

RAÍSSA MIRANDA COSTA

AVALIAÇÃO DE RISCO ASSOCIADA À EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO
AGROTÓXICO CARBENDAZIM

OURO PRETO – MG

2022

RAÍSSA MIRANDA COSTA

AVALIAÇÃO DE RISCO ASSOCIADA À EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO
AGROTÓXICO CARBENDAZIM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental – Área de Concentração: Meio Ambiente, sob orientação da:

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Elvira Poleti Martucci.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Karina Taciana Santos Rubio.

OURO PRETO – MG

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

C837a Costa, Raissa Miranda.
Avaliação de risco associada à exposição crônica ao agrotóxico
Carbendazim. [manuscrito] / Raissa Miranda Costa. - 2022.
98 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elvira Poleti Martucci.
Coorientadora: Profa. Dra. Karina Taciana Santos Rubio.
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro
Preto. Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental. Programa
de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.
Área de Concentração: Meio Ambiente.

1. Produtos químicos agrícolas - Carbendazim. 2. Liquid
chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). 3.
Metabólitos - Metabolômica. 4. Toxicologia - Toxicidade crônica. 5.
Produtos químicos agrícolas. 6. Zebrafish. I. Martucci, Maria Elvira Poleti.
II. Rubio, Karina Taciana Santos. III. Universidade Federal de Ouro Preto.
IV. Título.

CDU 502

Bibliotecário(a) Responsável: Maristela Sanches Lima Mesquita - CRB-1716



FOLHA DE APROVAÇÃO

Raíssa Miranda Costa

Avaliação de Risco Associada à Exposição Crônica ao Agrotóxico Carbendazim

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Aprovada em 22 de junho de 2022

Membros da banca

Dra. Maria Elvira Poleti Martucci - Orientadora Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Karina Taciana Santos Rubio - Coorientadora Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Carina de Souza Anselmo - Universidade Federal do Rio de Janeiro
Dr. Sérgio Francisco de Aquino - Universidade Federal de Ouro Preto

Dra. Maria Elvira Poleti Martucci, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 19/08/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Maria Elvira Poleti Martucci, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 23/08/2022, às 08:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0384863** e o código CRC **A72B0A40**.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me sustentar e dar forças para chegar até aqui.

À minha família, maior fonte de apoio e suporte ao longo desse período. Em especial a minha mãe, por ser minha companheira nas viagens até Ouro Preto durante o período experimental da pesquisa.

À Diego, meu marido, pelo incentivo, paciência e companheirismo durante essa etapa.

À minha amiga Thayná, por estar sempre presente na minha vida mesmo distante.

À minha orientadora Maria Elvira, por todo apoio, paciência e ensinamentos.

A todos os professores, que passaram ao longo dessa jornada transmitindo conhecimento.

À UFOP, em especial ao ProAmb, por todo conhecimento de qualidade e incentivo à ciência.

Ao CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO

O carbendazim, um agrotóxico amplamente utilizado, tem mostrado sinais de causar câncer, infertilidade e toxicidade a organismos. Consequentemente, este fungicida torna-se uma substância persistente no meio ambiente, levantando a importância de se conhecer melhor seu comportamento, vias metabólicas e efeitos nos organismos. Além disso, o carbendazim foi proibido nos EUA, Austrália e em vários países da União Europeia. Por outro lado, no Brasil, o agrotóxico ainda é permitido, de forma que a legislação brasileira de água potável permite uma concentração limite de 120 µg/L. Portanto, mais estudos são necessários para avaliar seus efeitos e o *zebrafish* é um modelo usado rotineiramente para fornecer informações relevantes sobre os efeitos agudos e de longo prazo dos xenobióticos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar metabólitos de carbendazim em tanques de água e no fígado do *zebrafish* exposto a concentração de 120 µg/L usando cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massa de alta resolução (LC-HRMS) com abordagem metabolômica para destacar alvos analíticos a fim de monitorar a exposição de carbendazim em ambientes aquáticos. Para tanto, foram definidos os grupos de tratamento, negativo e estabilidade. Além disso, amostras de água e fígado foram coletadas e análises foram realizadas por LC-HRMS. Por fim, os dados foram submetidos à análise estatística utilizando a abordagem da metabolômica global. Os resultados permitiram a anotação putativa de 7 metabólitos alvo e atribuições de metabólitos não direcionados. Este estudo aplicou a análise do tanque de água do *Zebrafish* para avaliação dos metabólitos alvo e não alvo do carbendazim como uma abordagem promissora, uma vez que é uma matriz muito mais limpa do que as matrizes biológicas usuais. Esses metabólitos podem garantir a detectabilidade e aprimorar a confiança no monitoramento da exposição ao carbendazim em ambientes aquáticos. Além disso, os resultados das análises do fígado sugerem comprometimento do metabolismo lipídico com consequente aumento de lipídeos intra-hepáticos e interrupção endócrina. Foi possível também sugerir dois metabólitos endógenos como potenciais biomarcadores para determinar a exposição ao carbendazim.

Palavras-chave: Carbendazim; LC-HRMS; metabolômica; toxicidade crônica; agrotóxico; *Zebrafish*.

ABSTRACT

Carbendazim, a widely used pesticide, has shown signs of causing cancer, infertility and toxicity to organisms. Consequently, this fungicide becomes a persistent substance in the environment, raising the importance of better understanding its behavior, metabolic pathways and effects on organisms. As a result, carbendazim has been banned in the US, Australia and several European Union countries. On the other hand, in Brazil, pesticides are still allowed, so the Brazilian drinking water legislation allows a limit concentration of 120 µg/L. Therefore, more studies are needed to assess its effects and the zebrafish is a model used routinely to provide relevant information about the acute and long-term effects of xenobiotics. Therefore, the objective of this work was to evaluate carbendazim metabolites in water tanks and in zebrafish liver exposed to a concentration of 120 ug/L using liquid chromatography coupled to a high resolution mass spectrometer (LC-HRMS) with a metabolomic approach to highlight analytical targets to monitor carbendazim exposure in aquatic environments. Therefore, treatment, negative and stability groups were defined. In addition, water and liver samples were collected and analyzes were performed by LC-HRMS. Finally, the data were submitted to statistical analysis using the global metabolomics approach. The results allowed the putative annotation of 7 target metabolites and assignments of untargeted metabolites. This study applied Zebrafish water tank analysis to assess target and non-target metabolites of carbendazim as a promising approach as it is a much cleaner matrix than usual biological matrices. These metabolites can ensure detectability and improve confidence in monitoring exposure to carbendazim in aquatic environments. In addition, the results of liver analyzes suggest impaired lipid metabolism with consequent increase in intrahepatic lipids and endocrine disruption. It was also possible to suggest two endogenous metabolites as potential biomarkers to determine exposure to carbendazim.

Keywords: Carbendazim; LC-HRMS; metabolomic; chronic toxicity; pesticide; Zebrafish.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ação do Carbendazim.....	20
Figura 2 - Dimorfismo sexual entre macho (esquerda) e fêmea (direita).....	23
Figura 3 - Agrupamento dos aquários.....	37
Figura 4- Dissecção do <i>Zebrafish</i>	39
Figura 5 - Cartucho STRATA-XCW 30 mg.....	40
Figura 6 - Evaporação das amostras sob o fluxo de nitrogênio.....	40
Figura 7 - Áreas dos sinais cromatográficos do carbendazim (a) e da proxifilina (b) no <i>software</i> Thermo Scientific XcaliburTM.....	43
Figura 8 - Tempo de retenção das cinco amostras da seletividade - Matriz água.....	46
Figura 9 - Tempo de retenção das cinco amostras da seletividade - Matriz fígado.....	47
Figura 10 - Curvas analíticas de calibração para as amostras de água e órgão.....	48
Figura 11 - Monitoramento da concentração do carbendazim na água dos aquários usados no teste de exposição do <i>zebrafish</i> ao carbendazim por 35 dias.....	51
Figura 12 - Cromatograma e espectro de massas do carbendazim referente às amostras de água para o grupo tratado por 7 dias.....	52
Figura 13 - Carbendazim e seus metabólitos identificados nas amostras de água para o grupo tratado por 7 dias.....	53
Figura 14 - Espectro de Massas nos modos <i>full-scan</i> e <i>full-scan / DDA-MS2</i> para o metabólito 5-HBC identificado nas amostras de água para o grupo tratado por 7 dias.....	55
Figura 15 - Espectro de Massas nos modos <i>full-scan</i> e <i>full-scan / DDA-MS2</i> para o metabólito 5-HBC-S identificado nas amostras de água para o grupo tratado por 7 dias.....	55
Figura 16 - Espectro de Massas nos modos <i>full-scan</i> e <i>full-scan / DDA-MS2</i> para o metabólito 2-AB identificado nas amostras de água para o grupo tratado por 7 dias.....	56
Figura 17 - Espectro de Massas nos modos <i>full-scan</i> e <i>full-scan / DDA-MS2</i> para o metabólito 1-metoxibenzotriazol identificado nas amostras de água para o grupo tratado por 7 dias.....	57
Figura 18 - Espectro de Massas nos modos <i>full-scan</i> e <i>full-scan / DDA-MS2</i> para o metabólito 2-HB identificado nas amostras de água para o grupo tratado por 7 dias.....	57
Figura 19 - Espectro de Massas nos modos <i>full-scan</i> e <i>full-scan / DDA-MS2</i> para o metabólito 1,2-diaminobenzeno identificado nas amostras de água para o grupo tratado por 7 dias.....	58
Figura 20 - Espectro de Massas nos modos <i>full-scan</i> e <i>full-scan / DDA-MS2</i> para o metabólito 1,2-dihidroxibenzeno identificado nas amostras de água para o grupo tratado por 7 dias.....	58
Figura 21 - (A) Carbendazim e seus metabólitos referentes as amostras de água do grupo tratamento 7 dias. (B) Ampliação dos metabólitos da Fig. A para visualização de detalhes.....	60
Figura 22 - (A) Carbendazim e seus metabólitos referentes as amostras de água do grupo estabilidade durante os primeiros 7 dias. (B) Ampliação dos metabólitos da Fig. A para visualização de detalhes.....	61
Figura 23 - Formação dos metabólitos durante as 168 primeiras horas de exposição para as amostras de água com base nos dados dos grupos tratamento e estabilidade de 7 dias.....	62
Figura 24 - Espectro de Massas do metabólito 5,6-HOBC-N-óxido identificado nas amostras de fígado do grupo tratamento.....	63
Figura 25 - (A) Carbendazim e seus metabólitos identificados no fígado para os grupos do tratamento de 7, 14, 28 e 35 dias. (B) Ampliação dos metabólitos da Fig. A para visualização de detalhes.....	64
Figura 26- Análises estatísticas PCA 2D (A) e PLS-DA 2D (B) referentes às amostras de água do tratamento 7 dias (verde) e negativo 7 dias (vermelho).....	65
Figura 27 - VIP Scores referentes às amostras de água do tratamento 7 dias (vermelho) e negativo 7 dias (azul).....	66

Figura 28 –Heatmap referente às amostras de água do tratamento 7 dias (verde) e negativo 7 dias (vermelho).....	72
Figura 29 – Volcano plot referente às amostras de água do tratamento 7 dias demonstrando os metabólitos que foram aumentados (vermelho) e diminuídos (azul).■.....	73
Figura 30– Análise estatística PLS-DA 2D referente às amostras de fígado do tratamento 7 dias (verde) e 28 dias (vermelho).....	74
Figura 31 - VIP Scores referentes às amostras de fígado do tratamento 7 dias (vermelho) e 28 dias (azul).....	75
Figura 32 –Heatmap referente às amostras de fígado do tratamento 7 dias (verde) e 28 dias (vermelho).....	79
Figura 33 - Visão geral do enriquecimento do conjunto de metabólitos.....	80
Figura 34 - Biomarcadores potenciais para determinar a exposição ao carbendazim.....	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Situação regulatória internacional dos dez ingredientes ativos de agrotóxicos mais detectados pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da ANVISA.....	12
Quadro 2 - Comparação entre os modelos animais mais utilizados.....	23
Quadro 3 - Biologia comparativa entre o zebrafish e o ser humano.	25
Quadro 4 - Pesquisas envolvendo o zebrafish no ramo da toxicologia.....	28
Quadro 5 - Quadro resumo do tratamento dos animais.....	36
Quadro 6 - Coletas de amostras de água.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características do carbendazim.....	19
Tabela 2- Relação sinal/ruído para o carbendazim e o padrão interno, no nível inferior da curva analítica.	48
Tabela 3- Critérios utilizados na avaliação do arraste.....	49
Tabela 4 - Cálculos robustez – Matriz água	50
Tabela 5 - Cálculos robustez – Matriz fígado.....	50
Tabela 6 - Carbendazim e seus metabólitos identificados.....	54
Tabela 7 - Metabólitos diferencialmente abundantes.....	68
Tabela 8 - Metabólitos diferencialmente abundantes.....	76
Tabela 9 - Área sob a curva da característica de operação do receptor (ROC)	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGC	Controle Automático de Ganho (do inglês, <i>Automatic Gain Control</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização Química à Pressão Atmosférica
APPI	Fotoionização à Pressão Atmosférica
BCF	Fator de Bioconcentração (do inglês, <i>Bioconcentration Factor</i>)
CA	Curva Analítica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CTA	Comitê Técnico de Assessoramento de Agrotóxicos
CTNFito	Comissão Técnica Nacional de Fitossanitários
CV	Coefficiente de Variação
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPR	Desvio Padrão Relativo
EUA	Estados Unidos da América
EFAR	Escola de Farmácia
ESI	Ionização por Eletrospray (do inglês, <i>Electrospray Ionization</i>)
HCD	Dissociação Colisional de Alta Energia (do inglês, <i>higher-energy collisional dissociation</i>)
US EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês, <i>United States Environmental Protection Agency</i>)
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>)
IDA	Ingestão Diária Aceitável
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LC-HRMS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas de Alta resolução (do inglês, <i>Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry</i>)
LC-MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (do inglês, <i>Liquid Chromatography–Mass Spectrometry</i>)

LMR	Limite Máximo de Resíduo
LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MSEA	Análise de Enriquecimento do Conjunto de Metabólitos (do inglês, <i>Metabolite set enrichment analysis</i>)
NIH	Instituto Nacional de Saúde (do inglês, <i>National Institute of Health</i>)
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (do inglês, <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>)
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PCA	Análise de Componentes Principais (do inglês, <i>Principal Component Analysis</i>)
PI	Padrão Interno
ROC	Curva Característica de Operação do Receptor (do inglês, <i>Receiver Operating Characteristic</i>)
RT	Tempo de Retenção (do inglês, <i>retention time</i>)
SI	Solução Intermediária
PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (do inglês, <i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>)
SPE	Extração em Fase Sólida (do inglês, <i>Solid-phase extraction</i>)
VIP	Índice de Importância Variável (do inglês, <i>Variable Importance in Projection</i>)
VMP	Valor Máximo Permitido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo Geral.....	15
2.2. Objetivos Específicos	15
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1. Utilização de Agrotóxicos no Brasil.....	16
3.1.1. Regulamentação dos Agrotóxicos no Brasil.....	16
3.1.2. Carbendazim.....	18
3.2. Zebrafish	21
3.3. Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS)	29
3.4. Metabolômica.....	31
4. METODOLOGIA	34
4.1. Reagentes e Solventes.....	34
4.2. Preparo das Soluções	34
4.3. Equipamentos Utilizados	34
4.4. <i>Zebrafish</i>	35
4.4.1. Ética em Experimentação Animal	35
4.4.2. Manutenção e Cultivo dos Animais.....	35
4.4.3. Tratamento e Exposição dos Animais ao Carbendazim	35
4.5. Preparo das Amostras	39
4.5.1. Amostras de Água.....	39
4.5.2. Amostras de Fígado	40
4.6. Análise Instrumental.....	41
4.7. Validação do Método Analítico.....	42
4.8. Monitoramento da Concentração de Carbendazim.....	43
4.9. Avaliação dos Metabólitos de Carbendazim	44
4.10. Análises Estatísticas para Abordagem Metabolômica	44
4.11. Avaliação da Bioacumulação no Fígado.....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	46
5.1. Validação do Método Analítico.....	46
5.2. Monitoramento da concentração do carbendazim	51
5.3. Detecção de Possíveis Metabólitos do Carbendazim utilizando o modelo <i>Zebrafish</i> por LC-HRMS no grupo tratado por 7 dias	51
5.4. Perfil Metabólico do Carbendazim	59
5.5. Avaliação da Bioacumulação no Fígado.....	62
5.6. Abordagem Metabolômica.....	64

5.6.1. Amostras de Água.....	64
5.6.2. Amostras de Fígado	73
5.7. Alterações nas vias metabólicas e biomarcadores de exposição ao carbendazim por análise de amostras de fígado de <i>Zebrafish</i>	80
6. CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS	85
ANEXO 01.....	98

1. INTRODUÇÃO

A atividade agrícola é um dos pilares da economia brasileira, sendo voltada para um modelo de desenvolvimento focado nos ganhos e produtividade. Desta forma, a fim de se alcançar melhores resultados nas lavouras, a agricultura no Brasil se encontra fortemente associada ao uso de agrotóxicos (FERREIRA, 2014).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2022), o Brasil tem cerca de 504 agrotóxicos de uso agrícola autorizado. Além disso, o uso desenfreado de agrotóxicos na agricultura tem se mostrado como uma questão preocupante relacionada à saúde pública, principalmente devido às concentrações de resíduos encontradas não somente nos alimentos, mas também no solo e na água, podendo prejudicar os seres vivos, bem como ocasionar alterações da biodiversidade do solo (ANVISA, 2019; CARNEIRO *et al.*, 2015).

Estudos mundialmente e no Brasil constataram a presença de agrotóxicos nos cursos hídricos tanto superficiais quanto subterrâneos utilizados para consumo humano (BORSOI, 2019). Desta forma, é requerida uma atenção por parte do governo a fim de se implementar medidas de controle para o uso dos agrotóxicos (QUEIROZ, 2012; RIGOTTO, 2011), uma vez que a intoxicação por meio do uso dessas substâncias pode se dar não somente por meio de contato direto, mas também pela ingestão do alimento em que se foi utilizado o produto durante o plantio ou até mesmo através da ingestão de água contaminada (BRASIL, 2015).

A Portaria GM/MS Nº 888, de 4 de maio de 2021 - que altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação Nº 5 do Ministério da Saúde de 03 de outubro de 2017 - estabelece procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano, bem como o seu padrão de potabilidade, contando inclusive com os valores permitidos para substâncias químicas que representam risco à saúde, dentre elas os agrotóxicos.

A Lei 7.802, de 11 de julho de 1989 dispõe que o registro de um determinado agrotóxico deve ser feito por meio de uma equipe multidisciplinar, em que o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) verifica a eficiência no combate a pragas e doenças no campo; a ANVISA avalia quais são os riscos à saúde e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) analisa os perigos ao meio ambiente. Assim, um agrotóxico não é liberado sem o aval dos três órgãos.

A ANVISA, por meio do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), avalia continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos

encontrados nos alimentos de origem vegetal que chegam até o consumidor, monitorando o Limite Máximo de Resíduo (LMR) e o intervalo de segurança. Em seu último relatório publicado (2017/2018), foi apontado um valor considerável de amostras acima do LMR e também a presença de agrotóxicos não autorizados para determinadas culturas (ANVISA, 2019).

Nos anos de 2017 e 2018, o PARA (2019) analisou 4.616 amostras com a finalidade de encontrar resíduos de agrotóxicos, sendo pesquisados até 270 ativos. Desta forma, foram detectados resíduos de 122 ingredientes ativos diferentes. Os agrotóxicos responsáveis pelo maior índice de detecção foram imidacloprido, tebuconazol e carbendazim. O carbendazim, proibido na Europa e Estados Unidos (EUA), foi detectado em 526 amostras, correspondendo a 11% das amostras analisadas. O Quadro 1 apresenta a situação regulatória internacional dos dez ingredientes ativos de agrotóxicos mais detectados pela ANVISA através do programa PARA (2019).

Quadro 1 - Situação regulatória internacional dos dez ingredientes ativos de agrotóxicos mais detectados pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da ANVISA.

Ingrediente Ativo	Brasil	Europa	EUA	Austrália	Canadá	Japão
Imidacloprido	+	+	+	+	+	+
Tebuconazol	+	+	+	+	+	+
Carbendazim	Reavaliação	-	-	+	-	-
Piraclostrobina	+	+	+	+	+	+
Ditiocarbamatos*	+	+	+	+	+	+
Difenoconazol	+	+	+	+	+	+
Acefato	+ (Reavaliado)	-	+	+	+	+
Procimidona	Reavaliação	-	+	+	+	+
Cipermetrina	+	+	+	+	+	+
Azoxistrobina	+	+	+	+	+	+

Nota:

(1) O símbolo “+” significa que o ingrediente ativo possui uso agrícola autorizado; o símbolo “-” significa que não possui uso agrícola autorizado no país da coluna relacionada.

(2) O ditiocarbamato considerado foi o mancozebe, 3º ingrediente ativo mais comercializado no Brasil, segundo o último relatório de comercialização emitido pelo Ibama.

(3) Carbendazim e procimidona foram selecionados para novas avaliações.

(4) O acefato foi reavaliado e mantido com restrições.

Fonte: ANVISA. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA), 2019.

O carbendazim é um fungicida de fórmula molecular $C_9H_9N_3O_2$. No Brasil, é utilizado nas culturas de algodão, arroz, cevada, citros, feijão, maçã, milho, soja e trigo. Tal agrotóxico atua no combate de pragas típicas das lavouras de laranja como a *Guignardia citricarpa* (pinta preta) e *Colletotrichum acutatum* (estrelinha). Possui

classificação toxicológica III, ou seja, considerado moderadamente tóxico (ANVISA,2019; KUPPER *et al.*, 2012).

O carbenzadim tornou-se notícia internacional no ano de 2012 devido a uma proibição, por parte dos EUA, da importação do suco de laranja brasileiro, em decorrência da presença de tal agrotóxico. O acontecimento impactou na economia brasileira, uma vez que grande parte da exportação de suco de laranja era destinada aos EUA. Segundo a agência americana de fiscalização *Food and Drug Administration* - FDA (2012), o carbenzadim está associado ao risco de tumores de fígado, o que gera a proibição no país.

Pesquisas realizadas nos EUA apontam que a exposição aguda em doses elevadas ou crônica de animais e seres humanos ao carbendazim pode contribuir para promoção de tumores, diferenciação sexual inadequada, desregulações endócrinas (FARAG *et al.*, 2011; IRELAND *et al.*, 1979; LIM E MILLER, 1997; MORINAGA, *et al.*, 2004; NAKAI *et al.*, 2002; URANI *et al.*, 1995) e prejuízo ao desenvolvimento humano, o que reforça a necessidade de estudos sobre os efeitos da exposição ao fungicida (LEWIS *et al.*, 2016).

Para a realização de tais estudos se faz necessário a adoção de um modelo experimental que seja eficiente para a avaliação do risco apresentado pelo carbendazim. Uma das espécies consideradas de destaque para experimentos dos efeitos de exposição a contaminantes ambientais é o *zebrafish* (*Danio rerio*), uma vez que a qualidade da água tem grande interferência na sua produtividade e saúde (FUZZEN *et al.*, 2011).

O *zebrafish*, como é popularmente conhecido, é um peixe de água doce de origem do sul da Ásia. Se alimenta de algas, zooplâncton, insetos e materiais orgânicos. É caracterizado por seu pequeno porte e listras ao longo do corpo nas cores prata e azul. Apresenta os estágios de vida larval, juvenil e adulto. A espécie vive em média de quatro a cinco anos e atinge a sua maturidade sexual com a fase adulta, ou seja, por volta dos noventa dias de vida (DAMMSKI *et al.*, 2011).

Esse modelo tornou-se popular na Europa e EUA no final do século XX e, desde então, seu uso começou a ser difundido em todo o mundo de modo que atualmente grandes universidades e centros de pesquisa vêm implementando o *zebrafish* como modelo animal (MEUNIER, 2012; KALUEFF *et al.*, 2014b). Em 2013, o *zebrafish* foi estabelecido pela OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) como modelo para avaliação de testes de toxicidade agudos e crônicos causadas por produtos químicos (OECD, 2013).

Alguns dos benefícios para a utilização do *zebrafish* em pesquisas são as características que ele apresenta: ocupa pouco espaço, possui alta tolerância a variações

ambientais, elevado potencial de reprodução, manejo facilitado, baixo valor de investimento e, principalmente sua capacidade de absorção dos compostos adicionados na água (BARBAZUK *et al.*, 2000; LIESCHKE e CURRIE, 2007; LAWRENCE, 2007).

Além disso, pesquisas apontam que o *zebrafish* apresenta um total de 94 genes CYP, divididas em 18 famílias de genes também encontradas em humanos e outros mamíferos. Goldstone *et al.* (2010) relataram através de análise filogenética molecular, relações entre genes CYP e famílias de genes em *zebrafish* e humanos. Em 2013, um estudo publicado por Howe, *et al.* (2013) demonstrou, através do sequenciamento do genoma do *zebrafish*, que o referido animal, os camundongos e os seres humanos possuem 12.719 genes em comum, o que representa que 70% dos genes humanos são encontrados no peixe. Desta forma, a espécie vem sendo amplamente utilizada para estudos em busca da cura de doenças genéticas como depressão, mal de Parkinson e esquizofrenia.

Outra vantagem do *zebrafish* é que ele apresenta semelhanças aos humanos em sua morfologia e fisiologia em relação a fibras musculares, sistema nervoso central, sistema esquelético complexo, células hematopoiéticas múltiplas, sistema cardiovascular (LIESCHKE e CURRIE, 2007).

Para se avaliar o comportamento de uma substância no organismo, é importante estudar de maneira abrangente o real potencial toxicológico desta associação como um todo. Desta forma, a metabolômica tornou-se uma ferramenta importante, principalmente para a toxicologia, uma vez que é capaz de estudar a resposta biológica e o metabolismo de organismos de forma abrangente (VILLAS-BOAS *et al.*, 2005).

A metabolômica propõe-se, por meio da análise de tecidos ou biofluidos, os quais são oriundos de reações celulares causadas por predisposições genéticas e/ou interações com o ambiente, a evidenciar e classificar padrões de alterações metabólicas advindas de estados fisiológicos ou adversos. Tal técnica vem sendo cada vez mais utilizada nas diversas áreas da ciência (ROBERTSON *et al.*, 2011; BARBAS *et al.*, 2011; NORDSTROM E LEWENSOHN, 2010).

Diante do apresentado e frente à necessidade de se estudar os efeitos tóxicos do agrotóxico carbendazim, este trabalho objetivou avaliar o risco associado à exposição crônica ao agrotóxico utilizando o modelo animal *zebrafish*. Para tal, amostras de água do aquário e do fígado dos animais expostos foram analisadas por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-HRMS), seguida por análises estatísticas multivariadas e univariadas, utilizando a abordagem metabolômica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o risco associado à exposição crônica de peixes *zebrafish* ao carbendazim – na concentração limite permitida na água potável no Brasil -, por meio da análise da água do aquário e do fígado dos animais expostos.

2.2. Objetivos Específicos

- Validar metodologia analítica por LC-HRMS para detecção de carbendazim e seus metabólitos em água de aquário.
- Avaliar o perfil metabólico e a excreção do agrotóxico por LC-HRMS de amostras de água dos aquários;
- Avaliar a bioacumulação de carbendazim e seus metabólitos no fígado;
- Avaliar as alterações metabólicas no fígado dos animais;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Utilização de Agrotóxicos no Brasil

Agrotóxicos são insumos agrícolas, porém são produtos de perigosos; se apresentam sob a forma de inseticidas, fungicidas, rodenticidas, inibidores de crescimento e vários outros; e, apesar de aumentar a produtividade das lavouras, quando usados em alta frequência e de maneira descontrolada, podem acarretar diversas consequências negativas.

Segundo Moraes (2019), os impactos sobre os seres humanos podem variar desde náuseas, dores musculares e dores de cabeça, até problemas mais graves como diabetes, má formação congênita e câncer. No meio ambiente, o uso desses compostos ocasiona desequilíbrio ecológico, afeta organismos “não-alvo”, prejudica polinizadores fundamentais como as abelhas e atinge os meios aquáticos e seus organismos (BELCHIOR *et al.*, 2017).

O Brasil é um dos principais países onde se destaca o agronegócio, por esse motivo e em consequência dos interesses econômicos do setor, o país é considerado líder em importação de agrotóxicos, buscando o controle de pragas e o controle de doenças das plantas (PELAEZ *et al.*, 2015).

A estimativa anual é que seja utilizado em torno de 900 milhões de litros por ano no país, distribuídos principalmente entre as culturas da soja, milho e cana (PIGNATI *et al.*, 2017). Sendo assim, programas e políticas públicas são criados na tentativa de monitorar e orientar a maneira adequada do uso de agrotóxicos, visando reduzir os riscos à saúde e ao meio ambiente, como por exemplo, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) criado pela ANVISA em 2001 (LOPES; ALBUQUERQUE, 2021).

3.1.1. Regulamentação dos Agrotóxicos no Brasil

A regulamentação dos agrotóxicos só começou a ter espaço a partir da década de 1970, mesmo em economias mais avançadas. Por muitos anos, devido ao grande poder dos produtores agrícolas, o grande interesse no uso dos agrotóxicos e poder estrutural do setor, a regulamentação desses compostos seguiu deficiente (MORAES, 2019).

No Brasil, somente após a promulgação da Constituição Federal de 1988 foi criada uma legislação específica para os agrotóxicos. Antes, vigorava o Decreto nº 24.114 de 1934 que se mostrava ineficiente ao tratar de medidas de restrições e mecanismos de

fiscalização, principalmente ao se considerar o cenário de inserção dos organossintéticos na agricultura (SOUZA, 2017).

Após a promulgação da Constituição Federal, em 1989, foi publicada a Lei dos Agrotóxicos (Lei nº 7.802 de 1989), lei básica atual que ainda hoje regulamenta e disciplina o uso dos agrotóxicos no Brasil. Segundo Lima (2018), tal legislação foi um marco no cenário do agronegócio, sendo considerada um avanço no que dizia respeito ao controle e uso dos agrotóxicos no país à época. Em 2002, através do decreto nº 4.074, foi regulamentada, estabelecendo critérios para avaliação dos compostos, conduta em relação às embalagens, destinação final, registro, classificação, controle, inspeção, fiscalização e trazendo a seguinte definição sobre agrotóxicos e afins:

- a) os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;
- b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento; (BRASIL, 1989, art. 2º, p. 1).

