

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

Taisson Kroth Thomé da Cruz

**EFEITOS DE FORMULAÇÕES CONTENDO CLOMAZONE® SOBRE
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, CITOGENÉTICOS E
COMPORTAMENTAIS EM PEIXE-ZEBRA (*DANIO RERIO*).**

Santa Maria, RS
2020

Taisson Kroth Thomé da Cruz

**EFEITOS DE FORMULAÇÕES CONTENDO CLOMAZONE® SOBRE
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, CITOGENÉTICOS E COMPORTAMENTAIS EM
PEIXE-ZEBRA (*DANIO RERIO*).**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora Prof. Dra. Vania Lucia Loro

Santa Maria, RS

CRUZ, TAISSON KROTH THOME
EFEITOS DE FORMULAÇÕES CONTENDO CLOMAZONE® SOBRE
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, CITOGENÉTICOS E COMPORTAMENTAIS
EM PEIXE-ZEBRA (DANIO RERIO) / TAISSON KROTH THOME CRUZ.
2020.

67 p.; 30 cm

Orientador: Vania Lucia Loro
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2020

1. Dano Oxidativo 2. Micronúcleo 3. Parâmetros
Comportamentais 4. Genotoxicidade I. Loro, Vania Lucia
II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, TAISSON KROTH THOME CRUZ, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Taisson Kroth Thomé da Cruz

**EFEITOS DE FORMULAÇÕES CONTENDO CLOMAZONE® SOBRE
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, CITOGENÉTICOS E COMPORTAMENTAIS EM
PEIXE-ZEBRA (*DANIO RERIO*).**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

Aprovado em 20 de novembro de 2020

Vania Lucia Loro, Dra. (UFSM)
Presidente/Orientadora
(vídeoconferência)

Denis Broock Rosemberg, Dr. (UFSM)
(vídeoconferência)

Bárbara Estevão Clasen, Dra. (UERGS)
(vídeoconferência)

Santa Maira, RS
2020

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação a Deus, pois sem Ele não somos nada!

Dedico em especial aos meus pais, Ivalter, o seu Tute, e Lenir, que nunca mediram esforços para que eu chegasse até aqui, sendo o primeiro da família com graduação e com pós-graduação, saiba que vocês são meu tudo, meu porto seguro!

Aos meus amigos, que muitas vezes tinham que aturar meu mau humor, meu **MUITO OBRIGADO!** Principalmente por existirem em minha vida!

Dedico ao meu irmão de coração, que nos deixou em 2018, no início da construção do meu sonho de me tornar mestre, a ti Carlos M. K. Korb, meu irmão, meu amigo, te dedico essa dissertação.

Dedico ainda, essa dissertação, ao grande Mestre, amigo, colega de profissão, que há pouco nos deixou, indo passar seus conhecimentos em outro plano. Obrigado pelas conversas, pelo incentivo em não desistir da carreira acadêmica, dedico a ti, meu amigo, Msc. Volnei A. Teixeira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Ivalter e Lenir, pelo apoio, incentivo, dedicação que sempre tiveram comigo, me apoiando nas minhas escolhas, escolhas essas que, me permitiram chegar até aqui, e me tornar Mestre, o meu mais sincero e profundo MUITO OBRIGADO!

À minha família, em especial minha nonna, Sra. Cândida T. Kroth, que sempre me apoiou nessa caminhada, muito obrigado.

Agradeço à prof. Dra. Vania L. Loro, pela orientação, e ensinamentos que possibilitaram que essa dissertação fosse escrita, meu muito obrigado.

À prof. Dra. Bárbara E. Clasen, e ao prof. Dr. Denis B. Rosemberg, que aceitaram avaliar e contribuir como membros da banca, muito obrigado pelas críticas, sugestões, todas são em prol do crescimento pessoal e profissional, muito obrigado.

Aos meus professores, da Escola Estadual de Ensino Fundamental Alice Couto, aos professores da Escola Técnica Estadual 25 de Julho, aos Mestres e Doutores da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ e da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, meu muito obrigado, pois cada um contribuiu desde a alfabetização até eu me tornar mestre! Em especial, agradeço a Prof. Dra. Mara Lisiane Tissot-Squalli, que durante a graduação, “puxou” minhas orelhas, aconselhando, criticando, fazendo-me crescer muito, como pessoa, como profissional, e que lá em 2018, me possibilitou fazer um estágio na UFSM, meu muito obrigado. A prof. Dra. Inaiara R. de Oliveira, que além de ser amiga, me orientou no não tão temido TCC, não se negando em trabalhar nos seus turnos e dias de folgas, para que pudéssemos fazer um trabalho, até então, inédito dentro do Curso de Ciências Biológicas, meu muito obrigado. Ao prof. Dr. Denis B. Rosemberg, que em 2018, possibilitou o estágio em seu laboratório, fazendo que despertasse meu amor pela Bioquímica, meu muito obrigado.

Aos meus amigos que ao longo desses 30 anos de vida, pude ter a oportunidade de cultivar verdadeiras amizades, em especial ao grupo “A gang das antigas” e “Encerração”, meu sincero muito obrigado, por me aguentar, por me incentivar, por estarem ao meu lado nessa caminhada,

pelas jantas, conversas... (não citarei nomes, pois faltaria espaço para tantas pessoas especiais, mas saibam que, todos estão presentes em minha vida, cada um de uma maneira especial).

Às amigas que a UFSM me deu, em especial a Dra. Aline M. B. do Amaral e a Msc. Tamiris R. Storck, a “gang do Poti”, obrigado pelos ensinamentos, pelo apoio na elaboração e execução desse projeto, pelas longas conversas e rodas de chimarrão, meu muitíssimo obrigado (obs.: Tami, ainda quero carona tá).

À Dra. Vanessa A. de Quadros, que em 2018 me aceitou em “seu laboratório”, em seu apartamento, que mais tarde virou nosso apartamento, meu mais profundo obrigado, por me apresentar à Bioquímica de uma outra maneira, de uma maneira que fizesse com que eu me encantasse, e entrasse nessa área, tão temida, porém tão encantadora, meu muito obrigado.

Às colegas do 122, Ariane da Silveira e Letícia M. Kuhn, que “caíram de paraquedas” em minha vida, mas se tornaram pessoas muito especiais em minha vida, obrigado pelo apoio, incentivo, conversas, e que possamos manter essa amizade por longos anos.

Aos demais colegas do Laboratório de Toxicologia Aquática, que de uma forma ou de outra, foram colaboradores para a elaboração dessa dissertação, muito obrigado.

Agradeço, também, ao CNPq, pelo apoio financeiro recebido, a Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, por possibilitar o uso de equipamentos e espaços físicos que foram fundamentais para a execução da minha pesquisa. À equipe técnica do Laboratório de Análise de Pesticidas (LARP), da UFSM, que foram fundamentais para a execução desse trabalho, cedendo gentilmente amostras P.A do composto químico, bem como pela realização das análises de resíduos de agrotóxicos, meu mais profundo muito obrigado.

Agradeço às técnicas em laboratório do Laboratório de Microscopia II, da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ, Biólogas Katarine Patatt e Jaqueline Siede, pelo suporte e auxílio para a realização das fotografias de micronúcleo, meu muito obrigado.

Ao Msc. Manoel F. M. Lasses, pelo auxílio no preparo das lâminas de micronúcleo, sem tua ajuda, essa parte do projeto, não teria sido nada fácil, meu muito obrigado.

Por fim, a todos que de alguma maneira contribuíram para que esse sonho se tornasse realidade, muito obrigado.

Eles passarão...
Eu passarinho!

(Mário Quintana)

A experiência é o nome que damos aos nossos erros.

(Oscar Wilde)

RESUMO

EFEITOS DE FORMULAÇÕES CONTENDO CLOMAZONE[®] SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, CITOGENÉTICOS E COMPORTAMENTAIS EM PEIXE-ZEBRA (*DANIO RERIO*).

AUTOR: Taisson Kroth Thomé da Cruz

ORIENTADORA: Prof.^a. Dr.^a. Vania Lucia Loro

Maior consumidor de agrotóxicos do mundo desde 2009, o Brasil, consumiu cerca de 84% dos agrotóxicos vendidos na América Latina. O aumento do consumo, bem como a redução de matas ciliares, junto com o uso indiscriminado, pode acarretar a contaminação do solo, das águas e de seres não alvos desses agrotóxicos. O Clomazone[®], pertence à classe dos herbicidas, utilizado como controle de pragas pré-emergentes. O uso exacerbado de agrotóxicos, pode causar um desequilíbrio na produção de espécies reativas, podendo desencadear uma série de problemas, entre eles, alterações comportamentais, danos oxidativos e enzimáticos, bem como dano ao DNA e ao RNA. Neste sentido, pesquisas dos efeitos desse pesticida utilizando modelos alternativos como o peixe-zebra, são de extrema relevância em meio científico, tendo em vista que esse trabalho é, até então, pioneiro na relação peixe-zebra adulto *versus* Clomazone[®]/Gamit360CS[®]. Para avaliar os potenciais riscos toxicológicos do Clomazone[®] e do Gamit360CS[®], os animais foram expostos a cinco diferentes concentrações (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 mg/L⁻¹), por um período de 96h, além do grupo controle que não foi exposto. Para a análise de micronúcleo, foi utilizado tecido sanguíneo, com a técnica de esfregaço, as análises comportamentais, os animais foram acondicionados individualmente no aparato claro-escuro, onde foram observados os seguintes parâmetros comportamentais: latência entre as áreas, tempo na parte escura, transições entre as áreas do aparato e avaliação de risco. Foi observado diminuição nos níveis de AChE no tecido encefálico, em tecido. Nos níveis de GST, em tecido encefálico e branquial houve aumento dos níveis, em tecido muscular a GST apresentou resultados desuniforme. Quanto os danos oxidativos, a peroxidação lipídica, em tecido cerebral houve um aumento, já em tecido branquial houve um aumento significativo principalmente quando expostos em 10,0 mg/L⁻¹, em tecido muscular não houve diferença significativa nos resultados. Já os níveis de tióis não proteicos, não foi observado diferença nos resultados em todos os tecidos examinados. Os testes comportamentais apresentaram resultados de comportamento tipo ansiedade, pois houve aumento na latência entre as áreas do aparato, houve um aumento da escototaxia de dois grupos expostos ao herbicida, bem como o aumento da exploração de risco em um grupo exposto. Os testes de genotoxicidade para micronúcleo mostrou-se dentro da normalidade para micronúcleo, porém diversas anomalias nucleares do tipo Cariorrexe, indicando uma alta genotoxicidade do Gamit360CS[®]. Podemos concluir, que, tanto Clomazone[®] como Gamit360CS[®], apresentam níveis toxicidade. Dessa forma, o objetivo dessa dissertação foi verificar a toxicidade e genotoxicidade do herbicida Clomazone[®] e Gamit360CS[®], utilizando como organismo experimental o peixe-zebra. Para isso foi analisando dados comportamentais, atividade antioxidante de moléculas enzimáticas e não enzimáticas, e, danos lipídicos.

Palavras-chaves: Dano Oxidativo; Micronúcleo; Parâmetros Comportamentais; Genotoxicidade.

ABSTRACT

FORMULATIONS EFFECTS WITH CLOMAZONE ON BIOCHEMICAL, CYTOGENETICS STANDARD AND BEHAVIOR PARAMETERS IN ZEBRA FISH (*DANIO RERIO*)

AUTHOR: Taisson Kroth Thomé da Cruz

ADVISOR: Prof.^a. Dr^a. Vania Lucia Loro

The largest consumer of pesticides in the world since 2009, Brazil, consumed around 84% of the pesticides sold in Latin America. The increase in consumption, as well as the reduction of riparian forests, together with indiscriminate use, can lead to contamination of the soil, water and non-targets of these pesticides. Clomazone®, belongs to the herbicide class, used to control pre-emergent pests. The exacerbated use of pesticides can cause an imbalance in the production of reactive species, which can trigger a series of problems, including behavioral changes, oxidative and enzymatic damage, as well as damage to DNA and RNA. In this sense, research on the effects of this pesticide using alternative models such as zebrafish, are extremely relevant in scientific circles, considering that this work is, until then, a pioneer in the relationship between adult zebrafish versus Clomazone® / Gamit360CS®. To assess the potential toxicological risks of Clomazone® and Gamit360CS®, the animals were exposed to five different concentrations (0.5; 1.0; 2.5; 5.0 and 10.0 mg / L-1), by a 96h period, in addition to the control group that was not exposed. For the micronucleus analysis, blood tissue was used, with the smear technique, the behavioral analyzes, the animals were individually conditioned in the light-dark apparatus, where the following behavioral parameters were observed: latency between the areas, time in the dark, transitions between the areas of the apparatus and risk assessment. A decrease in AChE levels was observed in brain tissue, in tissue. In GST levels, in brain and gill tissue there was an increase in levels, in muscle tissue GST showed uneven results. Regarding oxidative damage, lipid peroxidation, there was an increase in brain tissue, whereas in branchial tissue there was a significant increase, especially when exposed to 10.0 mg / L-1, in muscle tissue there was no significant difference in the results. As for the levels of non-protein thiols, no difference in results was observed in all tissues examined. The behavioral tests showed results of anxiety-like behavior, as there was an increase in latency between the areas of the apparatus, there was an increase in the scototaxis of two groups exposed to the herbicide, as well as an increase in risk exploitation in an exposed group. Genotoxicity tests for micronucleus were found to be within the normal range for micronucleus, but several nuclear anomalies of the Cariorrexe type, indicating a high genotoxicity of Gamit360CS®. We can conclude that both Clomazone® and Gamit360CS® have toxicity levels. Thus, the objective of this dissertation was to verify the toxicity and genotoxicity of the herbicide Clomazone® and Gamit360CS®, using zebrafish as an experimental organism. For that, it was analyzing behavioral data, antioxidant activity of enzymatic and non-enzymatic molecules, and, lipid damage.

Keywords: Oxidative Damage; Micronucleus; Behavioral Parameters; Genotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do herbicida Clomazone® (composto puro) {2[(2-clorobenzil)]-4,4-dimetil-1,2-oxalidín-3-one}.....	16
Figura 2: Embalagem comercial do Gamit360CS®.....	17
Figura 3: Gráfico estatístico dos micronúcleos.....	48
Figura 4: Fotomicrografia de tecido sanguíneo.....	49
Figura 5: Fotomicrografia de tecido sanguíneo.....	50
Figura 6: Representação do aparato claro-escuro.....	51
Figura 7: Latência entre a parte escura e clara do aparato.....	52
Figura 8: Tempo gasto na área escura.....	52
Figura 9: Transição para área escura.....	53
Figura 10: Avaliação de risco.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Contagem das células, para observação dos micronúcleos.....	47
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

“**n**” – Número de indivíduos

μL – Microlitro

ACh - Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

cm – Centímetro

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CT: Grupo controle

D. rerio – *Danio rerio*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ER – Espécie/s reativa/s

ERO– Espécies Reativas de Oxigênio

Ex. – Exemplo

g – Grama

GS-DNB – S-(2,4-dinitrobenzyl) glutathione

GST – Glutathione transferase

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

HCl – Ácido Clorídrico

L – Litro

LARP – Laboratório de Análise de Resíduos de pesticidas

MDA - Malondialdeído

mg/L – Miligrama por Litro

mL – Mililitro

mM – Milimolar

NPSH – Do inglês – non-protein thiol (tióis não proteico)

O₂⁻ - Ânion Superóxido

°C – Graus Célsius

OH° - Grupo Hidroxila

pH – Potencial de Hidrogênio

RNA – Ácido Ribonucleico

RPM – Rotação por Minuto

T1: Tratamento 1 – 0,5 mg/L⁻¹

T2: Tratamento 2 – 1,0 mg/L⁻¹

T3: Tratamento 3 – 2,5 mg/L⁻¹

T4: Tratamento 4 – 5,0 mg/L⁻¹

T5: Tratamento 5 – 10,0 mg/L⁻¹

TBARS – Do inglês – thiobarbituric reactive substance (substância reativa ao ácido tiobarbitúrico)

UFMS – Universidade Federal de Santa Maria

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	15
2. INTRODUÇÃO	16
2.1 Agrotóxicos	16
2.1.2 Clomazone	16
2.2 Estresse Oxidativo	18
2.3 Sistema Colinérgico.....	19
2.4 Uso do peixe-zebra nos modelos de toxicidade.....	20
2.5 Análise Comportamental	20
2.5.1. Teste do aparato claro-escuro.....	20
2.6 Análise de Micronúcleo.....	21
3. JUSTIFICATIVA.....	22
4. HIPÓTESES	23
5. OBJETIVOS.....	24
5.1. Objetivo geral.....	24
5.2. Objetivos específicos.....	24
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
6.1 Manuscrito – 1	25
7. RESULTADOS ADICIONAIS.....	47
7.1 Micronúcleo.....	47
7.2 Comportamento	51
8. DISCUSSÃO.....	55
9. CONCLUSÃO	57
10. PERSPECTIVAS.....	58
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO CEUA	65
ANEXO B – LISTA DE TRABALHOS COLABORATIVOS DESENVOLVIDOS DURANTE O MESTRADO.....	66
ANEXO C – APROVAÇÃO DE PUBLICAÇÃO DE CAPÍTULO DE E-BOOK REDIGIDO COM DADOS DAS PESQUISAS DO MESTRADO.....	67

1 APRESENTAÇÃO

Esta Dissertação aborda assuntos relacionados aos efeitos do herbicida Clomazone[®] em sua formulação pura e em sua formulação comercial, o Gamit360CS[®], nos parâmetros bioquímicos e comportamentais do organismo experimental o peixe-zebra (*Danio rerio*). Ela encontra-se estruturada da seguinte forma:

Introdução: Revisão da literatura com caracterização dos temas abordados na dissertação.

