

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

CAMILO ALEXANDRE JABLONSKI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ADVERSOS DA EXPOSIÇÃO AO AGROTÓXICO METOMIL NOS
ESTÁGIOS INICIAIS DE DESENVOLVIMENTO DO *ZEBRAFISH* (*Danio rerio*)**

Porto Alegre - RS
2021

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

CAMILO ALEXANDRE JABLONSKI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ADVERSOS DA EXPOSIÇÃO AO AGROTÓXICO
METOMIL NOS ESTÁGIOS INICIAIS DE DESENVOLVIMENTO DO *ZEBRAFISH*
(*Danio rerio*)**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Escola de Ciências da Saúde e da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Reis Bogo

Coorientadora: Dra. Talita Carneiro Brandão Pereira

Porto Alegre – RS

2021

Ficha Catalográfica

J11a Jablonski, Camilo Alexandre

Avaliação dos Efeitos Adversos da Exposição ao Agrotóxico Metomil nos Estágios Iniciais de Desenvolvimento do Zebrafish (*Danio rerio*) / Camilo Alexandre Jablonski. – 2021.

38 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Reis Bogo.

Co-orientadora: Dra. Talita Carneiro Brandão Pereira.

1. Metomil. 2. Agrotóxicos carbamatos. 3. Ecotoxicologia. 4. Morfologia zebrafish. 5. Comportamento zebrafish. I. Bogo, Maurício Reis. II. Pereira, Talita Carneiro Brandão. III. Título.

CAMILO ALEXANDRE JABLONSKI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ADVERSOS DA EXPOSIÇÃO AO AGROTÓXICO
METOMIL NOS ESTÁGIOS INICIAIS DE DESENVOLVIMENTO DO *ZEBRAFISH*
(*Danio rerio*)**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Escola de Ciências da Saúde e da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Reis Bogo

Coorientadora: Dra. Talita Carneiro Brandão Pereira

Aprovada em: 19 de março de 2021

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Fernanda Bueno Morrone (PUCRS)

Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico (UNESC)

Prof. Dr. José Maria Monserrat (FURG)

Porto Alegre – RS

2021

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa PROEX Modalidade I, que me permitiu realizar este trabalho.

À PUCRS, aos coordenadores e técnicos dos espaços fornecidos para a execução da pesquisa: Laboratório de Biologia Genômica e Molecular; Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia; Centro de Pesquisa em Toxicologia e Farmacologia e o Centro de Modelos Biológicos Experimentais.

Ao professor Maurício, por ter acreditado no meu potencial desde nosso primeiro encontro, por toda orientação, ensinamentos, paciência, disponibilidade, segurança e amizade durante todo esse percurso.

À Talita, por todo o conhecimento que ela pôde contribuir para a melhor execução desse projeto, sua paciência, perfeccionismo, segurança e confiança em mim, que foram indispensáveis para o meu amadurecimento profissional/acadêmico. E por todo o companheirismo e amizade.

À Lílian, que me auxiliou na adaptação quando cheguei ao laboratório, confiou em mim para auxiliar nos seus experimentos em 2019, o que me preparou para a parte prática do meu projeto. Por toda a ajuda oferecida durante o segundo semestre de 2020 nas semanas de experimento e pela sua amizade.

À toda a equipe de pesquisadores do professor Maurício e demais colegas do Genoma, que, de alguma forma, com certeza contribuíram com esse trabalho durante esses dois anos. Em especial, à Gi, por todo o suporte, disponibilidade e auxílio para o melhor andamento do projeto.

Ao grupo de pesquisa Zeblab, por toda a troca de experiências nesses dois anos. Em especial, à Stefani e professora Carla Bonan, pela colaboração com os experimentos deste trabalho.

À banca de defesa aprovação do Projeto de Pesquisa e suas contribuições: Dra. Fernanda Bueno Morrone (PUCRS) e Dr. Jarbas Rodrigues De Oliveira (PUCRS).

À banca de defesa dessa Dissertação, por terem aceitado o convite para avaliação: Dr. Eduardo Pacheco Rico (UNESC), Fernanda Bueno Morrone (PUCRS) e Dr. José María Monserrat (FURG).

À Bruna Caldas Remédio, por todo o suporte e auxílio na Secretaria Acadêmica do PPGBCM.

Ao meu namorado Alexandre, pelo apoio incondicional em todos os momentos, por sempre acreditar em mim quando muitas vezes eu não o fazia.

À minha família, sobretudo mãe e pai (*in memoriam*), que me apoiaram para realizar esse sonho.

Aos meus amigos, pela confiança no meu potencial, incentivo e companheirismo de sempre para todos os momentos.

RESUMO

Os agrotóxicos são definidos primariamente como substâncias químicas, físicas ou biológicas, que atuam no controle de organismos vivos considerados prejudiciais à agricultura, aos animais domésticos e ao próprio ser humano, e estão cada vez mais presentes no nosso cotidiano, sob diversas apresentações. Atualmente, o Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de alimentos do mundo e (consequentemente) é o maior consumidor de agrotóxicos mundialmente. O manejo agrícola para a produção em massa de alimentos, inclui o uso dessas substâncias, aumentando a preocupação com os riscos ambientais que esses produtos podem trazer para os recursos naturais e para biota, que podem vir a se contaminar com esses xenobióticos. Nesse sentido, o uso de organismos-modelo para avaliar os riscos *in vivo* é essencial e principal característica da ecotoxicologia. Neste trabalho foram investigados os efeitos letais e subletais da exposição aguda ao inseticida carbamato metomil em formulação comercial, utilizando embriões e larvas de *zebrafish* como organismo-modelo. Inicialmente determinou-se a CL₅₀ em 96h, e partir desta, as faixas de concentrações subletais de exposição. Na exposição subletal, foram analisados parâmetros de sobrevivência, eclosão; movimento espontâneo da cauda (STC); frequência cardíaca; morfologia; comportamento locomotor; atividade e expressão gênica da acetilcolinesterase (AChE). A exposição ao metomil afetou quase a totalidade dos parâmetros morfológicos, resultando em larvas com menor tamanho do corpo e dos olhos, falha na inflação da bexiga natatória e presença de deformidades. Parâmetros comportamentais também apresentaram significativas alterações: menor distância percorrida, velocidade, aceleração máxima, maior latência para entrar na periferia, menor frequência de mudança entre zonas, maior ângulo de giro e meandro. Além disso, a atividade biológica da AChE diminuiu de maneira dependente da concentração, enquanto sua expressão gênica não foi alterada. O conjunto de dados corroboram o efeito (neuro)tóxico do metomil, com potencial para alterar parâmetros biológicos essenciais para a sobrevivência de organismos não-alvo, mesmo em concentrações subletais.

Palavras-chave: Metomil; Agrotóxicos carbamatos; FET; Morfologia *zebrafish*; Comportamento *zebrafish*; Ecotoxicologia.

ABSTRACT

Pesticides are primarily defined as chemical, physical, or biological substances that act in the control of living organisms considered harmful to agriculture, domestic animals and human. Currently, Brazil is one of the largest food producers and exporters in the world and (consequently), the largest consumer of pesticides worldwide. As a large producer, Brazil has substantial areas of land destined for this purpose. Agricultural management for mass food production include the use of such substances, raising environmental risks concerns on natural resources and biota that may become contaminated with these xenobiotics. In this sense, use of model organisms to assess risks *in vivo* is essential and a main characteristic of ecotoxicology field. In this work, lethal and sublethal effect of the carbamate insecticide methomyl commercial formulation exposure in zebrafish embryos and larvae. The 96h-LC₅₀ was determine and then, sublethal concentration ranges specified. Sublethal exposures were analyzed in terms of survival; hatching; spontaneous tail coiling (STC); heart rate; morphology; locomotor behavior and acetylcholinesterase (AChE) activity and *ache* gene expression. Methomyl exposure affected almost all morphological parameters, resulting in larvae with smaller body and eyes size and swimming bladder inflation failure. Behavioral parameters also presented significant changes: shorter traveled distance, speed, maximum acceleration; greater latency to enter the periphery, less frequency of change between zones, higher absolute turn angles and meanders. In addition, AChE activity decreased in a concentration-dependent manner, while no changes in *ache* gene expression were observed. Together, results corroborate that the (neuro)toxic effect of methomyl, and its potential to alter essential biological parameters for the survival of non-target organisms, even in sublethal concentrations.

Keywords: Methomyl; Carbamates Pesticides; FET; Zebrafish Morphology; Zebrafish Behavior; Ecotoxicology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Produção agrícola e consumo de agrotóxicos e fertilizantes químicos nas lavouras.....	14
Figura 2 – Consumo de agrotóxicos e afins no Brasil entre 2000 e 2014 (por tonelada de ingrediente ativo).	15
Figura 3 – Série histórica de aprovação de agrotóxicos no Brasil.	16
Figura 4 – Número de agrotóxicos identificados em amostras de água nos municípios brasileiros.	17
Figura 5 – Fórmula química estrutural do metomil.	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção agrícola brasileira de 2002 a 2011, em milhões de hectares. 13

Tabela 2 – Dez ingredientes ativos mais vendidos no Brasil em 2014 (em toneladas).