O processo de aprovação de um novo ingrediente químico no país conta com um processo complexo, com três órgãos responsáveis, chamado de tripla análise: o Ministério da Saúde passa para a ANVISA a função de analisar os riscos inerentes à nova substância e avaliar sua toxicidade; o Ministério do Meio Ambiente encarrega o IBAMA de avaliar o fator ecotoxicológico, ou seja, o dano que este pode causar no meio ambiente; e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento fica a cargo de avaliar a eficiência agrônômica do composto para o setor, bem como, seu custo-benefício (LIMA, 2018).

Após a aprovação da tripla análise, o Comitê Técnico de Assessoramento de Agrotóxicos (CTA), instituído pelo decreto 4.074 de 2002, realiza a racionalização e os trâmites técnicos necessários para o registro do agrotóxico. O CTA também deve auxiliar no processo de concessão do registro para uso emergencial de agrotóxicos e afins (BRASIL, 2002a).

No que tange a regulação dos agrotóxicos na água, um instrumento importante é a Portaria de Consolidação Nº5, de 28 de setembro de 2017 que, “consolida as normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde” (BRASIL, 2017) e discorre em seu anexo XX, alterado pela Portaria GM/MS nº 888, de 04 de maio de 2021, sobre o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (BRASIL, 2021). De acordo com a tabela de padrão de potabilidade, o carbendazim, tem como limite 120 µg/L.

Entretanto, a flexibilização da legislação brasileira é grande quando comparada às legislações de locais como a União Europeia ou Estados Unidos. O acefato que se encontra na 3º posição de mais vendidos no Brasil, na União Europeia tem limite estabelecido de 0,1 µg/L na água (DE FREITAS; REGINO, 2020), enquanto que no território brasileiro seu limite estabelecido pela Portaria GM/MS nº 888/2021 é de 7 µg/L. Além do seu limite definido, o acefato também é proibido de ser comercializado e utilizado em plantios em países europeus (BOMBARDI, 2017).

Na mesma situação, tem-se a atrazina com limite de 0,1 µg/L na lei europeia, enquanto no Brasil seu limite chega a ser 20 vezes maior, atingindo um total de 2 µg/L (DE FREITAS; REGINO, 2020). O carbufurano, segundo Bombardi (2017), chega a ter limite 70 vezes maior (com 7 µg/L de limite) no Brasil e traz impactos agressivos à água e ao meio ambiente.

Em 2º lugar nos mais vendidos no Brasil, encontra-se o 2,4-D, com diferenças discrepantes entre as legislações (IBAMA, 2021). Nos países europeus, seu limite segue o padrão dos demais, 0,1 µg/L, já na legislação brasileira atinge-se concentração 300 vezes maior com o limite de 30 µg/L. Tal agrotóxico é utilizado na produção de um dos alimentos mais consumidos pelos brasileiros, o arroz. Portanto, Moraes (2019) alerta para o consumo e ingestão humana abusiva do 2,4-D por meio da água e arroz.

3.1.2. Carbendazim

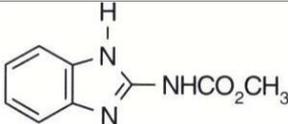
Os fungicidas sistêmicos da classe dos benzimidazois foram os protagonistas na história do desenvolvimento dos fungicidas nos anos de 1960. São aplicados em diversas culturas como: algodão, feijão, soja, trigo, citros, e em uma grande quantidade de frutas e demais plantas (COUTINHO *et al.*, 2006).

Desse grupo da classe dos benzimidazois, os principais fungicidas são: benomil, tiofanato-metílico e carbendazim, além de ser o principal ingrediente ativo de diversos produtos comerciais (Derosal 500 SC ®, Bendazol®, Rodazim®, ImperadorBR ®, Carbomax 500 SC®, dentre outros). Importante destacar que o benomil no ambiente é rapidamente transformado em carbendazim, com meia vida de 2 horas na água e 19 horas em solo, o que o torna um perigoso contaminante (MARTINI; SOLALIENDRES, 2011).

O carbendazim é um fungicida sistêmico pertencente ao grupo químico benzimidazol. Trata-se de um sólido cristalino incolor que apresenta baixa solubilidade em água, é volátil e moderadamente móvel (IUPAC, 2021). É utilizado no Brasil, geralmente, no controle de pragas como a *Guignardia citricarpa* (pinta preta) e

Colletotrichum acutatum (estrelinha), fungos comuns na produção de laranja (SILVA *et al.*, 2014), mas também é aplicado em culturas de feijão, soja e trigo (MAXIMIANO *et al.*, 2016). A Tabela 1 apresenta suas demais características.

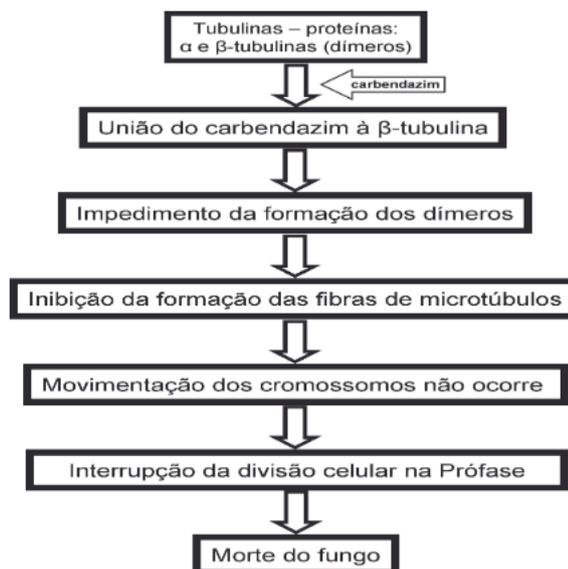
Tabela 1 - Características do carbendazim.

Fórmula molecular	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂
Nome químico	methyl benzimidazol-2-ylcarbamate
Fórmula estrutural	
Massa molar	191,07 g.mol ⁻¹
Solubilidade - Em água a 20°C (mg l⁻¹)	29 (pH 4) 8 (pH 7) 1,49 (pH 8)
Solubilidade - Em solventes orgânicos a 20°C (mg l⁻¹)	300 – Etanol 36 – Benzeno 135 – Acetato de etila 100 – Clorofórmio
Ponto de fusão (° C)	305
Ponto de degradação (° C)	305
Coefficiente de partição octanol-água em pH 7, 20 ° C	P: 3.02 x 10 ⁰¹ Log P: 1.48
Constante de dissociação pKa, a 25 ° C	4.2 (base fraca)

Fonte: ANVISA (2019); IUPAC (2021).

A atuação do carbendazim se dá através da inibição de algumas proteínas específicas, denominadas α e β tubulinas, que mediante polimerização constituem os microtúbulos. Desta forma, ao se ligar à β tubulina, que se encontra livre no citoplasma, o carbendazim inibe a formação dos dímeros, impedindo assim a formação das fibras dos microtúbulos e o movimento dos 23 cromossomos para a divisão mitótica do fungo, o levando à morte, conforme Figura 1 (COUTINHO *et al.*, 2006).

Figura 1 - Ação do Carbendazim



Fonte: COUTINHO *et al.*, 2006.

A absorção do carbendazim nas plantas acontece inicialmente através de suas raízes, folhas e sementes, somente depois se espalha pela planta inteira (MAXIMIANO *et al.*, 2016).

O seu metabolismo já foi estudado em diversos animais como ratos, galinhas e coelhos. Nos ratos, durante seu processo metabólico tem-se como principal reação a hidroxilação, a qual origina como metabólito principal o 5-hidroxi-2-benzimidazole-carbamato (5-HBC) seguido pelos metabólitos 2-metoxicarbonil-amino-1H-benzimidazol-5-il-(sulfato de hidrogênio) (5-HBC-S); o 5,6-hidroxi-2-benzi-midazole-carbamato-N-óxido (5,6-HOBC-N-óxido); e o 2-aminobenzimidazol (2-AB) (APVMA, 2009; IUPAC, 2021). Além disso, também já foram detectados os metabólitos: 5,6-dihidroxibenzimi-dazol-2-il-carbamato (5,6-DHCB) que pode se metabolizar a 6-hidroxi-2-metoxicarbonil-amino-1H-benzimidazol-5-il-5-(sulfato de hidrogênio) (5,6-DHCB-S) e 6-hidroxi-2-metoxicarbonil-amino-1H-benzimidazol-5-il-b-D-ácido glucopiranosidurônico (5,6-DHCB-G) (YU *et al.*, 2009).

A toxicidade de uma substância está relacionada a uma série de fatores, tais como as suas propriedades físico-químicas, os processos físicos, químicos e biológicos, as vias de exposição e a duração e frequência da exposição (PERES; MOREIRA, 2003). O carbendazim, segundo Da Costa (2017), é considerado pela ANVISA em nível de toxicidade mediano, contudo, a *European Union* (2008) e IUPAC (2021) afirmam que o composto é comprovadamente mutagênico, com elevada toxicidade, afetando de maneira

aguda os organismos, principalmente os aquáticos. Os efeitos para as comunidades de micro-organismos do solo são pequenos, mas fatais para as comunidades de minhocas (COUTINHO *et al.*, 2006).

Além disso, a *European Commission*, em 2007, afirmou que em seu estudo através do método OECD 301-D, o carbendazim é classificado como não biodegradável, tendo uma taxa de apenas 6% de biodegradação em um total de 28 dias.

Diversos estudos comprovam a presença do carbendazim em alimentos, solos e meio aquático. Maximiano *et al.* (2016), através do método de aplicação de técnica eletroanalítica para detecção de caberdazim em sucos de frutas cítricas, obteve o limite detecção de 1,04 µg/L. Já Martini e Solaliendres (2011) afirmam que a casca da banana e sua polpa adsorvem quantidades favoráveis do composto e sugerem um estudo para quantificar tal adsorção.

Gaspar *et al.* (2005), em sua pesquisa no rio Mearim no Maranhão, detectou a presença de carbendazim com concentração acima de 80 µg/L. Ribeiro (2009) também detectou em amostras de dois rios localizados em Cruz do Espírito Santo, Paraíba, a presença de carbendazim na água. Souza *et al.* (2019), também detectou o carbendazim em 83% das amostras de água para abastecimento público da cidade de Londrina, Paraná, com concentração média de 17 ng L⁻¹.

Outros pesquisadores detectaram a substância em cursos d'água fora do país. Palma *et al.*, (2004) identificaram o carbendazim em uma bacia agroflorestal no sul do Chile nas concentrações de 1,8 µg L⁻¹, 0,4 µg L⁻¹ e em níveis de até 1,2 µg L⁻¹ em campanhas durante três períodos diferentes. Já Masia *et al.*, (2015) detectaram através de amostragem na bacia do rio Llobregat na Espanha o carbendazim em 22% das amostras, na concentração de até 697 ng L⁻¹. Além de relatos em diversos outros países como Colômbia (HERNÁNDEZ *et al.*, 2012), Romênia (CHITESCU *et al.*, 2015), Alemanha (WICK *et al.*, 2010) e Grécia (KALOGRIDI *et al.*, 2014).

3.2. Zebrafish

Mesmo com o avanço das tecnologias e o surgimento de novos métodos de experimentação, o modelo animal ainda se encontra fortemente associado a pesquisas toxicológicas e de manifestações patológicas, principalmente por ser capaz de fornecer informações a nível celular e molecular do comportamento de diversas doenças (LIESCHKE e CURRIE, 2007). Em geral, os animais mais utilizados são os roedores, uma vez que aproximadamente 95% desses estudos são realizados com ratos e

camundongos (SILVEIRA e SCHNEIDER, 2012). Entretanto, alguns estudos apontam diferenças significativas entre o perfil dos metabólitos produzidos pelos ratos em relação aos humanos (LOOTENS *et al.*, 2009), o que demonstra a necessidade de um modelo *in vivo* que seja capaz de fornecer resultados representativos do metabolismo humano (ANSELMO *et al.*, 2017).

Neste contexto, em 1981, George Streisinger introduziu o *zebrafish* como modelo animal em suas pesquisas, apontando as vantagens da utilização da espécie em estudos genéticos, o que pode ser considerado como um marco para a difusão da utilização do animal em tais experimentos (STREISINGER *et al.*, 1981). A partir daí, o *zebrafish* se tornou um modelo popular em diversas áreas além da genética, como desenvolvimento da biologia, toxicologia, descoberta de medicamentos, estudos de doenças e neurobiologia (ANSELMO *et al.*, 2018).

O *zebrafish*, popularmente conhecido como paulistinha é um pequeno peixe tropical de água doce nativo do sul da Ásia. Comumente é encontrado em ambientes lânticos e é bem adaptado a variações ambientais, uma vez que em seu habitat natural o pH pode variar de 5.9 a 8.5 e a temperatura de 16 a 38°C. Entretanto, as faixas ideais onde ele apresenta maiores taxas de crescimento são de 7 a 8 e 24 a 28°C para o pH e temperatura, respectivamente. O *zebrafish* se alimenta de zooplâncton, insetos, algas, detritos e outros materiais orgânicos e geralmente é encontrado em cardumes de 5 a 20 indivíduos. A reprodução ocorre durante o período chuvoso geralmente no período da manhã. Em relação ao seu desenvolvimento, ele passa pelos estágios larval, que dura 14 dias; juvenil, durante 120 dias; e adulto, de aproximadamente 1000 dias. Inicialmente, possui o tamanho de 2 a 3 cm podendo alcançar de 4 a 5 cm (DAMMSK *et al.*, 2011).

As suas principais características fisionômicas são seu pequeno porte e seu padrão de listras pretas e brancas ao longo do corpo. Em geral, os machos são mais esguios e as fêmeas maiores e mais robustas (Figura 2) (DAMMSK *et al.*, 2011).

Figura 2 - Dimorfismo sexual entre macho (esquerda) e fêmea (direita).



Fonte: DAMMSK *et al.*, 2011.

O seu sucesso em pesquisas se dá principalmente em decorrência de suas vantagens em relação a outros modelos animais (Quadro 2), dentre elas seus embriões que são transparentes e se desenvolvem de forma externa e rapidamente (LEE *et al.*, 2017), o que permite a análise das divisões celulares em tempo real apenas com o auxílio de um microscópio (COSTA *et al.*, 2008), diferente de outros modelos animais como os ratos que para a análise dos embriões dependem de métodos invasivos como cirurgia ou necropsia (LIESCHKE e CURRIE, 2007). Outros pontos positivos são a sua fácil manipulação, baixo custo de manutenção, rápido desenvolvimento (atinge a fase larval em até 72 horas e a fase adulta em até 3 meses) (ESCALEIRA, 2017) e curto período de vida (aproximadamente 3 anos), o que permite que estudos que envolvem diversas fases do desenvolvimento sejam realizados rapidamente (WESTERFIELD, 2007).

Quadro 2 - Comparação entre os modelos animais mais utilizados

	 Zebrafish	 Primata	 Rato	 Pinto
Manipulação	Fácil	Difícil	Difícil	Moderado
Homologia genética	70%	96-98%	75%	62%
Rápido desenvolvimento	Sim	Não	Não	Sim
Transparência	Sim	Não	Não	Não
Número de embriões	100-600	1-2	~10	1-2
Modelos transgênicos	Muitos	Pouco	Muitos	Pouco
Custo de criação	Barato	Muito caro	Caro	Barato

Fonte: LEE *et al.*, 2017.

O modelo oferece, ainda, a vantagem de se encontrar próximo aos humanos em termos de evolução, uma vez que dos 26.000 genes sequenciados no peixe, 70% são homólogos nos seres humanos e ainda, se forem considerados apenas os genes relacionados a doenças, essa semelhança sobe para 84%, o que permite que os resultados

dos estudos nos animais sejam extrapolados para os humanos (ZORZETTO e GUIMARÃES, 2013). O Quadro 3 abaixo demonstra as demais semelhanças e diferenças entre o *zebrafish* e o ser humano.

Quadro 3 - Biologia comparativa entre o zebrafish e o ser humano.

Características	Principais semelhanças com os humanos	Principais diferenças e incógnitas
Biologia geral		
Genoma	Diploide; essencialmente contém o repertório completo de genes de vertebrados.	Duplicação de genes resultante da duplicação ancestral do genoma inteiro, resultando em subfuncionalização e neofuncionalização.
Anatomia	Vertebrado	As adaptações aquáticas incluem um plano corporal simplificado e diferentes estratégias locomotoras
Dieta e metabolismo	Onívoro	Poiquilotérmico, cresce otimamente a 28,5 ° C
Crescimento	O crescimento é determinado (isto é, prossegue até um tamanho adulto máximo limitado); exibe um padrão de crescimento saltatório (por exemplo, na regeneração de nadadeiras)	Capacidade significativa de regeneração de muitos tecidos e órgãos, por exemplo, coração, nadadeira, retina
Ciclo de vida	Fases de crescimento juvenil e adulta em torno do ponto de maturidade reprodutiva; evidências de mudanças fisiológicas relacionadas à idade, por exemplo, na função cognitiva	Vida útil de 3–5 anos; tempo de geração de 3 meses
Biologia sistemática		
Embriologia	Estágios e processos de clivagem, padronização inicial, gastrulação, somitogênese, organogênese estão todos representados	Muito rápido; não placentária, ocorre ex vivo; influência de transcrições maternas; envolve incubação
Sistema esquelético	Esqueleto ossificado complexo compreendendo cartilagem e osso	Falta de osso longo, osso esponjoso e medula óssea; as articulações não suportam peso
Músculo	Grupos de músculos axiais e apendiculares; tipos de células esqueléticas, cardíacas e de músculo liso; fibras musculares esqueléticas rápidas e lentas	Os músculos de contração rápida e lenta são topograficamente separados; a locomoção dirigida pela cauda depende da contração alternada do músculo miotoma; o volume do músculo apendicular é proporcionalmente pequeno
Sistema nervoso e comportamento	Anatomia representativa: cérebro anterior, médio e posterior, incluindo diencéfalo, telencéfalo e cerebelo; sistema nervoso periférico com componentes motores e sensoriais; sistemas nervosos entérico e autônomo; órgãos sensoriais especializados: olho, sistema olfatório e ouvido; exibem comportamentos "superiores" e função neural integrada: memória, respostas condicionadas e comportamentos sociais (por exemplo, escolaridade)	O telencéfalo possui apenas um córtex rudimentar; órgãos sensoriais específicos de peixes, como a linha lateral; o comportamento dos peixes e a função cognitiva são abstraídos ou simplificados em comparação com o comportamento humano
Sistemas hematopoiéticos e linfóides / imunológicos	Vários tipos de células hematopoiéticas: eritrócitos, células mieloides (neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos), linfócitos T e B; cascata de coagulação para hemostasia; imunidade humoral e celular inata e adaptativa	Os eritrócitos são nucleados; possuem trombócitos ao invés do que as plaquetas; o interstício renal é o local hematopoiético; os detalhes da regulação humoral da hematopoiese são amplamente desconhecidos; poderia ter desenvolvido componentes do sistema

Características	Principais semelhanças com os humanos	Principais diferenças e incógnitas
		imunológico específicos de peixes (por exemplo, uma família de receptores imunológicos)
Sistema cardiovascular	Coração multicâmara com átrio e ventrículo; circulação dentro de artérias e veias; circulação linfática separada	Tem distinções esquerda-direita na anatomia cardíaca, mas não tem circulações esquerda-direita separadas, ou seja, o coração tem apenas duas câmaras; até agora nenhuma evidência de derivados de campo cardíaco secundário; linfonodos não foram descritos
Sistema respiratório	Troca gasosa celular; a oxigenação depende da circulação e do transporte de hemoglobina	A respiração ocorre nas guelras, não nos pulmões; sem circulação pulmonar; possuem uma bexiga natatória derivada da endoderme (funcionando como um dispositivo de flutuação variável), que corresponde embriologicamente, mas não funcionalmente, aos pulmões
Sistema gastrointestinal	Órgãos principais: fígado, pâncreas exócrino e endócrino, vesícula biliar; especializações zonais ao longo do trato alimentar de absorção; células imunes na lâmina própria	Falta um órgão digestivo acidificado; ter um bulbo intestinal em vez de estômago; célula de Paneth intestinal ausente
Sistemas renais e urinários	Anatomia e função glomerular	A filtração ocorre nos rins anteriores e posteriores; rim adulto mesonéfrico em vez de metanéfrico; sem bexiga ou próstata
Sistema reprodutivo	Biologia molecular e embriológica do desenvolvimento das células germinativas; anatomia celular dos órgãos das células germinativas, testículos e ovários	Sem cromossomos sexuais; o mecanismo de determinação do sexo é incerto; a fertilização é ex vivo (ou seja, sem útero ou órgãos reprodutivos femininos internos relacionados); os oócitos são circundados por um córion, não a zona pelúcida, que deve ser penetrada por espermatozoides; não lactantes; sem equivalente de mama
Sistema endócrino	A maioria dos sistemas endócrinos representados, por exemplo, o eixo hipotálamo / hipofisário (glicocorticóides, hormônio do crescimento, hormônio da tireóide, prolactina), hormônio da paratireóide, insulina e renina	Diferenças na distribuição anatômica das glândulas, por exemplo, glândulas paratireóides discretas não parecem estar presentes; a prolactina tem um papel principal na osmorregulação
Pele e apêndices	Derivado ectodérmico; padrão de pigmentação é devido a células de pigmento derivadas da crista neural, incluindo melanócitos	Têm estruturas exclusivas para peixes que são especializadas para o ambiente aquático (por exemplo, escamas elasmóides, células mucosas); falta de apêndices de mamíferos (por exemplo, folículos capilares, glândulas sebáceas); possuem dois tipos de células de pigmento adicionais: xantóforos e iridóforos

Fonte: LIESCHKE e CURRIE, 2007.

O *zebrafish* se destaca por apresentar alta sensibilidade a exposição de produtos químicos e pela sua capacidade de absorção dos compostos adicionados na água, facilitando a administração. Nesta perspectiva, na literatura se encontram descritos testes toxicológicos e farmacológicos utilizando a espécie (Quadro 4) (DUCHARME *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2017; CORNET *et al.*, 2018).

Quadro 4 - Pesquisas envolvendo o zebrafish no ramo da toxicologia

Título	Pesquisa	Metodologia	Concentração	Principais resultados	Autor
Moxidectin toxicity to zebrafish embryos: bioaccumulation and biomarker responses	Embrião de <i>Zebrafish</i> como um sistema modelo para estudar os efeitos potenciais da moxidectina	OCDE 236	80, 40, 20 e 10 µg/L e 20 mg/L de	Os efeitos da moxidectina em embriões de <i>Zebrafish</i> se manifestam como um declínio nas taxas de eclosão até 96 h, bem como alterações na atividade enzimática de GST, LDH e CAT.	Muniz <i>et al.</i> , 2021
Microplastic accumulation patterns and transfer of benzo[a]pyrene to adult zebrafish (<i>Danio rerio</i>) gills and zebrafish embryos	Análise dos padrões de acumulação e transferência de substâncias tóxicas associadas à exposição ao microplástico por simples fixação a <i>Zebrafish</i> adulto e embriões.	OCDE 236	10 e 20 µM	Os microplásticos podem transferir POPs não apenas por ingestão, mas também por simples fixação ao epitélio ou pela coluna de água.	Batel <i>et al.</i> , 2018
Bioaccumulation mechanism of organophosphate esters in adult zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	Acúmulo específico de tecido e a depuração de sete organofosforados em <i>Zebrafish</i> adultos	OCDE 203	1/150 DL ₅₀ e 1/30 DL ₅₀	A bioacumulação de organofosforados variou entre os tecidos. O músculo continha o nível mais baixo e o fígado tinha o nível mais alto de TPP e TCEP.	Wang <i>et al.</i> , 2017
Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish	Avaliar os efeitos do Glifosato e Roundup® em parâmetros comportamentais e morfológicos em larvas e adultos de <i>Zebrafish</i>	-	0 (grupo controle), 0,01, 0,065 e 0,5 mg/L	Em larvas apresentou diferenças significativas na atividade locomotora e comportamento aversivo. Reduziu a distância percorrida, a velocidade média e os cruzamentos de linha em adultos	Bridi <i>et al.</i> , 2017
Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior in developing zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	Efeitos do ibuprofeno, diclofenaco e paracetamol na eclosão e capacidade motora do <i>Zebrafish</i>	-	5, 50 e 500 µg/L	O ibuprofeno e o diclofenaco causaram um atraso significativo na eclosão devido à supressão do movimento geral do embrião, enquanto o paracetamol não apresentou efeito observável,	Xia <i>et al.</i> , 2017

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

3.3. Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS)

No intuito de identificar, detectar e quantificar compostos em baixas concentrações, em diversas matrizes complexas, principalmente em meio aquático, os métodos analíticos idealmente precisam ser simples, sensíveis e rápidos. Nesse cenário, a cromatografia líquida é uma das técnicas mais utilizadas para separar os contaminantes em amostras ambientais (CONLEY *et al.*, 2008).

Em relação à cromatografia líquida, o processo ocorre de forma que a fase móvel, ou solvente, disposto em um recipiente adequado, é impulsionado por uma bomba de alta pressão e conduzido até a coluna cromatográfica. No trajeto, a amostra é inserida na fase móvel através de uma válvula de injeção e arrastada para a coluna, de modo que ocorre a separação. Essa solução é encaminhada para um detector que irá detectar a presença dos analitos eluídos. Então é gerado um sinal cromatográfico que é registrado por um software apropriado e assim, por meio do tratamento em um computador obtém-se um cromatograma que demonstra a variação do sinal em função do tempo (DONG, 2006; STRIEGEL, 2009).

Os métodos cromatográficos se encontram entre as técnicas predominantes de separação, principalmente quando se trata de análises em matrizes complexas, em função da eficiência e alta resolução em se separar os componentes presentes nas amostras (LANÇAS *et al.*, 2009). Com o avanço da tecnologia, a cromatografia desenvolveu um método de análise de alto rendimento e alta eficiência. Segundo Quaresma (2014), o cromatógrafo de ultra eficiência utiliza, na fase estacionária, partículas menores, o que resulta em melhor resultado que o cromatógrafo convencional. Ainda segundo a autora, o fato de utilizar partículas menores gera vantagens como, o menor tempo de análise, uso de colunas pequenas, com altas temperaturas e altas taxas de fluxo sem perda significativa na resolução.

Entretanto, as análises qualitativas da supracitada técnica são limitadas em decorrência da utilização dos tempos de retenção (RT) para a identificação dos analitos. Apesar do RT ser uma particularidade de um determinado composto, o mesmo não é exclusivo, de modo que diversas substâncias podem eluir neste mesmo tempo quando empregadas as mesmas condições (LANÇAS, 1993), surgindo assim, a necessidade de tornar a técnica mais seletiva e sensível, o que é solucionado através do acoplamento da cromatografia líquida à espectrometria de massas (LC/MS) (NIESSEN, 2006).

Em suma, a espectrometria de massas está relacionada com a capacidade de se medir moléculas e átomos a fim de se obter a massa molecular de um determinado composto, o que auxilia na identificação de uma determinada espécie. O processo ocorre de forma que se acrescenta carga nas moléculas de interesse e então é medida a trajetória dos íons resultantes

sob vácuo e condições específicas de combinações de campos elétricos e magnéticos (FENN, 2003).

Logo, o espectrômetro de massas, após a separação dos compostos pelos métodos cromatográficos, irá determiná-los por meio de detectores. O uso conjunto com a cromatografia é uma técnica ideal para detecção de compostos em matrizes ambientais, uma vez que, essa união possibilita a determinação de concentrações traços (KANDA; GLENDINNIND, 2011; TRUFELLI, 2011).

As técnicas mais empregadas na cromatografia de fase líquida quando acoplada ao espectrômetro de massas são: ionização por *eletrospray* – ESI; ionização química à pressão atmosférica – APCI; e fotoionização à pressão atmosférica – APPI (QUARESMA, 2014). Neste estudo optou-se por utilizar a tecnologia ESI, pois sua técnica de ionização apresenta maior eficiência em matrizes complexas (RODRIGUES, 2012).

A ESI consiste na dissolução da amostra em um solvente volátil que é bombeado por meio de um capilar de aço a uma taxa de fluxo entre 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ e 1 mL/min . A dispersão da solução formada por uma névoa fina é promovida por meio de uma diferença de potencial aplicada entre o pulverizador e o cone de amostragem da fonte de ionização. O processo é, ainda, auxiliado pela introdução de um gás que flui para fora do capilar e um gás de secagem oriundo da fonte de ionização para o pulverizador. As gotas reduzem de tamanho com o auxílio do fluxo de gás à medida em que ocorre a evaporação do solvente, o que acarreta o aumento da concentração de carga na superfície da gota (CROTTI, 2006; FENN, 2003; VESTAL, 2001).

A técnica apresenta diversas vantagens, dentre elas a alta sensibilidade e seletividade, fácil manejo, além de requerer pequenas quantias de amostra. Ademais, diversas matrizes podem ser analisadas utilizando ESI, desde que sejam compostos iônicos ou apresentem sítios ácidos ou básicos. Outra questão que distingue essa técnica é sua capacidade de produzir íons multiplamente carregados o que permite analisar compostos com alta massa molecular (LOO, 2000; HECK e VAN DEN HEUVEL, 2004). Por outro lado, tem-se como desvantagem a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas, onde íons produtos podem ser confundidos com moléculas protonadas e assim interferir nos resultados das análises (ADEJARE, 1997).

Após a ionização, os íons são acelerados por um campo eletromagnético e então o analisador de massa os separa conforme a razão massa/carga (m/z). Existem uma série de analisadores no mercado: setor eletromagnético, quadrupolos, tempo de voo, *orbitrap*, entre outros (FERREIRA, 2014). Para esse estudo adotou-se o método *orbitrap* uma vez que possui capacidade total de varredura de MS, além de ser convencionalmente utilizado para a

quantificação de resíduos de agrotóxicos, oferecer alta resolução de massa e medição precisa (WANG *et al.*, 2019).

Esse tipo de analisador é capaz de capturar os íons por meio de dois eletrodos, interno e externo, formando um campo eletroestático que permite que os íons sejam injetados tangencialmente. Além disso, é possível acoplar os métodos quadrupolo e *orbitrap* possibilitando reunir a seleção previa dos íons do primeiro com alta resolução e exatidão de massa do segundo. Essa combinação permite a seleção de íons precursores enquanto o processamento avançado do sinal aumenta o poder de resolução do sistema, o que proporciona um alto nível de confiabilidade para as análises. Tornando o analisador capaz de identificar, quantificar e validar uma grande quantidade de metabólitos, contaminantes, entre outras matrizes complexas (FERREIRA, 2014).

