

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

CAROLINA FERREIRA SAMPAIO

**Avaliação de múltiplos parâmetros de toxicidade do 1H-
benzotriazol e 5-Cloro benzotriazol em estágios embrio-larvais de
zebrafish**

Ribeirão Preto

2020

CAROLINA FERREIRA SAMPAIO

Avaliação de múltiplos parâmetros de toxicidade do 1H-benzotriazol e 5-Cloro benzotriazol em estágios embrio-larvais de zebrafish

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Profº Drº Daniel Junqueira Dorta

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 18/12/2020. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão preto

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Sampaio, Carolina Ferreira

Avaliação de múltiplos parâmetros de toxicidade do 1H-benzotriazol e 5-Cloro benzotriazol em estágios embrio-larvais de zebrafish. Ribeirão Preto, 2020.

43p. :il. ;30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Dorta, Junqueira Daniel.

1.Benzotriazóis.2.*Danio rerio*.3.Movimentação.4.Eclosão.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Carolina Ferreira Sampaio

Título do trabalho: Avaliação de múltiplos parâmetros de toxicidade do 1H-benzotriazol e 5-Cloro benzotriazol em estágios embrio-larvais de zebrafish.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais, Claudia e Vergilio, pelo amor incondicional, apoio e incentivo pelas minhas escolhas. A eles o meu muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meu pais, por sempre me ouvirem nos momentos mais difíceis, pelo apoio e incentivo que sempre me deram mesmo longe fisicamente e cobertos de saudades. Sou muita grata em tê-los como meus pais e agradeço todos os sacrifícios que fizeram e fazem por mim.

Aos meus padrinhos Dida e Bezerra que mesmo longe sempre me mandam suas bênçãos. E em especial ao Bezerra que nesse ano difícil não está mais conosco, agradeço por todos os momentos divertidos que me proporcionou.

Aos meus queridos amigos e parceiros de laboratório que pude conhecer ao ingressar no mestrado: Andréia, Camila, Flavia, Klaus, Olímpia, Sônia, Raul, Renan, Taisa, Taís e Tamires, pelos ensinamentos, pelo auxílio, aos todos os cafezinhos da tarde e as idas aos bares. Agradeço todos desse grupo que me acolheram no laboratório e graças a eles foi possível realizar esse trabalho.

À meu orientador Prof. Dr. Daniel, pela oportunidade de trabalhar nesse projeto, pela confiança, pela paciência, por todo conhecimento transmitido e a disponibilidade de sempre estarem abertos a conversa. Muito obrigada pela orientação.

À agência financiadora, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela formação acadêmica de excelência.

Os meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a realização desse projeto de maneira direta ou indireta.

“Perguntas às quais você não é capaz de responder são geralmente muito melhores para você do que respostas que você não é capaz de questionar”

Yuval Noah Hara

RESUMO

SAMPAIO, C. F. **Avaliação de múltiplos parâmetros de toxicidade do 1H-benzotriazol e 5-Cloro benzotriazol em estágios embrio-larvais de zebrafish.** 2020.43f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Os benzotriazóis são compostos heterocíclicos formados pela junção de um anel de benzeno com uma molécula de triazol. São amplamente utilizados nas indústrias como agentes anticorrosivos, além de serem utilizados em sistemas de refrigeração. Os benzotriazóis são também encontrados nos componentes de derivado de petróleo, e mais recentemente estão sendo empregados na indústria farmacêutica e nas formulações de detergente. É característico desses compostos a persistência no ambiente e o fato de não serem totalmente degradados pelas estações de tratamento de água, podendo ser encontrados em rios, lagos e até na água potável. Dessa forma, há uma necessidade de avaliação da segurança desses compostos para a população humana e de animais aquáticos. Neste cenário, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição aos compostos 1H-benzotriazol e o 5 –Cloro benzotriazol zebrafish (*Danio rerio*) nos estágios embrio-larval. Para isso, foram realizadas análises de toxicidade aguda (FET) em embriões de até 96 hpf (horas pós fertilização), avaliação morfométrica e de movimentação. O composto 5-Cloro benzotriazol, induziu uma diminuição na taxa de eclosão a partir da concentração 10 mg/L e alteração nos parâmetros morfométricos dos animais expostos, como redução do crescimento dos organismos, um aumento da área do saco vitelino e uma redução da área do olho nas concentrações de 5 e 10 mg/L. Ambos os compostos estudados induziram um aumento na movimentação dos embriões, indicando assim um possível efeito neurotóxico. Já 1H-benzotriazol não induziram alterações no FET (Fish Acute Embryo Toxicity) ou sobre parâmetros morfométricos significativos que possam prejudicar o desenvolvimento posterior. Dessa forma, o estudo demonstrou que os 2 benzotriazóis testados podem afetar o desenvolvimento do zebrafish nos estágios iniciais de vida, mas com uma maior toxicidade evidenciada para o 5-cloro benzotriazol e assim fornecendo dados à comunidade científica sobre seus mecanismos de ação tóxica.

Palavras-chave: benzotriazóis; movimentação; morfometria; toxicidade; *Danio rerio*

ABSTRACT

SAMPAIO, C. F. **Evaluation of multiple toxicity parameters of 1H-benzotriazole and 5-Chlorine benzotriazole in zebrafish embryo-larvae stages** 2020. 43f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Benzotriazoles are heterocyclic compounds formed by the junction of a benzene ring with a triazole molecule. They are used in industries as anti-corrosion agents, in addition to being used in refrigeration systems. Benzotriazoles are also found in petroleum derivative components, and more recently are being used in the pharmaceutical industry and in detergent formulations. Benzotriazole compounds have the characteristics of persistence in the environment and the fact that they are not totally degraded by water treatment plants, being found in rivers, lakes and even in drink water. Thus, there is a need to assess the safety of these compounds for the human and aquatic animal population. In this scenario, the present work aimed to evaluate the effects of exposure to 1H-benzotriazole and 5-cloro benzotriazole compounds in the embryo-larval stages of zebrafish (*Danio rerio*). For that, acute toxicity analyzes (FET) were performed on embryos up to 96 hpf (hours pos fertilization), morphometric and movement evaluation. The compound 5-Chlorine benzotriazole, induced a decrease in the hatching rate from the 10 mg/L concentration and a change in the morphometric parameters of the exposed animals, such as reduced organism growth, an increase in the area of the yolk sac and a reduction in the area of the eye in concentrations of 5 and 10 mg/L. Both studied compounds induced an increase in the movement of the embryos, indicating a possible neurotoxic effect. 1H-benzotriazole, on the other hand, did not induce changes in FET (Fish Acute Embryo Toxicity) or in morphometric parameters that may impair further development. Thus, the study showed that the 2 benzotriazoles tested can affect the development of zebrafish in the early life stages, but with greater toxicity evidenced for 5-chlorine benzotriazole. This data will help the understanding of the benzotriazole by the scientific community.

Keywords: benzotriazole; movement; morphometric; toxicity ; *Danio rerio*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Primeira patente de benzotriazóis documentada.....	2
Figura 2. Estruturas químicas de BTAs utilizados na indústria farmacêutica.....	3
Figura 3. Estrutura química do triazol. A) Configuração 1-H; B) Configuração 2-H.....	4
Figura 4. Estrutura química dos UV-BTAs. A)UV-320; B)UV-326;C)UV-327;D)UV-328.....	5
Figura 5. Estrutura molecular do A) 1H-benzotriazol B) 5-Cloro benzotriazol.....	5
Figura 6. Imagem do peixe zebrafish adulto	10
Figura 7. Desenvolvimento do <i>Danio rerio</i> . A) embrião controle negativo com 48 hpf (Aumento 2,0X). B):embrião controle negativo com 96 hpf (Aumento 1,25X).	11
Figura 8. Ciclo de vida do zebrafish.....	12
Figura 9. Áquários com o sistema de separação com 1 femea e 2 machos em cada lado.....	17
Figura 10. A) Embrião com 96 hpf com preseça de edema (Aumento 2,0 X); B) Embrião com 96 hpf apresentando alterações esqueléticas (Aumento 1,25 X).....	18
Figura 11. Embriões do controle negativo com 96 hpf anestesiados e posicionados lateralmente (Aumento 1,25 X).....	20
Figura 12. Posição dos embriões na lâmina para gravação do vídeo (Aumento 0.8 X).....	21
Figura 13. Resultado do ensaio de embriotoxicidade (FET) nos embriões expostos ao 1H-benzotriazol em 96 hpf. A) Porcentagem da presença de edema nos embriões em 96 hpf. B) Porcentagem da taxa de eclosão dos embriões em 96 hpf.....	23
Figura 14. Resultado dos parâmetros morfométricos dos embriões expostos ao composto 1H- benzotriazol em 96 hpf. A) Comprimento do corpo do embrião. B) Área do saco vitelino. C) área do olho *p<0,05.....	24
Figura 15. Resultados da análise de movimentação aos embriões expostos ao 1H-benzotriazol em 24 hpf. A) Apresenta-se a contagem de impulsos motores. B) O tempo	

gasto em atividade e C) A contagem de impulsos motores por minuto.* $p < 0,05$
 25

Figura 16. Resultados da análise de movimentação aos embriões expostos ao 5-Cloro benzotriazol em 24 hpf. A) Apresenta-se a contagem de impulsos motores. B) Apresenta-se o tempo gasto em atividade e C) Apresenta-se a contagem de impulsos motores por minuto.....26

Figura 17. Resultado da análise de embriotoxicidade (FET) nos embriões expostos ao 5-cloro benzotriazol em 96 hpf. A) Porcentagem da taxa de eclosão dos embriões expostos ao 5-Cloro benzotriazol em 96 hpf. B) Porcentagem de deformidades esqueléticas encontradas nos embriões expostos ao 5-cloro benzotriazol em hpf * $p < 0.05$27

Figura 18. Resultado dos parâmetros morfométricos dos embriões expostos ao composto 5-Cloro benzotriazol em 96 hpf. A: Comprimento do corpo do embrião. B: Área do saco vitelino. C: área do olho. D: Figura de comparação dos organismos expostos em 96 hpf (Aumento 1,25X)28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela com os endpoints avaliados em cada período de desenvolvimento dos embriões de zebrafish.....	19
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Analysis of Variance
BTA	Benzotriazol
EC ₅₀	Half maximal effective concentration
ECVAM	Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos
FET	Fish Embryo Acute Toxicity
Hpf	Horas pós fertilização
ISO	International Organization for Standardization
K _{ow}	Coeficiente de partição octanol/água
LC 50	Lethal Concentration 50%
OECD	Organization for economic Co-operation and Development
UV-BTA	Benzotriazóis estabilizadores UV

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Micro
\pm	Mais ou menos

SUMÁRIO

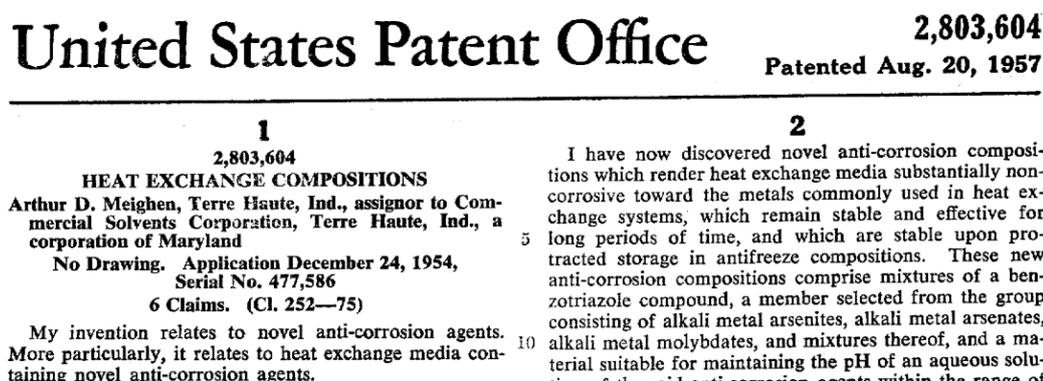
Resumo	I
Abstract	II
Lista de figuras	III
Lista de tabelas	V
Lista de abreviaturas e siglas	VI
Lista de símbolos	VII
1.INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Histórico.....	02
1.2. Funções dos benzotriazóis.....	02
1.3. Propriedades físico químicas dos BTAs.....	04
1.4. Benzotriazóis na água.....	06
1.5. Presença de BTAs em organismos vivos	07
1.6. Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	09
2.OBJETIVO.....	13
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1. Preparo de soluções.....	16
3.2. Manutenção e obtenção de ovos.....	16
3.3. Ensaio de toxicidade com embriões de zebrafish.....	17
3.4. Análise morfométrica.....	19
3.5. Avaliação da movimentação dos embriões de zebrafish.....	20
3.6 Análise Estatística.....	21
4.RESULTADOS.....	22
4.1.1H-benzotriazol.....	23
4.2.5-Cloro benzotriazol.....	25
5.DISSCUSSÃO.....	29
6.CONCLUSÃO.....	33
6.1. Considerações finais.....	34
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXO.....	43
Anexo A. Folha de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa.....	43

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

Os benzotriazóis (BTAs) são compostos orgânicos produzidos inicialmente nos Estados Unidos, onde em 1957 foi aprovada a primeira patente para a utilização destes compostos como inibidores de corrosão de metal em fluidos de troca de calor (Figura 1) (MEIGHEN; HOUTE, 1957).