.....20

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	11
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 CENÁRIO BRASILEIRO DO USO DE AGROTÓXICOS	12
1.2 OS AGROTÓXICOS CARBAMATOS	17
1.3 A IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS	20
1.4 CONTRIBUIÇÃO DE ESTUDOS ANTERIORES COM O METOMIL	21
2. OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
CAPÍTULO 2	25
Acute toxicity of methomyl commercial formulation induces morphological and behavioral changes in larval zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	26
CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
REFERÊNCIAS	34
ANEXOS	38
ANEXO 1 – Carta de aprovação CEUA	38

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

1.1 CENÁRIO BRASILEIRO DO USO DE AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos – também chamados de pesticidas, praguicidas, biocidas ou defensivos agrícolas – são definidos como substâncias físicas, químicas ou biológicas que são usados para “proteger” plantas ou animais de seres vivos considerados prejudiciais à agricultura, ao ambiente natural, urbano ou doméstico (BRASIL, 1989; BRASIL, 2002). Eles surgiram no período entre as duas Guerras Mundiais (PELAEZ, V.; TERRA; SILVA, 2014), sendo o DDT (diclorodifeniltricloroetano) a primeira dessas substâncias a ser sintetizada, no ano de 1929, quando sua produção se deu com o objetivo de ser uma arma de guerra (CARNEIRO *et al.*, 2015; SANTOS, 2009). Alguns anos após o fim da Segunda Guerra Mundial (em 1950), ocorreu o movimento na Europa e Estados Unidos da América (EUA) chamado de “Revolução Verde”, que teve como característica principal a mudança na forma em que a agricultura passou a ser utilizada, com a inserção de equipamentos e substâncias que pudessem facilitar o manejo das culturas, diminuir os custos e aumentar sua rentabilidade, como por exemplo, maquinários agrícolas, fertilizantes químicos, plantas geneticamente selecionadas e uso de agrotóxicos (BORSOI *et al.*, 2014; CARNEIRO *et al.*, 2015; CARVALHO; NODARI; NODARI, 2017; LOPES; ALBUQUERQUE, 2018; PELAEZ, V. M. *et al.*, 2017). É nesse cenário pós-Guerra que o Brasil, um pouco mais tarde, também iniciou esse movimento (CARNEIRO *et al.*, 2015; PELAEZ, V. M. *et al.*, 2017; PELAEZ, V.; TERRA; SILVA, 2014).

A Revolução Verde chegou ao Brasil somente a partir dos anos 1960-1970 e seu maior impulso foi nos anos 1990, quando o governo federal optou por incentivar o uso dessas substâncias e movimentar a economia com programas de incentivo à agricultura (CARNEIRO *et al.*, 2015; LOPES; ALBUQUERQUE, 2018; PELAEZ, V.; TERRA; SILVA, 2014). Sendo assim, apesar de o Brasil ter começado mais tarde a modernizar sua agricultura, hoje o país se destaca por ser um dos maiores produtores de agriculturáveis do mundo (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018) e, nesse contexto, cabe salientar que o controle de “pragas” na produção agrícola do país se torna cada vez mais dependente do uso de agrotóxicos.

Desde 2008, o Brasil tem sido considerado o país que mais faz uso de agrotóxicos no mundo, ultrapassando o até então líder nessa categoria, os EUA

(BOMBARDI, 2017; CARNEIRO *et al.*, 2015; CARVALHO; NODARI; NODARI, 2017; LOPES; ALBUQUERQUE, 2018). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012 *apud* CARNEIRO *et al.*, 2015) e Observatório da Indústria de Agrotóxicos da Universidade Federal do Paraná (2012, *apud* CARNEIRO *et al.*, 2015), as vendas de pesticidas a nível mundial cresceram em torno de 93%, enquanto no Brasil cresceram 190%, se comparados com o ano de 2002. Esse crescente aumento, principalmente no Brasil, se deve ao crescimento da demanda de alimentos (SAATH; FACHINELLO, 2018; SANTOS, 2009) respectivo ao aumento populacional no mundo, assim, tornando o Brasil um grande exportador de produtos da agricultura (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018), principalmente soja e milho (CARNEIRO *et al.*, 2015).

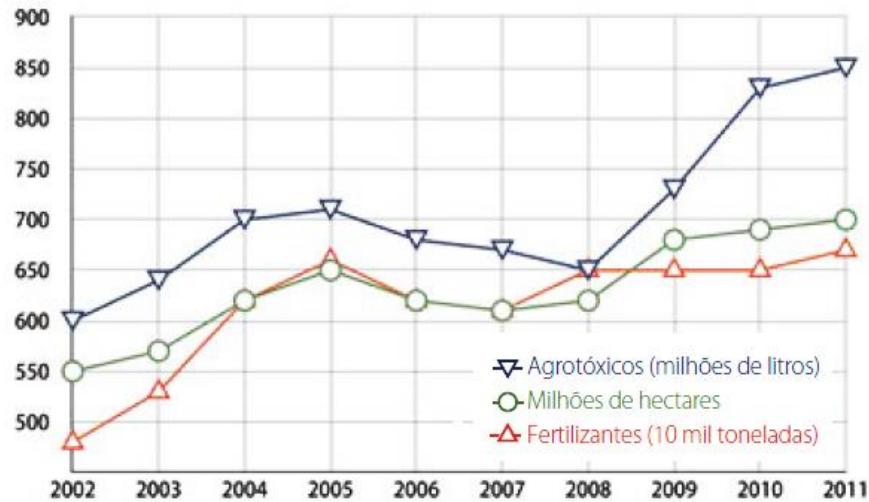
Na Tabela 1 estão disponíveis os dados relacionados ao território que é usado para a produção agrícola brasileira ao longo de uma década (2002 – 2011). Verifica-se que as culturas de soja e milho são os principais produtos da agricultura do país, ficando em terceiro lugar a cana-de-açúcar. Além disso, as culturas de cana-de-açúcar e soja destacam-se por terem tido um maior aumento do território cultivado nessa década analisada. Na Figura 1, também se observa que ao longo dos anos o uso de agrotóxicos nas lavouras cresceu de acordo com o aumento de área cultivada, acentuando-se a partir do ano de 2009.

Tabela 1 – Produção agrícola brasileira de 2002 a 2011, em milhões de hectares.

	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Algodão	0,8	0,7	1,2	1,3	0,9	1,1	1,1	1,2	1,4	1,7
Arroz	3,2	3,2	3,8	4,0	3,0	2,9	2,9	2,8	2,9	2,8
Borracha	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
Café	2,4	2,4	2,4	2,3	2,3	2,3	2,3	2,2	2,1	2,2
Cana	5,2	5,4	5,6	5,8	6,4	7,1	8,2	9,5	10,0	11,0
Feijão	4,3	4,4	4,3	4,0	4,2	4,0	4,0	4,0	4,3	3,7
Mandioca	1,7	1,6	1,8	1,9	2,0	1,9	2,0	2,1	1,8	1,8
Milho	12,3	13,3	12,9	12,2	13,0	14,0	14,7	15,5	13,6	13,6
Soja	16,4	18,5	21,6	23,4	22,1	20,6	21,1	21,6	22,2	22,7
Sorgo	0,5	0,8	0,9	0,8	0,7	0,7	0,8	1,1	0,8	0,7
Trigo	2,2	2,6	2,8	2,4	1,8	1,9	2,4	2,6	2,4	2,2
Citrus	0,9	1,0	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
Outros	4,5	4,5	4,7	5,1	5,1	4,9	4,8	4,8	6,4	7,8
Total	54,5	58,5	63	64,3	62,6	62,3	65,3	68,4	69	71,2

Fonte: IBGE/SIDRA (1998-2011) e MAPA (2010) *apud* Carneiro *et al.*, 2015 (adaptado).

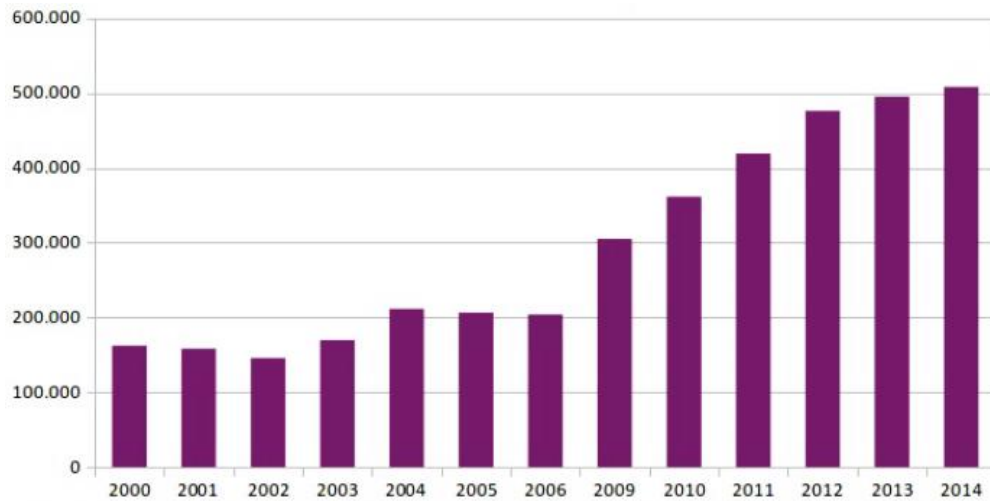
Figura 1 – Produção agrícola e consumo de agrotóxicos e fertilizantes químicos nas lavouras.



Fonte: SINDAG (2009; 2011), ANDA (2011), IBGE/SIDRA (1998-2011) e MAPA (2010) *apud* Carneiro *et al.*, 2015.