3.4. Metabolômica

As ciências ômicas estudam o comportamento das células dos organismos e suas alterações biológicas. Pertencem a esse grupo, a genômica (genes), a transcriptômica (RNA), a proteômica (proteínas) e a metabolômica (metabólitos). Os metabólitos são os produtos intermediários ou finais do metabolismo biológico, já o metaboloma é o conjunto de todos os metabólitos de baixa massa molecular presentes ou alterados em um sistema biológico (FIEHN, 2002). Desta forma, a metabolômica é voltada a fornecer uma visão geral qualitativa e quantitativa dos metabólitos presentes em um organismo (HALL, 2006).

Tem-se ainda que a metabolômica pode ser classificada em duas abordagens, a metabolômica alvo (*targeted metabolomics*), a qual se refere a uma análise quantitativa de metabólitos previamente selecionados de determinada classe química, ou de rotas metabólicas específicas, e metabolômica global (*untargeted metabolomics*), que aborda a análise qualitativa da maior quantidade de metabólitos possível, de uma classe química qualquer, contidas no sistema biológico em estudo (KUEHNBAUM e BRITZ-MCKIBBIN, 2013).

O desenvolvimento do estudo metabolômico consiste em uma série de etapas. Inicialmente, deve-se definir um problema biológico a ser estudado através de questões que possam ser esclarecidas ao término do estudo. Outro aspecto fundamental é a definição de qual abordagem será adotada (alvo ou global), uma vez que a partir daí serão definidas as etapas do planejamento experimental e analítico (VIANT *et al.*, 2017; VUCKOVIC, 2012). É necessário também definir o tipo de amostra utilizado (fluido, células, tecido, etc.) e a quantidade de amostras que serão avaliadas por grupo de estudo, bem como a logística de coleta e armazenamento das mesmas (CANUTO *et al.*, 2018).

Outro aspecto importante relacionado ao procedimento é denominado *quenching* metabólico, que é a interrupção imediata da atividade enzimática, seja por meio da adição de solventes orgânicos ou pelo congelamento instantâneo das amostras utilizando nitrogênio líquido ou gelo seco. O armazenamento também é de extrema importância a fim de se evitar a degradação ou atividade das enzimas. Recomenda-se que as amostras sejam estocadas em baixas temperaturas, preferencialmente a -80°C (ÁLVAREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2010).

O preparo das amostras é uma etapa determinante do processo, principalmente devido à complexidade das amostras biológicas, sua heterogeneidade e grande faixa de concentração dos metabólitos presentes (ÁLVAREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2010). O processo depende do tipo de abordagem adotada, matriz da amostra e técnicas de análise interessantes ao estudo (CANUTO *et al.*, 2018).

A abordagem metabolômica é uma atividade complexa, principalmente em função da enorme diversidade química de metabólitos com concentrações variadas existente. Desta forma, uma única técnica analítica não é o suficiente para cobrir todo o metaboloma de um organismo biológico (KUEHNBAUM e BRITZ-MCKIBBIN, 2013; VILLAS-BÔAS e BRUHEIM, 2007). Sendo assim, os estudos vêm sendo combinados com a utilização de multiplataformas de análise, que permitem uma maior abrangência de detecção de substâncias químicas, permitindo uma maior compreensão do objeto de estudo (VILLAS-BÔAS e BRUHEIM, 2007; DUNN e ELLIS, 2005).

Uma das ferramentas mais utilizadas nos estudos metabolômicos é a espectrometria de massas (MS), sendo capaz de fornecer informações sobre as estruturas de diversas classes químicas (DE RAAD *et al.*, 2016), além de proporcionar análises rápidas, com elevada sensibilidade e seletividade. Para melhores resultados, são acoplados a técnicas analíticas de separação, como a cromatografia líquida de alta eficiência (UHPLC) (KUEHNBAUM e BRITZ-MCKIBBIN, 2013). Ademais, o tempo de retenção do analito auxilia na comprovação de identificação do metabólito, com uso de padrões analíticos (CANUTO *et al.*, 2018).

Atualmente, o uso de LC-MS em análises metabolômicas está em crescimento (THEODORIDIS *et al.*, 2012), principalmente por se tratar de uma técnica extremamente robusta, de alta sensibilidade e seletividade e fácil operação (XIAYAN e LEGIDO-QUIGLEY, 2008), além de ser bastante abrangente em relação aos compostos que podem ser analisados em função da diversidade de fases estacionárias existente (CANUTO *et al.*, 2018).

Os dados oriundos das análises metabolômicas são numerosos e complexos requerendo assim ferramentas que permitam tratá-los de forma a evitar falhas e assim obter resultados confiáveis e representativos das amostras biológicas analisadas (SUGIMOTO *et al.*, 2012).

A análise da metabolômica global consiste em uma série de etapas de alinhamento, agrupamento, ajuste do tempo de retenção, deconvolução espectral e normalização. De forma que estão disponíveis no mercado diversos softwares para este fim (LUDWIG e GÜNTHER, 2011).

O tratamento dos dados está aliado à estatística por meio de métodos de análises multivariadas e univariadas. Os métodos multivariados consistem em avaliar o conjunto de dados extraídos da etapa experimental com o objetivo de classificar e discriminar os metabólitos responsáveis por distinguir os grupos de amostras. São utilizados procedimentos não supervisionados e supervisionados, como análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), respectivamente. Enquanto que nos métodos univariados, os metabólitos são analisados individualmente, ignorando se há relações entre eles, como *fold change*, *t-test* e *volcano plot* (LUDWIG e GÜNTHER, 2011).

A identificação dos metabólitos se dá com o auxílio de bancos de dados *online*, como por exemplo HMDB (WISHART *et al.*, 2018), Kegg (KANEHISA *et al.*, 2010), PubChem (JEFFRYES *et al.*, 2015), ChemSpider (MARCO-RAMELL *et al.*, 2018), Drug Bank (BROWN *et al.*, 2009), MassBank (HORAI *et al.*, 2010), entre outros. De forma que a interpretação desses dados tem como objetivo solucionar as questões propostas ao início do experimento, podendo também levantar novas hipóteses. Essa interpretação se dá por meio da comparação dos metabólitos alterados com as rotas metabólicas conhecidas (KARP e CASPI, 2011).

Assim, a metabolômica pode ser utilizada em diversos campos, tais como estudos ambientais, na medicina para estudos clínicos e patológicos, nos esportes para estudos de dopagem, análises de alimentos e nutrição, na microbiologia, parasitologia, estudo de plantas e também no ramo da toxicologia (CANUTO *et al.*, 2018; SUSSULINI, 2017).

Em relação à metabolômica ambiental, pode ser aplicada a experimentos animais onde os procedimentos são elaborados de forma a reproduzir situações que ocorrem no meio ambiente (MORRISON *et al.*, 2007), envolvendo o estudo do metabolismo dos animais submetidos a situações bióticas e abióticas como a exposição a poluentes por exemplo (SIMPSON e MCKELVIE, 2009).

4. METODOLOGIA

4.1. Reagentes e Solventes

Reagentes (grau HPLC): Acetato de Etila (J. T. Backer®); Ácido Fórmico(EMSURE®); Água ultrapura (Milli-Q®); Aqua Safe (Tetra); Carbendazim (Sigma-Aldrich®); Cartuchos Strata-X-CW (33 µm, polymeric weak cation 30 mg/3 mL) (Phenomenex - California, USA); Dimetilsulfóxido (Dinâmica®); Fitas de medição de pH (MColorpHast™); Hidróxido de Amônio 28% (CRQ Produtos Químicos®); Metanol (J. T. Backer®); Proxifilina (Sigma-Aldrich®); Sulfato de magnésio (CRQ Produtos Químicos®); tert-Butyl methyl ether - TBME (Sigma-Aldrich®); Teste de quantificação de amônia, oxigênio e nitrito (Alcon) e β-Glucuronidase (Sigma-Aldrich®).

4.2. Preparo das Soluções

As soluções de carbendazim e de proxifilina foram preparadas em metanol nas concentrações de 100 µg/mL e 1 mg/mL, respectivamente. A partir dessas soluções estoque foram realizadas diluições para preparação das soluções subsequentes. As soluções de carbendazim aplicadas nos aquários foram preparadas em DMSO devido à baixa solubilidade do agrotóxico. Além disso, foram preparadas soluções de metanol/ácido fórmico 95:5; metanol/hidróxido de amônio 95:5; água/metanol 70:30 com 0,1% de ácido fórmico e TBME/acetato de etila 50:50.

4.3. Equipamentos Utilizados

- Agitador vórtex;
- Bombas de água da marca Aqua One;
- Centrífuga da marca Hermle Labor Technik GmbH, modelo Z 400 K Universal;
- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) acoplado a um espectrômetro de massas (MS) com fonte de ionização por electrospray (ESI) e analisador tipo orbitrap (Exactive™ Orbitrap mass spectrometer-Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA);
- Estufa Thermo Scientific;
- Microscópio digital modelo Lcd Portátil G600 da marca Gaosuo;
- SPE Vacuum Manifold;
- Termostatos da marca Aqua One.

4.4. Zebrafish

4.4.1. Ética em Experimentação Animal

O trabalho proposto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto protocolado sob o CEUA nº 7061120319. Todo o processo de experimentação foi realizado nas dependências do Laboratório de Toxicologia da Escola de Farmácia – EFAR da Universidade Federal de Ouro Preto. O Certificado de comprovação se encontra no **Anexo 01** deste documento.

4.4.2. Manutenção e Cultivo dos Animais

Aproximadamente 240 peixes adultos *zebrafish* (*Danio rerio*) com cerca de 2 cm, igualmente distribuídos entre machos e fêmeas foram adquiridos na loja Lindoiá Peixes em Muriaé – MG.

Foram adquiridos 16 aquários com capacidade para 3,5 L de água, de forma a suportar até 20 animais. A temperatura, com o auxílio de um termostato, foi mantida na faixa entre 26°C e 28°C. A aeração foi realizada com a assistência de bombas que funcionavam em período integral. A iluminação da sala foi ajustada artificialmente de forma a fornecer os ciclos de claro:escuro 14h:10h. Antes do início dos experimentos, os peixes passaram por um período de aclimação de duas semanas com o objetivo de avaliar se possuíam alguma doença e para que se adaptassem ao novo ambiente.

A água dos aquários foi previamente aclimatada em um tanque a parte e condicionada utilizando-se o neutralizador de cloro, com a dosagem recomendada pelo fabricante de 5 mL a cada 10 L de água. Além disso, foram realizadas trocas de 2 L de água a cada dois dias, sendo a mesma substituída por água previamente aclimatada e a alimentação foi realizada diariamente com a ração floculada *Basic* da marca Alcon, salvas as datas de necropsia dos animais, quando os mesmos não foram alimentados nas 24h que antecederam a eutanásia.

Semanalmente, foram realizados testes químicos colorimétricos com a finalidade de avaliar a qualidade da água dos aquários. Os parâmetros analisados foram: pH, oxigenação, teor de nitrito e amônia. Os resultados foram comparados a tabelas e escalas de cores fornecidas pelo próprio fabricante.

4.4.3. Tratamento e Exposição dos Animais ao Carbendazim

A exposição dos animais ao agrotóxico carbendazim foi realizada conforme o descrito no protocolo OECD nº305. O padrão de carbendazim foi adicionado na concentração de 120

$\mu\text{g/L}$, uma vez que segundo a Portaria GM/MS N° 888, de 4 de maio de 2021 do Ministério da Saúde é o valor máximo permitido na água potável.

Divisão dos Grupos para Exposição

Foram definidos três grandes grupos, sendo eles tratamento, negativo e estabilidade. O grupo tratamento foi constituído por 20 peixes em cada aquário e a estes aquários foi administrada a solução contendo o agrotóxico carbendazim com o objetivo de se analisar os efeitos nos animais, bem como o perfil metabólico e a depuração do agrotóxico na água. O grupo negativo foi constituído por 20 peixes em cada aquário e a estes aquários foi administrada apenas DMSO com a finalidade de se criar um ambiente o mais semelhante possível com o grupo de tratamento, a critério de comparação entre os resultados. Já o grupo estabilidade não apresentou peixes, apenas o aquário com água contendo a solução de carbendazim, para que pudesse ser analisada a degradação do agrotóxico na água sem a presença dos animais, também a critério de comparação.

Os três grandes grupos foram divididos em subgrupos diferenciados pelo tempo de tratamento, sendo eles 7, 14, 28 e 35 dias, conforme Quadro 5. O grupo tratamento de 7 dias foi realizado em triplicata (7 dias, 7 dias R e 7 dias R2), enquanto o grupo estabilidade foi experimentado também em triplicata, mas apenas para o período de 7 dias.

Quadro 5 - Quadro resumo do tratamento dos animais

Tempo de tratamento	Grupos					
	Tratamento		Negativo		Estabilidade	
	Nº de peixes	Substância	Nº de peixes	Substância	Nº de peixes	Substância
7 Dias	20	120 $\mu\text{g/L}$ de solução de carbendazim	20	120 $\mu\text{g/L}$ de DMSO	0	120 $\mu\text{g/L}$ de solução de carbendazim
14 Dias					-	-
28 Dias					-	-
35 Dias					-	-

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O subgrupo de 7 dias contou com apenas uma aplicação da substância, no primeiro dia do experimento, uma vez que o principal objetivo deste grupo foi analisar o perfil metabólico do carbendazim na água. Os grupos 14 dias e 28 dias tiveram 2 L de água trocados a cada dois dias para garantir as condições ideais para o cultivo dos peixes e a solução de carbendazim também foi reaplicada de maneira a manter a concentração sempre constante e assim, possibilitar avaliar o acúmulo no animal. Já o grupo 35 dias teve sua água trocada e a reaplicação da substância a cada dois dias até o 28° dia. Após esse período, no 29° dia, a água

dos aquários foi trocada integralmente e a substância não mais foi aplicada e então no 32º dia houve troca de 50% da água também sem a reaplicação. De forma que o grupo de 35 dias, ao final do experimento, foi mantido durante 7 dias em água sem o agrotóxico com o objetivo de se avaliar a capacidade de depuração dos animais após o fim da exposição.

A disposição dos aquários no laboratório pode ser visualizada na Figura 3.

Figura 3 - Agrupamento dos aquários.



Fonte: Acervo pessoal da autora (2022).

Coletas de Amostras de Água

Foram realizadas coletas de amostras de 10 mL de água dos aquários em todos os grupos (tratamento, negativo e estabilidade). As coletas ocorreram nos tempos: 0h (imediatamente após a aplicação das substâncias), 1h, 3h, 5h, 8h, 10h e 24h de todos os aquários; a cada 24h até o 7º dia no grupo de 7 dias; no 2º, 5º, 8º, 11º e 14º dia do grupo 14 dias; no 17º, 20º, 23º, 26º e 28º dia do grupo de 28 dias e no 30º, 33º e 35º dia do grupo de 35 dias conforme Quadro 6.

Quadro 6 - Coletas de amostras de água.

Subgrupo	Tempo / Dia
7 Dias	0h
	1h
	3h
	5h
	8h

Subgrupo	Tempo / Dia
	10h
	24h
	2° dia (48h)
	3° dia (72h)
	4° dia (96h)
	5° dia (120h)
	6° dia (144h)
14 Dias	7° dia (168h)
	2° dia
	5° dia
	8° dia
	11° dia
28 Dias	14° dia
	17° dia
	20° dia
	23° dia
	26° dia
35 Dias	28° dia
	30° dia
	33° dia
	35° dia

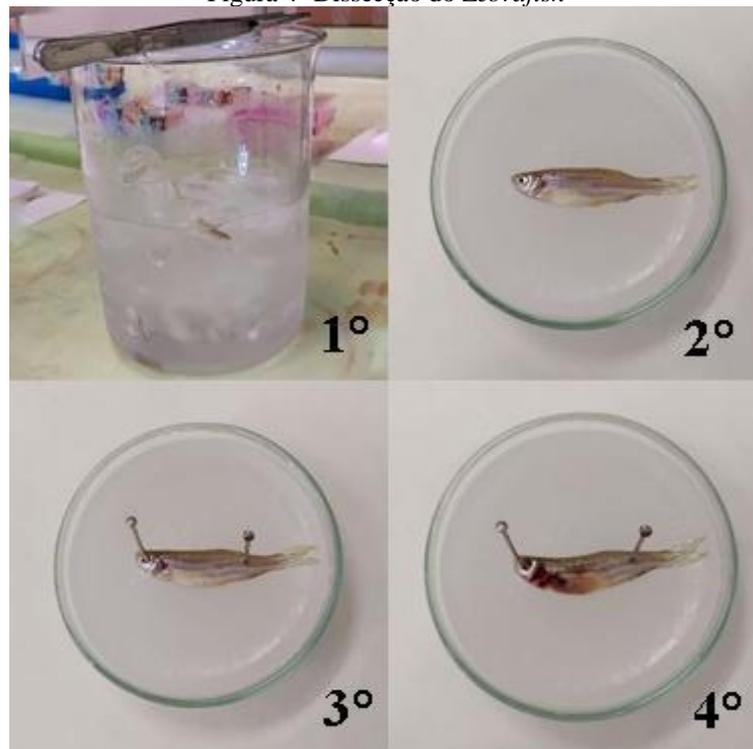
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Eutanásia e Dissecção dos Animais

Um dia após o fim da exposição de cada um dos subgrupos (7, 14, 28 e 35 dias), os animais foram eutanasiados seguindo as práticas descritas e aceitas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e NIH (*National Institute of Health*), as quais preconizam a submersão dos animais em banho de gelo por pelo menos 10 minutos antes do início da dissecção (National Institute of Health, 2009; Resolução Normativa CONCEA, 2017).

Após a eutanásia, primeiramente o corpo do animal foi seco suavemente com uma toalha de papel e medido. Com o auxílio de um microscópio, foi removido o fígado de cada animal, conforme Figura 4. Os órgãos foram então armazenados em microtubos, pesados, congelados e macerados com nitrogênio líquido, e acondicionados em freezer a - 80°C até o momento das análises.

Figura 4- Dissecção do Zebrafish



Fonte: Acervo pessoal da autora (2022).

4.5. Preparo das Amostras

4.5.1. Amostras de Água

Para o preparo das amostras foi utilizada a técnica de extração em fase sólida (SPE) por meio de uma adaptação do método desenvolvido por Sardela *et al.* (2018). Primeiramente foi transferido para os respectivos *vials*, 10 μ L de cada amostra e os mesmos foram acondicionados na geladeira. As amostras foram fortificadas a 100 ng/mL de Padrão Interno (PI) - SI de proxifilina a e agitados em vórtex. Para o procedimento de hidrólise adicionou-se 80 μ L da enzima β -glucuronidase e novamente as amostras foram agitadas em vórtex. Então os tubos foram incubados em banho a 50°C durante 1 hora.

Para o procedimento de extração em fase sólida, foi utilizado o cartucho STRATA-XCW 30 mg e um dispositivo multivias acoplado a uma bomba de vácuo denominado *SPE Vacuum Manifold* (Figura 5).

Figura 5 - Cartucho STRATA-XCW 30 mg



Fonte: Acervo pessoal da autora (2022).

Primeiramente, o cartucho foi condicionado com 3 mL de metanol e 3 mL de Água Milli-Q®. Então a amostra foi aplicada no cartucho e eluída completamente com o auxílio de uma pera e com bomba de vácuo. Posteriormente, o cartucho foi eluído com 2 mL de solução Metanol/Ácido Fórmico 95:5 e com 1 mL de solução Metanol/Hidróxido de Amônio 95:5. Em seguida, as amostras foram evaporadas sob o fluxo de nitrogênio conforme Figura 6.

Figura 6 - Evaporação das amostras sob o fluxo de nitrogênio



Fonte: Acervo pessoal da autora (2022).

Para a ressuspensão do resíduo seco, foi adicionado 60 μ L de solução água/metanol 7:3 0,1% de ácido fórmico, seguido por agitação vigorosa em vórtex. O conteúdo foi transferido para seus respectivos *vials*, os quais foram armazenados a -20°C até o momento da análise.

4.5.2. Amostras de Fígado

Foram utilizados 3 órgãos por amostra com o objetivo de se atingir o peso ideal para a análise. Para a extração, foi adicionado 2 mL de Água Milli-Q®, as amostras foram fortificadas a 25 ng/mL de solução de padrão interno (SI de proxifilina a 1 $\mu\text{g/mL}$) e agitadas em vórtex. Então se adicionou 4 mL de solução de TBME / Acetato de Etila 1:1 e cerca de 100 mg de

MgSO₄. Em seguida, as amostras foram agitadas em vórtex durante 1 minuto e centrifugadas durante 5 minutos na temperatura de 4° C e 4000 rpm. Logo após, o sobrenadante foi filtrado com filtro de 0.22 µm. O filtrado foi então transferido para um frasco limpo e evaporado sob o fluxo de nitrogênio.

Para a ressuspensão do resíduo seco, foi adicionado 50 µL de solução Água / Metanol 7:3 0,1% de ácido fórmico, seguida de agitação vigorosa em vórtex e por transferência para os respectivos *vials*. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da análise.

4.6. Análise Instrumental

As amostras de água e fígado foram analisadas utilizando cromatógrafo líquido de ultra eficiência (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) acoplado a um espectrômetro de massas (MS) com fonte de ionização por eletrospray (ESI) e analisador tipo Q-orbitrap (Q-Exactive™ Orbitrap-Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), usando uma coluna de fase reversa (Synchronis-Thermo USA, C18, 1.7 µm, 50 X 2.1 mm) mantida a 40°C. A fase móvel A (água, 5.0 mM de formiato de amônio e ácido fórmico 0,1%) e fase móvel B (metanol com ácido fórmico 0,1%) foram empregadas no seguinte gradiente de eluição: 0 min, 5%B; 0,2 min, 5%B; 0,5 min, 10%B; 1 min, 25%B; 7 min, 90%B; 11 min, 100%B; 13 min, 100%B; 13,1 min, 5%B; 15 min, 5%B. O volume de amostra injetado foi de 5 µL, o fluxo da fase móvel foi de 0,3 mL/min e o tempo de corrida foi de 15 min.

As amostras foram analisadas no modo de ionização positivo, sob o modo de aquisição FULL-MS e Full-MS/aquisição dependente de dados (DDA)-MS², utilizando os seguintes parâmetros: voltagem do spray foi de 2.9 kV; temperatura do capilar foi de 380 °C, a radiofrequência da S-lens foi de 80 (unidades arbitrárias). Os fluxos de nitrogênio do *sheath gas* e do *auxiliary gas* foram de 60 e 20, respectivamente. Para a aquisição em FULL-MS, os parâmetros foram: resolução de 70,000; *Automatic Gain Control (AGC) target* de 1e6; *Maximun IT* de 100 ms e a faixa de massa foi de 100-1000 *m/z*. Para a aquisição em dd-ms² os parâmetros foram: resolução de 17,500; *Automatic Gain Control (AGC) target* de 1e5; *Maximun IT* de 50 ms; *Isolation Window* de 2,0 *m/z*, loop count de 10, msx count de 1, Top N de 10, (N) CE de 30 eV e a faixa de massa de 100-1000 *m/z*. O equipamento foi calibrado no modo de ionização positivo com a solução produzida pelo fabricante (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha).

4.7. Validação do Método Analítico

A validação do método analítico desenvolvido foi baseada nas orientações de US EPA (2016) e INMETRO (2016), que compreende a avaliação dos seguintes parâmetros: seletividade, curva analítica, repetitividade, precisão intermediária, arraste, robustez e recuperação.

Para o procedimento de validação das análises de água foram utilizadas 40 amostras contendo 10 mL de Água Milli-Q®. Já para as análises de órgão foram utilizados 120 animais saudáveis. Os órgãos foram agrupados em 03 para formar cada amostra.

A seletividade foi avaliada por meio da análise de cinco amostras diferentes, seguida da verificação de ausência de interferentes no tempo de retenção dos analitos. Para a curva analítica foram determinados 6 pontos, cada um deles em triplicata, totalizando 18 amostras para cada matriz. O procedimento consistiu na fortificação das amostras com padrão interno a 100 ng/mL e com carbendazim nas concentrações de 5; 50; 150; 300; 500 e 800 ng/mL para as amostras de água e com padrão interno a 25 ng/g e com carbendazim a 0,025; 0,25; 0,5; 1; 5 e 10 ng/g para as amostras de fígado. A linearidade foi avaliada por meio da determinação do coeficiente de determinação (r^2) da regressão linear, a verificação da ausência de valores aberrantes foi feita pelo teste de *Grubbs* e a homocedasticidade pelos testes de *Cochran*.

O limite de quantificação (LQ) foi definido através do ponto equivalente ao nível inferior de concentração da curva analítica, de 5 ng/mL e 0,025 ng/g para água e fígado respectivamente, verificando a relação sinal/ruído para as áreas de carbendazim e do padrão interno no cromatograma referente a este ponto da curva analítica.

A repetitividade e a recuperação foram avaliadas utilizando 7 amostras e a robustez 3 amostras. A matriz água foi fortificada com PI a 100 ng/mL e carbendazim a 150 ng/mL e a matriz fígado foi fortificada com PI a 25 ng/g e carbendazim a 5 ng/g. A avaliação da repetitividade foi realizada por meio do coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR) das áreas do sinal cromatográfico. Para a robustez, a variação adotada consistiu na ressuspensão das amostras no dia seguinte da extração e a avaliação foi feita de forma análoga à da repetitividade. Inicialmente, calculou-se o CV para as análises realizadas sob as condições alteradas e normais e em seguida foi calculado o erro relativo entre as condições das análises. Para as amostras de condições normais foram adotadas 3 amostras da repetitividade por apresentar condições de preparo e análise semelhantes.

Para a recuperação, as amostras foram fortificadas após a extração e foi avaliada a porcentagem de rendimento da extração, bem como o CV. Já a análise da precisão intermediária

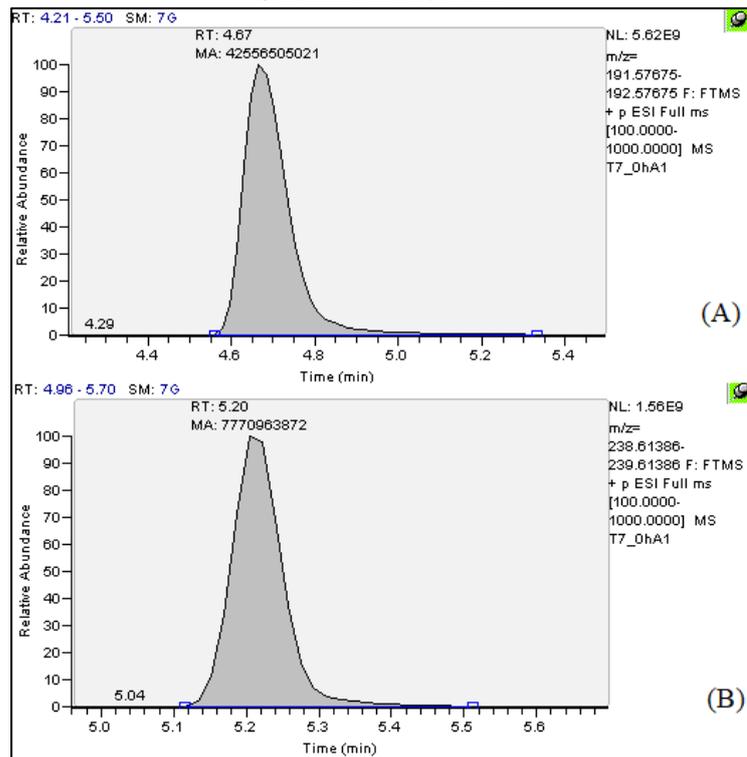
consistiu na reinjeção das amostras da repetitividade no dia seguinte e sua avaliação foi feita de forma análoga à repetitividade.

O arraste consistiu na reinjeção da amostra de 300 ng/mL e 10 ng/g de carbendazim para as amostras de água e fígado respectivamente entre 2 amostras de seletividade e a avaliação do resultado foi feita através do sinal do analito.

4.8. Monitoramento da Concentração de Carbendazim

O monitoramento da concentração do carbendazim consistiu de duas etapas. Inicialmente foram calculadas as áreas dos sinais cromatográficos no tempo de retenção do agrotóxico e do padrão interno (proxifilina) por meio do *software* Thermo Scientific Xcalibur™ para as amostras de água coletadas nos grupos 7, 14, 28 e 35 dias (Figura 7).

Figura 7 - Áreas dos sinais cromatográficos do carbendazim (a) e da proxifilina (b) no *software* Thermo Scientific Xcalibur™.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Então, foram calculadas as razões entre o carbendazim e a proxifilina (analito/PI). A concentração do carbendazim foi calculada através da seguinte fórmula:

$$C = \frac{R - C_L}{C_A}$$

Onde:

C: Concentração do carbendazim ($\mu\text{g/L}$)

R: Razão analito/PI

C_L : Coeficiente Linear

C_A : Coeficiente Angular

Vale ressaltar que os valores de C_L e C_A foram adotados com base nos resultados obtidos nos cálculos da curva analítica.

Em seguida foram plotados os resultados das concentrações calculadas em função do tempo.

4.9. Avaliação dos Metabólitos de Carbendazim

A avaliação dos metabólitos do carbendazim se iniciou com levantamentos em literatura dos possíveis metabólitos do carbendazim em artigos científicos e bancos de dados como PubChem, ChemSpider, IUPAC e IChemE.

Os candidatos a metabólitos foram listados e tiveram suas massas exatas teóricas protonadas calculadas a partir de suas fórmulas moleculares com o auxílio do software Thermo Scientific XcaliburTM. Em seguida, as massas obtidas foram pesquisadas no cromatograma no modo *full-scan*, no modo de ionização positivo, os espectros de massas dos respectivos sinais cromatográficos foram avaliados e os íons encontrados tiveram suas fórmulas moleculares calculadas a critério de confirmação.

Logo após, para corroborar as suspeitas foram avaliados os espectros de massas no modo *full-scan / DDA-MS²* no modo de ionização positivo, analisando os íons produto formados a partir da fragmentação dos íons precursores, tendo como base a rota metabólica do carbendazim.

4.10. Análises Estatísticas para Abordagem Metabolômica

Os dados brutos adquiridos foram processados no software Proteo Wizard com o objetivo de gerar um arquivo no formato mxml. Em seguida, foi realizado o pré-processamento dos espectros de massas na plataforma MetaboAnalyst 5.0 com o objetivo de realizar a deconvolução dos cromatogramas e de alinhar os sinais cromatográficos. Os espectros de massas foram adicionados no modo centroide sob os parâmetros LC-MS Platform > HPLC-Orbitrap; Parameter Setting > Default/Manual, Method: centWave, min_peakwidth: 10.0, max_peakwidth: 60.0, ppm: 3.0, mzdif: 0.01; Peak Alignment > Method: loess, Bandwidth: 30.0, minFraction: 0.8; Peak Annotation > Polarity: positive.

