórmula estrutural da substância metomil, que se apresenta com fórmula molecular  $C_5H_{10}N_2O_2S$ .

FONTE:Chemspider.

A toxicidade do metomil está relacionada ao acúmulo de acetilcolina nas terminações nervosas, por meio da inibição da acetilcolinesterase através da carbamilação da enzima (PEREIRA *et al.*, 2007) acarretando alterações no sistema colinérgico; aumento dos níveis de cálcio intracelular; alteração da neurotransmissão, resultando na hiper estimulação dos receptores colinérgicos nas junções neuromusculares; paralisia muscular e parada respiratória (YOON *et al.*, 2016). Apesar de diversos estudos indicarem que uma exposição única a esta substância possa induzir efeitos duradouros em animais, diversos organismos, principalmente aquáticos, lidam com contatos frequentes à esta substância, resultantes de aplicações e exposições repetidas do agrotóxico no meio, levando a efeitos além da mortalidade (PEREIRA *et al.*, 2007; MENG *et al.*, 2017).

Estudos de toxicidade *in vivo*, realizados em ratos, mostraram que o metomil pode induzir dano renal, estresse oxidativo e prejudicar o sistema de defesa antioxidante. O metomil também se mostrou genotóxico a linfócitos humanos, causando alterações cromossômicas e no micronúcleo (YOON *et al.*, 2016). Além disso, estudos mostraram que o uso deste inseticida pode promover efeitos inibitórios na microbiota do solo do local da aplicação, mesmo em doses permitidas pela legislação vigente, podendo resultar na perda na perda da qualidade biótica do mesmo (ROCHA *et al.*, 2020).

Apesar disso, o metomil tem sido amplamente utilizado na agricultura, tanto no tratamento do solo quanto na proteção de vegetais, devido ao seu amplo espectro de ação e alta eficiência contra insetos (MENG *et al.*, 2014). No Brasil, o metomil é autorizado nas mais diversas culturas de alimentos, incluindo aqueles alimentos consumidos diariamente e em grandes quantidades pelos brasileiros, tais como, arroz, café, feijão, trigo, entre outros, como mostrado na Tabela 7. Entretanto, a ANVISA ainda não estabeleceu a IDA, tampouco o Ministério da Saúde estabeleceu o valor máximo permitido (VMP) para este agrotóxico em água potável (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

**Tabela 7: Algumas das culturas nas quais o metomil é amplamente utilizado no Brasil. Algumas culturas, como o milho, tem a aplicação feita no pré-plantio.**

<b>Culturas</b>	<b>Modalidade de Emprego (Aplicação)</b>	<b>LMR (mg/kg)</b>	<b>Intervalo de Seaurança</b>
<b>Algodão</b>	Foliar	0,1	14 dias
<b>Arroz</b>	Foliar	0,2	14 dias
<b>Aveia'</b>	Foliar	0,1	14 dias
<b>Batata</b>	Foliar	0,1	09 dias
<b>Brócolis</b>	Foliar	3,0	03 dias
<b>Café</b>	Foliar	0,1	21dias

**FONTE:**ANVISA, 2018.

### **1.5 Modelo animal Zebrafish (*Danio rerio*)**

De um modo geral, os peixes são excelentes bioindicadores da qualidade da água, uma vez que, são capazes de absorver e armazenar xenobióticos dissolvidos na mesma, além de estarem diretamente expostos a contaminantes e mudanças ambientais (CASTRO *et al.*, 2018). Por possuírem uma alta variação de habitats e estilos de vida durante o seu desenvolvimento, os peixes podem responder de diversas maneiras a uma contaminação, seja com alterações na taxa de crescimento, na sua maturação sexual, desenvolvimento, entre outras alterações (RIBEIRO, 2018).

O uso de agrotóxicos e outras substâncias químicas nos meios terrestre e aquático podem trazer diversas perturbações químicas e físicas no ambiente, levando a alterações nos organismos que neles residem, como o óbito ou outros danos, de acordo com a dose do produto encontrada no local (RIBEIRO, 2018). Essas alterações fisiológicas nos peixes, quando associadas aos níveis de

agrotóxicos presentes no ambiente, não apenas fornecem meios para entender a dinâmica dos poluentes em termos biológicos, como também são úteis como modelos para estudos de toxicidade destes poluentes em vertebrados, entre eles os seres humanos (CASTRO *et al.*, 2018).

O *Zebrafish* (*Danio rerio*), é um peixe tropical de água doce, nativo do sul da Ásia, podendo ser comumente encontrado em águas rasas, paradas ou de baixa movimentação. Esta região possui uma sazonalidade chuvosa, com estações secas e chuvosas bem definidas, o que tem grande influência tanto na adaptação quanto na reprodução do *Zebrafish*, uma vez que o mesmo tem uma reprodução mais favorável em temperaturas de 28°C, que é comum nos períodos de chuva (DAMMSKI *et al.*, 2011), embora a temperatura ideal da água para o seu desenvolvimento e longevidade possa variar entre 25-28°C, assim como o pH da mesma pode ter uma variação entre 6,8 – 8,5, preferencialmente (LÓPEZ-OLMEDA *et al.*, 2010).

Em seu habitat natural, o *Zebrafish* tem uma alimentação baseada, em sua maior parte, por uma alta variedade de zooplâncton e insetos e, em menor quantidade, de algas e materiais orgânicos. As chamadas ‘dietas vivas’ são comumente realizadas com *Artêmias*, sendo este o principal alimento vivo presente na dieta do *Zebrafish*. Essas dietas são favoráveis as processadas, uma vez que elas possuem um perfil nutritivo mais atrativo e balanceado, alta digestibilidade, atratividade e aceitabilidade pelo animal, além de permitirem o desenvolvimento de um estímulo de caça pelo animal e por fornecerem, em maior quantidade, proteínas e aminoácidos, nutrientes extremamente importantes para a realização das funções biológicas destes animais (DAMMSKI *et al.*, 2011).

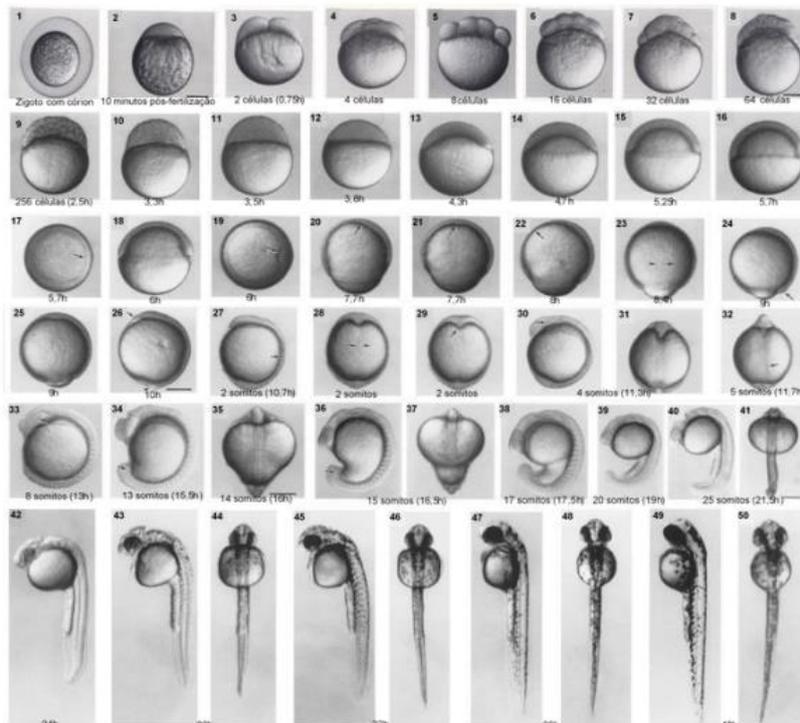
O *Zebrafish* é um peixe de pequeno porte, caracterizado pelo padrão de listras longitudinais que intercalam entre azuis-escuras e prateadas, que preenchem todo o seu corpo e as nadadeiras anal e caudal, quando em fase adulta, como podemos perceber na Figura 2.