Figura 1. Primeira patente de benzotriazóis documentada.
(Fonte: MEIGHEN; HOUTE, 1957)



Algun tempo depois, foi descoberto que os BTAs fenólicos tinham a capacidade de absorver luz UV, com isso em 1961 nos Estados Unidos foi emitida uma nova patente com a descrição dessa finalidade dos compostos (HELLER; KELLER; MINDERMAN, 1961).

1.2. Funções dos benzotriazóis

Após essas 2 patentes serem emitidas, com o decorrer do tempo foram criadas muitas outras nos Estados Unidos e no mundo, pois foram se descobrindo novas funções que os BTAs poderiam exercer (MONROE; VISHWAKARMA, 1996; PETERS; MINKS; SURMA, 1985).

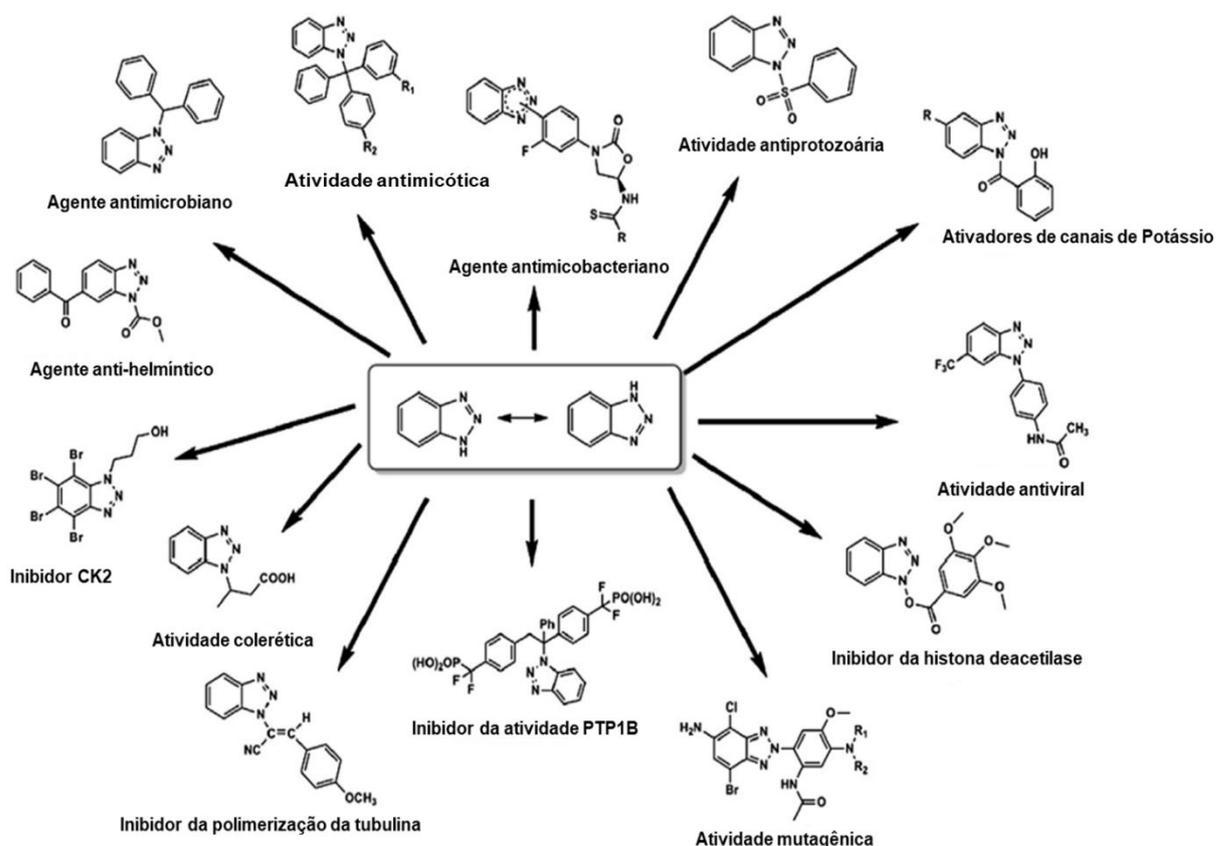
O grupo de BTAs que inicialmente era utilizado como inibidor de corrosão em fluidos de troca de calor, atualmente também é usado em sistemas de refrigeração como radiadores automotivos e componentes de derivados de petróleo como graxa e óleos lubrificantes, além disso também podem ser encontrados em formulações de detergente doméstico (JANNA et al., 2011; MALEC E, 1975; SENTHIVEL et al., 2010).

Já o grupo de BTAs que absorvem a luz UV (UV-BTA), são usados como aditivos estabilizadores em plásticos e polímeros, em agentes adesivos e tintas, dessa

maneira prevenindo o amarelamento e a degradação dos produtos (NAKATA; MURATA; FILATREAU, 2009). Além disso, esse grupo também é utilizado em produtos de higiene e cuidados com a pele como protetor solar, pasta de dente, tinta para cabelo, batom e formulações de maquiagem (BERRI et al., 2006).

Também é observado um crescimento do interesse dos BTAs na aplicação da indústria farmacêutica, pois eles podem exercer a função de agente antimicrobiano, antiprotozoário, antimicótico, anti-helmíntico, como agentes ativadores dos canais de potássio, como redutor de colesterol, com atividade anti-inflamatória e como agente antiviral e antitumorais (BOIDO et al., 2003; BOROWSKI et al., 2003; CARTA et al., 2002; CASTILLO; AMERICA, 2011; DISOUZA, 2012; SCARTONI; BARAGATTI; MARTINOTTI, 2001; SUDHIR; NADH, 2013; SWAMY et al., 2006). Na figura 2, podemos observar algumas estruturas químicas de benzotriazóis e suas funções correspondentes.

Figura 2. Estruturas químicas de BTAs utilizados na indústria farmacêutica. (Fonte: adaptado de BRIGUGLIO et al., 2014)

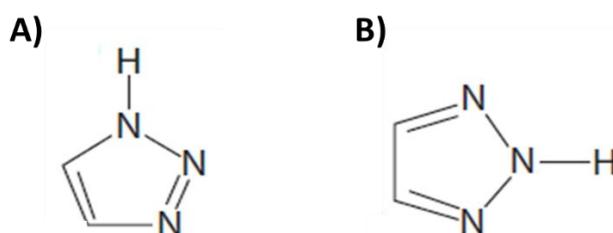


Por conta dessa versatilidade que os BTAs possuem, eles são amplamente utilizados no mundo com uma produção mundial superior a 9000 toneladas por ano (WEISS; REEMTSMA, 2005). Em 2012, a produção dos Estados Unidos chegou a 850 toneladas e na Austrália esse valor chega a 100 toneladas por ano de BTAs produzidos (GIRAUDO et al., 2017; LOI et al., 2013). No Brasil, não foram encontrados dados referentes a produção do benzotriazol na literatura, além disso dados mais recentes relacionada a produção mundial não são observados, uma vez que são dados confidenciais.

1.3. Propriedades físico químicas dos BTAs

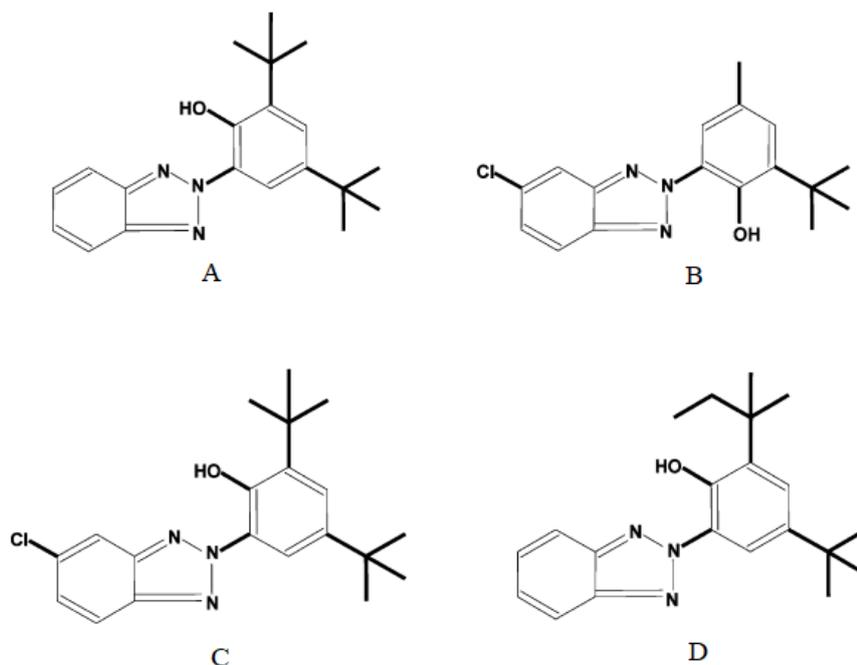
A molécula de triazol é composta por 3 átomos de nitrogênio e 2 átomos de carbono, com isso 2 isômeros são formados: um com o hidrogênio na posição 1-H e outro presente na posição 2-H, como podemos observar na figura 3 (CANTWELL; SULLIVAN; BURGESS, 2015). Assim, para a formação dos BTAs é necessária a fusão de um anel de benzeno com a molécula de triazol (CANTWELL; SULLIVAN; BURGESS, 2015).

Figura 3. Estrutura química do triazol. A) Configuração 1-H; B) Configuração 2-H (Fonte: Adaptado de CANTWELL; SULLIVAN; BURGESS, 2015).



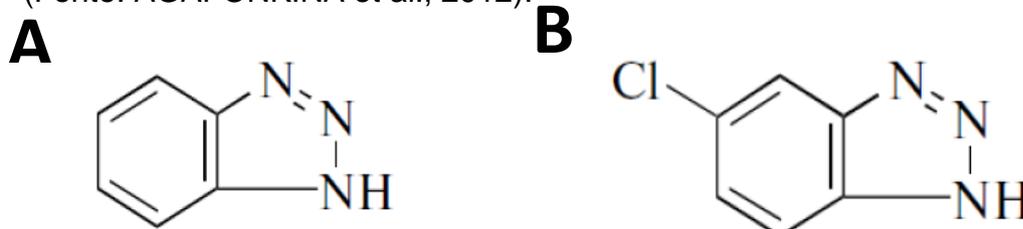
Os UV-BTAs são formados pela junção do anel de benzeno com a molécula de triazol e um grupo fenol ligado a posição 2-H. Na figura 4 podemos observar alguns exemplos de estruturas químicas dos UV-BTAs (CANTWELL; SULLIVAN; BURGESS, 2015). Os UV-BTAs possuem a capacidade de absorver a luz UV-A e UV-B (280 a 400 nm), também possuem alto peso molecular, estruturas químicas complexas e um alto valor de K_{ow} que varia entre 6,58 a 8,28 (CANTWELL; SULLIVAN; BURGESS, 2015; NAKATA; MURATA; FILATREAU, 2009).

Figura 4. Estrutura química dos UV-BTAs. A) UV-320; B) UV-326; C) UV-327; D) UV-328 (Fonte adaptado de NAKATA; MURATA; FILATREAU, 2009).



Já os BTAs utilizados como agentes anticorrosivos possuem o hidrogênio na posição 1-H, como é o caso do composto 1H-benzotriazol esquematizado na figura 5. Eles são caracterizados por possuírem estruturas químicas mais simples com relação ao UV-BTAs, com baixos valores de K_{ow} e de peso molecular (CANTWELL; SULLIVAN; BURGESS, 2015). No caso do 1H-benzotriazol ele possui um valor de K_{ow} de 1,44 e peso molecular de 119,12 g/mol (FENT et al., 2014). Além disso, os BTAs podem incluir um éster, um átomo de cloro e grupos funcionais como o metil, como exemplo podemos citar o 5-Cloro benzotriazol (K_{ow} 1,47 e peso molecular de 153,57g/mol), na figura 5 está esquematizada a sua estrutura molecular (CANTWELL; SULLIVAN; BURGESS, 2015; LEERDAM et al., 2009).

Figura 5. Estrutura molecular do A) 1H-benzotriazol e do B) 5-Cloro benzotriazol (Fonte: AGAFONKINA et al., 2012).



1.4. Benzotriazóis na Água

O primeiro relato da presença de BTA no ambiente foi em 1970, quando uma fábrica de produtos químicos em Cranston nos Estados Unidos descartou através de águas residuais industriais os UV-BTAs no rio Pawtuxet, com conseqüente transporte para a Baía Narragansett. Os compostos foram detectados pela deposição e acúmulo tanto nos sedimentos do rio Pawtuxet como da Baía de Narragansett (JUNGCLAUS; LOPEZ-AVILA; HITES, 1978; LOPEZ-AVILA; HITES, 1980).