As tabelas obtidas na etapa anterior foram exportadas para a opção *Statistical Analysis*, onde foram aplicados os métodos estatísticos razão de expressão (*Fold Change*), análise de componentes principais (PCA), análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA), *Heatmap*, *volcano plot* e *pathway analysis*. Por fim, procedeu-se à análise de biomarcadores também no Metabo Analyst. Ambas as análises foram realizadas para amostras de fígado de *Zebrafish* expostos por 28 e 7 dias.

4.11. Avaliação da Bioacumulação no Fígado

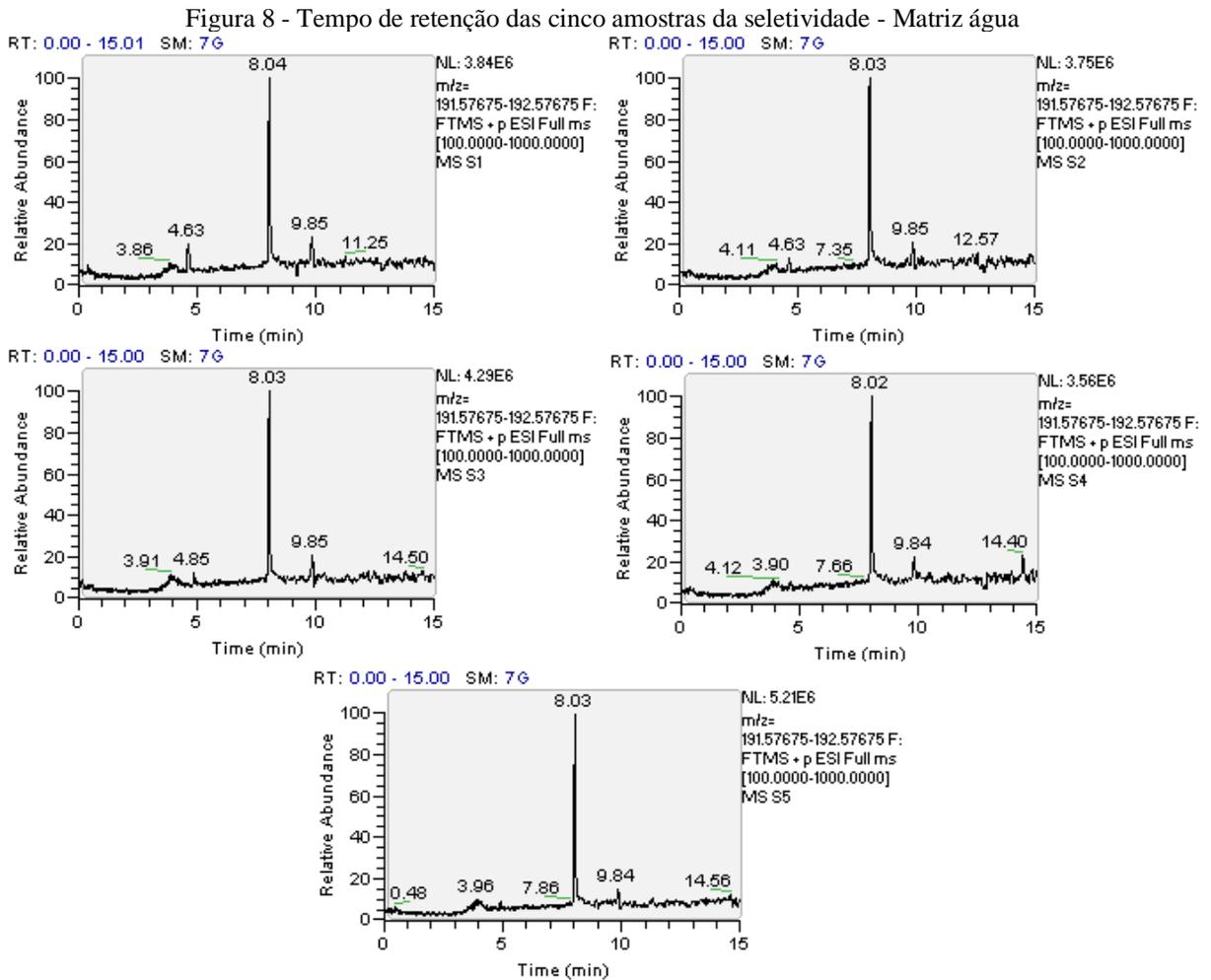
A avaliação da bioacumulação no fígado, se deu em três etapas: 1º) foram calculadas as áreas dos sinais cromatográficos do carbendazim, dos metabólitos e do padrão interno (proxifilina) por meio do software Thermo Scientific Xcalibur™ nas amostras de fígado dos grupos 7, 14, 28 e 35 dias. 2º) foram calculadas as razões entre o agrotóxico e o padrão interno e também entre os metabólitos e o padrão interno. Então, foram plotados os gráficos das razões em função do tempo em dias e calculada as concentrações de carbendazim e dos metabólitos conforme equação descrita no item 5.8.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Validação do Método Analítico

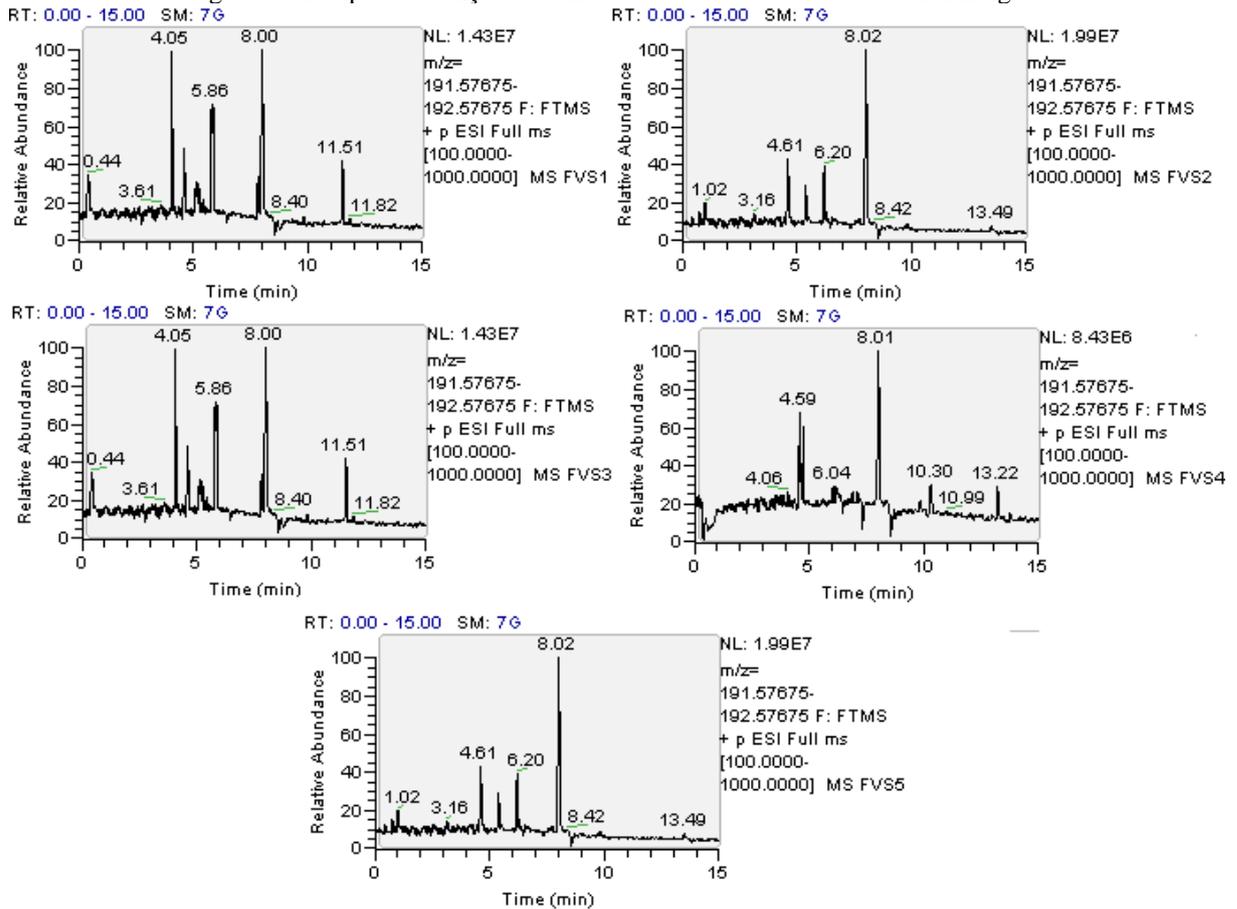
Seletividade

Observou-se que as matrizes de água e de fígado para avaliação da seletividade do método, não apresentaram sinal cromatográfico no tempo de retenção do analito de interesse ($RT_{\text{Carbendazim}}$: 4.6; RT_{PI} : 5.1), ou seja, o método analítico mostrou-se seletivo para análise de carbendazim (Figuras 8 e 9).



Fonte: Print do software Xcalibur (2022).

Figura 9 - Tempo de retenção das cinco amostras da seletividade - Matriz fígado



Fonte: Print do software Xcalibur (2022).

Curva Analítica

Foram construídas duas curvas de calibração nas quais foram utilizados valores crescentes de concentração para cada um dos seis pontos das curvas (5; 50; 150; 300; 500 e 800 ng/mL de carbendazim para as amostras de água e 0,025; 0,25; 0,5; 1; 5; e 10 ng/g de carbendazim para as amostras de fígado). Segundo recomendações da ANVISA (2003) o coeficiente de correlação linear (r) deve ser igual ou superior a 0,99, o que foi atingido. Ademais, os testes de *Grubbs* não apontaram valores aberrantes.

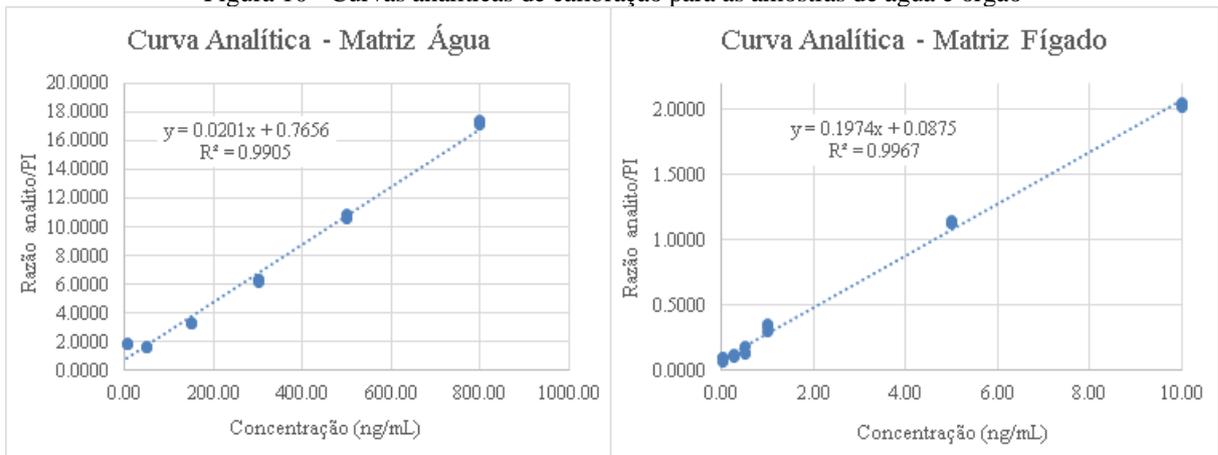
As equações das curvas (Equação 01 e 02), bem como as curvas analíticas (Figura 10) para as amostras de água e órgão, respectivamente, podem ser visualizadas abaixo.

$$y=0,0201x+0,7656 \quad (\text{Equação 01})$$

$$y=0,1974x+0,0875 \quad (\text{Equação 02})$$

Onde y é a razão analito / PI e x a concentração do carbendazim em ng/mL.

Figura 10 - Curvas analíticas de calibração para as amostras de água e órgão



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Segundo INMETRO (2016), o coeficiente de determinação linear (r^2) é um bom indicativo sobre a qualidade do modelo matemático adotado, entretanto não é conclusivo. Desta forma, é recomendada a avaliação também dos resíduos. Para os resíduos, o desejado é que apresentem comportamento aleatório, caso se observe alguma tendência isso pode ser indício de que o modelo seja inadequado. Desta forma, os testes de *Cochran* apontaram para o resultado homocedástico, ou seja, que apresenta homogeneidade da variância dos resíduos.

Limite de quantificação

Na Tabela 2 estão dispostas as relações sinal/ruído para o carbendazim e o padrão interno (proxifilina), verificados no nível inferior (5 ng/mL e 0,025ng/g para água e fígado respectivamente) da curva analítica.

Tabela 2- Relação sinal/ruído para o carbendazim e o padrão interno, no nível inferior da curva analítica.

Substância	Relação Sinal/Ruído - Água	Relação Sinal/Ruído - Fígado
Carbendazim	238	30
Proxifilina	121	379

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A proporção geralmente aceita na relação sinal/ruído como estimativa do limite de quantificação é de 10:1. Como a relação encontrada para o carbendazim, tanto para água quanto para fígado, foi superior a 10, pode se considerar as concentrações de 5 ng/mL e 0,025 ng/g como o limite de quantificação de carbendazim para este método.

Repetitividade

Segundo a ANVISA (2003), para verificar a precisão do método analítico deve-se avaliar o coeficiente de variação (CV) ou também denominado desvio padrão relativo (DPR), o qual não admite valores superiores a 15%. Considerando que os valores de CV para as amostras de água e fígado são de 4,4% e 3,4%, respectivamente, pode-se dizer que os métodos são precisos.

Precisão Intermediária

Assim como para a repetitividade, para se ter um método de análise preciso é necessário que o CV seja inferior a 15%. Foram obtidos valores de CV de 4,8% e 4,0% para as amostras de água e fígado, respectivamente, o que confere precisão ao método.

Arraste

Na Tabela 3, a seguir, estão dispostas as áreas consideradas na avaliação do arraste do analito na análise cromatográfica para a matriz água e fígado.

Tabela 3- Critérios utilizados na avaliação do arraste.

Amostra	Área - Água	Área - Fígado
Amostra antes	14880434	13045532
Controle (Carbendazim 300 ng/mL e 10 ng/g)	15826926800	1624745850
Amostra depois	31899658	5606383
Resultado	SEM ARRASTE	SEM ARRASTE

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Para este parâmetro, o critério de aceitação é que o sinal verificado na amostra seguinte seja menor ou igual a 1% do sinal encontrado na amostra controle (Carbendazim 300 ng/mL e 10 ng/g para água e fígado, respectivamente). O sinal de carbendazim verificado na injeção da amostra após a análise do controle representa, aproximadamente, 0,20% para água e 0,35% para fígado, da área verificada neste, ou seja, inferior a 1%.

Robustez

Para o método ser considerado robusto, é desejável que o erro relativo entre as médias dos resultados obtidos com as condições originais do método e dos resultados obtidos com as condições modificadas não exceda 10%.

Tabela 4 - Cálculos robustez – Matriz água

CONTROLES DE ROBUSTEZ – Condições normais			
Amostra	Concentração nominal (ng/mL)	Razão Carbendazim/PI	Concentração calculada (ng/mL)
Rep 1	150	4.4621	181.9857
Rep 2		4.5189	184.8249
Rep 3		4.1943	168.5749
Resultados	Desvio da Robustez (%)	Desvio Padrão Relativo (%)	Média (ng/mL)
	8.679	4.86	178.4618
CONTROLES DE ROBUSTEZ – Condições alteradas			
Amostra	Concentração nominal (ng/mL)	Razão Carbendazim/PI	Concentração calculada (ng/mL)
Rob 1	150	4.6285	190.3152
Rob 2		3.9570	156.6937
Rob 3		4.0578	161.7397
Resultados	Desvio da Robustez (%)	Desvio Padrão Relativo (%)	Média (ng/mL)
	18.131	10.69	169.5828
Erro relativo (%)	4,98		

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Tabela 5 - Cálculos robustez – Matriz fígado

CONTROLES DE ROBUSTEZ – Condições normais			
Amostra	Concentração nominal (ng/mL)	Razão Carbendazim/PI	Concentração calculada (ng/mL)
Rep 1	5	1.7658	8.4709
Rep 2		1.7512	8.3961
Rep 3		1.7696	8.4904
Resultados	Desvio da Robustez (%)	Desvio Padrão Relativo (%)	Média (ng/mL)
	0.050	0.59	8.4525
CONTROLES DE ROBUSTEZ – Condições alteradas			
Amostra	Concentração nominal (ng/mL)	Razão Carbendazim/PI	Concentração calculada (ng/mL)
Rob 1	5	1.6057	7.6473
Rob 2		1.7060	8.1633
Rob 3		1.5282	7.2485
Resultados	Desvio da Robustez (%)	Desvio Padrão Relativo (%)	Média (ng/mL)
	0.459	5.97	7.6864
Erro relativo (%)	9,06		

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Foi obtido um erro relativo de 4,98% para as amostras de água e de 9,06% para as amostras de fígado, atendendo assim ao critério dos 10%. Com isso, o método proposto pode ser considerado robusto.

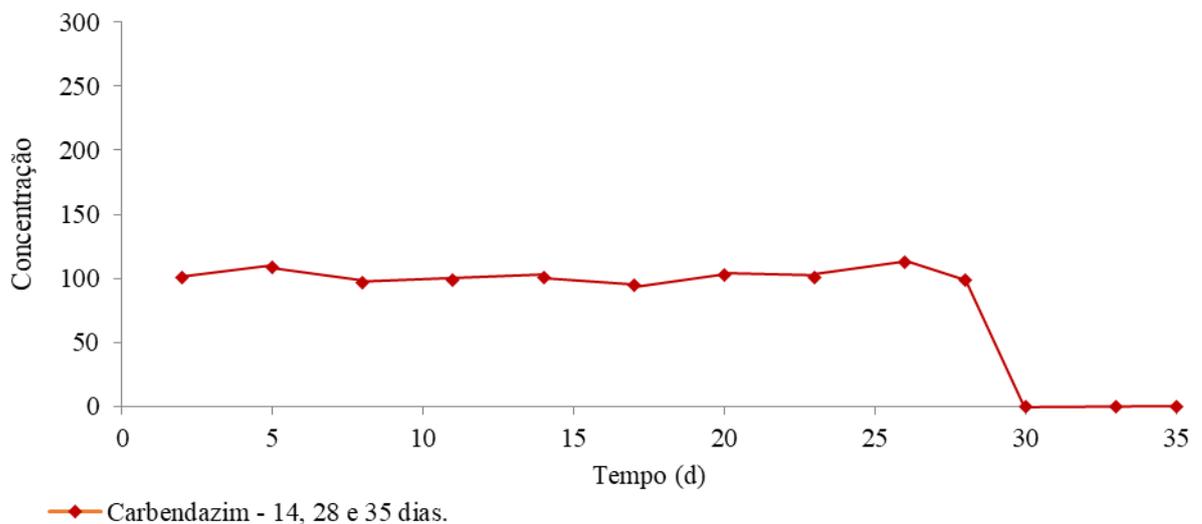
Recuperação

A recuperação desejável deve estar na faixa de 90 a 110% do valor da concentração nominal. Para as amostras de água o valor foi de 108,6% com um CV de 4,4% enquanto que para as amostras de fígado o valor foi de 109,1% com um CV de 3,4%.

5.2. Monitoramento da concentração do carbendazim

A respeito do monitoramento da concentração do carbendazim, observa-se na Figura 11 que durante os 35 dias de exposição os valores plotados resultaram em um gráfico linear, o que corrobora com o objetivo inicial de se manter valores constantes para o agrotóxico durante o experimento. De forma que o valor entra em decréscimo apenas a partir do 29º dia em que a água dos aquários foi trocada integralmente e a substância não mais foi aplicada.

Figura 11 - Monitoramento da concentração do carbendazim na água dos aquários usados no teste de exposição do *zebrafish* ao carbendazim por 35 dias.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

5.3. Detecção de Possíveis Metabólitos do Carbendazim utilizando o modelo *Zebrafish* por LC-HRMS no grupo tratado por 7 dias

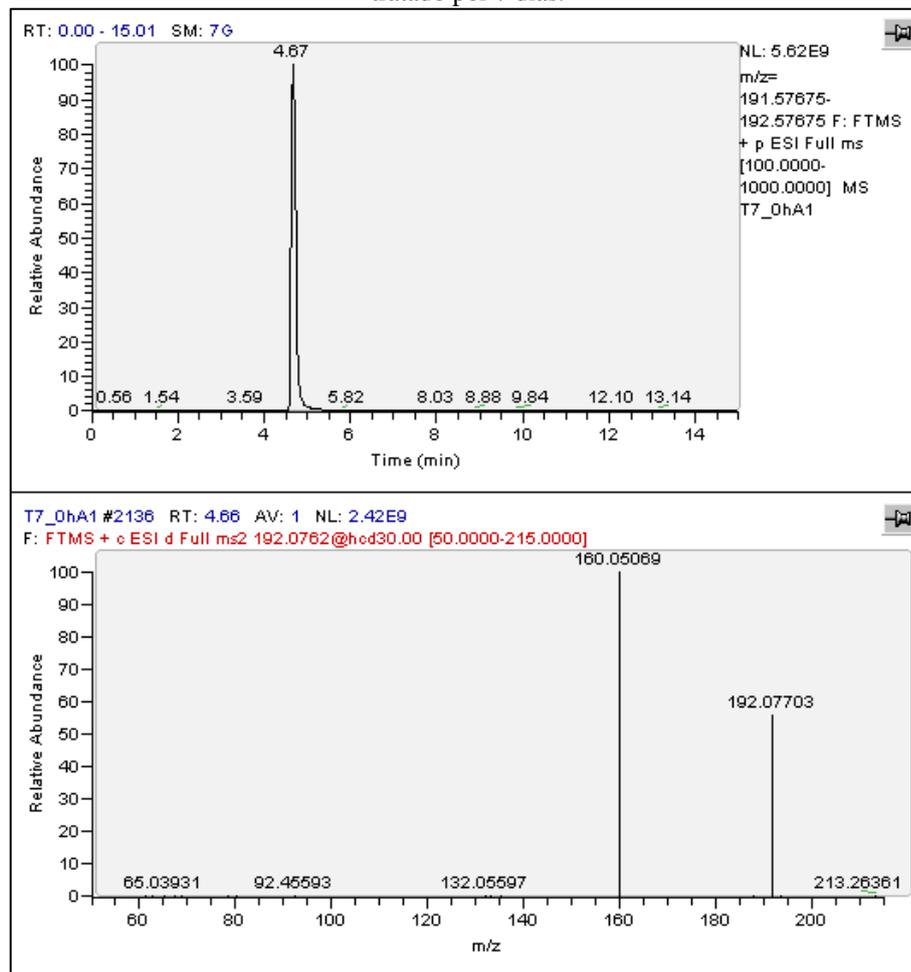
A avaliação do perfil metabólico do carbendazim se iniciou com a utilização do modelo *in vivo Zebrafish*, onde o perfil metabólico do carbendazim foi determinado pela adição direta nos sistemas do grupo tratado por 7 dias. Os controles negativos contaram com ausência de agrotóxico e presença de DMSO enquanto os controles estabilidade contaram com ausência de animais.

Desta forma, o primeiro passo da pesquisa foi identificar os metabólitos já descritos na literatura. Então, possíveis metabólitos foram avaliados com base no conhecimento das vias

metabólicas clássicas para xenobióticos. As massas exatas desses candidatos a metabólitos foram calculadas a partir de suas fórmulas moleculares. Assim, após realizar uma busca das massas exatas dos supostos metabólitos, alguns sinais cromatográficos foram identificados no modo *full-scan*, no modo de ionização positivo. Com o objetivo de corroborar os dados encontrados, foram avaliados os espectros no modo *full-scan* / *DDA-MS*², também no modo de ionização positivo. Neste modo de aquisição, os íons são primeiramente detectados no modo *full-scan* e em seguida, são direcionados para isolamento no quadrupolo e por fim, são fragmentados na C-trap - célula de dissociação de alta energia (HCD). Os íons produto gerados são enviados ao Orbitrap, onde a massa exata é determinada.

Inicialmente, foi avaliado o espectro de MS/MS do carbendazim e detectou-se a presença dos íons produto característicos m/z 160.05062, correspondente à perda da metoxila (-OCH₃) por meio da eliminação de metanol e do íon produto m/z 132.05597 correspondente à perda neutra de carbonila (-CO) (Figura 12).

Figura 12 - Cromatograma e espectro de massas do carbendazim referente às amostras de água para o grupo tratado por 7 dias.



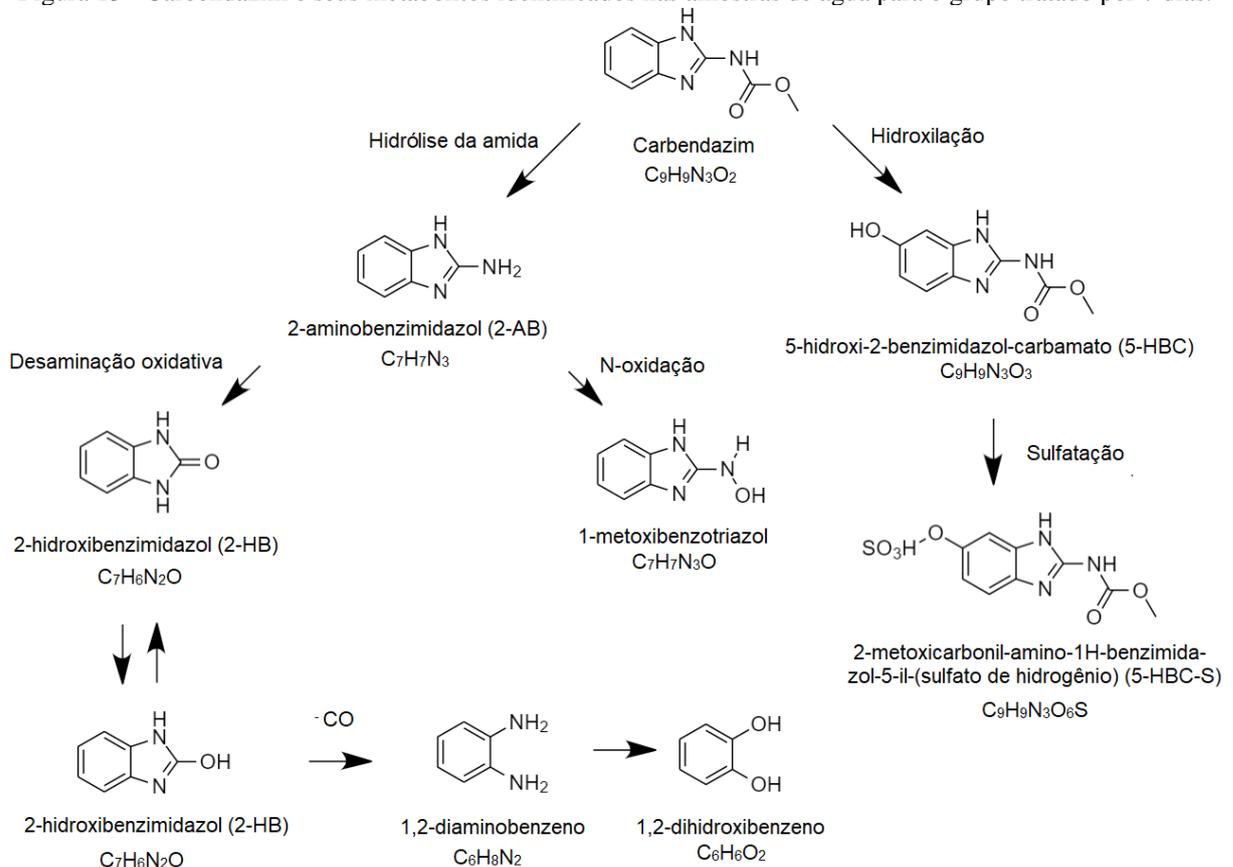
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Em seguida, foram encontrados os metabólitos 2-aminobenzimidazol (2-AB), 5-hidroxi-2-benzimidazol-carbamato (5-HBC), 2-metoxicarbonil-amino-1H-benzimidazol-5-il-(sulfato de hidrogênio) (5-HBC-S), 1-metoxibenzotriazol, 2-hidroxibenzimidazol (2-HB), 1,2-diaminobenzeno e 1,2-dihidroxibenzeno (figura 13).

O 5-HBC é um dos principais produtos da biotransformação do carbendazim, sendo formado por meio da reação de hidroxilação (reação de fase I) (APVMA, 2009; SILVA *et al.*, 2014). Já o 5-HBC-S é formado por meio da reação de sulfatação na hidroxila do 5-HBC, a qual se caracteriza como uma reação de fase II - do metabolismo (WHO *et al.*, 1993).

O 2-AB é oriundo da degradação do carbendazim a partir da perda do grupo metoxicarbonil, resultando numa amina primária ligada ao benzimidazol (COUTINHO *et al.*, 2006). Já o 1-metoxibenzotriazol é proveniente da reação de N-oxidação do 2-AB, enquanto que o 2-hidroxibenzimidazol (2-HB) é resultante da desaminação oxidativa do 2-AB. Por consequência, o 1,2-diaminobenzeno é formado através da perda de -CO do 2-HB, o que por sua vez gera o 1,2-dihidroxibenzeno.

Figura 13 - Carbendazim e seus metabólitos identificados nas amostras de água para o grupo tratado por 7 dias.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Os tempos de retenção, fórmula molecular, massas exatas teóricas protonadas, energia de colisão, massas exatas teóricas dos íons produto, bem como os valores do erro em partes por milhão (ppm) do carbendazim e seus metabólitos identificados são mostrados na Tabela 6 abaixo.

Tabela 6 - Carbendazim e seus metabólitos identificados.