**Figura 2: Zebrafish adulto.**

**FONTE:** (BUSKE; 2012)

Ele possui três estágios de vida: larval, juvenil e adulto. A fase larval ela tem início em até 72h após a fertilização e se mantém pelos primeiros 14 dias de vida (Figura 3). Em seguida temos a fase juvenil, que sendo uma intermediária entre a fase larval e fase adulta do peixe, dura até o 30º dia de vida do peixe. Logo após este período tem início a fase adulta, onde tem início a sua maturidade sexual (DAMMSKI *et al.*, 2011; COUTINHO, 2018).



**Figura 3: Etapas de desenvolvimento do Zebrafish desde a fertilização até as primeiras 72h de vida, onde tem início a sua fase larva.**

**FONTE:** COUTINHO; (2018).

Seu dimorfismo sexual é de fácil diferenciação, uma vez que as fêmeas desta espécie são, na maior parte das vezes, visivelmente mais robustas que os machos, possuindo a porção inferior do corpo mais redonda, como mostrado na Figura 9 abaixo. Os machos muitas vezes também podem apresentar uma coloração mais escura que as fêmeas (DAMMSKI *et al.*, 2011).



**Figura 4: Dimorfismo sexual. O macho (à esquerda) se apresenta notavelmente mais esguio que a fêmea (à direita).**

**FONTE:** (Dammski; 2011)

Peixes desta espécie apresentam comportamentos sociais e reprodutivos bem característicos, pois apesar de serem bastante sociais e não gostarem de viver sozinhos, os mesmos vivem e se reproduzem em cardumes pequenos, que variam entre 5 a 20 indivíduos (COUTINHO, 2018).

Muitas vezes, entre as fêmeas da espécie, pode ocorrer uma competição pela dominância, afetando tanto a reprodução quanto a criação destes animais em laboratório. Esta competição acontece por meio de mordeduras e pela liberação de hormônios inibitórios na água, como um mecanismo de impedir que as outras fêmeas do cardume liberem seus feromônios e consigam reproduzir. Sendo assim, a melhor alternativa, quando criados em laboratório, é evitar manter os mesmos grupos de fêmeas em um mesmo aquário, evitando o estabelecimento e uma hierarquia entre as mesmas (DAMMSKI, 2011).

Eles também são animais que necessitam que o controle da luz em cativeiro seja bem estabelecido, uma vez que possuem um ciclo circadiano diurno e suas atividades biológicas e comportamentais necessitam dessa padronização, sendo que a reprodução é fortemente influenciada pelo fotoperíodo, uma vez que a ovulação ocorre, normalmente um pouco antes do

amanhecer, e a desova tem início nas primeiras horas do ciclo claro. O indicado para a criação em laboratório é que o ciclo de luz seja mantido em 14 horas de luz e 10 de escuridão, ou ainda, 12h de luz e 12 horas de escuridão (LAWRENCE, 2007; DAMMSKI *et al.*, 2011).

Atualmente, o *Zebrafish* tem se tornado um modelo animal popular para avaliação da toxicidade, principalmente por ser um organismo com anatomia, fisiologia e desenvolvimento similares a vertebrados superiores; fornecer um grande número de embriões em cada evento reprodutivo; ter manejo simples; possuir embriões transparentes; apresentar desenvolvimento rápido; proporcionar ensaios rápidos e baratos; absorver facilmente substâncias presentes na água e apresentar células hepáticas semelhantes às células hepáticas humanas (OTTE *et al.*, 2017; ANSELMO *et al.*, 2018). Devido à essa transparência dos embriões e pelo fato deles possuírem um tamanho relativamente grande, o seu desenvolvimento, e alterações no mesmo, podem ser facilmente observados através do córion, permitindo uma análise da toxicidade mais clara e objetiva (DAMMSKI *et al.*, 2011).

Além disso, a utilização de embrião do *Zebrafish* tem se mostrado uma alternativa promissora à utilização do peixe adulto, uma vez que, apresenta sensibilidade e correlação comparável ao peixe adulto, além de tornar desnecessária a eutanásia dos mesmos, uma vez que a presença dos processos de má formação podem ser percebidos no embrião (SILVEIRA;2012), e, portanto, a “Organization for Economic Cooperation and Development” (OECD) estabeleceu e validou um protocolo para sua utilização em ensaios de toxicidade (OECD, 2013).

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho de conclusão de curso foi avaliar a toxicidade aguda do agrotóxico metomil em embriões de *Zebrafish* (*Danio rerio*), por meio da avaliação das alterações morfológicas e no desenvolvimento do embrião na presença de diferentes concentrações de metomil. Dessa forma, os objetivos específicos foram:

- a) Estabelecer o modelo animal *Zebrafish* no Laboratório de Toxicologia da Escola de Farmácia, otimizando as condições de manejo;
- b) Reproduzir peixes adultos de *Zebrafish*, de acordo com protocolo estabelecido, a fim de se obter os embriões para o ensaio de toxicidade;
- c) Expor os embriões de *Zebrafish* às concentrações de 0,1; 10; 20; 200 e 500ng/mL de metomil, de acordo com o protocolo OECD nº 236 “Guidelines for the Testing of Chemicals – Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test” (OECD, 2013);
- d) Analisar o desenvolvimento do embrião e as alterações morfológicas provocadas pela presença do metomil durante 5 dias consecutivos, ou seja, até o final de 120h após a fertilização do embrião;

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Ética em Experimentação Animal**

Este trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto, considerando as diretrizes do *National Council for Control of Animal Experimentation* (CONCEA). Dessa forma, o número de animais utilizados, assim como os tratamentos aplicados, será restringido ao estabelecido no processo CEUA nº 4758151018.

#### **3.2 Cultivo dos Animais Utilizados para obtenção dos embriões**

Peixes adultos *Zebrafish* (*Danio rerio*) foram mantidos em aquários com 4L de água aerada e filtrada automaticamente, além de termostaticada a 28±1°C, sendo o pH mantido entre 6-8. A troca de 50% da água foi feita diariamente, a fim de mantê-la em condições ideais para a manutenção e qualidade de vida dos peixes. A iluminação da sala foi ajustada artificialmente em ciclos de claro:escuro 14h:10h, e os peixes alimentados três vezes ao dia - com ração nas duas primeiras refeições e com artêmias na última alimentação - sendo os mesmos alimentados até a saciedade.

Os peixes foram mantidos em aquários separados de acordo com a sua idade, permitindo um maior controle de animais e o conhecimento do seu desenvolvimento e idade reprodutiva. Peixes aptos à reprodução foram mantidos, em sua rotina, já separados em diferentes famílias reprodutoras.

##### *3.2.1 Avaliação da Qualidade da água*

Semanalmente foram realizadas análises químicas com o intuito de avaliar a qualidade da água dos aquários. Estas análises foram realizadas por meio da determinação do pH e do teor de nitrito, amônia e oxigênio dissolvido, utilizando kits comerciais da marca Alcon®. Estes parâmetros são importantes variáveis ambientais, interferindo diretamente nos processos químicos, físicos e biológicos dos peixes (POMPEO, et al; 2015).

Os resultados dos testes foram analisados por meio da utilização de tabelas e escala de cores fornecidas pelo fabricante dos kits, como mostrado nas Figuras 5 e 6. Em relação ao nitrito, quanto mais intensa a coloração rosa, pior a qualidade da água. Já em relação ao oxigênio, quanto mais intensa a coloração amarelada, maior a quantidade de oxigênio dissolvida na água. Ao se analisar os resultados obtidos em relação ao teste de amônia tóxica presente na água, deve-se levar em consideração tanto o pH quanto a temperatura da mesma. Para o resultado ser favorável, o resultado encontrado deve estar inserido na faixa verde da tabela.