Os dados apresentados acima apontam o uso dos agrotóxicos durante a última década e início da atual. Como a Figura 1 aponta, esse aumento no uso de agrotóxicos, se deve, provavelmente, ao aumento da área de cultivo e também pela inserção na agricultura das plantas transgênicas e a sua resistência aos herbicidas, sobretudo ao mais utilizado atualmente: o glifosato (BOMBARDI, 2017; CARNEIRO *et al.*, 2015; KARAM *et al.*, 2018). Além desses fatores, a pressão seletiva que os agrotóxicos exercem sobre os organismos-alvo também deve ser levada em consideração (KARAM *et al.*, 2018), pois cada vez mais necessita-se de novas formulações para atender a demanda de seres vivos invasores resistentes aos agrotóxicos já existentes (CARNEIRO *et al.*, 2015), o que acaba criando um ciclo vicioso e aumentando o uso de substâncias tóxicas dos mais variados tipos no meio ambiente. A Figura 2 exemplifica esse ciclo que ao longo dos anos mostra uma curva ascendente no uso dos agrotóxicos no país.

Figura 2 – Consumo de agrotóxicos e afins no Brasil entre 2000 e 2014 (por tonelada de ingrediente ativo).

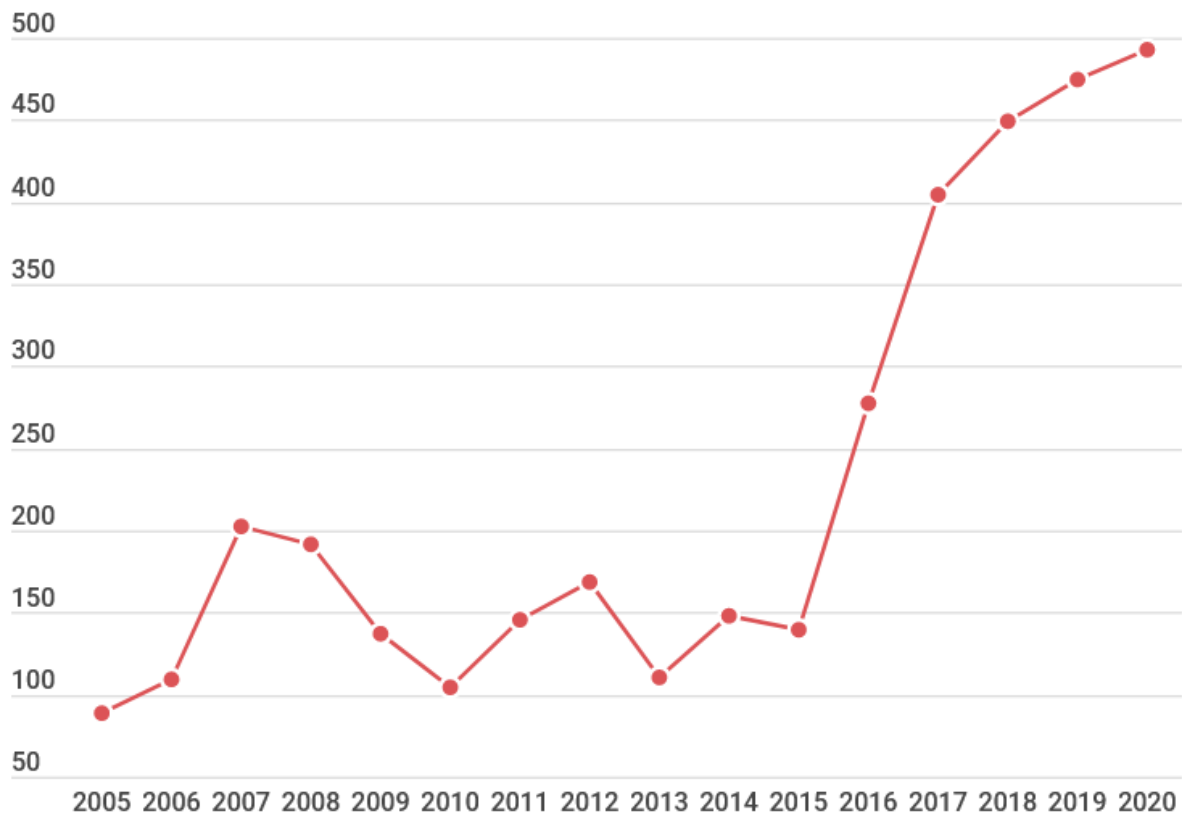


Fonte: IBAMA / Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto nº 4.074/2002 (*apud* BOMBARDI, 2017).

Em 2019, o governo federal brasileiro iniciou uma agenda de autorização rápida de produção de novos agrotóxicos no país (GREENPEACE BRASIL, 2019; LUÍSA MELO, 2019). Somente naquele ano, foram autorizados para comercialização mais novos agrotóxicos do que durante os 14 anos anteriores, representando um aumento de 445%, se comparado com 2005, quando se começou a se registrar esses dados (MARCELO KERVALT, 2019). Além disso, em 2020, o Brasil quebrou o recorde do número de registro de agrotóxicos desde que se iniciou a série histórica. Foram aprovados para comercialização 493 produtos, um aumento de 4% quando comparado com 2019 (G1, 2021).

Apesar do número expressivo, a maioria das autorizações realizadas são de agrotóxicos que já existiam no Brasil. Dessa forma, essas autorizações referem-se a novos produtos comerciais, fabricados por novos laboratórios, mas com princípios ativos que já estavam aprovados. A Figura 3 ilustra os números supracitados, constatando-se que, nos últimos quatro anos, houve um aumento expressivo de liberação de novos produtos para comercialização.

Figura 3 – Série histórica de aprovação de agrotóxicos no Brasil.

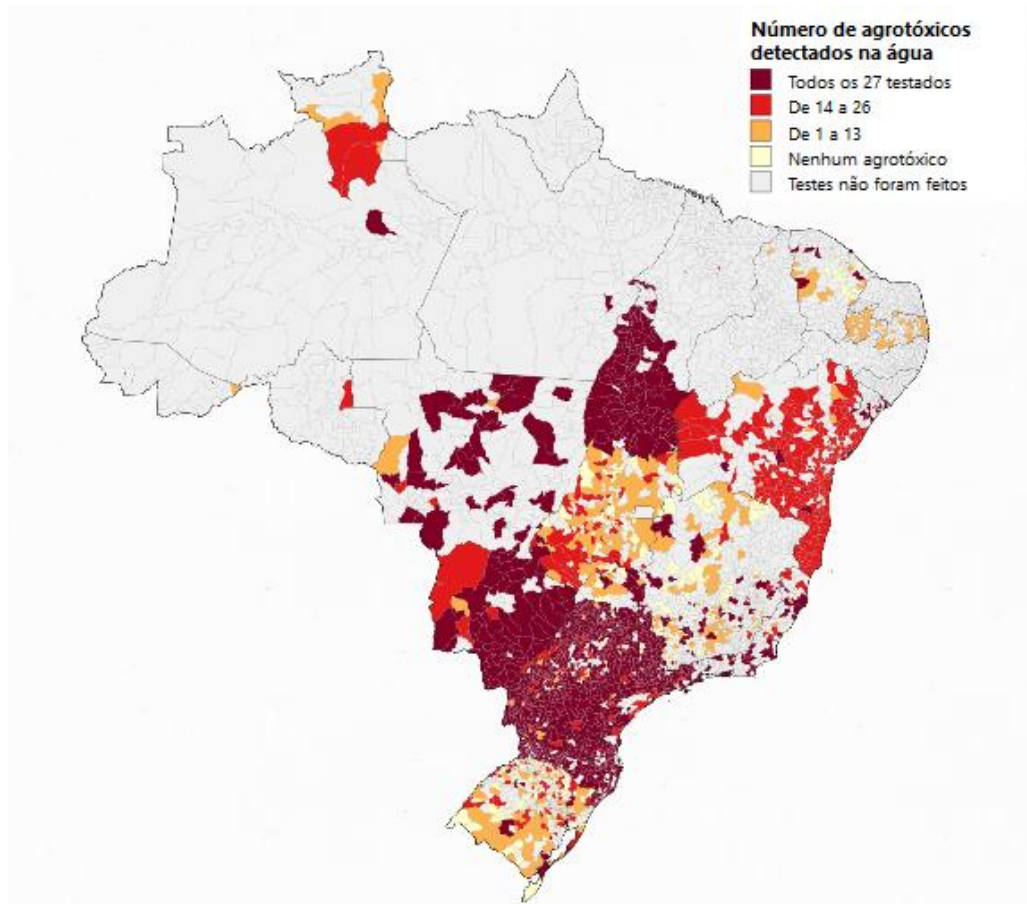


Fonte: ONG Repórter Brasil, 2021.

