



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



**ANDERSON GONÇALVES DOMINGUES**

**ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)  
PARA AVALIAÇÃO DE RISCO ASSOCIADO À EXPOSIÇÃO AOS SUBPRODUTOS  
DE DEGRADAÇÃO POR CLORO DO AGROTÓXICO FIPRONIL**

Ouro Preto – MG – Brasil  
Março, 2023

Anderson Gonçalves Domingues

Ensaio de toxicidade aguda e crônica em zebrafish (*Danio rerio*) para avaliação de risco associado à exposição aos subprodutos de degradação por cloro do agrotóxico fipronil

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.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dra. Karina T. Santos Rúbio

Coorientador: Dr. Andre Luis Corrêa de Barros.

Ouro Preto – MG – Brasil

Março, 2023

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

D671e Domingues, Anderson Goncalves.

Ensaio de toxicidade aguda e crônica em zebrafish (danio rerio) para avaliação de risco associado à exposição aos subprodutos de degradação por cloro do agrotóxico fipronil. [manuscrito] / Anderson Goncalves Domingues. - 2023.

53 f.: il.: color., tab..

Orientadora: Profa. Karina Taciana Santos Rubio Rubio.

Coorientador: Dr. Andre Luis Corrêa de Barros Barros.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Teratogênese. 2. Inseticidas. 3. Compostos de Sulfidril. 4. Histologia. I. Rubio, Karina Taciana Santos Rubio. II. Barros, Andre Luis Corrêa de Barros. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 615.9

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



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Anderson Gonçalves Domingues**

**Ensaio de toxicidade crônica e aguda em Zebrafish (*Danio rerio*) para avaliação de risco associado à exposição aos subprodutos de degradação por cloro do agrotóxico fipronil**

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

Aprovada em 30 de março de 2023

### Membros da banca

Dr<sup>a</sup>. Karina Taciana Santos Rubio - Orientador(a) Universidade Federal de Ouro Preto  
Dra. Mônica Cristina Teixeira - Universidade Federal de Ouro Preto  
Mestranda Mariana Laiz Silva de Lima - PROAMB - Universidade Federal de Ouro Preto

Dr<sup>a</sup>. Karina Taciana Santos Rubio, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 30 de abril de 2023



Documento assinado eletronicamente por **Karina Taciana Santos Rubio, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 07/11/2023, às 09:56, 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 **0620308** e o código CRC **691E3DD0**.

*O mal que os homens praticam sobrevive  
a eles; o bem quase sempre é sepultado  
com eles.*

*William Shakespeare*

## **AGRADECIMENTO**

Esse definitivamente foi o trabalho mais difícil que realizei durante a minha graduação, não apenas pela questão da parte prática do trabalho, mas sim pelas experiências que enfrentei e meus desvaneios que tive durante a realização do mesmo.

Sou muito grato por estar finalizando essa etapa com amigos tão competentes ao meu lado, agradeço à minha orientadora Karina, que é uma mulher, pesquisadora e professora incrível, obrigado pelo apoio, pelos conselhos diários e por acreditar em mim e sempre comprar minhas ideias, por mais banais que fossem. Gostaria de agradecer também ao meu coorientador, que sempre estará nos meus pensamentos, pelas conversas sempre repletas de conhecimento e pelo entusiasmo de sempre me ajudar e sempre se certificando em relação ao meu bem estar. Agradeço à equipe do laboratório que sempre me ajudou nos desafios e pelas conversas durante o dia a dia no laboratório.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Dimorfismo sexual. A fêmea (à direita) é maior e mais robusta, enquanto o macho (à esquerda) é menor e mais delgado.....	14
Figura 2 - Comparação do gasto de manutenção do modelo zebrafish com o modelo murinho.....	15
Figura 3 - Comparação da arquitetura hepática de zebrafish e de humanos. Anatomia celular e arquitetura do fígado em (A – dentro) corte histológico fígado de zebrafish adulto corado com H&E e (B) humano.....	16
Figura 4 - Fórmula estrutural do agrotóxico fipronil.....	17
Figura 5 - Dados da análise por ESI-HRMS dos subprodutos formados pela cloração do fipronil. ....	19
Figura 6 - Escala de cores para determinação de Nitrito, Oxigênio Dissolvido e Amônia Tóxica. ....	23
Figura 7 - Processo de eutanásia no zebrafish.....	24
Figura 8 - Delineamento do experimento para análise dos embriões de zebrafish sobre exposição às soluções testes e controles.....	27
Figura 9 - Organização dos grupos expostos as soluções de controle e teste.....	28
Figura 10 - Avaliação da alteração de massa corporal entre os grupos tratados e não tratados com diferentes soluções de fipronil por período de 28 dias.....	33
Figura 11 - Avaliação da alteração de massa corporal entre os grupos tratados e não tratados com diferentes soluções de fipronil por período de 60 dias .....	34
Figura 12 - Comparação da alteração de massa corporal entre os grupos tratados e não tratados com diferentes soluções de fipronil nos períodos de 28 e 60 dias .....	35
Figura 13 - Análise histológica para presença de Esteatose entre os grupos 28 e 60 dpe.....	37
Figura 14 - Análise histológica para presença de Núcleo Picnótico entre os grupos 28 e 60 dpe .....	37
Figura 15 - Efeito das diferentes soluções sobre a concentração de grupamentos sulfidrilas no fígado do zebrafish após 28 e 60 dias de exposição .....	39
Figura 16: Fotodocumentação dos peixes adultos expostos às soluções de fipronil padrão e íntegro; a) água pura, b) água clorada; c) fipronil padrão íntegro 50ppb; d) fipronil padrão clorado 50ppb; e) fipronil comercial íntegro 50ppb; f) fipronil comercial clorado 10ppb; g) fipronil comercial clorado 50ppb; h) fipronil comercial clorado 100ppb.....	40

Figura 17: Comparação entre o desenvolvimento de um embrião normal exposto à Fipronil Íntegro 50 ppb sem tratamento sobre alterações morfológicas observados nos estágios correspondentes sobre a mesma dosagem. Embrião zebrafish de 24hpf em (A) demonstrando somitos bom desenvolvidos (seta vermelha), em contraste (D) apresenta embrião coagulado após 24hpf. Embrião com 48hpf (B) apresentando início da pigmentação (seta verde), batimento cardíaco e desenvolvimento normal, em contraste (E) apresenta-se um embrião com defasagem de desenvolvimento de pigmentação após 48hpf (seta preta). Embrião eclodido após 72hpf (C). Embrião após eclosão apresentando edema no saco vitelínico (seta azul) e pigmentação normal de acordo com o desenvolvimento de 72hpf..... 42

## RESUMO

O tratamento de água no Brasil sempre teve uma grande importância, aumentando gradativamente devido aos níveis de poluição estarem cada vez mais significativos, podendo causar desequilíbrios graves na biota. Para que se obtenha um tratamento da água adequado, o sistema foi dividido em várias etapas, com o objetivo de desinfecção, clarificação e purificação da água. A etapa de cloração, que será maior evidenciada no estudo, consiste em utilizar produtos químicos à base de cloro, com o objetivo de inativar os micro organismos patogênicos existentes na água, porém a presença de agrotóxicos, por exemplo, pode gerar subprodutos de desinfecção quando em contato com o cloro. O objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade dos subprodutos formados por cloração do agrotóxico fipronil utilizando como organismo teste o *zebrafish* (*Danio rerio*), por meio da exposição desta espécie a diferentes concentrações de fipronil, em testes agudos (140 horas) realizado em embriões do peixe, e crônico (28 e 60 dias) realizado com peixes adultos. No ensaio agudo foram utilizadas as seguintes concentrações do agrotóxico: 10ppb (parte por bilhão), 25ppb, 50ppb e 100ppb. Os parâmetros avaliados foram modificações e desenvolvimento anormal, utilizados como indicadores de teratogênese. Nesse ensaio não foi observada toxicidade do agrotóxico fipronil, visto que não foi observada a ocorrência de nenhuma anomalia com diferença estatística significativa. Durante o tratamento crônico as concentrações utilizadas foram: 10ppb, 50ppb e 100ppb. Os animais adultos foram subdivididos em 8 grupos contendo, controle água pura e água clorada TTO (tratamento), fipronil íntegro (TTO) 50ppb, fipronil íntegro sem tratamento sTTO (sem tratamento) 50ppb, fipronil comercial clorado (TTO) nas concentrações 10ppb, 50ppb e 100ppb e fipronil comercial (sTTO) 50ppb. No ensaio crônico foram avaliados a massa corporal, histologia do fígado, e a expressão de grupos sulfidrilas dos peixes adultos com o objetivo de analisar um possível estresse oxidativo causado pelos produtos clorados analisados. Nesse ensaio foi observado que os subprodutos clorados do agrotóxico fipronil são mais tóxicos ao animal testado comparado ao fipronil íntegro. A partir das análises de massa corporal, análise morfológica macroscópica, análise histológica e análise de dosagem de sulfidrilas totais foi possível evidenciar uma maior toxicidade dos subprodutos clorados do agrotóxico fipronil no modelo animal estudado, porém sobre os resultados demonstrado na análise de toxicidade aguda não foi evidenciado toxicidade dos subprodutos clorados estudados.

Palavras chave: Inseticida. Histologia. Grupo sulfidrilas. Teratogênese.

## ABSTRACT

Water treatment in Brazil has always been of great importance, as pollution levels are gradually increasing, which can cause serious imbalances in the biota. To achieve adequate water treatment, the system has been divided into several stages, with the aim of disinfection, clarification, and purification of the water. The chlorination stage, which will be highlighted in this study, consists of using chlorine-based chemical products to inactivate pathogenic microorganisms present in the water, but the presence of pesticides, for example, can generate disinfection byproducts when in contact with chlorine. The objective of this work was to evaluate the toxicity of the byproducts formed by chlorination of the pesticide fipronil using the zebrafish (*Danio rerio*) as a test organism, through exposure of this species to different concentrations of fipronil in acute (140 hours) and chronic (28 and 60 days) tests conducted with fish embryos and adult fish, respectively. In the acute assay, the following pesticide concentrations were used: 10ppb (parts per billion), 25ppb, 50ppb, and 100ppb. The parameters evaluated were modifications and abnormal development, used as indicators of teratogenesis. In this assay, no toxicity of the fipronil pesticide was observed, as no statistically significant anomalies were observed. During the chronic treatment, the concentrations used were: 10ppb, 50ppb, and 100ppb. The adult animals were subdivided into 8 groups containing pure water control and TTO chlorinated water treatment, intact fipronil (TTO) 50ppb, intact fipronil without treatment (sTTO) 50ppb, chlorinated commercial fipronil (TTO) at concentrations of 10ppb, 50ppb, and 100ppb, and commercial fipronil (sTTO) 50ppb. In the chronic assay, body mass, liver histology, and the expression of sulfhydryl groups in adult fish were evaluated to analyze a possible oxidative stress caused by the analyzed chlorinated products. In this assay, it was observed that the chlorinated byproducts of the fipronil pesticide are more toxic to the tested animal compared to intact fipronil. From the analysis of body mass, macroscopic morphological analysis, histological analysis, and analysis of total sulfhydryl levels, it was possible to demonstrate a greater toxicity of the chlorinated byproducts of the fipronil pesticide in the animal model studied, but no toxicity of the chlorinated byproducts was observed in the acute toxicity analysis.

.Keywords: Insecticide. Histology. SulpHydryl Group. Teratogenesis.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1 Impacto dos agrotóxicos no Brasil</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2 Mercado do Agronegócio Brasileiro</b> .....	<b>12</b>
<b>1.3 Regulamentação de agrotóxicos no Brasil</b> .....	<b>12</b>
<b>1.4 Modelo animal: <i>zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>)</b> .....	<b>13</b>
<b>1.5 Fipronil</b> .....	<b>16</b>
<b>1.6 Ensaio técnico</b> .....	<b>19</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>19</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1 Objetivos específicos</b> .....	<b>20</b>
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>21</b>
<b>4.1 Reagentes e solventes</b> .....	<b>21</b>
<b>4.2 Preparo das soluções de subprodutos do agrotóxico fipronil para exposição do <i>zebrafish</i></b> .....	<b>21</b>
<b>4.3 Teste de toxicidade crônica em <i>zebrafish</i></b> .....	<b>22</b>
<b>4.4 Eutanásia</b> .....	<b>23</b>
<b>4.5 Análise histológica</b> .....	<b>24</b>
<b>4.6 Análise dos níveis dos grupos sulfidrilas</b> .....	<b>24</b>
<b>4.7 Análise toxicidade aguda em embriões</b> .....	<b>26</b>
<b>4.8 Fotodocumentação do ensaio crônico</b> .....	<b>31</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>32</b>
<b>5.1 Análise de massa corporal</b> .....	<b>32</b>
<b>5.2 Análise Histológica</b> .....	<b>35</b>
<b>5.2.1 Análise histológica para presença de núcleo picnótico e esteatose hepática entre os grupos 28 dpe e 60 dpe</b> .....	<b>35</b>
<b>5.3 Análise de dosagem de sulfidrilas totais</b> .....	<b>37</b>
<b>5.4 Fotodocumentação do ensaio crônico</b> .....	<b>39</b>
<b>5.5 Análise toxicidade aguda em embriões</b> .....	<b>40</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>46</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Impacto dos agrotóxicos no Brasil

A crise hídrica que ameaça a sobrevivência da população mundial decorre de diferentes processos e progressivas mudanças socioeconômicas, políticas e ambientais, tais como alterações climáticas e no ciclo hidrológico; crescente demanda industrial, agrícola e doméstica; aumento de substâncias químicas utilizadas para tentar suprir a demanda prevista e para obtenção de lucros, e conseqüentemente deterioração da qualidade das águas; ineficiência de fiscalização e desarticulação no gerenciamento dos recursos hídricos por setores públicos e privados (TUNDISI, 2008). De acordo com a UNESCO, atualmente 20 países estão em situação de escassez crônica de água potável e estima-se que 25% da população mundial estará nessa situação crítica em 2050. Embora 75% da superfície do planeta seja coberta por água, o volume de água doce corresponde a apenas 3%, dos quais somente cerca de 0,3% encontra-se em mananciais superficiais, enquanto cerca de 30% está no subsolo e cerca de 70% em geleiras (AUGUSTO, *et al.*, 2012).