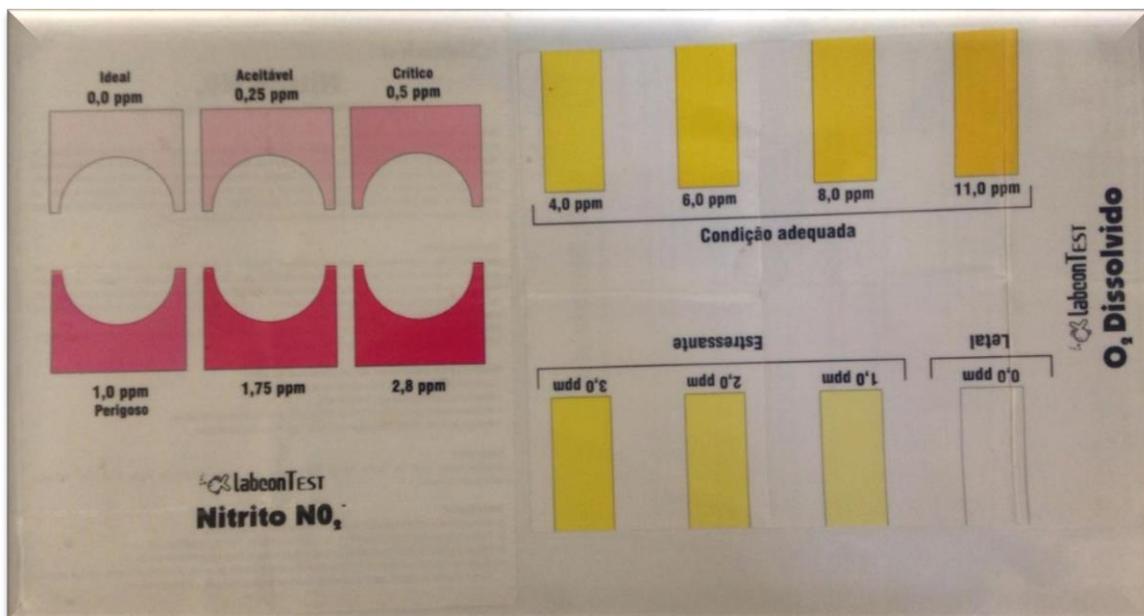


Figura 5: Escala de cores para determinação do teor de nitrito e de oxigênio dissolvido.

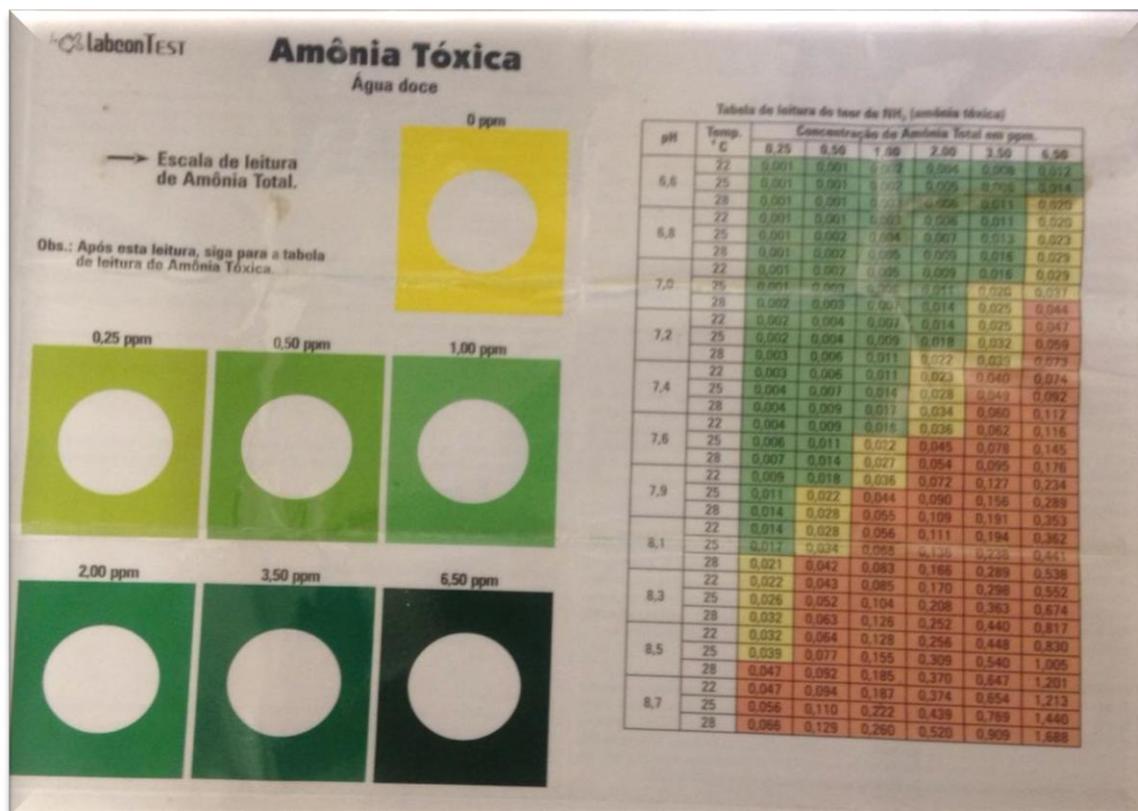


Figura 6: Escala de cores e tabela de leitura para determinação do teor de amônia tóxica.

### 3.3 Reprodução dos peixes adultos

Em aquários específicos para a reprodução, localizados no biotério da Universidade Federal de Lavras (UFLA), foram colocados peixes na proporção 2:1 e 1:1 (machos:fêmeas), separados por uma divisória de plástico resistente e com orifícios, pelos quais foi possível a troca de hormônios entre os animais. Os peixes foram mantidos separados por cerca de 12h, mantendo o pH 6-8 e a temperatura 28 ± 1°C. Após as 12h e anteriormente ao início da fase clara do ciclo, a divisória foi retirada e um jato de água gelada foi lançado rapidamente sobre os peixes.

### 3.4 Preparo da solução de metomil

Foi preparada, inicialmente, uma solução intermediária (SI) de metomil na concentração de 500ng/mL, pipetando-se 500µl da solução estoque de 21,5µg/ml em 21mL de água. A partir da mesma foram preparadas as soluções nas concentrações de 0,1;10;20;200 e 500ng/mL.

### **3.5 Ensaio de toxicidade aguda com embrião de Zebrafish exposto ao metomil**

Após a reprodução, os ovos fertilizados foram selecionados e coletados, sendo aceitável um tempo de até 8 horas entre a fecundação, coleta e aplicação no meio com solução de metomil, visando evitar qualquer início de desenvolvimento embrionário. Foram selecionados apenas os ovos fertilizados, que podem ser diferenciados dos não fertilizados através de uma análise microscópica, uma vez os mesmos apresentam uma aparência completamente transparente, enquanto os não fertilizados se apresentam com uma coloração esbranquiçada (DAMMSKI, 2011). Os ovos foram aplicados em placas de 96 poços, onde cada poço foi preenchido com solução de metomil e em seguida, foi adicionado 1 ovo em cada, conforme descrito no protocolo OECD n°236(OECD,2013).

O metomil foi avaliado em 5 concentrações diferentes (0,1;10;20;200 e 500ng/mL), utilizando 20 ovos para cada concentração. Essas concentrações foram definidas levando-se em consideração o valor permitido em água potável na União Europeia (0,1 µg/L) e estudos preliminares, que indicavam envenenamentos fatais por metomil a partir de 600ng/mL (MORIYA, *et al*; 2005). Sendo assim, foram selecionadas concentrações intermediárias, trazendo uma maior sensibilidade ao teste. As placas, contendo os ovos e a solução de metomil, foram mantidas à 28±-1°C e sob as mesmas condições de luminosidade utilizadas para os peixes adultos. Foi mantido um grupo controle negativo, também com 20 ovos, onde os mesmos foram colocados em contato com água e mantidos sob as mesmas condições que os grupos de estudo.

