

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos
Trópicos

ANA CARLA DOS SANTOS WANDERLEY

**EFEITOS DO INSETICIDA SULFOXAFLORE E DA SUA FORMULAÇÃO COMERCIAL
NO DESENVOLVIMENTO EMBRIO-LARVAL DO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

MACEIÓ - ALAGOAS
Julho de 2025

ANA CARLA DOS SANTOS WANDERLEY

**EFEITOS DO INSETICIDA SULFOXAFLOR E DA SUA FORMULAÇÃO COMERCIAL
NO DESENVOLVIMENTO EMBRIO-LARVAL DO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre/Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Conservação da Biodiversidade Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Lázaro Wender Oliveira de Jesus

Co-orientador: Prof. Dr. Robson Guimarães dos Santos

**MACEIÓ - ALAGOAS
Julho/2025**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

W245e Wanderley, Ana Carla dos Santos.

Efeitos do inseticida sulfoxaflor e da sua formulação comercial no desenvolvimento embrio-larval do zebrafish (*Danio rerio*) / Ana Carla dos Santos Wanderley. – 2025.

76 f. : il. color.

Orientador: Lázaro Wender Oliveira de Jesus.

Coorientador: Robson Guimarães dos Santos.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos. Maceió, 2025.

Inclui bibliografias.

1. Inseticida sulfoxaflor. 2. Ecotoxicologia. 3. Toxicidade em peixes. I. Título..

CDU: 574.64:597.2/.5

Folha de aprovação

Ana Carla dos Santos Wanderley

Efeitos do inseticida sulfoxaflor e da sua formulação comercial no desenvolvimento embrio-larval do zebrafish (*Danio rerio*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS na área da Biodiversidade.

Dissertação aprovada em 21 de julho de 2025.

Documento assinado digitalmente
gov.br LAZARO WENDER OLIVEIRA DE JESUS
Data: 21/07/2025 18:05:12-0300
verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr.^(a)Presidente – Lázaro Wender Oliveira de Jesus/UFAL
(orientador)

Documento assinado digitalmente
gov.br ROBSON GUIMARAES DOS SANTOS
Data: 22/07/2025 10:00:58-0300
verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr.^(a) Robson Guimarães dos Santos
(coorientador)

Documento assinado digitalmente
gov.br DAVI FELIPE FARIAS
Data: 21/07/2025 20:25:44-0300
verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. ^(a) – Davi Felipe Farias

Documento assinado digitalmente
gov.br THIAGO LOPES ROCHA
Data: 21/07/2025 18:58:17-0300
verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr.^(a) – Thiago Lopes Rocha

Documento assinado digitalmente
gov.br TAMI MOTT
Data: 21/07/2025 21:05:17-0300
verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. ^(a) – Tami Mott

MACEIÓ - AL

Julho/2025

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Mariângela, por todo carinho e apoio incondicional, por ser o ombro que sempre procuro em dias difíceis, por todas às vezes que acreditou em mim e por ter sido mais tantas o meu porto seguro. Estarei com a senhora sempre, ainda que fisicamente distante. Ao meu pai, Rogério, por ter me ensinado o valor da coragem para ir mais longe, pelas palavras de incentivo para que eu fosse atrás do que eu desejasse. À ambos, obrigada por, debaixo de muito sol, terem me feito chegar até aqui.

À minha irmã Julia, que é o maior alicerce da minha vida e a minha melhor amiga. Obrigada por toda a troca que temos, por continuar presente na vida dos nossos pais para que eu pudesse ir mais longe, e por sempre acreditar em mim. Você é brilhante. Eu te amo e te admiro infinitamente. Para sempre a minha jujuba vermelha.

À minha família, em especial aos meus avós (*in memoriam*), por todo carinho e apoio, e às minhas tias, Marielvys, Marilene, Every, Ariana e Luiza (*in memoriam*) por sempre serem exemplos como profissionais e como pessoas. Admiro todas vocês. Obrigada por todos os abraços, por terem sido tantas vezes meu refúgio em dias difíceis, e por me ensinarem o valor das minhas raízes. À minha prima Maria Eduarda, pela infância e pelos sonhos compartilhados e pelas lembranças que me acompanham sempre.

Aos amigos que conheci na Universidade Federal de Alagoas que acompanharam a pós-graduação e a tornaram mais leve. Aos meus amigos e integrantes do LABSET, Roberto, Elton e Ana, obrigada pelas risadas, pelo apoio, e pelos momentos de desespero (rs). Sou muito grata por compartilhar o trabalho e a vida com vocês.

Aos amigos que a vida trouxe, em especial Morgana, Bianca, Kalênia, Gabriel e Mário, que fizeram parte de todas as fases, que me ouviram centenas de vezes e sempre tornaram tudo melhor. Obrigada por tudo! Amo vocês. E também aos amigos que fiz em terras botucatuenses, em especial Rian, Cláudia, Cristina e Janaína, por todos os momentos que tornaram a vida aqui a melhor possível.

Ao meu orientador Prof. Dr. Lázaro Wender Oliveira de Jesus, pela confiança, pelos conselhos e por todo o tempo dedicado. Obrigada por ser um exemplo como profissional. Guardarei com carinho todo esse período que integrei o laboratório.

Aos membros da banca de qualificação e de defesa, prof. Dra. Tamí Mott, Dr. Guilherme Malafaia, Dr. Flávio Rodrigues, Dr. Thiago Rocha e Dr. Felipe Farias, pelo tempo dedicado na correção da dissertação e do artigo, assim como por todas as considerações apontadas.

À UFAL, ao ICBS e ao Programa de pós-graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos (DIBICT), por terem permitido a realização do sonho do mestrado, assim como aos professores e à Juliene, por toda disponibilidade e assistência. Também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ainda, à Universidade Estadual Paulista (UNESP) e ao Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) por ter permitido a execução de grande parte deste projeto. Ao Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega do DBEF/IBB pelo compartilhamento do biotério de zebrafish e demais equipamentos.

“Todo caminho da gente é resvaloso.
Mas também, cair não prejudica demais – a
gente levanta, a gente sobe, a gente volta!
O correr da vida embrulha tudo, a vida é
assim: esquenta e esfria, aperta e daí
afrouxa, sossega e depois desinquieta. O
que ela quer da gente é coragem.”