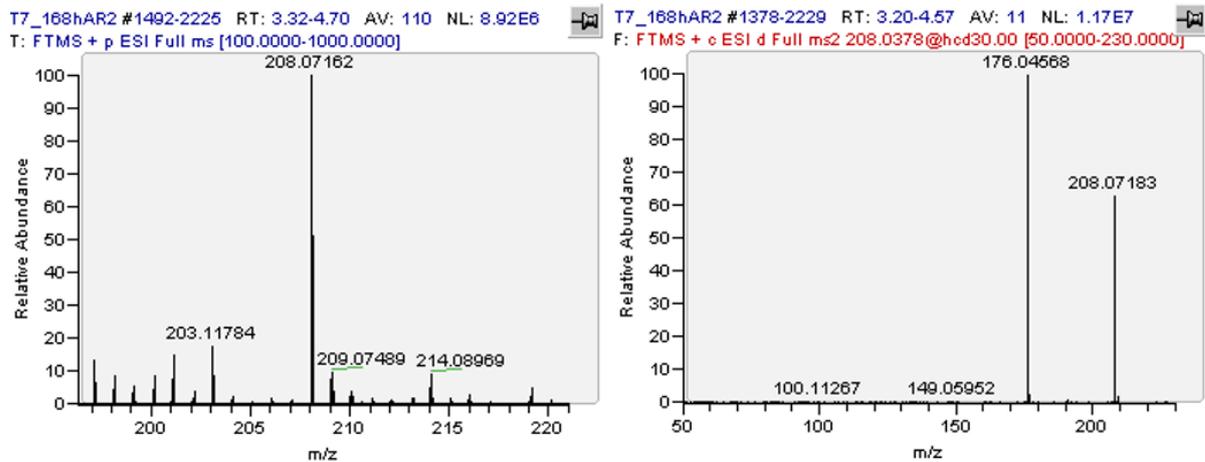
Metabólitos identificados no modelo <i>Zebrafish</i>	Tempo de retenção (t _R) (min)	Fórmula molecular	[M + H] + m/z*	Erro (ppm)	Energia de Colisão (eV)	Íons produto	Fórmula molecular do produto	Erro (ppm)
Carbendazim	4.6	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	192.07675	-0.16	30	160.05062 132.05597	C ₈ H ₆ N ₃ O C ₇ H ₆ N ₃	0.08 0.34
2-AB	1.8	C ₇ H ₇ N ₃	134.07127	-0.01	30	-	-	-
5-HBC	3.7	C ₉ H ₉ N ₃ O ₃	208.07166	-0.02	30	176.04568 149.05952	C ₈ H ₆ N ₃ O ₂ C ₇ H ₇ N ₃ O	0.22 1.15
5-HBC-S	2.9	C ₉ H ₉ N ₃ O ₆ S	288.02848	-0.39	30	176.04576 208.07191	C ₈ H ₆ N ₃ O ₂ C ₉ H ₁₀ N ₃ O ₃	0.30 0.24
1-metoxibenzotriazol	3.0	C ₇ H ₇ N ₃ O	150.06618	-0.008	30	-	-	-
2-HB	0.5	C ₇ H ₆ N ₂ O	135.05528	-0.009	30	-	-	-
1,2-diaminobenzeno	0.4	C ₆ H ₈ N ₂	109.07602	-0.005	30	-	-	-
1,2-dihidroxibenzeno	5.7	C ₆ H ₆ O ₂	111.04405	-0.006	30	-	-	-

[M + H] + m/z*: Massa exata teórica protonada.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Ao se avaliar o espectro de MS/MS referente ao metabólito 5-HBC (LEENHEERS *et al.*, 1993) (Figura 14) observa-se que o íon precursor m/z 208.07183 se encontra pouco intenso, uma vez que foi fragmentado, formando os íons produto m/z 176.04568 e m/z 149.05952. O íon m/z 176.04568 é o pico base do espectro de massas e é referente à perda da metoxila (O-CH₃) por meio da eliminação de metanol, enquanto que o íon m/z 149.05952 corresponde à perda neutra da carbonila (-CO), demonstrando que a hidroxilação ocorreu no grupo 2-aminobenzimidazol.

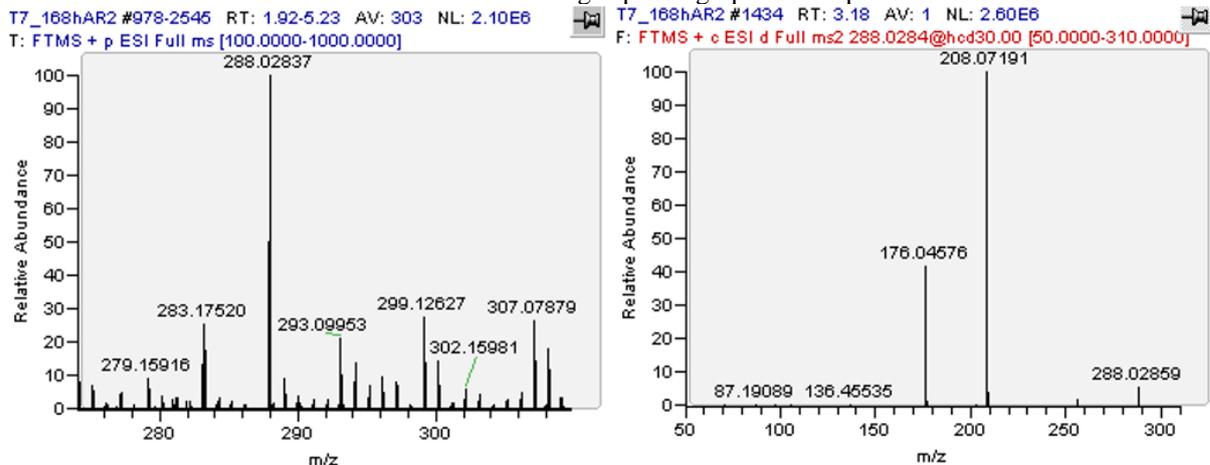
Figura 14 - Espectro de Massas nos modos *full-scan* e *full-scan / DDA-MS2* para o metabólito 5-HBC identificado nas amostras de água para o grupo tratado por 7 dias.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Em relação ao espectro de MS/MS do metabólito 5-HBC-S (Figura 15) observa-se que o íon precursor m/z 288.02859 encontra-se menos intenso, uma vez que também sofreu uma energia de colisão de 30 eV⁻, se fragmentando, o que acabou por gerar os íons produto m/z 176.04576 e m/z 208.07191. Desta forma, para o íon produto m/z 208.07191, o que se observa é uma perda de massa de 80 em relação ao íon precursor, que se refere ao sulfato (SO₃), comprovando que ocorreu uma reação de sulfatação (reação de fase II) na hidroxila do 5-HBC. Logo, quando o 5-HBC-S é fragmentado, ocorre perda do sulfato gerando o íon produto m/z 208.07191, que corresponde ao 5-HBC. Já o íon produto m/z 176.04576 corresponde à perda de metoxila (-OCH₃) por meio da eliminação de metanol da molécula de 5-HBC, conforme descrito anteriormente.

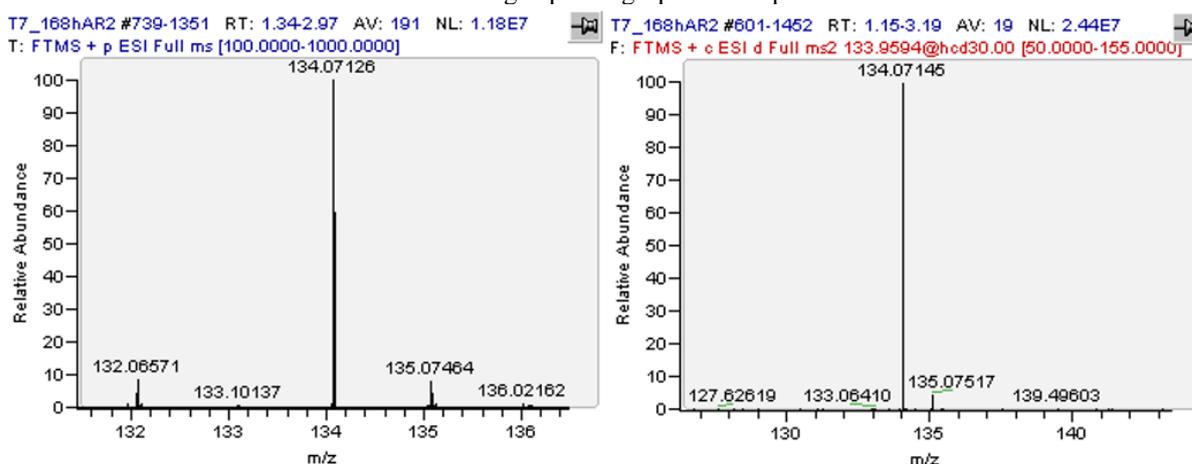
Figura 15 - Espectro de Massas nos modos *full-scan* e *full-scan / DDA-MS2* para o metabólito 5-HBC-S identificado nas amostras de água para o grupo tratado por 7 dias.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Analisando o espectro de MS/MS do metabólito 2-AB, é possível constatar que a energia de colisão de 30 eV⁻ não foi suficiente para promover a fragmentação, entretanto analisando o espectro no modo *full-scan* (Figura 16), observa-se que há um íon m/z 134.07126, o qual tem massa experimental muito próxima à massa teórica do metabólito 2-AB ($C_7H_8N_3$, $M + H^+ = m/z$ 134.07127) e um erro de -0.01 ppm, o que corrobora a hipótese de formação do metabólito 2-AB.

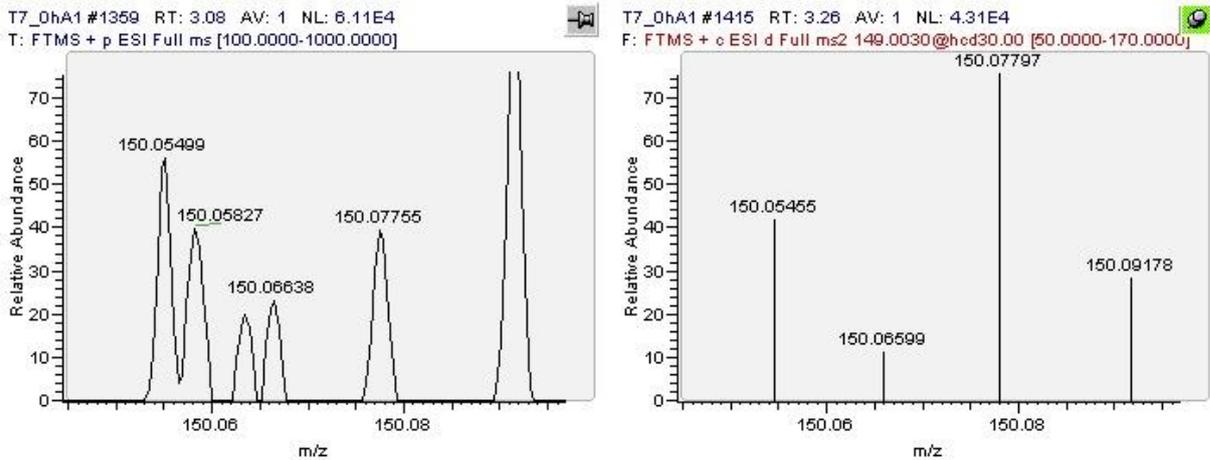
Figura 16 - Espectro de Massas nos modos *full-scan* e *full-scan / DDA-MS2* para o metabólito 2-AB identificado nas amostras de água para o grupo tratado por 7 dias.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Conforme descrito anteriormente, 1-metoxibenzotriazol é formado a partir da reação de N-oxidação (reação de fase I) do 2-AB. Ao analisar o espectro no modo MS/MS nota-se que por se encontrar pouco abundante, o íon não foi selecionado para a fragmentação, entretanto, analisando-se o espectro no modo *full-scan* (Figura 17), observa-se que há um íon m/z 150.06638, o qual tem massa experimental muito próxima à massa teórica do metabólito 1-metoxibenzotriazol ($C_7H_7N_3O$, $M + H^+ = m/z$ 150.06618) e um erro de 0.19 ppm, o que corrobora a hipótese de formação do 1-metoxibenzotriazol.

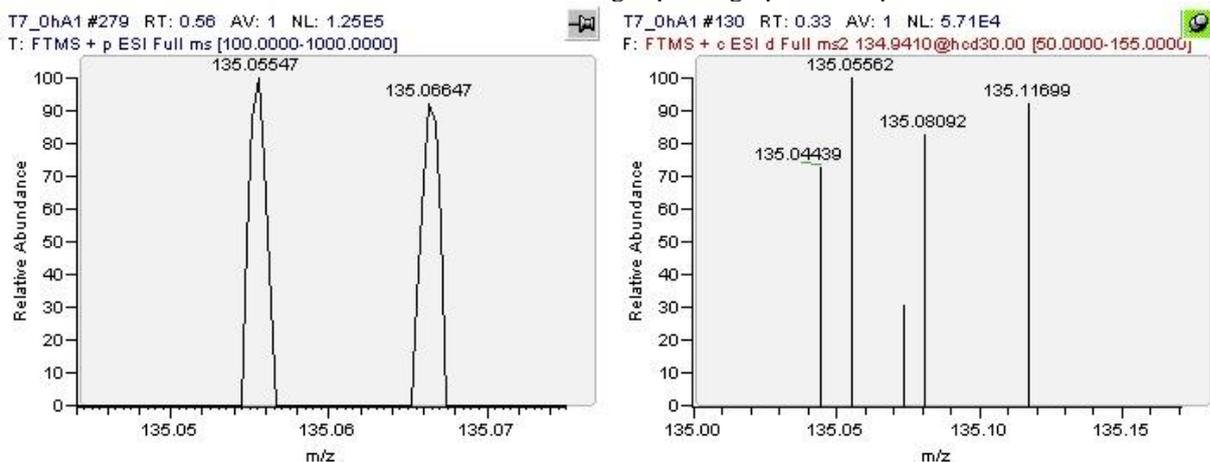
Figura 17 - Espectro de Massas nos modos *full-scan* e *full-scan / DDA-MS2* para o metabólito 1-metoxibenzotriazol identificado nas amostras de água para o grupo tratado por 7 dias.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O 2-HB é um metabólito formado a partir da desaminação oxidativa do 2-AB, uma reação de fase I do metabolismo. Avaliando o espectro no modo MS/MS nota-se que por se encontrar pouco abundante na amostra, o íon não foi selecionado para a fragmentação na C-trap, entretanto, analisando-se o espectro no modo *full-scan* (Figura 18), observa-se que há um íon m/z 135.05547, o qual tem massa experimental muito próxima à massa teórica do metabólito 2-HB ($C_7H_6N_2O$, $M + H^+ = m/z$ 135.05528) e um erro de 0.18 ppm, o que corrobora a hipótese de formação do metabólito 2-HB.

Figura 18 - Espectro de Massas nos modos *full-scan* e *full-scan / DDA-MS2* para o metabólito 2-HB identificado nas amostras de água para o grupo tratado por 7 dias.

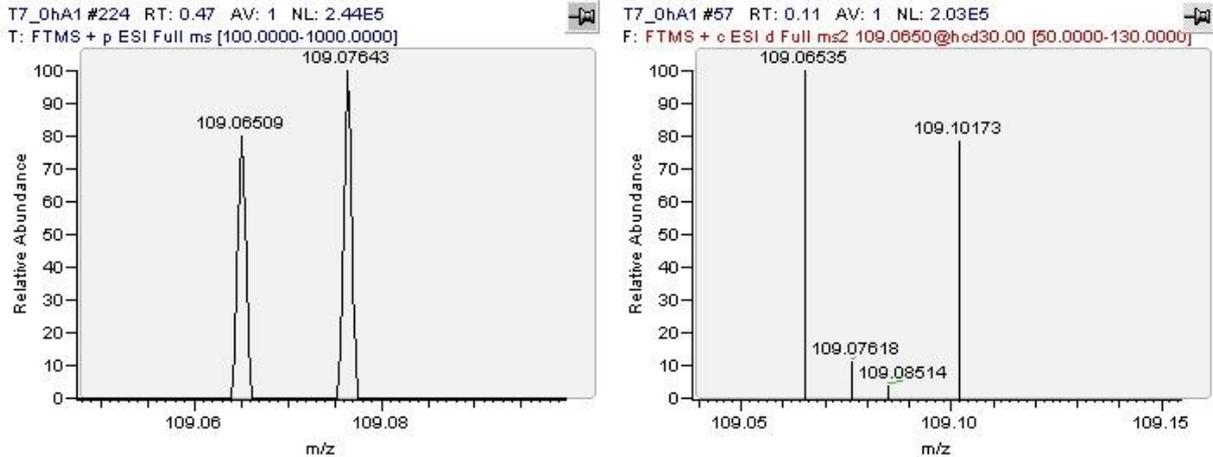


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O 1,2-diaminobenzeno é um metabólito formado a partir da perda de $-CO$ do 2-HB. Avaliando-se o espectro MS/MS, é possível perceber que a energia de colisão de 30 eV não foi capaz de promover a sua fragmentação, entretanto, analisando-se o espectro no modo *full-scan* (Figura 19), observa-se que há um íon m/z 109.07643, o qual tem massa experimental muito

próxima à massa teórica do metabólito 1,2-diaminobenzeno ($C_6H_7N_2$, $M + H^+ = m/z$ 109.07602) e um erro de 0.40 ppm, o que corrobora a hipótese de sua formação.

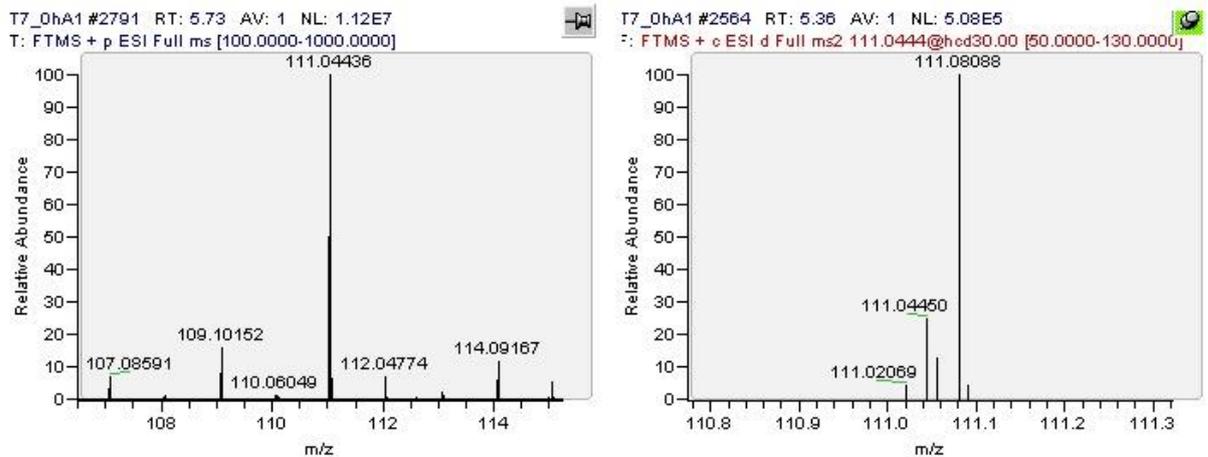
Figura 19 - Espectro de Massas nos modos *full-scan* e *full-scan* / *DDA-MS2* para o metabólito 1,2-diaminobenzeno identificado nas amostras de água para o grupo tratado por 7 dias.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Ao analisar o espectro MS/MS do 1,2-dihidroxibenzeno, é possível perceber que a energia de colisão de 30 eV⁻ também não foi capaz de promover a sua fragmentação, entretanto, analisando-se o espectro no modo *full-scan* (Figura 20), observa-se que há um íon m/z 111.04436, o qual tem massa experimental muito próxima à massa teórica do metabólito ($C_6H_6O_2$, $M + H^+ = m/z$ 111,04405) e um erro de 0.30 ppm, o que corrobora a hipótese de formação do 1,2-dihidroxibenzeno.

Figura 20 - Espectro de Massas nos modos *full-scan* e *full-scan* / *DDA-MS2* para o metabólito 1,2-dihidroxibenzeno identificado nas amostras de água para o grupo tratado por 7 dias.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

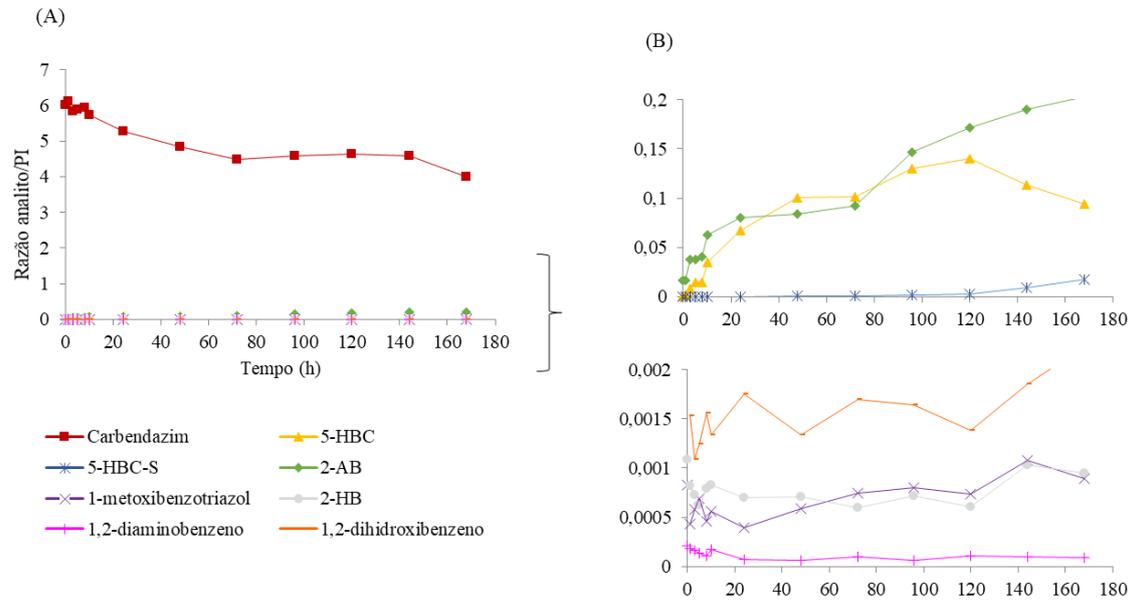
5.4. Perfil Metabólico do Carbendazim

O perfil metabólico do carbendazim pelo *zebrafish* foi avaliado por meio da sua adição ao aquário, seguida pela coleta de amostras de água durante 7 dias, nos seguintes tempos: 0h, 1h, 3h 5h, 8h, 10h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h e 168h. Contando também com os controles negativo e estabilidade, caracterizados pela ausência do agrotóxico e dos animais, respectivamente.

Tais amostras foram analisadas por LC-HRMS e a partir da razão entre o analito e padrão interno em função do tempo é possível visualizar o comportamento do carbendazim e dos metabólitos formados (Figura 21). Nas amostras do aquário tratamento, observa-se que o carbendazim apresentou um decréscimo ao longo do tempo, principalmente após 8h. Enquanto que os metabólitos 5-HBC e 2-AB foram formados rapidamente, demonstrando um aumento mais relevante 8h após a aplicação do agrotóxico na água do aquário. O 5-HBC-S é formado por meio da reação de sulfatação do metabolismo de fase II na hidroxila do 5-HBC, o que é corroborado ao se observar que seu surgimento se dá após 120h e seu aumento é proporcional ao decréscimo do 5-HBC.

Em relação aos metabólitos 1-metoxibenzotriazol, 2-hidroxibenzimidazol (2-HB), 1,2-diaminobenzeno e 1,2-dihidroxibenzeno, observa-se que eles foram formados rapidamente e em concentrações bem inferiores em relação aos demais. O 1-Metoxibenzotriazol e o 2-HB apresentaram um acréscimo ao longo dos 7 dias avaliados, atingindo o ápice às 144h de experimento e a partir daí entraram em decréscimo. Já o 1,2-dihidroxibenzeno também apresentou resultados exponenciais, atingindo o seu maior valor com 168h de experimento. Por outro lado, o 1,2-diaminobenzeno, teve sua formação mais representativa após 5h de experimento, atingindo o ápice com 8h e entrando em decréscimo logo em seguida.

Figura 21 - (A) Carbendazim e seus metabólitos referentes as amostras de água do grupo tratamento 7 dias. (B) Ampliação dos metabólitos da Fig. A para visualização de detalhes.

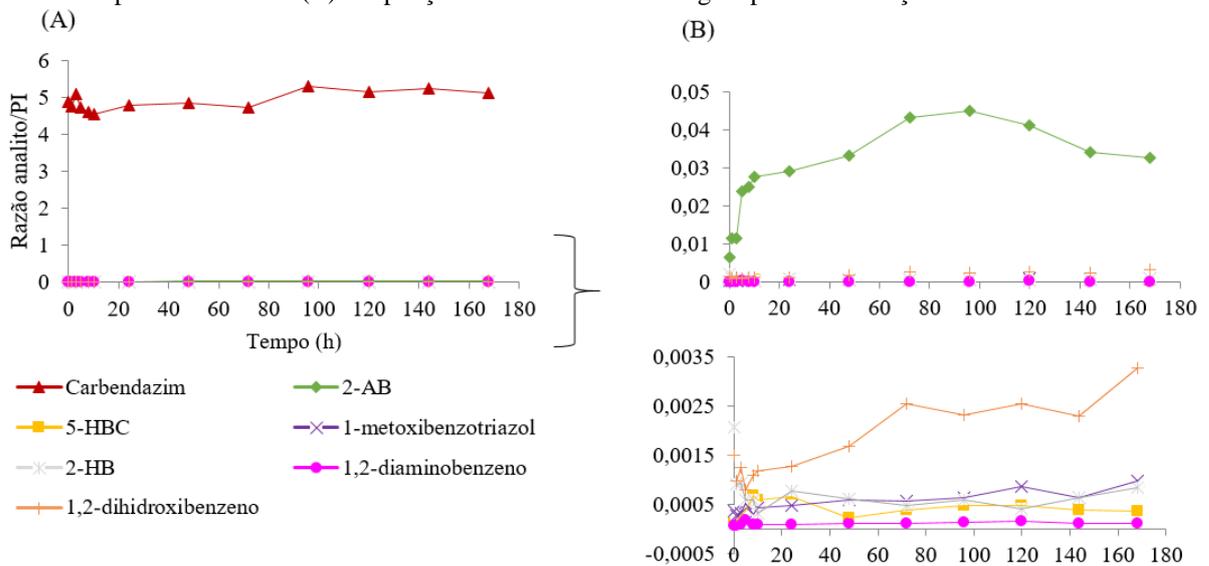


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

As amostras do controle de estabilidade apresentaram os metabólitos 5-HBC, 1-metoxibenzotriazol, 2-hidroxi-benzimidazol (2-HB), 1,2-diaminobenzeno, 1,2-dihidroxibenzeno e o 2-AB.

Observa-se que o carbendazim apresentou pequena variação, o que pode ser justificado uma vez que o produto de sua degradação, o 2-AB, foi encontrado em concentrações menores quando comparada com as amostras do aquário tratamento, assim como os metabólitos 5-HBC, 1-metoxibenzotriazol, 2-hidroxi-benzimidazol (2-HB), 1,2-diaminobenzeno e 1,2-dihidroxibenzeno (Figura 22).

Figura 22 - (A) Carbendazim e seus metabólitos referentes as amostras de água do grupo estabilidade durante os primeiros 7 dias. (B) Ampliação dos metabólitos da Fig. A para visualização de detalhes.



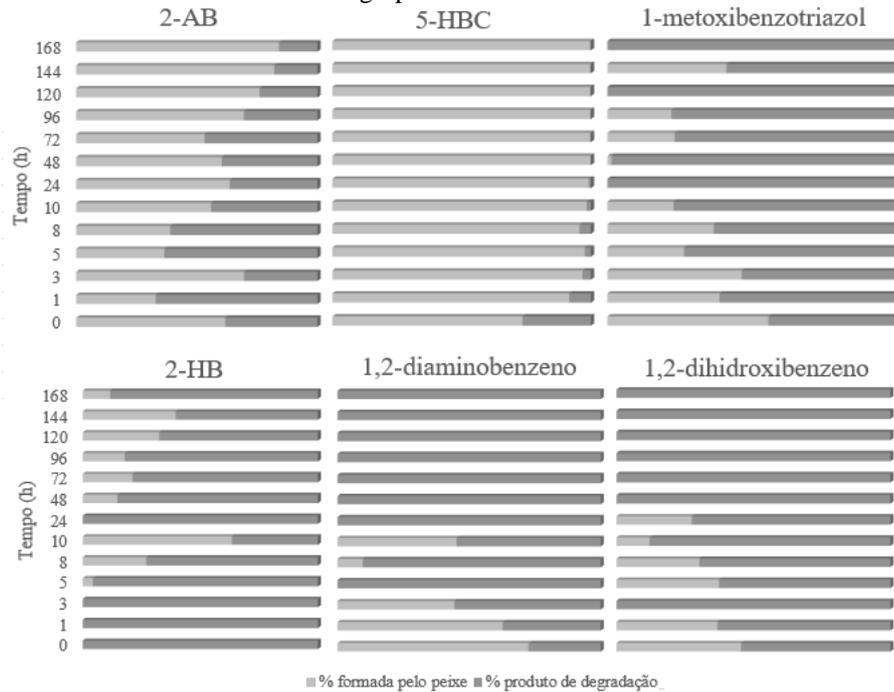
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Com o objetivo de se avaliar quanto dos metabólitos está relacionado à degradação e quanto é referente ao metabolismo do carbendazim pelo peixe, foram comparadas as razões analito/PI do metabólito nas primeiras 168 horas de experimento referentes aos grupos tratamento e estabilidade e calculadas as porcentagens de formação (Figura 23).

Em relação ao 2-AB, o que se observa é que a partir de 72h de experimento, a porcentagem de 2-AB, oriunda do metabolismo do peixe, se torna mais representativa do que aquela proveniente da degradação abiótica do carbendazim, de forma que na amostra de 168h, 84% do metabólito formado é decorrente do metabolismo dos animais.

Em relação aos demais metabólitos, observa-se que o 5-HBC é quase que inteiramente formado pelo peixe, enquanto que os demais (1-metoxibenzotriazol, 2-HB, 1,2-diaminobenzeno e 1,2-dihidroxibenzeno) pela degradação do carbendazim.

Figura 23 - Formação dos metabólitos durante as 168 primeiras horas de exposição para as amostras de água com base nos dados dos grupos tratamento e estabilidade de 7 dias.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

É evidente que a maior parte dos metabólitos é formada após 120h de exposição do *Zebrafish* ao carbendazim, atingindo o ápice 168h após o início do tratamento, ou seja, no 7º dia. Dessa forma, as amostras de água do grupo 7 dias foram analisadas por meio da abordagem metabolômica com o intuito de identificar novos metabólitos que podem ser úteis na detecção da exposição ao carbendazim.