### **3.6 Avaliação da toxicidade aguda do metomil**

A avaliação da toxicidade foi realizada mediante observação do número de embriões mortos, através de uma análise feita diretamente com microscópio. Foram avaliados os estágios do desenvolvimento embrionário, a mortalidade e as seguintes alterações morfológicas do embrião: coagulação do ovo; ausência de formação do somito; ausência de separação da cauda do saco vitelínico; edema no saco vitelínico e no pericárdio; deformação espinhal; desenvolvimento

ocular incompleto; ausência de pigmentação; atraso na eclosão; lordose; tamanho de cauda e batimentos cardíacos. Essas avaliações foram feitas diariamente, até o 5º dia após a desova (120h), conforme descrito no protocolo OECD n°236 (OECD, 2013).

Foram também analisados aspectos relacionados à validação do método utilizado, sendo necessárias as seguintes condições: taxa geral de fertilização maior ou igual a 70%; a sobrevivência global dos embriões do controle maior ou igual a 90% até o final das 96h de exposição; a taxa de eclosão do controle negativo maior ou igual a 80% no final das 96h de exposição (OECD, 2013).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estabelecimento do cultivo e da reprodução do modelo animal

O estabelecimento do cultivo do modelo animal no Laboratório de Toxicologia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) foi bem-sucedido, mostrando resultados positivos quanto a criação e ao manejo, porém, apresentando dificuldades quanto à reprodução.

As tentativas de reprodução realizadas no Laboratório de Toxicologia foram realizadas repetidamente, com pequenas alterações entre elas, como um modo de alcançar o objetivo. Os peixes reprodutores eram retirados dos aquários comuns dois dias antes da reprodução, sendo mantidos em aquários específicos para este fim, em grupos na proporção 1:1 ou 2:1 machos:fêmeas, separados pelo gênero por uma barreira transparente de acrílico e gradeada, o que permitia a troca de feromônios entre eles. Esse período e a troca de feromônios servem para que o acasalamento seja estimulado. No aquário de reprodução foram fixadas plantas plásticas de coloração verde, como um modo de simular o habitat natural dos peixes.

Após 48h de troca de feromônios entre os mesmos, e sabendo-se que o melhor horário reprodutivo desta espécie ocorre na primeira parte do ciclo de luz, a barreira era retirada rapidamente antes do início do ciclo claro da sala. Uma vez que a reprodução habitual do *Zebrafish* ocorre em um período de chuva em seu habitat natural, assim que a divisória era retirada, se era esguichado um pouco de água fria sobre os peixes com a ajuda de uma pisseta.

As tentativas de reprodução foram realizadas de forma semanal, sempre com diferentes grupos de peixes, alternando os machos e as fêmeas.

O processo de estabelecimento do cultivo e da reprodução, assim como a coleta dos embriões utilizados nessa pesquisa, foi realizado com o auxílio e treinamento do grupo de pesquisa em *Zebrafish* da Universidade Federal de Lavras (UFLA), coordenado pelo Prof. Dr. Murgas, que possui 20 anos de experiência em manejo e criação da espécie em questão e de outros peixes de água doce.

Diferentes fatores podem influenciar na implementação do protocolo de reprodução do *Zebrafish* em laboratório, uma vez que existem diferenças entre as condições fornecidas para os peixes no Biotério da UFLA e as fornecidas no Laboratório de Toxicologia da UFOP, sendo algumas delas: água filtrada por osmose reversa, o que garante uma maior qualidade da água e um ambiente mais favorável; processo de limpeza, troca da água dos aquários e controle dos parâmetros de qualidade, descritos no item 3.2.1, são realizados de modo automático, por tubulações, o que diminui o estresse causado pelas sifonações manuais e diárias; e a reprodução é realizada em uma sala destinada exclusivamente para este fim.

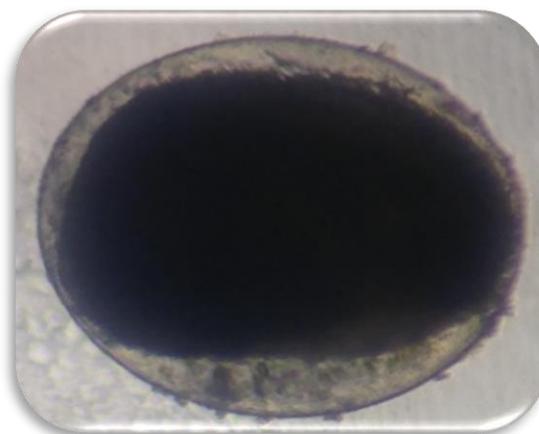
#### **4.2 Ensaio de toxicidade aguda com o embrião de Zebrafish**

Para a determinação da toxicidade e para o desenvolvimento da análise, foi seguido o Protocolo da OECD, nº 236 de 26 de julho de 2013, seguindo a metodologia descrita no item 3.6.

Após as avaliações diárias realizadas até o 5º dia pós-fertilização, foram observadas alterações no desenvolvimento embrionário e também alterações morfológicas. Cada uma das alterações observadas foi analisada separadamente, considerando a concentração de metomil à qual os embriões foram expostos (itens 4.2.1 a 4.2.3).

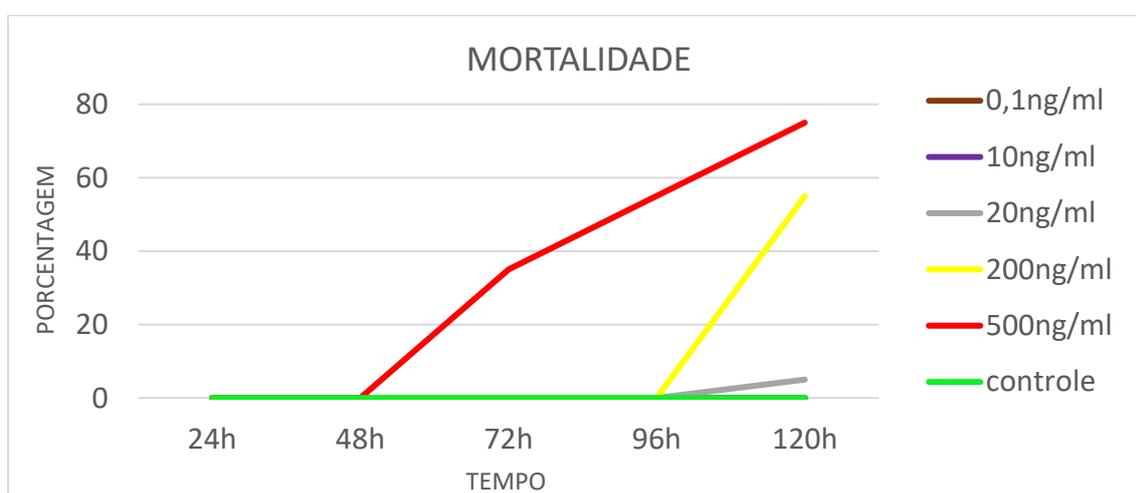
##### *4.2.1 Mortalidade*

A mortalidade foi avaliada por meio da análise da coagulação do embrião (Figura 7) e da ausência de batimentos cardíacos.



**Figura 7: Embrião coagulado exposto a 500 ng/mL decorridas 48h de ensaio.**  
**FONTE:** Acervo Pessoal de Tainá Umbelino (2020)

De acordo com os resultados obtidos (Figura 8), pode-se perceber que a taxa de mortalidade é diretamente proporcional ao aumento da concentração do metomil, uma vez que para os embriões expostos à concentração de 0,1 ng/mL, a taxa de mortalidade foi nula, enquanto que na concentração de 200 ng/mL, mais de 50% dos embriões morreram após 120 h. Também é importante observar que, 35% dos embriões expostos a 500 ng/mL morreram nas primeiras 48h, ultrapassando 70% após 120h. Assim, na concentração de 500 ng/mL, o metomil apresentou alto nível de letalidade.