A partir dos dados apresentados, podemos nos preocupar com as consequências que a maior disponibilidade e uso de pesticidas podem trazer para a saúde ambiental e da biota. Um estudo publicado em 2019 em conjunto pela Organização Não-Governamental (ONG) Repórter Brasil, a agência de jornalismo investigativo “Agência Pública” e a organização suíça *Public Eye* mostrou que, a água potável de vários municípios do Brasil tem apresentado resíduos de agrotóxicos, e alguns, inclusive, com limites acima do permitido pela Anvisa e pela regulamentação europeia (ANA ARANHA; LUANA ROCHA, 2019). Os dados sobre resíduos de agrotóxicos nos municípios brasileiros estão disponíveis no portal “*Por trás do alimento*” (<https://portrasdoalimento.info/agrotoxico-na-agua/#>). Nesse *website*, que é de domínio das três organizações citadas, pode-se pesquisar a situação em cada município, com os agrotóxicos que foram detectados nas análises e as amostras que mostraram níveis acima dos recomendados de resíduos destas substâncias. A cidade de Porto Alegre – RS, por exemplo, teve 27 tipos de agrotóxicos identificados entre os anos de 2014 e 2017, sendo 11 deles relacionados a doenças crônicas como o câncer,

defeitos congênitos e distúrbios endócrinos. Contudo, nenhum dos pesticidas identificados ultrapassaram os limites permitidos pela legislação brasileira de concentração na água. Na Figura 4 pode-se verificar o estado atual de resíduos de pesticidas no território brasileiro e percebe-se que as regiões Sul (Santa Catarina e Paraná), Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e São Paulo), e o Tocantins, no Norte, são as regiões que mais tiveram agrotóxicos detectados nesse estudo.

Figura 4 – Número de agrotóxicos identificados em amostras de água nos municípios brasileiros.



Fonte: Controle do Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (SISAGUA), do Ministério da Saúde (2018) *apud* "Por trás do alimento".

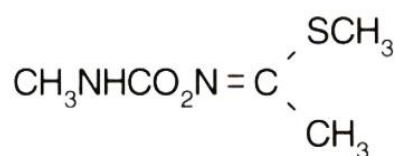
1.2 OS AGROTÓXICOS CARBAMATOS

Os carbamatos são um grupo de agrotóxicos que atuam, principalmente, na inibição reversível da enzima acetilcolinesterase (AChE). Essa é a principal enzima do sistema colinérgico e tem como função essencial a degradação da acetilcolina –

um importante neurotransmissor do sistema nervoso autônomo e também das junções neuromusculares (ALTENHOFEN, 2017; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014; SANTOS, 2009; VENTURA *et al.*, 2010) –, impedindo o acúmulo de acetilcolina na sinapse, o que causa hiperexcitabilidade devido a transmissão contínua e descontrolada dos impulsos nervosos; resultando na paralisação dos músculos, impedindo a respiração e levando à morte o organismo por falta de oxigênio no cérebro (BOSGRA *et al.*, 2009; ALBERTS *et al.*, 2011; BULA BRILHANTEBR, [2011]; GUANGGANG *et al.*, 2013; LAU; KARRAKER; LEUNG, 2015; MENG *et al.*, 2014a, 2014b, 2016, 2017, 2019; NUSAIR *et al.*, 2019; REN *et al.*, 2017; SANTOS, 2009; SELEEM, 2019; SILVA, 2013; TRACHANTONG *et al.*, 2016).

O metomil (S-methyl-N-[(methylcarbamoyl)oxy]thioacetimidate) é um pesticida pertencente ao grupo dos carbamatos, sintetizado pela primeira vez em 1966; e desde então, muito usado no mundo inteiro como um inseticida e acaricida de contato e ingestão de amplo espectro, principalmente para o controle de pragas em vegetais (BOSGRA *et al.*, 2009; GUANGGANG *et al.*, 2013; HAYES JR.; LAWS JR., 1991; LAU; KARRAKER; LEUNG, 2015; MENG *et al.*, 2014a, 2014b, 2016, 2017, 2019; NUSAIR *et al.*, 2019; REN *et al.*, 2017; SANTOS, 2009; SELEEM, 2019; SILVA, 2013; TRACHANTONG *et al.*, 2016). Esse inseticida pode ser empregado para uma gama de culturas, tais como, o algodão, arroz, aveia, batata, brócolis, café, centeio, cevada, couve, dendê, feijão, milheto, milho, repolho, soja, sorgo, tomate, trigo e triticaie (ANVISA, 2019). Além disso, pode ser aplicado em pré-plantio nas culturas de soja e milho (ANVISA, 2019). O metomil possui como fórmula química $C_5H_{10}N_2O_2S$ (Figura 5). Ele se apresenta na sua forma pura como um sólido cristalino com um leve odor sulfuroso. Seu ponto de fusão é de 78 a 79°C e possui solubilidade a 25°C de 5,8% em água, 22% em isopropanol, 42% em etanol, 73% em acetona e 100% em metanol (HAYES JR; LAWS JR.; 1991).

Figura 5 – Fórmula química estrutural do metomil.



Em relação à periculosidade ambiental, o metomil comercial pertence à Categoria 2 da nova classificação toxicológica brasileira vigente, ou seja, o produto é considerado muito perigoso ao meio ambiente. No que concerne a esse aspecto, a bula do produto comercial BrilhanteBR[®] informa que o produto é altamente móvel, indicando alto potencial de deslocamento no solo, e, conseqüentemente, alto risco de contaminação para lençóis freáticos. Em águas superficiais e solos, metomil apresenta uma rápida degradação, de no máximo sete dias, pois altas temperaturas e a luz solar podem auxiliar nesse processo, ao contrário do que se encontra nas condições de águas subterrâneas. Nesse sentido, Carbo *et al.* (2008) analisaram amostras de águas subterrâneas próximas a lavouras de cultura de algodão na cidade de Primavera do Leste, no Estado do Mato Grosso – Brasil, e demonstraram por meio da metodologia de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Rede de Diodos (CLAE/DAD) que dos doze pesticidas analisados, oito deles foram detectados nas amostras, incluindo o metomil, detectado com uma concentração de 22,81 µg/L (CARBO *et al.*, 2008). Esse valor é em torno de setenta vezes maior se comparado com o estabelecido para o carbaril (outro agrotóxico carbamato), cujo limite ambiental estabelecido é de 0,32 µg/L pela Resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (BRASIL, 2005).¹

Segundo o relatório de comercialização de agrotóxicos em 2014 do Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama), que mostra os 10 princípios ativos mais vendidos, o metomil aparece no 9º lugar desse ranking (Tabela 2). No entanto, de acordo com o relatório de vendas de agrotóxicos nas Unidades Federativas para o ano de 2019, o metomil se encontrava em 17º lugar nas vendas nacionais, num total de 89 ingredientes ativos disponíveis para comercialização.

¹ Não existe valor estabelecido pelo CONAMA 357/2005 para o metomil.

Tabela 2 – Dez ingredientes ativos mais vendidos no Brasil em 2014 (em toneladas).

Ingrediente Ativo	Vendas Ingrediente Ativo	Ranking
Glifosato e seus sais	194.877,84	1º
2,4-D	36.513,55	2º
Acefato	26.190,52	3º
Óleo mineral	25.632,86	4º
Clorpirifós	16.452,77	5º
Óleo vegetal	16.126,71	6º
Atrazina	13.911,37	7º
Mancozebe	12.273,86	8º
Metomil	9.801,11	9º
Diurom	8.579,52	10º

Fonte: IBAMA (2016) / Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto nº 4.074/2002.

1.3 A IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS

A Ecotoxicologia se ocupa dos estudos da interação de componentes xenobióticos e o impacto que estas substâncias antropogênicas podem causar nos organismos que vivem nos mais variados ambientes (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014; KLAASSEN; WATKINS, 2012). É uma área interdisciplinar e se beneficia de estudos dos mais variados campos do conhecimento, como a geologia, a farmacologia, a toxicologia, a química analítica, a ecologia, a bioquímica, a biologia molecular e a estatística (OGA; CAMARGO, BATISTUZZO, 2014). O termo “Ecotoxicologia” foi usado pela primeira em 1969 (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008) e desde então, esta área vem se tornando cada vez mais importante para avaliar o risco que certas substâncias podem ocasionar, principalmente, na biota. Nesse sentido, os organismos-modelo são essenciais, para que estudos mais aprofundados sejam feitos de avaliação de impacto ambiental, quando muitas vezes somente a análise de parâmetros físico-químicos da água, por exemplo, se tornam insuficientes (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014; KLAASSEN; WATKINS, 2012).

Dentre os contaminantes antropogênicos mais comuns, os agrotóxicos ocupam uma posição de destaque em relação à sua periculosidade de contaminação ambiental (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014), com alto potencial de impacto nos recursos naturais, como águas superficiais e subterrâneas, e conseqüentemente, contaminação de organismos vivos que aí vivem (PARWEEN; JAN, 2019). Portanto,

avaliar e prever quais serão os efeitos destes produtos em organismos, populações, comunidades e ecossistemas é indispensável (KLAASSEN, WATKINS, 2012).

1.4 CONTRIBUIÇÃO DE ESTUDOS ANTERIORES COM O METOMIL

Em um estudo de Meng *et al.* (2014), os pesquisadores avaliaram os efeitos crônicos que o metomil poderia vir a causar em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), em seu sistema antioxidante. Os resultados que estes autores encontraram foram que as atividades de glutathione-S-transferase (GST), glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx) e os níveis de glutathione oxidada (GSSG) acompanhada por uma diminuição nos níveis de glutathione reduzida (GSH) em exposição às concentrações de metomil de 2, 20 ou 200 µg/L, depois de 30 dias (com posterior recuperação das tilápias em água sem metomil por 18 dias) induziu o aumento nas taxas de GST, GR, GPx e GSSH em 150,87%, 163,21%, 189,76% e 179,56%, respectivamente, comparados com o controle. A taxa de inibição de GSH foi de 50,67% comparado com o controle. Segundo os autores, todas essas alterações indicam que o metomil causou estresse oxidativo no animal testado (MENG *et al.*, 2014a).