Como foi ressaltado, a crise hídrica é uma realidade que deve ser levada em consideração, principalmente visto o crescimento exponencial da população no planeta. Ainda assim, todo ano são liberadas novas substâncias que podem agravar ainda mais a situação, poluindo os mananciais que são essenciais para a sobrevivência dos animais, incluindo o ser humano. A presença de microcontaminantes orgânicos no ambiente pode resultar em desequilíbrios graves na biota (AMÉRICO *et al.*, 2012; BAQUERO; MARÍNEZ; CANTÓN, 2008; FARRÉ; KANTIANI; BARCELÓ, 2008; BILA; DEZOTTI, 2007). Essas substâncias podem atingir os sistemas de abastecimento público contribuindo para o aumento do risco à saúde humana. Esses compostos são dificilmente removidos nos processos envolvidos no tratamento da água bruta e, quando degradados na etapa de desinfecção por cloração, podem gerar subprodutos ainda mais tóxicos.

Os lençóis freáticos são a maior fonte de água doce no mundo (aproximadamente 97% da água disponível na terra). Apesar da sua localização, a atividade antropogênica ameaça sua qualidade química e a estabilidade de ecossistemas aquáticos uma vez que muitos contaminantes podem atingir os aquíferos. Tal fato torna a poluição ambiental um dos temas prioritários em todo o mundo (REGALDO *et al.*, 2018; JURADO; WALTHER; DÍAZ-CRUZ, 2019).

No Brasil, os agrotóxicos merecem atenção especial com relação à sua presença em corpos d'água. A produção de alimentos no país tem se tornado cada vez mais importante para o balanço comercial e, por isso, a produtividade elevada a qualquer custo tem nos colocado como o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, mesmo não possuindo a maior área cultivada (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016; BOMBARDI, 2017). Além disso, o Brasil continua permitindo a utilização de princípios ativos comprovadamente perigosos e já proibidos em países desenvolvidos (IBAMA, 2014, 2016). Por serem comumente detectados em água, eles se tornaram alvo de avaliações em sistemas de desinfecção. Diferentes classes de agrotóxicos como carbamatos, organoclorados, organofosforados, pirazóis, piretróides, entre outras, têm demonstrado de moderada a alta reatividade ao cloro livre e, portanto, podem representar possíveis precursores de subprodutos de desinfecção (DPBs – em inglês: *desinfection by products*) (CHAMBERLAIN *et al.*, 2012).

As estações de tratamento de água são pontos críticos para a liberação de micropoluentes orgânicos e materiais biológicos também conhecidos como contaminantes de preocupação emergente (CECs). Embora os CECs químicos sejam liberados na água superficial em concentrações extremamente baixas (ng/L – µg/L), eles podem acumular no ambiente aquático resultando em graves e imprevisíveis efeitos tóxicos de caráter crônico. O tratamento empregado normalmente em tais estações para promover a desinfecção da água é a cloração. Tal processo não remove os CECs e pode levar ainda à formação de subprodutos de degradação com maior potencial tóxico e maior persistência no ambiente que o produto original (CERRETA *et al.*, 2019).

Os efeitos derivados da ação de agrotóxicos e seus subprodutos podem ser diversos, tais como reação direta com o DNA nuclear, incorporação no DNA durante a replicação celular, interferência na divisão celular mitótica ou meiótica, decorrendo em divisões incorretas da célula (VEIGA, 1995; FERNADES, 2005).

Em trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa, o agrotóxico fipronil foi submetido à cloração e 4 de seus subprodutos foram identificados por espectrometria de massas. Considerando os resultados obtidos juntamente com o fato de ocorrer uma exposição crônica a estes subprodutos, foi idealizada para o presente trabalho a realização de um ensaio crônico para a avaliação da toxicidade dos subprodutos gerados a partir da etapa de desinfecção por cloração.

## **1.2 Mercado do Agronegócio Brasileiro**

O atual conceito de agronegócio evoluiu e se firmou no Brasil a partir de outros termos. Historicamente, o conceito de complexo rural foi utilizado para designar o conjunto de atividades desenvolvidas nas fazendas coloniais, que produziam, além das mercadorias agrícolas para consumo interno e exportação, manufaturas, instrumentos simples para produção, transporte e moradia. Após a II Guerra Mundial a agricultura brasileira entrou num processo de transformações chamado de modernização agrícola (CORSO *et al.*, 2003).

A importância econômica do mercado de agrotóxicos é evidente: de acordo com a CEPEA/USP (Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada) apenas em 2022 o PIB do agronegócio cresceu 23,11% frente ao ano anterior, sendo que o setor agrícola cresceu. Esse crescimento abrupto do PIB do agronegócio, não apenas em 2022, se deve à expansão da oferta e, por outro lado, ao intenso avanço dos preços agropecuários reais resultado dos aumentos expressivos na demanda, tanto externa quanto doméstica, e do alto patamar da taxa de câmbio (Cepea/USP).

De acordo com o Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA), órgão vinculado a Universidade de São Paulo (USP), o setor de agronegócio brasileiro corresponde por cerca de 21,2% do Produto Interno Bruto (PIB). A agricultura familiar é a base da economia de 90% dos municípios da federação brasileira, com até 20 mil habitantes. Além disso é responsável pela renda de cerca de 40% da população economicamente ativa do País e por mais de 70% dos brasileiros ocupados no campo (CENSO AGROPECUÁRIO, 2017).

## **1.3 Regulamentação de agrotóxicos no Brasil**

De acordo com a Portaria GM/MS Nº 888, 4 de maio de 2021 – que altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação Nº 5 do Ministério da Saúde de 03 de outubro de 2017 – estabelece procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano, como também seu padrão de potabilidade, incluindo os valores permitidos para substâncias químicas que possam representar um risco à saúde, como por exemplo os agrotóxicos. Entretanto, o que se observa é que pouquíssimos agrotóxicos têm seu Valor Máximo Permitido (VMP) estabelecido na Portaria, apenas 40 (entre metabólitos e

agrotóxicos) frente a 497 ingredientes ativos de agrotóxicos de uso permitido segundo a ANVISA (2021).

A portaria Normativa nº 139, de 21 de dezembro de 1994, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), embasado no Decreto nº 98.816/90, classificou os agrotóxicos em circulação levando em consideração o seu potencial de periculosidade ambiental (PPA), levando em consideração as seguintes variáveis: bioacumulação, persistência, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, carcinogênico e teratogênico. Os agrotóxicos foram subdivididos então em classe I, II, III e IV, definidos como altamente perigoso, muito perigoso, perigoso, e pouco perigoso, respectivamente (COMPÊNDIO, 1996).

Na portaria 03 de 16 de janeiro de 1992, refere-se à autorização e renovação de registros e extensão de uso de agrotóxicos e afins no Brasil (DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, 1991). Essa portaria é responsável pela classificação dos agrotóxicos em função da sua utilização, levando em consideração, modo de ação e potencial ecotoxicológico, tanto para o homem como para os demais organismos vivos, eventualmente, expostos a esses produtos.

#### **1.4 Modelo animal: zebrafish (*Danio rerio*)**

Os peixes são os animais mais utilizados como bioindicadores em ensaio ecotoxicológicos (AMÉRICO P., et. al. 2021). São considerados ótimos organismos-teste para o monitoramento de ambientes aquáticos, devido às diferentes respostas às contaminações; como mudanças na taxa de crescimento e na maturação sexual (RAMELOW *et al.*, 1989; SCHULZ; MARTINS-JUNIOR, 2001). O interesse sobre os efeitos provocados por substâncias tóxicas na saúde dos peixes tem aumentado, pois atividades agrícolas geram muitos resíduos que, ao atingirem as bacias hidrográficas, expõem estes animais a altas concentrações de substâncias tóxicas (PARMA DE CROUX *et al.*, 2002). Os ensaios de toxicidade com organismos de água doce têm como objetivo avaliar os possíveis impactos de agentes físicos, químicos e biológicos sobre as comunidades biológicas deste ambiente. Os ensaios com peixes podem ter caráter agudo (que têm na letalidade seu principal desfecho) e crônico (que avaliam efeitos sobre as funções biológicas fundamentais) e podem também estar associados à análise de comportamento e avaliação da toxicidade genética (COSTA *et al.*, 2008).

O *Danio rerio*, conhecido como *zebrafish* é popularmente conhecido como paulistinha pelos brasileiros. O *zebrafish* é um teleosteo tropical de água doce. Seu habitat natural é o sul

da Ásia, nas bacias dos rios Ganges e Brahmaputra, região nordeste da Índia, Bangladesh, Nepal e norte de Mianmar (SPENCE et al., 2006). Esta região é caracterizada pelo clima tropical, com estações secas e chuvosas bem definidas, podendo ter variações de temperatura, que varia de 25 a 30°C, fatores climáticos que são importantes na adaptação e reprodução desta espécie. O *zebrafish* tem sido identificado em uma ampla variedade de tipos de habitat nessa região, incluindo diques de irrigações, plantações de arroz, lagoas feitas pelo homem, cursos superiores de rios e até mesmo correntezas rápidas (MENON, 1999; DANIELS, 2002; BHAT, 2003 *apud* LAWRENCE, 2007).

Em relação ao desenvolvimento do *zebrafish*, 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 (FIG. 1), o que facilita a sua identificação (DAMMSKI *et al.*, 2011).

Figura 1 - 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

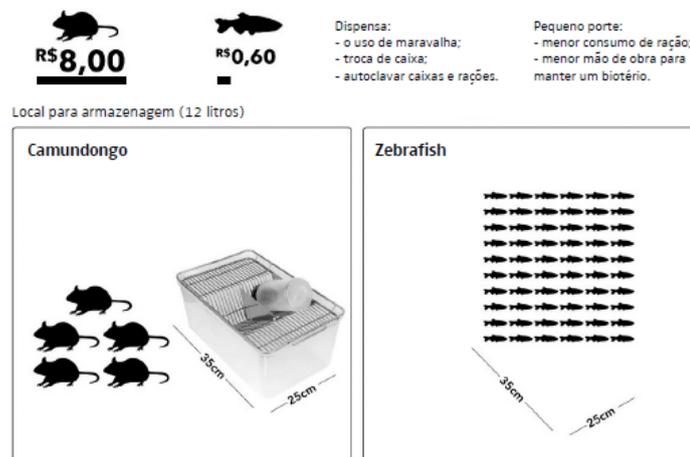
Esses peixes são animais onívoros, possuem um longo intestino com uma grande área de absorção, não apresentando estômago (ULLOA *et al.*, 2011). Possuem uma dieta variada de organismos vivos, como paramécios, rotíferos e artêmias que nadam ativamente na água, proporcionando ao peixe um estímulo de caça ideal e também um alto teor de proteína (DAMMSKI *et al.*, 2001).

Os *zebrafish* são animais ovíparos, ou seja, a fertilização e o desenvolvimento são externos. As fêmeas desovam várias vezes durante o dia e não praticam cuidado parental, visto que os ovos são espalhados pela água, porém a reprodução ocorre em pequenos grupos

(BREder; ROSEN, 1966 *apud* LAWRENCE, 2007). Sua maturidade sexual é atingida por volta de 10-12 semanas de vida (SUWA; YAMASHITA, 2007 *apud* GODOY, 2021).

A utilização do *zebrafish* como modelo animal experimental tem crescido abruptamente para a pesquisa toxicológica, devido a algumas vantagens biológicas, como por exemplo, homologia genética, anatômica e fisiológica aos mamíferos, ocorrência de fertilização externa, elevado número de progênies, transparência das larvas e rápido desenvolvimento facilitam as abordagens fenotípicas em larga escala (CORNET; DI DONATO; TERRIENTE, 2018) e também por ser mais prático, eficiente e barato que os roedores (FIG. 3), possibilita a otimização do tempo do experimento em meses, o que poderia levar anos para ser realizado com modelos murinos. (ZORZETTO; GUIMARÃES, 2013).

Figura 2 - Comparação do gasto de manutenção do modelo zebrafish com o modelo murinho

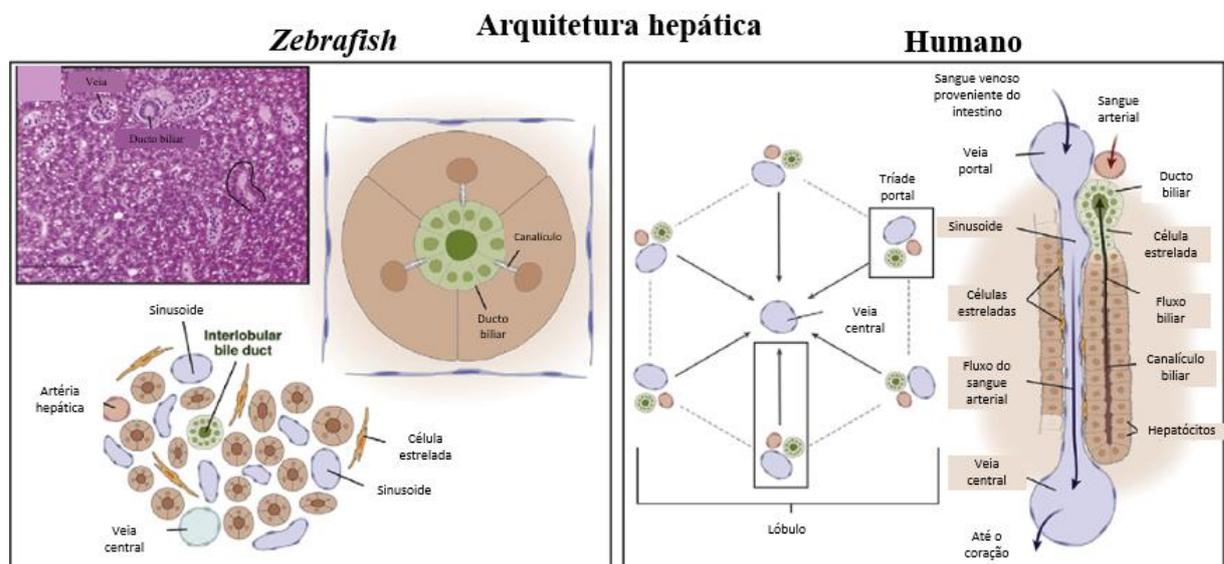


Em 2013, foi publicada na revista Nature, por Howe *et al.* (2013) a sequência do genoma do zebrafish, revelando que esse peixe possui 12.719 genes em comum ao ser humano, ou seja, 70% dos genes humanos são encontrados no *Danio rerio*. Sendo assim é possível analisarmos o desenvolvimento de doenças genéticas, visando à cura dessas patologias, como depressão, mal de Parkinson e esquizofrenia. Também foram analisadas semelhanças em relação à morfologia e fisiologia desses peixes ao ser humano, como por exemplo: fibras musculares, sistema esquelético complexo, sistema nervoso central, células hematopoiéticas múltiplas (eritrócitos, linfócitos B e T etc.) e sistema cardiovascular (LIESCHKE; CURRIE, 2007).