**Figura 8: Mortalidade dos embriões expostos às diferentes concentrações de metomil em relação ao tempo de ensaio.**

Em estudo realizados por Hanazato (1991), crustáceos da espécie *Daphnia ambigua*, no estágio final do desenvolvimento embrionário foram expostos à diferentes concentrações de diferentes agrotóxicos (inseticidas,

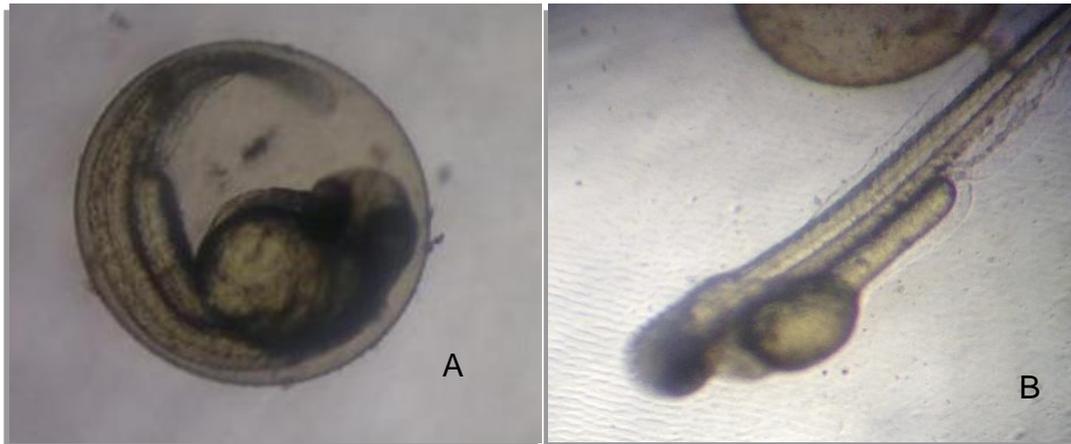
pesticidas e fungicidas) por 10h. Os resultados obtidos mostraram que, apesar de não terem sido observados óbitos quando expostos à concentrações de 3 e 5 µg/L do agrotóxico carbaril, quando os crustáceos foram expostos à concentrações de 5 e 10 µg/L de 2-sec-butilfenil-N-metilcarbamato (BPMC), carbamato, foram observados, respectivamente, óbitos de 50 e 100% dos indivíduos (HANAZATO; 1991). Posteriormente, um estudo realizado por Gallo (1995) com peixes adultos *Zebrafish*, mostrou que 4 dos 10 peixes sobreviveram quando expostos a uma concentração de 48.37 µg/mol de carbaril, após 96h. Recentemente, Sanches *et al.*, (2018) expôs embriões de *Zebrafish* a uma solução de abamectina na concentração de 11,7 mg/L (11,7 µg/mL), levando a uma mortalidade de 30% dos embriões.

Assim como o metomil, a abamectina, o carbaril e o BMPC são agrotóxicos da classe dos carbamatos, ou seja, são inseticidas que atuam nos receptores GABA, levando a danos nas transmissões neuromusculares e a neurotoxicidade, uma vez que essa substância é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica dos peixes.

Sendo assim, podemos perceber que a toxicidade de agrotóxicos da classe dos carbamatos se mostra relativamente alta e com um alto grau de letalidade quando em contato com diferentes espécies aquáticas em diferentes estágios de desenvolvimento, corroborando a importância de estudos mais detalhados e de exposição crônica em relação a essas substâncias e seus efeitos tóxicos.

#### 4.2.2 Eclosão

A eclosão dos embriões da espécie *Danio rerio* deve ocorrer no intervalo de 48h a no máximo 96h após a fertilização (Figura 9). Após esse período, deve-se considerar que houve um atraso no desenvolvimento do animal, além de possivelmente resultar em alterações morfológicas posteriores.

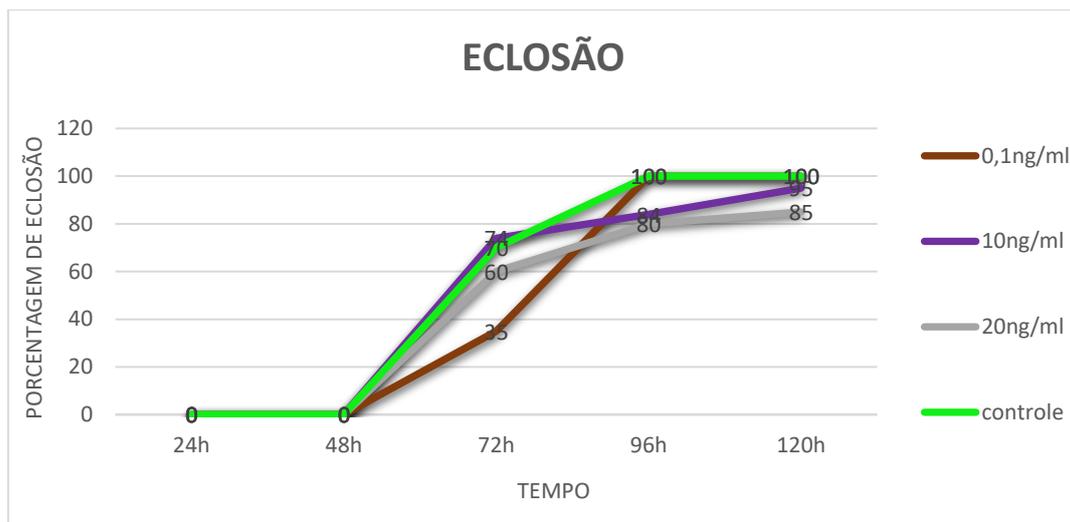


**Figura 9:** Embrião exposto à concentração de 0,1 ng/mL sem alteração e anterior à eclosão decorridas 24h de ensaio (A). Embrião exposto à concentração de 0,1 ng/mL após eclosão decorridas 96h de ensaio (B). Podemos perceber, em ambas as fotos, que não houve alteração visível.

**FONTE:** Acervo Pessoal de Tainá Umbelino (2020)

As eclosões iniciaram 48h após a fertilização nos embriões expostos às concentrações de 0,1, 10 e 20 ng/mL de metomil, sendo possível observar que após 96h, ocorreu uma queda na taxa de eclosão de acordo com o aumento da concentração (Figura 10). Assim, pode-se perceber que na concentração de 0,1 ng/mL e no grupo controle, a taxa de eclosão foi de 100% ao final das 120h, enquanto que nas concentrações de 10 ng/mL e 20 ng/mL a taxa de eclosão foi de 95% e 85%, respectivamente.

Por outro lado, os embriões expostos às concentrações de 200 e 500 ng/mL, não eclodiram, demonstrando que quando presente em concentrações superiores a 200 ng/mL, o metomil é capaz de alterar o desenvolvimento do embrião, resultando em morte ou má formação.