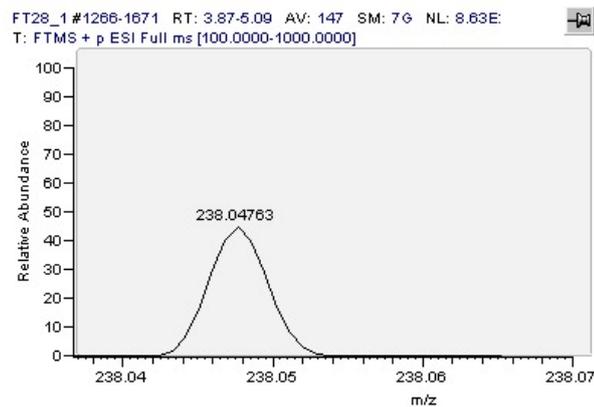
5.5. Avaliação da Bioacumulação no Fígado

Para se avaliar a bioacumulação de uma determinada substância, inicialmente é necessário analisar a sua concentração ao longo do experimento, considerando que para afirmar que houve bioacumulação é necessário que a concentração se mantenha constante. Logo, foram calculadas as concentrações do carbendazim na água dos aquários expostos durante 14, 28 e 35 dias.

Em relação às amostras de água dos grupos expostos durante 14, 28 e 35 dias, a concentração média do carbendazim foi de $101,51 \mu\text{g/mL} \pm 5,4$. Apenas no 29º dia, quando o carbendazim deixou de ser aplicado e a água dos aquários foi totalmente substituída por água livre de carbendazim, a substância entrou em decréscimo e apresentou concentração igual a 0 a partir do 30º dia. Isto corrobora o objetivo inicial de manter sua concentração constante durante o período de exposição (14 e 28 dias) e também de garantir a depuração de 7 dias, proporcionada pela adição de água livre de carbendazim a partir do 28º dia de tratamento.

Nas amostras de fígado, além do carbendazim, sugere-se a presença dos metabólitos 5-HBC, 2-AB, 2-HB, 1,2-diaminobenzeno, 1,2-dihydroxybenzene e 5,6-HOBC-N-óxido. O 5,6-HOBC-N-óxido é um produto da biotransformação do carbendazim. Analisando o espectro no modo *full-scan* (Figura 24), observa-se que há um íon m/z 238.04763, o qual tem massa experimental muito próxima à massa teórica do metabólito 5,6-HOBC-N-óxido ($C_9H_7N_3O_5$, $M + H^+ = m/z$ 238.04584) e um erro de 1.7 ppm o que corrobora a hipótese de formação do metabólito 5,6-HOBC-N-óxido. Entretanto, por se encontrar em uma intensidade muito baixa, este íon não foi selecionado para a fragmentação, e esta ausência de espectro de MS/MS com íons produto característicos, dificulta a confirmação da identidade do metabólito 5,6-HOBC-N-óxido.

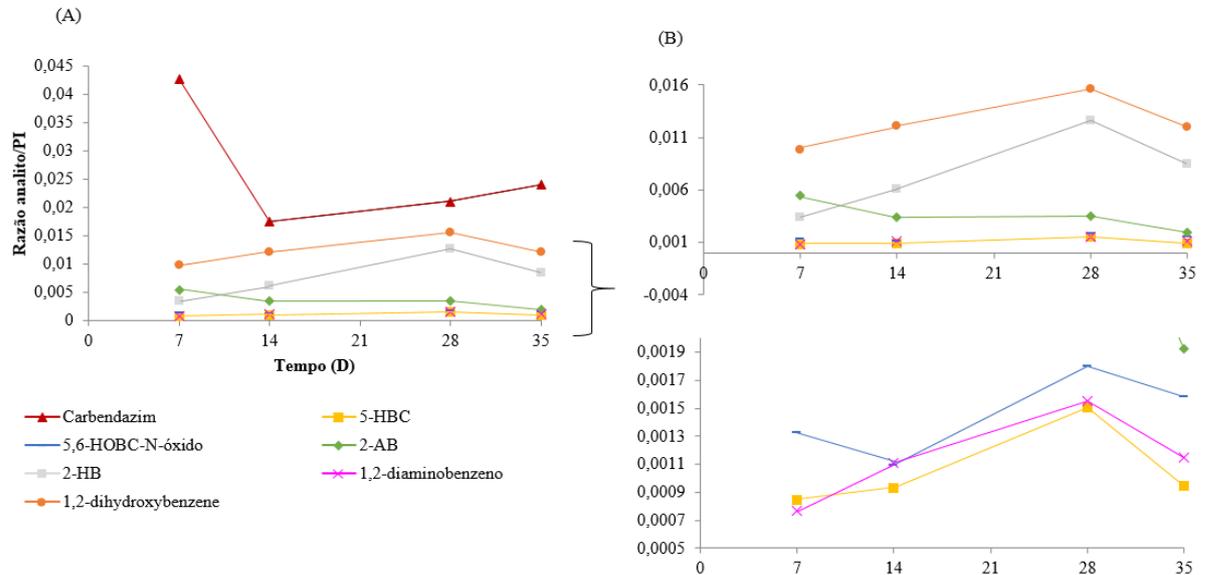
Figura 24 - Espectro de Massas do metabólito 5,6-HOBC-N-óxido identificado nas amostras de fígado do grupo tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

É importante observar que o metabólito 5-HBC-S não foi detectado no fígado, possivelmente devido à alta polaridade, uma vez que se trata de um metabólito de fase II proveniente de reação de sulfatação. Em relação aos metabólitos identificados, observa-se que eles apresentaram um leve acréscimo em relação aos tempos de exposição até o período de 28 dias, a partir daí, no grupo exposto por 35 dias eles decaíram, possivelmente em decorrência do período de depuração proporcionado pelos últimos 7 dias livre de agrotóxico.

Figura 25 – (A) Carbendazim e seus metabólitos identificados no fígado para os grupos do tratamento de 7, 14, 28 e 35 dias. (B) Ampliação dos metabólitos da Fig. A para visualização de detalhes.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Em contrapartida, observa-se que o carbendazim apresentou resultados lineares quando se compara as amostras de 28 e 35 dias mesmo com o período de depuração realizado ao final do experimento. Dessa forma, conclui-se que o carbendazim possivelmente seja capaz de bioacumular no fígado dos animais.

5.6. Abordagem Metabolômica

5.6.1. Amostras de Água

As amostras de água, provenientes do tratamento de 7 dias, foram analisadas por LC-HRMS e então os dados brutos foram processados na plataforma *MetaboAnalyst 5.0*. Os dados foram agrupados para o processamento, de forma que inicialmente as amostras de água do tratamento de 7 dias foram comparadas às amostras de água do grupo negativo.

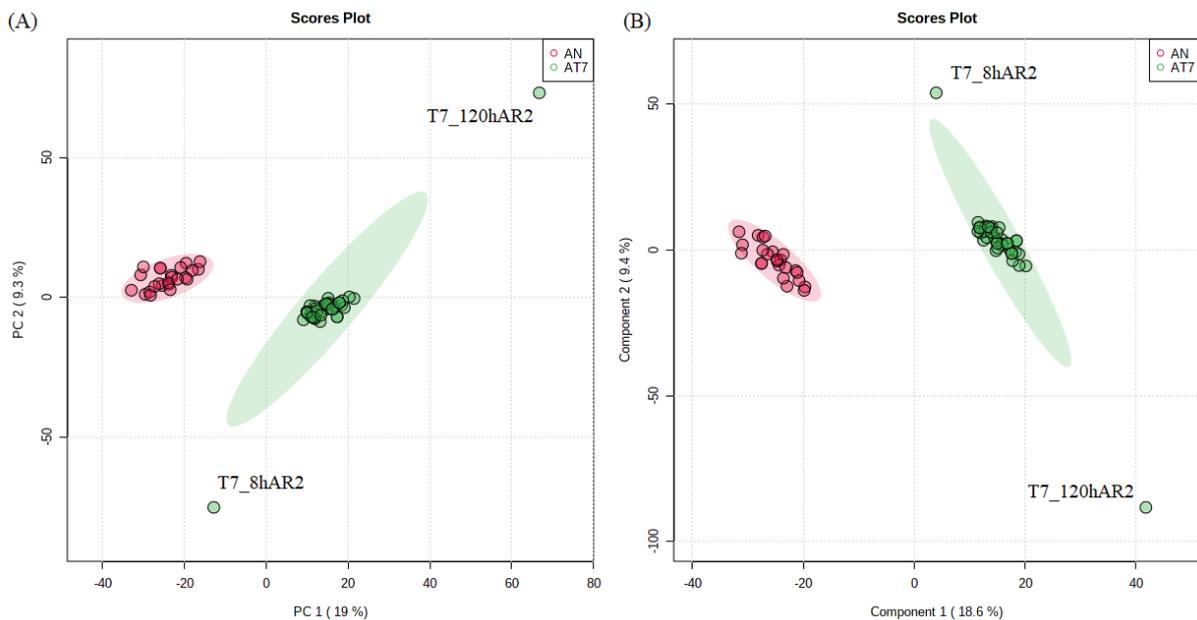
A análise estatística foi empregada através dos seguintes métodos: análise de componentes principais (PCA), Análise por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA), *fold change*, *heatmap*, *volcano plot* e *pathway analysis*.

A PCA é um método estatístico multivariado não supervisionado utilizado para avaliar as relações entre um grande número de variáveis e explicar a sua correlação (FERREIRA, 2016). Os resultados encontrados demonstraram uma tendência de separação entre dois grupos com base em suas composições metabólicas. A somatória dos dois primeiros componentes principais explicou 28,3% da variação dos dados e foram encontrados apenas dois pontos fora

da curva (do inglês, *outlier*), sendo eles as amostras de água coletadas no grupo tratamento 7 dias, 8h e 120h após a aplicação do carbendazim (Figura 26.a).

Já a PLS-DA é um método supervisionado que utiliza de técnicas de regressão multivariada com a finalidade de obter, através dos padrões de agrupamento da amostra e da combinação linear de variáveis originais, informações que permitem prever a covariância dos dados (XIA *et al.*, 2015). O modelo, por meio de suas duas componentes principais, explicou 28% da variância total e apresentou valores de Q^2 e R^2 de 0,98012 e 0,99988 respectivamente (Figura 26.b). Os valores de Q^2 representam a qualidade do ajuste do modelo e devem ser superiores a 0,5, enquanto que os valores de R^2 são referentes à adequabilidade e qualidade da predição e devem ser maiores que 0,8 (ERIKSSON *et al.*, 2008).

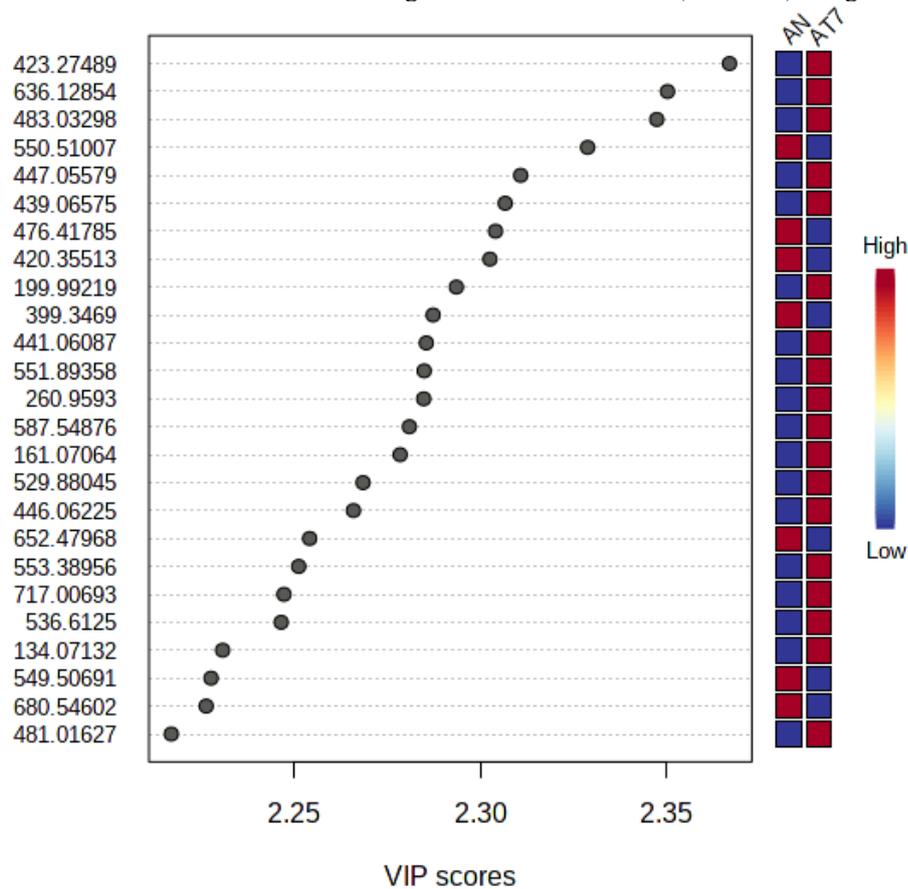
Figura 26– Análises estatísticas PCA 2D (A) e PLS-DA 2D (B) referentes às amostras de água do tratamento 7 dias (verde) e negativo 7 dias (vermelho).



Fonte: MetaboAnalyst 5.0 (2022).

Os metabólitos foram ranqueados utilizando o Índice de Importância Variável – VIP (do inglês, *Variable Importance in Projection*) que utiliza da soma ponderada dos quadrados das cargas PLS com base na quantidade de variação Y explicada em cada dimensão, com o objetivo de informar quais variáveis mais contribuíram para a separação dos grupos (XIA *et al.*, 2012). Os valores ideais de VIP devem se encontrar acima de 1,5 (ERIKSSON *et al.*, 2008). Nas amostras foram identificadas 317 variáveis (metabólitos) importantes para a separação dos grupos no PLS, e dado o número elevado de variáveis, foram consideradas apenas as 25 principais (Figura 27).

Figura 27 - VIP Scores referentes às amostras de água do tratamento 7 dias (vermelho) e negativo 7 dias (azul).



Fonte: MetaboAnalyst 5.0 (2022).

Outra informação importante fornecida pela PLS-DA são as concentrações relativas dos metabólitos em relação aos grupos de análise. Observa-se na Figura 27 anterior, através das colunas coloridas, que dos 25 metabólitos analisados, 18 foram aumentados e 7 foram diminuídos no grupo tratamento em relação ao controle negativo. Preliminarmente, tais dados sugerem que o carbendazim, possivelmente é capaz tanto de promover o surgimento de metabólitos, quanto de inibir algumas reações do metabolismo.

Além disso, com os dados supracitados de VIP em conjunto com o método *fold change* é possível determinar a partir das concentrações relativas dos metabólitos, quanto cada um deles aumentou no grupo tratamento em relação ao controle negativo.

Para possibilitar a identificação dos metabólitos capazes de discriminar as amostras do tratamento de 7 dias das amostras do tratamento negativo, inicialmente, as fórmulas moleculares foram calculadas considerando a produção de adutos e o erro entre a massa teórica e a massa experimental obtida por HRMS. Em seguida, cada fórmula molecular foi comparada com os metabólitos de carbendazim relatados anteriormente na literatura (APVMA, 2009; FANG *et al.*, 2010; HAN *et al.*, 2019; LEENHEERS *et al.*, 1993; SILAMBARASAN E ABRAHAM, 2020; ZHANG *et al.* 2017) e com resultados de metabólitos fornecidos por uma

pesquisa direta no HMDB e pelo MS-FINDER. Por fim, foi possível sugerir a identidade de alguns metabólitos ou pelo menos propor a fórmula molecular (Tabela 7).

Tabela 7 - Metabólitos diferencialmente abundantes.

Item	m/z	Fórmula Molecular	Aduto	RT (min)	Composto	Descrição	Erro (ppm)	ID	VIP	Fold Change	p-value	Abundância
1	423.27489	C ₂₄ H ₃₈ O ₆	M+H ⁺	6.99	2beta,7alpha,12alpha-Trihydroxy-3-oxo-5beta-cholan-24-oic acid	Classe de ácido biliar	-1.83	CHEBI 166704	2.3669	115.86	5.23E-47	↑
2	636.12854	C ₄₄ H ₆₇ N ₈ O ₂₃ P ₃ S ₂	M+H+K ⁺	4.65	CoA-20-COOH-18-oxo-LTE4	Metabólito decorrente da oxidação lipídica do leucotrieno	8	HMDB 12912	2.3502	31.379	2.06E-42	↑
3	483.03298	NI	-	4.66	-	-	-	-	2.3473	68.423	9.29E-42	↑
4	550.51007	NI	-	14.89	-	-	-	-	2.3287	0.12776	3.41E-38	↓
5	447.05579	C ₁₂ H ₂₃ N ₂ O ₉ PS	M+2Na-H ⁺	4.65	4'-Fosfopantotenoilcisteína	Um intermediário na maquinaria biossintética (via) que converte pantotenato (vitamina B5) em coenzima A (CoA)	-5.58	HMDB 0001117	2.3108	190.59	1.74E-35	↑
6	439.06575	C ₂₂ H ₁₄ O ₁₀	M+H ⁺	4.65	NI	-	0.5	-	2.3066	150.71	6.19E-35	↑
7	476.41785	C ₆₀ H ₁₁₂ O ₆	M+H+Na ⁺	14.89	Triacilgliceróis	-	7.0	-	2.304	0.13024	1.33E-34	↓
8	420.35513	C ₂₇ H ₄₆ O ₃	M+H ⁺	14.89	3alpha, 7alpha-Dihydroxy-5beta-cholestan-26-al	Classe de ácido biliar	-	KEGG C05445	2.3025	0.13322	2.06E-34	↓
9	199.99219	NI	-	0.50	-	-	-	-	2.2935	15.774	2.45E-33	↑
10	399.3469	C ₂₄ H ₄₇ O ₄	M+H ⁺	12.97	Ácido tetracosanodioico	Ácido graxo	0,034	CHEBI 165388	2.2872	0.08845 2	1.22E-32	↓
11	441.06087	NI	-	4.64	-	-	-	-	2.2854	338.88	1.92E-32	↑
12	551.89358	NI	-	13.60	-	-	-	-	2.2848	37.813	2.21E-32	↑
13	260.9593	NI	-	0.46	-	-	-	-	2.2847	421.6	2.28E-32	↑
14	587.54876	C ₃₈ H ₆₉ NO ₃	M+NH ₄ -H ₂ O	14.89	N-araquidonoilefingana	Compostos orgânicos: ceramida de cadeia longa (contendo um ácido graxo de cadeia longa)	3	HMDB 0240729	2.2809	18.184	5.74E-32	↑
15	161.07064	C ₅ H ₇ N ₃ O	M+H ⁺	4.62	Metabólito de carbendazim	Formado a partir da O-desalquilação do carbendazim (metabólito da fase I).	7	PubChem CID 53987768	2.2784	45.898	1.02E-31	↑
16	529.88045	NI	-	13.61	-	-	-	-	2.2684	46.818	9.48E-31	↑
17	446.06225	NI	-	4.65	-	-	-	-	2.2658	57.848	1.64E-30	↑

Item	m/z	Fórmula Molecular	Aduto	RT (min)	Composto	Descrição	Erro (ppm)	ID	VIP	Fold Change	p-value	Abundância
18	652.47968	C ₁₆ H ₃₁ NO ₅	2M+NH ₄	13.03	3-hidroxinonanoil carnitina	Acilcarnitina	-	HMDB 0061635	2.2541	0.02879 5	1.77E-29	↓
19	553.38956	C ₁₅ H ₂₇ NO ₄	2M+H-H ₂ O	14.33	2-octenoilcarnitina	Acilcarnitina. Papel importante no transporte de ácidos graxos	-1.46	HMDB 0013324	2.2511	5.4039	3.10E-29	↑
20	717.00693	NI	-	13.52	-	-	-	-	2.2472	40.232	6.53E-29	↑
21	536.6125	NI	-	12.92	-	-	-	-	2.2464	182.08	7.49E-29	↑
22	134.07132	C ₇ H ₇ N ₃	M+H ⁺	1.01	2-aminobenzimidazol	Da degradação do carbendazim pela perda do grupo metoxicarbonila	-	PubChem CID 13624	2.2307	16.115	1.18E-27	↑
23	549.50691	NI	-	14.89	-	-	-	-	2.2276	0.12763	1.98E-27	↓
24	680.54602	C ₄₀ H ₇₅ NO ₈	M+H-H ₂ O	12.25	N - [(4E, 8Z) -1,3-dihidroxiocetadeca-4,8-dien-2-il] hexadecanamida 1-glucosídeo	Glicosfingolípídeo	1	HMDB 0034623	2.2263	0.19255	2.46E-27	↓
25	481.01627	NI	-	12.79	-	-	-	-	2.2169	15.961	1.09E-26	↑

NI: Não identificado.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O metabólito mais importante para discriminar os grupos de amostras de água do tratamento e negativo de 7 dias foi m/z 423,27489, um metabólito regulado positivamente classificado como ácido biliar. É importante observar que a eliminação do colesterol do organismo ocorre principalmente por sua conversão em ácido biliar no fígado, em que as enzimas CYP450 CYP7A1, CYP39A1 e CYP7B1 desempenham um papel central (RENDIC E GUENGERICH, 2018). As enzimas CYP do *zebrafish* compartilham uma relação ortóloga com essas enzimas CYPs humanas (GOLDSTONE *et al.* 2010), indicando que o metabolismo do colesterol do *zebrafish* pelo CYP450 pode ser semelhante ao dos humanos. Em seguida, podemos observar uma regulação negativa dos triglicerídeos e do ácido tetracosanodioico, um ácido graxo. Isso pode estar associado ao acúmulo de triglicerídeos no fígado e, posteriormente, a um aumento dos lipídeos intra-hepáticos, o que causaria disfunção mitocondrial com estresse oxidativo e produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, além de induzir estresse do retículo endoplasmático (ER), todos levando à inflamação hepática (QIN *et al.*, 2020).

Essa hipótese se destaca devido à suprarregulação do metabólito CoA-20-COOH-18-oxo-LTE4 gerado a partir da oxidação do lipídeo leucotrieno E4 (LTE4). O LTE4 é sintetizado por meio da atividade da enzima 5S-lipoxigenase do ácido araquidônico (ADEL *et al.*, 2016) e é um eicosanoide bem caracterizado como mediador lipídico envolvido em respostas inflamatórias e outros processos patológicos (ZARINI *et al.*, 2014).

Algumas acilcarnitinas foram atribuídas e desempenham um papel crucial no transporte de ácidos graxos do citoplasma para a mitocôndria para a beta-oxidação, gerando energia. Além disso, sugerimos a atribuição de 4'-fosfopantotenoilcisteína que é um intermediário na conversão de pantotenato em coenzima A (LEONARDI *et al.*, 2005). A suprarregulação desse composto é notável, pois mostra um impacto direto na geração de energia e no metabolismo lipídico (TAHILIANI E BEINLICH, 1991; GATTA *et al.*, 2009).

Além dos esfingolipídeos, especificamente a esfingomielina e a N-araquidonoilsfinganina também foram importantes para discriminar entre os grupos tratamento e negativo. Os esfingolipídios são uma classe de lipídios bioativos que medeiam processos fisiológicos e fisiopatológicos e podem ter efeitos opostos; esfinganinas são consideradas pró-apoptóticas e podem mediar apoptose, parada de crescimento e senescência. Em contraste, a esfingomielina está ligada ao crescimento e adesão celular (ADADA *et al.*, 2015; CUNHA *et al.*, 2021; GARCÍA-ARRIBAS *et al.*, 2015). Uma vez que as esfingomielinas são sintetizadas pela transferência de fosforilcolina de fosfatidilcolina para uma ceramida em uma reação catalisada pela esfingomielina sintetase, a regulação positiva de N-araquidonoilsfinganina associada à regulação negativa de esfingomielina sugere produção de ceramida comprometida

no agrupamento tratamento. Além disso, um glicosfingolípideo também foi regulado negativamente. Esta subclasse de esfingolípideos contém uma porção de sacarídeo glicosidicamente ligada à base esfingoide. Desse modo, sugere que a interrupção do esfingolípido pode prejudicar a produção de glicosfingolípídios, levando a alterações mais amplas do metabolismo lipídico.

Alterações lipídicas em peixes foram associadas à exposição a xenobióticos (REBELO *et al* 2020; ZIARRUSTA *et al.*, 2018), incluindo carbendazim (EZEYILI *et al*, 2019; JIANG *et al.*, 2015; SAKR E SHALABY, 2014). Um estudo anterior realizado com *zebrafish* adultos mostrou que a exposição ao carbendazim afetou o metabolismo dos glicolípideos e o metabolismo da desintoxicação no fígado (BAO *et al.*, 2020). Considerando isso, em concentrações próximas a 100 µg/L na água, nossos resultados sugerem uma desregulação do metabolismo lipídico em *Zebrafish* adultos após a exposição ao carbendazim por meio da análise metabolômica da água do aquário.

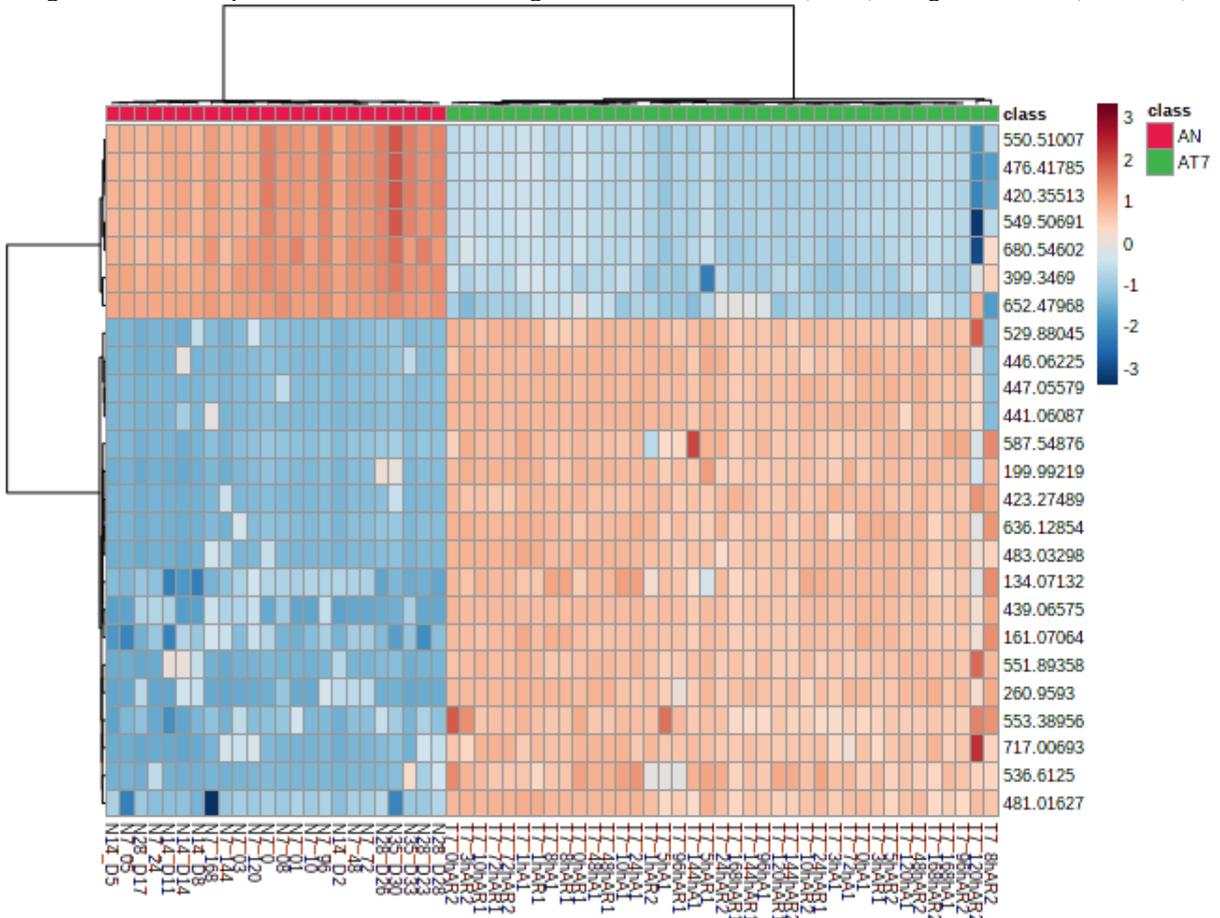
Além disso, também sugerimos metabólitos relacionados à biotransformação do carbendazim para discriminar entre agrupamentos de tratamento e negativo. O metabólito em m/z 161,0544 foi produzido a partir da reação de O-desalquilação, que é uma reação de oxidação realizada pelas enzimas CYPs do *Zebrafish* (GOLDSTONE *et al* 2010). Além disso, o metabólito em m/z 134,07132 corresponde ao metabólito 2-AB já relatado neste estudo. Esses metabólitos podem ser usados para garantir a detectabilidade e aumentar a confiança no monitoramento da exposição ao carbendazim.

Embora VIPs sugiram outros metabólitos importantes para discriminar entre grupos, eles não puderam ser identificados. Alguns deles são metabólitos presentes em concentrações muito baixas nas amostras, dificultando a atribuição de sua fórmula molecular. Outros metabólitos tiveram suas fórmulas moleculares determinadas, embora não tenham sido identificados. Como os metabólitos do carbendazim relatados na literatura e o MS-FINDER foram usados e, ainda assim, esses metabólitos não puderam ser identificados, isso sugere que eles podem ser novos metabólitos. Além disso, vários deles mostraram um alto tempo de retenção (> 13,0 min) que se relaciona a metabólitos altamente apolares, provavelmente metabólitos lipídicos, uma vez que outros metabólitos lipídicos foram atribuídos. É importante notar que esses metabólitos devem ser caracterizados posteriormente para melhorar o monitoramento da exposição ao carbendazim e para avaliar o risco de exposição.

Além disso, como forma de corroborar os dados apresentados acima, os dados podem ser visualizados através de um mapa de calor (*heatmap*) (Figura 28), que consiste na combinação de um agrupamento hierárquico (*Hierarchical Clustering*) com o VIP, que

relaciona as variáveis, sendo esta uma ferramenta importante para a diferenciação dos íons em análises metabolômicas (KHAKIMOV *et al.*, 2015; MARACHIN *et al.*, 2017).

Figura 28 –Heatmap referente às amostras de água do tratamento 7 dias (verde) e negativo 7 dias (vermelho).