Materiais e métodos, apresentados na forma de manuscrito científico e resultados complementares.

Conclusão, sobre os resultados obtidos no trabalho.

Perspectivas, apresentação das possibilidades de novos estudos a partir dos resultados obtidos.

Referências, que traz as referências utilizadas na introdução, discussão geral da Dissertação.

2. INTRODUÇÃO

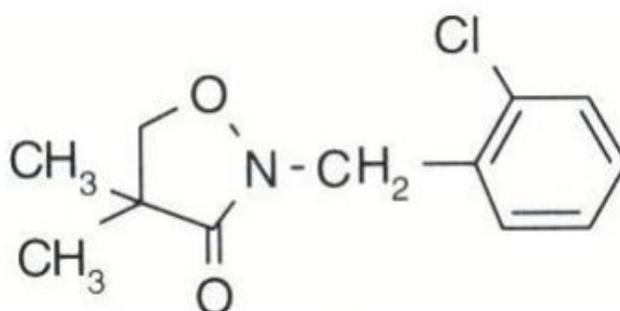
2.1 Agrotóxicos

Em 2009 o Brasil alcançou o topo do ‘ranking’ mundial em consumo de agrotóxicos, abrangendo cerca de 84% dos produtos vendidos na América Latina, e em 2013 o país foi responsável pelo consumo de 20% da produção mundial (NETO et al., 2009). O uso indiscriminado de agrotóxicos causa, cada vez mais, contaminações do solo, água, animais não alvo e seres humanos (ALBUQUERQUE et al., 2016). A contaminação pode ocorrer por diversos meios, como: manuseio direto, consumo de alimentos e/ou água contaminadas ou ainda pela inalação de partículas em suspensão. Cerca de 30% a 70% dessa contaminação ocorre pela deriva técnica, que é a dispersão do pesticida pelo ambiente através da água e/ou vento (BOMBARDI et al., 2011; CLASEN, et al., 2017; PIGNATI et al., 2017). A diminuição das matas ciliares também facilita uma maior deriva desses contaminantes, bem como, a sua entrada no ambiente aquático adjacente as áreas agrícolas (BERTI et al., 2009). De acordo com as resoluções 357/05 e 396/08 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), o Brasil possui normativas que descrevem os níveis seguros de concentrações para alguns agrotóxicos em ambientes aquáticos. No entanto, há uma série de compostos químicos presentes nestes produtos que ainda não apresentam valores de referência em termos de níveis seguros para exposição de alimentos ou água potável. Outra questão são normativas para concentrações consideradas seguras para cursos d’água. (BORTOLUZZI et al., 2006; MARCHESAN et al. 2010; MARINS et al 2020).

2.1.2 Clomazone

O herbicida Clomazone[®] (composto puro) {2[(2-clorobenzil)]-4,4-dimetil-1,2oxialidin-3-one}, vendido em uma das suas variantes comercial com o nome de Gamit360CS[®].

Figura 1: Estrutura química do herbicida Clomazone[®] (composto puro) {2[(2-clorobenzil)]-4,4-dimetil-1,2oxialidin-3-one}.



Fonte: o autor.

Figura 2: Embalagem comercial do Gamit360CS®.



Fonte: o Autor.

Pertence ao grupo químico isoxazolidinona, sendo o primeiro pesticida importante da classe dos inibidores da biossíntese de carotenoides (ALBUQUERQUE et al. 2016; OLIVEIRA JR. 2011). Este herbicida pode interferir na cadeia transportadora de elétrons, principalmente na reoxidação de NADPH (AGUIAR et al., 2020). Surgiu no mercado em 1986 e seu uso é indicado para o controle de plantas não desejadas. O princípio ativo Clomazone[®] está classificado no nível II de risco ambiental e toxicológico, é considerado não corrosivo, não inflamável, solúvel em água e altamente tóxico. Em 2018 no Rio Grande do Sul, foram vendidas 397,58 toneladas deste herbicida (13^o pesticida mais vendido no estado), e 4,54 mil toneladas no Brasil (16^o pesticida mais vendido a nível nacional) (IBAMA, 2018). Sua meia-vida no solo corresponde cerca de 10 a 14 dias, e pode ser encontrado a uma profundidade média de 30 cm. Sua solubilidade em água é de 1.100 mg/L⁻¹, considerada extremamente solúvel (FREITAS et al. 2017), podendo chegar facilmente as águas de profundidade, como o lençol freático (MATTOS et al. 2006). Em águas superficiais a meia vida do Clomazone[®], pode variar entre 84 a 120 dias, podendo afetar novas culturas bem como causar danos a organismos não alvo como peixes (ZANELLA et al. 2002). Pelas resoluções 357/05 e 396/08 do CONAMA, não existem níveis considerados seguros para esse pesticida para água e solo (BRASIL 2005, BRASIL 2008, MARCHESAN et al. 2010).

2.2 Estresse Oxidativo

O Clomazone[®] e o Gamit 360CS[®], assim como outros agrotóxicos podem causar danos oxidativos em tecidos e células de organismos não alvo. O estudo de danos oxidativos causados por estes compostos em organismos não alvo, peixes, por exemplo, torna-se relevante.

Estresse oxidativo, ocorre, pois, o oxigênio é utilizado pelos organismos aeróbicos como acceptor final de elétrons durante a respiração celular, em condições normais, durante a respiração aeróbica, pequenas quantidades de espécies reativas (ER) são geradas, não causando danos ao organismo, porém quando excedem a capacidade antioxidante do organismo podem causar dano celular (BIRNIE-GAUVIN et al., 2017; CLASEN et al., 2018).

Essas ER, como o radical hidroxila (OH[·]) e o ânion superóxido (O₂⁻) podem ser altamente prejudiciais ao organismo, oxidando lipídeos, proteínas e DNA. O dano ao DNA pode ocorrer tanto nas bases nitrogenadas como na desoxirribose (BARBOSA et al., 2014; BARREIROS et al., 2006). O aumento na formação de ERO, ou a diminuição da capacidade antioxidante do organismo, pode estar ligado a exposição à agrotóxicos.

Os organismos possuem naturalmente defesas antioxidantes, que podem sofrer alterações em seus níveis, tanto para mais como para menos, numa tentativa de equilibrar os níveis normais de ER no organismo, essas defesas antioxidantes, podem ser enzimáticas e não enzimáticas (CLASEN et al., 2018; GOMES et al., 2014; LUSHCHAK et al., 2011). Podemos citar as defesas antioxidantes enzimáticas como superóxido dismutase (SOD), SOD-Cu, SOD-Zn, SOD-Mn, Glutaciona Peroxidase (GPX), Catalase, e não enzimáticas como ácido ascórbico, Glutaciona S-transferase (GST), Glutaciona reduzida/oxidada, tióis não proteicos (NPSH) (CAO et al. 2004).

Uma das linhas de defesas antioxidantes do organismo, temos a Glutaciona S-transferase (GST), antioxidante não enzimático, tendo como função auxiliar na detoxificação celular, sendo em peixes muito importante pois possui capacidade de conjugação de subprodutos formados na degradação de agrotóxicos, tornando-os compostos facilmente excretáveis (PEREIRA et al., 2013). A exposição a produtos como herbicidas pode causar desequilíbrios no sistema antioxidante, como reduzir a atividade de enzimas antioxidantes e/ou concentração de antioxidantes não enzimáticos, o resultado final seria potencializar os danos oxidativos causados pela exposição à agrotóxicos (CLASEN et al., 2018). O excesso de ERO, pode causar danos proteicos que podem ser medidos através da carbonilação de proteínas, essas modificações podem ocorrer como modificações dos resíduos de aminoácidos, oxidação dos grupos sulfirila e formação de carbonílicos de proteínas. Os danos aos lipídeos são medidos através da formação

de produtos reativos ao ácido tiobabítúrico (TBARS) (LUSHCHAK et al., 2011; MURUSSI et al., 2015).

Outro componente celular que sofre dano com o desequilíbrio causado devido a produção excessiva de ERO, é o DNA, conjunto de ácidos nucléicos responsável pelo armazenamento das informações genéticas dos seres vivos e ao se duplicar, permite com que as células se multipliquem. Nele estão contidas informações para a produção de proteínas, enzimas e outras moléculas importantes para a manutenção da vida (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NOVAK et al., 2017; SRIVASTAVA & SINGH, 2015). Fragmentos acêntricos causados por quebras cromossômicas ou por cromossomos inteiros, a partir de danos oxidativos não incorporados ao núcleo principal, dão origem aos micronúcleos (COSTA et al., 2017). Além disso, esse fragmento de DNA pode ser reincorporado ao núcleo principal ou ainda eliminado da célula (BOLOGNESI, et al., 2011; DALZUCHIO et al., 2016; GHISI et al., 2016; RIBEIRO et al., 2007). Para organismos aquáticos, o teste de micronúcleo é uma das ferramentas mais eficientes para identificar alterações no DNA, tendo como alvo células em fase de interfase (SRIVASTAVA & SINGH, 2015).

2.3 Sistema Colinérgico

A exposição dos organismos aos agrotóxicos, pode causar além de danos oxidativos, pode ocorrer danos neurológicos, como alterações no sistema colinérgico. Essa alteração pode ser avaliada nos organismos experimentais, peixes, pela atividade de colinesterases como a acetilcolinesterase em tecidos cerebral e muscular (MURUSSI et al., 2015). Relacionado como mediador neuroinume, ligado ao sistema cognitivo e memória, o sistema colinérgico, pode sofrer danos oxidativos quando exposto a produtos químicos como álcool, agrotóxicos, por reduzir os níveis de AChE (acetilcolinesterase), na fenda sináptica aumentado os níveis de acetilcolina, podendo causar espasmos musculares (AGOSTINI et al., 2017). A AChE Localiza-se em maior quantidade nos tecidos muscular e cerebral, e é responsável por transformar o excesso de ACh em uma molécula mais simples, que terá um grupamento éster e um grupamento amina quaternária (ARAÚJO; SANTOS; GONÇALVES, 2016). Essa enzima pode ser utilizada para avaliar danos causados ao encéfalo e ao tecido muscular, a partir de produtos químicos, dentre eles os agrotóxicos (ARAÚJO; SANTOS; GONÇALVES, 2016). Uma das consequências da inibição da atividade de AChE no tecido encefálico, pode resultar em hiperatividade, tremores e outros sintomas, o que é resultante da superestimulação das fibras musculares devido ao acúmulo

de ACh na fenda sináptica. (GONÇALVES et al., 2018; MIRON et al., 2008; MURUSSI et al., 2015).

2.4 Uso do peixe-zebra nos modelos de toxicidade

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é teleósteo de água doce, nativo do sudeste asiático e pertence à família Cyprinidae (WHITLOCK; WESTERFIELD, 2000). Possui características como: fecundação extracorpórea, ovos translúcidos, o que possibilita acompanhar todo o desenvolvimento embrionário, alto índice de reprodução, de 50 a 70 ovos por dia, rápido desenvolvimento, chegando a idade adulta em três meses, alto grau de genética conservativa, com cerca de 70% de similaridade dos genes quando comparado com os mamíferos, e seu genoma ser totalmente sequenciado o que torna viável para pesquisa em diversas linhas, inclusive de doenças genéticas humanas, além de ser um animal pequeno, ocupando pouco espaço, favorecendo seu cultivo em biotério (DAHM; GEISLER, 2006; EGAN et al., 2009; HOWE et al., 2013; LELE; KRONE, 1996).

Sendo assim, o uso do peixe-zebra como modelo alternativo não mamífero para análises comportamentais, bioquímicas, neuroquímicas, toxicológica, farmacológicas e genéticas e genotóxicas tem se tornado cada vez mais frequente entre os pesquisadores (EGAN et al., 2009; MAXIMINO et al., 2010; MÜLLER et al., 2018; ROSEMBERG et al., 2011).

2.5 Análise Comportamental

Os testes comportamentais em peixes-zebras, propõem avaliar as respostas relacionadas à motricidade/locomoção e comportamento tipo ansiedade. Estudos sugerem que os testes comportamentais sejam realizados entre às 9h e às 16h, pois nesse período caracteriza-se maior atividade dos animais (ROSEMBERG et al., 2011). Também é importante que os testes sejam realizados imediatamente após o período de exposição, para evitar que haja alguma distorção nos resultados.

2.5.1. Teste do aparato claro-escuro

A escototaxia de peixe-zebra é caracterizada pela preferência a ambientes escuros em detrimento a ambientes claros. O teste é descrito e validado como um modelo para a avaliação comportamental do tipo ansiedade para a espécie (MAXIMINO et al., 2010; QUADROS et al., 2016). Utiliza-se um aparato de vidro, retangular (25 cm × 15 cm × 11 cm largura, altura e profundidade respectivamente), com capacidade de 2L de água, que é dividido igualmente em

uma área escura e uma clara. Para a divisão dos compartimentos, é utilizado externamente, um papel adesivo opaco nas cores branco e preto. Para as análises comportamentais, um indivíduo será colocado na parte clara de do aparato, onde a latência para a parte escura, tempo e número de entradas na área escura, bem como número de avaliações de risco foram avaliadas por 6 minutos e analisados no software ANY-maze[®] (BLASER et al., 2010; MAXIMINO et al, 2010; ROSEMBERG et al., 2012).

2.6 Análise de Micronúcleo

Micronúcleos são fragmentos de DNA, que se separam do núcleo principal, gerando um núcleo secundário, de formato redondo ou ovalado semelhante aos núcleos primários. Sua presença é um indicativo de instabilidade cromossômica e normalmente são gerados na fase mitótica das células, muito utilizados para testes de genotoxicidade (HINTZSCHE et al., 2017; SOTO et al., 2018; TERRADAS et al., 2016). Agentes físicos ou químicos, podem causar quebra na fita de DNA, essa quebra pode ser: tipo quebra de dupla da fita de DNA, gerando na célula o micronúcleo causando um envelhecimento precoce e até o surgimento de cânceres (SKEFF et al., 2014; SOTO et al., 2018). Desta forma os agrotóxicos que são agentes químicos possuem diversas maneiras de entrar em contato com o ser vivo, como pelo ar, solo, água, alimento, por isso são considerados um grande influenciador para o surgimento de micronúcleo (ILYUSHINA et al., 2019). Quando ao dano ao DNA quando ocorre o surgimento do micronúcleo, a célula possui mecanismos para corrigir esse erro (HINTZSCHE et al., 2017; TERRADAS et al., 2016). Os mecanismos de defesa celular, podem dar quatro possíveis destinos para esse micronúcleo, que são: degradação, onde o micronúcleo é degradado por apoptose ou outro mecanismo catabólico, reincorporação, que pode ocorrer no próximo ciclo de mitose, fazendo com o que o micronúcleo se reintegre aos núcleo normal da célula; extrusão, quando o micronúcleo é eliminado da célula por exocitose e persistência, que consiste no micronúcleo permanecer na célula mesmo a após a próxima fase da mitose (HINTZSCHE et al., 2017).