João Guimarães Rosa

(em *Grande Sertão Veredas*)

RESUMO

O uso intensivo de agrotóxicos na agricultura moderna, aliado à escassez de dados sobre os efeitos de novas substâncias químicas em organismos não-alvo, representa uma ameaça crescente à biodiversidade aquática, sobretudo em ecossistemas tropicais. Dentre os diversos compostos empregados, destaca-se o inseticida sulfoxaflozina (SFX), recentemente introduzido no mercado como uma alternativa aos neonicotinóides e aplicado no controle de insetos sugadores de seiva da ordem Hemiptera. Este composto tem atraído crescente atenção devido à sua ampla aplicação, à toxicidade em organismos não-alvo e à sua capacidade de alcançar ambientes aquáticos por deriva, lixiviação e escoamento superficial. Diante desse cenário, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos ecotoxicológicos do SFX sobre o desenvolvimento embrionário de zebrafish (*Danio rerio*), utilizando tanto o ingrediente ativo (i.a.) isolado quanto uma formulação comercial disponível no mercado brasileiro (Verter[®], Corteva Agriscience[®]). O estudo experimental foi conduzido por meio de ensaios de toxicidade com exposição semi-estática por 96 horas, utilizando concentrações crescentes de SFX e avaliando parâmetros letais e subletais, incluindo mortalidade, taxa de eclosão, frequência de teratogênias, contrações espontâneas, frequência cardíaca e alterações morfológicas. Os resultados demonstraram que o i.a. puro não promoveu mortalidade significativa nem interferiu na taxa de eclosão nas concentrações testadas. No entanto, observou-se uma redução significativa na frequência de contrações espontâneas e no número de batimentos cardíacos a partir da concentração de 400 µg/L, evidenciando efeitos neuro e cardiotoxicos. Em contrapartida, a formulação comercial apresentou um perfil de toxicidade mais pronunciado, induzindo alterações nos parâmetros subletais mesmo nas menores concentrações avaliadas, tais como aumento da frequência cardíaca, manifestações neurotóxicas e uma variedade de alterações morfológicas. Tal resultado sugere que, sob as condições experimentais adotadas e nas concentrações testadas, os aditivos presentes na formulação exerceram um maior potencial de toxicidade sobre os parâmetros fisiológicos e morfológicos analisados em embriões e larvas de zebrafish. Este estudo reforça a importância de considerar as formulações comerciais nos testes ecotoxicológicos e fornece subsídios para políticas públicas e estratégias de manejo

ambiental mais efetivas, em consonância com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS 3, 6, 12 e 14).

Palavras-chave: Ecotoxicologia, Poluição ambiental, Agrotóxicos, Peixes, Biomarcadores.

ABSTRACT

The intensive use of pesticides in modern agriculture, combined with the lack of data on the effects of new chemical substances on non-target organisms, represents a growing threat to aquatic biodiversity, especially in tropical ecosystems. Among the various compounds employed, the insecticide sulfoxaflor (SFX) stands out. It has been recently introduced to the market as an alternative to neonicotinoids and is used to control sap-sucking insects of the order Hemiptera. This compound has attracted increasing attention due to its widespread application, toxicity to non-target organisms, and its ability to reach aquatic environments through drift, leaching, and surface runoff. In this context, the present study aimed to investigate the ecotoxicological effects of SFX on the embryonic and larval development of zebrafish (*Danio rerio*), using both the isolated active ingredient (a.i.) and a commercial formulation available in the Brazilian market (Verter®, Corteva Agriscience®). The experimental study was conducted through embryo-larval toxicity assays with semi-static exposure over 96 hours, using increasing concentrations of SFX and evaluating lethal and sublethal parameters, including mortality, hatching rate, frequency of teratogenesis, spontaneous contractions, heart rate, and morphological alterations. The results showed that the pure a.i. did not cause significant mortality or interfere with the hatching rate at the tested concentrations. However, a significant reduction in the frequency of spontaneous contractions and heartbeats was observed from 400 µg/L onwards, indicating neurotoxic and cardiotoxic effects. In contrast, the commercial formulation exhibited a more pronounced toxicity profile, inducing changes in sublethal parameters even at the lowest concentrations tested, such as increased heart rate, neurotoxic manifestations, and a variety of morphological alterations. These results suggest that, under the experimental conditions adopted and the concentrations tested, the additives present in the formulation exerted a higher toxic potential on the physiological and morphological parameters analyzed in zebrafish embryos and larvae. This study reinforces the importance of considering commercial formulations in ecotoxicological assessments and provides technical and scientific support for more effective public policies and environmental management strategies, in line with the Sustainable Development Goals (SDGs 3, 6, 12, and 14).

Keywords: Ecotoxicology, Environmental pollution, Pesticides, Fish, Biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

- Figura 1.** Estrutura química do sulfoxaflor. **25**
- Figura 2.** Fêmea de zebrafish (*Danio rerio*). **33**
- Figura 3.** Estágio do desenvolvimento do zebrafish ao longo das primeiras 144 horas pós-fertilização (hpf). **34**

Artigo

- Figura 1.** Efeitos de diferentes concentrações de i.a. puro de SFX e do inseticida à base de SFX em embriões de zebrafish **52**
- Figura 2.** Efeitos de diferentes concentrações de i.a. puro de SFX e do inseticida à base de SFX em embriões de zebrafish bem como dos grupos controle e controle positivo nas contrações espontâneas nas 24 horas pós-fecundação **53**
- Figura 3.** Efeitos de diferentes concentrações de i.a. puro de SFX e do inseticida à base de SFX em embriões de zebrafish bem como dos grupos controle e controle positivo (3,4-dicloroanilina – DCA) nos batimentos cardíacos nas 48 horas pós-fecundação **54**
- Figura 4.** Alterações morfológicas observadas em larvas de zebrafish expostas em diferentes concentrações de i.a. puro de SFX e do inseticida à base de SFX **56**
- Figura 5.** Efeitos de diferentes concentrações de i.a. puro de SFX e do inseticida à base de SFX em diferentes parâmetros morfométricos avaliados nas larvas de zebrafish **58**
- Figura 6.** Análise de componentes principais (PCA) do ingrediente ativo puro e do inseticida à base de sulfoxaflor, com base na resposta de múltiplos biomarcadores **60**
- Figura 7.** Índice Integrado de Biomarcadores (IBR) obtidos a partir de múltiplos biomarcadores avaliados ao longo do desenvolvimento embrionário de zebrafish expostos ao i.a. SFX e ao inseticida à base de SFX. **61**

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1. Doses do composto sulfoxaflor presente em Closer e Expedition permitidas em diversas culturas. **26**

Artigo

Tabela 1. Frequência de alterações morfológicas em embriões e larvas de zebrafish expostas à diferentes concentrações de i.a. puro de SFX e da formulação comercial. **55**

SUMÁRIO

1 Apresentação	14
Referências	15
2 Revisão da literatura	16
2.1 Poluição química decorrente do uso de agrotóxicos	16
2.2 Agrotóxicos no Brasil	18
2.3 Ingrediente ativo e formulação comercial	22
2.4 Sulfoxaflor	23
2.5 Teste de toxicidade em peixes	28
2.6 Zebrafish como modelo sistema	31
Referências	35
3. ARTIGO: IMPACTOS DO INSETICIDA SULFOXAFLOR E DA SUA FORMULAÇÃO COMERCIAL NO DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL DO ZEBRAFISH	42
3.1 Introdução	43
3.2 Materiais e métodos	47
3.2.1 Animais e coleta dos embriões de zebrafish	47
3.2.2 Exposições e teste embriotoxicidade com zebrafish (ZET)	47
3.2.3 Avaliação de atividade neuromuscular espontânea e cardiotoxicidade	48
3.2.4 Análise morfométrica	49
3.2.5 Análises comparativas	49
3.2.6 Análise estatística	49
3.3 Resultados	50
3.3.1 Toxicidade ao longo do desenvolvimento do zebrafish	50
3.3.2 Atividade neuromuscular espontânea	51
3.3.3 Cardiotoxicidade	52
3.3.4 Alterações morfológicas e morfométricas	53
3.3.5 Análises comparativas	58
3.3.5.1 Análise de componente principal	59
3.3.5.2 Índice de biomarcadores	60
3.4 Discussão	67
3.5 Conclusão	68
Referências	69