O fígado do *zebrafish* é responsável por múltiplas funções metabólicas que são semelhantes às dos mamíferos, onde podemos destacar, o processamento e armazenamento de

nutrientes, síntese de enzimas e cofatores. Sua organização se dá em 3 lobos contíguos, sendo 2 laterais e 1 ventral, posicionados no eixo dorso ventral, levemente na lateral do intestino e a outros órgãos do sistema gastrointestinal (GOESSLING; SADLER, 2015). Diferente dos mamíferos, os lobos do fígado do *zebrafish* não possuem pedículo os separando-os (FIG. 2). Os hepatócitos estão arranjados em forma de cordões, onde apresentam um padrão de organização mais ou menos cilíndrica, sendo encontrado pequenos ductos biliares (GOESSLING; SADLER, 2015).

Figura 3 - Comparação da arquitetura hepática de zebrafish e de humanos. Anatomia celular e arquitetura do fígado em (A – dentro) corte histológico fígado de zebrafish adulto corado com H&E e (B) humano.

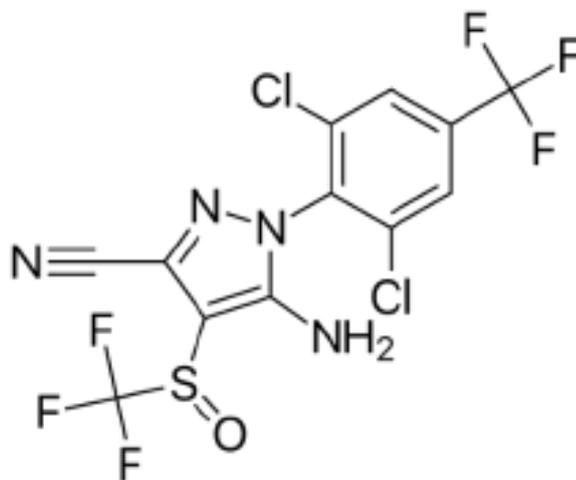


Fonte: Traduzido Goesslig e Sadler, 2015

## 1.5 Fipronil

O fipronil (FIG.4), (5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-[(1R,S)-(trifluoromethyl)sulfinyl]-1H-pyrazole-3-carbonitrile), é um inseticida da classe dos fenilpirazóis de fórmula molecular  $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$ , massa molar 437,15 g/mol e solubilidade em água de aproximadamente 2,0 mg/L (20°C) (LILIA, 2003).

Figura 4 - Fórmula estrutural do agrotóxico fipronil.



Fonte: Lu *et al.*, 2015

Em um estudo publicado por Albuquerque *et al.*, (2016) este agrotóxico fipronil foi identificado como o segundo pesticida mais presente em termos de amostras positivas analisadas com concentrações acima dos limites de quantificação do método analítico empregado. Possui solubilidade em água de aproximadamente 2,0 mg/L (LILIA, 2003). O fipronil apresenta amplo espectro de atividade e é utilizado no controle de formigas, besouros, baratas, pulgas, carrapatos, cupins, grilos-toupeira, minhocas e outros insetos no ambiente rural e doméstico. Como insetos normalmente sensíveis aos carbamatos, organofosforados e piretróides são sensíveis ao fipronil, ele se tornou um pesticida amplamente utilizado (SANTOS, *et al.* 2023).

Seu mecanismo de ação está associado ao bloqueio não competitivo do receptor GABA no sistema nervoso central. A seletividade do mesmo está vinculada ao fato de ele apresentar menor afinidade pelo receptor GABA de mamíferos quando comparada à dos receptores de insetos (HAINZL; COLE; CASIDA, 1998). Em relação à toxicidade do composto íntegro, outras alterações observadas estão associadas ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio que induzem danos no fígado, rins, tireóide e cérebro (VERMA; MEHTA; SRIVASTAVA; 2007; EL-GENDRY *et al.*, 2010). Sintomas vinculados à toxicidade aguda (primariamente relacionados a alterações no receptor de GABA) e à toxicidade crônica (primariamente vinculados à danos teciduais) são amplamente discutidos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012; KI *et al.*, 2012; MOSSA *et al.*, 2015; MONTEIRO *et al.*, 2019).

Uma vez que o cloro é um potente oxidante químico de matéria orgânica dissolvida e contaminantes antropogênicos presentes em águas naturais, a preocupação com a formação de

tais moléculas também se tornou uma preocupação desde o início dos anos 70 (BELLAR, LICHTENBERG; KRONER, 1974; ROOK, 1977; LOPER, 1980; KRZEMINSKI *et al.*, 2019). Dentre as centenas de subprodutos de degradação por cloração que já foram identificados, podemos perceber que aproximadamente 80% (em relação à frequência e concentração) são representados por trihalometanos (THMs) e ácidos haloacéticos (AHAs) (GRÜNWARD *et al.*, 2002).

Além dos esforços empregados na identificação desses compostos gerados nos processos de desinfecção, diversos estudos têm sido desenvolvidos para a avaliação de seu potencial tóxico. Nas últimas décadas, vários estudos têm sugerido a alta probabilidade de desenvolvimento de câncer de fígado, bexiga, cólon e reto na exposição a algumas dessas substâncias. Além disso, muitos ensaios biológicos *in vitro* para a avaliação de estrogenicidade, mutagenicidade, toxicidade aguda envolvendo *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri*, inibição enzimática entre outros, têm sido utilizados para mensurar o potencial tóxico dos mais diversos subprodutos clorados (KOMULAINEN, 2004; LEE *et al.*, 2004; ABBAS *et al.*, 2015).

Muitos compostos após o processo de cloração têm demonstrado, em ensaios *in vitro*, possuir maior potencial tóxico que seus precursores (ONODERA; HIROSE; ISHIKURA; 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2010; EMIN, OZCAN, BEDUK, 2011; BOURGIN *et al.*, 2013; TAWK *et al.*, 2015). O aumento da preocupação com os níveis desses compostos presentes em água converge com a crescente discussão no que diz respeito às legislações para padrões de potabilização em inúmeros países. Nos Estados Unidos, a USEPA estabeleceu que as concessionárias devessem cumprir os níveis máximos dos THMs e AHAs em 80 e 60 µg/L, respectivamente (U.S.EPA, 2010). Os padrões de THMs estabelecidos em outros países são: 100 µg/L para o Reino Unido e Irlanda, 10 µg/L para Alemanha e 1 µg/L para Holanda. No Brasil, a Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011, estabeleceu limites de 100 e 80 µg/L para os THMs e AHAs (BRASIL, 2011).

Dados relacionados à degradação do fipronil por cloração incluindo a identificação por espectroscopia de massas de alta resolução dos subprodutos formados e ensaios de toxicidade aguda foram obtidos em um trabalho prévio com artigo aceito do nosso grupo de pesquisa (FIG. 5).

Figura 5 - Dados da análise por ESI-HRMS dos subprodutos formados pela cloração do fipronil.

Composto	Fórmula Molecular	Massa monoisotópica exata	Tempo de retenção	ESI no modo negativo			
				m/z teórico	m/z experimental	Erro (ppm)	DBE
<b>Fipronil</b>	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> N <sub>4</sub> C <sub>12</sub> F <sub>6</sub> S	435,93870	7,72	434,93143	434,93109	- 0,34	9,5
<b>DBP-F1</b>	C <sub>12</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub> N <sub>4</sub> C <sub>13</sub> F <sub>6</sub> S	469,89973	8,01	468,89136	468,89218	0,82	9,5
<b>DBP-F2</b>	C <sub>12</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> N <sub>4</sub> C <sub>13</sub> F <sub>6</sub> S	485,89465	7,67	484,88627	484,88714	0,87	9,5
<b>DPB-F3</b>	C <sub>11</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> N <sub>4</sub> C <sub>13</sub> F <sub>3</sub> S	433,90218	7,12	432,89380	432,89444	0,64	9,5
<b>DBP F4</b>	C <sub>11</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> N <sub>3</sub> C <sub>12</sub> F <sub>3</sub>	320,96883	7,13	319,95998	319,96090	- 0,31	9,5
<b>DBP F5</b>	C <sub>9</sub> H <sub>4</sub> N <sub>3</sub> C <sub>12</sub> F <sub>3</sub>	280,97344	7,72	279,96506	279,96593	0,87	7,5
<b>DBP F6</b>	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> N <sub>3</sub> C <sub>12</sub> F <sub>3</sub>	228,96729	7,87	227,95892	227,95949	0,57	4,5

Fonte: Barros, 2021

## 2 JUSTIFICATIVA

A disponibilidade hídrica para fins potáveis tem sido um dos principais pontos de discussão entre as comunidades científicas e órgãos internacionais. Essa questão encontra-se atrelada à pequena quantidade de recursos hídricos disponíveis para fins potáveis, ao atual panorama tecnológico e de custo no que diz respeito ao acesso e a tratabilidade da água e ao acelerado processo de degradação dos recursos naturais que nos levam a uma segunda grande preocupação: a qualidade da água (RAMOS, 2021).

Paradoxalmente, as fontes potenciais de abastecimento público são utilizadas também como receptoras de esgotos domésticos, efluentes industriais e hospitalares, resíduos da agricultura, entre outros. Associado a este cenário, o crescimento demográfico acelerado, a intensificação das atividades industriais e do agronegócio e a falta de políticas públicas para a mitigação dos impactos causados pela ação antropogênica, têm causado um crescente aumento dos níveis de contaminação dos mananciais por substâncias químicas danosas e/ou potencialmente perigosas a saúde humana e ao meio ambiente (SILVA, 2021).

As etapas envolvendo sistemas convencionais de tratamento de água (pré-filtração, coagulação, floculação, decantação e desinfecção) dificilmente garantem a remoção completa

desses contaminantes orgânicos. Além disso, o processo de desinfecção por cloração pode levar a formação de subprodutos que podem ser potencialmente mais tóxicos e mais persistentes no meio ambiente que o composto original. Dessa forma, a ampliação do conhecimento na área pode auxiliar no desenvolvimento e adoção de novas políticas de proteção e monitoramento da qualidade dos mananciais e da água tratada. Nas últimas décadas, muitos desses subprodutos têm sido identificados, embora poucos deles tenham sido profundamente avaliados quanto ao potencial tóxico (Richardson et al., 2007; Sharma, Zboril e McDonald, 2014).

Assim, este projeto visa caracterizar as alterações vinculadas à toxicidade crônica de subprodutos de degradação formados por cloração do agrotóxico fipronil em modelo animal *zebrafish*. Esta substância apresenta índices significativos de identificação em corpos d'água superficiais brasileiros, além de mecanismo de ação relevante no que diz respeito à possibilidade de intoxicação em humanos.

### **3 OBJETIVOS**

Avaliar a toxicidade aguda e crônica do agrotóxico fipronil e seus subprodutos de degradação formados após cloração no modelo animal *zebrafish*.

#### **3.1 Objetivos específicos**

- Manutenção do biotério do modelo animal *zebrafish* no Laboratório de Toxicologia – Escola de Farmácia /UFOP;
- Análise do agrotóxico fipronil juntamente com seus subprodutos expostos aos animais controle e teste, para observações sobre a toxicidade aguda, crônica e estresse oxidativo.
- Processar os tecidos eutanasiados dos animais expostos para análise histológica e estresse oxidativo.
- Analisar estatisticamente as lesões observados nos tecidos processados e discutir a toxicidades crônica e aguda observada. Correlacionar os achados com demais dados publicados na literatura sobre o agrotóxico em questão.

## 4 METODOLOGIA

O protocolo de experimentação aplicado foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFOP protocolo nº 5632111120, em 20/11/2020. Para tal, foram utilizados 90 peixes da espécie *Danio rerio* (*zebrafish*), subdivididos em 8 grupos experimentais.

### 4.1 Reagentes e solventes

Água ultrapura (Milli-Q); Água Safe (Tetra); Azul de Metileno (Quimibrás, LTDA); Bicarbonato de Sódio (Synth); Cloreto de Cálcio Anidro (Dinâmica); Cloreto de Potássio (Dinâmica); Fosfato Potássio Monobásico (Cinética química Ltda); Fosfato Potássio dibásico (Carlo Ebra); Cloreto de sódio (Fmaia); Sulfeto de Magnésio (Reagen); Álcool absoluto (LS Chemicals); Hipoclorito de sódio (); Fipronil 250FS (alta); Fipronil 97% (CHEM-IMPEX INT'L INC); Dimetilsulfóxido (êxodo científica); Metanol (J. T. Backer); Teste de quantificação de amônia, oxigênio e nitrito (Alcon), Tris (Sigma Aldrich), 5,5' – dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DNTB) (Sigma Aldrich), Trietanolamina (TEA), L-cisteína.

### 4.2 Preparo das soluções de subprodutos do agrotóxico fipronil para exposição do *zebrafish*

Soluções estoque do agrotóxico padrão (1 g/L de fipronil padrão solubilizada em DMSO) e formulação comercial (Fipronil alta; Alta – América Tecnologia Agrícola LTDA; pureza: 25,00% m/v; classificação toxicológica: categoria 4) foram preparadas em DMSO à concentração de 0,01% e armazenadas em frascos âmbar sob refrigeração a – 20 °C, a fim de evitar uma possível degradação. Para a etapa de cloração, as soluções de agrotóxicos empregadas foram preparadas de dois em dois dias. Para a formação dos subprodutos de degradação por cloração, soluções de 1g/L de fipronil padrão e 2,5g/L de fipronil comercial, foram preparadas e adicionadas de hipoclorito de sódio (NaOCl) em uma relação de 3 mg de cloro livre ( $\text{OCl}^- \leftrightarrow \text{HOCl}$ ) para cada 1 mg de carbono disponível na solução de agrotóxico, conforme procedimento descrito por Kishida et al. (2010) por 60 min em agitação. Para garantir a remoção do cloro residual, foi adicionada ao final da reação uma solução de tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ). Ensaios para o grupo controle negativo, ou seja, sem o contato entre o cloro livre e o agrotóxico, foram conduzidos por adição do hipoclorito e de tiosulfato em água.