3. JUSTIFICATIVA

O Brasil, lidera o consumo de agrotóxicos 2009, tornando-se desde então, o maior consumidor de agrotóxicos a nível mundial, com um de consumindo 20% da produção mundial (NETO et al., 2009). Esse aumento no consumo de agrotóxicos aumenta o um risco de contaminação do solo, água, e organismos não alvo. Essa contaminação, pode ocorrer pelo manuseio direto do produto, como ocorre com trabalhadores da agricultura, ou de forma indireta, como a população que reside ao redor das áreas agrícolas pela deriva técnica, ou ainda pelo consumo de produtos contaminados (água, alimentos) (ALBUQUERQUE et al., 2016; BOMBARDI et al., 2011; CLASEN, et al., 2017; PIGNATI et al., 2017). De acordo com as resoluções 357/05 e 396/08 do CONAMA, o Brasil possui normativas que descrevem os níveis seguros de concentrações para alguns agrotóxicos em ambientes aquáticos. No entanto, o herbicida Clomazone[®] não faz parte dessas resoluções, não possuindo valores de referência, que possam ser considerados seguros (MARCHESAN et al., 2010). O princípio ativo Clomazone[®], é considerado de nível II de risco ambiental e toxicológico, não corrosivo, não inflamável, solúvel em água e altamente tóxico (IBAMA, 2018). No ano de 2018 foi o 13º pesticida mais vendido no estado do Rio Grande do Sul e o 16º mais vendido no Brasil (IBAMA, 2018). Devido a sua alta solubilidade, pode facilmente contaminar cursos de águas superficiais e também subterrâneas, além de possuir uma vida útil que pode varias de 15 a 120 dias (FREITAS et al., 2017; MATTOS et al., 2006; ZANELLA et al., 2002).

O peixe-zebra, como organismo experimental alternativo, vem se consolidando cada vez mais, para as pesquisas comportamentais, genéticas e bioquímicas (EGAN et al., 2009; MAXIMINO et al., 2010; MÜLLER et al., 2018; ROSEMBERG et al., 2011). Buscamos avaliar as possíveis alterações que o Clomazone[®] e sua variante comercial Gamit360CS[®], podem causar, quando exposto em diferentes concentrações. Dessa forma, acreditamos que a presente Dissertação possa auxiliar para a elucidação dos efeitos toxicológicos desses dois tipos de herbicidas Clomazone em sua formulação pura (princípio ativo) e comercial (Gamit360CS[®]).

4. HIPÓTESES

- A exposição ao herbicida Clomazone[®], princípio ativo, e ao Gamit360CS[®], formulação comercial, gera aumento no dano oxidativo a peixe-zebra exposto a diferentes concentrações, podendo causar um desequilíbrio na capacidade antioxidante enzimática e não enzimática. Essas alterações deverão ser maiores na formulação comercial, já que nessas, há misturas de outros compostos além do princípio ativo.
- A exposição ao herbicida Clomazone[®] em sua formulação comercial (Gamit360CS[®]) é capaz de alterar o comportamento dos animais, essas alterações poderão ser ter ligação dose/efeito, ou seja, maiores concentrações, maiores danos comportamentais.
- Com base em estudos utilizando agentes químicos, dentre eles os agrotóxicos, sabe-se que essa exposição é possível causadora de danos genéticos aos organismos expostos, sendo assim o herbicida GAMIT360CS[®] seria capaz de induzir a formação de danos genéticos como o micronúcleo?

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

Verificar os efeitos da exposição aguda do herbicida Clomazone[®] (formulação pura) e do Gamit360CS[®] (formulação comercial) no peixe-zebra (*Danio rerio*) avaliando a genotoxicidade, danos bioquímicos e alterações comportamentais.

5.2. Objetivos específicos

- Analisar os possíveis danos oxidativos causado pelo Clomazone[®] e Gamit360CS[®];
- Verificar o perfil antioxidante frente a exposição aos herbicidas;
- Analisar o dano ao DNA a partir da presença de micronúcleos;
- Analisar o comportamento no aparato claro-escuro;
- Verificar se existe diferença nos níveis de toxicidade causada pelo Clomazone[®] e Gamit360CS[®].

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Manuscrito – 1

Comparative study between commercial and pure formulation of herbicide on zebrafish

Taisson Kroth Thomé da Cruz^{1,2}, Aline Monique Blank do Amaral², Tamiris Rosso Storck^{2,3}, Dionatan de Pellegrin², Luana Floriano⁴ Osmar Damian Prestes⁴, Renato Zanella⁴, Vania Lucia Loro^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica; ²Laboratório de Toxicologia Aquática; ³ Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental; ⁴ Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas (LARP), ^{1,2,3,4} Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima nº 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria, CEP: 97105-900, Rio Grande do Sul, Brasil.

* Corresponding author:

Professora Dr^a Vania L. Loro, PhD

Laboratório de Toxicologia Aquática (LABTaq)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Centro de Ciências Naturais e Exatas

Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, CEP: 97105–900, Brazil.

Phone: +55 55 3220-9456, e-mail: vania.loro@ufsm.br

vania.loro@gmail.com

Abstract:

Clomazone[®] is a herbicide widely used in several agricultural crops in Brazil because it is potent and supposedly safe. Thus, this study aims to compare the effects of two formulations of Clomazone[®] (commercial Gamit360CS[®] or the active ingredient) on *Danio rerio*. The fish were exposed to sublethal herbicide concentrations and some biochemical parameters were verified. The fish responses to different Clomazone[®] formulations exposure differed according to the tissue analyzed. The most affected tissue was the brain, followed by gills, and muscle. The exposure to commercial formula Gamit360CS[®] showed more lipid peroxidation in muscle as compared to the active ingredient Clomazone[®]. Overall, both commercial formulations inhibited brain AChE activity, increased lipid peroxidation and GST activity. These findings demonstrate that both formulations could be toxic to fish exposed at their natural environment, considering low concentrations.

Keywords: Clomazone[®], Gamit360CS[®], cholinesterase, oxidative damage

Introduction

Commercial formulations of pesticides have in their composition other compounds besides the active principle, among them, surfactants, inerts which are used to stabilize, improve the solubility or absorption of the compound by the target organism. However, these other compounds added to the formulation can be more toxic than the active ingredient itself, or make the active ingredient more toxic to non-target organisms, as they can alter their physical and chemical properties, facilitating contamination (Cox & Sorgan, 2006; Puglis and Boone, 2011). Nagy et al. (2019), in a systematic review comparing pure and commercial pesticides, presented that inert compounds, surfactants of commercial formulations were more toxic to non-target organisms than the active principle itself. These authors found results related to insecticide, fungicide and herbicide, the latter class, works with Glyphosate, 2,4-D, Paraquat, among others, except Clomazone[®]. In the case of Glyphosate, it was shown that its surfactant, POEA (polyethoxylated tallowamine), causes more damage (genetic, embryonic, cytological) than pure Glyphosate.

Clomazone[®] is a herbicide used on a large scale mainly in rice cultivation. Its half-life in soil is 10 to 14 days, but, on the other hand, in water, it can persist between 100 to 120 days and can affect new crops, as well as cause damage to non-target organisms such as fish (Marchesan et al., 2010; Mattos et al., 2006). Residual concentrations of Clomazone[®] ranging from 0.2 to 0.4 mg L⁻¹ were found in 90% of the water collected in rivers close to rice paddies in southern Brazil (Zanella et al., 2002). In Southern Brazil (Rio Grande do Sul State) 397.58 tons of the active ingredient Clomazone[®] were sold, being the 13th best-selling herbicide. In Brazil, 4.54 thousand tons were sold, so Clomazone[®] was the 16th most sold pesticide in Brazil (IBAMA, 2018). In the European Union (EU), there are 1387 registered active ingredients and only 466 are released for use, which may vary according to the member country (Nagy et al., 2019). In Brazil, only the class of herbicides has 106 registered active principles and 994 registered commercial formulations (MAPA, 2020), with Brazilian legislation responsible for bringing the safe numbers of these substances in soil and water, some formulations are not mentioned in these resolutions, such as and the case of Clomazone[®] and its 31 commercial variations (BRASIL 2005; 2008, BRASIL 2020).

The generation of oxidative damage is a common effect of exposure to pesticides, due to the interference with normal cellular metabolism. When the antioxidant capacity of cells is not sufficient, some cellular consequences can occur (Birnie-Gauvinet et al., 2017; Lushchak 2011), including increased lipid peroxidation (PLO) or protein oxidation (Clasen et al., 2018). Fish, like

other animals, have biotransformation enzymes such as the family of glutathione-S-transferase (GSTs), which act in phase II of the cell detoxification process. Another important antioxidant defense is the non-protein thiols (NPSH) that assist in the detoxification process (Livingstone 1998; Blahová et al., 2013; Pereira et al., 2013). The enzyme acetylcholinesterase (AChE) is known to be inhibited by carbamates and organophosphates. However, pesticides as herbicides can also cause changes in AChE activity. AChE belongs to the cholinergic system and in fish it is important for neuromuscular transmission of impulses; it is also used for orientation and movement towards food (Menéndez-Helman et al., 2015; Silva et al., 2015).

The zebrafish (*Danio rerio*) has been widely used in studies of behavioral neuroscience and, in fact, can be considered a promising organism for toxicology tests with pesticides (Blahová et al., 2013; Müller et al., 2017; Nunes et al., 2018). *Danio rerio* shows about 70% similarity with the human genome and due to this fact this species can be considered a promising organism in toxicological studies (Fontana et al., 2018).

Considering the uncontrolled increase in the use of herbicides and the lack of safe values for their use in laws, comparative studies with different formulations and concentrations are relevant to verify their possible toxic potential for non-target organisms such as fish. Due to importance of know the toxic effects of the exposure to two formulations of Clomazone[®], a pure and a commercial in fish model, the objective of this work was investigate the biochemical alterations caused to both clomazone formulations in *Danio rerio* tissues.

Materials and methods

1.1 Chemicals

The standard Clomazone[®] (99.6%) of purity was obtained from FMC (Uberaba, Brazil). The commercial compound Gamit360CS[®] (36% of purity) was obtained from FMC Corporation (Philadelphia, EUA). All reagents for biochemical analysis were obtained from Sigma Aldrich.

1.2 Animals

A total of 198 adult zebrafish (4 - 6 months of age), heterogeneous wild type (standard short fin phenotype) of both sexes, weighing $0.5 \text{ g} \pm 0.1 \text{ g}$ and $3.0 \text{ cm} \pm 1.0 \text{ cm}$ in length, were obtained of local commercial store (Hobby Aquários, RS, Brazil). Fish were acclimatized in a tank (40 L) filled with non-chlorinated water treated with AquaSafe[™] (Tetra, VA, USA) to remove chlorine.

Fish were maintained under constant aeration, temperature-regulated (27 ± 1 °C) and photoperiod cycle of 14/10 hours. This tank allowed the maintenance of animals in the same aquarium. Additionally, the housing tank allowed the direct visual contact with other fish, minimizing the stress of isolation (Nunes et al., 2017). All animals were fed with Alcon BASICTM flakes (Alcon, Brazil) twice daily. The animal experimentation fully adhered to the National Health Guide for Animal Care. The protocols were approved by the Ethics Commission on Animal Use of the Federal University of Santa Maria under protocol number: 2298230819.

Experimental design

After acclimatization, the fish were relocated in tanks measuring 30 X 15 X 20 cm (length, width and depth), with 5 L of water, where zebrafish were exposed to two Clomazone[®] formulations: Gamit360CS[®], the commercial formulation and the standard formulation of Clomazone[®] without any mixture (only active ingredient). The exposure groups were: Control (CTRL); 0.5; 1.0; 2.5; 5.0 and 10.0 mg/L⁻¹ of Gamit360CS[®] (GAM) and 0.5; 1.0; 2.5; 5.0 and 10.0 mg/L⁻¹ of Clomazone[®] (CLO) during 96h. The exposure concentrations were chosen according to Mattos et al. (2006) that found 9.0 mg/L⁻¹ of Clomazone[®] in an environment 115 days after its application in rice crop. Water samples from the tanks were collected in 500 mL amber glass bottles at 0, 48h and 96h and set under refrigeration to the laboratory for pesticide residue analysis (Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas, LARP, UFSM). Pesticide residue analysis was performed using gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS/MS and LC-MS/MS, respectively) according to the methodology described in Zanella et al. (2003) and Donato et al. (2015).

1.4 Biochemical analysis

1.4.1. Tissue preparation

After 96h of Clomazone[®] or Gamit360CS[®] exposure, zebrafish were transferred to a glass beaker with 500 mL of water, containing 0.25 g/L of tricaine for anesthesia (Wilson et al., 2009). After, they were euthanized by punching the spinal cord behind the operculum and brains, gills and muscle were dissected, transferred to microtubes and stored at -80 °C. To perform the biochemical analyses, brain and gills were homogenized in a proportion of one brain or gill to 150 µL Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 buffer, centrifuged (3000 g for 10 min, 4° C) and the supernatant

was used for posterior assays. The muscle tissue was homogenized in a proportion of 0.25 g to 1000 μL of the same buffer used for the brain and gills. All experiments were performed in duplicate.

1.4.2. Biochemical analysis

Acetylcholinesterase (AChE) activity was determined using the method described by Ellman et al. (1961), expressed as μmol of ASCh hydrolyzed/min/mg of protein. Further details of AChE measurements can be found in Leitemperger et al. (2019).

Glutathione S-transferase (GST) activity was analyzed according to Habig et al. (1974). The assay mixture contained 1mM 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) in ethanol, 10 mM glutathione reduced (GSH), 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5), and 10 μl of the tissue homogenates (40-60 μg of protein). One unit of GST activity was defined as the amount of enzyme required to catalyze the conjugation of 1 mol CDNB with GSH/min at 25 °C. The activity was expressed as μmol GS-DNB/min/mg protein.

Lipid peroxidation was estimated by thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) production, which is widely performed for measurement of lipid redox state according to Draper and Hadley (1990). Briefly, 80 μL of the homogenate of the brain were mixed with 160 μL of 10% trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged (3.000 \times g, 10 min). Supernatants (100 μL) were mixed with 100 μL of 0.67% thiobarbituric acid (TBA, 4,6-Dihydroxypyrimidine-2- thiol) and heated at 100°C for 30 min. TBARS levels were determined by the absorbance at 532 nm using malondialdehyde (MDA) reaction with TBA in microplate reader and expressed as μmol MDA/mg tissue. Protein was determined by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard. Absorbance of samples was measured at 595 nm according to Bradford (1976).

Non-protein thiols (NPSH) were determined by Ellman (1959) where supernatant was mixed (1:1) with 10% TCA to deproteinized and centrifuged at 3000 \times g for 10 min. Phosphate buffer 0.5 mM (pH 6.8), 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 10 mM was added to an aliquot of the supernatant and the measurement change of measurement at 412 nm, and the residues were expressed in $\mu\text{mol g}^{-1}$ of tissue.

1.4.3. Statistics

Normality of data and homogeneity of the variances were analyzed by Kolmogorov-Smirnov e Bartlett's tests, respectively. Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.) and analyzed by One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. The significance level was set at $p \leq 0.05$.

Results

The concentrations of pesticides in the water during the experiment were analyzed at times 0, 48h and 96h, and are shown in the tables 1A and B. The lowest percentage of Gamit reduction was 29.3% at the concentration of 0.5 mg/L-1. For clomazone the smallest reduction observed was 17.94 at the concentration of 2.5 mg/L. With relation to AChE activity brain showed reduction of activity for both herbicides tested at all concentrations tested in comparison to control (Fig. 1A (Gamit360CS[®]) and 1B (pure Clomazone[®]). AChE activity in muscle did not show any variation considering all concentrations or formulations of Clomazone[®] tested (Fig 1. C-D).