1 APRESENTAÇÃO

O crescente uso de agrotóxicos nas práticas agrícolas modernas, aliado à escassez de dados ecotoxicológicos acerca de novas substâncias químicas, tem despertado preocupações quanto aos potenciais impactos desses compostos sobre organismos não-alvo, especialmente organismos aquáticos, uma vez que esses impactos afetam o desenvolvimento, a sobrevivência e os serviços ecossistêmicos associados.

Essa preocupação se intensifica ao se considerar que os estudos ecotoxicológicos muitas vezes concentram-se apenas no ingrediente ativo (i.a.) isolado, desconsiderando os efeitos das formulações comerciais utilizadas em campo. As formulações comerciais contêm inúmeros aditivos como solventes, surfactantes e estabilizantes, que podem modificar significativamente a biodisponibilidade, a toxicidade e o comportamento ambiental do i.a.. Dessa forma, os impactos ecotoxicológicos observados em organismos aquáticos podem ser subestimados quando se considera apenas o i.a. isolado, sem levar em conta a complexidade química e os efeitos sinérgicos ou aditivos dos componentes presentes na formulação final.

Dentre os inseticidas utilizados, o sulfoxaflor (SFX) tem sido introduzido como alternativa a inseticidas neonicotinóides previamente banidos. Contudo, apresenta características físico-químicas que contribuem para sua alta mobilidade ambiental, como alta solubilidade em água (Niesen *et al.*, 2019) e baixa adsorção ao solo (Gauthier *et al.*, 2021). No Brasil, o SFX foi aprovado em 2019 pelo Ministério da Agricultura, mesmo após ter sido previamente vetado pela ANVISA em 2016 devido aos efeitos em organismos não-alvo (Capela *et al.*, 2022). Seu uso está autorizado em diversas culturas de alto valor econômico, como soja, milho, algodão, arroz, citros e tomate — todas amplamente cultivadas no país. Apesar de sua ampla aplicação e dos avanços na caracterização ecotoxicológica do SFX, ainda não existem dados sobre seus efeitos no desenvolvimento de organismos aquáticos em concentrações ambientalmente relevantes. Além disso, permanecem ausentes estudos comparativos que avaliem a ecotoxicidade tanto do i.a. puro quanto de sua formulação comercial nesses mesmos parâmetros, o que representa uma lacuna crítica para a compreensão de seus impactos reais nos ecossistemas aquáticos.

A presente dissertação é constituída por dois capítulos. No primeiro capítulo, é apresentada uma revisão de literatura sobre o uso de agrotóxicos no Brasil, informações básicas sobre o SFX e os dados disponíveis na literatura sobre a sua ecotoxicidade em organismos não-alvo. No segundo capítulo, apresentado na forma de artigo científico, contém uma abordagem experimental que investigou os possíveis efeitos ecotoxicológicos do i.a. puro (SFX) e da sua formulação comercial Verter[®], considerando parâmetros morfológicos e fisiológicos nos primeiros estágios de vida do zebrafish (*Danio rerio*). Os dados obtidos visam contribuir com o avanço do conhecimento sobre os impactos do SFX em organismos aquáticos, ainda mais à luz das metas dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), que incluem o uso seguro de substâncias químicas e a proteção da vida aquática (ODS 3, 6, 12, 14), além de oferecer subsídios técnicos e científicos que possam fundamentar políticas públicas de regulação do uso de agrotóxicos e estratégias de manejo ambiental que promovam a sustentabilidade ambiental no Brasil e em outros países que enfrentam desafios semelhantes.

REFERÊNCIAS

Capela, N. *et al.* Sub-lethal doses of sulfoxaflor impair honey bee homing ability. *Science of The Total Environment*, v. 837, p. 155710, 2022.

Gauthier, J. R., e Mabury, S. A. (2021). The sulfoximine insecticide sulfoxaflor and its photodegradate demonstrate acute toxicity to the nontarget invertebrate species *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(8), 2156-2164.

Niesen, M., Sappington, K., Ruhman, M., Mroz, R., Leader, R. A. P., Housenger, J., e Chief, B. (2019). Ecological risk assessment for the registration of sulfoxaflor.

OECD (2013), Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Poluição química decorrente do uso de agrotóxicos

O início do Antropoceno tem sido marcado pelo esgotamento dos recursos naturais e pelo desenvolvimento de novas moléculas químicas em busca do desenvolvimento global, resultando em fluxos de resíduos que transgrediram as fronteiras planetárias, perturbando os ecossistemas naturais e induzindo mudanças nas práticas agrícolas (Matlin *et al.*, 2022). Essas mudanças são caracterizadas principalmente pela introdução de novos agrotóxicos, marcando o que pode ser chamado de segunda revolução química (Wang *et al.*, 2024), demonstrado também pelo rápido crescimento do registro da Sociedade Americana de Química (Chemical Abstract Service – CAS), que cresceu de 20 milhões em 2002 para mais de 204 milhões em 2023, sugerindo uma adição de quase 15.000 novos produtos químicos diariamente (Escher *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2024).

Os agrotóxicos são caracterizados como compostos naturais ou sintéticos que são aplicados para prevenir, controlar ou eliminar espécies que afetam o crescimento das plantas (Araya *et al.*, 2024). Podem ser classificados por diversos parâmetros, incluindo por organismos alvo (inseticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas, etc.), por estrutura química (carbamatos, organofosforados, neonicotinóides, sulfoxaminas, etc.), por modo de ação (inibidores de acetilcolinesterase, bloqueadores de canais de cloreto GABA-gatados, moduladores de canais de sódio, moduladores de receptores de hormônios juvenis), ou por tempo e método de aplicação (agrotóxicos de contato, agrotóxicos foliares, herbicidas pré-plantio, pré-emergentes ou pós-emergentes) (NIPHM, 2025).