Outro estudo de Meng *et al.* (2014), avaliou as atividades das enzimas hepáticas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Eles mostraram que a exposição dos animais a doses de metomil de 2, 20 e 200 µg/L durante 30 dias (com posterior recuperação das tilápias em água sem metomil por 18 dias) demonstraram que as atividades hepáticas de SOD e CAT foram afetadas significativamente, com o aumento da atividade destas duas enzimas em 197,56% e 355,67%, respectivamente, no grupo de maior concentração, quando comparado com o controle (MENG *et al.*, 2014b).

Guanggang *et al.* (2013) demonstraram por meio de teste cometa alcalino, que o metomil induz quebras no DNA de fita simples de células *in vitro* expostas em concentrações subletais, sendo que as quebras foram maiores em concentrações maiores, ou seja, dose-dependentes (GUANGGANG *et al.*, 2013). Em outro estudo, Silva (2013) mostrou que a formulação comercial do metomil foi mutagênico pelo teste de micronúcleo em camundongos, nas doses de 0,005 mg/kg e 0,0005 mg/kg ($p < 0,05$). O mesmo autor também demonstrou pelo teste cometa que o metomil induziu dano significativo ao DNA dos camundongos na dose de 0,005 mg/kg ($p < 0,05$) (SILVA, 2013).

Santos (2009) avaliou a toxicidade aguda (em 96h) do metomil sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em *zebrafish* adultos. Na avaliação in vitro da AChE, como era de se esperar, o metomil causou a inibição da enzima nas variadas concentrações. Na concentração de 0,01 mg/L a atividade da AChE foi de 50,60%; na concentração de 0,02 mg/L de metomil foi de 37,34%; e na concentração de 0,2 mg/L a atividade foi de 31,27%. Além disso, a autora também avaliou as alterações comportamentais do *zebrafish*, os quais mostraram nas primeiras horas após o início da exposição: extensões repetidas das nadadeiras, disparos de natação, tremores, dobramento da espinha dorsal, abrimento e fechamento bucal repetitivos, diminuição da capacidade natatório, natação horizontal, movimentos natatórios circulares, migração dos peixes para a superfície do aquário e ausência de movimento em alguns peixes (SANTOS, 2009).

Yoon *et al.* (2016) avaliaram a toxicidade do metomil (e da metidationa) em *zebrafish* adultos por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR). Os autores buscaram por meio desta metodologia, avaliar a existência de metabólicos no metabolismo da colina, resultantes da alteração da hidrólise da acetilcolina. Dessa forma, chegaram à conclusão, por meio da correlação de Pearson, que a colina mostra forte correlação positiva com acetato ($r > 0,9$, $p < 0,0001$) e betaína ($r > 0,85$, $p < 0,001$) em peixes no controle sem a adição dos pesticidas. Os tratamentos com os pesticidas do estudo mostraram mudanças nessas correlações positivas, levando a valores nulos ($r < 0,78$) (YOON *et al.*, 2016).

Seleem (2019), avaliou os efeitos teratogênicos e neurotóxicos induzidos por metomil em girinos de uma espécie de sapo (*Bufo arabicus*). Nesse estudo, o autor demonstrou que os girinos expostos ao metomil mostraram hiperatividade, agitação extrema, natação anormal, e cauda com torções, quando comparados com o controle. Além disso, os girinos apresentaram escoliose nos estágios 25 e 37; cifose com regressão caudal retardada e redução da ossificação das falanges de dígitos para ambos os membros anteriores e posteriores nos girinos no estágio 40 expostos ao metomil. Além desses aspectos, mudanças de ordem histopatológica e imuno-histoquímica também foram detectados, levando assim a conclusão pelo autor, que o metomil tem efeitos teratogênicos e neurotóxicos nessa espécie de anfíbio (SELEEM, 2019).

E para concluir, apesar de não existir estudos que avaliem os efeitos adversos do metomil em embriões e larvas de *zebrafish*, um estudo de Schock *et al.* (2012)

avaliou os efeitos do carbaril nos estágios de desenvolvimento de *zebrafish*. Carbaril faz parte do mesmo grupo de inseticidas que o metomil e possui valores de detecção limites (0,32 µg/L) para a legislação brasileira (CONAMA Nº 357/2005). Os autores demonstraram que larvas de *zebrafish* expostas ao carbaril tiveram mudanças na sua morfologia normal, especialmente no tamanho e forma do embrião. Esse agrotóxico também causou alterações na formação do coração, caracterizado pelo decréscimo na taxa dos batimentos cardíacos e um atraso no desenvolvimento do ciclo cardíaco. Além disso, houve um declínio no número de neurônios na medula espinal e um aumento na morte de células nesses animais (SCHOCK *et al.*, 2012).

Com o objetivo de avaliar os danos que possivelmente o metomil poderia causar em organismos não-alvo, para este trabalho foi escolhido como organismo-modelo o *zebrafish* (*Danio rerio*), que nos últimos anos tem se consolidado como um modelo experimental bastante sensível para estudos toxicológicos. As vantagens do uso desta espécie na pesquisa científica já são bem conhecidos e incluem: menor demanda física e menor custo de manutenção que roedores; reprodução por fertilização externa numerosa; presença de dimorfismo sexual; alta similaridade anatômica e genômica com os humanos; e rápido desenvolvimento embrionário, com embriões transparentes, o que facilita as mais variadas metodologias (ALTENHOFEN, 2017; ALTENHOFEN *et al.*, 2017, 2019; BRIDI *et al.*, 2017; DA SILVA ACOSTA *et al.*, 2016; DAMMSKI *et al.*, 2011; LEITE *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2011; SANTOS, 2009; SCHOCK *et al.*, 2012; YOON *et al.*, 2016). Além disso, por se tratar de um organismo aquático, esse modelo biológico se torna ainda mais valioso, pois pode representar os efeitos que certos contaminantes podem causar em organismos que entram em contato direto com águas contaminadas (PARWEEN; JAN, 2019). Dessa forma, a hipótese para este estudo é de que o metomil, mesmo em concentrações subletais, poderia causar alterações no desenvolvimento inicial do *zebrafish*, com alterações funcionais, morfológicas, comportamentais, na atividade e expressão gênica da AChE.

2. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar os efeitos adversos do metomil, em uma formulação comercial, nos estágios iniciais de desenvolvimento do *zebrafish* sobre os parâmetros morfológicos, funcionais, comportamentais, moleculares e bioquímicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração letal mediana (CL₅₀) para embriões de *zebrafish*;
- Avaliar o efeito da exposição de diferentes concentrações do metomil em embriões e larvas de *zebrafish* perante os seguintes parâmetros:
 - Taxas de sobrevivência e eclosão ao longo de seis dias de exposição;
 - Eventos de movimento espontâneo da cauda (STC) de embriões de 1 dia pós-fertilização (dpf);
 - Frequência cardíaca de larvas de 2 dpf;
 - Morfologia das larvas de 5 dpf;
 - Atividade locomotora das larvas de 6 dpf;
- Analisar a atividade biológica da acetilcolinesterase (AChE) em larvas de 6 dpf por meio de ensaio enzimático;
- Avaliar a expressão gênica de *ache* em larvas de 6 dpf, por meio de RT-qPCR.

CAPÍTULO 2
ARTIGO CIENTÍFICO EM PREPARAÇÃO

Acute toxicity of methomyl commercial formulation induces morphological and behavioral changes in larval zebrafish (*Danio rerio*)

Camilo Alexandre Jablonski ^{a,b}; Talita Carneiro Brandão Pereira ^{a,b*}; Lilian De Souza Teodoro ^{a,b};
Stefani Altenhofen ^{a,c}; Carla Denise Bonan ^{a,b,c,d}; Maurício Reis Bogo ^{a,b,c,d,**}

^a Laboratory of Genomics and Molecular Biology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), School of Health and Life Sciences. Av. Ipiranga, 6681. CEP: 90.619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, PUCRS. Av. Ipiranga, 6681. CEP: 90.619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Neurochemistry and Psychopharmacology Laboratory, School of Health and Life Sciences, PUCRS, Av. Ipiranga, 6681. CEP: 90.619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

^d Graduate Program in Medicine and Health Sciences, PUCRS. Av. Ipiranga, 6690. CEP: 90.610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail addresses: camilo.aj@hotmail.com (C.A. Jablonski); talitapereira@gmail.com (T.C.B. Pereira); lilians.souza.teodoro@gmail.com (L.S. Teodoro); stefani.altenhofen@edu.pucrs.br (S. Altenhofen); cbonan@pucrs.br; (C.D. Bonan); mbogo@pucrs.br (M.R. Bogo).

* **Corresponding author:** Laboratory of Genomics and Molecular Biology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), School of Health and Life Sciences. Av. Ipiranga, 6681. CEP: 90.619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail address: talitapereira@gmail.com (T.C.B. Pereira).

** **Corresponding author:** Laboratory of Genomics and Molecular Biology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), School of Health and Life Sciences. Av. Ipiranga, 6681. CEP: 90.619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail address: mbogo@pucrs.br (M.R. Bogo).

Abbreviations:

a.i.: active ingredient

AChE: acetylcholinesterase

Dpf: days post-fertilization

FET: fish embryo acute toxicity test

Hpf: hours post-fertilization

LC₅₀: median lethal concentration

M1: 0.5 mg/L a.i. of methomyl

M2: 1.0 mg/L a.i.