Considering the GST activity (figure 2), all Clomazone[®] formulations caused increased activity to the zebrafish brain and gill tissues when compared to the control. In the brain, there was an increase of GST activity in all concentrations of Gamit360CS[®]. For Clomazone[®] the increase in GST activity started only at the concentration of 1.0 mg L⁻¹ (Fig. 2 A-B). For gills Gamit360CS[®] exposure caused an increase in the activity of GST in the concentrations 0.5 to 10 mg/L⁻¹ and for Clomazone[®] the increase in the activity started at concentration of 1.0 mg/L⁻¹ (Fig. 2 C-D). Muscle tissue displays the minor alterations as compared to brain and gills for both Clomazone[®] formulations. The GST activity increased only at 1.0 or 0.5 for Gamit360CS[®] or Clomazone[®] respectively (Fig. 2 E-F).

TBARS represents the levels of lipid peroxidation of a tissue, and in this study, there was an increase of TBARS levels in all tissues at least in one concentration tested for both formulations. TBARS in the brain increased in all concentrations of Gamit360CS[®] tested. The increase of lipid peroxidation occurred in all concentrations of Clomazone[®], except 1.0 mg/L⁻¹ (Fig. 3 A-B). Lipid peroxidation in gills increased in 2.5 to 10 mg/L⁻¹ of Gamit360CS[®]. On the other hand, when zebrafish were exposed to Clomazone[®] gills exhibited increased TBARS levels at concentrations of 5.0 to 10 mg/L⁻¹ (Fig. 3 C-D). Muscle tissue showed increased lipid

peroxidation for all concentrations of Gamit360CS[®] tested. Clomazone[®] exposure caused significant increase of TBARS levels in muscle only at concentrations of 10 mg/L⁻¹ (Fig. 3 E-F). In general, brain seems to be more affected by both pure Clomazone[®] formulation in comparison to gills and muscle, due to the AChE inhibition, GST activity and TBARS levels increased at all concentrations tested. What was not observed when analyzing the levels of NPSH, which showed a similarity in the levels in all treatments and tissues, except in muscle tissue when exposed to pure Clomazone[®].

In figure 4, we shows the results of NPSH, antioxidant non-enzymatic that acts in the removal of free radicals (Rutkoski et al. 2020), where A, has results for brain tissue, animals exposed to the pesticide Gamit360CS[®] that has no significant difference between procedures, and in B, levels of NPHS in brain tissue exposed to pure Clomazone[®], there was a significant difference between the control group and contractions of 0.5 mg/L⁻¹ and 1.0 mg/L⁻¹ and 1.0 mg/L⁻¹ with 10.0 mg/L⁻¹, the other groups showed no significant differences. In C, it brings the results of the NPSH levels of gills exposed to the pesticide Gamit360CS[®], where in no concentration there was a significant difference, in D, the results are from exposure to pure Clomazone[®], there was a significant difference between the contractions of 0.5 mg/L⁻¹ and 1.0 mg/L⁻¹, in addition to other significant differences not obtained. Muscle tissue showed the greatest differences, as 0.5 and 1.0 were different with a concentration of 1.0 mg/L⁻¹, was different with 2.5 mg/L⁻¹, 5.0 mg/L⁻¹ and 10.0 mg/L⁻¹, when exposed to Gamit360CS[®] (E), when exposed to pure Clomazone[®], we can observe a significant difference between the control group and 1.0 mg/L⁻¹, 0.5 mg/L⁻¹ with 1.0 mg/L⁻¹, and 1.0 mg/L⁻¹ with 5.0 mg/L⁻¹ and 10.0 mg/L⁻¹, the other concentrations did not show differences, neither with the control group, nor between themselves (F).

Discussion

Organizar de modo que fique mais fluida e valorizando teus dados frente a literatura, evitando repetir descrição de resultados meramente..

Clomazone[®] is an herbicide used for weed management and is frequently registered in rivers of Southern Brazil due to the high rice production. Thus, it is possible that Clomazone[®] residues founded in water could interfere with other organisms as fish, especially because of its high persistence in this environment. Zebrafish exposed to two formulations of Clomazone[®] showed some biochemical alterations in different tissues. The exposure to Clomazone[®] formulations caused lipid peroxidation, inhibition of cholinesterase and increased GST activities. The tissue more affected was the brain evidenced by the AChE inhibition and increased TBARS

levels. This fact is probably responsible for the increase of GST activities at all concentrations of Clomazone[®] tested. Already the levels of NPSH, it was observed that there was a stability in almost all tissues, except in muscular tissue when exposed to the pure formulation of Clomazone[®].

When comparing the Clomazone[®] formulations in the brain, it was not possible to observe differences between the formulations. The AChE inhibition due to Clomazone[®] exposure in different fish species was shown by Dos Santos et al. (2005) and Miron et al. (2008) when *Rhamdia quelen* and *Leporinus obtusidens* were exposed to Gamit360CS[®]. These authors related brain AChE inhibition with disruptions in the cholinergic system causing some effects as behavior alterations and disorientation. Moraes et al. (2007) demonstrated that AChE activity increased in muscle after exposure to Clomazone[®], propanil and metsulfuron methyl at rice field condition. In the same experimental model AChE activity in the brain decreased significantly after exposure to the herbicides Clomazone[®] and quinclorac (Moraes et al., 2007). Falta destacar link com teu trabalho nesse parágrafo acima.

The increased GST activity is a common response to the increase of lipid peroxides formation as suggested by Nunes et al. (2017). High GST activity was more effective to control lipid peroxidation formation induced by Clomazone[®] active ingredient exposure. This fact is clear in gills and muscle where the lipid peroxidation occurred only at high concentrations (5.0 or 10.0 mg/L⁻¹). Commercial formulation Gamit360CS[®] seems to be more toxic to zebrafish considering lipid peroxidation than Clomazone[®] active ingredient. In agreement with the results of the present study, Cattaneo et al. (2012) and Nunes et al. (2017) showed the increase of GST activity after exposure of carp and zebrafish to Clomazone[®] or paraquat respectively. For other perspective, Classen et al. (2018) recorded a reduction of GST activity in muscle when *Cyprinus carpio* were exposed to pesticides used in the rice culture. In summary, muscle tissue was less affected than the brain and gills of zebrafish. Apparently there were no great differences between the effects of Gamit360CS[®] or Clomazone[®] active ingredient except for lipid peroxidation in gills and muscle where reduced LPO was observed as compared to the brain tissue. In fact, all Clomazone[®] formulations tested interfere with the detoxificant enzyme GST, inhibited AChE activity and causes lipid peroxidation in zebrafish exposed.

The antioxidant NPSH was maintained at levels close to the control group in almost all treatment groups in the two formulations tested. For animals exposed to the Gamit 360CS[®], in brain tissue, in all its concentrations, there was no significant difference in NPSH levels, indicating that antioxidant system was efficient to protect tissue. In contrast, TBARS levels were high, indicating that, even active, it was not sufficient to prevent damage to lipids. The gills of

animals exposed to Gamit360CS[®], obtained significant differences between treatments 0.5 mg/L⁻¹ and 1.0 mg/L⁻¹, in the treatments 1.0 mg/L⁻¹ with 2.5 mg/L⁻¹, 1.0 mg/L⁻¹ with 5.0 mg/L⁻¹ and 1.0 mg/L⁻¹ with 10.0 mg/L⁻¹, the same result can be seen in TBARS, that there was an increase in TBARS levels in the same treatments, except in 1.0mg/L⁻¹, which indicates that, even active, NPSH, was not enough to eliminate the damage caused by Gamit360CS[®]. Moraes et al (2020), found a similar relationship between the levels of TBARS and NPSH levels. In muscle tissue, there was no significant difference, neither between control and treatments, nor between treatments, which may indicate less damage from this pesticide in this tissue. The animals that were exposed to pure Clomazone[®], in the brain, there was a significant difference in the levels of NPSH only in groups 0.5 mg/L⁻¹ to 1.0 mg/L⁻¹, when compared to each other, whereas in relation to the control group there was no significant difference, comparing with the levels of TBARS, there is an increase in lipid damage, indicating that, even though it was active, it was not possible to protect the damage caused by Clomazone[®]. In a general way NPSH protect against oxidative damage caused by pesticides, but each fish species and sometimes each tissue showed different responses. For example, Müller et al (2017), found a slight reduction in NPSH levels in animals exposed to the paraquat herbicide, indicating that herbicides can affect NPSH levels. In gills, significant differences occurred between control treatment and 1.0 mg/L⁻¹, treatments 0.5 mg/L⁻¹ and 1.0 mg/L⁻¹, and treatment 1.0 mg/L⁻¹ with treatments 2.5 mg/L⁻¹ and 5.0 mg/L⁻¹. In the other treatments there were no significant differences. Indicating that certain concentrations of pure Clomazone[®] can cause the body to react by trying to eliminate the pesticide, in higher concentrations, as in 5.0 mg/L⁻¹ and 10.0 mg/L⁻¹, saturates the body's antioxidant system, as we can see, when we relate the levels of NPSH with the levels TBARS, where there was an increase only in treatments 5.0 mg/L⁻¹ and 10.0 mg/L⁻¹, the others remained close to or equal to the control, indicating that up to 2.5 mg/L⁻¹ the antioxidant system can eliminate the organism pesticide. In muscle tissue, significant differences occurred in the control group compared to treatments of 0.5 mg/L⁻¹ and 1.0 mg/L⁻¹, and between treatments 1.0 mg/L⁻¹ and 5.0 mg/L⁻¹, in the other concentrations there were no significant differences. When compared to TBARS, NPSH levels were similar, indicating the efficiency of this antioxidant system. In summary, did not have great differences in oxidative damage caused by both formulations tested. The results showed clearly the potential of clomazone to cause oxidative damage and impair antioxidant defenses of zebrafish. The sum of results are important tool to future decisions concerning toxic levels of clomazone to fish species.

Conclusion

The growing agricultural demand for increased productivity means that there is a greater consumption of pesticides. This fact, increase the contamination of non-target organisms, such as fish. It was seen that lowest Clomazone[®] concentrations used in the study induced oxidative damage and impair antioxidant defenses. The reduction in Clomazone[®] observed could be a indicative of degradation in metabolites that could be more toxic than Clomazone[®] per se. The possible bioaccumulation in fish tissues needs to be considered. Clomazone[®] is the cause of the damage, due to similarity of results recorded to both pure and the commercial version.

Funding

This work was partially supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior – Brasil (CAPES-PROEX). Vania Lucia Loro received research fellowship from CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), process number: 309313/2017-8. Taisson Kroth Thomé da Cruz received a doctoral fellowship from CAPES

Acknowledgments

To Dra. Vania Lucia Loro, the laboratory colleagues and co-authors of this work, who made the project possible. To the Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, for the use of its physical structure and equipment.

Conflict of Interest

The authors declare that did not have any conflict of interest in the present study.

References:

- Birnie-Gauvin, K., Costantini, D., Cooke, S. J., Willmore, W. G., 2017. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. **Fish and Fisheries**. v. 18, p. 928 – 942. doi.org/10.1111/faf.12215.
- Blahova, J., Plhalova, L., Hostovsky, M., Divisova, L., Dobsikova, R., Mikulikova, I., Stepanova, S., Svobodova, Z., Oxidative stress responses in zebrafish (*Danio rerio*) after subchronic exposure to Atrazine. **Food Chemical Toxicology**. 61 (2013) 82–85. doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.041.
- Bradford, M. M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248 – 254. doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- BRASIL – CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Conama nº 396 de 3 de abril de 2008. Brasília: **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 11p, 2008.
- BRASIL – CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Conama nº. 357 de 17 de março de 2005. Brasília: **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 23p, 2005
- BRASIL – MAPA, Ministério da Pecuária e Abastecimento, Brasil, **Sistema de agrotóxicos fitossanitário.2020.** Disponível em http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.
- Cattaneo, R., Moraes, B. S., Loro, V. L., Pretto, A., Menezes, C., Sartori, G. M. S., Clasen, B., Avila, L. A., Marchesan, E., Zanella. R., 2012. Tissue Biochemical Alterations of *Cyprinus carpio* Exposed to Commercial Herbicide Containing Clomazone Under Rice-Field Conditions. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 62, p. 91 – 106. DOI: 10.1007/s00244-011-9669-8.
- Clasen, B., Loro, V. L., Murussi, C. R., Tiecher, T. L., Moraes, B., Zanella, R., 2018. Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* reared in a rice-fish system. **Science of the Total Environment**. v. 626, p. 737–743. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.154.

Cox, C., Surgan, M., 2006. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. **Environmental Health Perspectives**. 114, 1803-6. DOI: 10.1289/ehp.9374.

Donato, F. F., Martins, M. L., Munaretto, J. S., Prestes, O. D., Adaime, M. B., Zanella, R., 2015. Development of a Multiresidue Method for Pesticide Analysis in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Determination by Gas and Liquid Chromatography with Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 26, p. 2077-2087. doi.org/10.5935/0103-5053.20150192.

Dos Santos, Miron, D. M., Preto, A., Crestani, M., Glusczak, L., Schetinger, M. R., Loro, V. L., Morsch, V. M., 2008. Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**, v. 74, p. 1-5. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.070.

Draper, H. H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol**. v, 186, p. 421-431. doi: 10.1016/0076-6879(90)86135-i.

Ellman, G. L., 1959, Tissue sulfhydryl groups. **Archives Biochemistry**. v. 82, p. 70 – 77. doi: 10.1016/0003-9861(59)90090-6.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Valentino, A. JR, Featherstone, R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. v. 7, p. 91 – 94. doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9.

FMC Brasil., 2017. Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico – FISPQ Gamit. **FMC Química do Brasil Ltda**. 19.

Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal Biology Chemistry**. v. 249, p. 7130-7139.

IBAMA., 2018. **Relatório de Comercialização de Agrotóxicos** – Vendas por UF. 2018. Disponível em: <<https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>>, accessed: 28/August/2020.

Leitemperger, J., Menezes, C., Oliveira, V. A., Fiuza, T., Barcarolli, I. F., Pereira, M. E., Bianchini, A., Loro, V. L., 2019. The bioaccumulation of waterborne zinc in tissues of silver

catfish (*Rhamdia quelen*) and effect on biochemical parameters. **Biometals**. v. 32, p. 241 – 249. doi.org/10.1007/s10534-019-00168-6.

Livingstone, D. R., 1998. The Fate of Organic Xenobiotics in Aquatic Ecosystems: Quantitative and Qualitative Differences in Biotransformations by Invertebrates and Fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**. v. 120, p. 43 – 49. doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10008-9.

Marchesan, I., E., Meneghetti, G. S. S., de Avila, L. A., MachadoII, S. L. O., Zanella, R., Primel, E. G., Macedo, V. R. M., Garcia Marchezan, M. G., 2010. Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**. v. 40, p. 1053-1059. doi.org/10.1590/S0103-84782010005000078.

Mattos, M. L. T., Hermes, L. C., Peralba, M. do C. R., 2006. Monitoramento Ambiental do Herbicida Clomazone, Formulação Solúvel em Água de Lavoura de Arroz Irrigado. **Embrapa Clima Temperado – Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 30. Pelotas – RS**, 20p.

Menéndez-Helman, R. J., Ferreyroa, G. V., Afonso, M. S., 2015. Circannual rhythms of acetylcholinesterase (AChE) activity in the freshwater fish *Cnesterodon decemmaculatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 111, p. 236-241. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.10.017

Menezes, C., Leitemperger, J., Murussi, C., Viera, M. S., Adaime, M. B., Zanella, R., Loro, V. L., 2016. Effect of diphenyl diselenide diet supplementation on oxidative stress biomarkers in two species of freshwater fish exposed to the insecticide fipronil. **Fish Physiology Biochemistry**. v. 42, p. 1357 – 1368. doi.org/10.1007/s10695-016-0223-5.

Miron, D., Crestani, M., Schetinger, M. R., Morsch, V. M., Baldisserotto, B., Tierno, M. A., Moraes, G., Viera, V. L. P., 2005. Effects of the herbicide clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 61, p. 398 – 403. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2004.12.019.