O uso generalizado de agrotóxicos começou após a Segunda Guerra Mundial (1939 - 1945) devido à necessidade urgente de aumentar a produção de alimentos após os efeitos devastadores da guerra na agricultura (Perobelli *et al.*, 2025). Desde então, o uso de agrotóxicos tem aumentado consistentemente, tornando-se um pilar da agricultura moderna e um mercado global altamente lucrativo. Contudo, apesar da sua efetividade no aumento da produtividade agrícola e ser um mercado altamente rentável, é crucial considerar que cerca de 1% das aplicações totais de agrotóxicos realmente atinge as espécies pretendidas, sendo a maior parte desses produtos dissipados no meio ambiente e afetando organismos não-alvo (Tudi *et al.*, 2021; Perobelli *et al.*, 2025). Além disso, o uso generalizado de agrotóxicos pode impulsionar o desenvolvimento de resistência de

espécies indesejadas, resultando em um uso ainda maior de agrotóxicos, gerando uma série complexa de problemas, incluindo o comprometimento da biodiversidade, degradação do solo e poluição da água, perturbando ecossistemas e, conseqüentemente, impactando a saúde das plantações e criando um ciclo de práticas insustentáveis (Perobelli *et al.*, 2025). Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), aproximadamente 40% da produção agrícola global ainda é perdida para espécies de interesse agrícola (FAO, 2022), destacando que ainda existe uma perda significativa apesar do uso intenso de agrotóxicos, e do custo ambiental e de saúde associados a esse uso.

Dentre os fatores que influenciam a contaminação ambiental por esses compostos químicos, têm-se as suas propriedades químicas e o modo de aplicação. A propriedade de volatilidade e a aplicação por pulverização são os principais fatores correlacionados que podem resultar em resíduos de agrotóxico no ambiente (Carneiro *et al.*, 2025). Quando no ambiente, os agrotóxicos têm o potencial de contaminar o ar, o solo e as fontes de água, tanto superficiais quanto subterrâneas, expondo diversos organismos a riscos químicos, associados principalmente à ingestão da água e de alimentos contaminados (Capela *et al.*, 2022).

Contudo, embora os estudos de monitoramento estejam crescendo gradualmente em países como Brasil, Sri Lanka, Cazaquistão, Nigéria e Quênia, ainda há uma falta significativa de dados de monitoramento ambiental de muitos países na Ásia, África e América do Sul (Kandie *et al.*, 2020; Ogunbanwo *et al.*, 2020; Brack *et al.*, 2022). As evidências emergentes sugerem que as concentrações de substâncias químicas perigosas nesses países subdesenvolvidos podem ser consideravelmente mais elevadas do que as observadas atualmente na Europa (Brack *et al.*, 2022). Essa diferença está associada a uma série de fatores, incluindo a má gestão de resíduos, ao comércio internacional de resíduos, a precariedade dos sistemas de saneamento e tratamento de água, a permanência no uso e emissão de substâncias químicas altamente tóxicas que já foram progressivamente banidas em países de alta renda, além da aplicação intensiva de compostos específicos em determinadas regiões (K'Oreje *et al.*, 2020).

Além disso, o dano causado pelo uso indiscriminado de agrotóxicos não ocorre somente onde este foi aplicado. A depender do modo de aplicação, do local e do produto,

esses agentes podem entrar em contato com organismos que estão a quilômetros de distância das áreas de cultivo. Estima-se que 7% do total do agrotóxico aplicado anualmente lixivia para aquíferos, enquanto mais de 10% permanecem no solo (Maggi *et al.*, 2023). Esses resíduos criaram pontos críticos de poluição, representando sérias ameaças aos ecossistemas, à biodiversidade e à saúde humana (Tang *et al.*, 2021).

A contaminação dos ecossistemas aquáticos, resultante tanto do uso intensivo de agrotóxicos quanto do descarte inadequado de resíduos, tem despertado crescente preocupação ambiental, uma vez que essas substâncias apresentam elevada persistência no ambiente e podem representar riscos significativos para toda a cadeia ecológica (Kümmerer *et al.*, 2021). Dentre os organismos aquáticos, os peixes se destacam como bioindicadores relevantes na avaliação da toxicidade desses contaminantes. A contaminação deles por agrotóxicos pode ocorrer por diferentes vias de exposição — dérmica, respiratória ou oral — permitindo a entrada de resíduos químicos no organismo por difusão direta da água contaminada ou pela ingestão de presas já expostas aos poluentes (Fantke *et al.*, 2021). Além disso, as características biológicas e ecológicas, como o hábito bentônico de algumas espécies, aumentam a susceptibilidade à contaminação por resíduos depositados nos sedimentos do leito aquático (Fantke *et al.*, 2021). Outros fatores, como o tamanho corporal dos peixes, a composição química dos agrotóxicos e os níveis de contaminação presentes no ambiente, também influenciam na intensidade da exposição (Brack *et al.*, 2022)

2.2 Agrotóxicos no Brasil

Persiste no Brasil, assim como na América Latina de modo geral, uma lógica colonial que molda a forma como a natureza é percebida e tratada (Alimonda, 2011). Nesse contexto, a realidade biofísica, a organização do território, a flora, a fauna, os povos humanos, a biodiversidade e até as dinâmicas socioculturais são frequentemente encaradas, sob a ótica do pensamento hegemônico, como elementos subordinados, destinados à exploração, degradação e reconfiguração conforme os interesses dos atuais regimes de acumulação (Gaboardi *et al.*, 2023). Como resultado, vastos ecossistemas foram destruídos para dar lugar a monoculturas voltadas à exportação. Sob a perspectiva ecológica, o modelo de produção baseado em commodities promove a destruição e a

simplificação dos ecossistemas naturais, ao mesmo tempo em que contribui significativamente para a contaminação ambiental por diversos poluentes. Essa dinâmica compromete não apenas a integridade dos ambientes naturais, mas também as condições de saúde de trabalhadores rurais e de consumidores expostos a alimentos e à água contaminados, configurando um claro cenário de injustiça ambiental (Gaboardi *et al.*, 2023). Após mais de cinco décadas de incentivo estatal e consolidação desse modelo agroquímico no Brasil e em outros países da América Latina, observa-se um crescimento significativo dos estudos voltados à avaliação dos impactos do uso de agrotóxicos na região, com contribuições de profissionais de distintas áreas do conhecimento em abordagens inter e multidisciplinares.

Desde meados de 1970, a agricultura brasileira tem passado por intensas transformações, impulsionadas pela incorporação de tecnologias agrícolas modernas e pela expansão das fronteiras produtivas, com o intuito de aumentar tanto a produtividade quanto a rentabilidade de empresas e produtores ligados ao agronegócio (Szerman *et al.*, 2022). Atualmente, o país possui uma vasta área destinada à agricultura, com aproximadamente 55 milhões de hectares, sendo a soja a principal cultura, ocupando mais de 36 milhões de hectares (Dias *et al.*, 2025). Além da soja, cultivos como cana-de-açúcar e milho também abrangem grandes extensões territoriais (MapBiomas, 2021). Essa elevada capacidade produtiva está diretamente associada ao aumento expressivo no uso de agrotóxicos nas áreas agrícolas (Dias *et al.*, 2025). Como consequência, o Brasil tornou-se o maior consumidor mundial desses produtos, com mais de 800 mil toneladas aplicadas apenas em 2022 — volume aproximadamente 70% superior ao registrado pelos Estados Unidos, o segundo maior consumidor (FAO, 2024). As culturas de soja, cana-de-açúcar, milho e algodão concentram cerca de 83% do total de agrotóxicos comercializados no país (Dias *et al.*, 2025). De forma preocupante, estima-se que cerca de 46,6% dos ingredientes ativos aprovados para uso no Brasil são proibidos em outras regiões, como União Europeia, Estados Unidos e China, evidenciando discrepâncias nos critérios de segurança toxicológica e nas políticas regulatórias (Pereira *et al.*, 2022).