Atualmente, em diferentes estudos são relatadas concentrações de BTAs encontradas em rios, lagos e água para consumo (GINGER; SCHAFFNER; KOHLER, 2006; LEERDAM et al., 2009; LOOS et al., 2009). Isso ocorre pela remoção apenas parcial desses compostos nas estações de tratamento de água, pois os BTAs são compostos com alta solubilidade e resistentes a biodegradação, assim sendo são considerados persistentes no ambiente aquático (HART et al., 2004; LIU et al., 2012).

Um estudo realizado em 2009, analisou amostras de água de rios de 27 países europeus para detecção de poluentes orgânicos persistentes, os BTAs foram identificados nas amostras com uma frequência de 94% (LOOS et al., 2009). Já um outro estudo, realizado em 2016 com amostras de um aquífero na Espanha, detectou 16 tipos de produtos de higiene pessoal e entre eles os que apresentaram maiores concentrações nas amostras analisadas foram os benzotriazóis (495-1500 ng/L) (SERRA-ROIG et al., 2016).

No Brasil, um estudo conduzido em 2017 analisou amostras do sedimento da bacia do Alto Iguaçu, no qual foram encontradas concentrações de 5,6 a 322,2 ng/g (peso seco) de BTAs, sendo o 1H-benzotriazol um dos compostos encontrados nestes sedimentos (MIZUKAWA et al., 2017).

Concentrações de BTAs também já foram detectadas em água para consumo de alguns países, como observado em um estudo conduzido na Holanda em que foi encontrado o 1H-benzotriazol e 5-cloro benzotriazol em concentrações que variaram entre 10 e 200 ng/L (LEERDAM et al., 2009). Já em outro estudo realizado em 2011, foram coletadas amostras de água potável na Inglaterra e foi constatada a presença de 1 H-benzotriazol em concentrações entre 0,6 e 79,4 ng/L (JANNA et al., 2011). Além disso, em estudo conduzido por Kiss e Fries, nos rios Main, Hengstbach e Hegbach localizados na Alemanha, foi encontrado concentrações de 1H-benzotriazol que variaram entre 38 e 1.474 ng/L (KISS; FRIES, 2009).

Em um outro estudo, agora conduzido na China, foi observado que o tratamento da água por cloração também pode contribuir para o aparecimento de compostos clorados na água para consumo, como é o caso do 5-Cloro benzotriazol (WANG et al., 2016). Também foi observado neste estudo que a fervura da água potável por períodos que variaram entre 1 a 10 minutos foi ineficaz para a eliminação dos compostos (WANG et al., 2016).

1.5. Presença de BTAs em organismos vivos

Os BTAs são largamente produzidos e utilizados no mundo, e suas propriedades físico-químicas dificultam a degradação de sua estrutura nas estações de tratamento de água, o que possibilita que eles entrem em contato com animais aquáticos e a população humana (CANTWELL; SULLIVAN; BURGESS, 2015; SHI et al., 2019).

Um estudo conduzido no Canadá, avaliou o plasma de animais aquáticos do rio Ontário e constataram a presença do benzotriazol UV-328 em 50 % das trutas (*Salvelinus Namaycush*) avaliadas, com uma média de concentração de 465 pg/g, além disso também foi detectada a presença do benzotriazol UV-329 no plasma de 4 dos 18 golfinhos analisados no estudo, com uma taxa entre 640 a 860 pg/g. (LU et al., 2019).

Já na Alemanha em 2016, foram analisados fígados dos peixes brema (*Abramis brama*) que habitavam 5 rios alemães, e detectada a presença dos benzotriazóis UV-327 e UV-328 com as maiores concentrações de 65 ng/g peso seco e 40 ng/g peso seco, respectivamente (KUNKEL et al., 2016).

Além dos estudos mostrando a presença de BTAs em organismos vivos em seu habitat natural, também há estudos que observaram os efeitos tóxicos que esses compostos potencialmente possuem sobre organismos aquáticos, como o estudo feito por Damalas e seus colaboradores, que avaliaram a exposição do 1H-benzotriazol em até 96 horas em larvas de zebrafish (*Danio rerio*), e observaram que em concentrações de até 50 mg/L o 1H-BTA não apresentou capacidade de induzir alterações morfológicas aos embriões, porém em concentrações iguais e superiores a 100 mg/L foi observada a presença de edemas de pericárdio, com uma LC₅₀ para 1H-benzotriazol de 170 mg/L nestas condições (DAMALAS et al., 2018).

Já em um estudo realizado em 2014, em que se avaliou a toxicidade do 1H-benzotriazol no estágio embrio-larval de zebrafish por até 144 horas nas

concentrações de 7,9; 97,3 e 1197,3 $\mu\text{g/L}$, não foi possível observar alterações morfológicas brutas (como mortalidade e alteração do tempo de eclosão), porém foi visto um potencial efeito de desregulação endócrina do composto, pela constatação de atividade anti-androgênica nos embriões (FENT et al., 2014).

Além de ensaios de toxicidade dos BTAs em zebrafish, na literatura encontramos também avaliações de toxicidade empregando *Daphnia magna*, um microcrustáceo de água doce muito utilizado em ensaios de ecotoxicidade. Giraudo e colaboradores (2017) observaram que a exposição dos daphnídeos ao 1 H-benzotriazol por até 48 hrs induziu a uma LC_{50} de 93,3 mg/L, enquanto DURJAVA e colaboradores (2013) obtiveram uma EC_{50} de 155,40 mg/L para o parâmetro de imobilidade dos organismos (DURJAVA et al., 2013; GIRAUDO et al., 2017) . Além disso, há dados com relação ao 5-Cloro benzotriazol que mostrou uma maior toxicidade em relação ao 1H-benzotriazol, pois sua LC_{50} para *Daphnia magna* foi de 28,73 mg/L (GIRAUDO et al., 2017).

Com relação aos seres humanos, como os BTAs já foram encontrados em água potável, uma das maneiras com que a população pode entrar em contato com esses compostos seria pela sua ingestão (WANG et al., 2016). Como os benzotriazóis possuem caráter polar, em humanos esses compostos são excretados principalmente pela via urinária, com isso para a avaliação da exposição humana é frequentemente analisada amostras de urina (SHI et al., 2019).

Assim em estudo realizado em 2013, foram analisadas amostras de urina de pessoas dos seguintes países: Estados Unidos, Grécia, Vietnã, Coreia do Sul, Japão, China e Índia; e a concentração mais alta de todos os compostos de BTAs foram encontrados na Índia (2,8 ng/mL) e China (2,3 ng/mL), seguida por Vietnã (1,4 ng/mL), Japão (1,0 ng/mL), Grécia (0,9 ng/mL), EUA (0,7 ng/mL) e Coreia do Sul (0,2 ng/mL) (ASIMAKOPOULOS et al., 2013).

Há estudos também mensurando concentrações de BTAs em urina de mulheres grávidas (concentração média de 0,88ng/mL) e no líquido amniótico (concentração média de 0,026 ng/mL), pois é um importante dado para a avaliação fetal (LI et al., 2018). Nesse aspecto, um estudo conduzido na China avaliou amostras de urina de mulheres grávidas e detectaram presença de diversos BTAs, e entre eles, a presença tanto do 5-Cloro benzotriazol quanto do 1 H-benzotriazol (LI et al., 2018).

Uma outra rota de exposição aos BTAs pelos humanos seria pelas roupas, pois durante a fabricação de tecidos muitos compostos químicos são utilizados e entre eles

os BTAs (LIU; XUE; KANNAN, 2017). Com isso, um estudo avaliou amostras de 79 tecidos na cidade de Albany (Estados Unidos) e a concentração mais alta encontrada foi a de 14.000 ng/g de 1H-benzotriazol em um macacão infantil com impressão gráfica (LIU; XUE; KANNAN, 2017). Porém nas amostras de tecidos foram encontradas diversos outros BTAs como o 5-Cloro benzotriazol, em concentrações de até 113 ng/g (LIU; XUE; KANNAN, 2017).

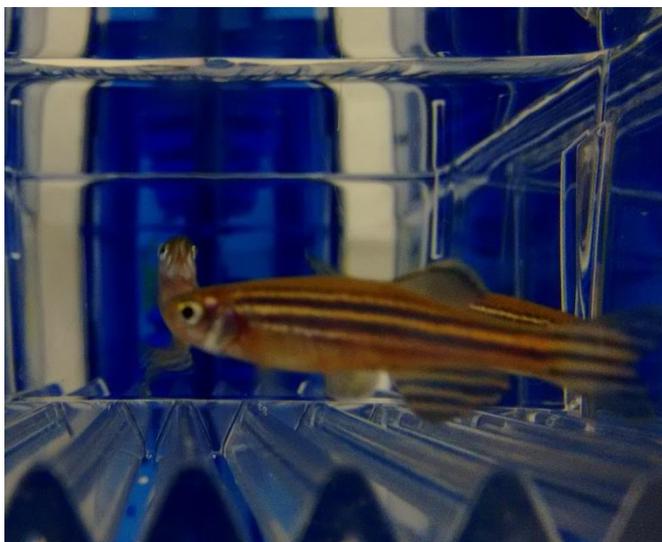
1.6. Zebrafish (*Danio rerio*)

Desde o estabelecimento do princípio dos 3 Rs, publicados em 1959 por William Russel e Rex Burch, e definidos como redução, refinamento e substituição (reduction, refinement e replacement) de animais em experimentação, vem se ganhando importância o maior respeito ao bem-estar animal e sendo estabelecidas políticas de redução do uso de animais para pesquisa (RUSSEL; BURCH, 1959) (LAMMER et al., 2009).

Nesse sentido, estudos conduzidos por um grupo referência de testes alternativos ao uso de animais, o ECVAM (Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos – European Centre for the Validation of Alternative Methods) em conjunto com a OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico – Organization for Economic Co-operation and Development), em 2009, validaram o teste de toxicidade aguda com embriões de zebrafish, para que houvesse uma redução na quantidade de peixes adultos utilizados nos ensaios (EUROPEAN COMMISSION, 2014). É importante salientar que na União Europeia é definido que os ensaios com embriões não são testes considerados *in vivo*, pois segundo a Diretriz 2010/63/EU, são considerados ensaios *in vitro* aqueles que utilizam animais vertebrados vivos (não humanos), no qual as larvas não se alimentem de forma independente (UNIÃO EUROPEIA, 2010).

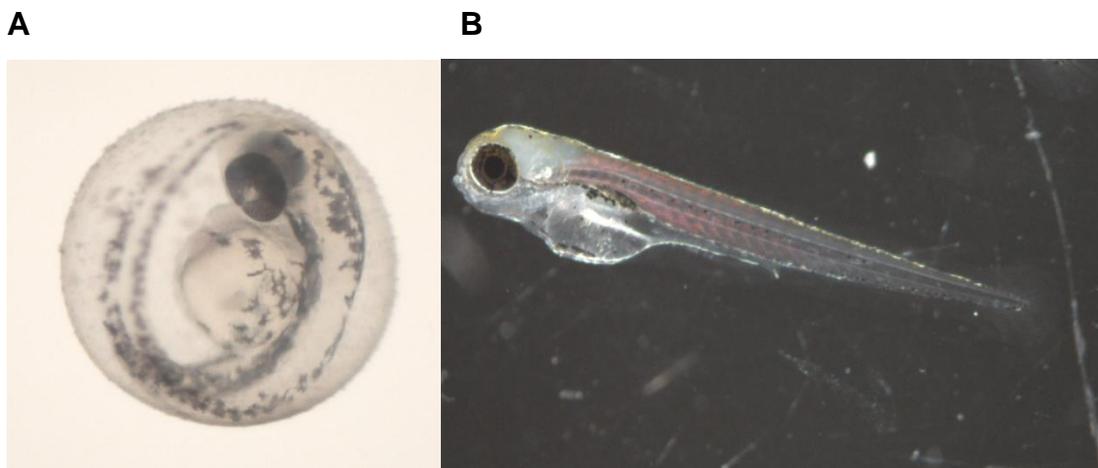
O peixe-zebra (zebrafish ou paulistinha) pertence a Família Cyprinidae e tem origem na Índia e Paquistão, porém atualmente está presente em diversos países (ABNT, 2016). Ele é considerado um peixe de pequeno porte, medindo aproximadamente de 3 a 4 cm de comprimento com corpo longilíneo fusiforme e achatado nas laterais, também possui de 5 a 7 linhas longitudinais com tons azulados, que o deixou conhecido como zebrafish (Figura 6) (SPENCE et al., 2008) (ABNT, 2016).

Figura 6. Imagem do peixe zebrafish adulto (Fonte: Autor).