Moraes, B. S., Loro V. L., Glusczak L., Pretto A., Menezes C., Marchezan E., de Oliveira Machado S., 2007. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**, v. 68, p. 1597-1601. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.03.006.

Moraes, B., Menezes, C., Leitemperger, J., Amaral, A. M. B., Loro, V. L., Classen, B., 2020. Comparative Study on Diet Added with Organic and Inorganic Selenium Forms Provided to Carps Exposed to Fipronil Insecticide. **Water Air Soil Pollut.** p. 116 – 231. doi.org/10.1007/s11270-020-4448-7.

Müller, T. E., Nunes, M. E., Menezes, C. C., Marins, A. T., Leitemperger, J., Gressler, A. C. L., Carvalho, F. B., De Freitas, C. M., Quadros, V. A., Fachineto, R., Rosemberg, D. B., Loro, V. L., 2017. Sodium Selenite Prevents Paraquat-Induced Neurotoxicity in Zebrafish. **Molecular Neurobiology.** v. 55, p.1928–1941. DOI: 10.1007/s12035-017-0441-6.

Nagy, K., Duca, R. C., Lovas, S., Creta, M., Scheepers, P. T. J., Godderis, L., Adám, B. Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations. 2019. **Environmental Research.** doi.org/10.1016/j.envres.2019.108926.

Nunes, M. E. M., Müller, T. E., Murussi, C., do Amaral, A. M. B., Gomes, J. L. C., Marins, A. T., Leitemperger, J., Rodrigues, C. C. R., Fiuza, T. L., Costa, M. D., Severo, E. S., Rosemberg, D. B., Loro, V. L., (2018). Oxidative effects of the acute exposure to a pesticide mixture of cypermethrin and chlorpyrifos on carp and zebrafish – A comparative study. **Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 206-207, p. 48-53. doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.03.002.

Nunes, M. E., Müller, T. E., Braga, M. M., Fontana, B. D., Quadros, V. A., Marins, A., Rodrigues, C., Menezes, C., Rosemberg, D. B., Loro, V. L., 2017. Chronic Treatment with Paraquat Induces Brain Injury, Changes in Antioxidant Defenses System, and Modulates Behavioral Functions in Zebrafish. **Molecular Neurobiology**, v. 54 (6), p. 3925-3934. DOI: 10.1007/s12035-016-9919-x.

Pereira, L., Fernandes, M. N., Martinez, C. B. R., 2013. Hematological and biochemical alterations in fish *Prochilodus lineatus* caused by the herbicide clomazone. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, p. 1-8. DOI: 10.1016/j.etap.2013.02.019.

Puglis, H. J., Boone, M. D., Effects of Technical-Grade Active Ingredient vs. Commercial Formulation of Seven Pesticides in the Presence or Absence of UV Radiation on Survival of Green Frog Tadpoles. 60:145–155. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2011. DOI 10.1007/s00244-010-9528-z.

Rutkoski, C. F., Macagnan, N., Folador, A., Skovtonki, V. J., Do Amaral, A. M. B., Leitemperger, J., Costa, M. D., Hartmann, P. A., Müller, C., Loro, V. L., Hartmann, M. T., 2020. Morphological and biochemical traits and mortality in *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles exposed to the insecticide chlorpyrifos. **Chemosphere**, v. 250. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126162.

Silva, J.M., Santos, F.L.B., Tenório, H.A., Pereira, H.J.V., Costa, J.G., Santana, A.E.G., Machado, S.S., Abreu, F.C., 2015. In vivo and in vitro inhibition of cholinesterase activity in *Colossoma macropomum* (tambaqui) fingerlings by the herbicide trifluralin. **Ecotoxicology Environmental Contamination**, v.10 (1), 23-30. doi.org/10.5132/eec.2015.01.04.

Wilson J. M., Bunte R. M., Carty A. J., 2009. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 48, p. 785-789.

Zanella, R., Primel, E. G., Gonçalves, F. F., Kurz, M. H. S., Mistura, C. M., 2003. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of herbicide residues in surface and agricultural waters. **Journal of Separations Science**, v. 26, p. 935–938. doi.org/10.1002/jssc.200301309.

Zanella, R., Primel, E. G., Machado, S. L. O., Gonçalves, F. F., Marchezan, E., 2002. Monitoring of the Herbicide Clomazone in Environmental Water Sample by Solid-phase Extraction and High-performance Liquid Chromatography With Ultraviolet Detection. **Chromatographia**, v. 55, p. 573 – 577. doi.org/10.1007/BF02492903.

Table 1 A-B. Gamit360CS[®] (A) or Clomazone[®] (B) concentrations (mg/L⁻¹) in the water at 0.0h, 48h and 96h after the beginning of the exposure.

A) Gamit360CS [®]			
0h	48h	96h	% reduction
0.5	0.367	0.340	29.30
1.0	0.668	0.695	31.85
2.5	1.694	1.698	32.16
5.0	3.86	3.181	29.60
10.0	6.825	6.767	32.04
B) Clomazone [®]			
0h	48h	96h	% reduction
0.5	0.314	0.293	39.30
1.0	0.802	0.742	22.80
2.5	2.094	2.009	17.94
5.0	3.114	3.029	38.57
10.0	7.915	7.540	22.72

Figure captions

Figure 1. AChE activity in the brain (A-B) and muscle (C-D) of zebrafish exposed to Gamit360CS[®] or pure Clomazone[®], respectively. The concentrations are expressed in mg/L⁻¹. Different letters indicate significant differences among groups and control ($p < 0.05$).

Figure 2. GST activity in the brain (A-B), gills (C-D) and muscle (E-F) of zebrafish exposed to Gamit360CS[®] or pure Clomazone[®], respectively. The concentrations are expressed in mg/L⁻¹. Different letters indicate significant differences among groups and control ($p < 0.05$).

Figure 3. Lipid peroxidation levels (TBARS) in the brain (A-B), gills (C-D) and muscle (E-F) of zebrafish exposed to Gamit360CS[®] or pure Clomazone[®], respectively. The concentrations are expressed in mg/L⁻¹. Different letters indicate significant differences among groups and control ($p < 0.05$).

Figure 4. Non-protein thiols levels (NPSH) in the brain (A-B), gills (C-D) and muscle (E-F) of zebrafish exposed to Gamit360CS[®] or pure Clomazone[®], respectively. The concentrations are expressed in mg/L⁻¹. Different letters indicate significant differences among groups and control ($p < 0.05$).

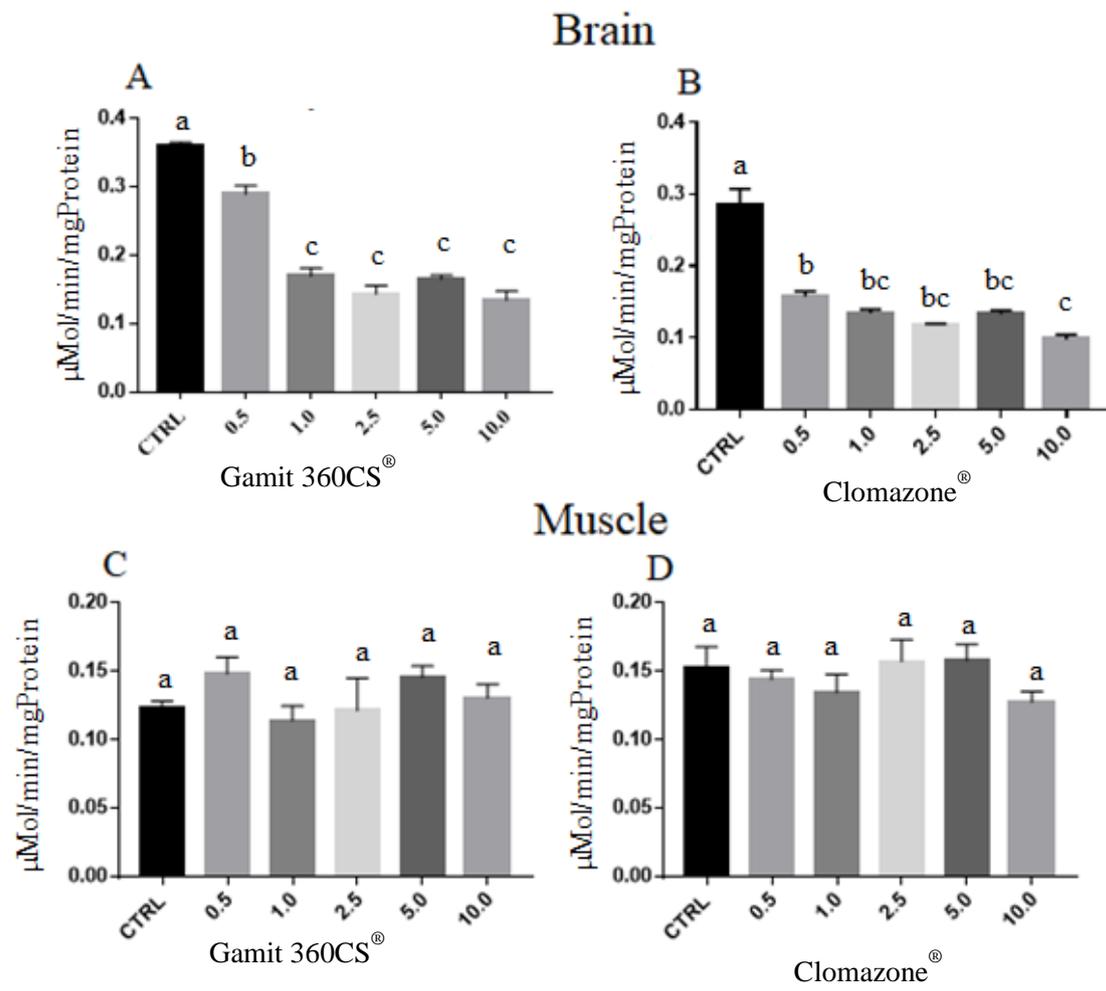


Figure 1

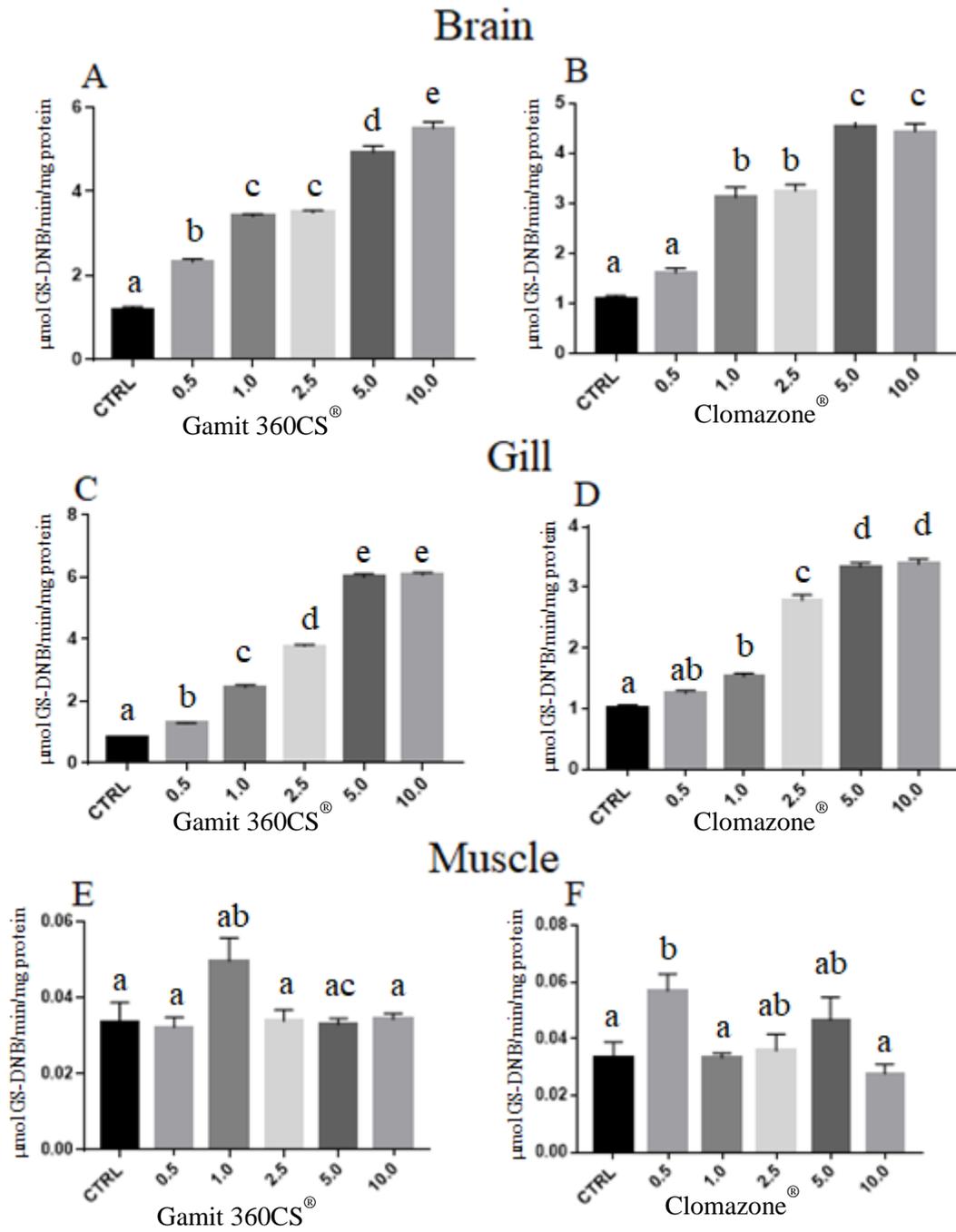


Figure 2.

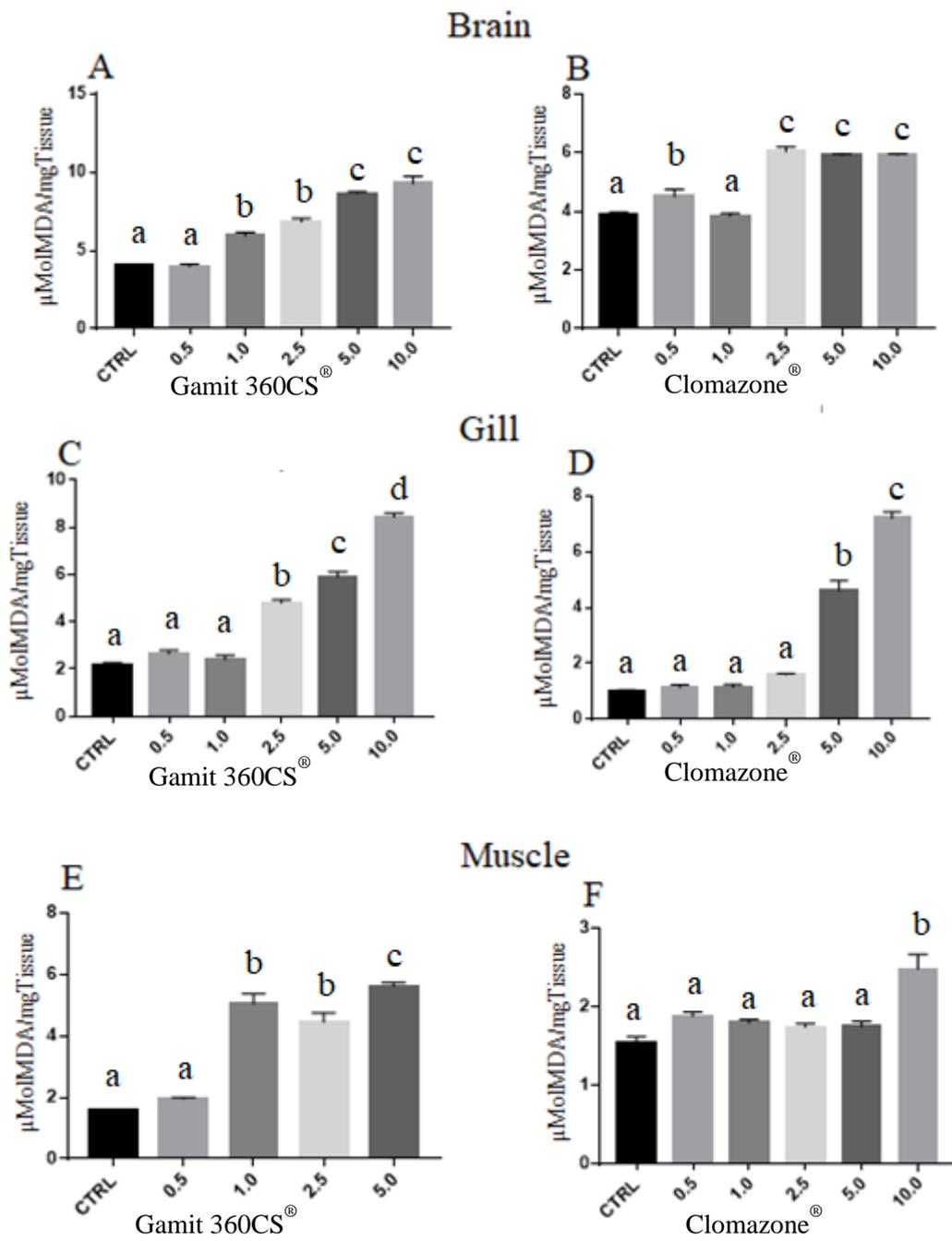


Figure 3.