De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (2021), o consumo anual de agrotóxicos no Brasil é superior a 300 mil toneladas, representando um aumento de 700% do consumo em 40 anos, enquanto o território agrícola aumentou

apenas 78% nesse período (Spadotto e Gomes, 2021). A legislação brasileira, a partir da lei nº 14.785/2023, define agrotóxicos como “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens ou na proteção de florestas plantadas, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos”.

No Brasil, os agrotóxicos podem ser classificados a partir de diversos aspectos, mas os mais comuns incluem:

- Alvos específicos de ação: fungicidas (atuantes contra fungos), herbicidas (que inibem o crescimento de plantas daninhas), rodenticidas (utilizados no combate a roedores), acaricidas (para exterminar ácaros), moluscicidas (usados principalmente contra caramujos causadores da esquistossomose), algicidas (para eliminar algas), nematicidas, fumigantes, e reguladores e inibidores de crescimento;

- Grupo químico ao qual pertencem: organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, triazinas, neonicotinóides, sulfonamidas, etc;

- Nível de toxicidade: conforme determinado por testes ou estudos laboratoriais, conforme estabelecido pela portaria nº3/MS/SNVS, de 16 de janeiro de 1992, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Em 2019, ocorreu a reclassificação toxicológica dos agrotóxicos já registrados no Brasil pela ANVISA. A partir disso, os parâmetros de classificação toxicológica foram caracterizados nos padrões do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – GHS), com regras harmonizadas com as de países da União Europeia, Ásia, entre outros. Assim, foram estabelecidas 5 categorias (ANVISA, 2019):

Categoria 1 = Produto Extremamente Tóxico;

Categoria 2 = Produto Altamente Tóxico;

Categoria 3 = Produto Moderadamente Tóxico;

Categoria 4 = Produto Pouco Tóxico;

Categoria 5 = Produto Improvável de Causar Dano Agudo.

De acordo com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), em 2022 ocorreram comercialização de 800.652 toneladas de ingredientes ativos (i.a.), o que representa um aumento de aproximadamente 11% em relação ao ano anterior. Nesse mesmo período, os ingredientes ativos mais comercializados no país foram: Glifosato e seus sais; 2,4-D; Atrazina, Mancozebe; Acefato; Clorotalonil, Dibrometo de Diquat, Glufosinato – Sal de Amônio, Clorpirifós e Metomil. Em paralelo ao vasto número de agrotóxicos que foram liberados nos últimos anos, apresenta-se como um horizonte de possíveis acidentes ambientais que podem acontecer no nosso país (IBAMA, 2022).

O primeiro levantamento público sobre a contaminação por agrotóxicos em água potável no país foi divulgado em 2019 por meio do programa "Por Trás do Alimento", uma iniciativa colaborativa entre as organizações Repórter Brasil, Public Eye e Agência Pública (Carneiro *et al.*, 2025). Este estudo analisou dados referentes ao período de 2014 a 2017, utilizando informações do Sistema de Monitoramento da Qualidade da Água para Consumo Humano (SISAGUA), do Ministério da Saúde, e do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), revelando uma lacuna significativa na vigilância nacional. Dos 5.570 municípios brasileiros, 2.931 não enviaram resultados ao Ministério da Saúde durante o período analisado, e, entre os que realizaram testes, um em cada quatro detectou a presença de todos os 27 resíduos de agrotóxicos avaliados nas amostras de água. A detecção de resíduos de agrotóxicos em água tratada e potável no Brasil evidencia a presença desses compostos em mananciais superficiais utilizados para o abastecimento público, além de apontar limitações nos métodos convencionais de tratamento de água, que não têm sido plenamente eficazes na remoção dessas substâncias.

Embora exista regulamentação específica no Brasil para resíduos de agrotóxicos em água potável, ela ainda é considerada restrita quanto à variedade de substâncias contempladas. A atual Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021 (Ministério da Saúde,

2021), estabelece limites máximos para apenas 40 ingredientes ativos — um aumento de 13 compostos em relação à normativa anterior. Apesar desse avanço, o número continua expressivamente inferior ao total de princípios ativos aprovados para uso no país, que em 2024 somavam 368 substâncias, indicando que apenas cerca de 11% dos agrotóxicos legalmente registrados no Brasil são efetivamente monitorados na água potável (Carneiro *et al.*, 2025). Além disso, em 2024, o Brasil atingiu um recorde na liberação de novos agrotóxicos para uso doméstico, o que intensifica ainda mais a preocupação com a contaminação ambiental (Souza e Salati, 2025)

2.3 Ingrediente ativo e formulação comercial

Os agrotóxicos, amplamente utilizados tanto na agricultura quanto em ambientes urbanos, são comercializados e aplicados sob a forma de formulações comerciais — misturas complexas compostas por ingredientes ativos e diversas substâncias auxiliares, como adjuvantes ou aditivos (Seralini, 2024). Embora essas substâncias sejam rotuladas frequentemente como “inertes”, elas não são necessariamente química ou biologicamente inativas, uma vez que muitos desses compostos são capazes de influenciar diretamente a toxicidade, mobilidade, persistência e absorção dos ingredientes ativos no ambiente e em organismos expostos (Sanches *et al.*, 2024).

Esses aditivos têm como finalidade melhorar a estabilidade, a penetração, a eficácia e a aplicabilidade dos ingredientes ativos (Kalyabina *et al.*, 2021). No entanto, sua composição química completa raramente é divulgada de forma transparente, e seus perfis toxicológicos variam significativamente conforme a natureza e concentração dos compostos presentes (Seralini, 2024). Entre os aditivos mais comuns encontram-se solventes, surfactantes, emulsificantes e conservantes, alguns dos quais, como os destilados de petróleo, apresentam potenciais efeitos adversos à saúde animal e aos ecossistemas (Ahmad *et al.*, 2024)

Diversos estudos têm demonstrado que as formulações comerciais podem ser substancialmente mais tóxicas do que os ingredientes ativos isolados (Nagy *et al.*, 2020; Straw *et al.*, 2022). Esse aumento na toxicidade deve-se, em grande parte, a interações sinérgicas entre os aditivos e os princípios ativos (Karaca *et al.*, 2021; Nagy *et al.*, 2020). Substâncias como o butóxido de piperonila, frequentemente empregadas como

sinergistas em inseticidas, potencializam os efeitos dos ingredientes ativos, aumentando sua toxicidade (Karaca *et al.*, 2021). Adicionalmente, o surfactante alquil poliglicosídeo, presente em formulações comerciais, reduz a tensão superficial e promove maior absorção cutânea ou penetração celular dos ingredientes ativos, o que contribui para o aumento de sua biodisponibilidade e toxicidade (Ahmad *et al.*, 2024). Surfactantes como etoxilatos de alquilfenol (APEs) e de nonilfenol (NPEs), por exemplo, têm sido associados à toxicidade aquática e a efeitos de desregulação endócrina, enquanto emulsificantes como as aminas de sebo etoxiladas (ETAs) também demonstraram ser prejudiciais à biota aquática (Ahmad *et al.*, 2024). Além disso, a análise de espectrometria de formulações comerciais de agrotóxicos revelou a presença de centenas de compostos não identificados, indicando que os adjuvantes não são apenas variáveis e numerosos, mas também contêm produtos químicos residuais, os quais podem intensificar os efeitos biológicos adversos (Seralini, 2024). Contudo, esses aditivos não são submetidos ao mesmo conjunto de testes regulatórios que os ingredientes ativos (Straw e Brown, 2021).