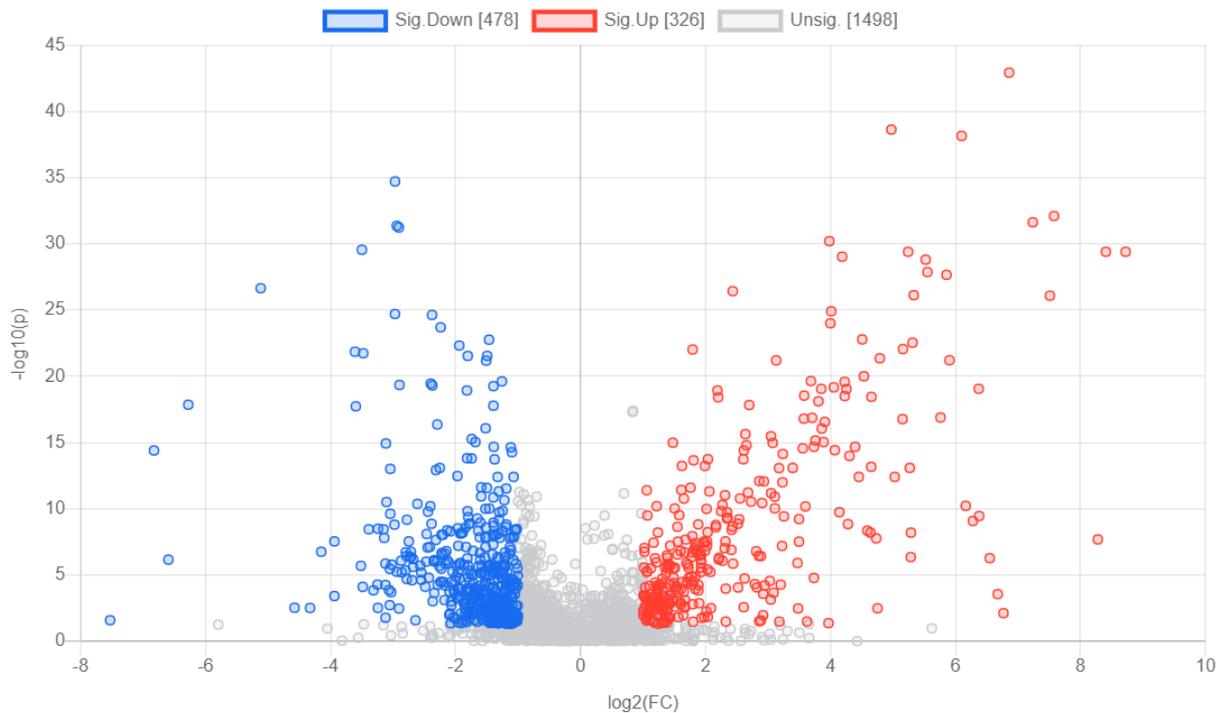
Fonte: MetaboAnalyst 5.0 (2022).

O *heatmap* acima relaciona as amostras dos grupos tratamento e negativo com os metabólitos, apontando as concentrações relativas dos metabólitos em relação aos grupos. De forma que tons vermelhos representam os acréscimos e tons azuis os decréscimos e, quanto mais intensa a cor, mais expressivos são os resultados. Observa-se ainda, que para os sete primeiros metabólitos houve um decréscimo em concentração para o grupo tratamento em relação ao controle negativo, enquanto que para os demais ocorreu o contrário, corroborando os dados apresentados anteriormente na Figura 27 e na Tabela 7.

Foi aplicado, ainda, o método *volcano plot* o qual se trata de um gráfico de dispersão que apresenta a significância estatística e a magnitude da acumulação diferencial, onde os metabólitos mais induzidos se encontram demonstrados a direita enquanto os reprimidos a esquerda. E quanto mais ao topo mais estatisticamente significativos eles são para a separação

dos grupos (BATUT *et al*, 2018). Observa-se na Figura 29 que 478 metabólitos foram diminuídos no grupo tratamento em relação ao negativo enquanto 326 foram aumentados.

Figura 29 – *Volcano plot* referente às amostras de água do tratamento 7 dias demonstrando os metabólitos que foram aumentados (vermelho) e diminuídos (azul).



Fonte: MetaboAnalyst 5.0 (2022).

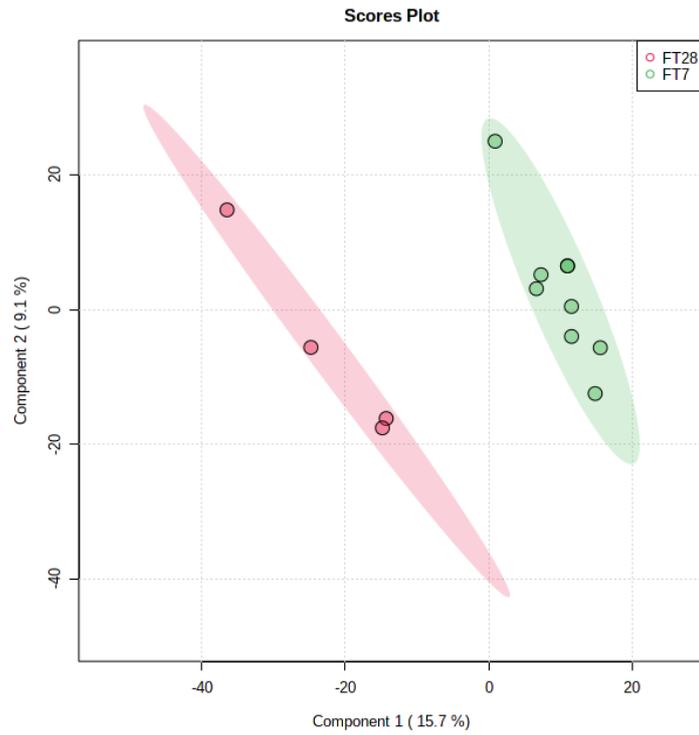
5.6.2. Amostras de Fígado

As amostras de fígado foram analisadas por LC-HRMS e então os dados brutos foram processados na plataforma *MetaboAnalyst 5.0*. Os dados foram agrupados para o processamento, de forma que inicialmente as amostras de fígado do tratamento de 7 dias foram comparadas às amostras de fígado do tratamento de 28 dias.

A análise estatística foi empregada através dos seguintes métodos: Análise por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA), *fold change*, *heatmap*, *volcano plot* e *pathway analysis*.

A PLS-DA por meio de suas duas componentes principais, explicou 24,8% da variância total e apresentou valores de Q^2 e R^2 de 0,43614 e 0,98069 respectivamente (Figura 30).

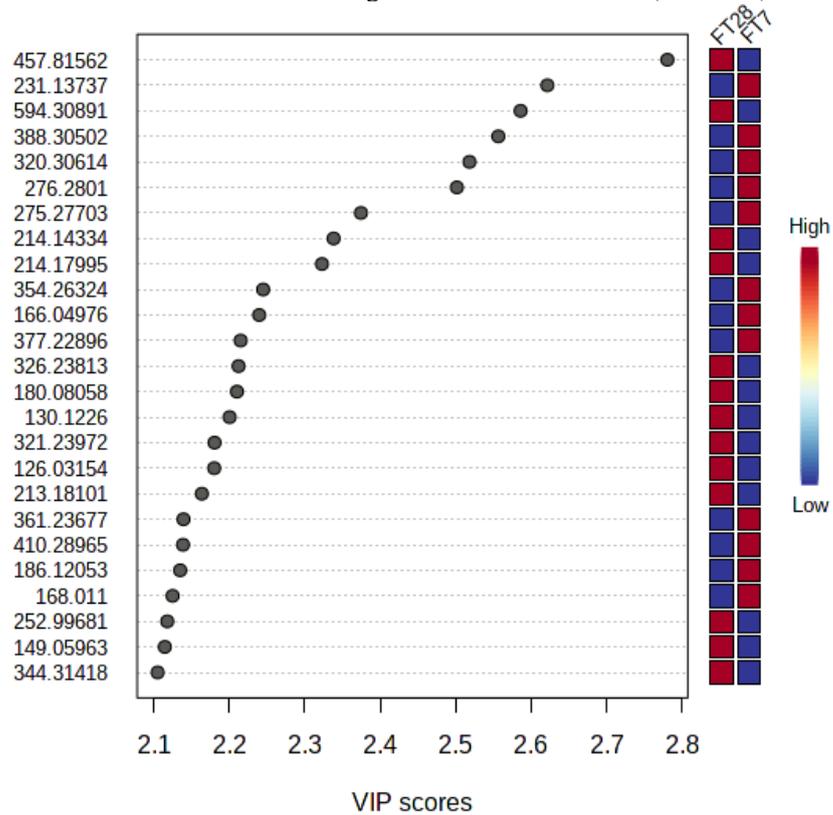
Figura 30– Análise estatística PLS-DA 2D referente às amostras de fígado do tratamento 7 dias (verde) e 28 dias (vermelho).



Fonte: MetaboAnalyst 5.0 (2022).

Os metabólitos foram ranqueados utilizando o Índice de Importância Variável – VIP (do inglês, *Variable Importance in Projection*), de forma que nas amostras foram identificadas 296 variáveis (metabólitos) importantes para a separação dos grupos no PLS, e dado o número elevado de variáveis, foram consideradas apenas as 25 principais (Figura 31).

Figura 31 - VIP Scores referentes às amostras de fígado do tratamento 7 dias (vermelho) e 28 dias (azul).



Fonte: MetaboAnalyst 5.0 (2022).

A respeito das concentrações relativas dos metabólitos em relação aos grupos de análise. Observa-se na Figura 31 anterior, através das colunas coloridas, que dos 25 metabólitos analisados, 12 foram aumentados e 13 foram diminuídos no grupo tratamento de 7 dias em relação ao de 28 dias.

Na Tabela 8 abaixo sugere-se a identidade dos 25 metabólitos identificados.

Tabela 8 - Metabólitos diferencialmente abundantes.

Item	m/z	Fórmula Molecular	Aduto	RT (min)	Composto	Descrição	Erro (ppm)	ID	VIP	Fold Change	p-value	Abundância
1	457.8156	C ₄₈ H ₉₄ NO ₁₀ P	M+H+K	8,89	PS (18: 0/24: 0)	Fosfolípideo	1,0	HMDB0112384	2.7804	0.12844	1.03E-09	↓
2	231.1374	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	M+H	8,91	(2E, 8Z) -Decadieno-4,6-diin-1-il 3-metilbutanoato	Éster de álcool graxo	2,0	HMDB0035425	2.6214	14.653	4.64E-06	↑
3	594.3089	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	M+DMSO+H	8,82	Ácido tauro-b-muricólico	Ácido biliar	7,0	HMDB0000932	2.5859	0.1162	1.10E-05	↓
4	388.305	C ₁₈ H ₃₃ NO ₄	M+IsoProp+H	9,17	Ácido (9E) -10-nitrooctadecenóico	Molécula lipídica de ácido graxo	3,0	HMDB0062737	2.5564	2.2407	2.06E-05	↑
5	320.3061	C ₄₄ H ₇₈ O ₂	M+2H	8,82	CE (17: 0)	Éster de ácido graxo de colesterol	4,0	HMDB0060059	2.5182	7.7529	4.18E-05	↑
6	276.2801	C ₃₁ H ₆₄ O ₂	M+2ACN+2H	8,81	Eritro-8,10-Hentriacontanodiol	Álcool graxo	3,0	HMDB0031277	2.5015	3.0403	5.54E-05	↑
7	275.277	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	M+H-2H ₂ O	8,82	Ácido paulínico	Ácido graxo de cadeia longa	9,0	HMDB0035159	2.3744	5.8981	-	↑
8	214.1433	C ₂₃ H ₄₂ O ₄	M+2Na	13,67	MG (20: 2 (11Z, 14Z) / 0: 0/0: 0)	Monoacilglicerídeo	0,0	HMDB0011574	2.3382	0.29179	-	↓
9	214.18	NI	-	8,13	-	-	-	-	2.3227	0.15384	-	↓
10	354.2632	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	M+NH ₄ -H ₂ O	9,65	8-isoprostaglandina E1	Lipídio	0,0	HMDB0004686	2.2448	6.0913	-	↑
11	166.0498	NI	-	6,55	-	-	-	-	2.2396	2.9672	-	↑
12	377.229	NI	-	9,36	-	-	-	-	2.215	5.2901	-	↑
13	326.2381	C ₅₆ H ₁₀₁ NO ₁₀ P	M+3H	10,83	PC (DiMe (13,5) / DiMe (13,5))	Fosfatidilcolina (glicerofosfolípideo)	2,0	HMDB0061410	2.2122	2.5863	-	↓
14	180.0806	NI	-	5,79	-	-	-	-	2.21	0.17508	-	↓
15	130.1226	C ₇ H ₁₂ O	M+NH ₄	13,19	Trans-2-trans-4-heptadien-1-ol	Álcool graxo	0,0	HMDB0032301	2.2003	0.09765	-	↓
16	321.2397	C ₃₆ H ₆₈ O ₆	M+2Na	10,97	TG (8: 0 / i-12: 0 / a-13: 0) [rac]	Triglicerídeo	1,0	HMDB0071223	2.1804	0.14772	-	↓
17	126.0315	C ₄ H ₉ NO	M+K	13,77	Butiramida	Amida graxa	1,0	HMDB0033870	2.1799	0.38677	-	↓
18	213.181	NI	-	13,80	-	-	-	-	2.1635	3.162	-	↓
19	361.2368	NI	-	9,30	-	-	-	-	2.1392	5.9684	-	↑
20	410.2897	C ₃₉ H ₇₀ NO ₇ P	M+3ACN+2H	9,74	Cortol	Hidroxiesteroide	5,0	HMDB0011346	2.1386	6.2807	-	↑
21	186.1205	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	M+2ACN+2H	7,11	2-hidroxiestradiol	Estrogênio	2,0	HMDB0000338	2.1348	9.0255	-	↑

Item	m/z	Fórmula Molecular	Aduto	RT (min)	Composto	Descrição	Erro (ppm)	ID	VIP	Fold Change	p-value	Abundância
22	168.011	C ₁₁ H ₁₄ O ₇ S	M+2Na	4,64	Ácido 4-hidroxi-5- (3'-hidroxifenil) -valérico-3'-O-sulfato	Ácido graxo sulfatado	7,0	HMDB0059975	2.1248	19.969	-	↑
23	252.9968	NI	-	8,71	-	-	-	-	2.1177	-	-	↓
24	149.0596	C ₉ H ₁₀ O ₃	M+H-H ₂ O	13,81	Etil 2-furanacrilato	Éster de ácido graxo	5,0	HMDB0041611	2.1145	0.21054	-	↓
25	344.3142	C ₂₀ H ₄₀ O ₄	M+NH ₄ -H ₂ O	12,62	MG (0: 0 / a-17: 0/0: 0) [rac]	Lípídeo glicerolípídico	3,0	HMDB0072848	2.105	7.3737	-	↓

NI: Não identificado.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O metabólito mais importante para discriminar entre o agrupamento de foi m/z 457.8156, um metabólito suprarregulado supostamente atribuído como um fosfolipídeo. Alterações fosfolipídicas já foram relatadas em outros estudos como consequência da exposição ao carbendazim (COSTA *et al.* 2008; STRONG *et al.* 2016; GASPER *et al.* 2009). Um estudo anterior com células epiteliais do rim A6 de anfíbios (*Xenopus laevis*) expostas ao carbendazim demonstrou alterações nos lipídeos como um indicativo de um efeito significativo nas membranas celulares, incluindo a bicamada fosfolipídica (STRONG *et al.* 2016). Os autores também sugeriram que tais alterações são indicativas de peroxidação lipídica, que pode alterar a estrutura da membrana e sua integridade (STRONG *et al.* 2016). A peroxidação lipídica já foi relatada em peixes da espécie *Chanos chanos* devido à exposição ao carbendazim (PALANIKUMAR 2014).

Nossos resultados também apontam para um aumento do ácido biliar (m/z 594.3089) no fígado de animais expostos por 28 dias em comparação aos expostos por 7 dias. Isso confirma os resultados encontrados na abordagem metabolômica para amostras de água que mostraram uma regulação positiva para ácidos biliares. Tal aumento de ácido biliar no fígado dos animais expostos por 28 dias em relação aos expostos por 7 dias, sugere uma desregulação do metabolismo lipídico ao longo do tempo de exposição.

Além disso, os ácidos graxos foram regulados negativamente nas amostras de 28 dias, enquanto o triglicerídeo foi regulado positivamente, sugerindo acúmulo de triglicerídeos no fígado e, posteriormente, um aumento no lipídeo intra-hepático. Alterações lipídicas em peixes têm sido associadas à exposição a xenobióticos, incluindo carbendazim (EZEYILI *et al.* 2019; JIANG *et al.* 2015; REBELO *et al.* 2020; SAKR *et al.* 2014; ZIARRUSTA *et al.* 2018). Ademais, o aumento de triglicerídeos e lipídeos intra-hepáticos foi demonstrado após a exposição ao carbendazim (FARAG *et al.* 2011; JIN *et al.* 2015). Considerando isso, nossos resultados sugerem comprometimento do metabolismo lipídico em *Zebrafish* adulto após exposição ao carbendazim através da análise metabolômica do tanque de água e do fígado.

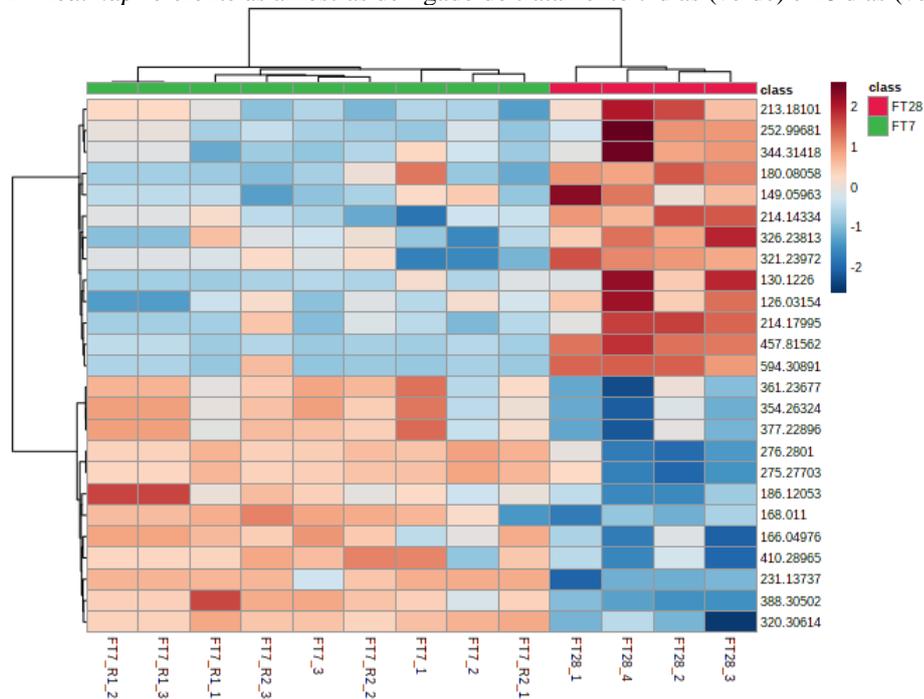
Outra importante alteração observada foi a desregulação do estrogênio nas amostras de 28 dias. Tais resultados sugerem que o carbendazim pode ser capaz de promover desrupção endócrina. Essa possível desregulação endócrina pelo carbendazim foi relatada em outros estudos, que relataram danos no receptor de estrogênio e alterações no sistema reprodutivo (LIU *et al.* 2019; RAMA *et al.* 2014).

Embora VIPs sugiram outros metabólitos importantes para discriminar, eles não puderam ser identificados. Alguns deles eram metabólitos menores nas amostras, dificultando a atribuição de sua fórmula molecular. Outros metabólitos tiveram suas fórmulas moleculares

determinadas, embora não tenham sido anotadas putativamente. Uma vez que ambos os metabólitos do carbendazim relatados na literatura e o MS-FINDER foram usados, e ainda assim esses metabólitos não puderam ser identificados, isso sugere que eles podem ser novos metabólitos. Além disso, vários deles mostraram um alto tempo de retenção ($> 9,0$ min) relacionado a metabólitos altamente apolares, provavelmente um metabólito lipídico, uma vez que outros metabólitos lipídicos foram atribuídos putativamente. É importante notar que esses metabólitos devem ser caracterizados para melhorar o monitoramento da exposição ao carbendazim e avaliar o risco de exposição.

Por fim, foi empregado também o *heatmap*, o qual relaciona as amostras dos grupos tratamento de 7 e 28 dias com os metabólitos, apontando as concentrações relativas dos metabólitos em relação aos grupos. Observa-se que para os treze primeiros metabólitos houve um decréscimo em concentração para o grupo tratamento de 7 dias em relação ao de 28 dias, enquanto que para os demais ocorreu o contrário, corroborando os dados apresentados anteriormente.

Figura 32 –*Heatmap* referente às amostras de fígado do tratamento 7 dias (verde) e 28 dias (vermelho).



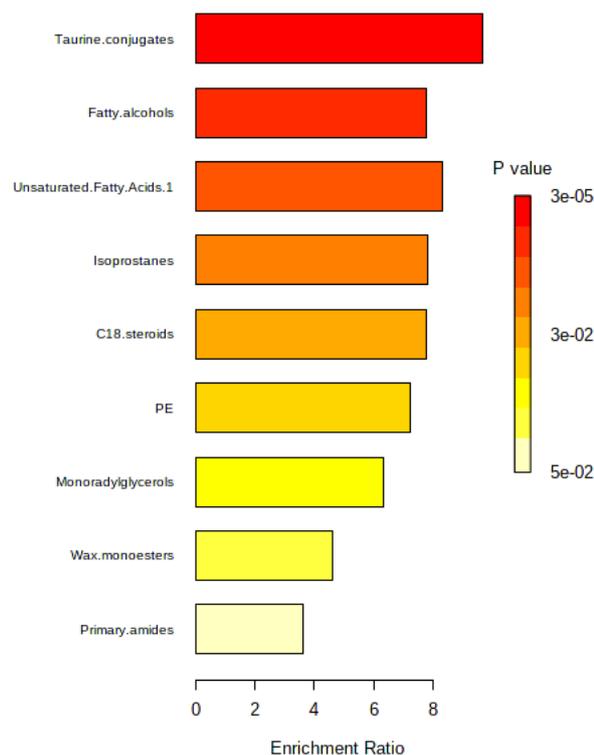
Fonte: MetaboAnalyst 5.0 (2022).

5.7. Alterações nas vias metabólicas e biomarcadores de exposição ao carbendazim por análise de amostras de fígado de *Zebrafish*

Os estudos metabolômicos atuais podem ser focados na compreensão de processos biológicos e na identificação de biomarcadores. A análise de enriquecimento do conjunto de metabólitos (MSEA) geralmente é empregada para compreender os processos biológicos envolvidos nas condições de interesse, enquanto a análise de biomarcadores de metabólitos pode identificar marcadores de exposição (CHONG *et al.* 2019).

Assim, as variáveis estatisticamente significativas para discriminar o fígado de *zebrafish* exposto por 7 dias em relação ao fígado do animal exposto por 28 dias foram ainda utilizadas para MSEA (Figura 33). A significância da relação entre a lista de metabólitos e uma determinada via é indicada por uma razão correspondente ao número de entradas de metabólitos por via dividido pelo número total de metabólitos que constituem a via e um valor p ($< 0,05$). A análise de enriquecimento destacou que o tempo de exposição ao carbendazim altera diferencialmente o metabolismo lipídico (conjugados de taurina, álcoois graxos, ácidos graxos insaturados, isoprostanos, esteroides C18, fosfatidiletanolamina (PE), monoradilgliceróis, monoésteres de cera) e metabolismo de amidas primárias.

Figura 33 - Visão geral do enriquecimento do conjunto de metabólitos.
Metabolite Sets Enrichment Overview



Fonte: MetaboAnalyst 5.0 (2022).

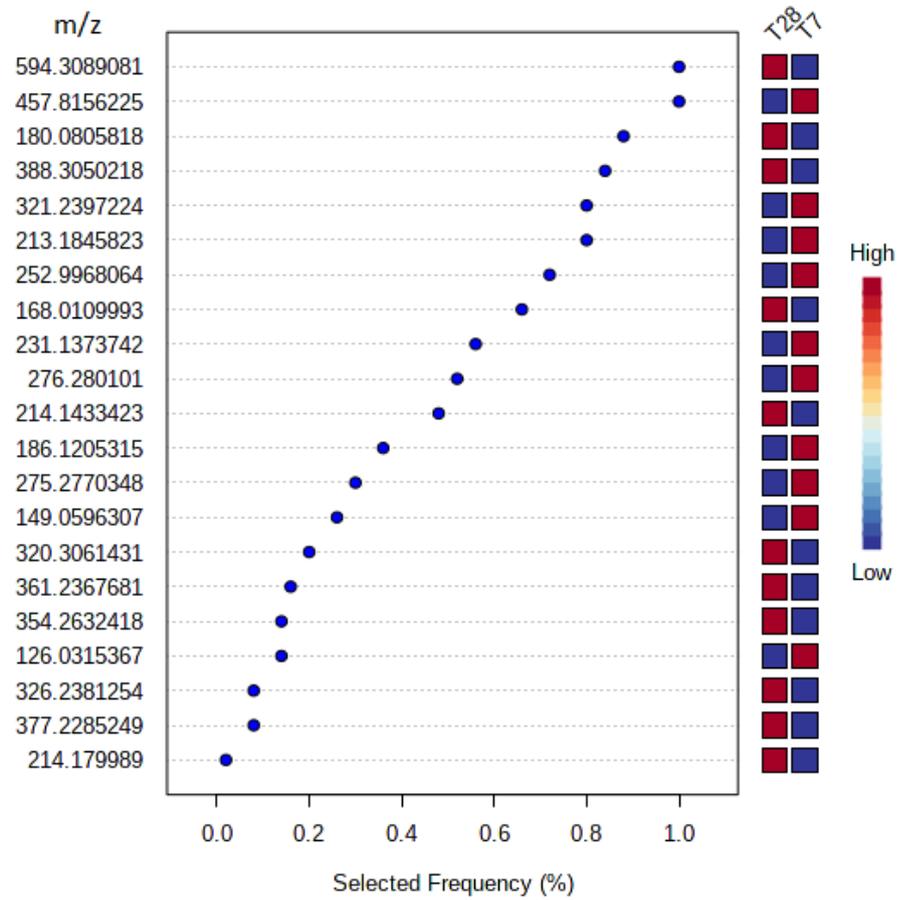
Após isso, procedeu-se a uma análise de biomarcadores metabólitos e como um biomarcador promissor deve ter alta sensibilidade e alta especificidade, uma curva característica de operação do receptor (ROC) foi desenvolvida para avaliar essas questões. A área sob a curva ROC (AUC) é uma medida robusta para comparar o desempenho de biomarcadores: uma área de 1 significa um biomarcador promissor e uma área de 0,5 significa que o biomarcador não é adequado. Aqui, observamos (Tabela 9) AUC de 1 para metabólitos em m/z 457.8156225, m/z 594.3089081, m/z 388.3050218, m/z 320.30614, m/z 276.28010, m/z 321.23972, m/z 213.18458, m/z 252.99680, que podem ser biomarcadores para o tempo de exposição do carbendazim. No entanto, apenas os metabólitos m/z 457.8156225 (fosfolipídeo) e m/z 594.3089081 (ácido biliar) foram detectados em todas as amostras de fígado pertencentes ao grupo de 28 dias (Figura 34), uma vez que sempre foram selecionados no modelo. Portanto, ambos os metabólitos são biomarcadores potenciais para determinar a exposição ao carbendazim.

Tabela 9 - Área sob a curva da característica de operação do receptor (ROC)

Item	m/z	AUC	P value	FC	clusters
1	457.8156225	1	5.36E-12	2.5019	1
2	594.3089081	1	3.44E-05	2.7494	1
3	388.3050218	1	1.90E-05	-8.1674	4
4	320.3061431	1	0.000285513	-3.4355	4
5	276.280101	1	9.93E-05	-3.3366	4
6	321.2397224	1	0.005136434	2.6206	2
7	213.1845823	1	2.69E-06	1.4035	1
8	252.9968064	1	2.88E-05	0.27677	1

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Figura 34 - Biomarcadores potenciais para determinar a exposição ao carbendazim.



Fonte: MetaboAnalyst 5.0 (2022).

Metabólitos endógenos são conhecidos por serem sensíveis a perturbações ambientais (JOHNSON E GONZALEZ 2012). Portanto, os metabólitos endógenos desregulados podem ser usados como biomarcadores de exposição.

6. CONCLUSÕES

O carbendazim se encontra presente no meio ambiente e a exposição crônica mesmo em baixas doses ao longo da vida é uma realidade. Este estudo aplicou a análise da água do aquário, no qual *zebrafish* adulto foi exposto ao carbendazim para avaliação dos metabólitos alvo do carbendazim como uma abordagem promissora, uma vez que é uma matriz muito mais limpa do que as matrizes biológicas usuais. Assim, esta abordagem pode ser potencialmente aplicada à avaliação de outros xenobióticos, especialmente aqueles ambientalmente relevantes que podem estar presentes em matrizes aquáticas que afetam espécies não-alvo, como peixes.

Em suma, foram observadas diferenças significativas entre os grupos de 7 dias (tratamento, estabilidade e negativo) em relação ao metabolismo do carbendazim nas amostras de água. No grupo tratamento, o carbendazim apresentou decréscimo ao longo do tempo, enquanto que os metabólitos 5-HBC e 2-AB foram formados rapidamente. O 5-HBC-S teve seu surgimento proporcional ao decréscimo do 5-HBC, uma vez que o primeiro é formado por meio da reação de sulfatação do metabolismo de fase II na hidroxila do 5-HBC. No ensaio de estabilidade observou-se apenas o metabólito 2-AB, o qual pode ser formado por degradação abiótica através da fotólise. Enquanto que o grupo negativo não apresentou metabólitos.

Os metabólitos supostamente atribuídos, principalmente 5-HBC e 5-HBC-S, podem ser usados como potenciais alvos analíticos e podem permitir o monitoramento da exposição ao carbendazim. Ficou evidente que a geração de metabólitos pelo *zebrafish* começa após 8 h e a maior quantidade de metabólitos produzidos ocorre após 120 h, com uma geração máxima em 168 h após a exposição. Portanto, esses metabólitos podem garantir a detectabilidade e fortalecer ainda mais a confiança no monitoramento da exposição ao carbendazim em um curto período após a exposição ou mesmo após um período mais longo, até uma semana.

Sugere-se também que o carbendazim seja capaz de bioacumular no fígado dos animais uma vez que apesar do período de depuração realizado ao final do experimento, o agrotóxico não apresentou decréscimo quando se compara as amostras de 28 e 35 dias.

Além disso, o estudo teve como objetivo avaliar as consequências para o *Zebrafish* adulto exposto a este agrotóxico analisando amostras de água e amostras de fígado por abordagem metabolômica. Os resultados sugerem comprometimento do metabolismo lipídico com consequente aumento de lipídeos intra-hepáticos e desrupção endócrina. Foi possível, também, sugerir dois metabólitos endógenos como potenciais biomarcadores para determinar a exposição ao carbendazim. Por fim, os resultados mostram que é possível usar a água do aquário para avaliar a desregulação de metabólitos endógenos seguido de uma compreensão dos efeitos biológicos.