M3: 2.2 mg/L a.i.

M4: 4.8 mg/L a.i.

M5: 10.6 mg/L a.i.

M6: 23.3 mg/L a.i.

MSDS: Material Safety Data Sheet

STC: spontaneous tail coiling

Abstract

The use of pesticides has continue grown over recent years, leading to several environmental concerns, such as the contamination of surface and groundwater resources and associated biota, potentially affecting populations that are not primary targets of these xenobiotics. In this sense, environmental risk assessment is imperative, and the use of model organisms to evaluate these threats *in vivo* is an essential tool. In this work we investigate lethal and sublethal effects of acute exposure of methomyl in commercial formulation in zebrafish embryo and larvae. Methomyl is a broad-spectrum carbamate insecticide and acaricide that acts primarily in acetylcholinesterase inhibition (AChE). Methomyl 96h-LC₅₀ was determined through the *Fish Embryo Acute Toxicity Test* (FET). Sublethal 6-day exposure was performed in six methomyl (a.i.) nominal concentrations (0.5; 1.0; 2.2; 4.8; 10.6; 23.3 mg/L) to evaluate developmental, functional, morphological, behavioral, biochemical, and molecular endpoints of zebrafish early-development. Methomyl affected embryo hatching and larval morphology and behavior, especially in higher concentrations; resulting in smaller body and eyes size, failure in swimming bladder inflation, hypolocomotor activity, and concentration-dependent reduction in AChE activity; demonstrating methomyl strong acute toxicity and neurotoxic effect.

Keywords: Carbamate Pesticides; FET; Zebrafish Morphology; Zebrafish Behavior; Ecotoxicology; LC₅₀

ARTIGO EM PREPARAÇÃO. DADOS MANTIDOS SOB SIGILO.

References

- Bachour, R.L., Golovko, O., Kellner, M., Pohl, J., 2020. Behavioral effects of citalopram, tramadol, and binary mixture in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Chemosphere* 238, 124587. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124587>
- Beekhuijzen, M., de Koning, C., Flores-Guillén, M.E., de Vries-Buitenweg, S., Tobor-Kaplon, M., van de Waart, B., Emmen, H., 2015. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. *Reprod. Toxicol.* 56, 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.06.050>
- Blahova, J., Cocilovo, C., Plhalova, L., Svobodova, Z., Faggio, C., 2020. Embryotoxicity of atrazine and its degradation products to early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 77, 103370. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103370>
- Bournele, D., Beis, D., 2016. Zebrafish models of cardiovascular disease. *Heart Fail. Rev.* 21, 803–

813. <https://doi.org/10.1007/s10741-016-9579-y>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Braga, A.R.C., de Rosso, V.V., Harayashiki, C.A.Y., Jimenez, P.C., Castro, Í.B., 2020. Global health risks from pesticide use in Brazil, *Nature Food*. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0100-3>
- Burri, N.M., Weatherl, R., Moeck, C., Schirmer, M., 2019. A review of threats to groundwater quality in the anthropocene. *Sci. Total Environ.* 684, 136–154. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.236>
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Chen, L., 2020. Visual system: An understudied target of aquatic toxicology. *Aquat. Toxicol.* 225, 105542. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105542>
- Cheng, B., Zhang, H., Hu, J., Peng, Y., Yang, J., Liao, X., Liu, F., Guo, J., Hu, C., Lu, H., 2020. The immunotoxicity and neurobehavioral toxicity of zebrafish induced by famoxadone-cymoxanil. *Chemosphere* 247, 125870. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125870>
- Cook, L.W., Paradise, C.J., Lom, B., 2005. The pesticide malathion reduces survival and growth in developing zebrafish. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1745–1750. <https://doi.org/10.1897/04-331R.1>
- Costa, K.M., Pereira, T.C.B., Valente, C.A., Pissinate, K., Soares, J.C., Cruz, F.F., Corte, T.W.F., Machado, P., Basso, N.R.S., Bogo, M.R., 2019. Adverse effects of p-TSA-doped polypyrrole particulate exposure during zebrafish (*Danio rerio*) development. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 177, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.041>
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Fernandes, C.L.F., Volcão, L.M., Ramires, P.F., Moura, R.R. De, Da Silva Júnior, F.M.R., 2020. Distribution of pesticides in agricultural and urban soils of Brazil: A critical review. *Environ. Sci. Process. Impacts* 22, 256–270. <https://doi.org/10.1039/c9em00433e>
- Gerlai, R.T., 2020. The design of behavioral screening in zebrafish. *Behav. Neural Genet. Zebrafish* 513–526. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817528-6.00029-2>
- Glaberman, S., Padilla, S., Barron, M.G., 2017. Evaluating the zebrafish embryo toxicity test for pesticide hazard screening. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 1221–1226. <https://doi.org/10.1002/etc.3641>
- Guanggang, X., Diqiu, L., Jianzhong, Y., Jingmin, G., Huifeng, Z., Mingan, S., Liming, T., 2013. Carbamate insecticide methomyl confers cytotoxicity through DNA damage induction. *Food Chem. Toxicol.* 53, 352–358. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.12.020>
- Jin, M., Zhang, X., Wang, L., Huang, C., Zhang, Y., Zhao, M., 2009. Developmental toxicity of bifenthrin in embryo-larval stages of zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 95, 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.10.003>
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Klüver, N., König, M., Ortmann, J., Masei, R., Paschke, A., Kühne, R., Scholz, S., 2015. Fish embryo toxicity test: Identification of compounds with weak toxicity and analysis of behavioral effects to improve prediction of acute toxicity for neurotoxic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 49, 7002–7011. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01910>
- Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T., 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute

- toxicity test? *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 149, 196–209.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.11.006>
- Lanzarin, G.A.B., Félix, L.M., Santos, D., Venâncio, C.A.S., Monteiro, S.M., 2019. Dose-dependent effects of a glyphosate commercial formulation – Roundup® UltraMax - on the early zebrafish embryogenesis. *Chemosphere* 223, 514–522.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.071>
- Liu, X.Y., Zhang, Q.P., Li, S.B., Mi, P., Chen, D.Y., Zhao, X., Feng, X.Z., 2018. Developmental toxicity and neurotoxicity of synthetic organic insecticides in zebrafish (*Danio rerio*): A comparative study of deltamethrin, acephate, and thiamethoxam. *Chemosphere* 199, 16–25.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.176>
- Material Safety Data Sheet (MSDS) BrillhanteBR, 2011.
- Meng, S.L., Chen, J.Z., Hu, G.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*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 101, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.10.020>
- Mu, X., Chai, T., Wang, K., Zhu, L., Huang, Y., Shen, G., Li, Y., Li, X., Wang, C., 2016. The developmental effect of difenoconazole on zebrafish embryos: A mechanism research. *Environ. Pollut.* 212, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.035>
- OECD, 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidel. Test. Chem. Sect. 2, OECD Publ. 1–22. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
- Ogungbemi, A., Leuthold, D., Scholz, S., Küster, E., 2019. Hypo- or hyperactivity of zebrafish embryos provoked by neuroactive substances: a review on how experimental parameters impact the predictability of behavior changes. *Environ. Sci. Eur.* 31. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0270-5>
- Ogungbemi, A.O., Teixeira, E., Massei, R., Scholz, S., Küster, E., 2020. Optimization of the spontaneous tail coiling test for fast assessment of neurotoxic effects in the zebrafish embryo using an automated workflow in KNIME®. *Neurotoxicol. Teratol.* 81.
<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2020.106918>
- Parween, T., Jan, S., 2019. Pesticides and environmental ecology, *Ecophysiology of Pesticides*.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817614-6.00001-9>
- Pathak, N.H., Barresi, M.J.F., 2019. Zebrafish as a model to understand vertebrate development, *The Zebrafish in Biomedical Research: Biology, Husbandry, Diseases, and Research Applications*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00045-2>
- Paumgarten, F.J.R., 2020. Pesticides and public health in Brazil. *Curr. Opin. Toxicol.* 22, 7–11.
<https://doi.org/10.1016/j.cotox.2020.01.003>
- Pereira, T.C.B., Batista dos Santos, K., Lautert-Dutra, W., de Souza Teodoro, L., de Almeida, V.O., Weiler, J., Homrich Schneider, I.A., Reis Bogo, M., 2020. Acid mine drainage (AMD) treatment by neutralization: Evaluation of physical-chemical performance and ecotoxicological effects on zebrafish (*Danio rerio*) development. *Chemosphere* 253, 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126665>
- Pereira, V.M., Bortolotto, J.W., Kist, L.W., Azevedo, M.B. de, Fritsch, R.S., Oliveira, R. da L., Pereira, T.C.B., Bonan, C.D., Vianna, M.R., Bogo, M.R., 2012. Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology* 33, 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.03.005>
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45–e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Postlethwait, J.H., Braasch, I., 2019. Zebrafish genetics. *Zebrafish Biomed. Res. Biol. Husbandry, Dis. Res. Appl.* 25–39. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00003-8>
- Pretty, J., 2018. Intensification for redesigned and sustainable agricultural systems. *Science* (80-.). 362. <https://doi.org/10.1126/science.aav0294>