No Brasil, a Lei nº 14.785/2023, complementada pela Lei nº 15.070/2024, regula aspectos relacionados à produção, comercialização e aplicação de agrotóxicos, ingredientes ativos e aditivos. No entanto, os produtos com função adjuvantes, embora reconhecidos como produtos que melhoram a aplicação dos formulados, não são diretamente abrangidos por essa legislação, sendo sujeitos a regulamentações específicas. De acordo com o Art. 2º dessa lei, é considerado:

- Agrotóxicos: produtos e agentes de processos físicos ou químicos isolados ou em mistura com biológicos destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens ou na proteção de florestas plantadas, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;

- Ingrediente ativo: agente químico isolado ou em mistura com biológicos que confere eficácia a agrotóxicos, produtos de controle ambiental e afins;

- Aditivo: substância ou produto adicionado a agrotóxicos, a produtos de controle ambiental e afins, para melhorar sua ação, função, durabilidade, estabilidade e detecção ou para facilitar o processo de produção;

adjuvante: produto utilizado em mistura com produtos formulados para melhorar a sua aplicação;

2.4 Sulfoxaflor

A resistência aos inseticidas atualmente disponíveis representa um desafio persistente para o manejo de espécies indesejadas na agricultura, exigindo a busca contínua por novas estratégias de controle (Sparks *et al.*, 2013). Diversas espécies de insetos sugadores de seiva da ordem Hemiptera, como pulgões, percevejos, moscas-brancas, percevejos-fedorentos, cigarrinhas, cochonilhas e cochonilhas, têm demonstrado resistência aos compostos tradicionalmente utilizados (Solomon *et al.*, 2025). Embora o surgimento da resistência tenha ocorrido de forma gradual em alguns casos, muitas dessas espécies já apresentam resistência significativa aos neonicotinoides — classe de inseticidas que, até então, constituía a principal ferramenta para seu controle em diversas culturas agrícolas (Sparks *et al.*, 2013).

A partir disso, a classe das sulfoximinas foi projetada uma alternativa aos neonicotinoides, e que tem como seu principal composto o sulfoxaflor (SFX) (Kramer e Solomon, 2025). O SFX, de nome químico [1-[6-(trifluoromethyl)pyridin-3-yl]ethyl]methyl(oxido)-λ4-sulfanylidenecyanamide, e fórmula química C₁₀H₁₀F₃N₃OS (Figura 1), é um composto inseticida desenvolvido nos anos 2000 pela Dow AgroSciences®, e tem como organismo-alvo insetos da ordem Hemiptera (Capela *et al.*, 2022). O ingrediente ativo técnico sulfoxaflor (SFX-T) é comercializado em formulações como concentrado de suspensão (SC) e grânulos dispersíveis em água (WG), sendo aplicado por via aérea ou terrestre na forma de pulverização aquosa sobre a folhagem de diversas culturas (Kramer e Solomon, 2025). Após a aplicação, o composto é translocado através do xilema e também de forma translaminar, ou seja, atravessando as camadas das folhas a partir do local de contato. Dessa forma, torna-se biodisponível para insetos sugadores de seiva, que o absorvem durante a alimentação (Solomon *et al.*, 2025).

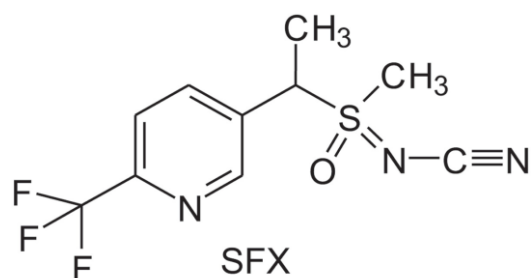


Figura 1. Estrutura química do sulfoxaflor. Fonte: Salomão *et al.*, 2025

O SFX atua como agonista e/ou modulador dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) em insetos, apresentando um mecanismo de ação semelhante ao dos neonicotinoides (Cartereau *et al.*, 2024). Com base no mecanismo de ação, o Comitê de Ação à Resistência a Inseticidas (IRAC), que visa coordenar estratégias para mitigar a resistência, classifica os inseticidas que atuam sobre os nAChRs como pertencentes ao Grupo 4. O SFX integra a subclasse 4C, denominada sulfoximinas (Kramer e Salomão, 2025). Os nAChRs são canais iônicos controlados por ligantes e podem ser divididos em dois grupos: receptores musculares e receptores neuronais. Além disso, foi demonstrado que os nAChRs contribuem para o controle do potencial de membrana em repouso, modulação da transmissão sináptica e mediação da transmissão excitatória rápida (Harper *et al.*, 2020). Dessa forma, o SFX tem como alvo o sistema nervoso, induzindo sintomas excitatórios, tais como tremores, extensão ou curvatura das pernas, paralisia parcial ou total, e mortalidade, conforme observado em estudos conduzidos com insetos (Damasceno *et al.*, 2021).

Em alguns países, como os Estados Unidos, o Canadá e a União Europeia, existem restrições ou proibições de seu uso, devido a preocupações com a segurança ambiental e a saúde dos organismos (Capela *et al.*, 2022). Entretanto, agrotóxicos à base de SFX voltaram a ser utilizados no Brasil em 2019, entre eles as formulações comerciais Verter[®]SC, Expedition[®], Closer[®]SC, os quais são classificados como “Produto Moderadamente Tóxico” pela ANVISA. Contudo, com base na lei 10.603/2002, que estabelece que novos produtos aprovados para comercialização têm proteção de 10 anos de sigilo nas informações, não existem dados disponibilizados sobre a comercialização e o uso desses agrotóxicos no Brasil. No Brasil, o uso deste composto é recomendado nas

culturas de algodão, aveia, batata, cana-de-açúcar, milho, soja, entre outras, de acordo com a ANVISA (2023). Além disso, existem recomendações realizadas pelo IBAMA para a utilização de agrotóxicos à base de SFX, de acordo com a cultura a qual é utilizada.