O *Danio rerio* é um modelo animal importante, pois possui grande sensibilidade quando exposto a compostos químicos, uma vez que ele absorve rapidamente as substâncias que são adicionadas na água e acumula em vários tecidos, além disso possui a vantagem de poder utilizar os embriões que são ainda mais sensíveis quando comparados aos adultos, assim sendo uma importante qualidade para ensaios de toxicidade (NAGEL, 2002; ZHANG; WILLETT; FREMGEN, 2003). Além disso, o *Danio rerio* apresenta 70 % de similaridade genômica com os humanos, incluindo também semelhanças fisiológicas e anatômicas (HILL et al., 2005; HOWE et al., 2013; ZHANG; WILLETT; FREMGEN, 2003). Na figura 7, podemos observar o embrião com 48 hpf antes da eclosão e outro embrião com 96 hpf após o rompimento do córion.

Figura 7. Desenvolvimento do *Danio rerio*. A) embrião controle com 48 hpf (Aumento 2,0X). B) embrião controle com 96 hpf (Aumento 1,25X). (Fonte: autor).



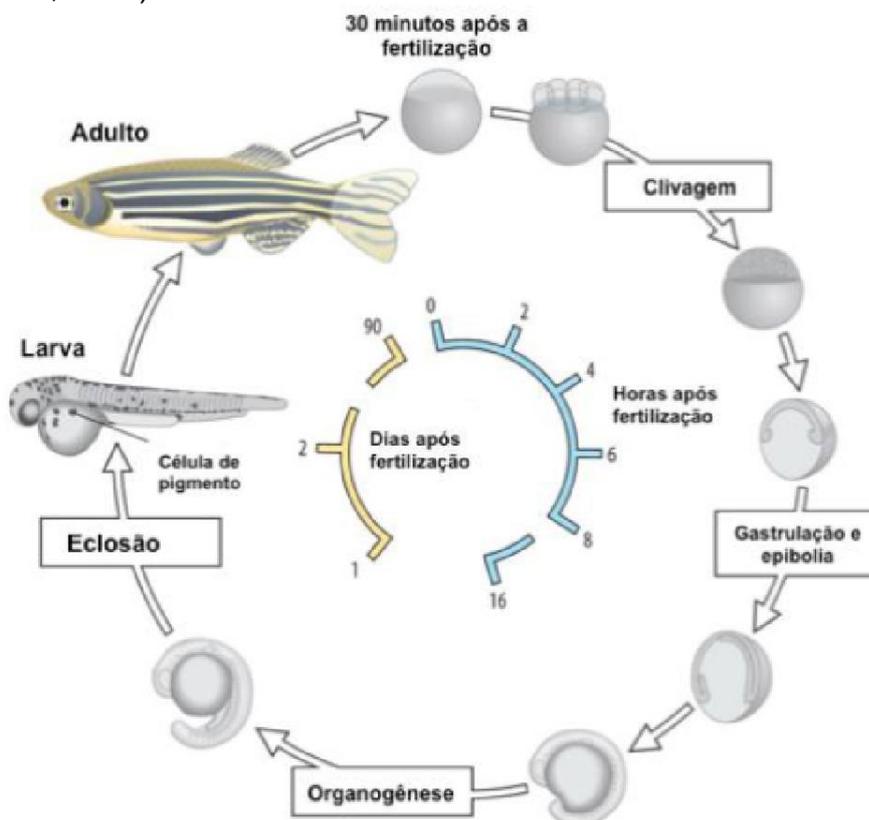
Outros benefícios que podemos destacar com relação ao uso do *Danio rerio* é a necessidade do pouco espaço para manejo, pois eles são relativamente pequenos e podem ser criados em um grande número em um mesmo aquário (HILL et al., 2005). Além disso, a reprodução é elevada e possui rápido desenvolvimento embrionário, suas larvas possuem apenas de 1 a 4 mm de comprimento, e podem viver até sete dias em um único poço de placa de 6 poços sobrevivendo apenas com nutrientes armazenados no saco vitelínico (HILL et al., 2005; MCGRATH; LI, 2008; SIPES; PADILLA; KNUDSEN, 2011).

O peixe alcança a maturidade sexual em 3 meses de vida e podem produzir até 100 ovos por desova, como a fertilização é externa e os ovos transparentes e grandes (0,5 a 0,7 mm), é possível o acompanhamento do desenvolvimento do embrião utilizando um estereomicroscópio simples, com isso são realizadas análises dos estágios embrionários e larvais do zebrafish podendo ser observado os efeitos de teratogenicidade, assim identificando malformações durante essa fase de desenvolvimento sem a necessidade da eutanásia do organismo (HILL et al., 2005; NAGEL, 2002). Na figura 8 está esquematizado o ciclo de vida do zebrafish.

Dessa forma, propomos no presente trabalho avaliar a toxicidade dos BTAs (1H-benzotriazol e 5-Cloro benzotriazol) em modelo de zebrafish, utilizando alguns parâmetros como o Fish Embryo Acute Toxicity (FET) que é capaz de detectar uma ampla gama de efeitos tóxicos, desde letais até subletais. E também o uso de ensaio

para a avaliação da atividade de movimentação dos embriões com o auxílio do software DanioScope®.

Figura 8. Ciclo de vida do zebrafish (Fonte: Adaptado do COSTA; SHEPHERD, 2014).



2. OBJETIVO

O objetivo geral do trabalho foi avaliar a toxicidade de dois representantes da classe dos benzotriazóis do tipo anticorrosivo (1H-benzotriazol e o 5-Cloro benzotriazol) sobre o desenvolvimento embrio-larval do *Danio rerio*.

Para isso foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliação dos efeitos agudos dos BTAs sobre os estágios iniciais de desenvolvimento de zebrafish (análise morfométrica e FET) ;
- Avaliação dos efeitos agudos dos BTAs sobre a movimentação dos zebrafish em estágios iniciais de desenvolvimento (análise de movimentação).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Preparo de soluções

Nesse trabalho, foram estudados os compostos 1H-benzotriazol (CAS: 95-14-7, 99%) e 5-Cloro benzotriazol (CAS:94-97-3, 99%), cujos padrões foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA).

Foram utilizadas 5 concentrações para cada composto, sendo para o 1H-benzotriazol as concentrações de 2,5; 5; 7,50; 10 e 15 mg/L para o FET (Fish Embryo Acute Toxicity) e para as análises morfométricas, já para análise de movimentação as concentrações de 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5 e 10 mg/L. As maiores doses utilizadas nos estudos foram estabelecidas como 15% do efeito agudo encontrado na literatura para o 1H-benzotriazol em zebrafish (de 100 mg/L) (DAMALAS et al.,2018) uma vez que 100 mg/L está muito acima de qualquer concentração encontrada ambientalmente.

Já para o 5-Cloro benzotriazol foram escolhidas as concentrações de 1; 5; 10; 15 e 20 mg/L para o FET, para a análise morfométrica foram determinadas concentrações de 1;5 e 10 mg/L. Já para a análise de movimentação foram utilizadas as concentrações de 0,5; 1;5;10;15 e 20 mg/L. Na literatura não há estudos com relação ao 5-cloro benzotriazol em zebrafish, com isso foram escolhidas concentrações semelhantes às utilizadas com o 1H-benzotriazol, para fins de comparação da toxicidade dos compostos.

Em todas as etapas para a preparação das soluções foi evitada a presença de luz, pois sabe-se que os compostos são fotossensíveis.

3.2. Manutenção e obtenção de ovos

Todo o protocolo de avaliação de toxicidade previsto neste projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de animais da FCFRP, USP (CEUA, protocolo nº 20.1.137.60.1 , emitido em 29 de Setembro de 2020).

Machos e fêmeas de zebrafish adultos foram mantidos juntos em água reconstituída e padronizada de acordo com as ISO 7346-1 e 7346-2 (ISO, 1996) no equipamento ZebTech® (Techniplast), à temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 14 h claro e 10 h escuro e mantidos com alimentação à base de ração comercial e ovos de *Artemia salina*.

No dia anterior ao acasalamento e aquisição dos ovos, dois machos e uma fêmea (proporção 2:1) são colocados em um sistema reprodutor próprio (que mantém o macho e fêmea separados), esse sistema permite a troca de água entre os espaços ocupados pelos organismos, sem contato físico, permitindo a exposição das fêmeas aos feromônios liberados pelos machos durante toda a noite, e assim otimizando o acasalamento (Figura 9).

Figura 9. Áquários com o sistema de separação com 1 fêmea e 2 machos em cada lado (Fonte:Autor).



O acasalamento dos organismos ocorre apenas na manhã seguinte após iluminação do aquário, quando a grade de separação entre machos e fêmea é retirada, então os organismos são mantidos juntos por cerca de 1h e 30 minutos. O sistema conta ainda com gradeamento na parte inferior do aquário, que impede os adultos de se alimentarem dos ovos fecundados. Os ovos são coletados 30 minutos após a desova, transferidos para uma placa de Petri e lavados com água reconstituída padronizada para posterior separação entre aqueles fecundados, que podem ser utilizados no ensaio, e não fertilizados (que são descartados) com auxílio de microscópio de dissecação (SZM-168, Motic). Para os experimentos, foram selecionados ovos que alcançaram o estágio de blástula.

3.3. Ensaio de toxicidade com embrião de zebrafish

As alterações no desenvolvimento em embriões de zebrafish foram avaliadas pelo protocolo Fish Embryo Acute Toxicity (FET) de acordo com Nagel (2002) e OECD Guideline 236 (2013), com pequenas modificações.

As soluções de 1H-benzotriazol e 5-Cloro benzotriazol foram feitas com água padronizada OECD, contendo 294,0 mg/L cloreto de cálcio, 123,3 mg/L sulfato de magnésio, 63,0 mg/L bicarbonato de sódio e 5,5 mg/L cloreto de potássio, também foi utilizado um controle positivo (4 mg/L de 3,4-dicloroanilina) e um negativo (apenas com água padronizada OECD).

Para os testes foram utilizados ovos fertilizados, distribuídos em placas de cultura em triplicata com 20 embriões por concentração de benzotriazol. Após a distribuição dos ovos, esses foram encubados a $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e as placas foram envolvidas com papel alumínio, para assim durante todo o teste não receberem luz. Posteriormente a cada 24h, por período de até 96h, os embriões de zebrafish foram avaliados com o auxílio de um estereomicroscópio (SMZ800, Nikon, Japão) acoplado a uma câmera (LV-TV, Nikon, Japão).

Na avaliação da toxicidade, foram utilizados os indicadores de letalidade, subletalidade e teratogenicidade recomendado por Nagel (2002) e apresentados na tabela 1. Na figura 10, podemos observar alguns exemplos de efeitos subletais encontrados na análise de toxicidade.

Figura 10. A) Embrião com 96 hpf com preseça de edema (Aumento 2,0 X); B) Embrião com 96 hpf apresentando alterações esqueléticas (Aumento 1,25 X). (Fonte:Autor)

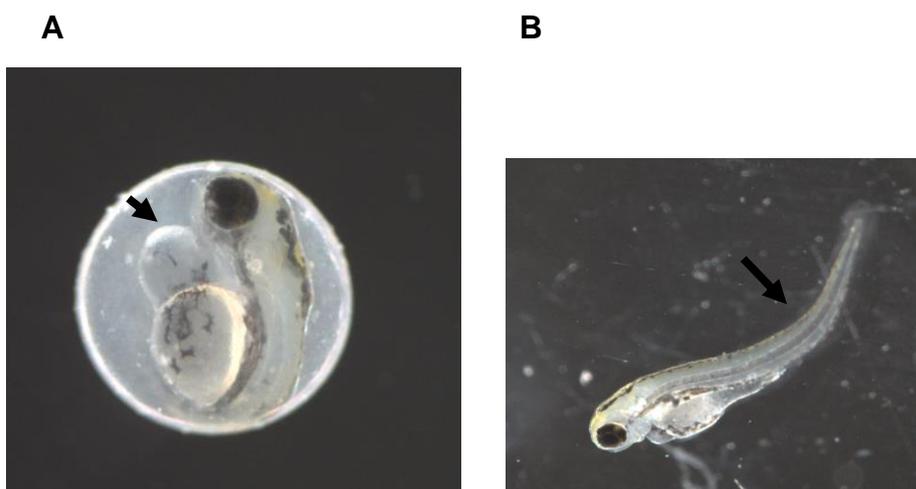


Tabela 1. Tabela com os endpoints avaliados em cada período de desenvolvimento dos embriões de zebrafish. Fonte: Adaptado de Nagel (2002).

ENDPOINTS	Tempo de exposição (hpf)			
	24	48	72	96
Letalidade				
Coagulação	X	X	X	X
Não desprendimento da cauda	X	X	X	X
Ausência de somitos	X	X	X	X
Ausência de batimentos cardíacos		X	X	X
Subletalidade				
Edema cardíaco ou de saco vitelínico			X	X
Ausência de pigmentação		X	X	X
Desenvolvimento dos olhos	X	X		
Teratogenicidade				
Não eclosão				X
Malformação da cabeça, olhos e cauda	X	X	X	X
Crescimento retardado	X	X	X	X

(hpf) = horas pós fertilização

3.4. Análise morfométrica

Na avaliação morfométrica o software DanioScope 1.1 (Noldus) foi utilizado para medir o embrião com o intuito de detectar malformações no organismo que não são possíveis de avaliar no FET, assim por ser uma análise automatizada ela consegue ser mais sensível e precisa do que as observações realizadas no estereomicroscópio.