- Robertson, G.N., McGee, C.A.S., Dumbarton, T.C., Croll, R.P., Smith, F.M., 2007. Development of the swimbladder and its innervation in the zebrafish, *Danio rerio*. *J. Morphol.* 268, 967–985. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jmor.10558>
- Sánchez-Bayo, F., 2012. Insecticides Mode of Action in Relation to Their Toxicity to Non-Target Organisms. *J. Environ. Anal. Toxicol.* s4. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.s4-002>
- Seleem, A.A., 2019. Teratogenicity and neurotoxicity effects induced by methomyl insecticide on the developmental stages of *Bufo arabicus*. *Neurotoxicol. Teratol.* 72, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2018.12.002>
- Stelzer, J.A.A., Rosin, C.K., Bauer, L.H., Hartmann, M., Pulgati, F.H., Arenzon, A., 2018. Is fish embryo test (FET) according to OECD 236 sensible enough for delivering quality data for effluent risk assessment? *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 2925–2932. <https://doi.org/10.1002/etc.4215>
- Tang, R., Dodd, A., Lai, D., McNabb, W.C., Love, D.R., 2007. Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 39, 384–390. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00283.x>
- Yang, L., Ivantsova, E., Souders, C.L., Martyniuk, C.J., 2021. The agrochemical S-metolachlor disrupts molecular mediators and morphology of the swim bladder: Implications for locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 208, 111641. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111641>
- Yoon, D., Kim, Siwon, Lee, M., Yoon, C., Kim, Suhkmann, 2016. 1H-NMR-based metabolomic study on toxicity of methomyl and methidathion in fish. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 51, 824–831. <https://doi.org/10.1080/03601234.2016.1208460>
- Yue, M.S., Peterson, R.E., Heideman, W., 2015. Dioxin inhibition of swim bladder development in zebrafish: Is it secondary to heart failure? *Aquat. Toxicol.* 162, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.02.016>
- Zhang, S., Xu, J., Kuang, X., Li, S., Li, X., Chen, D., Zhao, X., Feng, X., 2017. Biological impacts of glyphosate on morphology, embryo biomechanics and larval behavior in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 181, 270–280. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.094>
- Zhu, X.Y., Wu, Y.Y., Xia, B., Dai, M.Z., Huang, Y.F., Yang, H., Li, C.Q., Li, P., 2020. Fenobucarb-induced developmental neurotoxicity and mechanisms in zebrafish. *Neurotoxicology* 79, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.03.013>
- Zindler, F., Beedgen, F., Braunbeck, T., 2019. Time-course of coiling activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to ethanol as an endpoint for developmental neurotoxicity (DNT) – Hidden potential and underestimated challenges. *Chemosphere* 235, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.154>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o avanço tecnológico da sociedade, cada vez mais novas substâncias antropogênicas são expostas no meio ambiente, trazendo riscos para as populações de seres vivos que fazem parte do ecossistema, incluindo o ser humano. A poluição é um dos maiores desafios da humanidade atualmente, e o atual sistema agrícola é um dos fatores críticos para o agravamento da contaminação de solos e recursos hídricos. Além da expansão das áreas de cultivo que trazem a redução de florestas, como aconteceu com a Mata Atlântica e Cerrado, e que acontece atualmente com a Floresta Amazônica, a agricultura hoje tem ainda como um outro impacto o uso de agroquímicos, sendo os agrotóxicos os maiores vilões. O Brasil é o país que mais faz uso de agrotóxicos no mundo, com atual aumento progressivo na aprovação de novos agrotóxicos para comercialização. O aumento no uso destas substâncias no nosso país já tem se refletido sobre a qualidade da água potável dos municípios, e, portanto, se faz urgente avaliar as consequências da exposição à essas substâncias, a fim de evitar danos aos organismos vivos como um todo.

O metomil é um potente inseticida, e amplamente utilizado não somente na agricultura, mas também no uso doméstico para o controle de infestação de aracnídeos e moscas. Até esse momento, estudos desse ingrediente são escassos e, assim, se torna importante saber suas consequências em organismos não-alvo. Nesse sentido, o *zebrafish* já é bem consolidado como um organismo-modelo sensível e confiável para estudos de toxicidade, e muito adequado no contexto deste trabalho, por ser a água o principal potencial meio de contaminação pelo metomil para outros organismos.

A CL_{50} do metomil para embriões de *zebrafish* foi maior que aquela encontrada na FISPQ do produto para adultos. Alguns trabalhos já demonstraram que os embriões de *zebrafish* podem não ser tão sensíveis para compostos neurotóxicos, como apresentado no Capítulo 2. Apesar de certa resistência à letalidade, exposição a concentrações subletais demonstram alta toxicidade aguda do metomil, especialmente nas larvas de *zebrafish*. Parâmetros avaliados nos primeiros estágios de desenvolvimento, como movimento espontâneo da cauda (STC) e frequência cardíaca, não apresentam alterações significativas após exposição ao metomil, exceto quanto à taxa de eclosão, que apresentou antecipação da eclosão de embriões, de forma concentração dependente. Na fase larval, praticamente todos os parâmetros

morfológicos e comportamentais avaliados apresentaram alterações significativas. Sob aspectos morfológicos, as larvas expostas ao metomil apresentaram menor comprimento do corpo e o tamanho dos olhos foi menor em todos os grupos; e nos grupos de maior concentração de metomil, M5 e M6, menor distância entre olhos, indicando, possivelmente, um menor tamanho da cabeça. Adicionalmente, identificou-se falha, ou atraso, no processo de inflar a bexiga natatória em todos os grupos expostos ao metomil. Em conjunto, tais alterações certamente contribuíram ao comportamento hipolocomotor observado nas larvas. A exposição ao metomil demonstrou diminuir a distância percorrida pelas larvas; a velocidade média e máxima aceleração; diminuiu o estado de alta mobilidade; além de aumentar os ângulos absoluto de giro e de meandro absoluto, indicando não apenas que apresentaram menor comportamento locomotor, mas com trajetória de deslocamento comprometido. A indicação de efeito neurotóxico do metomil foi ainda reforçado pela redução na atividade da AChE, que ocorreu de forma concentração-dependente, e sem contribuição de regulação transcricional.

Assim, é possível hipotetizar que, em condições ambientais, a prole do *zebrafish* teria dificuldades de sobrevivência, impedindo inclusive de atingir a fase adulta. Por exemplo, prejuízos no sistema visual, na bexiga natatória e no tamanho do corpo das larvas podem diminuir as chances de sobrevivência desses animais em um cenário natural. A morfologia está ligada ao comportamento locomotor, logo, na presença de prejuízos e até deformidades morfológicas, haverá prejuízos na locomoção desses animais, podendo experimentar uma maior dificuldade para fugir de predadores, buscar de alimentos ou habitat seguro.

Apesar de o metomil ter alterado vários padrões dos estágios iniciais de desenvolvimento do *zebrafish*, não é possível precisar que os danos registrados para esse período se perpetuam até a vida adulta. Este estudo propôs avaliar o efeito de exposição aguda ao metomil nestes animais, porém, ainda é desconhecido o efeito após a retirada desse contaminante da água; como por exemplo, uma possível recuperação dos animais. Nesse sentido, estudos que avaliem a recuperação e até estudos transgeracionais de animais expostos ao metomil seriam interessantes ferramentas para avaliar efeitos de curtas exposições à longo prazo. Adicionalmente, estudos para aprofundar os potenciais mecanismos envolvidos em tais alterações, como por exemplo, um possível envolvimento de mecanismos de estresse oxidativo,

ou danos no DNA; vias de sinalização importante em exposição à diferentes contaminantes.

Finalmente, este trabalho demonstrou que o *zebrafish* é um organismo sensível para a exposição ao metomil em concentrações subletais, especialmente no estágio larval, a partir de dados inéditos na literatura contribuindo elucidação de efeitos adversos deste tipo de composto, cada vez mais presentes em nosso cotidiano e que podem trazer sérios riscos para as populações de seres vivos silvestres, bem como para a saúde do ser humano.

REFERÊNCIAS

- ALTENHOFEN, Stefani *et al.* Dichlorvos alters morphology and behavior in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 245, p. 1117–1123, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.095>
- ALTENHOFEN, Stefani. **Envolvimento dos sistemas purinérgico, colinérgico e dopaminérgico na neurotoxicidade induzida por metais e agrotóxicos em peixe-zebra (*Danio rerio*)**. 1–60 f. 2017. - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS, [s. l.], 2017. Disponível em: <http://meriva.pucrs.br:8080/dspace/handle/10923/10606>
- ALTENHOFEN, Stefani *et al.* Tebuconazole alters morphological, behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, [s. l.], v. 180, p. 483–490, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.029>
- ANA ARANHA; LUANA ROCHA. **“Coquetel” com 27 agrotóxicos foi achado na água de 1 em cada 4 municípios**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://reporterbrasil.org.br/2019/04/coquetel-com-27-agrotoxicos-foi-achado-na-agua-de-1-em-cada-4-municipios/>. Acesso em: 13 jul. 2019.
- BOMBARDI, Larissa Mies. **Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil**. 1ªed. São Paulo: FFLCH - USP, 2017. *E-book*.
- BORSOI, Augustinho *et al.* Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente. **Acta Iguazu**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 64–72, 2014. Disponível em: <http://e-revista.unioeste.br/index.php/actaiguazu/article/view/8392/6203>
- BOSGRA, Sieto *et al.* Toxicodynamic analysis of the inhibition of isolated human acetylcholinesterase by combinations of methamidophos and methomyl in vitro. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 236, n. 1, p. 1–8, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.01.002>
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA - RESOLUÇÃO No 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005 Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63. [s. l.], p. 58–63, 2005.
- BRIDI, Daiane *et al.* Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. **Toxicology**, [s. l.], v. 392, n. July, p. 32–39, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.10.007>
- BRUCE ALBERTS *et al.* **Fundamentos da Biologia Celular**. 3. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2011.
- CARBO, Leandro *et al.* Determination of pesticides multiresidues in shallow groundwater in a cotton-growing Region of Mato Grosso, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 1111–1117, 2008.
- CARNEIRO, Fernando Ferreira *et al.* **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro/São Paulo: RJ: EPSJV; SP: Expressão Popular, 2015. *E-book*.
- CARVALHO, Miguel Mundstock Xavier de; NODARI, Eunice Sueli; NODARI, Rubens Onofre. “Defensivos” ou “agrotóxicos”? História do uso e da percepção dos

agrotóxicos no estado de Santa Catarina, Brasil, 1950-2002. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 75–91, 2017. Disponível em: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S0104-59702017000100002>

DA SILVA ACOSTA, Daiane *et al.* Copper at low levels impairs memory of adult zebrafish (*Danio rerio*) and affects swimming performance of larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 185–186, p. 122–130, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.03.008>

DAMMSKI, Ana Paula *et al.* **Zebrafish - Manual de criação em biotério**. 1. ed. Curitiba: UFPR, 2011. *E-book*.