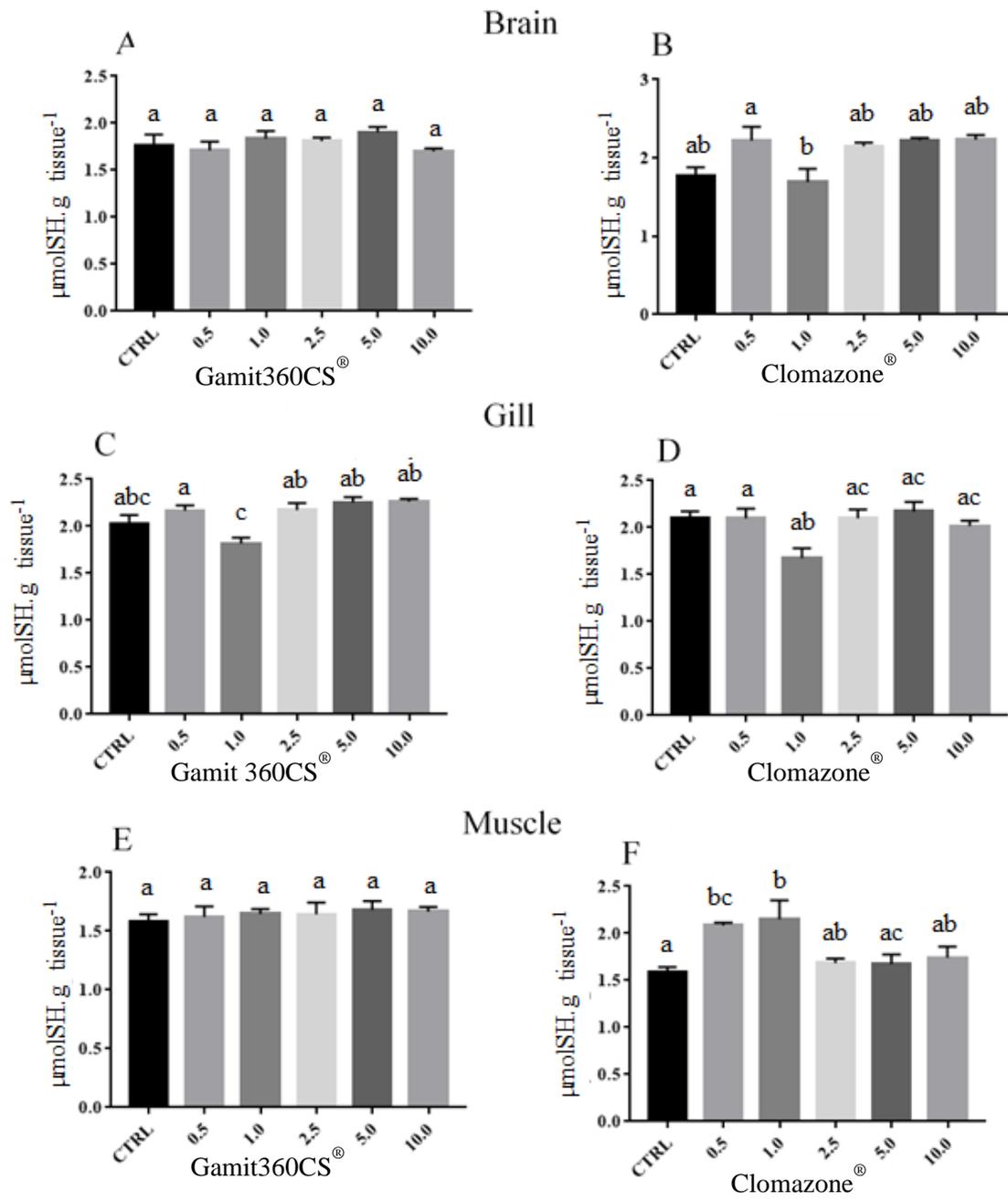


Figure 4.

7. RESULTADOS ADICIONAIS

7.1 Micronúcleo

Para verificar a presença dos micronúcleos em peixe-zebra, foi utilizado tecido sanguíneo, onde foi pingado uma gota de sangue em uma lâmina, feito esfregaço, deixado secar em temperatura ambiente, e feito a pelo método de Shiff com contracoloração de Fast Green, (GAO et al., 2018; UEDA et al., 1992). Para cada indivíduo foi realizado uma lâmina, totalizando seis lâminas, e contadas 1000 células de cada lâmina (ALI et al., 2008). Para contagem e observação das células foi utilizado microscópio óptico Nikon Eclipse e200, objetiva de 100×1,25, com auxílio de óleo de imersão e, foram feitas fotografias, com o auxílio do software Capture 2.1, com auxílio de câmera fotográfica Exfocus precision.

O cálculo utilizado para determinar a porcentagem de micronúcleos está descrito abaixo, adaptado de Ali (2008).

$$\text{NM\%} = \frac{\text{Número de Células Contendo Micronúcleo} \times 100}{\text{Número de células contadas}}$$

Tabela 1: Contagem das células, para observação dos micronúcleos.

Contagem de Micronúcleos (MN)											
Controle		T1		T2		T3		T4		T5	
Células	MN	Células	MN	Células	MN	Células	MN	Células	MN	Células	MN
6082	10	6171	10	6024	20	6064	8	6134	11	6037	8

Total de Células	36512
Total de MN	67
% de MN total	0,18

Fonte: o autor.

Na tabela a cima, pode-se observar a quantidade total de células contadas e o total de micronúcleos encontrado, onde células indicia o número de células contadas por tratamento. MN a quantidade de micronúcleos no tratamento. CTRL: controle. T1: tratamento 1, exposto a 0,5 mg/L-1. T2: tratamento 2, exposto a 1,0 mg/L-1. T3: tratamento 3, exposto a 2,5 mg/L-1. T4: tratamento 4, exposto a 5,0 mg/L-1. T5: tratamento 5, exposto a 10,0 mg/L-1. Todos os tratamentos foram expostos a formulação comercial do Clomazone - Gamit360CS®.

Figura 3: Gráfico estatístico dos micronúcleos

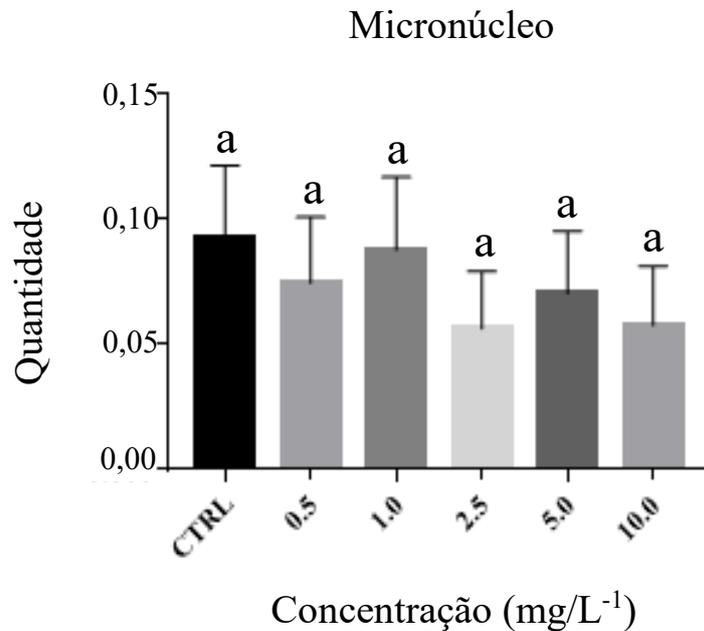
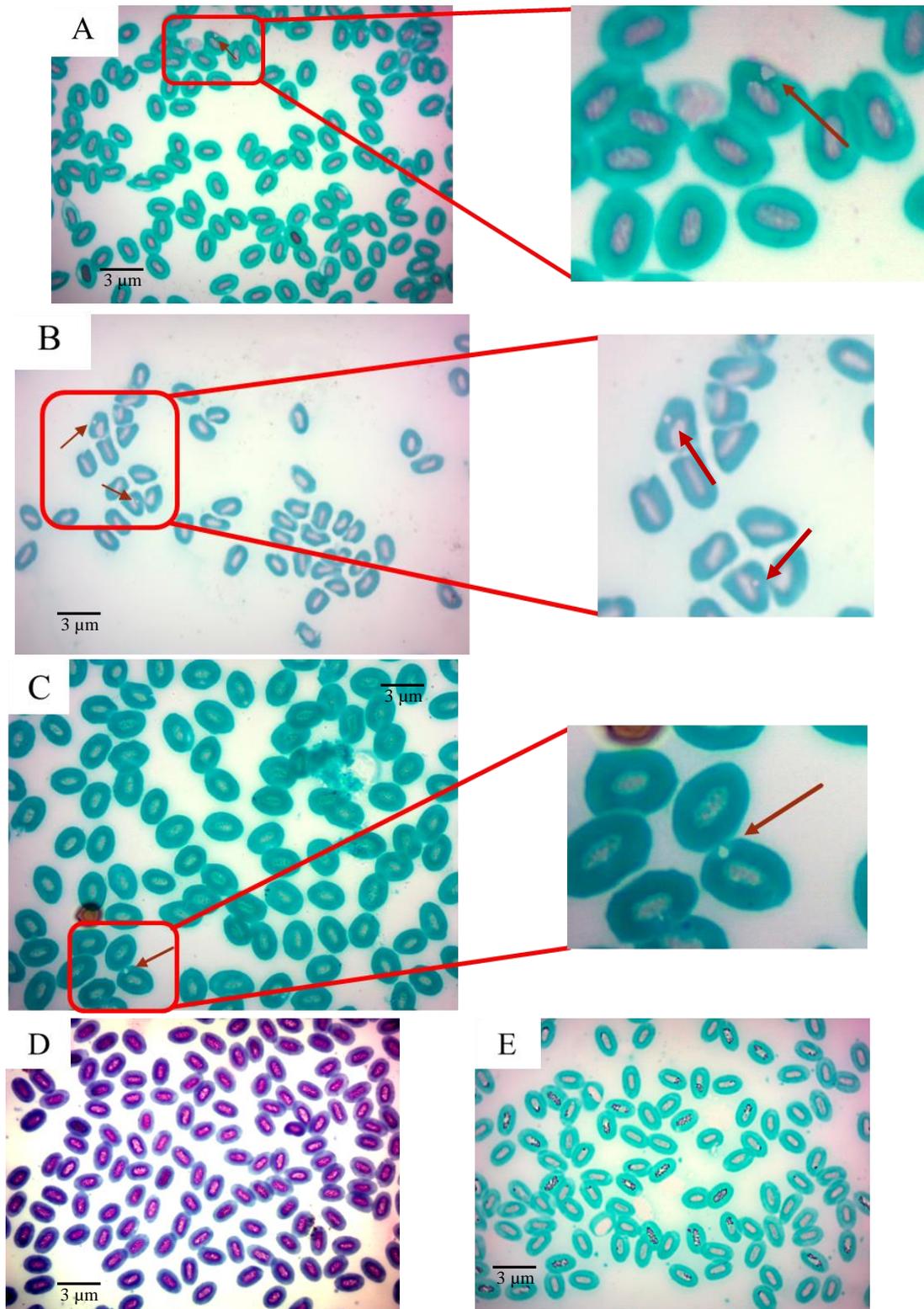


Figura 1: Quantidade de micronúcleo no tecido hematológico de peixes-zebra, após a realização do cálculo: MN/celulas contadas*100. Expostos a Gamit360CS[®]. As concentrações de exposição foram 0,5 mg/L⁻¹, 1,0 mg/L⁻¹, 2,5 mg/L⁻¹, 5,0 mg/L⁻¹, 10,0 mg/L⁻¹. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos e controle (p <0,05).

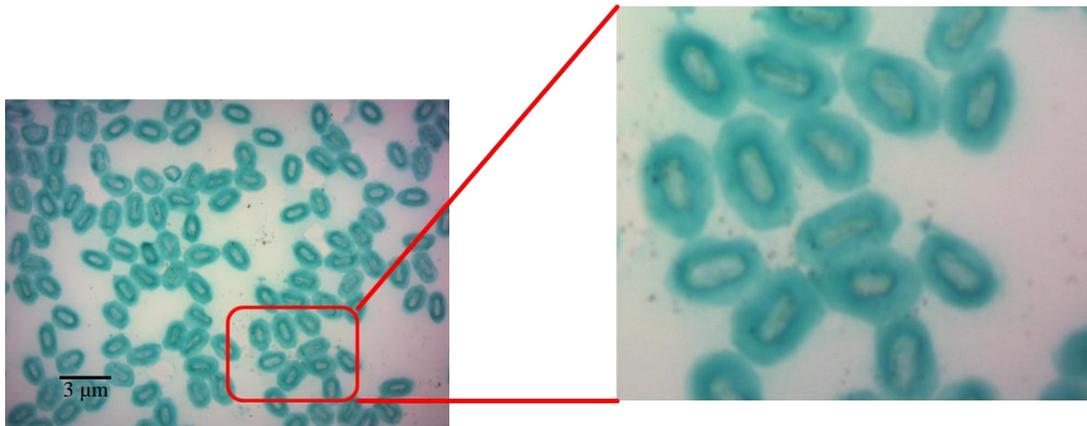
Foi observado que não houve diferença significativa entre os grupos tratados quando comparados entre si, e quando comparados com o grupo controle. A presença de micronúcleos indica que houve um erro durante a divisão celular, fazendo que um pedaço ou um cromossomo inteiro se desprende do núcleo principal, criando um novo “núcleo” (HINTZSCHE, et al., 2017; ILYUSHINA, et al., 2019; TERRADAS, et al., 2016).

Figura 4: Fotomicrografia de tecido sanguíneo.



Imagens de fotomicrografia de tecido sanguíneo. Em A e B, apontados por setas, os micronúcleos, e a direita, destaque dos mesmos. Em C, apontado pela seta e no destaque, uma mancha, proveniente da coloração, ou algum vacúolo celular. Em D, tecido sanguíneo sem micronúcleo ou manchas. Em E, pode-se observar acúmulo de corante nos núcleos, efeito causado pelo processo de coloração. Aumento: 100 X 1,25 + óleo de imersão. Ampliação a direita de 10X. Fonte: o autor.

Figura 5: Fotomicrografia de tecido sanguíneo.