Para isso, quando os embriões sendo avaliados no FET atingem 96 hpf eles são anestesiados com uma solução de 400 mg/L de triclaína, e então adicionados a preparação de agarose de 1,5% para serem então colocados em uma lâmina côncava de vidro em uma posição lateral que permita um melhor e adequada captura da imagem (Figura 11).

As imagens são posteriormente transferidas para o software DanioScope onde são obtidas as medidas de comprimento do organismo, da área dos olhos e a área do saco vitelino. Essa análise só é realizada nos organismos que não estão envoltos no córion, ou seja, apenas aqueles que eclodiram. Por este motivo a concentração de 10 mg/L do composto 5 –Cloro benzotriazol apresentam um menor n na análise morfométrica (n=30) em relação aos ensaios de FET, uma vez que apenas metade dos embriões expostos ao composto eclodiram.

Figura 11. Embriões do controle negativo com 96 hpf anestesiados e posicionados lateralmente (Aumento 1,25 X). (Fonte:Autor)



3.5. Avaliação da movimentação dos embriões de zebrafish

Na avaliação da atividade os embriões de zebrafish foram feitos ensaios em que o software DanioScope 1.1 (Noldus) consegue mensurar a movimentação de cada embrião. Dessa forma, por ser uma análise automatizada, ocorre a eliminação das variabilidades do observador.

Após a reprodução e separação dos embriões viáveis, estes foram expostos aos compostos por 26 hpf. No estereomicroscópio (SMZ800, Nikon, Japão), 15 embriões foram posicionados na lâmina côncava de vidro (Figura 12), aguardando 2 minutos para aclimatação antes de iniciar a gravação dos vídeos, e desta forma evitando possíveis alterações devido a diferenças no ambiente. Em seguida a gravação é realizada com duração de 3 minutos. A análise foi feita em triplicata e para cada concentração foram utilizados um total de 135 embriões.

Figura 12. Posição dos embriões na lâmina para gravação do vídeo (Aumento 0,8 X). (Fonte:autor).



Os vídeos foram então transferidos para o software DanioScope, que realiza o reconhecimento automático dos embriões, selecionando-se a zona de interesse. A seguir dados de contagem de impulsos motores, correspondente ao número de vezes que o embrião se moveu; de tempo gasto em atividade motora (porcentagem de tempo em que o embrião estava em movimento) e contagem de impulsos motores por minuto foram obtidos.

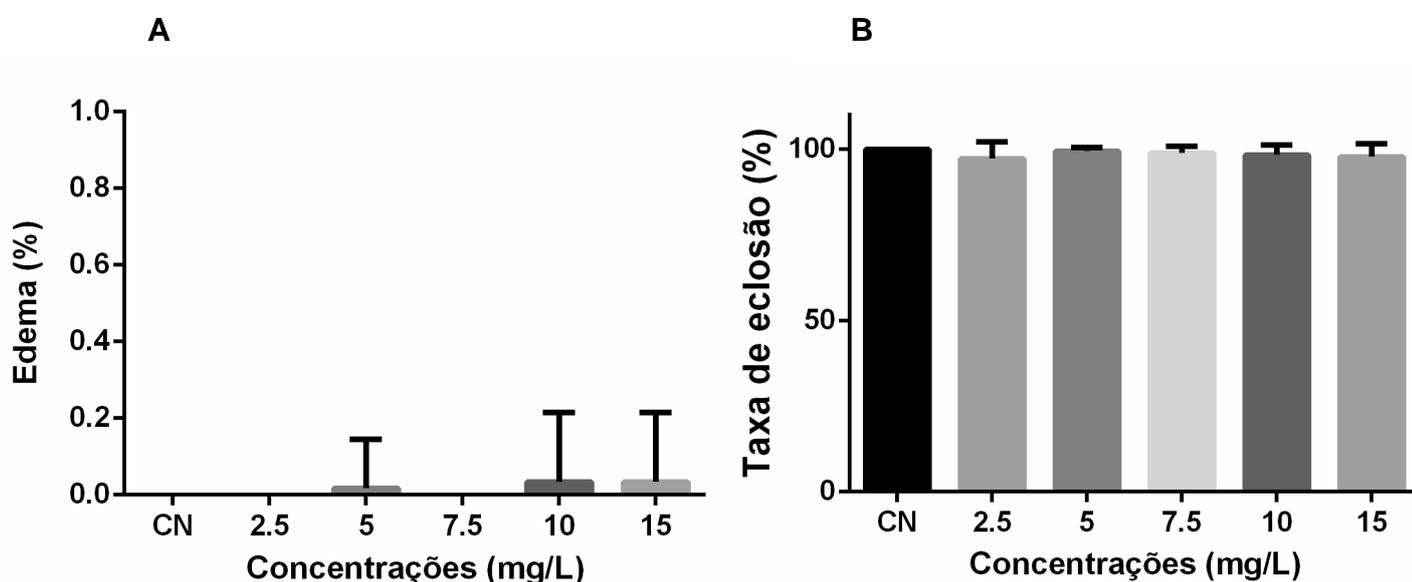
3.6. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, California, EUA). Foi realizada análise de variância one-way (ANOVA) e aplicado o pós-teste de Dunn para verificar diferenças significativas entre os tratamentos e controles. Todas as análises estatísticas foram realizadas com nível de significância de 0,05.

4.1. 1H-benzotriazol

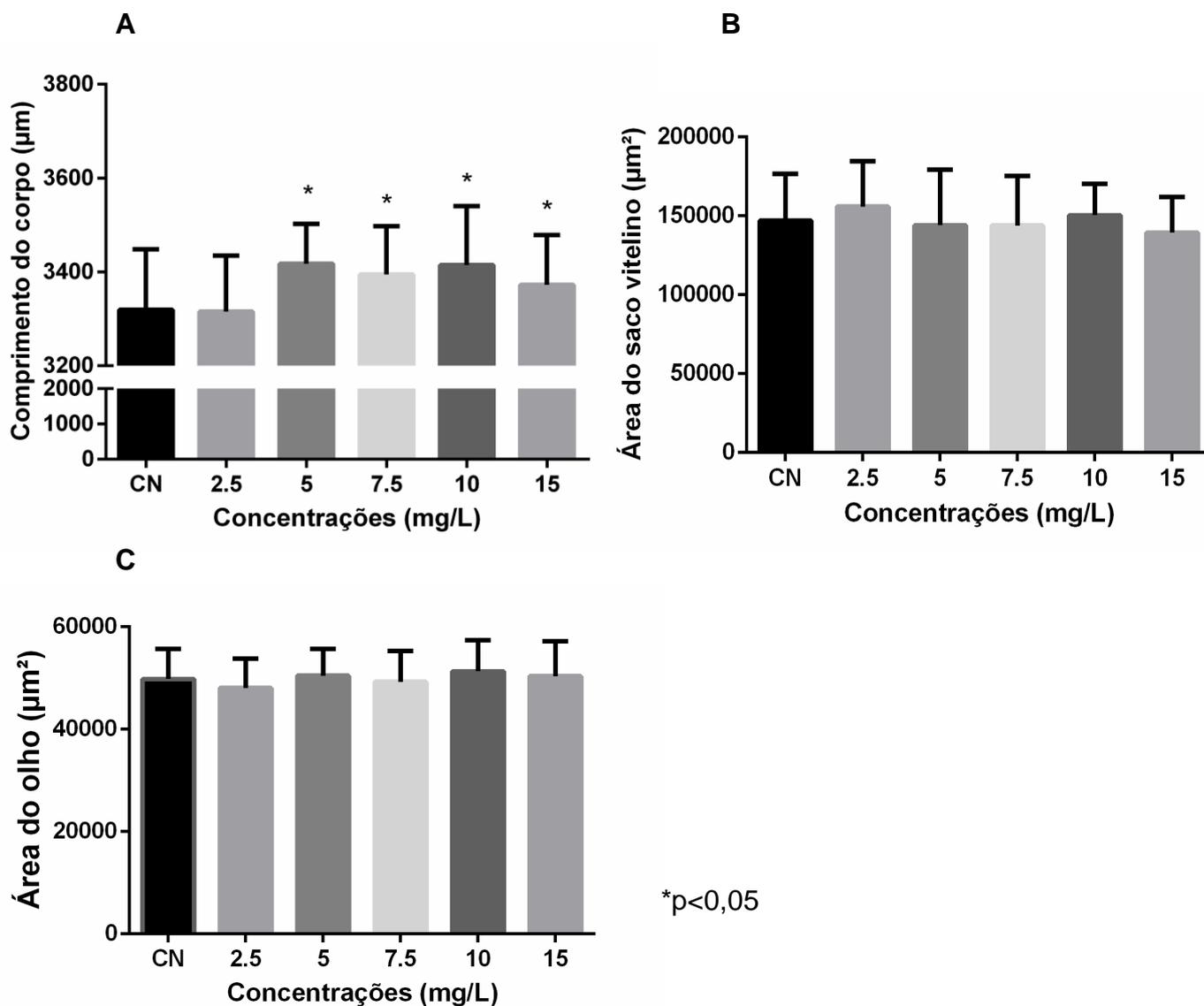
No ensaio de embriotoxicidade (FET) pudemos observar a presença de edema de saco vitelino e a alteração na taxa de eclosão nos embriões expostos ao 1H-benzotriazol, porém nenhuma concentração foi estatisticamente significativa em relação ao controle negativo (Figura 13). Nenhuma outra alteração morfológica foi observada durante o teste de embriotoxicidade nos embriões em até 96 hpf.

Figura 13. Resultado do ensaio de embriotoxicidade (FET) nos embriões expostos ao 1H-benzotriazol em 96 hpf. A) Porcentagem da presença de edema nos embriões em 96 hpf. B) Porcentagem da taxa de eclosão dos embriões em 96 hpf.



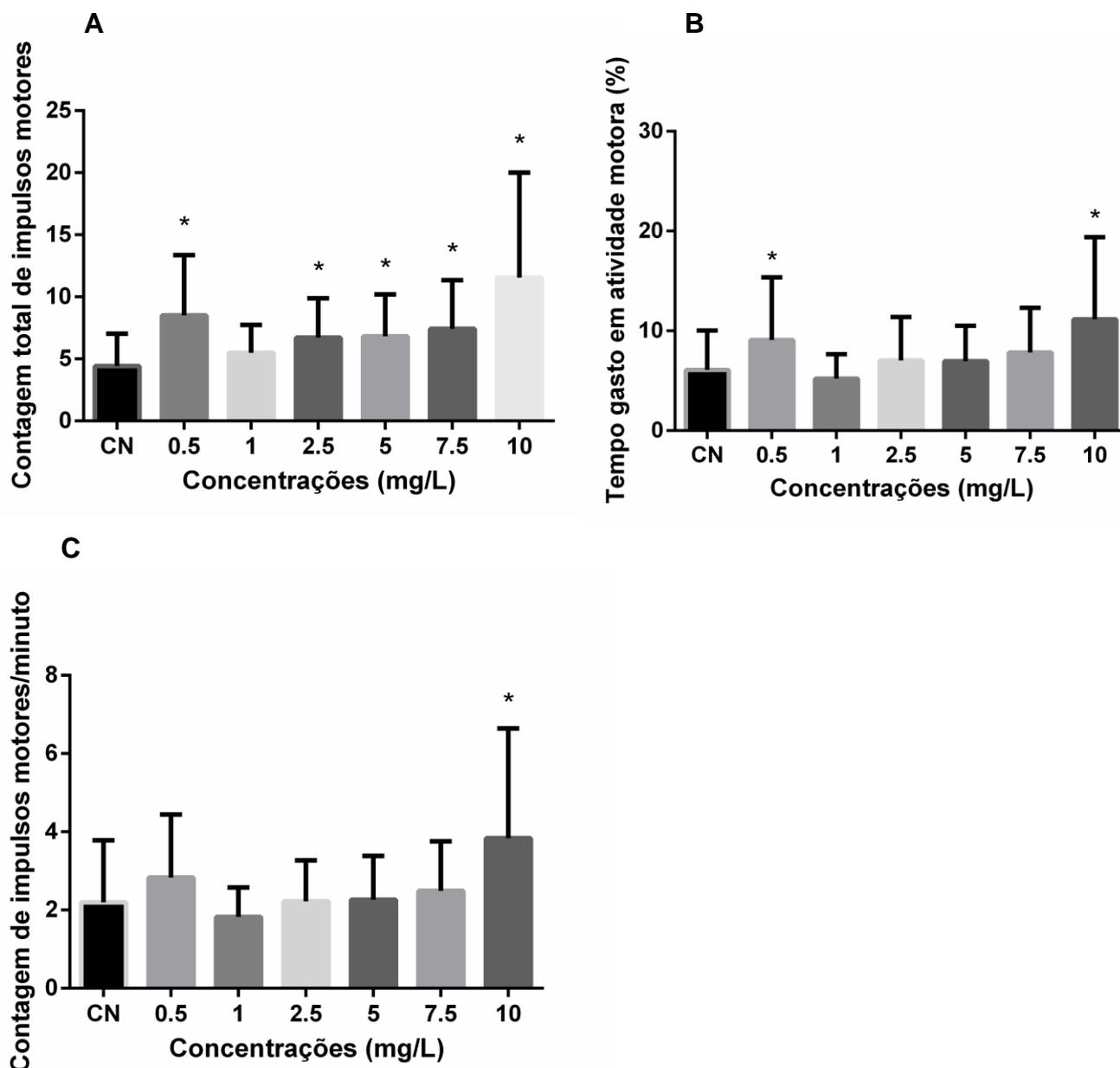
Já na análise morfométrica foi possível observar um aumento do comprimento do corpo dos embriões nas concentrações de 5; 7,5; 10 e 15 mg/L, porém na concentração 2,5 mg/L não houve diferenças significativas. A concentração 5 mg/L teve um aumento médio de 2,9 % do corpo dos embriões com relação ao controle negativo, nas concentrações de 7,5 e 10 mg/L ambas tiveram um aumento médio de 2,2 % e na concentração 15 mg/L o aumento foi de 1,6 %. Na avaliação da área do olho e saco vitelino não foram observadas alterações nos parâmetros morfométricos dos embriões expostos ao 1H-benzotriazol em 96 hpf (Figura 14).