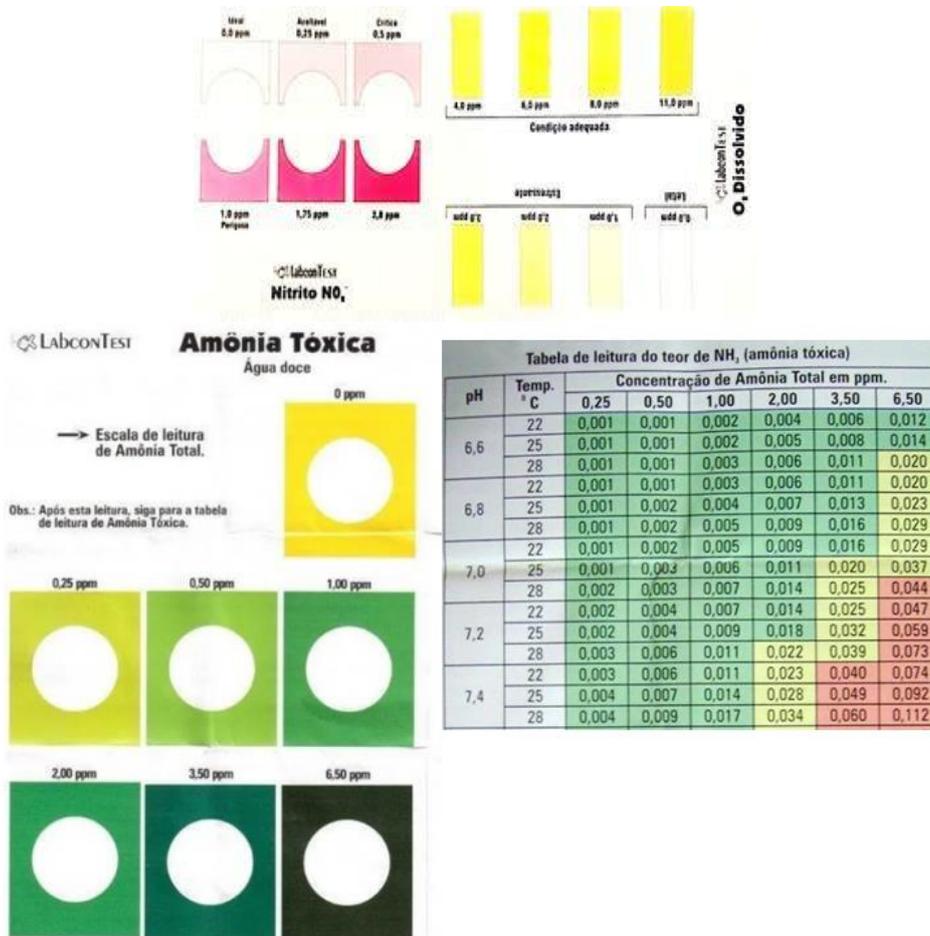
Os animais foram divididos em 8 (oito) grupos experimentais com 10 animais cada, a saber:

- Grupo I – Controle Negativo A (exposição à água pura);
- Grupo II – Controle Negativo B (exposição à água tratada da mesma maneira que as soluções Controle Positivo B e Testes 1 a 4);
- Grupo III – Controle Positivo A (fipronil padrão íntegro 50ppb);
- Grupo IV – Controle Positivo B (fipronil padrão degradado por cloração 50ppb);
- Grupo V – Controle Positivo C (fipronil comercial íntegro 50ppb);
- Grupo VI a XIII – Teste 1 a 3 (fipronil comercial degradado por cloração nas concentrações 10; 50; 100ppb).

#### **4.3 Teste de toxicidade crônica em *zebrafish***

Peixes adultos da espécie *zebrafish* (n=90) adquiridos em loja de aquarismo, passaram por um período de aclimação de 14 dias antes do início dos ensaios. Finalizando este período, foi iniciado o tratamento dos animais, subdivididos em 8 aquários/grupos com 2L de água aerada mecanicamente (proporção de 5 animais por litro de água), filtrada constantemente com filtro e termostatizada a  $26 \pm 1$  °C por 28 e 60 dias. A cada dois dias, 50% da solução correspondente a cada grupo experimental foi trocada a fim de mantê-la em condições ideais para a manutenção dos peixes e garantir uma condição semi-estática da concentração de subprodutos nos aquários (ZHANG *et al.*, 2018 com adaptações). A iluminação da sala foi ajustada artificialmente em ciclos de claro:escuro 12h:12h e os peixes foram alimentados 2 vezes ao dia com ração composta por derivados de peixe, vitaminas e minerais. Foram monitorados semanalmente os parâmetros de qualidade de água: pH, oxigenação, nitrito, nitrato e amônia, utilizando o kit adquirido em loja de aquarismo e produzido pela *Labcon Test* (FIG. 6). As concentrações utilizadas para o ensaio crônico foram determinadas a partir da DL50 e de concentrações encontradas em corpos d'água por trabalhos descritos na literatura.

Figura 6 - Escala de cores para determinação de Nitrito, Oxigênio Dissolvido e Amônia Tóxica.

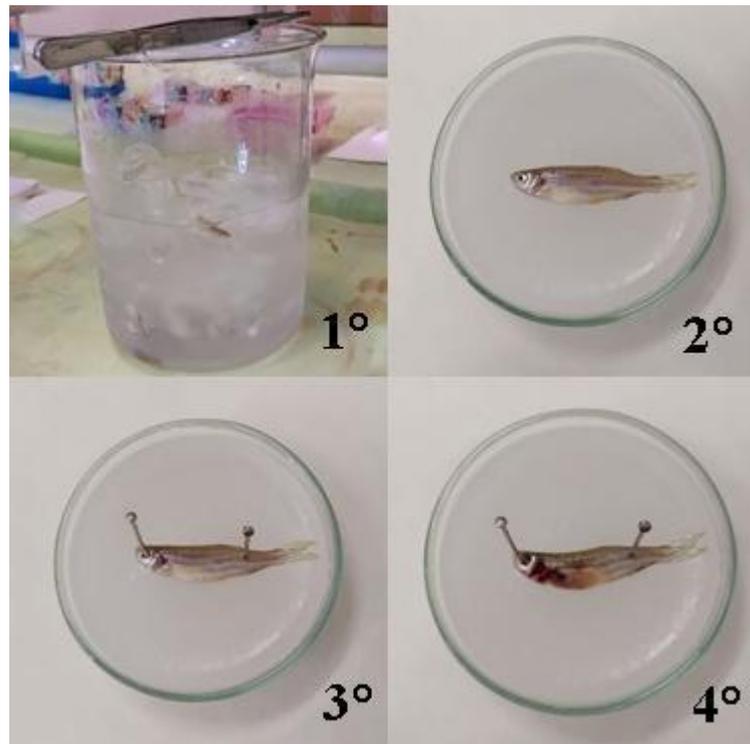


Fonte: O autor, 2023

#### 4.4 Eutanásia

Decorrido os períodos de exposição (28 e 60 dias), 5 animais por grupo por período foram eutanasiados por imersão em banho de gelo por tempo superior a 10 min (FIG.7). Esta técnica é aceita pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e preconizada pelo NIH (*National Institute of Health*) e pela AVMA (*Guidelines for the Euthanasia of Animals*). Posteriormente, foram coletados o fígado, intestino, músculo, coração e guelra para a realização de análises histológicas.

Figura 7 - Processo de eutanásia no *zebrafish*



Fonte: O autor, 2022

#### 4.5 Análise histológica

Os segmentos de tecidos biopsiados foram fixados em formol tamponado e posteriormente processados e incluídos em parafina. Para a análise histológica, secções de 4 $\mu$ m foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e examinadas ao microscópio. Diferentes parâmetros foram avaliados qualitativamente. Entre eles: presença/ausência de atipias celulares, inflamação, necrose, atipias estruturais e hiperplasia de nódulos linfóides. Para digitalização das imagens foi utilizado o microscópio Leica DM5000B com câmera acoplada, por meio do programa *Leica Application Suite* (versão 2.4.0 R1, Leica Microsystems).

#### 4.6 Análise dos níveis dos grupos sulfidrilas

Foi realizada a análise dos grupos sulfidrilas (SH) nas amostras coletadas de fígado do modelo animal *zebrafish*, que engloba todos os grupos tíois encontrados no organismo, principalmente como compostos de baixo peso molecular como a cisteína e proteínas como a albumina (MARINHO *et al.*, 2014). Os tíois reagem lentamente com os radicais livres,

enquanto a albumina apresenta alto potencial de oxidação, sua quantificação revela o nível antioxidante do tecido (MUSUMECI *et al.*, 2013; MARINHO *et al.*, 2014).

O método para determinação dos grupos – SH utilizado no qual 5,5'-ditio-2-nitrobenzoato (DNTB) é usado para reagir com os grupos -SH para produzir uma substância amarela com uma absorvância máxima de 412 nm. Esse método é muito utilizado devido sua simplicidade, rápido e direto. Para a realização do método foi utilizado o protocolo estabelecido pelo laboratório LABNEX - ENUT, com algumas alterações: foram preparadas 4 soluções para realização do procedimento, solução Tris-HCL 0,2M (pH=8,2), solução de DNTB à 0,01M, solução de TEA à 0,02M e solução inicial de L-cisteína (solução estoque utilizada para a curva) à 20000uM/L

Para cada amostra, foi realizado um pool contendo 3 amostras de fígado provenientes de 3 animais diferentes do mesmo grupo amostrado, adicionaram-se 400 µL de metanol, 75 µL de Tris-HCl pH 8,2, 25 µL de DTNB e 20 µL de amostra (ou da série de padrões). Foi centrifugado a 13000 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente. As absorvâncias das amostras foram determinadas em 412 nm, a 25°C. Nesta dosagem são feitos dois brancos, o branco 1 que contém todos os reagentes menos a amostra e o branco 2 que não contém amostra e DTNB. O branco 2 é utilizado para acertar o aparelho. E as absorvâncias obtidas de todas as amostras são diminuídas da absorvância obtida para o branco 1.

A construção da curva padrão de cisteína foi realizada com as seguintes concentrações milimolares: 5000, 2500, 1250, 625, 312,5, 156,25, 78,125. Amostras de 50 uL de cada solução de cisteína foram incubadas com 50 uL de solução de TEA. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS, com um comprimento de onda de 407 nm.

Para realização dos cálculos foi plotado um gráfico expressando Concentração do padrão (Eixo Y) X Absorvância do padrão (Eixo X). Após análise de regressão linear da curva padrão obteve-se a equação da reta (Concentração = a\*Absorvância + b) que foi utilizada para determinar a concentração de sulfidrilas totais e de sulfidrilas livres. A concentração dos radicais sulfidrilas ligadas às proteínas foi calculada pela diferença entre sulfidrilas totais e sulfidrilas livres. Todas as concentrações foram expressas em µmol/L.

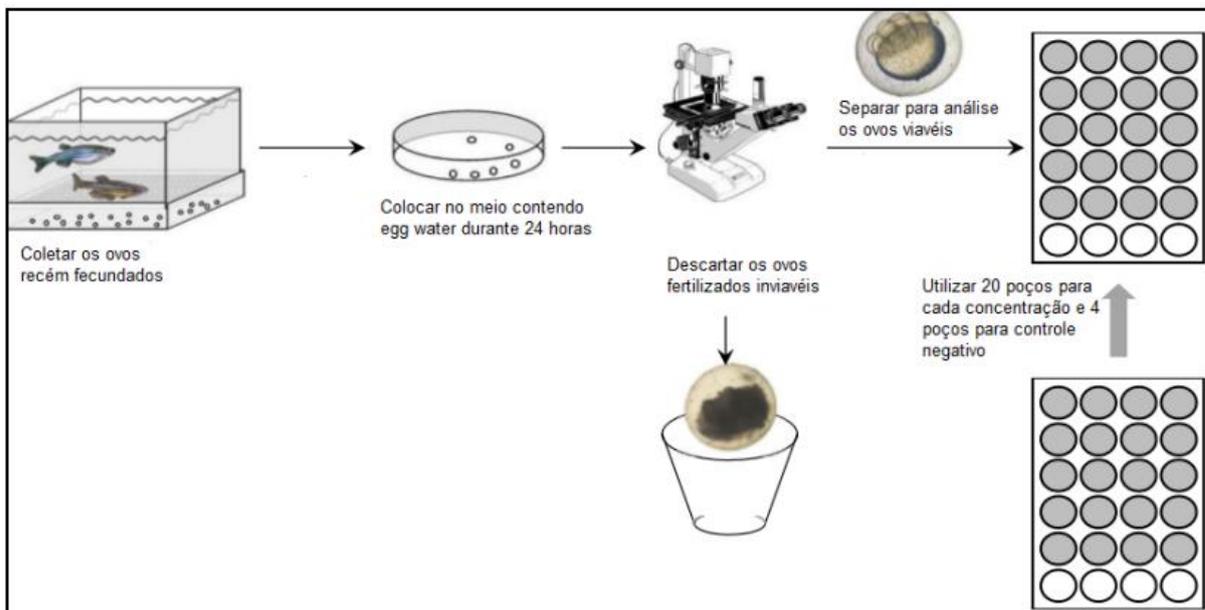
#### 4.7 Análise toxicidade aguda em embriões

Para análise da toxicidade aguda em embriões de *zebrafish* foram utilizados 10 animais adultos igualmente distribuídos entre machos e fêmeas, os quais foram mantidos em um aquário com capacidade para 3,5L de água, após sua distribuição, foi realizado a fecundação controlada e posteriormente coletados os embriões para o ensaio de toxicidade aguda. O protocolo utilizado para a avaliação da toxicidade foi o OECD N° 236/2013 com algumas adaptações

Para a obtenção dos embriões a serem utilizados no ensaio agudo, os animais adultos foram separados por gênero, onde continha a mesma proporção entre machos e fêmeas, contabilizando 5 machos e 5 fêmeas, durante o período noturno, utilizando uma placa acrílica com pequenas fissuras que permitia a troca de água contendo os feromônios que estimulam o acasalamento. Na parte inferior do aquário, foi colocada uma outra placa de acrílico, com o objetivo de separar os peixes adultos dos óvulos que seriam liberados pelas fêmeas. Na manhã do dia seguinte, antes de se ativar o sistema de iluminação, foi retirada a placa de acrílico permitindo o acasalamento.