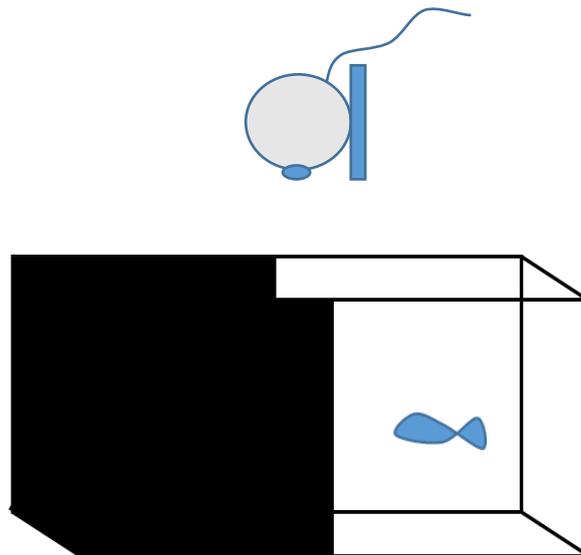
Nesta imagem pode-se observar a formação de anomalias nucleares do tipo Cariorrexe, indicando que o dano causado pelo Gamit3603CS[®]. Aumento: 100 X 1,25 + óleo de imersão. Ampliação a direita de 10X. Fonte: o autor.

7.2 Comportamento

Para a realização dos testes comportamentais, claro escuro, os animais foram dispostos individualmente em novos aquários contendo uma parte escura e outra clara. Os animais foram realocados no novo aquário (25 cm × 15 cm × 11 cm largura, altura e profundidade respectivamente), contendo 2L de água, dechlorada, 27°C ± 1°C. (GROSSMAN et al., 2010; MATHUR & GUO, 2011; ROSEMBERG et al., 2011; ROSEMBERG et al., 2012). A escototaxia do peixe-zebra, avaliada pelo aparato claro-escuro, caracteriza-se pela preferência a ambientes escuros em fuga a ambientes claros, e é validado como um modelo experimental de avaliação comportamental do tipo ansiedade para a espécie. Para análise dos dados o teste foi filmado com auxílio de webcam e computador portátil, por pelo menos 6 min, para posterior análise com auxílio do software ANY-maze® (QUADROS et al., 2016; ROSEMBERG et al., 2012).

Para a realização dos testes, foi utilizado um aquário com as dimensões já citadas, para o teste claro-escuro, o aquário foi dividido ao meio, sendo revestido com fundo preto opaco ocupando 50% da área do aquário, e a parte clara, revestida com fundo branco opaco, sendo as imagens gravadas pelo topo do aquário.

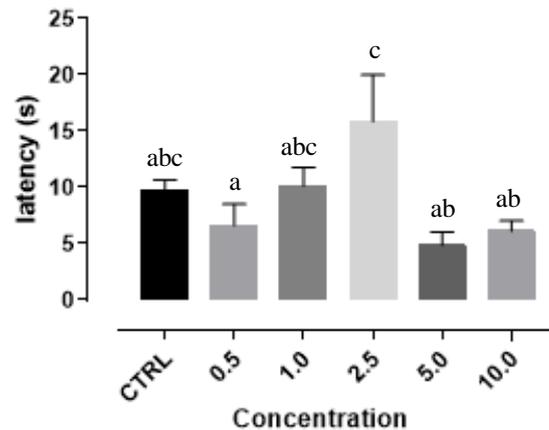
Figura 6: Representação do aparato claro-escuro.



Representação do aparato claro-escuro, utilizado para comportamento do tipo ansiedade, com a webcam posicionada no topo para filmagem.

Será adotado a simbologia CT, T1, T2, T3, T4 e T5 para os grupos: controle, tratamento 1 (0,5 mg/L⁻¹), tratamento 2 (1,0 mg/L⁻¹), tratamento 3 (2,5 mg/L⁻¹), tratamento 4 (5,0 mg/L⁻¹) e tratamento 5 (10,0 mg/L⁻¹), respectivamente.

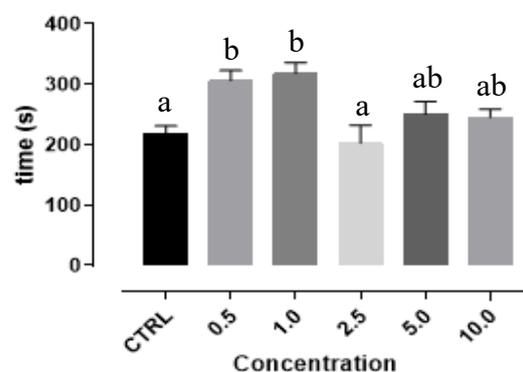
Figura 7: Latência entre a parte escura e clara do aparato.



Latência entre a entrada da parte clara para a parte escura do aparato-claro escuro. Peixes-zebra, expostos a Gamit360CS®, nas concentrações respectivamente de 0,5 mg/L⁻¹, 1,0 mg/L⁻¹, 2,5 mg/L⁻¹, 5,0 mg/L⁻¹, 10,0 mg/L⁻¹. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos e controle ($p < 0,05$).

Neste gráfico podemos observar o tempo de latência gasto para os animais saírem da parte clara, a qual representa um maior perigo aos animais e ingressarem na parte escura, a qual representa maior segurança, pode-se observar que os animais de T3, tiveram o maior tempo de latência, diferenciando dos grupos T1, T4 e T5, em relação ao grupo controle não houve diferença significativa.

Figura 8: Tempo gasto na área escura.

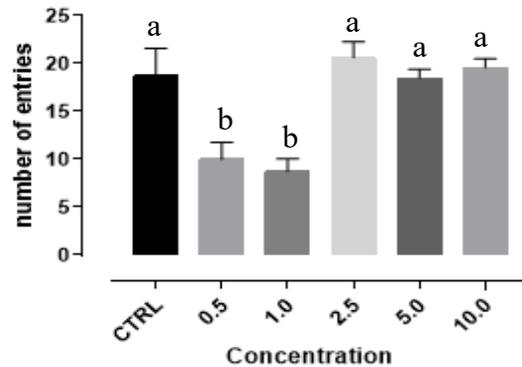


Tempo gasto explorando a área escura do aparato. Peixes-zebra, expostos a Gamit360CS®, nas concentrações respectivamente de 0,5 mg/L⁻¹, 1,0 mg/L⁻¹, 2,5 mg/L⁻¹, 5,0 mg/L⁻¹, 10,0 mg/L⁻¹. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos e controle ($p < 0,05$).

Os animais expostos as concentrações mais baixas, tiveram maior permanência exploratória em área escura, sendo o T1 e T2, maiores significativamente quando comparados ao grupo CT e

ao T3, os demais grupos não apresentaram diferenças significativas entre si e nem com o grupo CT.

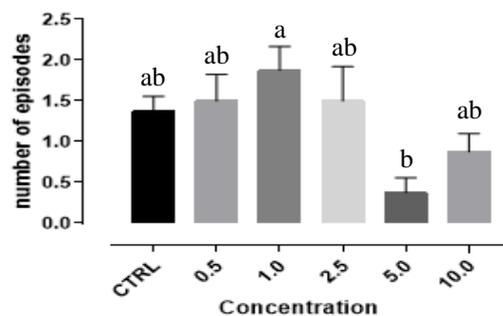
Figura 9: Transição para área escura.



Número de vezes em que houve transição da área clara para área escura. Peixes-zebra, expostos a Gamit360CS[®], nas concentrações respectivamente de 0,5 mg/L⁻¹, 1,0 mg/L⁻¹, 2,5 mg/L⁻¹, 5,0 mg/L⁻¹, 10,0 mg/L⁻¹. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos e controle (p < 0,05).

O número de transições feitas pelos animais entre as áreas do aparato claro-escuro, os resultados indicam que os animais dos grupos T1 e T2 tiveram um número de reentradas da área clara para a área escura significativamente menor que o grupo CT e os demais grupos, os demais grupos, T3, T4 e T5, não tiveram diferenças significativamente ao grupo CT.

Figura 10: Avaliação de risco.



Episódios de avaliação de risco. Peixes-zebra, expostos a Gamit360CS[®], nas concentrações respectivamente de 0,5 mg/L⁻¹, 1,0 mg/L⁻¹, 2,5 mg/L⁻¹, 5,0 mg/L⁻¹, 10,0 mg/L⁻¹. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos e controle (p < 0,05).

No que se refere a avaliação de risco, que é considerado quando o animal passa a linha entre a parte clara e escura, com menos de 50% do seu corpo, e retorna para a parte escura, podemos observar que apenas os tratamentos com $1,0 \text{ mg/L}^{-1}$ e $5,0 \text{ mg/L}^{-1}$ (T2 e T4), foram diferentes significativos dos demais tratamentos, mostrando que em T2 os animais avaliaram mais a situação nova de risco, que nas outras concentrações, já no T4, houve uma menor avaliação de risco entre as áreas.

8. DISCUSSÃO

A exposição a produtos químicos, incluindo os agrotóxicos, podem causar problemas genotóxicos, como os micronúcleos, esses podem ser utilizados como testes. Durante nossos experimentos, nenhum animal morreu ou apresentou alguma alteração física diferente do normal, devido a exposição ao Gamit360CS®.

Os resultados por nós encontrados, podem indicar que o Gamit360CS®, apresenta uma característica genotóxica, pois foi observado a presença de micronúcleo e a anomalia nuclear do tipo Cariorrexe (CARRASCO et al., 1990) (figura 3), essa anomalia, indica um início de apoptose celular, sendo capaz de danificar a célula, impedimento a divisão celular, devido a elevada genotoxicidade de produtos químicos como o Gamit360CS® (CARRASCO et al., 1990; CASATI et al., 1995; SKEFF, et al., 2014).

Os testes comportamentais, realizados com o aparato claro-escuro, já estão consolidados como testes para identificar comportamento do tipo medo/ansiedade (MAXIMINO et al., 2010; QUADROS et al., 2019;). Nossos resultados mostram que houve um aumento na latência entre a parte escura e a parte clara do aparato dos animais do T3, indicando um maior nível de ansiedade, pois a permanência no ambiente escuro do aparato, indica um aumento na ansiedade (MAXIMINO et al. 2010).

Quanto ao tempo gasto explorando a área escura, foi observado que os animais dos grupos T1 e T2, tiveram uma maior exploração da área escura, e menor taxa de transição entre as áreas clara e escura do aparato, podendo indicar que, esses animais estavam mais ansiosos e inseguros em sair da zona escura, Maximino et al. (2010), o comportamento de exploração dos animais, pode ser alterado sob efeito de fármacos e outros químicos, o comportamento de exploração está ligado à procura de alimento, quando há uma alteração nesse comportamento, pode-se ligar ao comportamento do tipo ansiedade, fazendo com que ele permaneça mais tempo no lado escuro do aparato.

Já em relação aos demais tratamentos, não houve diferença significativa entre eles, na transição entre as áreas, os grupos CT, T3, T4 e T5, não apresentaram diferenças significativas entre si, indicando que essas concentrações não alteraram o comportamento. Na exploração de risco, foi observado apenas uma diferença significativa entre os grupos T2 e T4, onde no grupo T2 teve a maior incidência de episódios e no T4 a menor. Porém quando comparado com o grupo

controle, não houve diferença significativa no número de episódios, essas pequenas entradas na zona considerada insegura, indica que o os animais estavam inseguros, demonstrando comportando do tipo ansiedade (MAXININO et al. 2010).

9. CONCLUSÃO

Com a realização deste estudo, pode-se verificar que não há a presença de trabalhos nos bancos de dados nacionais e internacionais relacionando o peixe-zebra adulto com o herbicida Clomazone[®] e ao Gamit 360CS[®], sendo assim, esse um trabalho inédito, até então, com esses compostos e esse organismo experimental.

Também foi observado que o princípio ativo Clomazone[®] ($\{2[(2\text{-clorobenzil})\text{-}4,4\text{-dimetil-}1,2\text{oxialidin-}3\text{-one}]\}$), que representa a maior toxicidade do produto, pois não houve uma diferença significativa entre a formulação pura para a formulação comercial.

Observamos que, o Gamit360CS[®] possui potencial genotóxico, pois, além de encontrarmos micronúcleos nas células sanguíneas, também encontramos anormalidades nucleares, a ponto de levar as células a apoptose precoce, causando um envelhecimento precoce e talvez o surgimento de outras doenças, como o câncer.

Bioquimicamente, o Clomazone[®], tem potencial de causar desequilíbrio na balança REDOX, causado assim, danos oxidativos e causa danos enzimáticos nos tecidos encefálico, branquial e muscular, o que juntamente com o potencial genotóxico pode causar sérios danos à saúde do indivíduo exposto a esse composto.

Quanto ao comportamento dos animais, nos critérios avaliados houve diferença significativa entre grupos tratados quando comparados entre si, já entre quando comparado com o grupo controle, não houve diferença significativa, indicando que há alteração comportamental.

10. PERSPECTIVAS

Ainda cabem muitas pesquisas sobre essa interação pesticida organismo não alvo. Como perspectiva, realizar ensaios com os compostos isolados das formulações comerciais mais vendidas, para verificar a toxicidade isolada de cada componente da formulação, uma vez que é possível que os componentes inertes possam ser utilizados juntamente com outros princípios ativos, podendo apresentar níveis diferentes de toxicidade devido as reações químicas.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, J. F., et al. Cholinergic System and Oxidative Stress Changes in the Brain of a Zebrafish Model Chronically Exposed to Ethanol. **Neurotoxicity Research**. 33(4), 749–758. 2017. doi:10.1007/s12640-017-9816-8.

AGUIAR, L. M. et al. Phytoremediation by *Eremanthus crotonoides* and *Inga striata* decay atrazine and clomazone residues in the soil. **International Journal of Phytoremediation**, [S. l.], v. 22, n. 8, p. 827–833, 2020. ttps://doi.org/10.1080/15226514.2019.1710818.

ALBUQUERQUE, A. F. et al. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environmental Science: Process and Impacts**, v. 18, p. 779-787, 2016. DOI: 10.1039/c6em00268d.

ALI, D., et al. Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. **Chemosphere** v. 71, p. 1823–1831. 2008. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.02.007.

ARAÚJO, C. R. M., SANTOS, V. L., GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista. Virtual de Química**. v. 8 (6), p. 1818 – 1834, 2016. DOI: 10.21577/1984-6835.20160122.

BARBOSA, M. R, Geração e Desintoxicação de Espécies Reativas de Oxigênio em Plantas. **Ciência Rural**. V. 44, nº 3. Mar. 2014.

BARREIROS, A. L. B. S. Estresse Oxidativo: Relação Entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. **Química Nova**. Vol. 29, nº 1. p. 113 – 123. 2006. doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021.

BERTI, A. P., DÜSMAN, E. SOARES, L. C., GRASSI, L. E. A. Efeitos da Contaminação do Ambiente Aquático por Óleos e Agrotóxicos. **SaBios: Revista Saúde e Biologia**. V. 4, n 1 – p. 45 – 51, jan./jun. 2009.

BIRNIE-GAUVIN, K., et al., A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. **Fish and Fisheries**. v.18, p. 928 – 942, 2017. doi.org/10.1111/faf.12215.

BLASER, R. E.; CHADWICK, L.; MCGINNIS, G. C. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research** v. 208, p. 56-62, 2010. doi.org/10.1016/j.bbr.2009.11.009

BOLOGNESI, C., et al. Micronuclei and pesticide exposure. **Mutagenesis**, v.26, n 1, p. 19 – 26. 2011. doi.org/10.1093/mutage/geq070.

BOMBARDI, L. M. **Intoxicação e Morte e por Agrotóxicos no Brasil: A Nova Versão do Capitalismo Oligopolizado**. Boletim DATALUTA – Artigo do mês: setembro de 2011.

BORTOLUZZI, E. C., et al. Contaminação de Águas Superficiais por Agrotóxicos em Função do uso do Solo numa Microbacia Hidrográfica de Agudo, RS. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.10, n.4, p.881-887, 2006. doi.org/10.1590/S1415-43662006000400015.

BRASIL – CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Conama nº 396 de 3 de abril de 2008. Brasília: **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 11p, 2008.

BRASIL – CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Conama nº. 357 de 17 de março de 2005. Brasília: **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 23p, 2005.

CAO, L., LEERS-SUCHETA, S., AZHAR, S. Aging alters the functional expression of enzymatic and non-enzymatic anti-oxidant defense systems in testicular rat Leydig cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. Jan;88(1):61-7. 2004. doi: 10.1016/j.jsbmb.2003.10.007.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2123–2136, 1990. doi.org/10.1139/f90-237.