Figura 14. Resultado dos parâmetros morfométricos dos embriões expostos ao composto 1H- benzotriazol em 96 hpf. A) Comprimento do corpo do embrião. B) Área do saco vitelino. C) área do olho. * $p < 0,05$



Na figura 15, podemos observar que a contagem total de impulsos motores, ou seja, o número de vezes que o embrião se moveu, foram maiores nas concentrações de 0,5; 2,5; 5; 7,5 e 10 mg/L do que no controle negativo. Já o tempo gasto de atividade motora (porcentagem de tempo em que os embriões estavam em movimento) foi maior nas concentrações 0,5 e 10 mg/L com relação ao tempo que os embriões do controle negativo se moveram. Na contagem de impulsos motores por minuto apenas a concentração de 10 mg/L foi estatisticamente significativa com relação ao controle negativo.

Figura 15. Resultados da análise de movimentação aos embriões expostos ao 1H-benzotriazol em 24 hpf. A) Apresenta-se a contagem de impulsos motores. B) O tempo gasto em atividade e C) A contagem de impulsos motores por minuto. * $p < 0,05$



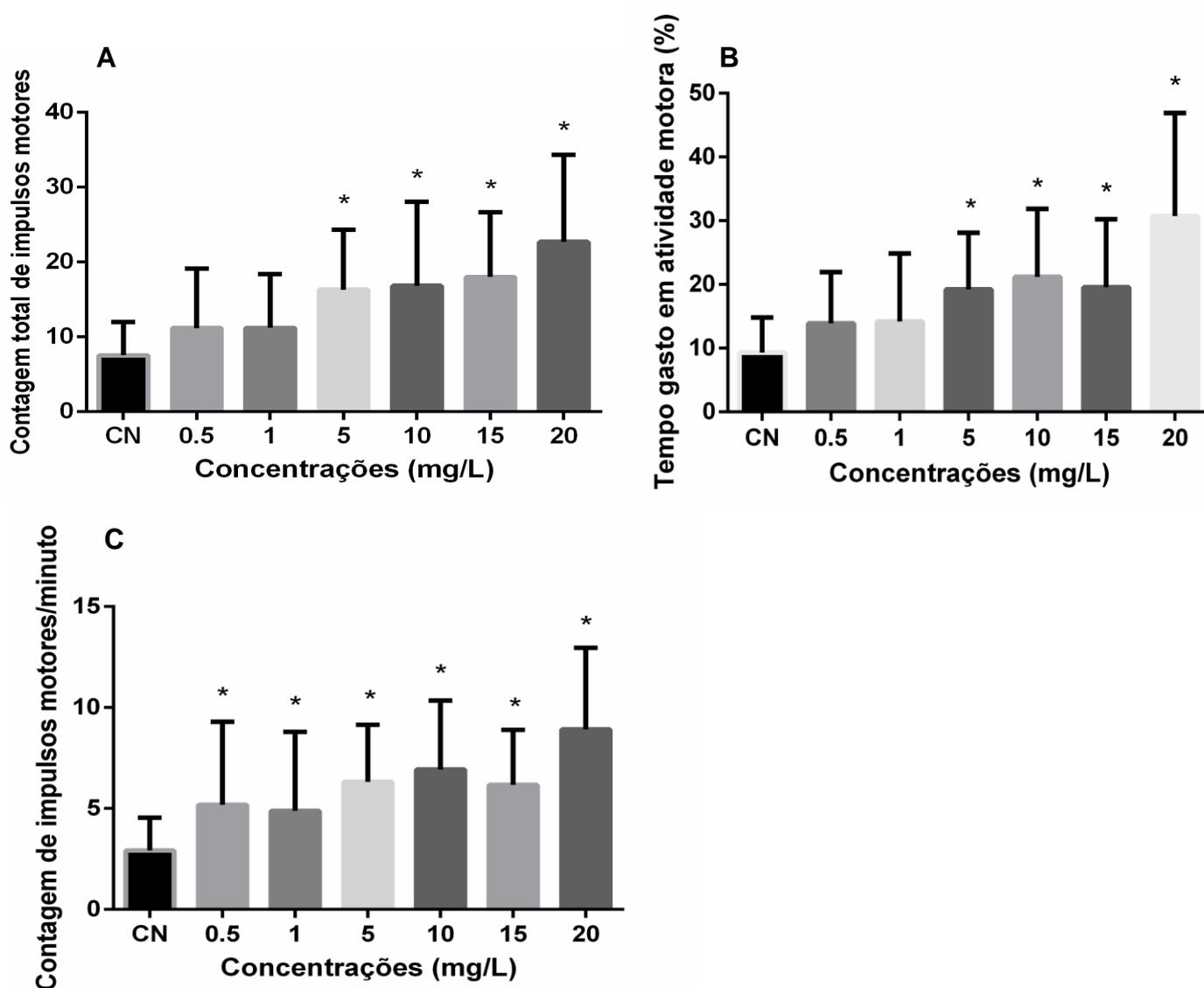
4.2. 5-Cloro benzotriazol

A análise de movimentação apresentou diferenças significativas com a exposição do embrião ao 5-Cloro benzotriazol em 26 hpf. A contagem total de impulsos motores (o número de vezes que o embrião se moveu) e o tempo gasto em atividade motora (porcentagem de tempo em que os embriões estavam em movimento) foi maior a partir da concentração 5 mg/L com relação ao controle

negativo. Porém, na contagem de impulsos motores por minuto em todas as concentrações os embriões se moveram mais do que no controle negativo (Figura 16).

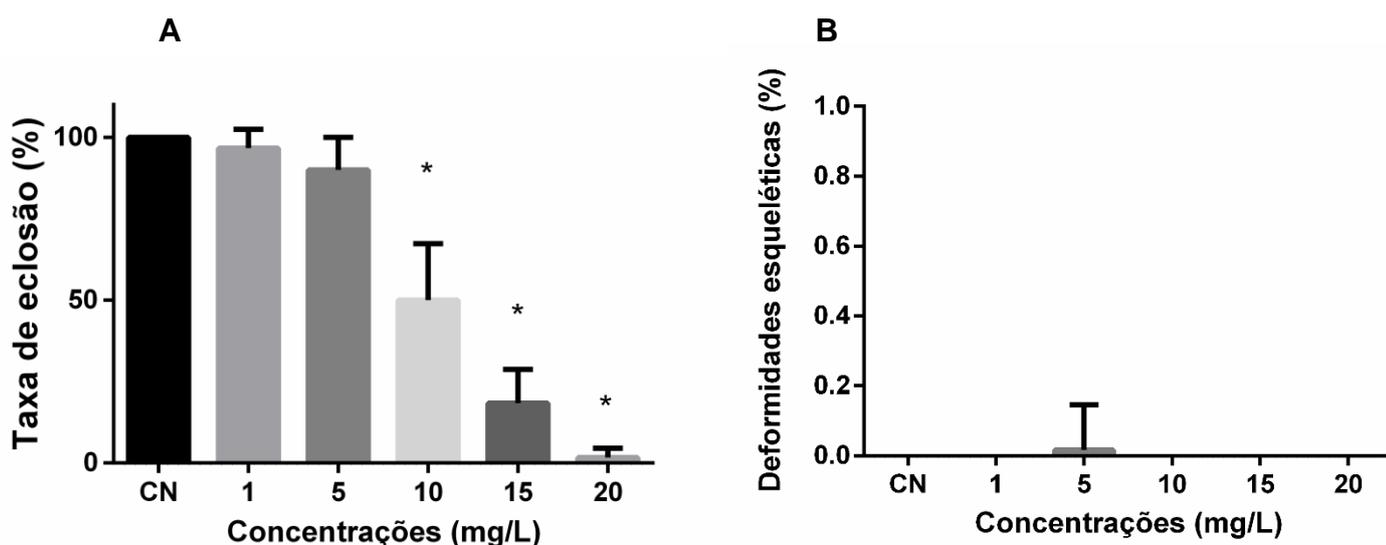
A análise de movimentação tem como período de exposição de apenas 26 hpf, a menor concentração avaliada com o 5-Cloro benzotriazol foi de 0,5 mg/L diferente das análises de embriotoxicidade, pois o objetivo era observar se o composto em concentração mais baixa e em pouco tempo de exposição era possível alterar o padrão de movimentação dos embriões.

Figura 16. Resultados da análise de movimentação aos embriões expostos ao 5-Cloro benzotriazol em 24 hpf. A) Contagem de impulsos motores. B) Tempo gasto em atividade e C) Contagem de impulsos motores por minuto. * $p < 0.05$



No ensaio de embriotoxicidade observou-se que os embriões expostos ao 5-Cloro benzotriazol nas concentrações de 10, 15 e 20 mg/L tiveram uma inibição na eclosão de forma dose-dependente, nas concentrações de 1 e 5 mg/L não foram observadas diferenças significativas na eclosão (Figura 17). Também foi observada a presença de deformidades esqueléticas durante o teste, porém nenhuma concentração foi estatisticamente significativa com relação ao controle negativo (Figura 17). Nenhuma outra alteração no teste de embriotoxicidade (FET) foi observada nos embriões.

Figura 17. Resultado da análise de embriotoxicidade (FET) nos embriões expostos ao 5-cloro benzotriazol em 96 hpf. A) Porcentagem da taxa de eclosão dos embriões expostos ao 5-Cloro benzotriazol em 96 hpf. B) Porcentagem de deformidades esqueléticas encontradas nos embriões expostos ao 5-cloro benzotriazol em 96 hpf. * $p < 0.05$