Após o acasalamento, os ovos foram mantidos em placas de petri por 24h, onde após esse tempo foi realizada uma triagem para a exclusão dos possíveis óvulos não fertilizados. Esses óvulos foram mantidos nas placas de petri em uma solução *egg water* (0.137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgSO<sub>4</sub>, 4.2 mM NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, azul de metileno 1%), a qual permite a manutenção dos embriões, e mantidos em uma estufa Thermo Scientific a 26°C. Após esse período de 24h, os embriões viáveis foram transferidos para as placas de ELISA de 96 poços, como ilustrados na figura 8, onde foram expostos às soluções de tratamento e controle, nas concentrações demonstradas na tabela 2. Em função da baixa solubilidade do fipronil a solução estoque foi preparada em DMSO 0,1%, sendo assim foi necessário estabelecer um controle solvente. Além disso, o experimento contou também com um controle negativo contendo *egg water* (OECD,2013).

Figura 8 - Delineamento do experimento para análise dos embriões de zebrafish sobre exposição às soluções testes e controles.



Fonte: OECD, 2013

Para a exposição dos embriões às soluções preparadas, os embriões viáveis, fecundados, foram transferidos para placas de ELISA com o auxílio da pipeta de pasteur, cada borda da placa de ELISA continha água destilada onde cada poço continha apenas 1 embrião. As soluções de controle e tratamento foram trocadas 50% diariamente, com o auxílio da pipeta pasteur, sobre o objetivo de se manter uma concentração semi estática em contato com os embriões (OECD, 2013).

A análise da toxicidade aguda se desenvolveu com base na observação por alterações no desenvolvimento dos embriões do *zebrafish*, com base no protocolo estabelecido pela OCDE nº236, com algumas alterações incluídas pelo autor. Foram avaliados alguns efeitos teratogênicos como: coagulação (Coag), presença de edema no saco vitelino (Esv), não formação de somito (Nsom), não deslocamento da cauda (Ncal), ausência de batimento cardíaco (Abc), má formação dos olhos (Folhos), ausência de pigmentação (Apig) e eclosão Ecl) e desenvolvimento normal (Dnor). Foram avaliados diariamente 10 grupos com 20 embriões, nos tempos de: 48 horas pós exposição (hpe), 72hpe, 96hpe e 144hpe (figura 9)





PLACA 6													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	H20												
B	H20	H20	H20	H20	H20								H20
C	H20	H20	H20	H20	H20								H20
D	H20	H20	H20	H20									H20
E	H20	H20	H20	H20									H20
F	H20	H20	H20	H20									H20
G	H20	H20	H20	H20									H20
H	H20												

Fonte: O autor, 2023

Legenda:

F.C.: Fipronil Comercial;

F.I.: Fipronil Íntegro;

H20c: Água Clorada;

H20: Água Pura;

F.C.: Fipronil Comercial;

F.I.: Fipronil Íntegro.

Sem TTO: 

Com TTO: 

#### **4.8 Fotodocumentação do ensaio crônico**

Visto que a maior parte do corpo dos peixes é formada por tecido muscular (Bone Q. et.al, 1978) e uma vez que o ambiente aquático se apresenta mais denso que o terrestre, os peixes necessitam de maior força para se deslocarem em situações como caça ou fuga de predadores. Sendo assim, uma característica de sobrevivência para esses animais em seu habitat. Visto isso, uma possível perda de massa muscular visível pode ser um indicador agravante não apenas de toxicidade, mas de mortalidade desses animais.

Durante o experimento foi realizada a fotodocumentação dos peixes adultos que foram expostos às soluções controle e teste. A partir dos dados coletados foi realizada uma análise qualitativa com o objetivo de investigar a toxicidade dos subprodutos gerados após cloração sobre o desenvolvimento morfológico do zebrafish, onde após análise das fotos registradas, foi possível identificar alterações visíveis nos peixes expostos, principalmente, às concentrações de fipronil padrão íntegro 50ppb e fipronil comercial clorado 50ppb e 100ppb, demonstradas na Tabela 15.

A maioria dos estudos de qualidade ambiental usados com o objetivo de analisar alterações morfológicas em organismos adotam como parâmetro de análise, alterações anatômicas, visto que essas alterações se encontram presentes em situação de estresse.

#### **4.9 Análise Estatística**

Para análise das lâminas coletadas após os cortes histológicos de fígados provenientes dos peixes adultos expostos às soluções selecionadas, foi realizado a análise de variância *One-Way* ANOVA e complementada pelos pós Teste de Tukey, realizadas pelo Software GraphPad Prism 9, visto que são dados paramétricos. Para todas as análises o valor de  $p < 0,05$  foi considerado estaticamente significativo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Análise de massa corporal

O primeiro parâmetro avaliado foi a manutenção de massa corporal. Foram comparados os resultados obtidos entre os animais no período pós aclimatação (antes de iniciar o tratamento), tratados com água pura e com água clorada com os resultados obtidos para os animais tratados com fipronil padrão (puro) e comercial (fórmula). Como pode ser observado na figura 10, no período de 28 dias após o tratamento, os animais pertencentes aos grupos tratados com água pura e água clorada não apresentaram diferença estatística em relação aos animais no período pós aclimatação. Isso indica que os animais se encontravam em fase adulta já com estabilidade no crescimento.

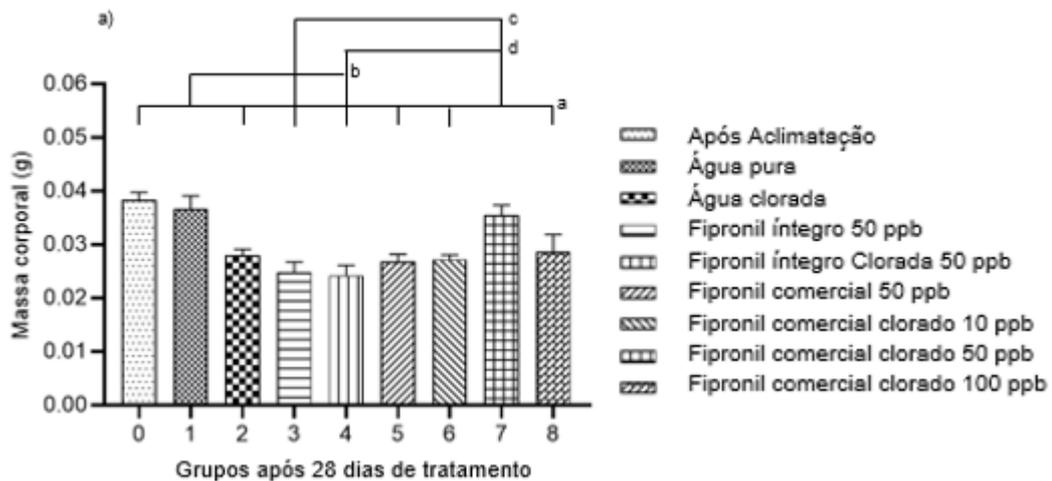
Quando comparadas as massas corporais dos animais pertencentes ao grupo água pura (letra “b” na Figura 10) com os grupos tratados com fipronil íntegro 50ppb com e sem cloração, podemos observar diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) que indicam perda de massa. Na comparação entre os grupos após aclimatação e tratado com água clorada (letra “a” na Figura 10) e os grupos tratados com fipronil padrão, observa-se que apenas o grupo tratado com a substância clorada apresenta diminuição estatística. Tal fato pode indicar uma maior toxicidade dos subprodutos de cloração do agrotóxico fipronil em relação ao composto íntegro.

Em relação à comparação entre o grupo tratado com água pura e os grupos tratados com fipronil comercial (50ppb sem tratamento; 10, 50, 100ppb com tratamento), observamos que todos os grupos com exceção do grupo 50ppb com tratamento apresentaram diminuição estatisticamente significativa da massa corporal. Para a comparação com o grupo tratado com água clorada observamos que apenas o grupo tratado com fipronil padrão 50ppb clorado apresenta diminuição da massa corporal. Juntos tais resultados parecem indicar que, apesar de o tratamento da água com cloro não demonstrar redução significativa no peso dos animais, ele tende a promover tal alteração.

Ainda sob o aspecto de redução da massa corporal, a comparação entre os grupos tratados com fipronil (padrão e comercial) não indica diferenças estatísticas significativas com exceção do grupo fipronil comercial 50ppb com cloração quando comparado com os demais grupos). Tal fato indica que provavelmente os excipientes utilizados na produção da fórmula comercial não são compostos ativos em termos de toxicidade e também não geram subprodutos que possam interferir nesse aspecto da saúde animal.

Quando comparamos a massa corporal entre os grupos fipronil íntegro 50 ppb sobre o grupo fipronil comercial clorado 50 ppb (letra “c”, Figura 10), após 28 dias de exposição, podemos observar que não há diferença estatisticamente significativa entre eles. Isso indica que os subprodutos de cloração do fipronil possuem uma toxicidade equivalente.

Figura 10 - Avaliação da alteração de massa corporal entre os grupos tratados e não tratados com diferentes soluções de fipronil por período de 28 dias



Fonte: O autor, 2022

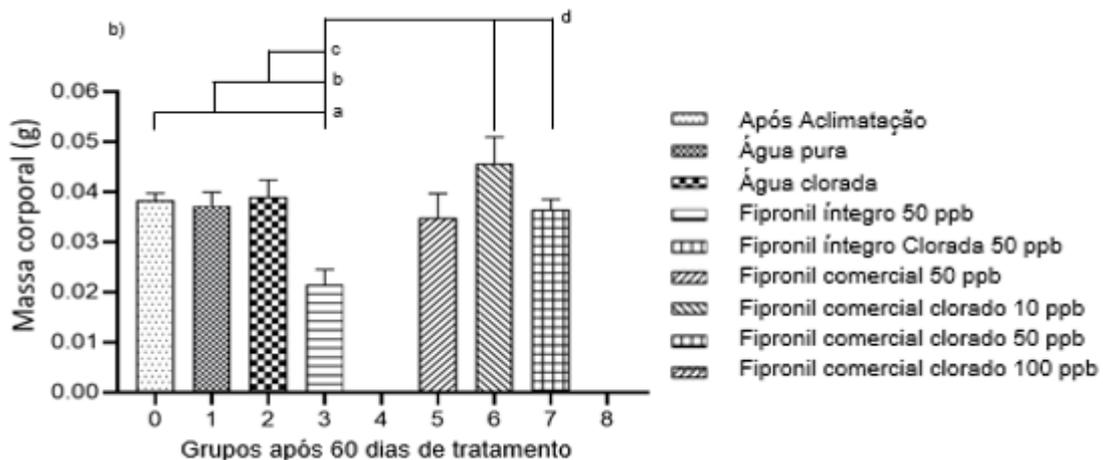
O restante dos animais pertencentes a cada grupo experimental (n=5) foi mantido sob o mesmo esquema de tratamento e condições ambientais descritas anteriormente por um período total de 60 dias. Como dito anteriormente, as concentrações selecionadas para avaliação da exposição crônica do *zebrafish* aos produtos de cloração do fipronil foram determinadas a partir de valores de CL50 descritos em diferentes espécies de peixes e nas concentrações ambientais já encontradas em corpos d'água localizados em regiões diversas. Apesar disso, todos os animais restantes nos grupos fipronil padrão 50ppb com cloração e fipronil comercial 100ppb com cloração morreram antes do término do período de exposição. Tal fato reforça o potencial tóxico de tais subprodutos após exposição crônica uma vez que os animais pertencentes ao grupo fipronil padrão 50ppb não tratado resistiram até o fim do período de 60 dias.

Para os animais restantes, da mesma forma que para o tempo de 28 dias, foi construído um gráfico para avaliação da manutenção de massa corporal para os grupos de 60 dias pós exposição (Fig.11). Em relação à comparação entre os grupos pós aclimação, água pura e água clorada podemos observar que não houve alteração estatística significativa. Além disso,

a tendência de redução da massa corporal observada no período de 28 dias (Figura 10 para o grupo tratado com água clorada não mais se mostra presente).

O grupo tratado com fipronil comercial 10ppb clorado não mais apresenta redução da massa corporal quando comparado com os grupos água pura e água clorada. Isso pode indicar uma reposta adaptativa dos animais a essa baixa concentração ambiental dos subprodutos de cloração do fipronil. O mesmo não acontece para os grupos tratados com fipronil comercial na concentração de 50ppb clorados e para o fipronil padrão 50ppb não clorado. Como pode ser observados os três grupos apresentam redução significativa da massa corporal quando comparados aos grupos controle negativo. Nesse tempo de 60 dias também não foram observadas diferenças entre os grupos tratados com fipronil comercial clorado e não clorado na concentração de 50ppb o que indica, junto com os demais dados que a toxicidade dos subprodutos de cloração do fipronil comercial demonstram relação dose-dependente.