G1. **Número de agrotóxicos registrados em 2020 é o mais alto da série histórica; maioria é genérico, diz governo | Agronegócios | G1**. [S. l.], 2021.

Disponível em:

<https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2021/01/14/numero-de-agrotoxicos-registrados-em-2020-e-o-mais-alto-da-serie-historica-maioria-e-produto-generico.ghtml>. Acesso em: 26 fev. 2021.

GOVERNO ACELERA LIBERAÇÃO DO USO DE NOVOS AGROTÓXICOS NO PAÍS. Apresentado por Jornal Nacional. Brasil: Rede Globo, 2019. Disponível em: <https://g1.globo.com/jornal-nacional/noticia/2019/06/28/governo-acelera-liberacao-do-uso-de-novos-agrotoxicos-no-pais.ghtml>. Acesso em: 11 jul. 2019.

GREENPEACE BRASIL. **Três meses de veneno - Greenpeace Brasil**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://www.greenpeace.org/brasil/blog/tres-meses-de-veneno/>. Acesso em: 10 jul. 2019.

GUANGGANG, Xiang *et al.* Carbamate insecticide methomyl confers cytotoxicity through DNA damage induction. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 53, p. 352–358, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.12.020>

KARAM, Décio *et al.* Situação Atual da Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas nos Sistemas Agrícolas. *In*: PAES, Maria Cristina Dias; PINHO, Renzo Garcia Von; MOREIRA, Silvino Guimarães (org.). **Soluções integradas para os sistemas de produção de milho e sorgo no Brasil: livro de palestras**. 1. ed. Sete Lagoas, MG: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2018. p. 932. *E-book*.

LAU, Edward Tak Chuen; KARRAKER, Nancy Elizabeth; LEUNG, Kenneth Mei Yee. Temperature-dependent acute toxicity of methomyl pesticide on larvae of 3 Asian amphibian species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [s. l.], v. 34, n. 10, p. 2322–2327, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/etc.3061>

LEITE, Carlos Eduardo *et al.* Involvement of purinergic system in inflammation and toxicity induced by copper in zebrafish larvae. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 272, n. 3, p. 681–689, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.08.001>

LOPES, Carla Vanessa Alves; ALBUQUERQUE, Guilherme Souza Cavalcanti de. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, [s. l.], v. 42, n. 117, p. 518–534, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-1104201811714>

LUÍSA MELO. **Ritmo de liberação de agrotóxicos em 2019 é o maior já**

registrado. [S. l.], 2019. Disponível em:

<https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2019/05/26/ritmo-de-liberacao-de-agrotoxicos-em-2019-e-o-maior-ja-registrado.ghtml>. Acesso em: 10 jul. 2019.

MAGALHÃES, Danielly de Paiva; FERRÃO-FILHO, Aloysio da Silva. a Ecotoxicologia Como Ferramenta No Biomonitoramento De Ecossistemas Aquáticos. **Oecologia Australis**, [s. l.], v. 12, n. 03, p. 355–381, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.4257/oeco.2008.1203.02>

MARCELO KERVALT. **Liberação de agrotóxicos no Brasil é a maior em 14 anos.** Porto Alegre, 2019. Disponível em: <https://gauchazh.clicrbs.com.br/economia/campo-e-lavoura/noticia/2019/06/liberacao-de-agrotoxicos-no-brasil-e-a-maior-em-14-anos-cjwjs4f1203at01oi1ew0o9en.html>. Acesso em: 11 jul. 2019.

MENG, Shun Long *et al.* Effect of Chronic Exposure to Methomyl on Tissue Damage and Apoptosis in Testis of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Recovery Pattern. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, [s. l.], v. 102, n. 3, p. 371–376, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2522-2>

MENG, Shun Long *et al.* Effect of methomyl on sex steroid hormone and vitellogenin levels in serum of male tilapia (*Oreochromis niloticus*) and recovery pattern. **Environmental Toxicology**, [s. l.], v. 32, n. 7, p. 1869–1877, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/tox.22409>

MENG, Shun Long *et al.* Effects of chronic exposure of methomyl on the antioxidant system in liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 101, n. 1, p. 1–6, 2014a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.10.020>

MENG, Shun Long *et al.* Hepatic antioxidant enzymes SOD and CAT of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to pesticide methomyl and recovery pattern. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, [s. l.], v. 92, n. 4, p. 388–392, 2014b. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1232-7>

MENG, Shun Long *et al.* Responses and recovery pattern of sex steroid hormones in testis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of methomyl. **Ecotoxicology**, [s. l.], v. 25, n. 10, p. 1805–1811, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1726-7>

NUSAIR, S. D. *et al.* Methomyl induced effect on fortilin and S100A1 in serum and cardiac tissue: Potential biomarkers of toxicity. **Human and Experimental Toxicology**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 371–377, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0960327118814153>

PARWEEN, Talat; JAN, Sumira. **Pesticides and environmental ecology.** [S. l.: s. n.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817614-6.00001-9>

PELAEZ, Victor Manoel *et al.* A (des)coordenação de políticas para a indústria de agrotóxicos no Brasil. **Revista Brasileira de Inovação**, [s. l.], v. 14, p. 153, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.20396/rbi.v14i0.8649104>

PELAEZ, Victor; TERRA, Fábio Henrique Bittes; SILVA, Letícia Rodrigues da. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. **Revista de Economia**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 27–48, 2014.

Disponível em: <https://doi.org/10.5380/re.v36i1.20523>

PEREIRA, Talita Carneiro Brandão *et al.* Zebrafish as a Model Organism to Evaluate Drugs Potentially Able to Modulate Sirtuin Expression. **Zebrafish**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 9–16, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/zeb.2010.0677>

REN, Qing *et al.* The Role of AChE in Swimming Behavior of *Daphnia magna* : Correlation Analysis of Both Parameters Affected by Deltamethrin and Methomyl Exposure . **Journal of Toxicology**, [s. l.], v. 2017, p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2017/3265727>

SAATH, Kleverton Clovis de Oliveira; FACHINELLO, Arlei Luiz. Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, [s. l.], v. 56, n. 2, p. 195–212, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1234-56781806-94790560201>

SANTOS, Paula Ivani Medeiros dos. **Avaliação da Toxicidade Aguda do inseticida metomil e o seu efeito sobre a atividade da Acetilcolinesterase do Peixe Danio rerio**. 0–65 f. 2009. - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, [s. l.], 2009. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/12489>

SCHOCK, Elizabeth N. *et al.* The Effects of Carbaryl on the Development of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos . **Zebrafish**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 169–178, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0747>

SELEEM, Amin A. Teratogenicity and neurotoxicity effects induced by methomyl insecticide on the developmental stages of *Bufo arabicus*. **Neurotoxicology and Teratology**, [s. l.], v. 72, n. November 2018, p. 1–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2018.12.002>

SILVA, Hugo Gama Aguiar. **Avaliação genotóxica dos pesticidas metomil e cipermetrina: efeitos agudos in vivo avaliação genotóxica dos pesticidas metomil e cipermetrina : efeitos agudos in vivo**. 1–26 f. 2013. - Universidade Federal de Pernambuco, [s. l.], 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/10559>

TRACHANTONG, Waret *et al.* Lethal and sublethal effects of a methomyl-based insecticide in *Hoplobatrachus rugulosus*. **Journal of Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 15–24, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1293/tox.2016-0039>

VENTURA, Ana L. M. *et al.* Cholinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 66–72, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-60832010000200007>

YOON, Dahye *et al.* 1H-NMR-based metabolomic study on toxicity of methomyl and methidathion in fish. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, [s. l.], v. 51, n. 12, p. 824–831, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03601234.2016.1208460>

ANEXOS

ANEXO 1 – Carta de aprovação CEUA



SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 9593

Porto Alegre, 18 de dezembro de 2019

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Avaliação dos Efeitos Adversos da Exposição ao Agrotóxico Metomil nos Estágios Iniciais de Desenvolvimento do Zebrafish (Danio rerio)" coordenado por MAURICIO REIS BOGO.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Duração do Projeto: 18/12/2019 - 18/02/2021

Nº de Animais	Espécie
10114	Danio rerio
Total de Animais: 10114	

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br