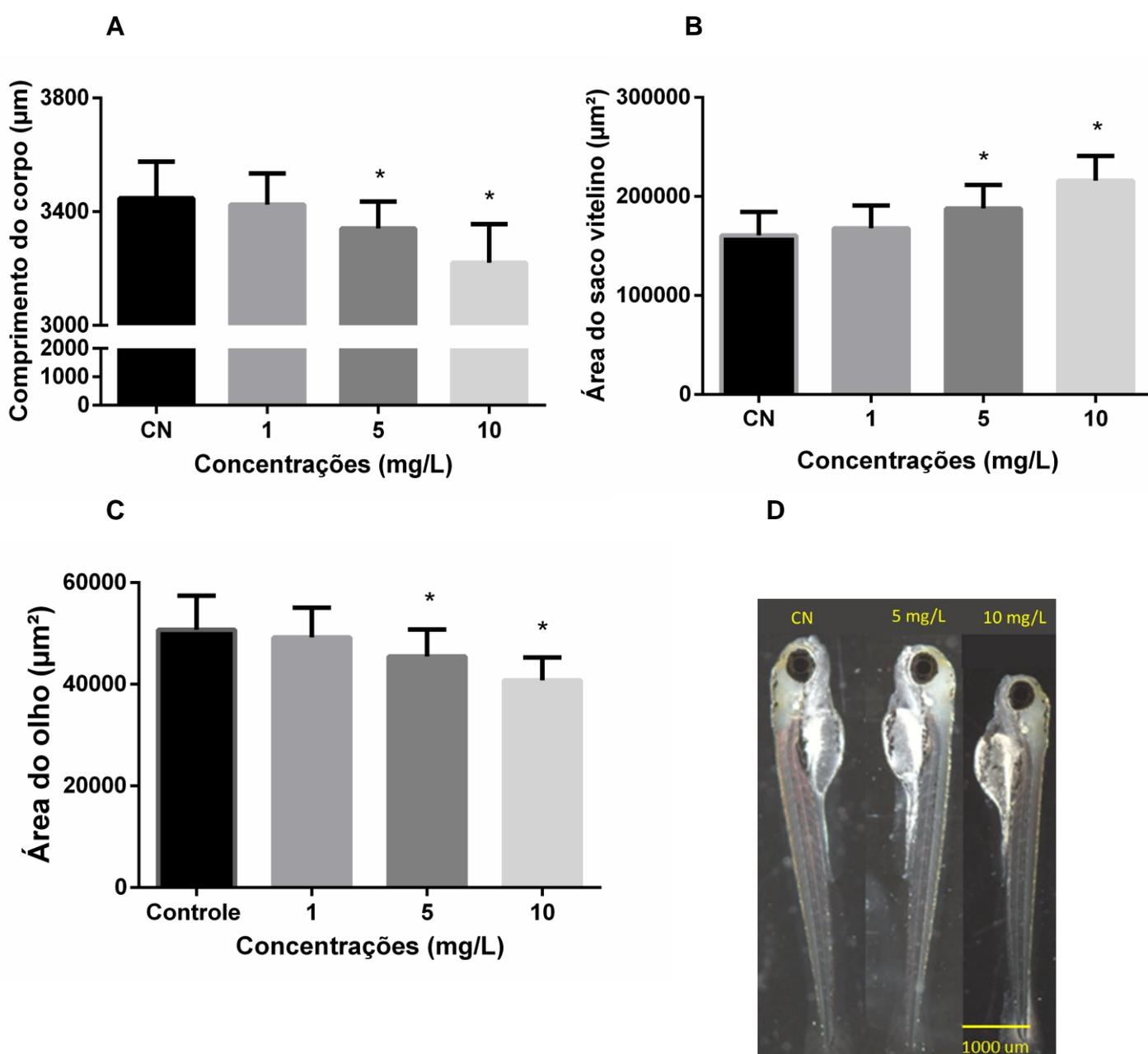


Na análise morfométrica podemos observar que as concentrações de 5 e 10 mg/L apresentaram uma diminuição de 3,1 % e 6,6 % do comprimento do corpo dos embriões com relação ao controle negativo, respectivamente. Já na área do saco vitelino houve um aumento de 16,9% em 5 mg/L e 34,3 % em 10 mg/L com relação ao controle. Por fim, a área do olho teve um decréscimo em 10,3 % em 5 mg/L e 19,5 % em 10 mg/L com relação ao controle negativo, porém a concentração de 1 mg/L não apresentou nenhuma alteração significativa com relação ao controle (Figura 18).

Para a realização das análises morfométricas é necessária a eclosão dos embriões, uma vez que eles necessitam estar posicionados lateralmente para medi-

los corretamente. Dessa forma, os embriões avaliados nessa análise foram das concentrações 1, 5 e 10 mg/L. Na concentração de 10 mg/L 50% dos embriões eclodiram, logo estes foram avaliados (n=30). Porém nas concentrações de 15 e 20 mg/L não foi possível analisar, pois a maioria dos embriões apresentaram inibição na eclosão.

Figura 18. Resultado dos parâmetros morfométricos dos embriões expostos ao composto 5-Cloro benzotriazol em 96 hpf. A) Comprimento do corpo do embrião. B) Área do saco vitelino. C) área do olho. D) Figura de comparação dos organismos expostos em 96 hpf (Aumento 1,25 X). *p<0,05



Há poucos estudos em animais aquáticos sobre o efeito do 5-Cloro benzotriazol, encontrando apenas um estudo realizado por Giraudo e colaboradores, onde foi realizada a exposição aguda e crônica do 5-Cloro benzotriazol em *Daphnia magna*, e observou que em 48 horas de exposição a LC₅₀ é de 28,73 mg/L e na exposição crônica a única alteração que se verificou foi a diminuição da ecdise em concentrações de 2 µg/L e 2 mg/L (GIRAUDO et al., 2017). Porém, até onde sabemos, não há estudos do 5-Cloro benzotriazol em zebrafish, sendo este presente trabalho o primeiro a relatar efeitos com este composto.

Um dos efeitos observados em nosso trabalho foi a diminuição da taxa de eclosão nos embriões em concentrações de 10, 15 e 20 mg/L de 5- Cloro benzotriazol. A eclosão é um importante processo no ciclo de vida do *Danio rerio*, ela pode acontecer esporadicamente durante todo o terceiro dia de vida do embrião, entretanto pode acontecer alterações no seu tempo, um atraso ou adiantamento, fazendo com que a probabilidade de sobrevivência desse animal no ambiente seja menor do que aquele que teve uma eclosão no tempo correto (KIMMEL et al., 1995; SKAULI; REITAN; WALTHER, 2000).

Para ocorrer o processo da eclosão são necessários 2 fatores: o fator químico e o físico, ou seja, para o rompimento do córion são necessárias enzimas que clivam o córion (fator químico) e em conjunto o embrião deve realizar movimentos espontâneos para conseguir de fato a quebra dele (fator físico) (GASPAR et al., 1999; SCHOOTS; STIKKELBROECK, 1982). No presente trabalho, podemos observar pela análise de movimentação que ocorreu um aumento dos movimentos espontâneos dos embriões expostos ao 5-Cloro benzotriazol, logo provavelmente a causa da diminuição da eclosão não esteja correlacionada ao fator físico.

Um estudo conduzido por Jin e seus colaboradores, observaram que o composto Bifentrina era capaz de aumentar os movimentos espontâneos dos embriões de zebrafish expostos a ele e com isso acelerar o seu processo de eclosão (JIN et al., 2009). Entretanto, foi possível observar no presente trabalho o processo oposto disso, então provavelmente a causa da diminuição da taxa de eclosão com a exposição do 5-Cloro benzotriazol seja devido a um processo químico.

Um estudo conduzido por De la Paz e seus colaboradores, expuseram embriões de zebrafish a fungicidas triazóis (Triadimefon, Triadimenol e o triazol livre), que possuem a mesma estrutura básica (Triazol) dos benzotriazóis (PAZ et al., 2017). O

trabalho demonstrou que os embriões tiveram a sua taxa de eclosão diminuída após a exposição a todos os compostos testados e que, especificamente, o composto Triadimefon, similarmente ao observado com o 5-cloro benzotrizol, também induziu um aumento na movimentação dos embriões (PAZ et al., 2017). Os autores também observaram que os fungicidas triazóis eram capazes de bloquear a glândula responsável por secretar as enzimas que clivam o córion, ou seja, nesse trabalho foi possível compreender que estes compostos constituídos por triazol em sua estrutura e até mesmo o triazol livre, era capaz de inibir a eclosão dos embriões de maneira química (PAZ et al., 2017).

No presente trabalho não é possível afirmarmos que esse processo também ocorreu, porém é uma hipótese do que poderia ter acontecido com a exposição do 5-Cloro benzotriazol com relação a taxa de eclosão diminuída.

Já o 1H-benzotriazol não apresentou alteração na taxa de eclosão e ele também é constituído pela mesma molécula de triazol, no trabalho de De la Paz foi também observado que em concentrações menores a taxa de eclosão não se alterou com fungicidas e o triazol livre (PAZ et al., 2017), logo o mesmo poderia ter acontecido com o 1H-benzotriazol, nesse caso a concentração parece ser o fator determinante no efeito sobre a eclosão dos embriões.

O saco vitelino é uma estrutura que desempenha um papel importante para o desenvolvimento embrionário do zebrafish, pois através dele o embrião recebe hormônios, nutrientes, fatores de crescimento e proteínas (HERBOMEL; THISSE; THISSE, 1999; RALDÚA; ANDRÉ; BABIN, 2008), apenas em 120 hpf as larvas começam sua alimentação extrínseca (STRÄHLE et al., 2012).

Os embriões expostos ao 5 –Cloro benzotriazol apresentaram um aumento do tamanho do saco vitelino. Essa alteração na estrutura pode estar relacionada a causa do retardo do crescimento do embrião, uma vez que o saco vitelino é a fonte de energia e de outros fatores, assim os embriões podem não ter recebido os nutrientes necessários para seu desenvolvimento correto. Um estudo realizado em 2008 corrobora com essa hipótese, pois aponta que em ambientes controlados o tamanho do saco vitelino é inversamente proporcional ao tamanho do embrião (RALDÚA; ANDRÉ; BABIN, 2008). Já os organismos expostos ao 1H-benzotriazol não apresentaram alteração na área do saco vitelino e também não tiveram um retardo no seu crescimento, em vez disso os embriões expostos ao 1H-benzotriazol tiveram um

aumento do seu crescimento, porém essa alteração no corpo da larva não irá prejudicar seu desenvolvimento posterior.

O 5-cloro benzotriazol também diminuiu a área do olho dos embriões em concentrações de 5 e 10 mg/L. Não podemos especificar qual estrutura foi diretamente afetada no desenvolvimento do olho, porém uma redução ocular pode indicar uma diminuição da proliferação de células neuronais ou um aumento da apoptose, de qualquer maneira esse efeito pode prejudicar a visão do peixe e assim afetando posteriormente a seleção de parceiros e a capacidade de evitar a predação (OOK; ARADISE; OM, 2005).

A análise de movimentação em zebrafish é utilizada para a detecção de compostos com potencial efeito neurotóxicos em estágios recentes de desenvolvimento (24 hpf) (SELDERSLAGHS et al., 2020). No atual trabalho foi possível observar que a exposição ao 1H-benzotriazol e 5 -Cloro benzotriazol induziram um aumento da movimentação nos embriões, o que pode futuramente resultar em uma interferência no padrão de natação desses peixes, prejudicando sua sobrevivência no ambiente, o que pode ser futuramente avaliado com a realização de análises de atividade de locomoção em larvas com maior estágio de desenvolvimento (144hpf). Um trabalho realizado em 2017, observou que os embriões expostos ao fungicida Triadimefon, que também possui a molécula de triazol na sua estrutura, apresentaram uma hiperatividade com 3 dias pós fertilização, sugerindo que o triazol tenha uma relação com a hiperatividade observada (PAZ et al., 2017).

Diferente do 5-Cloro benzotriazol, na literatura há trabalhos avaliando a exposição ao composto 1H-benzotriazol em zebrafish. O estudo publicado por Damalas e seus colaboradores que calcularam a LC_{50} em 170 mg/L, corroborando com o nosso trabalho em que não foi constatada a presença de mortalidade nos embriões até a maior concentração testada de 15 mg/L (DAMALAS et al., 2018). Além disso, no trabalho de Damalas foi demonstrado o aparecimento de edema de pericárdio em concentrações maiores ou igual a 100 mg/L, também corroborando com nosso trabalho em que não foi constatada alterações morfológicas, nas concentrações testadas (DAMALAS et al., 2018). Nosso trabalho, no entanto, é o primeiro a observar diferenças na movimentação em estágios iniciais de desenvolvimento.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, é possível concluir que nas condições dos tratamentos:

- O 1H-benzotriazol e 5-Cloro benzotriazol induziram um aumento na movimentação dos embriões de zebrafish em estágios iniciais do desenvolvimento, apresentando um potencial efeito neurotóxico;

- O 5-Cloro benzotriazol induziu diminuição na eclosão dos ovos a partir da concentração de 5 mg/L e alterou parâmetros morfométricos, tais como redução do crescimento dos embriões, aumento da área do saco vitelino e diminuição da área dos olhos;

- O 1H-benzotriazol não induziu alterações morfológicas que prejudicassem o desenvolvimento dos embriões.

Nosso trabalho demonstra assim que o 5-cloro benzotriazol apresenta uma maior toxicidade que o 1H-benzotriazol aos estágios iniciais de desenvolvimento do zebrafish em estágio embrio-larvais.

6.1. Considerações finais

As concentrações utilizadas dos compostos estudados no atual trabalho são maiores do que aquelas encontradas no ambiente, entretanto a investigação dos efeitos desses compostos sobre o zebrafish é relevante para o entendimento do mecanismo de ação tóxica dessa classe de compostos para o qual não se tem uma grande quantidade de trabalhos publicados na literatura. Além disso, é importante considerar a possibilidade de exposição crônica a esses compostos tanto pelos animais aquáticos quanto pela população humana, uma vez que os benzotriazóis são estáveis no ambiente e não são degradados totalmente nas estações de tratamento de água, atingindo a água para consumo humano.

Os resultados obtidos nesse trabalho agregados aos já existentes na literatura científica auxiliará na compreensão de mecanismos que possam gerar um efeito neurotóxico e a falha na eclosão dos ovos de zebrafish, dando subsídios para a avaliação de risco dessa classe de compostos amplamente utilizados no mundo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda — Método de ensaio com peixes (Cyprinidae). Terceira Edição, 25 p. 2016.

AGAFONKINA, M. O. et al. Formation of Protective Layers by 5 Chlorobenzotriazole and its Mixture with Sodium Fluphenamate on Low Carbon Steel from Aqueous Solutions. **Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces**, v. 48, n. 7, p. 773–779, 2012.

ASIMAKOPOULOS, A. G. et al. Benzotriazoles and benzothiazoles in human urine from several countries : A perspective on occurrence , biotransformation , and human exposure. **Environment International**, v. 59, p. 274–281, 2013.