Espera-se, que os dados aqui apresentados forneçam informações que possam fomentar a necessidade de políticas públicas que priorizem o uso seguro de agrotóxicos para a população e para o meio ambiente, bem como incentive o desenvolvimento de pesquisas para demais substâncias que ofereçam riscos à saúde pública.

REFERÊNCIAS

ADADA, Mohamad; LUBERTO, Chiara; CANALS, Daniel. Inhibitors of the sphingomyelin cycle: Sphingomyelin synthases and sphingomyelinases. **Chemistry and physics of lipids**, v. 197, p. 45-59, 2016.

ADEJARE, Adeboye; BROWN, Paul W. Hydrogen/deuterium exchange to differentiate fragment ions from pseudomolecular ions by electrospray tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 8, p. 1525-1529, 1997.

ADEL, Susan et al. The lipoxygenase pathway in zebrafish. Expression and characterization of zebrafish ALOX5 and comparison with its human ortholog. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1861, n. 1, p. 1-11, 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Painel de Monografias de Agrotóxicos. 2022. Disponível em:<<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiMjBmMmM4ZDgtNTA5Yy00MWRiLTk2NjUtODYwM2JkMTY1YzgxIiwidCI6ImI2N2FmMjNmLWMzZjMtNGQzNS04MGM3LWI3MDg1ZjVIZGQ4MSJ9>> Acesso em: Junho 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA). **Diário Oficial da União**, 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, 2003.

ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, B.; PRIEGO-CAPOTE, F.; DE CASTRO, MD Luque. Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 111-119, 2010.

ANSELMO, Carina et al. Is zebrafish (Danio rerio) a tool for human-like metabolism study?. **Drug Testing and Analysis**, v. 9, n. 11-12, p. 1685-1694, 2017.

ANSELMO, Carina et al. Zebrafish (Danio rerio): a valuable tool for predicting the metabolism of xenobiotics in humans?. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 212, p. 34-46, 2018.

APVMA (Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority). Chemical Review Program. **Human Health Risk Assessment of Carbendazim**, December 2009.

BAO, Zhiwei et al. Sub-chronic carbendazim exposure induces hepatic glycolipid metabolism disorder accompanied by gut microbiota dysbiosis in adult zebrafish (Danio rerio). **Science of The Total Environment**, v. 739, p. 140081, 2020.

BARBAS, C.; MORAES, Edgar P.; VILLASENOR, A. Capillary electrophoresis as a metabolomics tool for non-targeted fingerprinting of biological samples. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 55, n. 4, p. 823-831, 2011.

BARBAZUK, W. Bradley et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. **Genome research**, v. 10, n. 9, p. 1351-1358, 2000.

BATUT, Bérénice et al. Community-driven data analysis training for biology. **Cell systems**, v. 6, n. 6, p. 752-758. e1, 2018.

BATEL, Annika et al. Microplastic accumulation patterns and transfer of benzo [a] pyrene to adult zebrafish (*Danio rerio*) gills and zebrafish embryos. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 918-930, 2018.

BELCHIOR, Diana Cléssia Vieira et al. Impactos de agrotóxicos sobre o meio ambiente e a saúde humana. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 34, n. 1, p. 135-151, 2017.

BOMBARDI, Larissa Mies. **Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia**. São Paulo, 2017.

BORSOI, Zilda Maria Ferrão; TORRES, Solange Domingo Alencar. A política de recursos hídricos no Brasil. 1997.

BRASIL, Brasília. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2015.

BRASIL. Decreto Nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Brasília, DF, 2002 [a].

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários. 2011.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Biblioteca Virtual em Saúde. Intoxicação por agrotóxicos, 11 set. 2015. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/dicas-em-saude/2084-intoxicacao-por-agrotoxicos>. Acesso em: 8 abr. 2021.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. Agrotóxicos na ótica do Sistema Único de Saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 2 v. :il

BRASIL. **Portaria de Consolidação Nº 5, de 28 de setembro de 2017**. Consolidação das normas sobre ações e serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0005_03_10_2017.html. Acesso em: 03 mar. 2021.

BRASIL. **Portaria GM/MS Nº 888, de 4 maio de 2021**. Ministério de Estado da Saúde, Brasília, DF, 2021.

BRASIL. Projeto de Lei n. 6.299 de 2002. Altera os arts 3º e 9º da Lei n. 7.802, de 11 de julho de 1989. Brasília, DF: Câmara dos Deputados, 2002 [b].

BRIDI, Daiane et al. Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. **Toxicology**, v. 392, p. 32-39, 2017.

BROWN, Marie et al. Mass spectrometry tools and metabolite-specific databases for molecular identification in metabolomics. **Analyst**, v. 134, n. 7, p. 1322-1332, 2009.

CARNEIRO, Fernando Ferreira et al. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. EPSJV/Expressão Popular, 2015.

CHONG, Jasmine; WISHART, David S.; XIA, Jianguo. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. **Current protocols in bioinformatics**, v. 68, n. 1, p. e86, 2019.

CONLEY, Justin M. et al. Rapid liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of a broad mixture of pharmaceuticals in surface water. **Journal of Chromatography A**, v. 1185, n. 2, p. 206-215, 2008.

CANUTO, Gisele AB et al. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, p. 75-91, 2018.

CHITESCU, Carmen Lidia et al. High sensitive multiresidue analysis of pharmaceuticals and antifungals in surface water using U-HPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS. Application to the Danube river basin on the Romanian territory. **Science of the total environment**, v. 532, p. 501-511, 2015.

CORNET, Carles; DI DONATO, Vincenzo; TERRIENTE, Javier. Combining zebrafish and CRISPR/Cas9: toward a more efficient drug discovery pipeline. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 703, 2018.

COSTA, Manoel L. et al. Cell adhesion in zebrafish myogenesis: distribution of intermediate filaments, microfilaments, intracellular adhesion structures and extracellular matrix. **Cell motility and the cytoskeleton**, v. 65, n. 10, p. 801-815, 2008.

COSTA, Monica J. et al. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 3, p. 153-163, 2008.

COUTINHO, Cláudia FB et al. Carbendazim e o meio ambiente: degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 16, 2006.

CROTTI, A. E. M. et al. LC-hyphenated techniques: Uses in the structural elucidation of low- and high molecular weight compounds. In: **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**. Research Signpost, 2006. p. 99-141.

CUNHA, Dulce Lima et al. REP1 deficiency causes systemic dysfunction of lipid metabolism and oxidative stress in choroideremia. **JCI insight**, v. 6, n. 9, 2021.

DA COSTA, Elizângela Pinheiro. Degradação de carbendazim em água por foto-Fenton solar em um fotorreator semipiloto do tipo RPR. 2017.

DAMMSKI, Ana Paula; MÜLLER, Bruno Roberto; GAYA, Carolina. Manual de Criação em Biotério. 1ª Edição, 2011.

DE FREITAS, André Devecchi; REGINO, Josueh Estevão Bartolomeu. A legislação para a quantidade permitida de agrotóxicos na água: os casos do Brasil e da União Europeia. **INFORME ECONÔMICO (UFPI)**, v. 41, n. 2, 2020.

DE RAAD, Markus; FISCHER, Curt R.; NORTHEN, Trent R. High-throughput platforms for metabolomics. **Current opinion in chemical biology**, v. 30, p. 7-13, 2016.

DONG, Michael W. **Modern HPLC for practicing scientists**. John Wiley & Sons, 2006.

DUCHARME, Nicole A. et al. Comparison of toxicity values across zebrafish early life stages and mammalian studies: Implications for chemical testing. **Reproductive Toxicology**, v. 55, p. 3-10, 2015.

DUNN, Warwick B.; ELLIS, David I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285-294, 2005.

ERIKSSON, Lennart et al. Design of experiments: Principles and applications (2008). **Third revised and enlarged edition**. Umetrics Academy, Sweden, 2008.

ESCALEIRA, Roberta. O Zebrafish (*Danio rerio*). **Arquivos Brasileiros de Medicina Naval**, v. 78, n. 1, p. 43-48, 2017.

EUROPEAN COMMISSION. Review report for the active substance carbendazim finalised in the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health at its meeting on 3 March 2006 in view of the inclusion of carbendazim. **Annex I of Directive 91/414/EEC**. Regulation, 2007.

EUROPEAN UNION. REGULATION (EC) No 1272/2008, de 16 dezembro 2008. **European Union: Official Journal of the European Union**, 31 de dezembro de 2008. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=celex%3A32008R1272>>. Acesso em: 25 de maio de 2021.

EZEYOILI, Ifeanyi Christian et al. Changes in brain acetylcholinesterase and oxidative stress biomarkers in African catfish exposed to carbendazim. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 31, n. 4, p. 371-379, 2019.

FANG, Hua et al. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. CBW capable of degrading carbendazim. **Biodegradation**, v. 21, n. 6, p. 939-946, 2010.

FARAG, Amina et al. Developmental toxicity of fungicide carbendazim in female mice. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 92, n. 2, p. 122-130, 2011.

FENN, John B. Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture). **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, n. 33, p. 3871-3894, 2003.

FERREIRA, Márcia. Multivariate qsar. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 6, p. 742-753, 2002.

- FERREIRA, Tanare Cambraia Ribeiro. **Identificação e pré-concentração dos produtos da fotodegradação de antimicrobianos**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- FERREIRA, Maria Leonor Paes Cavalcanti. A pulverização aérea de agrotóxicos no Brasil: cenário atual e desafios. **Revista de Direito Sanitário**, v. 15, n. 3, p. 18-45, 2014.
- FIEHN, Oliver. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. **Functional genomics**, p. 155-171, 2002.
- Food and Drug Administration. U.S. FDA. **Guidance Regulation**. 2012. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM292266.pdf>>. Acesso em Junho 2020.
- FUZZEN, Meghan LM; BERNIER, Nicholas J.; VAN DER KRAAK, Glen. Differential effects of 17 β -estradiol and 11-ketotestosterone on the endocrine stress response in zebrafish (*Danio rerio*). **General and comparative endocrinology**, v. 170, n. 2, p. 365-373, 2011.
- GARCÍA-ARRIBAS, Aritz B.; ALONSO, Alicia; GOÑI, Felix M. Cholesterol interactions with ceramide and sphingomyelin. **Chemistry and physics of lipids**, v. 199, p. 26-34, 2016.
- GASPAR, Simone Maria FS et al. Avaliação de risco de pesticidas aplicados no município de Arari, Maranhão, Brasil: base para programa de controle ambiental do rio Mearim. **Pesticidas: Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 15, 2005.
- GASPER, Régis et al. IR spectroscopy as a new tool for evidencing antitumor drug signatures. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1788, n. 6, p. 1263-1270, 2009.
- GATTA, Luisa Benerini et al. Inhibition of heme synthesis alters Amyloid Precursor Protein processing. **Journal of neural transmission**, v. 116, n. 1, p. 79-88, 2009.
- GOLDSTONE, Jared V. et al. Identification and developmental expression of the full complement of Cytochrome P450 genes in Zebrafish. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 1-21, 2010.
- HALL, Robert D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. **New phytologist**, v. 169, n. 3, p. 453-468, 2006.
- HAN, Lingxi et al. Adsorption and desorption of carbendazim and thiamethoxam in five different agricultural soils. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 102, n. 4, p. 550-554, 2019.
- HECK, Albert JR; VAN DEN HEUVEL, Robert HH. Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. **Mass spectrometry reviews**, v. 23, n. 5, p. 368-389, 2004.
- HERNÁNDEZ, F. et al. Use of time-of-flight mass spectrometry for large screening of organic pollutants in surface waters and soils from a rice production area in Colombia. **Science of the Total Environment**, v. 439, p. 249-259, 2012.

- HORAI, Hisayuki et al. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. **Journal of mass spectrometry**, v. 45, n. 7, p. 703-714, 2010.
- HOWE, Douglas G. et al. ZFIN, the Zebrafish Model Organism Database: increased support for mutants and transgenics. **Nucleic acids research**, v. 41, n. D1, p. D854-D860, 2012.
- IBAMA. **Ranking dos Agrotóxicos**. Disponível em: <<https://www.gov.br/pt-br>>. Acesso em: 26 maio 2021.
- INMETRO (2016). Orientação sobre validação de métodos analíticos.
- IRELAND, Christina M. et al. The interaction of benzimidazole carbamates with mammalian microtubule protein. **Biochemical pharmacology**, v. 28, n. 17, p. 2680-2682, 1979.
- IUPAC. **Carbendazim**. 2021. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/116.htm>>. Acesso em 20/05/2021.
- JEFFRYES, James G. et al. MINEs: open access databases of computationally predicted enzyme promiscuity products for untargeted metabolomics. **Journal of cheminformatics**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2015.
- JIANG, Jinhua et al. Carbendazim has the potential to induce oxidative stress, apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption during zebrafish larvae development. **Toxicology In Vitro**, v. 29, n. 7, p. 1473-1481, 2015.
- JIN, Yuanxiang et al. Oral exposure of mice to carbendazim induces hepatic lipid metabolism disorder and gut microbiota dysbiosis. **Toxicological Sciences**, v. 147, n. 1, p. 116-126, 2015.
- JOHNSON, Caroline H.; GONZALEZ, Frank J. Challenges and opportunities of metabolomics. **Journal of cellular physiology**, v. 227, n. 8, p. 2975-2981, 2012.
- KALOGRIDIS, Eleni-Chrysoula et al. Part I: Temporal and spatial distribution of multiclass pesticide residues in lake waters of Northern Greece: application of an optimized SPE-UPLC-MS/MS pretreatment and analytical method. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 12, p. 7239-7251, 2014.
- KALUEFF, Allan V.; STEWART, Adam Michael; GERLAI, Robert. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in pharmacological sciences**, v. 35, n. 2, p. 63-75, 2014.
- KANDA, Rakesh; GLENDINNING, Richard. Mass spectrometry for environmental and wastewater monitoring. **Spectroscopy Europe**, v. 23, n. 5, p. 14, 2011.
- KARP, Peter D.; CASPI, Ron. A survey of metabolic databases emphasizing the MetaCyc family. **Archives of toxicology**, v. 85, n. 9, p. 1015-1033, 2011.
- KANEHISA, Minoru et al. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. **Nucleic acids research**, v. 38, n. suppl_1, p. D355-D360, 2010.

KHAKIMOV, Bekzod; GÜRDENİZ, Gözde; ENGELSEN, Søren Balling. Trends in the application of chemometrics to foodomics studies. **Acta Alimentaria**, v. 44, n. 1, p. 4-31, 2015.

KUEHNBAUM, Naomi L.; BRITZ-MCKIBBIN, Philip. New advances in separation science for metabolomics: resolving chemical diversity in a post-genomic era. **Chemical reviews**, v. 113, n. 4, p. 2437-2468, 2013.

KUPPER, K. C. et al. *Bacillus subtilis* to biological control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum* under field conditions. **Scientia horticultrae**, v. 134, p. 139-143, 2012.

LANÇAS, Fernando M. *et al.* A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”. **Scientiachromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LANÇAS, Fernando M. **Cromatografia em fase gasosa**. Acta, 1993.

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

LEE, Keon Yong *et al.* Zebrafish models for functional and toxicological screening of nanoscale drug delivery systems: promoting preclinical applications. **Bioscience reports**, v. 37, n. 3, 2017.

LEENHEERS, L. H. *et al.* Determination of methyl 5-hydroxy-2-benzimidazole carbamate in urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 613, n. 1, p. 89-94, 1993.

LEONARDI, Roberta et al. Coenzyme A: back in action. **Progress in lipid research**, v. 44, n. 2-3, p. 125-153, 2005.

LEWIS, Kathleen A. *et al.* An international database for pesticide risk assessments and management. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 22, n. 4, p. 1050-1064, 2016.

LIESCHKE, Graham J.; CURRIE, Peter D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 5, p. 353-367, 2007.

LIU, Jing et al. Low dose carbendazim disrupts mouse spermatogenesis might be through estrogen receptor related histone and DNA methylation. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 176, p. 242-249, 2019.

LIM, Junghee; MILLER, Marion G. The role of the benomyl metabolite carbendazim in benomyl-induced testicular toxicity. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 401-410, 1997.

LIMA, João Fernando Muniz. Análise comparativa da legislação de agrotóxicos entre Brasil e União Europeia e os seus impactos comerciais. 2018.

LOO, Joseph A. Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying noncovalent macromolecular complexes. **International journal of mass spectrometry**, v. 200, n. 1-3, p. 175-186, 2000.

LOOTENS, Leen *et al.* uPA^{+/+}-SCID mouse with humanized liver as a model for in vivo metabolism of exogenous steroids: methandienone as a case study. **Clinicalchemistry**, v. 55, n. 10, p. 1783-1793, 2009.

LOPES, Carla Vanessa Alves; ALBUQUERQUE, Guilherme Souza Cavalcanti de. Desafios e avanços no controle de resíduos de agrotóxicos no Brasil: 15 anos do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, p. e00116219, 2021.

LUDWIG, Christian; GÜNTHER, Ulrich L. MetaboLab-advanced NMR data processing and analysis for metabolomics. **BMC bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2011.

MARCO-RAMELL, Anna *et al.* Evaluation and comparison of bioinformatic tools for the enrichment analysis of metabolomics data. **BMC bioinformatics**, v. 19, n. 1, p. 1-11, 2018.

KARLING, Bibiana. ESTUDO DA ADSORÇÃO DO CARBENDAZIM EM BANANA. **ANAIS DO ENIC**, v. 1, n. 3, 2011.

MASIÁ, Ana *et al.* Pesticide monitoring in the basin of Llobregat River (Catalonia, Spain) and comparison with historical data. **Science of the Total Environment**, v. 503, p. 58-68, 2015.

MAXIMIANO, Elizabete Maria; CARDOSO, Cláudia Andrea Lima; ARRUDA, Gilberto José. Detecção eletroquímica de carbendazim em sucos de frutas cítricas utilizando eletrodo de pasta de carbono. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 232-239, 2016.

MEUNIER, Robert. Stages in the development of a model organism as a platform for mechanistic models in developmental biology: Zebrafish, 1970–2000. **Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**, v. 43, n. 2, p. 522-531, 2012.

MORAES, Rodrigo Fracalossi. **Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória**. Texto para Discussão, 2019.

MORINAGA, Hidetaka *et al.* A benzimidazole fungicide, benomyl, and its metabolite, carbendazim, induce aromatase activity in a human ovarian granulosa-like tumor cell line (KGN). **Endocrinology**, v. 145, n. 4, p. 1860-1869, 2004.

MORRISON, Norman *et al.* Standard reporting requirements for biological samples in metabolomics experiments: environmental context. **Metabolomics**, v. 3, n. 3, p. 203-210, 2007.

MUNIZ, Marta Silva *et al.* Moxidectin toxicity to zebrafish embryos: bioaccumulation and biomarker responses. **Environmental Pollution**, p. 117096, 2021.

NAKAI, M. et al. Stage-specific effects of the fungicide carbendazim on Sertoli cell microtubules in rat testis. **Tissue and cell**, v. 34, n. 2, p. 73-80, 2002.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH *et al.* Final Report to OLAW on Euthanasia of Zebrafish. **Report of the ACLAM TasU Force on Rodent Euthanasia–2005**, 2009.

NIESSEN, Wilfried MA. **Liquid chromatography-mass spectrometry**. CRC press, 2006.

NORDSTRÖM, Anders; LEWENSOHN, Rolf. Metabolomics: moving to the clinic. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 4-17, 2010.

OECD, Test No. 305: bioaccumulation in fish: aqueous and dietary exposure. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section**, v. 3, 2012.

OECD, Test No. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section**, 2013.

PALMA, Graciela et al. Pesticide levels in surface waters in an agricultural–forestry basin in Southern Chile. **Chemosphere**, v. 57, n. 8, p. 763-770, 2004.

PELAEZ, Victor Manoel et al. A (des) coordenação de políticas para a indústria de agrotóxicos no Brasil. **Revista Brasileira de Inovação**, v. 14, p. 153-178, 2015.

PALANIKUMAR, L. et al. Toxicity, biochemical and clastogenic response of chlorpyrifos and carbendazim in milkfish *Chanos chanos*. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 3, p. 765-774, 2014.

PERES, Frederico; MOREIRA, Josino Costa. É veneno ou é remédio. **Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, v. 384, 2003.

PIGNATI, Wanderlei Antonio et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 3281-3293, 2017.

QIN, Jingyu et al. Long-term bisphenol S exposure aggravates non-alcoholic fatty liver by regulating lipid metabolism and inducing endoplasmic reticulum stress response with activation of unfolded protein response in male zebrafish. **Environmental Pollution**, v. 263, p. 114535, 2020.

QUARESMA, Amanda de Vasconcelos. Monitoramento de microcontaminantes orgânicos por métodos cromatográficos acoplados a espectrometria de massa e inorgânicos por fluorescência de pós-graduação em engenharia ambiental raios–x por reflexão total nas águas da Bacia do Rio Doce. 2014.

QUEIROZ, Ana Carolina Lanza *et al.* Programa Nacional de Vigilância em Saúde Ambiental Relacionada à Qualidade da Água para Consumo Humano (Vigiagua): lacunas entre a formulação do programa e sua implantação na instância municipal. **Saúde e Sociedade**, v. 21, n. 2, p. 465-478, 2012.

RAMA, Elkiane Macedo et al. Reproductive and possible hormonal effects of carbendazim. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 476-486, 2014.

REBELO, D.; CORREIA, A. T.; NUNES, B. Acute and chronic effects of environmental realistic concentrations of clofibric acid in *Danio rerio*: Behaviour, oxidative stress, biotransformation and lipid peroxidation endpoints. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 80, p. 103468, 2020.

RENDIC, Slobodan P.; PETER GUENGERICH, F. Human cytochrome P450 enzymes 5–51 as targets of drugs and natural and environmental compounds: mechanisms, induction, and inhibition–toxic effects and benefits. **Drug metabolism reviews**, v. 50, n. 3, p. 256-342, 2018.

Resolução Normativa CONCEA nº 34, de 27.07.2017 no anexo: **DIRETRIZ DA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA.**

RIBEIRO, Williame Farias. **Análise de traços do pesticida carbendazim por voltametria de onda quadrada com eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono.** 2009. Tese de Doutorado. Dissertação (mestrado). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa.

RIGOTTO, Raquel. Agrotóxicos, trabalho e saúde: vulnerabilidade e resistência no contexto da modernização agrícola no baixo Jaguaribe/CE. In: **Agrotóxicos, trabalho e saúde: vulnerabilidade e resistência no contexto da modernização agrícola no baixo Jaguaribe/CE.** 2011. p. 613-613.

ROBERTSON, Donald G.; WATKINS, Paul B.; REILY, Michael D. Metabolomics in toxicology: preclinical and clinical applications. **Toxicologicalsciences**, v. 120, n. suppl_1, p. S146-S170, 2011.

RODRIGUES, Keila Letícia Teixeira. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação simultânea de microcontaminantes emergentes em águas superficiais por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. 2012.

SAKR, Saber A.; SHALABY, Somaya Y. Carbendazim-induced testicular damage and oxidative stress in albino rats: ameliorative effect of licorice aqueous extract. **Toxicology and Industrial Health**, v. 30, n. 3, p. 259-267, 2014.

SARDELA, V. F. et al. Comprehensive analysis by liquid chromatography Q-Orbitrap mass spectrometry: Fast screening of peptides and organic molecules. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 53, n. 6, p. 476-503, 2018.

SILAMBARASAN, Sivagnanam; ABRAHAM, Jayanthi. Biodegradation of carbendazim by a potent novel *Chryseobacterium* sp. JAS14 and plant growth promoting *Aeromonas caviae* JAS15 with subsequent toxicity analysis. **3 Biotech**, v. 10, n. 7, p. 1-14, 2020.

SILVA, Renato C.; BARROS, Karina A.; PAVÃO, Antonio C. Carcinogenicidade do carbendazim e seus metabólitos. **Química Nova**, v. 37, n. 8, p. 1329-1334, 2014.

SILVEIRA, Themis Reverbel da; SCHNEIDER, Ana Claudia; HAMMES, Thais Ortiz. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2, p. 4-5, 2012.

SIMPSON, Myrna J.; MCKELVIE, Jennifer R. Environmental metabolomics: new insights into earthworm ecotoxicity and contaminant bioavailability in soil. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 394, n. 1, p. 137-149, 2009.

SOUZA, Larissa Camapum. Análise da Legislação Sobre Agrotóxicos no Brasil: Regulação ou Desregulação do Controle do Uso?. **Revista Jurídica da Escola Superior do Ministério Público de São Paulo**, v. 11, n. 1, 2017.

SOUZA, Laura Fernanda Condota Borba et al. Determination of pesticides in the source and drinking waters in Londrina, Paraná, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 3, p. 1153-1164, 2019.

SUGIMOTO, Masahiro *et al.* Bioinformatics tools for mass spectroscopy-based metabolomic data processing and analysis. **Current bioinformatics**, v. 7, n. 1, p. 96-108, 2012.

SUSSULINI, Alessandra (Ed.). **Metabolomics: from fundamentals to clinical applications**. Springer, 2017.

STREISINGER, George *et al.* Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). **Nature**, v. 291, n. 5813, p. 293-296, 1981.

STRIEGEL, Andre *et al.* **Modern size-exclusion liquid chromatography: practice of gel permeation and gel filtration chromatography**. John Wiley & Sons, 2009.

STRONG, Rebecca J. et al. Infrared spectroscopy detects changes in an amphibian cell line induced by fungicides: Comparison of single and mixture effects. **Aquatic Toxicology**, v. 178, p. 8-18, 2016.

TAHILIANI, Arun G.; BEINLICH, Cathy J. Pantothenic acid in health and disease. **Vitamins & Hormones**, v. 46, p. 165-228, 1991.

THEODORIDIS, Georgios A. *et al.* Liquid chromatography–mass spectrometry based global metabolite profiling: a review. **Analytical chimica acta**, v. 711, p. 7-16, 2012.

TRUFELLI, Helga et al. An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry. **Mass spectrometry reviews**, v. 30, n. 3, p. 491-509, 2011.

URANI, Chiara *et al.* Benomyl affects the microtubule cytoskeleton and the glutathione level of mammalian primary cultured hepatocytes. **Toxicology letters**, v. 76, n. 2, p. 135-144, 1995.

US EPA (2016). Validation and Peer Review of U.S. Environmental Protection Agency Chemical Methods of Analysis. REVISION: February 3, 2016.

VESTAL, Marvin L. Methods of ion generation. **Chemical reviews**, v. 101, n. 2, p. 361-376, 2001.

VIANT, Mark R. *et al.* How close are we to complete annotation of metabolomes?. **Current opinion in chemical biology**, v. 36, p. 64-69, 2017.

VILLAS-BOAS, Silas G. *et al.* Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. **Yeast**, v. 22, n. 14, p. 1155-1169, 2005.

VILLAS-BÔAS, Silas Granato; BRUHEIM, Per. The potential of metabolomics tools in bioremediation studies. **Omics: a journal of integrative biology**, v. 11, n. 3, p. 305-313, 2007.

VUCKOVIC, Dajana. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography–mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 403, n. 6, p. 1523-1548, 2012.

WANG, Guowei, *et al.* In vivo metabolism of organophosphate flame retardants and distribution of their main metabolites in adult zebrafish. **Science of The Total Environment** 590, 50-59, 2017.

WANG, Jian *et al.* Non-target data acquisition for target analysis (nDATA) of 845 pesticide residues in fruits and vegetables using UHPLC/ESI Q-Orbitrap. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 411, n. 7, p. 1421-1431, 2019.

WESTERFIELD, Monte. **The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish Danio ("Brachydanio Rerio")**. University of Oregon, 2007.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) *et al.* **Carbendazim**. World Health Organization, 1993.

WISHART, David S. *et al.* HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. **Nucleic acids research**, v. 46, n. D1, p. D608-D617, 2018.

XIA, Jianguo *et al.* MetaboAnalyst 2.0—a comprehensive server for metabolomic data analysis. **Nucleic acids research**, v. 40, n. W1, p. W127-W133, 2012.

XIA, Jianguo *et al.* MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W251-W257, 2015.

XIA, L., ZHENG, L., & ZHOU, J. L. Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior in developing zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere** 182, 416-425, 2017.

XIAYAN, Li; LEGIDO-QUIGLEY, Cristina. Advances in separation science applied to metabonomics. **Electrophoresis**, v. 29, n. 18, p. 3724-3736, 2008.

YU, G. *et al.* Effects of subchronic exposure to carbendazim on spermatogenesis and fertility in male rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 25, n. 1, p. 41-47, 2009.

ZARINI, Simona *et al.* Lysophospholipid acyltransferases and eicosanoid biosynthesis in zebrafish myeloid cells. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 113, p. 52-61, 2014.

ZHANG, Yingkun et al. Identification of the key amino acid sites of the carbendazim hydrolase (MheI) from a novel carbendazim-degrading strain *Mycobacterium* sp. SD-4. **Journal of hazardous materials**, v. 331, p. 55-62, 2017.

ZIARRUSTA, Haizea et al. Non-targeted metabolomics reveals alterations in liver and plasma of gilt-head bream exposed to oxybenzone. **Chemosphere**, v. 211, p. 624-631, 2018.

ZORZETTO, R.; GUIMARÃES, M. Um peixe modelo. **Revista Pesquisa FAPESP**, São Paulo, ed. 209, p.16-21, jul., 2013.

ANEXO 01



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO RISCO ASSOCIADO À EXPOSIÇÃO CRÔNICA AOS AGROTÓXICOS ACEFATO E CARBENDAZIM UTILIZANDO O MODELO ANIMAL ZEBRAFISH (DANIO RERIO)", protocolada sob o CEUA nº 7061120319 (ID 000165), sob a responsabilidade de **Maria Elvira Poletti Martucci** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 15/03/2019.

We certify that the proposal "Risk Evaluation to chronic exposure to both agrochemicals acephate and carbendazim using Zebrafish model (Danio rerio)", utilizing 504 Fishes (males and females), protocol number CEUA 7061120319 (ID 000165), under the responsibility of **Maria Elvira Poletti Martucci** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 03/15/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **04/2019** a **12/2022** Área: **Ciências Biológicas**

Origem:	Animais provenientes de estabelecimentos comerciais		
Espécie:	Peixes	sexo:	Machos e Fêmeas
		idade:	1 a 6 meses
		N:	504
Linhagem:	Danio rerio	Peso:	020 a 025 g

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

Ouro Preto, 23 de julho de 2020

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

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