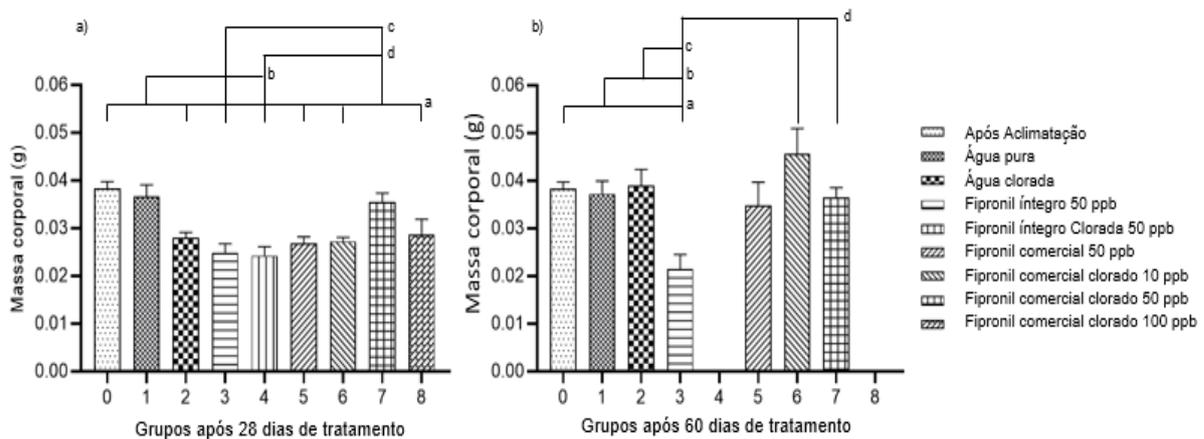
Figura 11 - Avaliação da alteração de massa corporal entre os grupos tratados e não tratados com diferentes soluções de fipronil por período de 60 dias



Fonte: O autor, 2022

Quando comparamos as massas corporais entre os grupos tratados por 28 e 60 dias (FIG.12), notamos a manutenção da massa entre os grupos controle negativos e no grupo tratado com fipronil comercial sem cloração. Para o grupo tratado com 10 ppb há uma recuperação da massa e para os grupos fipronil padrão sem cloração 50 ppb e comercial 50 ppb com cloração há uma redução da massa ainda mais acentuada ao final de 60 dias.

Figura 12 - Comparação da alteração de massa corporal entre os grupos tratados e não tratados com diferentes soluções de fipronil nos períodos de 28 e 60 dias



Fonte: O autor, 2022

## 5.2 Análise Histológica

### 5.2.1 Análise histológica para presença de núcleo picnótico e esteatose hepática entre os grupos 28 dias pós exposição e 60 dias pós exposição

O fígado é o primeiro órgão exposto a substâncias exógenas, recebendo 70% do suprimento de sangue do intestino através da circulação entero-hepática da comunicação via sistema porta (LAMBERTZ *et al.*, 2017). Por esse motivo o fígado é um órgão fundamental contra defesa de agentes estressores, como por exemplo os agrotóxicos, o que pode explicar a estreita relação entre o influxo de endotoxinas e progressão de doenças hepáticas (MOUZAKI; ALLARD, 2012). Não está claro até que ponto as alterações no fígado contribuem para alterações na mucosa do epitélio intestinal (SCHNABL; BRENNER, 2014).

Esteatose hepática ou degeneração gordurosa do fígado é a condição na qual ocorre acúmulo de triglicerídeos dentro dos hepatócitos (ROBBINS; COTRAN, 2015). Esteatose hepática é um termo que envolve desde a simples deposição de tecido adiposo no fígado a um progressivo processo de esteatose hepática associado a hepatite, fibrose, cirrose e, em alguns casos, carcinoma hepatocelular (Benedict M *et.al*, 2017).

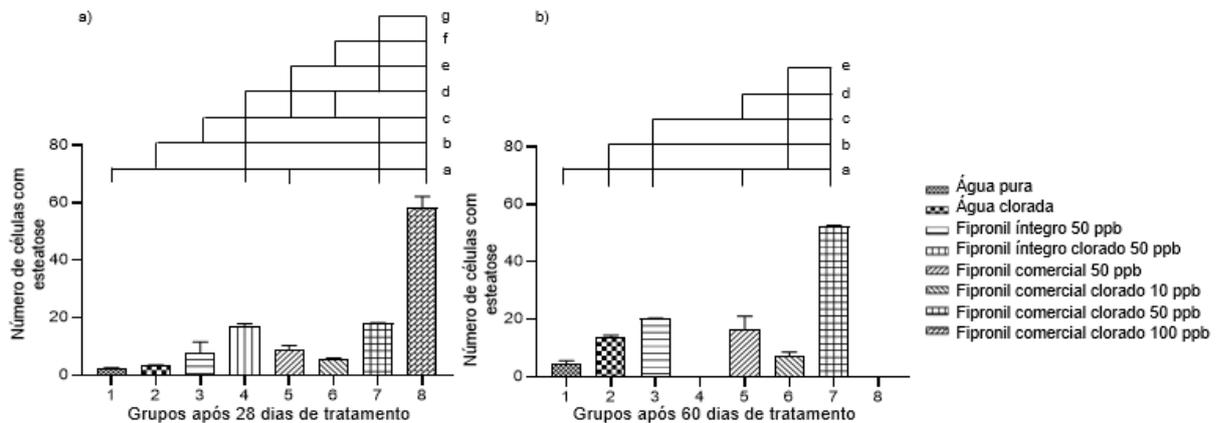
A análise da presença de núcleo picnótico indica possível apoptose celular, onde esse é umDurante a apoptose ocorrem alterações que podem ser observadas no núcleo celular, onde o núcleo torna-se picnótico e a cromatina se condensa nas porções adjacentes à membrana celular, que levará ao colapso e posterior fragmentação. Simultaneamente, ocorre formação de bolhas no citoplasma que separam a célula em fragmentos circundados por

membrana, contendo partes do núcleo e organelas intactas (corpos apoptóticos) (PATEL et al, 1995). O aumento do apoptose pode ser estimulado por vários fatores, sendo um deles por substâncias química, como é o caso do presente estudo (PATEL *et al*, 2000).

Em relação aos grupos que foram eutanasiados após 28 dpe (dias após exposição), quando comparamos o grupo “água pura” com o grupo “fipronil comercial clorado 100ppb” (a) podemos analisar que há uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação a quantidade de núcleo picnótico e esteatose hepática, indicando que os subprodutos gerados após a cloração do fipronil levou à apoptose no tecido analisado, e uma maior prevalência de esteatose, sendo um indicativo de intoxicação. Levando isso em consideração, ao compararmos os grupos controles não houve um aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ), sendo que a partir desse dado pode-se afirmar que a toxicidade do processo de cloração não é significativa, validando assim os resultados sobre os grupos expostos aos tratamentos nas diferentes concentrações. Em relação aos outros grupos em que houve uma diferença significativa em relação ao grupo controle, “água pura”, os grupos “fipronil padrão clorado 50ppb”, “fipronil comercial íntegro 50ppb” e fipronil comercial clorado 50ppb” obtiveram resultados significativos ( $p < 0,01$ ) quando comparamos a quantidade contabilizada de núcleos picnóticos e esteatose entre os grupos.

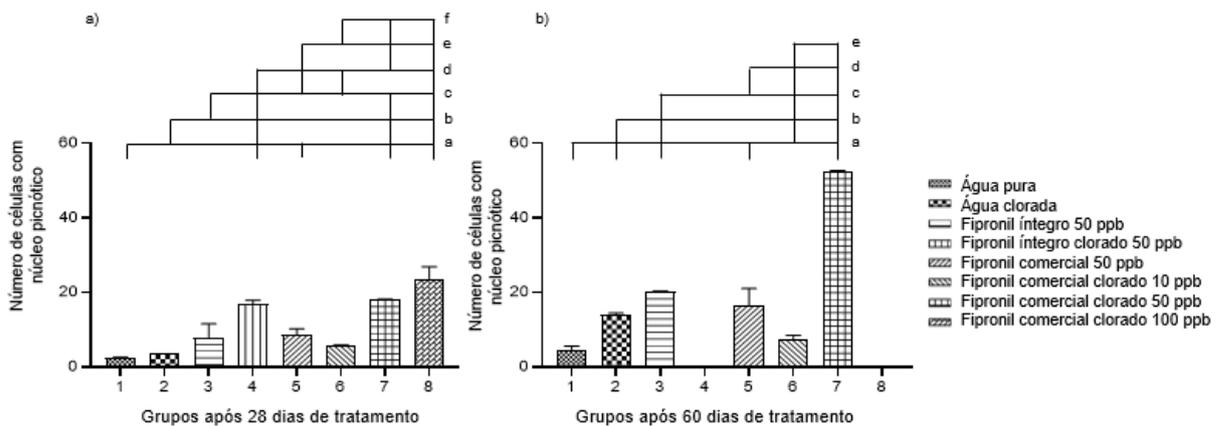
Em relação aos grupos eutanasiados após 60 dpe, podemos observar que a escala varia correspondente ao analisado nos grupos após 28 dpe. Os grupos que se destacaram com maior prevalência de núcleos picnóticos e esteatose hepática na análise de 28 dpe, morreram antes da análise finalizar, indicando que ambas as soluções são tóxicas ao animal exposto, na ausência desses dados, o grupo de maior destaque em relação à níveis de presença de núcleo picnótico e esteatose, foi o grupo “fipronil comercial clorado 50ppb”, onde foi analisado que há uma diferença significativa em relação aos grupos controles, evidenciando uma possível toxicidade dos subprodutos clorados nessa concentração (figuras 13 e 14).

Figura 13 - Análise histológica para presença de Esteatose entre os grupos 28 e 60 dpe



Fonte: O autor, 2022

Figura 14 - Análise histológica para presença de Núcleo Picnótico entre os grupos 28 e 60 dpe



Fonte: O autor, 2022

### 5.3 Análise de dosagem de sulfidrilas totais

Tem-se demonstrado que os níveis de grupos tióis também podem ser considerados um biomarcador do estresse oxidativo (KADOTA *et al.*, 1991; QUINLAN *et al.*, 1994), uma vez que estes grupos contribuem significativamente para a capacidade antioxidante da glutatona (SELVAM; DEVARAJ, 1996) ao proteger os tecidos contra o estresse oxidativo (SARMADI; ISMAIL, 2010). De acordo com, Harman, Mottley e Mason (1984), este grupo tem um papel muito importante na proteção de células e biomoléculas de estresse oxidativo. No presente estudo, avaliamos os níveis séricos de radicais sulfidrilas totais.

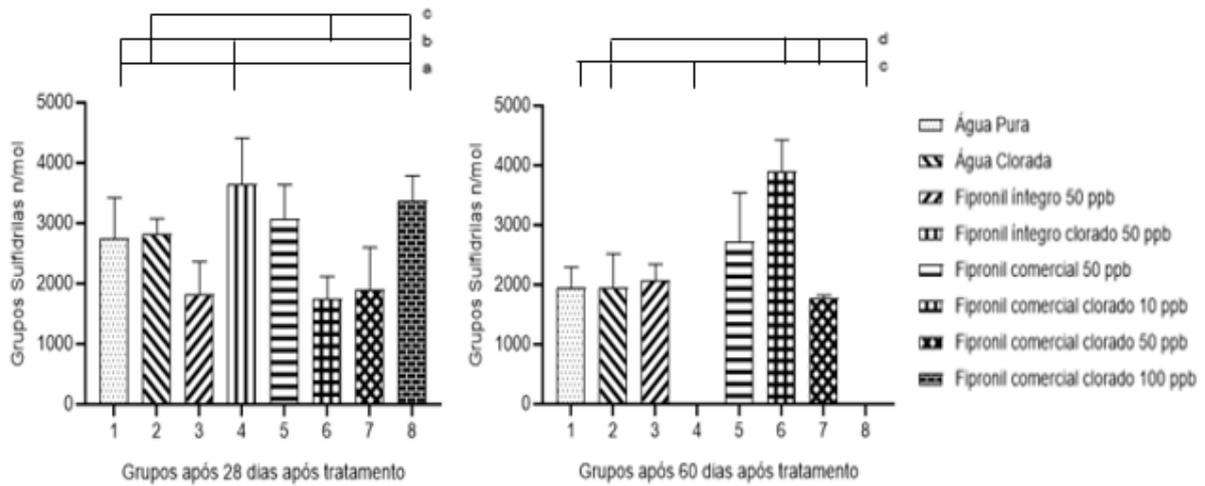
O conteúdo de grupamento sulfidrilado avaliado no presente estudo indica indiretamente, o recrutamento do sistema de defesa antioxidante das glutatonas para o tecido testado. A figura 15, demonstra a exposição as soluções contendo o agrotóxico e seus subprodutos clorados não alteraram de forma significativa o conteúdo de tióis nos animais, com exceção, dos grupos fipronil padrão com cloração 50ppb 28dpe e fipronil comercial íntegro 50 ppb 60dpe (letra “a”, figura 15), onde apresentaram um alto nível de grupos sulfidrilados, indicando um possível efeito toxicológico derivado das soluções levando à um estresse oxidativo.

Comparando os grupos fipronil comercial 10ppb com cloração 28dpe e 60dpe, é possível analisar que houve uma redução do potencial antioxidante mediado por mecanismo não enzimático, apesar do valor não ser significativo, há uma tendência nessa concentração, onde quando a relação de massa corporal, é possível observar uma possível adaptação do animal à solução, visto a recuperação de peso do mesmo quando comparamos às análises de 28dpe e 60dpe.

Além disso, é possível observar um aumento significativo nos grupos “fipronil íntegro clorado 50 ppb” e “fipronil comercial clorado 100ppb”, já nos grupos coletados de 28dpe, quando comparados aos padrões de água pura e água clorada (letra “b”, figura 15) que as amostras continham um alto nível de grupos sulfidrilados, evidenciando e reforçando a toxicidade do fipronil em ambas as concentrações, visto que os animais expostos as concentrações mencionadas não sobreviveram ao final do estudo (Letra “c”, figura 15).

Após análise sobre os grupos tratados de 60dpe com os grupos de 28dpe é possível observar uma diferença estatística sobre o grupo “fipronil comercial clorado 10ppb 28dpe” quando comparado ao grupo “fipronil comercial clorado 10ppb 60dpe”, onde o grupo de 60dpe houve uma maior prevalência de grupamentos sulfidrilados, indicando que mesmo que foi observado a redução do potencial antioxidante mediado pelo mecanismo enzimático, a exposição crônica aos subprodutos de cloração do agrotóxico fipronil causou um possível estresse oxidativo. Sendo assim essa concentração podendo já ser um nível tóxico ao animal quando este é exposto à longo prazo, como foi realizado no ensaio crônico. Esse apontamento se reforça visto que os grupos controles se mantiveram estáveis (letra “d”, figura 15).