BERRI, S. et al. Simple Extraction and HPLC Determination of UV-A and UV-B Filters in Sunscreen Products. **Chromatographia**, v. 64, n. 23, p. 509–515, 2006.

BOIDO, A. et al. Antiinflammatory and antinocicepti v e acti v ities of some benzotriazolylalkanoic acids. **Il Farmaco**, v. 58, p. 33–44, 2003.

BOROWSKI, P. et al. Halogenated benzimidazoles and benzotriazoles as inhibitors of the NTPase / helicase activities of hepatitis C and related viruses. **Eur. J. Biochem**, v. 1653, p. 1645–1653, 2003.

BRIGUGLIO, I. et al. European Journal of Medicinal Chemistry Benzotriazole : An overview on its versatile biological behavior. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 1–37, 2014.

CANTWELL, M. G.; SULLIVAN, J. C.; BURGESS, R. M. Benzotriazoles : History , Environmental Distribution , and Potential Ecological Effects. In: **Persistent Organic Pollutants**. [s.l.] Elsevier, 2015. v. 67p. 513–545.

CARTA, A. et al. Synthesis and antiproliferative activity of 3-aryl-2- (1 H - benzotriazol- 1-yl) acrylonitriles . Part III. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 891_ – 900, 2002.

CASTILLO, R.; AMERICA, S. Benzotriazoles and Indazoles Are Scaffolds with Biological Activity against. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 16, n. 8, p. 862–868, 2011.

COSTA, A. D.; SHEPHERD, I. T. Zebrafish Development and Genetics : Introducing in a Large Introductory Laboratory Class. **ZEBRAFISH**, v. 6, n. July 2009, p. 169–177, 2014.

DAMALAS, D. et al. ASSESSMENT OF THE ACUTE TOXICITY, UPTAKE AND BIOTRANSFORMATION POTENTIAL OF BENZOTRIAZOLES IN ZEBRAFISH (DANIO RERIO) LARVAE COMBINING HILICWITH RPLC-HRMS FOR HIGH THROUGHPUT IDENTIFICATION. **Environmental Science & Technology**, v. 52, p. 6023–6031, 2018.

DISOUZA, J. I. Benzotriazole derivatives as Antimicrobial Agents. **Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. July 2012, p. 123–130, 2012.

DURJAVA, M. K. et al. Experimental Assessment of the Environmental Fate and Effects of Triazoles Experimental Assessment of the Environmental Fate and Effects of Triazoles and Benzotriazole. **ATLA**, v. 41, n. April 2014, p. 65–75, 2013.

EUROPEAN COMMISSION. **EURL ECVAM Recommendation on the Zebrafish Embryo Acute Toxicity Test Method (ZFET) for Acute Aquatic Toxicity Testing**. [s.l: s.n.].

FENT, K. et al. Science of the Total Environment Benzotriazole UV-stabilizers and benzotriazole : Antiandrogenic activity in vitro and activation of aryl hydrocarbon receptor pathway in zebra fi sh. **Science of the Total Environment, The**, v. 482–483, p. 125–136, 2014.

GASPAR, I. et al. The hatching gland cells of trout embryos : characterisation of N- and O-linked oligosaccharides. **J. Anat.**, p. 109–118, 1999.

GINGER, W.; SCHAFFNER, C.; KOHLER, E. H.-P. Benzotriazole and Tolyltriazole as Aquatic Contaminants . 1 . Input and Occurrence in Rivers and Lakes †. **Environ. Sci. Technol.**, v. 40, n. 23, p. 7186–7192, 2006.

GIRAUDO, M. et al. Transcriptomic , cellular and life-history responses of *Daphnia magna* chronically exposed to benzotriazoles : Endocrine- disrupting potential and molting effects. **Plos one**, v. 14, p. 1–24, 2017.

HART, D. S. et al. Sorption and partitioning parameters of benzotriazole compounds. **Microchemical Journal**, v. 77, p. 9–17, 2004.

HELLER, H.; KELLER, E.; MINDERMANN, F. **United States Patent Office** United States, 1961.

HERBOMEL, P.; THISSE, B.; THISSE, C. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. **Development**, v. 126, p. 3735–3745, 1999.

HILL, A. J. et al. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 6–19, 2005.

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

JANNA, H. et al. From Dishwasher to Tap Xenobiotic Substances Benzotriazole and Tolyltriazole in the Environment. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 3858–3864, 2011.

JIN, M. et al. Developmental toxicity of bifenthrin in embryo-larval stages of zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 95, p. 347–354, 2009.

JUNGCLAUS, G. A.; LOPEZ-AVILA, V.; HITES, R. A. Organic Compounds in an Industrial Wastewater : A Case Study of Their Environmental Impact. **Environmental**

Science & Technology, p. 88–96, 1978.

KIMMEL, C. B. et al. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. **DEVELOPMENTAL DYNAMICS**, v. 10, p. 255–310, 1995.

KISS, A.; FRIES, E. Occurrence of benzotriazoles in the rivers Main , Hengstbach , and Hegbach (Germany). **Environ Sci Pollut Res**, v. 9, p. 702–710, 2009.

KUNKEL, U. et al. Benzotriazole UV stabilizers in sediments , suspended particulate matter and fi sh of German rivers : New insights into occurrence , time trends and persistency *. **Environmental Pollution**, v. 212, p. 401–412, 2016.

LAMMER, E. et al. Toxicology in Vitro Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (Danio rerio). **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 7, p. 1436–1442, 2009.

LEERDAM, J. A. VAN et al. Determination of polar 1H-benzotriazoles and benzothiazoles in water by solid-phase extraction and liquid chromatography LTQ FT Orbitrap mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 282, p. 99–107, 2009.

LI, X. et al. Chemosphere Benzotriazoles and benzothiazoles in paired maternal urine and amniotic fl uid samples from Tianjin , China. **Chemosphere**, v. 199, p. 524–530, 2018.

LIU, W.; XUE, J.; KANNAN, K. Science of the Total Environment Occurrence of and exposure to benzothiazoles and benzotriazoles from textiles and infant clothing. **Science of the Total Environment**, v. 592, p. 91–96, 2017.

LIU, Y. et al. Occurrence and removal of benzotriazoles and ultraviolet fi lters in a municipal wastewater treatment plant. **Environmental Pollution**, v. 165, p. 225–232, 2012.

LOI, C. H. et al. Development of a solid-phase extraction liquid chromatography tandem mass spectrometry method for benzotriazoles and benzothiazoles in

wastewater and recycled water. **Journal of Chromatography A**, v. 1299, p. 48–57, 2013.

LOOS, R. et al. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 561–568, 2009.

LOPEZ-AVILA, V.; HITES, R. A. Organic Compounds in an Industrial Wastewater. Their Transport into Sediments. **Environmental Science & Technology**, p. 1382–1390, 1980.

LU, Z. et al. Science of the Total Environment Substituted diphenylamine antioxidants and benzotriazole UV stabilizers in blood plasma of fish, turtles, birds and dolphins from North America. **Science of the Total Environment**, v. 647, p. 182–190, 2019.

MALEC E, R. **Lubricating oil compositions containing trialkyl-substituted phenol and benzotriazole**USA, 1975.

MCGRATH, P.; LI, C. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. **REVIEWS Drug Discovery Today**, v. 13, n. May, p. 394–401, 2008.

MEIGHEN, A.; HOUTE, T. **HEAT EXCHANGE COMPOSITIONS**USA, 1957.

MIZUKAWA, A. et al. Sediments as a sink for UV filters and benzotriazoles: the case study of Upper Iguaçú watershed, Curitiba (Brazil). **Environ Sci Pollut Res**, v. 24, p. 18284–18294, 2017.

MONROE, G.; VISHWAKARMA, L. C. **Benzotriazole based UV absorbing compounds and photographic elements containing them**Alemanha, 1996.

NAGEL, R. Dar T: The Embryo Test with the Zebrafish *Danio rerio* – a General Model in Ecotoxicology and Toxicology. **ALTEX**, v. 19, p. 38–48, 2002.

NAKATA, H.; MURATA, S.; FILATREAU, J. Occurrence and Concentrations of Benzotriazole UV Stabilizers in Marine Organisms and Sediments from the Ariake Sea, Japan. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 18, p. 6920–6926, 2009.

OOK, L. E. W. C.; ARADISE, C. H. J. P.; OM, B. A. L. THE PESTICIDE MALATHION REDUCES SURVIVAL AND GROWTH IN DEVELOPING ZEBRAFISH. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 1745–1750, 2005.

PAZ, J. F. DE et al. Triazole Fungicides Inhibit Zebrafish Hatching by Blocking the Secretary Function of Hatching Gland Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, 2017.

PETERS, H.; MINKS, P.; SURMA, E. **Nitrite-free cooling fluids on the basis of glycols**Alemanha, 1985.

RALDÚA, D.; ANDRÉ, M.; BABIN, P. J. Clofibrate and gemfibrozil induce an embryonic malabsorption syndrome in zebrafish. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 228, p. 301–314, 2008.

SCARTONI, V.; BARAGATTI, B.; MARTINOTTI, E. Some structural changes on triazolyl-benzotriazoles and triazolyl-benzimidazolones as potential potassium channel. **Il Farmaco**, v. 56, p. 841–849, 2001.

SCHOOTS, A. F. M.; STIKKELBROECK, J. J. M. Hatching in Teleostean Fishes : Fine Structural Changes in the Egg Envelope during Enzymatic Breakdown in Vivo and in Vitro. **JOURNAL OF ULTRASTRUCTURE RESEARCH**, v. 196, p. 185--196, 1982.

SELDERSLAGHS, I. W. T. et al. Neurotoxicology and Teratology Locomotor activity in zebra fi sh embryos: A new method to assess developmental neurotoxicity. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 32, n. 4, p. 460–471, 2020.

SENTHIVEL, P. et al. **LUBRICATING GREASE COMPOSITION**USA, 2010.

SERRA-ROIG, M. P. et al. Science of the Total Environment Occurrence , fate and risk assessment of personal care products in river – groundwater interface. **Science of the Total Environment**, p. 1–9, 2016.

SHI, Z. et al. Science of the Total Environment Occurrence , toxicity and transformation

of six typical benzotriazoles in the environment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 661, p. 407–421, 2019.

SIPES, N. S.; PADILLA, S.; KNUDSEN, T. B. Zebrafish — As an Integrative Model for Twenty-first Century Toxicity Testing. **Birth Defects Research**, v. 267, n. Part C, p. 256–267, 2011.

SKAULI, K. S.; REITAN, J. B.; WALTHER, B. T. Brief Communication Hatching in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos Exposed to a 50 Hz Magnetic Field. **Bioelectromagnetics**, v. 410, n. September 1999, p. 407–410, 2000.

SPENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish , *Danio rerio*. **Biological Reviews**, v. 83, p. 13–34, 2008.

STRÄHLE, U. et al. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments — A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. **Reproductive Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 128–132, 2012.

SUDHIR, M. S.; NADH, R. V. Evaluation of i n vitro anthelmintic activities of novel 1 , 2 , 3 e benzotriazole derivatives synthesized in ultrasonic and solvent free conditions. **JOPR: Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 1, p. 47–52, 2013.

SWAMY, S. N. et al. Microwave-assisted synthesis of N -alkylated benzotriazole derivatives : Antimicrobial studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 999–1004, 2006.

UNIÃO EUROPEIA. **DIRECTIVA 2010/63/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO**. [s.l: s.n.].

WANG, L. et al. Widespread Occurrence of Benzotriazoles and Benzothiazoles in Tap Water: In fl uencing Factors and Contribution to Human Exposure. **Environ. Sci. Techno**, v. 50, p. 2709–2717, 2016.

WEISS, S.; REEMTSMA, T. Determination of Benzotriazole Corrosion Inhibitors from

Aqueous Environmental Samples by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 77, n. 22, p. 7415–7420, 2005.

ZHANG, C.; WILLETT, C.; FREMGEN, T. Zebrafish: An Animal Model for Toxicological Studies. **Current Protocols in Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 1–18, 2003.

ANEXO

Anexo A. Folha de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que o adendo da proposta intitulada "Avaliação de múltiplos parâmetros de toxicidade do 1H - benzotriazol e 5 - cloro benzotriazol em estágios embrionários de zebrafish", registrada sob nº 20.1.137.60.1, sob a responsabilidade de Flavia Carolina Ferreira Sampaio e Daniel Junqueira Dorta, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada *ad referendum* em 29/09/2020 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Colaborador: Danielle Palma de Oliveira

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/10/2020 a 21/06/2021
Espécie/Linhagem/Raça	Peixe Danio rerio
Nº de animais	5.460
Peso/Idade	Embrião - até 96 hrs pós-fertilização
Sexo	Indiferente
Origem	Biotério de Toxicologia Ambiental da FCFRP

Ribeirão Preto, 29 de setembro de 2020.


 Ana Patrícia Yatsuda Natsui
 Coordenadora da CEUA-FCFRP