**Figura 10: Taxa de eclosão de acordo com o tempo da análise.**

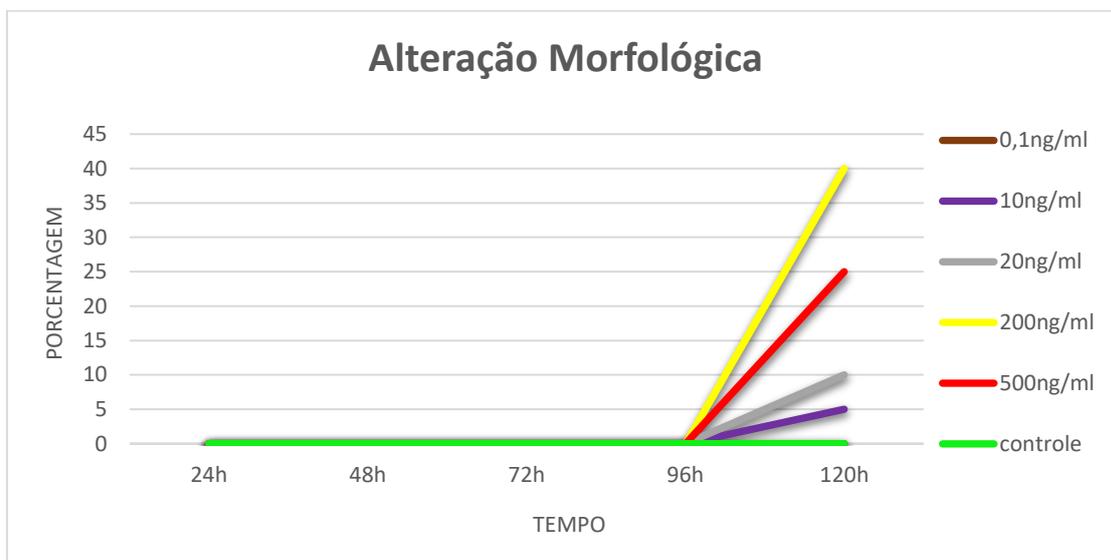
Em um estudo descrito em 2001, ovos e embriões de *Zebrafish* foram expostos a quatro soluções do inseticida carbaril, preparadas nas seguintes proporções: 1:1000; 1:750; 1:500 e 1:250 carbaril:água. Apesar de, nestas concentrações, a substância não ter se mostrado altamente letal aos embriões, os resultados obtidos mostraram um atraso no tempo de eclosão, principalmente nas concentrações maiores, demorando até duas vezes mais tempo para eclodir do que o grupo controle do estudo, que estava em exposto a água pura (TODD, *et al.*; 2002). Posteriormente, em estudo realizado por SANCHES *et al.*, (2018), embriões de *Zebrafish* foram expostos a diferentes concentrações de solução de abamectina (0,5; 1,1; 2,4; 5,3 e 11,7 mg/L) e os resultados demonstraram um atraso na eclosão dos mesmos nas diferentes concentrações testadas.

Sendo assim, podemos perceber que a exposição a agrotóxicos da classe dos carbamatos, como o metomil, a abamectina e o carbaril, nas concentrações avaliadas, podem causar sérios danos ao desenvolvimento do embrião do *Zebrafish*, prejudicando a eclosão e podendo resultar em atraso no desenvolvimento ou morte do mesmo.

#### 4.2.3 Alterações Morfológicas

A avaliação de alterações morfológicas foi realizada mediante análise da porcentagem de embriões que não eclodiram ou que tiveram eclosão incompleta

ao final das 120h (Figura 11); avaliação da formação correta dos somitos; lordose; presença de edemas e anormalidades no desenvolvimento ocular.



**Figura 11: Ocorrência de má formação nos embriões expostos às soluções de metomil no decorrer do ensaio de toxicidade (24h a 120h).**

De acordo com os resultados obtidos apresentados na Figura 12, pode-se perceber que o aumento da porcentagem de alteração morfológica é diretamente proporcional ao aumento da concentração de metomil no meio. Os embriões expostos à concentração de 0,1 ng/mL não apresentaram alterações morfológicas em nenhum estágio do seu desenvolvimento. Enquanto que, os embriões expostos às concentrações de 10 a 500 ng/mL apresentaram alteração morfológica após 96h de exposição (Figura 12).



**Figura 12: Embrião exposto à concentração de 20ng/mL em 96h, com eclosão incompleta. FONTE: Acervo Pessoal de Tainá Umbelino (2020)**

Especificamente, em embriões expostos à concentração de 200 ng/mL de metomil, foi possível observar a presença de batimento cardíaco mesmo com ausência da eclosão do embrião, demonstrando que a exposição a essa concentração, pode não resultar em morte imediata do embrião, mas sim em alterações morfológicas posteriores e em prejuízos no desenvolvimento do animal.

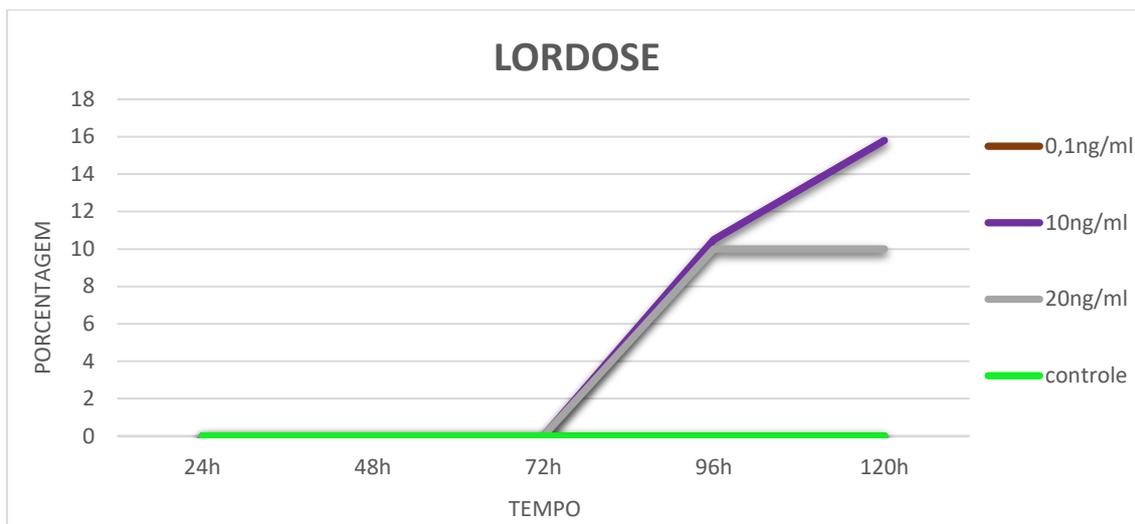
Além da eclosão incompleta, outro tipo de alteração morfológica observada foi a lordose. A lordose é caracterizada por uma alteração na coluna vertebral, que apresenta uma curvatura incompleta ou cuneiforme (CARRILLO *et al.*, 2004), como podemos observar na Figura 13. Essa alteração morfológica pode ser resultante tanto de uma resposta fisiológica à exposição a um xenobiótico quanto uma anormalidade genética, podendo também ser relacionada a deficiências nutricionais (SANCHES *et al.*, 2013).



**Figura 13: Ocorrência de lordose nos embriões expostos às soluções de 10 ng/mL de metomil após 96h de exposição.**

**FONTE:** Acervo Pessoal de Tainá Umbelino (2020)

De acordo com os resultados obtidos (Figura 12), pode-se perceber que, a lordose foi observada em embriões expostos às concentrações de 10 e 20 ng/mL, demonstrando que em concentrações superiores a 10 ng/mL, o metomil já é capaz de causar alterações morfológicas. É importante observar que, a ausência de lordose nos embriões expostos às concentrações de 200 e 500 ng/mL, possivelmente está relacionada à não eclosão ou eclosão incompleta destes embriões.



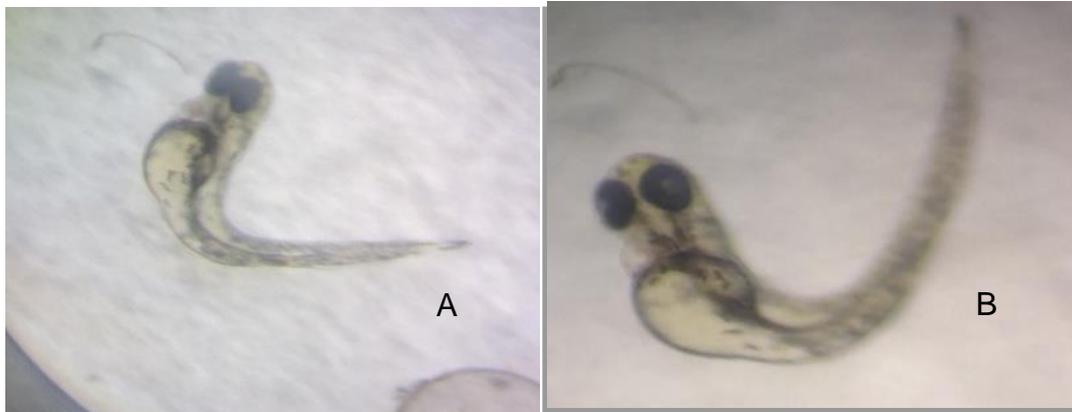
**Figura 14: Taxa de lordose de acordo com o tempo da análise.**

Em uma pesquisa realizada por Dodson *et al.* (1995), crustáceos do gênero *Daphnia* foram expostos a concentrações de 1 a 5 ppm (mg/L) do agrotóxico carbaril, resultando em alterações no seu crescimento e reprodução. Posteriormente, Villalobos *et al.* (2000) descreveu em seu estudo que, após expôr embriões de peixes da espécie *Oryzias latipes* em diferentes períodos da embriogênese e a diferentes concentrações – 10; 5; 2.5; 1.0 e 0.5 mg/L - do agrotóxico carbamato tiobencarbe, foi revelado um aumento de má formações e a presença de anormalidades nos embriões expostos à substância, incluindo anormalidades cardíacas (VILLALOBOS *et al.*, 2000).