Figura 15 - Efeito das diferentes soluções sobre a concentração de grupamentos sulfidrila no fígado do *zebrafish* após 28 e 60 dias de exposição



Fonte: O autor, 2022

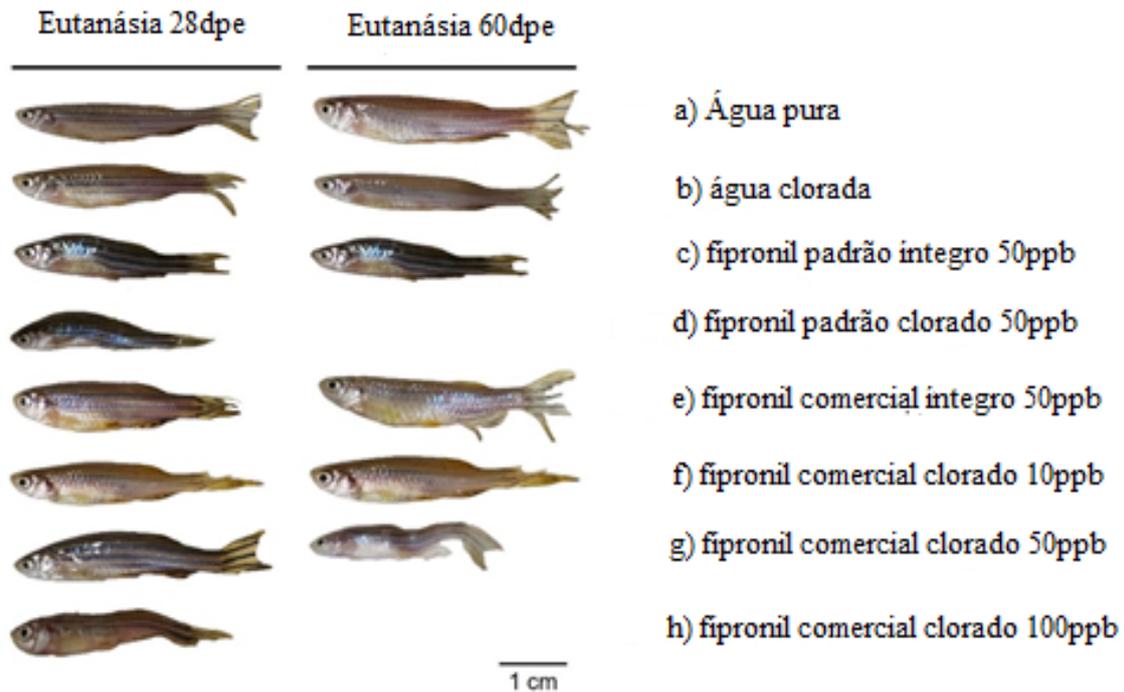
#### 5.4 Análise morfológica macroscópica

A partir das imagens coletadas é possível observar que os grupos expostos às soluções cloradas de fipronil padrão e comercial à 50ppb e 100ppb respectivamente, no tratamento com 28dpe foram os mais afetados morfológicamente, evidenciando a intoxicação pelos subprodutos clorados. Em relação à análise de 60dpe podemos observar uma diferença morfológica visível em relação ao grupo que foi exposto à solução clorada de fipronil comercial 50ppb em relação aos demais grupos trabalhados, indicando intoxicação crônica relacionada ao tempo de exposição aos subprodutos clorados.

Comparando os grupos controle com os grupos de tratamento, podemos observar uma diferença morfológica visível, e essa afirmação é reforçada pelos dados coletados de massa corporal, onde conseguimos analisar que as massas corporais dos grupos controle não tiveram alterações significativas, porém em relação aos grupos com tratamento, salvo o grupo com fipronil comercial 10ppb, houve uma redução da massa corporal.

Para os grupos fipronil íntegro sem cloração 50ppb e comercial 50ppb com cloração foi possível analisar uma redução de massa acentuada quando comparamos os dados de 28dpe e 60dpe, e esses dados são possíveis analisar nas fotos coletadas, onde os peixes apresentaram uma redução de tamanho e visivelmente a morfologia dos peixes expostos à essas concentrações estão mais semelhantes à uma possível intoxicação, onde estes apresentaram um aspecto de perda de gordura significativa.

Figura 16: Fotodocumentação dos peixes adultos expostos às soluções de fipronil padrão e íntegro; a) água pura, b) água clorada; c) fipronil padrão íntegro 50ppb; d) fipronil padrão clorado 50ppb; e) fipronil comercial íntegro 50ppb; f) fipronil comercial clorado 10ppb; g) fipronil comercial clorado 50ppb; h) fipronil comercial clorado 100ppb.



Fonte: Autor, 2021.

### 5.5 Análise toxicidade aguda em embriões

A análise realizada para avaliação da toxicidade aguda em embriões se baseia na observação sobre alterações no desenvolvimento morfológico dos embriões do peixe, *zebrafish*. Onde os parâmetros utilizados para análise foram: 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.

Para validação do método utilizado, foi seguido parâmetros estabelecidos pela OECD 236 de 2013: 90% de ovos viáveis coletados (foram coletados 300 ovos e contabilizados 270 ovos viáveis para o início do ensaio), controle negativo com 100% de sobrevivência ao final

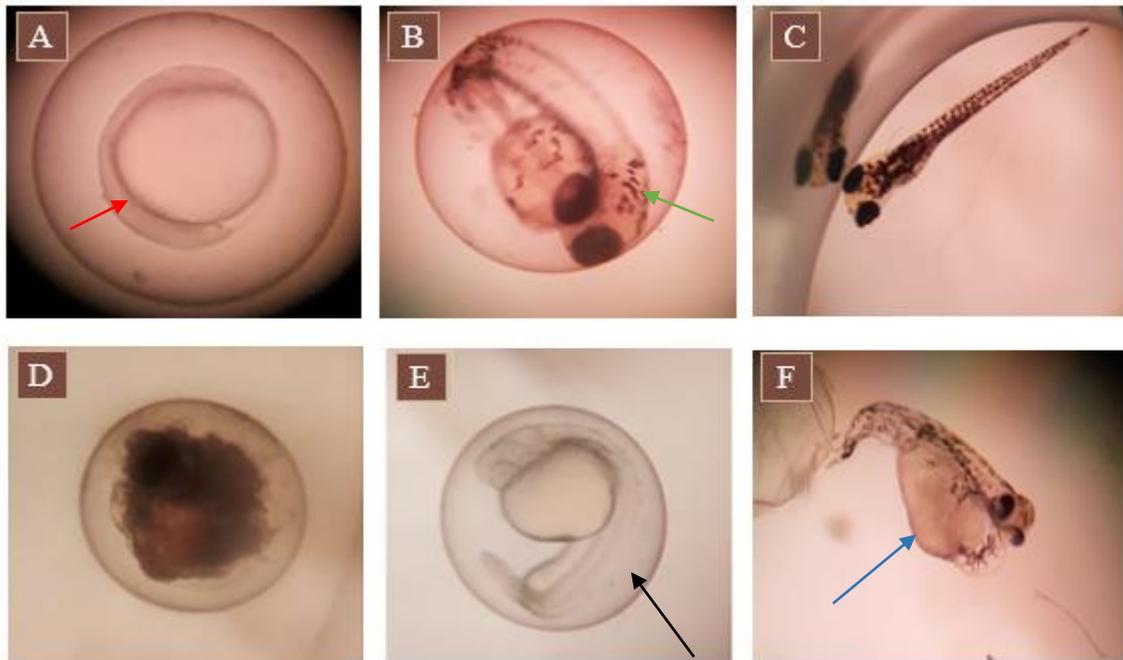
dos tetes e 100% de eclosão ao final de 96hpf (horas pós fecundação), como demonstrado na tabela 2.

Após às análises não foi observada a presença de lesões, salvo o grupo “Fipronil Íntegro 50 ppb sem tratamento” (figura 17, letra “e” e “f”), onde foi observada ausência de pigmentação até 72hpf, e presença de edema no saco vitelino em um embrião do grupo analisado. Apesar do edema observado, não foi contabilizada morte do embrião após as 144hpf. O edema tem sido uma característica muito observada nos testes de toxicidade com *Danio rerio* (TESOLIN et al., 2014). Caracterizado por um acúmulo anormal de líquido no tecido e pode vir a ocorrer em órgãos específicos ou sobre qualquer parte do corpo do animal. O 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).

Em relação a um embrião saudável, é possível observar a presença de somitos bem desenvolvidos (Figura 17, letra “a”), além disso, pode-se observar movimentos espontâneos (contrações lado a lado), que irão indicar a formação dos somitos e por conseguinte considerando o seu desenvolvimento normal após 24hpf.

A ausência de identificação de lesões, reflete a ausência de toxicidade do agrotóxico no ensaio agudo em questão. Porém, outros trabalhos fipronil demonstraram toxicidade significativa do agrotóxico fipronil em ensaios agudos. Stark et al. (2005) testaram o efeito do fipronil para a espécie *Daphnia pulex* e registraram o valor de CL50 – 96h de 0,016 mg.L<sup>-1</sup>, Schlenk et. Al. (2001) observaram a sensibilidade do cladóceros *Ceriodaphnia dubia* e também a elevada toxicidade do fipronil para esta espécie, onde o valor registrado para a CL50 – 48h foi de 0,017 mg.L<sup>-1</sup>. Portanto, podemos supor que o córion (tecido que protege o embrião do meio externo, possa ter interferido na exposição inicial do embrião.

Figura 17: Comparação entre o desenvolvimento de um embrião normal exposto à Fipronil Íntegro 50 ppb sem tratamento sobre alterações morfológicas observados nos estágios correspondentes sobre a mesma dosagem. Embrião zebrafish de 24hpf em (A) demonstrando somitos bom desenvolvidos (seta vermelha), em contraste (D) apresenta embrião coagulado após 24hpf. Embrião com 48hpf (B) apresentando início da pigmentação (seta verde), batimento cardíaco e desenvolvimento normal, em contraste (E) apresenta-se um embrião com defasagem de desenvolvimento de pigmentação após 48hpf (seta preta). Embrião eclodido após 72hpf (C). Embrião após eclosão apresentando edema no saco vitelíneo (seta azul) e pigmentação normal de acordo com o desenvolvimento de 72hpf.



Fonte: Acervo pessoal do autor, 2021

Tabela 2 - Efeitos teratogênicos avaliados em embriões de zebrafish expostos a diferentes soluções contendo agrotóxico fipronil. Coag - coagulação; Esv - edema no saco vitelino; Nsom - Não formação de somito; Ncal - Não deslocamento da cauda; Abc - ausência de batimento cardíaco; Folhos - Má formação dos olhos; Apig - Ausência de pigmentação; Ecl - Eclosão; Dnor - Desenvolvimento normal

hpe	Composto	Contrace H2O	Contrace TTO	Fipronil Íntegro				Fipronil Comercial			
				50 (TTO)	50 (sTTO)	10 (TTO)	25 (TTO)	50 (TTO)	100 (TTO)	50 (sTTO)	100 (sTTO)
48h	Mortalidade (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Esv (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Nsom (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ncal (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Abc (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Folhos (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Apig (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ecl (%)	10	10	5	10	5	5	0	10	0	0
	Dnor (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
72h	Mortalidade (%)	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0
	Esv (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Nsom (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ncal (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Abc (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Folhos (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Apig (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
	Ecl (%)	95	100	100	95	100	65	60	75	95	95
	Dnor (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	95	100

<b>96h</b>	<b>Mortalidade (%)</b>	<b>0</b>									
	Esv (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Nsom (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ncal (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Abc (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Folhos (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Apig (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ecl (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	95	100
	Dnor (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	95	100
<b>120h</b>	<b>Mortalidade (%)</b>	<b>0</b>									
	Esv (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Nsom (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ncal (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Abc (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Folhos (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Apig (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ecl (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Dnor (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	95	100
<b>144h</b>	<b>Mortalidade (%)</b>	<b>0</b>									
	Esv (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Nsom (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ncal (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Abc (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Folhos (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Apig (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ecl (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Dnor (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	95	100

Fonte: O autor, 2022

## 6. CONCLUSÃO

Foi observado que os produtos clorados a partir do agrotóxico fipronil se apresentaram mais tóxicos quando comparados à formulação original, sendo assim importante ressaltar a necessidade da identificação dessas substâncias e a criação de estratégias que consigam neutralizar esses subprodutos formados por cloração, com o objetivo de assegurar a saúde das populações.

Durante o desenvolvimento do trabalho foi observada limitada transparência quanto às informações referentes aos procedimentos necessários para registro do pesticida em questão, o que não apenas dificulta a realização de pesquisas para desenvolvimento de um banco de dados robusto, mas também acaba por limitar a atuação de órgãos responsáveis pelo controle da utilização dessa substância e sua acessibilidade à população em relação ao conhecimento toxicológico da mesma.

A legislação é um aspecto de extrema importância para o controle não apenas do fipronil, mas sobre essas substâncias de caráter nocivo no geral, porém, a legislação é apenas um dos fatores essenciais, visto que envolvem as questões políticas, sociais, econômicas e técnicas, as quais devem ser amplamente discutidas para elaboração de dossiês com o objetivo de controle e registro com ênfase na saúde e melhor utilização dessas substâncias.

Esse trabalho desenvolvimento, onde foi demonstrado uma preocupação quando a utilização do agrotóxico em questão, ressalta a importância de serem desenvolvidos trabalhos na área, principalmente em conjunto com os órgãos de controle, onde essa prática permitiria uma maior pressão acerca das deliberações provocadas pela economia, com o objetivo de reanalisar as flexibilizações das exigências de caráter restritivo, trazendo assim dados que corroborem para a criação de legislações pertinentes à uma política de registro e de controle, para obtermos um melhor proveito dessas substâncias assegurando também a saúde das populações tanto humanas quanto ambiental.

## 7. REFERÊNCIAS

ABBAS S. *et al.* Journal of Water and Health, v. 13, p. 270–284, 2015.

AGRICULTURA. Institutos de Pesca e Butantan negociam parceria para criar peixe paulistinha, 2016.

ALBUQUERQUE, A. F. *et al.* Environmental Science: Processes and Impacts, v. 18, p. 779–787, 2016.

AMÉRICO, J. H. P.; ISIQUE, W. D.; MINILLO, A.; CARVALHO, S. L. de. Fármacos em Uma Estação de Tratamento de Esgoto na Região Centro-Oeste do Brasil e os Riscos aos Recursos Hídricos. **RBRH – Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 17, n. 3, p. 61-67, 2012.

AMÉRICO-PINHEIRO, Juliana Heloisa Pinê; MERCADO, Letícia Sales. Agrotóxicos, recursos hídricos e organismos bioindicadores. 2021.