Tabela 1. Doses do composto Sulfoxaflor presente em Closer[®] e Expedition[®] permitidas em diversas culturas.

Formulação	Cultura	Dose	
		mL PF/ha**	g i.a/ha*
Closer	Algodão	60	14,4
	Citros	100 - 200	24 - 48
	Tomate	200 - 300	48 - 72
	Trigo	50 - 75	50 - 75
	Feijão	300 - 400	72 - 96
	Melancia	300 - 400	72 - 120
	Melão	300 - 400	72 - 120
	Soja	300 - 400	72 - 96
Expedition	Arroz	200 - 300	20 - 30
	Milho	200 - 300	20 - 30
	Soja	200 - 300	20 - 30

Fonte: Autora (2024), adaptado de IBAMA (2019)

* i.a/ha - ingrediente ativo por hectare.

**PF/ha - produto fitossanitário por hectare.

O composto SFX também apresenta características singulares, incluindo baixa absorção pelo solo e sedimentos, alta solubilidade em água, meia-vida no solo de aproximadamente 13 dias (Gauthier *et al.*, 2021), e entre 37 a 88 dias na água, resistência à fotólise e hidrólise tanto no solo quanto na água (Niesen *et al.*, 2019). Essas propriedades lhe conferem o potencial de se tornar um contaminante em corpos d'água superficiais e subterrâneos e de afetar organismos não-alvo.

Em minhocas, o SFX causa estresse oxidativo, de acordo com Zhang *et al.* (2020). Em abelhas, afeta a capacidade de retorno (Capela *et al.*, 2022). Em caranguejos, afetou o comportamento da alimentação e da motricidade (Damasceno *et al.*, 2021). Em girinos de *Rana nigromaculata*, afetou o crescimento, os índices antioxidantes e o sistema endócrino relacionado ao hormônio tireoidiano (Zhou *et al.*, 2023). Em zebrafish, foi observado que o SFX causou danos oxidativos, imunotoxicidade, e aumentou significativamente a atividade de acetilcolinesterase (Piner Benli e Çelik, 2021a); Wang *et al.*, 2023, Piner Benli e Çelik, 2021b). Wang (2023) detectou que o i.a. puro de SFX induz imunotoxicidade em zebrafish através da ativação da via de sinalização TLR4/NF- κ B. Neste estudo, os embriões de zebrafish foram expostos a concentrações 20, 25 e 30 mg/L de i.a. puro de SFX, correspondendo aos valores relacionados à Concentração Letal média (CL50) de 34,11 mg/L. Isso foi feito com o intuito de avaliar a eclosão, mortalidade, frequência cardíaca, contagem de neutrófilos, estresse oxidativo e expressão de genes associados à apoptose (IL-6, IL-1 β , MYD88, TNF- α , COX2 e TLR4) e inflamação imunológica. Assim, após exposição ao sulfoxaflor, a taxa de sobrevivência, a taxa de eclosão, e o número de batimentos cardíacos dos embriões foram significativamente reduzidos. Também o número de neutrófilos diminuiu com o aumento da concentração do composto no grupo de tratamento, assim como o número de células-tronco hematopoiéticas. Além disso, em comparação com o grupo controle, os níveis de expressão dos genes analisados aumentaram significativamente (Wang *et al.*, 2023).

Além disso, de acordo com Piner Benli e Çelik (2021b), a formulação comercial do SFX chamada Transform, pode causar alterações na atividade da AChE no cérebro e nos músculos do zebrafish, indicando que SFX pode ser neurotóxico. Nesse estudo, foram utilizados adultos de zebrafish, os quais foram expostos por 96h a 0,87 mg/L (2,5% da CL 50 de 96 h), 1,75 mg/L (5% da CL 50 de 96 h), 3,51 mg/L (10% da CL 50 de 96 h) do inseticida à base de SFX, e ao grupo controle com apenas água. A formulação comercial também causou estresse oxidativo, alterando também os parâmetros antioxidantes relacionados à glutathiona (GSH) (Piner Benli e Çelik, 2021a). Nesse estudo, embriões de zebrafish foram expostos por 96h às concentrações subletais de SFX 0,87 mg/L, 1,75 mg/L, e 3,51 mg/L. Após a exposição, foram realizadas a análise de estresse oxidativo

das enzimas superóxido dismutase (SOD), Quinona-oxidoreductase-1 (NQO1) e heme oxigenase-1 (HMOX1).

De acordo com Watson (2021), o SFX interage de maneira distinta com os nAChRs em insetos, quando comparado a outras substâncias químicas. Essa distinção acontece devido à sua composição química, que exibe interações distintas com enzimas metabólicas e nAChRs em comparação com outros inseticidas. Isso resulta em diferentes frequências e graus de resistência cruzada entre SFX e outras substâncias. Ou seja, a maioria dos insetos que apresentam resistência a inseticidas, incluindo os neonicotinóides, apresentam pouca ou nenhuma resistência ao SFX.

Contudo, observa-se que ainda há uma escassez de estudos envolvendo os efeitos do SFX em diferentes fases do ciclo de vida dos peixes e com a análise de múltiplos biomarcadores, sobretudo utilizando concentrações de relevância ambiental. Dessa forma, há uma necessidade urgente de se compreender os potenciais efeitos tóxicos que o SFX pode exercer sobre os ecossistemas aquáticos. A ausência de avaliações ambientais específicas, como análise de concentrações na água e no solo, por exemplo, torna essencial a condução de estudos mais detalhados para preencher essa lacuna de conhecimento e entender melhor as implicações ambientais desse inseticida.

2.5 Testes de toxicidade em peixes

A toxicidade de uma substância química se refere à capacidade dessa substância de causar danos em determinado órgão, alterar os processos químicos ou desregular o metabolismo enzimático. Os testes de toxicidade são caracterizados como ensaios laboratoriais, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais, amostras ambientais de água ou sedimentos, entre outros (Krewski *et al.*, 2020).

Os dados de toxicidade aquática são necessários para a avaliação dos riscos ambientais de produtos químicos, de acordo com regulações como o Sistema Globalmente Harmonizado (GHS) de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos e o regulamento de Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Produtos Químicos (REACH) (Xiong *et al.*, 2022). A avaliação da toxicidade de produtos químicos na água é conduzida por meio de testes ecotoxicológicos utilizando organismos representativos encontrados na água ou nos sedimentos de diferentes ambientes, como em água doce,

estuarinos e marinhos. Além disso, esses estudos permitem avaliar o impacto imediato que esses poluentes exercem sobre as espécies nos corpos d'água. Nesses experimentos, os organismos-teste são expostos a diferentes concentrações de amostra, e em seguida são avaliados e quantificados os efeitos tóxicos que apresentaram (Fitzgerald *et al.*, 2021).

Os ensaios de toxicidade são classificados de acordo com os efeitos que os organismos apresentam durante o tempo de exposição nos ensaios (Zhao *et al.*, 2024), podendo ser:

- Toxicidade Aguda: testes breves que examinam apenas uma parte do ciclo de vida do organismo-teste. Geralmente, eles avaliam a mortalidade ou imobilidade dos organismos, bem como seu impacto em reações bioquímicas e metabolismo, entre outros fatores.