Já em um estudo realizado por Kashiwada *et al.* (2008), embriões e larvas de *Oryzias latipes* foram expostos a concentrações de 5 e 10 mg/L do carbaril, o que acarretou em múltiplas malformações em ambos os grupos, além de uma redução considerável na taxa de sobrevivência das larvas. Lin *et al.*, (2007) descreveu em seu estudo que, embriões de *Zebrafish* expostos a concentrações de 44,66 e 7,52 µg/mL (mg/L) do agrotóxico carbaril, apresentaram efeitos cardíacos, como bradicardia e edema pericárdico, entretanto não apresentaram má formações neste órgão (LIN *et al.*, 2007).

Em contrapartida, no estudo realizado por Schock *et al.*, (2012) os embriões de *Zebrafish* foram expostos a concentrações de 20 e 40 µg/mL do inseticida carbaril. Os resultados obtidos mostraram que a ação do inseticida nos embriões acarretou em alterações morfológicas do embrião, como a diminuição

do tamanhos dos embriões expostos à substância – quando comparados ao grupo controle - e o aumento da curvatura da cauda, além de causar alterações na formação do coração (SCHOCK et al., 2012).



**Figura 15: Embriões expostos a 10 ng/mL (A) e 20 ng/mL (B) de metomil com lordose após 96h de ensaio.**

**FONTE:** Acervo Pessoal de Tainá Umbelino (2020)

Podemos perceber que, diversos demonstram a existência de toxicidade associada a agrotóxicos da classe dos carbamatos, uma vez que os mesmos são capazes de levar a danos irreversíveis no em diferentes fases do desenvolvimento de diferentes organismos expostos. Além disso, a discrepância em alguns dos resultados descritos sugere a necessidade de mais estudos voltados aos efeitos tóxicos dessas substâncias.

## 5. CONCLUSÃO

Podemos perceber pelos resultados obtidos a evidência da possibilidade de uma toxicidade associada ao metomil, uma vez que mesmo nas menores concentrações (10 e 20 ng/mL) foi possível observar a presença de alterações morfológicas, como a eclosão incompleta em embriões expostos a 20 ng/mL, a presença de lordose nas concentrações de 10 e 20 ng/mL, e também uma diminuição na taxa de eclosão, que foi proporcional ao aumento da concentração de metomil. Nas concentrações mais altas do agrotóxico (200 e 500 ng/mL) foram observadas alterações e danos ainda mais nocivos ao embrião, como pôde ser percebido pelo atraso nas eclosões dos embriões, e também no aumento considerável da mortalidade dos mesmos nessas concentrações, quando comparadas ao grupo controle e às concentrações mais baixas.

Neste sentido, os resultados demonstraram que há uma necessidade iminente da realização de estudos complementares relacionados à toxicidade decorrente da exposição aguda e crônica ao metomil, e assim, possibilitar o estabelecimento da IDA; determinar a quantidade segura para aplicação na agricultura; e estabelecer o valor máximo permitido (VMP) na água potável. Dessa forma, esses estudos poderão contribuir para o estabelecimento de políticas públicas que priorizem a utilização segura de agrotóxicos por meio da autorização de substâncias em quantidades que não ofereçam risco à saúde humana e ao meio ambiente.

Cabe ressaltar ainda, que no próprio relatório publicado pela ANVISA (2019), é relatada a importância e a necessidade da realização de estudos de toxicidade que sejam capazes de subsidiar as medidas cabíveis relacionadas à reavaliação da permissão de uso de agrotóxicos potencialmente perigosos à população e ao meio ambiente.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE JÚNIOR, O. P. de; et al. Breve revisão de métodos de determinação de resíduos do herbicida ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D). **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 223-229, 2003.

AMARANTE JUNIOR, O. P. de; et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

ANSELMO, C.S.; SARDELA, V. F.; DE SOUSA, V.P; PEREIRA, H.M.G.; ZEBRAFISH (DANIORERIO). A valuable tool for predicting the metabolism of xenobiotics in humans? **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. 212: 34-46, 2018.

ANVISA. **Índice Monográfico Metomil (M17)**. 2020

ANVISA. Monografias de Agrotóxicos. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos>. Acesso em 18 de outubro de 2020

ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Relatório das amostras analisadas no período de 2017-2018. 2019.

ASCOM ANVISA (2019). Agrotóxicos: Anvisa é contrária ao PL 6299/02 - Notícias. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2018/agrotoxicos-anvisa-e-contraria-ao-pl-6299-02>. Acesso em: 01 de novembro de 2020;

BARBOSA, A.M.C.; SOLANO, M.L.M.; UMBUZEIRO, G.A. Pesticides in drinking water – the Brazilian monitoring program. **Frontiers in Public Health**. 3: 1-10. 2015.

BOMBARDI, L.M. Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Europeia. São Paulo: FFLCH–USP, 2019.

BRIDGES, C. M. Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the southern leopardfrog (*Ranasphenoccephala*). **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 39, n. 1, p. 91-96, 2000.

BUSKE, C.; Zebrafish reserach: growing demands in South America. **Behaviour Research Blog**. Disponível em: <https://www.noldus.com/blog/zebrafish-research-south-america>. Acesso em 10 de dezembro de 2020;

CARRILLO, M.; ROMAGOSA, E. Efeito do choque térmico quente em ovos de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*): Tempo pós-fertilização e duração do processo na sobrevivência das larvas. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, 31(1): 55-64, 2004.

CASTRO, T.F.D.; SOUZA, J.G.S.; DE CARVALHO, A.F.S.; ASSIS, I.L.; PALMIERI, M.J.; VIEIRA, L.F.A.; MARCUSSI, S.; MACHADO, M.R.F.; MURGAS, L.D.S. Anxiety associated behavior and genotoxicity found in adult Danio rerio exposed to te buconazole – based comercial product. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 62: 140-146. 2018.

COSTA, A. M.; RIZZOTTO, M.L.F.; LOBATO, L. de V.C. A questão dos agrotóxicos rompe os limites da ética da preservação da saúde e da vida. **Saúde em Debate**, v.42, n.117, p. 346-353, 2018.

COUTINHO, C.I.N. Manutenção e reprodução em peixe zebra (*Danio rerio*) - Relatório final de estágio no Biotério de Organismos Aquáticos do CIIMAR. **Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar**, 2018.

DA SILVA, I. R.; XAVIER, D. M.; CEZAR-VAZ, M. R. Os impactos relacionados ao uso de agrotóxicos na saúde dos trabalhadores rurais: uma revisão sistemática. **REMEA-Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental**, v. 36, n. 3, p. 160-177, 2019.

DAMMSKI, A.P.; MULLER, B.R.; GAYA, C.;REGONATO, D. Zebrafish – Manual de Criação em Biotério. 1ª Edição, 2011.

DE LARA, S. S. *et al.*; A Agricultura do Agronegócio e sua relação com a intoxicação aguda por agrotóxicos no Brasil. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**. p.1-19; 2019.

DE MORAES, R. F.. Agrotóxicos no Brasil: Padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória. Texto para Discussão, 2019.

DE SOUZA VIEIRA, L. J. E. et al. Envenenamento por carbamato em crianças: estudo descritivo. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 17, n. 4, p. 193-199, 2012.