CASATI, A., et al., Condensation anomalies and exclusion in micronuclei of rearranged chromosomes in human fibroblasts cultured in vitro. **Chromosoma**. 104:137-142. 1995. doi.org/10.1007/BF00347696.

CLASEN, B. et al. Atividades Agropecuárias e a Contaminação da Água e dos Peixes com Agrotóxicos. In. **Manejo e conservação do solo e da água em pequenas propriedades rurais no sul do Brasil**: impacto das atividades agropecuárias na contaminação do solo e da água / Organizador Tales Tiecher. – Frederico Westphalen: RS: URI – Frederico Westphalen,. 181 p. 2017.

CLASEN, B. et al. Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* reared in a rice-fish system. **Science of the Total Environment**. v. 626, p. 737–743, 2018. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.154.

COSTA, M. B. **Análise de Expressão dos Genes de Reparo da Lesão de Fita Simples do DNA de Trabalhadores Rurais Expostos à Agrotóxicos**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2017.

DAHM, R., GEISLER, R. Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. **Marine Biotechnology** (NY). 8(4):329-45, 2006. DOI: 10.1007/s10126-006-5139-0.

DALZOCHIO, T. et al. Gill histopathology and micronucleus test of *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Teleostei, Characidae) to evaluate effects caused by acute exposure to aluminum. **Biotemas**, 29 (1): 75-83, mar. 2016. doi.org/10.5007/2175-7925.2016v29n1p75.

EGAN, R. J. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioural Brain Research** – 205. P 38 – 44. 2009. DOI: 10.1016/j.bbr.2009.06.022.

EMBRAPA, Trigo. **Documentos online 62**. Passo Fundo – RS. Set. 2006. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do62_17.htm>, acesso em: 21 de agosto de 2018.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**; 43(1): 61-8, 1997. doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014.

FREITAS, J. S., et al., Combined effects of temperature and clomazone (Gamit®) on oxidative stress responses and B-esterase activity of *Physalaemus nattereri* (Leiuperidae) and *Rhinella schneideri* (Bufonidae) tadpoles. **Chemosphere**. 185, 548 – 562. 2017. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.061.

GAO, M., et al. Oxidative stress and DNA damage in zebrafish liver due to hydroxyapatite nanoparticles-loaded cádmium. **Chemosphere**. v. 202 – p. 498-505. 2018. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.146.

GHISI, N. DE C., OLIVEIRA, E. C., PRIOLI, A, J. Does exposure to glyphosate lead to an increase in the micronuclei frequency? A systematic and meta-analytic review. **Chemosphere**, v.145, 42 a 54, 2016. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.11.044.

GOMES, M. A. F., BARIZON, R. R. M. **Panorama da contaminação ambiental por agrotóxicos e nitrato de origem agrícola no Brasil: cenário 1992/2011**. Embrapa Meio Ambiente, documento 98 – Jaguariúna, SP – 35 p. 2014.

GONÇALVES, C.R., et al. Biochemical Responses in Freshwater Fish Exposed to Insecticide Propoxur. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 100, 524–528. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2285-9>

GROSSMAN, L. et al. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. **Behavioural Brain Research**. v.214, p. 277-284, 2010. doi: 10.1016/j.bbr.2010.05.039.

HINTZSCHE, L., et al. Fate of micronuclei and micronucleated cells. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**. V. 771, p. 85 – 98. 2017. DOI: 10.1016/j.mrrev.2017.02.002.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 25 abr. 2013. doi.org/10.1038/nature12111.

IBAMA. **Relatório de Comercialização de Agrotóxicos – Vendas por UF**. 2018. Disponível em: < <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>>, acessado em julho de 2020.

ILYUSHINA, N., EGOROVA, O., RAKITSKII, V. Limitations of pesticide genotoxicity testing using the bacterial in vitro method. **Toxicology in Vitro**. V.57, p110 – 116. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.02.018>

LELE, Z., KRONE, P.H. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. **Biotechnology Advances**. 14(1): 57-72. 1996. [doi.org/10.1016/0734-9750\(96\)00004-3](https://doi.org/10.1016/0734-9750(96)00004-3).

LUSHCHAK, V. I., Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. 101, p. 13-30. 2011. doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006.

MARCHESAN, E., et al., Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**. v. 40, p. 1053-1059, 2010.

MARINS, A.T., et al. Assessment of River Water Quality in an Agricultural Region of Brazil Using Biomarkers in a Native Neotropical Fish, *Astyanax* spp. (Characidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 104, 575–581. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-02821-0>

MATHUR, P; GUO, S. Differences of acute versus chronic ethanol exposure on anxiety-like behavioral responses in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v.219, p.234-239, 2011. doi: 10.1016/j.bbr.2011.01.019.

MATTOS, M. L. T. et al Monitoramento Ambiental do Herbicida Clomazone, Fomulação Solúvel em Água de Lavoura de Arroz Irrigado. Embrapa Clima Temperado – **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 30**. Pelotas – RS, 20p, 2006.

MAXIMINO, C., et al. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. **Nature Protocols** v.5 n.2. 2010. doi:10.1038/nprot.2009.225.

MÜLLER, T. E., et al. Sodium Selenite Prevents Paraquat-Induced Neurotoxicity in Zebrafish. **Molecular Neurobiology**. 55: 1928–1941, 2018. doi: 10.1007/s12035-017-0441-6.

MURUSSI, C. R., et al. Integrated Assessment of Biomarker Response in Carp (*Cyprinus carpio*) and Silver Catfish (*Rhamdia quelen*) Exposed to Clomazone. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 68 p. 646 – 654, 2015. doi: 10.1007/s00244-015-0145-8.

NETO, M. L. F., SARCINELLI P. N. Agrotóxicos em água para consumo humano: uma abordagem de avaliação de risco e contribuição ao processo de atualização da legislação. **Revista Engenharia Sanitária**. – v.14 n.1 – jan/mar – p. 69-78. 2009.

NOVAK, M., et al. Cytotoxicity and genotoxicity of anticancer drug residues and their mixtures in experimental model with zebrafish liver cells. **Science of the Total Environment** 601–602 p. 293–300. 2017. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.05.115.

OLIVEIRA JR, R. S. et al. Mecanismos de Ação dos Herbicidas, capítulo 7. In. *Biologia e Manejo de Plantas Daninhas*. Editores: Rubem Silvério de Oliveira Jr., Jamil Constantin e Miriam Hiroko Inoue. – Curitiba, PR. **Omnipax**, 348p. 2011.

PEREIRA, L., FERNANDES, M.N., MARTINEZ, C.B.R. Hematological and biochemical alterations in fish *Prochilodus lineatus* caused by the herbicide clomazone. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 36, 1-8, 2013. DOI: 10.1016/j.etap.2013.02.019.

PIGNATI, W. A. et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**. 22(10): 3281-3293, 2017.

QUADROS, V. A. et. al. Strain- and context-dependent behavioural responses of acute alarm substance exposure in zebrafish. **Behavioural Processes**. v122, p. 1, 11, 2016. doi.org/10.1016/j.beproc.2015.10.014.

QUADROS, V. A., et al. Involvement of anxiety-like behaviors and brain oxidative stress in the chronic effects of alarm reaction in zebrafish populations. **Neurochemistry International**. v. 129. 2019. doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104488.

RIBEIRO, M. L., et al. Avaliação do Dano Oxidativo ao DNA de Células Normais e Neoplásicas da Mucosa Cólica de Doentes com Câncer Colorretal. **Revista Brasileira de Coloproctologia** – v. 27:4. 2007. doi.org/10.1590/S0101-98802007000400005.

ROSEMBERG, D.B., et al. Behavioral effects of taurine pretreatment in zebrafish acutely exposed to ethanol. **Neuropharmacology**, v.63, p.613-23, 2012. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.05.009.

ROSEMBERG, D.B., et al. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. **Plos One**, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019397>.

SKEFF, M.A, et al., S-Nitrosoglutathione Accelerates Recovery from 5- Fluorouracil-Induced Oral Mucositis. **PLoS ONE**. 9(12). 2014. doi:10.1371/journal.pone. 0113378.

SOTO, M., et al. Chromosomes trapped in micronuclei are liable to segregation errors. **Journal of Cell Science**. 2018. doi: 10.1242/jcs.214742.

SRIVASTAVA, P. SINGH, A. Evidence of Micronuclei in Fish Blood as a Biomarker of Genotoxicity due to Surface run off Agricultural Fungicide (Propiconazole). **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**. v. 7(1). p. 4 – 8. 2015. DOI: 10.5897/JTEHS2015.0325.

TERRADAS, M., MARTÍN, M. & GENESCÀ, A. Impaired nuclear functions in micronuclei results in genome instability and chromothripsis. **Archives of Toxicology** **90**, 2657–2667. 2016. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1818-4>.

UEDA, T. et al. A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. **Water Science & Technology**. Vol. 25, No. II, p. 235-240, 1992. doi.org/10.2166/wst.1992.0297.

UENOJO, M., MARÓSTICA JUNIOR, M. R., PASTORE, G. M. Carotenóides: Propriedades, Aplicações e Biotransformação Para Formação de Compostos De Aroma. **Química Nova**. Vol. 30, No. 3, 616-622. 2007. doi.org/10.1590/S0100-40422007000300022.

WHITLOCK, K. E., M. WESTERFIELD. The olfactory placodes of the zebrafish form by convergence of cellular fields at the edge of the neural plate. **Development**. v. 127 (17):3645 – 3653, 2000.

ZANELLA, R., et al. Monitoring of the Herbicide Clomazone in Environmental Water Sample by Solid-phase Extraction and High-performance Liquid Chromatography With Ultraviolet Detection. **Chromatographia**, v. 55, p. 573 – 577. 2002. https://doi.org/10.1007/BF02492903.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do Herbicida Clomazone® em Peixe-Zebra (Danio Rerio): uma Análise Bioquímica e Comportamental", protocolada sob o CEUA nº 2298230819 (ID 002814), sob a responsabilidade de **Vânia Lucia Loro** e equipe; *Taisson Kroth Thomé da Cruz; Aline Monique Blank do Amaral; Tamiris Rosso Storck; Dionatan de Pellegrin; Vanessa Andreatta de Quadros* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 03/12/2019.

We certify that the proposal "Effect of Clomazone® Herbicide on Zebrafish (Danio Rerio): A Biochemical and Behavioral Analysis", utilizing 396 Fishes (males and females), protocol number CEUA 2298230819 (ID 002814), under the responsibility of **Vânia Lucia Loro** and team; *Taisson Kroth Thomé da Cruz; Aline Monique Blank do Amaral; Tamiris Rosso Storck; Dionatan de Pellegrin; Vanessa Andreatta de Quadros* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 12/03/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [10/2019](#) a [03/2020](#)

Área: [Bioquímica E Biologia Molecular](#)

Origem: [Biotério externo](#)

Espécie: [Peixes](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [6 a 12 semanas](#)

N: [396](#)

Linhagem: [Selvagem](#)

Peso: [04 a 06 g](#)

Local do experimento: Biotério de experimentação do laboratório de fisiologia de peixes (anexo sala 2226 prédio 18) sobre responsabilidade do Professor Dr. Bernardo Baldisserotto e da professora Dra. Vania Lucia Loro.

Santa Maria, 14 de janeiro de 2020

Profa. Dra. Patrícia Severo do Nascimento
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

**ANEXO B – LISTA DE TRABALHOS COLABORATIVOS DESENVOLVIDOS
DURANTE O MESTRADO**

1. AMARAL, A. M. B., LORO, V. L., STORCK, T. R., **CRUZ, T. K. T.**, AMES, J., PELLEGRIN, D., MOURA, L. K. RESPOSTA INTEGRADA DA VARIABILIDADE SAZONAL DE FATORES ABIÓTICOS E BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM DUAS ESPÉCIES DE PEIXES DO RESERVATÓRIO PASSO REAL, RS, BRASIL. In: 34ª Jornada Acadêmica Integrada, 2019, Santa Maria. **Anais da 34ª Jornada Acadêmica Integrada**, 2019.
2. **CRUZ, T. K. T.**, LORO, V. L., PELLEGRIN, D., AMARAL, A. M. B., STORCK, T. R., AMES, J. NÍVEIS DE GLICOGÊNIO MUSCULAR EM CYPRINUS CARPIO ALIMENTADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE RESVERATROL. In: 34ª Jornada Acadêmica Integrada, 2019, Santa Maria. **Anais da 34ª Jornada Acadêmica Integrada**, 2019.
3. **CRUZ, T. K. T.**, STORCK, T. R., AMARAL, A. M. B., PELLEGRIN, D., LORO, V. L. NÍVEIS PROTEICOS DE PEIXE-ZEBRA (DANIO RERIO) EXPOSTOS A DUAS FORMULAÇÕES DE HERBICIDA. In: I Congresso Brasileiro Interdisciplinar de Ciência e Tecnologia, 2020, Brasil. **Anais do I Congresso Brasileiro Interdisciplinar de Ciência e Tecnologia**, 2020.
4. LASSEN, M. F. M., **CRUZ, T. K. T.**, FROHLICH, J. PEIXE COMO BIOINDICADOR AMBIENTAL DE CONTAMINAÇÃO EM ÁGUAS SUPERFICIAIS. In: 34ª Jornada Acadêmica Integrada, 2019, Santa Maria. **Anais da 34ª Jornada Acadêmica Integrada**, 2019.
5. STORCK, T. R., AMARAL, A. M. B., PELLEGRIN, D., **CRUZ, T. K. T.**, LORO, V. L. CONTAMINAÇÃO DE UM RIO POR AGROTÓXICOS: AVALIAÇÃO E EFEITOS EM BIOMARCADORES DE BRÂNQUIAS DE ASTYANAX SP. In: I Congresso Brasileiro Interdisciplinar de Ciência e Tecnologia, 2020, Brasil. **Anais do I Congresso Brasileiro Interdisciplinar de Ciência e Tecnologia**, 2020.
6. STORCK, T. R., CLASEN, B. E., AMARAL, A. M. B., **CRUZ, T. K. T.**, PELLEGRIN, D., AMES, J., LORO, V. L. AVALIAÇÃO DE PESTICIDAS E DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA DE UM RIO UTILIZADO PARA ABASTECIMENTO HUMANO. In: 34ª Jornada Acadêmica Integrada, 2019, Santa Maria. **Anais da 34ª Jornada Acadêmica Integrada**, 2019.

**ANEXO C – APROVAÇÃO DE PUBLICAÇÃO DE CAPÍTULO DE E-BOOK REDIGIDO
COM DADOS DAS PESQUISAS DO MESTRADO**



PONTA GROSSA, 10 de novembro de 2020.

DECLARAÇÃO DE ACEITE

Após avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta editora, tenho a honra de informar que o artigo intitulado "NÍVEIS PROTEICOS DE PEIXE-ZEBRA (DANIO RERIO) EXPOSTOS A DUAS FORMULAÇÕES DE HERBICIDA" de autoria de "TAISSON KROTH THOMÉ DA CRUZ, MANOEL FRANCISCO MENDES LASSEN, TAMIRIS ROSSO STORCK, ALINE MONIQUE BLANK DO AMARAL, DIONATAN DE PELLEGRIN, VANIA LUCIA LORO", foi aprovado e encontra-se no prelo para publicação no livro eletrônico "O Fortalecimento Intensivo das Ciências Biológicas e suas Interfaces" a ser divulgado em fevereiro de 2021.

Agradeço a escolha pela Atena Editora como meio de transmitir ao público científico e acadêmico o trabalho e parabenizo os autores pelo aceite de publicação.

Reitero protestos de mais elevada estima e consideração.

Prof.ª Dr.ª Antonella Carvalho de Oliveira
Editor Chefe ATENA EDITORA

PREFIXO EDITORIAL ISBN 93243 PREFIXO EDITORIAL DOI 10.22533

Atena Editora - CNPJ: 26.080.637/0001-29 R JULIA LOPES , 556, ORFAS

PONTA GROSSA – PR – CEP: 84070-202

E-mail: contato@atenaeditora.com.br Site: www.atenaeditora.com.br