AUGUSTO, Lia Giraldo da Silva et al. O contexto global e nacional frente aos desafios do acesso adequado à água para consumo humano. **Ciência & saúde coletiva**, v. 17, p. 1511-1522, 2012.

AVMA. Guidelines for the Euthanasia of Animals, 2013.

BARCELÓ, Damià; LÓPEZ, María J. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. **Jornadas de presentación de resultados: el estado ecológico de las masas de agua. Panel científico-técnico de seguimiento de la política de aguas, Sevilla**, p. 1-27, 2008.

BAQUERO, Fernando; MARTÍNEZ, José-Luis; CANTÓN, Rafael. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current opinion in biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 260-265, 2008.

BELLAR T., LICHTENBERG J., KRONER R.C. Journal of American Water Works Association, v. 66, p. 703–706, 1974.

BOMBARDI, L. M. São Paulo: FFLCH- USP, 2017.

BOURGIN M., *et al.*, 2013. Chemosphere 93:2814–2822.

BARROS, André Luis Corrêa de. Cloração de agrotóxicos: remoção, identificação de "novos" subprodutos de desinfecção e avaliação de toxicidade. 2021.

BRASIL. **Portaria MS N°2914/2011**. Ministério da Saúde, Brasília, DF, 2011.

BRASIL. **Portaria GM/MS N° 888, de 4 maio de 2021**. Ministério de Estado da Saúde, Brasília, DF, 2021.

BILA, Daniele Maia; DEZOTTI, Márcia. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química nova**, v. 30, p. 651-666, 2007.

Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: an expanded review. World J Hepatol. 2017;16: 715-732.

Bone Q, Hoar W, Randall D. Locomotor muscle. Fish physiology. p.361-424, 1978.

CAVALCANTE, A. K. 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*. Dissertação (Programa de pós-graduação em Ciências na área de Tecnologia Nuclear) – Universidade de São Paulo, 110 f., 2017.

CENSO AGROPECUÁRIO 2017. Rio de Janeiro: IBGE, 2017.

CERRETA G. *et al.*, Water Res 169:115220, 2019.

CNA, CEPEA – Centro de estudos avançados em economia aplicada, p. 1-10, 2023.

CHAMBERLAIN; E. *et al.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 60, p. 354–363, 2021.

CONCEA. Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA. Resolução Normativa 13, 2013.

COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS. Guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola. São Paulo: Andrei, 1996.

CORNET, C.; DI DONATO, V.; TERRIENTE, J. Combining zebrafish and CRISPR/Cas9: towards a more eficiente drug discovery pipeline. **Frontiers in PHarmacology**, v. 9, p. 703, 2018.

CORSO, N. M. O agronegócio do palmito no Paraná. Dissertação (Programa de pós-graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, 140 f., 2003.

D., HOLDER, A. W., HOVINGA, R.; BEDIENT, P. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 41, 325–332, 2001.

DE OLIVEIRA P. R. *et al.* Microsc Res Techniq, v. 75, p. 28–35, 2012.

EL-GENDY A.K. *et al.* Food Chem Toxicol, v. 48, p. 215–221, 2010.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Government Printing Office Washington, p. 1-10, 1996.

FARIA, N. M. *et al.* Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos, v. 12, n. 1, 25-38, 2007.

FERNANDES, T. C. C. Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-testes, 2005.

GOESSLING, W.; SADLER, K. C. Zebrafish: an important tool for liver disease research. **Gastroenterology**, v. 149, n. 6, p. 1361-1377, 2015.

GRÜNWALD A. *et al.* Acta Polytechnica, v. 42, p. 56–59, 2002.

HAINZL, D., COLE, L. M., CASIDA J. E. Chem Res Toxicol, v. 11, p. 1529–1535, 1998.

HANO T. *et al.* Environmental Pollution, v. 252, p. 205-215, 2019.

HARMAN, Laura S.; MOTTLEY, Carolyn; MASON, Ronald P. Free radical metabolites of L-cysteine oxidation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 9, p. 5606-5611, 1984.

IBAMA. Boletim de Comercialização de Agrotóxicos e Afins, 2014.

IBAMA. Relatório de comercialização de agrotóxicos: Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil, 2016.

JURADO, A., WALTHER, M., DÍAZ-CRUZ, M. Science of The Total Environment, v. 663, p. 285-296, 2019.

KADOTA, K.; YUI, Y.; HATTORI, R.; MUROHARA, Y.; KAWAI, C. Decreased sulfhydryl groups of serum albumin in coronary artery disease. **Jpn Circ J.**, v. 55, p. 937–941, 1991.

KI Y.W. *et al.* Toxicol Lett, v. 211, p. 18-28, 2012.

KOMULAINEN H., 2004. Toxicology 198:239–248.

KRZEMINSKI, P. *et al.*, Sci Total Environ, v. 648, p. 1052-1081, 2019.

LAMBERTZ, J. *et al.* Fructose: a dietary sugar in crosstalk with microbiota contributing to

the development and progression of non-alcoholic liver disease. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1159, 2017.

LEE, B. C. *et al.* *Water Research*, v. 38, p. 733–739, 2004.

LI, W. *et al.* *Chemical Engineering Journal*, v. 274, p. 39-49, 2015.

LILIA, A. New York, NY: Springer New York 176, 2003.

LOPER, J. C. *Mutation research*, v. 76, p. 241–268, 1980.

LUO, Y. *et al.* *Science of the Total Environment*, p. 473–474; 619–641, 2014.

MARINHO, H. S. *et al.* Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. **Redox Biol**, v. 2, p. 535-562, 2014.

MUSUMECI, M. *et al.* Role of SH levels and markers of immune response in the stroke. **Dis Markers**, v. 35, n. 3, p. 141-7, 2013.

MONTEIRO, H. R. *et al.* Toxicity of the insecticides spinosad and indoxacarb to the non-target aquatic midge *Chironomus riparius*. **Science of the Total Environment**, v. 666, p. 1283-1291, 2019.

MOUZAKI, Marialena; ALLARD, Johane P. The role of nutrients in the development, progression, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 46, n. 6, p. 457-467, 2012.

MOSSA, A. H.; SWELA, E. S.; MOHAFRASH, S. M. M. *Tox Reports*, v. 2, p. 775-784, 2015.

OECD. Test N° 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, 2013.

OLIVEIRA, G. A. R., *et al.* Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 703, p. 200–208, 2010.

ONODERA, S.; HIROSE, Y.; ISHIKURA S. Journal of Environmental Chemistry, v. 5, p. 65–71, 1995.

TUNDISI, José Galizia. Recursos hídricos no futuro: problemas e soluções. **Estudos avançados**, v. 22, p. 7-16, 2008.

PATEL, T.; GORES, G. Apoptosis and hepatobiliary disease. Hepatology, v. 21, p. 1725-1741, 1995.

PATEL, T. Apoptosis in hepatic pathophysiology. **Clin Liver Dis**, v. 4, p. 295- 317, 2000.

REGALDO, L. *et al.* Environmental Science and Pollution Research, v. 25, p. 6951-6968, 2018.

RAMELOW, G. J.; WEBRE, C. L.; MUELLER, C. L.; BECK, J. N; YOUNG, J. C.; LANGLEY, M. P. Variations of heavy metals and arsenic in fish and other organisms from the Calcasien River and Lake, Louisiana. **Arch. Environ. Contam. Toxicol**, v. 18, p. 804-818, 1989.

RAMOS, Lara Luiza dos Santos et al. Tratamento de efluentes e reatores de circulação interna: uma breve revisão e aplicação. 2021.

RICHARDSON, S. et al. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, v. 636, n. 1–3, p. 178–242, 2007.

ROBBINS, Stanley Leonard. **Robbins y Cotran: patología estructural y funcional**. Elsevier España, SLU, 2015.

ROOK, J. J. *Environmental Science and Technology*, v. 11, p. 478–482, 1977.

SANTOS, Gabrielly Machado dos et al. Avaliação da degradação simultânea de fipronil, oxibenzona e propilparabeno por UV-C/persulfato em efluente sanitário terciário. 2023.

SARMADI, Bahareh H.; ISMAIL, Amin. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1949-1956, 2010.

SELVAM, R.; DEVARAJ, Sridevi. Oxalate binding to rat kidney mitochondria: induction by oxidized glutathione. **Indian journal of biochemistry & biophysics**, v. 33, n. 1, p. 62-65, 1996.

SCHLENK, D., HUGGETT, D. B., BENNETT, E., RIMOLDI, J., BEELER, A. B., BLOCK, SCHNABL, B.; BRENNER, D. A. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. **Gastroenterology**, v. 146, n. 6, p. 1513-1524, 2014.

SHARMA, V. K.; ZBORIL, R.; MCDONALD, T. J. Formation and toxicity of brominated disinfection byproducts during chlorination and chloramination of water: A review. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. 49, n. 3, p. 212–228, 2014.

SILVA, C. G. A., COLLINS, C. H. *Química Nova*, v. 34, p. 665-676, 2011.

SILVA, Taís Elaine da et al. Nas tramas da desinformação: a indústria cultural a serviço da legitimação do agronegócio brasileiro. 2021.

STARK, D. J.; VARGAS, I. R. Toxicity and hazard assessment of fipronil to *Daphnia pulex*. **Ecotoxicology Environmental**, v. 62, p. 11-16, 2005.

SYMONS, G. E. *Journal/American Water Works Association*, v. 98, p. 87-97, 2006.

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

U. S. GEOLOGICAL SURVEY, U. S. Department of the Interior, USGS Fact Sheet FS-010-0, 2000.

U. S. EPA. Quick Reference Guide Overview of the Rules, p. 4, 2010.

VERMA, R. S.; MEHTA, A.; SRIVASTAVA, N. Pestic Biochem PHys, v. 88, p. 191-196, 2007.

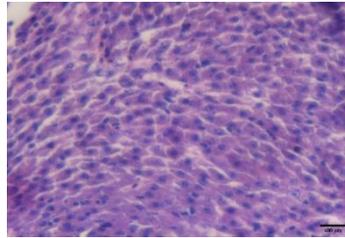
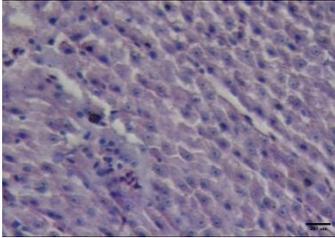
ZHANG, C. *et al.* Science of the Total Environment, p. 610-611; 769-775, 2018.

REGALDO *et al.*, 2018; JURADO, WALTHER *and* DÍAZ-CRUZ, 2019

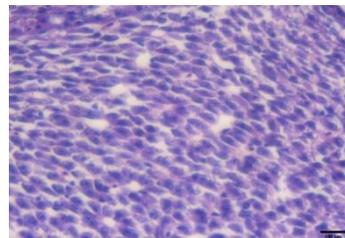
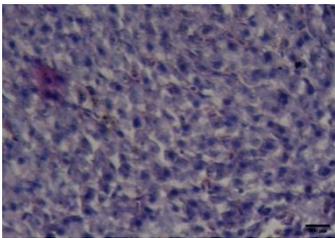
ZORZETTO, R.; GUIMARÃES, M. Um peixe modelo. Pesquisa FAPESP, n. 209, 2013.

## ANEXOS

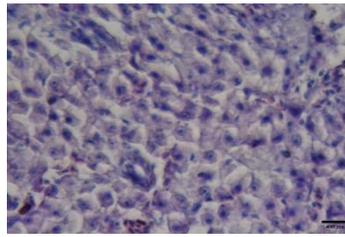
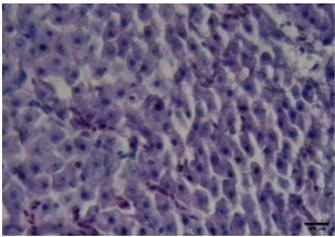
Análise histológica para presença de núcleo picnótico e esteatose hepática entre os grupos 28 dpe e 60 dpe.



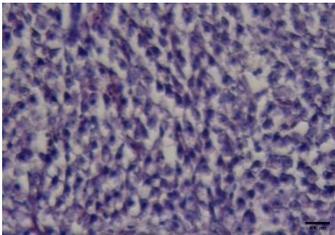
**1) Água Pura**



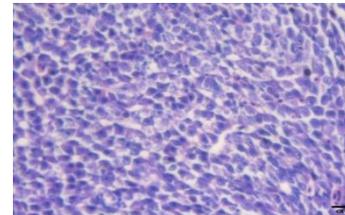
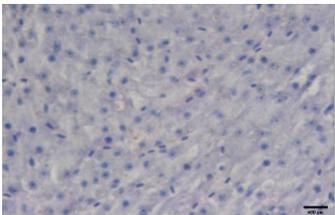
**2) Água Clorada**



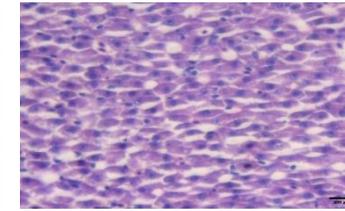
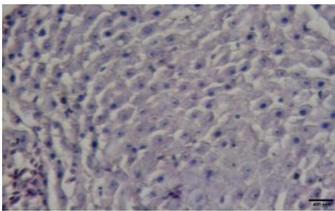
**3) F.I. sem TTO 50 ppb**



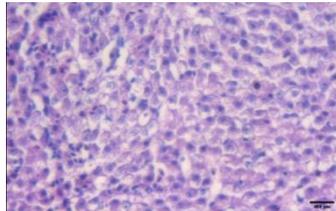
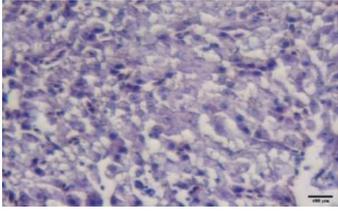
**4) F.I. com TTO 50 ppb**



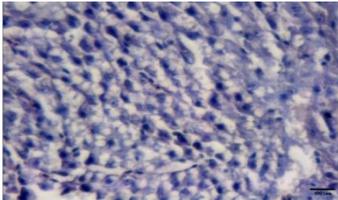
**5) F.C. sem TTO 50 ppb**



**6) F.C. sem TTO 10 ppb**



**7) F.C. sem TTO 50 ppb**



**8) F.C. com TTO 100 ppb**