DODSON, S.I.; HANAZATO, T. Commentary on effects of anthropogenic and natural organic chemicals on development, swimming behavior, and reproduction of *Daphnia*, a key member of aquatic ecosystems. **Environmental health perspectives**, v. 103, n.suppl 4, p. 7-11, 1995.

DUTRA, R.M.S.; SOUZA, M.M.O. Impactos negativos do uso de agrotóxicos na saúde humana. **Revista Brasileira de Geografia Médica e Saúde**, v.13, n. 24, p.127-140, 2017.

EUROPEAN COMMISSION. **EU Pesticides Database**. Disponível em: [https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-db\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-db_en). Acesso em 20 de outubro de 2020

EUROPEAN UNION. **Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption**.1998.

GALLO, D.; MERENDINO, A.; KEIZER, J. & VITTOZZI, L. Acute toxicity of two carbamates to the guppy (*Poecilia reticulata*) and the zebrafish (*Brachydanio rerio*). **Science of the total environment**,171(1-3), p. 131-136.1995.

HANAZATO, T.Pesticides as chemical agents inducing helmet formation in *Daphnia ambigua*. **Freshwater Biology**, v. 26, n. 3, p. 419-424, 1991.

HESS; S.C. Ensaio sobre poluição e doenças no Brasil. 1ª Edição. São Paulo: Outras Expressões, 2018

IBAMA. Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos. Disponível em: <http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em 20 de outubro de 2020.

JAMHOUR, R.M.A.Q. Determination of methomyl and imidacloprid in water by adsorption on Ni-Al hydrotalcite using HPLC. **Canadian Chemical Transactions**. 2: 535-545. 2016.

KASHIWADA, S.; TATSUTA, H.; KAMESHIRO, M. (et al.) Stage-dependent differences in effects of carbaryl on population growth rate in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, 27(11), 2397-2402. 2008.

KIM, K.-H.; KABIR, E.; JAHAN, S.A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Science of the Total Environment**, v. 575, p. 525-535, 2017.

LAWRENCE, C. "The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review." **Aquaculture** 269.1-4 1-20. 2007.

LIN, C. C.; HUI, M. N.Y.; CHENG, S. H. Toxicity and cardiac effects of carbaryl in early developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 222, n. 2, p. 159-168, 2007.

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

MELLO, F. A.; et al. AGROTÓXICOS: IMPACTOS AO MEIO AMBIENTE E À SAÚDE HUMANA. In: **Colloquium Vitae. ISSN: 1984-6436**. 2019. p. 37-44.

MENG, S.L.; CHEN J.Z.; HU, C.D.; SONG, C.; FAN, L.M.; QIU, L.P.; XU, P. 2014. Effects of chronic exposure of methomyl on the antioxidant system in liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 101: 1-6. 2011.

MENG, S.L.; QIU, L.P. (et al.), Effect of methomyl on sex steroid hormone and vitellogenin levels in serum of male tilapia (*Oreochromis niloticus*) and recovery pattern. **Wiley Environmental Toxicology**. 32: p1869-1877; 2017.

**Methomyl – Chemical Structure.** Disponível em: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3966.html>. Acesso em 09 de dezembro de 2020

**METHOMYL (Compound)**. Disponível em:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methomyl#section=Structures>.

Acesso em 20 de outubro de 2020

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria MS nº 2914/2011**.2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. v.1, tomo 2.2018.

MORIYA, F.; HASHIMOTO, Y. A fatal poisoning caused by methomyl and nicotine. **Forensic science international**, v. 149, n. 2-3, p. 167-170, 2005.

OECD. nº 236. **OECD “Guidelines for the Testing of Chemicals – Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test”**. 2013.

OBA, E.T.; MARIANO, W. dos S.; SANTOS, L.R.B.dos. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, p. 226-247, 2009.

OTTE, J.C.; SCHULTZ, B.; FRUTH, D.; FABIAN, E.; VAN, B.R.; HIDDING, B.; SALINAS, E.R. Intrinsic xenobiotic metabolizing enzyme activities in early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicology Science**. 159: 86-93.2017.

PEREIRA, J.L.; GONÇALVES, F. Effects of food availability on the acute and chronic toxicity of the insecticide methomyl to *Daphnia* spp. **Science of the Total Environment** 386, 9-2. 2007.

POMPÊO, M.L.M.; CARDOSO-SILVA, S.; MOSHINI-CARLOS, V. Rede independente de monitoramento da qualidade da água de reservatórios eutrofizados: uma proposta. **Ecologia de reservatórios e interfaces**, p. 396-410, 2015.

QUEIROZ, P.R. (et al.,) Sistema de Informação de Agravos de Notificação e as intoxicações humanas por agrotóxicos no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 22, n. 0, 2019.

RIBEIRO, N.U.F.; AMÉRICO-PINHEIRO, J.H.P. Peixes como Bioindicadores de Agrotóxicos em Ambientes Aquáticos. **Revista Científica**, v.11, n.22, p.65-75, 2018.

ROCHA, M.F.; MATOS, F.S.; (et al.)Influência do inseticida Metomil sobre a população microbiana do solo.**Brazilian Journal of Development.** v. 6, n. 8, p.59307-59321aug. 2020.

SAKA, M.; TADA, N.; KAMATA, Y. Chronic toxicity of 1,3,5-triazine herbicides in the postembryonic development of the western clawed frog *Silurana latipes*. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** 147: 373-381. 2018.

SANCHES, A. L. M. et al. Lethal and sublethal toxicity of abamectin and difenoconazole (individually and in mixture) to early life stages of zebrafish. **Chemosphere**, v. 210, p. 531-538, 2018.

SANCHES, E.G.; de MELLO, G.L.; JUNIOR, H.A. Primeira ocorrência de malformação na coluna vertebral em juvenis de robalo-flecha. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 39, n. 1, p. 77-83, 2013.

SEVERO, E.S.; MARINS, A. T.; CEREZER, C.; COSTA, D.; NUNES, M.; PRESTES, O.D.(et al.). Ecological risk of pesticide contamination in a Brazilian river located near a rural area: A study of biomarkers using zebrafish embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**,v. 190, 110071. 2020.

SILVEIRA, T.R.D.; SCHNEIDER, A.C.; HAMMES, T.O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**,64(2), 4-5. 2012.

SCHOCK, E.N. (et al.). The effects of carbaryl on the development of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Zebrafish**, v. 9, n. 4, p. 169-178, 2012.

SCHOLZ, S.; FISCHER, S.; GÜNDEL, U. (et al.). The zebrafish embryo model in environmental risk assessment-applications beyond acute toxicity testing. **Environ SciPollut Res** 15, 394-404. 2008.

TAVARES, D.C.G. (et al.).Utilização de Agrotóxicos no Brasil e sua correlação com intoxicações. **Revista S&G**, v.15, n.1, p.2-10, 2020.

TODD, N. E.; VAN LEEUWEN, M.Effects of Sevin (carbaryl insecticide) on early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, n. 2, p. 267-272, 2002.

TRACHATONG, W.(et al.).Lethal and sublethal effects of a methomyl-based insecticide in *Hoplobatrachus rugulosus*. **J ToxicolPathol**, 30: 15-24. 2017.

US EPA Archive. **Registration Eligibility Decision (RED) Methomyl**. 1998.

VILLALOBOS, S. A. (et al.)Thiobencarb – induced embryotoxicity in medaka (*Oryziaslatipes*): stage- specific toxicity and the protective role ofchorion. **AquaticToxicology**, v. 48, n. 2-3, p. 309-326, 2000.

YOON, D.; KIM, S.; LEE, M.; YOON, C.; KIM, S. 1-H-NMR-based metabolomic study on toxicity of methomyl and methidathion in fish. **Journal of Environmental Science and Health, part B**. 1-9, 2016.

ZHAO, Q.; ZHU, L. Effect of humicacido in prometryn bioaccumulation and the induction of oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*). **Royal Society of Chemistry Advances**. 6: 16790-16797.2016.