- Toxicidade Crônica: envolve testes de longo prazo com exposição prolongada, que podem cobrir todo o ciclo de vida dos organismos-teste. Esses testes analisam efeitos subletais, como reprodução, deformidades e crescimento. Os resultados obtidos em testes de toxicidade crônica são geralmente expressos como Concentração Sem Efeito Observado (CENO) ou Concentração com Efeito Observado (CEO), mas também podem ser expressos como Concentração Efetiva 50% (CE50).

Conforme Krewski *et al.* (2020), as principais características dos organismos-teste devem ser:

- Seletividade elevada aos contaminantes,
- Elevada disponibilidade e abundância,
- Uniformidade e estabilidade genética nas populações,
- Representatividade de seu nível trófico,
- Significado ambiental em relação à área de estudo,
- Ampla distribuição e importância comercial,
- Facilidade de cultivo e de adaptação às condições de laboratório,
- Espécies cuja fisiologia, genética e comportamento sejam bem compreendidos.

Em 1984, a Organização Internacional de Padronização (International Organization for Standardization - ISO) introduziu o teste de toxicidade utilizando o zebrafish (*Danio rerio*). Desde então, diversos países adotaram suas próprias regulamentações baseadas nesse teste, como o padrão britânico BS/EN/ISO 7346-3-1998, o padrão alemão DIN/EN/ISO 7346-3-1998 e o padrão chinês GB/T 13267-91. No Brasil, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) estabeleceu, em 2016, o uso de duas espécies de peixes da família *Cyprinidae*, o *Pimephalis promelas* e o zebrafish (NBR 15088:2016), para avaliação da toxicidade aguda (Lopes-Ferreira *et al.*, 2021).

A adoção de testes padronizados traz vantagens significativas, especialmente ao permitir a escolha de testes uniformes e úteis para diversos laboratórios. Isso simplifica a comparação de dados entre diferentes estudos, contribuindo para uma maior utilização dos dados publicados, além de possibilitar a reprodução dos testes (Su *et al.*, 2021). Para experimentos de exposição aguda em zebrafish, uma abordagem comum consiste na adição direta da substância-teste à água, permitindo a exposição de embriões ou larvas recém-eclodidas. Outra estratégia empregada para exposição aguda é a microinjeção, que permite a introdução direta do composto no embrião (Zhao *et al.*, 2024)

O teste de toxicidade aguda em embriões de peixe, conhecido como Fish Embryo Toxicity Test (FET), demonstra potencial para atender às exigências regulatórias relacionadas à avaliação toxicológica de uma ampla variedade de compostos químicos recentemente desenvolvidos (Xiong *et al.*, 2022). Conforme estabelecido pelo Guia n. 236 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), o ensaio consiste na exposição de ovos recém-fertilizados a substâncias químicas por um período de 96 horas, geralmente em placas de petri ou placas de 24 poços (OCDE, 2013). Além disso, o uso do FET está alinhado com os princípios dos 3Rs – substituição, redução e refinamento – que orientam práticas éticas na experimentação animal (Su *et al.*, 2021). Os peixes são um grupo parafilético adaptado a ambientes de água doce e marinha, com mecanismos distintos para enfrentar diversas condições, como variações de temperatura, pressão, pH, oxigênio dissolvido, matéria orgânica, salinidade e presença de outras espécies. Essas adaptações não apenas garantem a sobrevivência desses animais, mas também influenciam seu sucesso reprodutivo e a resiliência de suas espécies e comunidades (Mariu *et al.*, 2023). De acordo com Aldhamin *et al.* (2021), o uso de peixes

como bioindicadores da qualidade ambiental se dá pela sua sensibilidade aos efeitos dos poluentes em baixas concentrações. Além disso, possuem capacidade de acumular substâncias tóxicas, características estas que os distinguem como bioindicadores das alterações do ambiente aquático (Hussain *et al.*, 2018).

O protocolo original do teste FET, conforme estabelecido pela OCDE (2013), foi desenvolvido com base em quatro desfechos morfológicos principais: coagulação do embrião, ausência de formação de somitos, ausência de batimentos cardíacos e falha no descolamento da cauda. Esses pontos finais foram escolhidos por estarem direta ou indiretamente relacionados à mortalidade, por sua viabilidade em procedimentos de triagem realizados por equipes técnicas treinadas e pela facilidade de documentação e reporte dos resultados. No entanto, ao longo das últimas duas décadas, o embrião de peixe-zebra consolidou-se como um modelo experimental altamente promissor e versátil. Essa evolução impulsionou uma ampliação significativa do escopo do teste FET, levando à incorporação de diversos outros desfechos ao protocolo original, incluindo parâmetros morfológicos adicionais, bem como fisiológicos, bioquímicos e moleculares (von Hellfeld *et al.*, 2022).

Além dos critérios morfológicos padronizados utilizados para a avaliação da toxicidade aguda no teste FET, é possível incorporar um conjunto abrangente de desfechos adicionais de relevância ecotoxicológica por meio de pequenas adaptações no protocolo (von Hellfeld *et al.*, 2023). Essas modificações permitem a avaliação de efeitos como teratogenicidade (Escher *et al.*, 2022), desregulação endócrina (Yao *et al.*, 2020), indução de sistemas de biotransformação (Loerracher e Braunbeck, 2021) e neurotoxicidade (Kämmer *et al.*, 2022). Essas ampliações reforçam a versatilidade do teste FET como uma ferramenta valiosa para a investigação de múltiplas vias de toxicidade em ambientes aquáticos.

2.6 Zebrafish como espécie modelo

O zebrafish (*Danio rerio*) é um peixe teleósteo, pertencente à família Cyprinidae, classe *Actinopterygii*, nativo do sudeste asiático (Fan *et al.*, 2023). Esta espécie é amplamente utilizada como um organismo-modelo em estudos de embriotoxicidade, teratogenicidade, neurotoxicidade, genotoxicidade, estresse oxidativo e alterações

morfológicas e comportamentais devido a diversos fatores (Hong *et al.*, 2024). Os estudos realizados nesta espécie de peixe são de crescente importância para a avaliação de possíveis consequências da exposição de vertebrados a diversos contaminantes encontrados em águas superficiais.

Os peixes adultos (Figura 2) apresentam pequeno tamanho (3-4 cm), sendo possível manter uma grande quantidade de animais em um pequeno espaço e sem a necessidade de estrutura laboratorial de alta complexidade. Oferecem também ampla disponibilidade de embriões, com fêmeas capazes de colocar centenas de ovos a cada evento reprodutivo, que podem ocorrer mais de uma vez por semana (Hong *et al.*, 2024). Além disso, os animais possuem um curto tempo geracional, alcançando a maturidade reprodutiva com três/quatro meses de vida (Brito *et al.*, 2022). Além disso, o zebrafish têm a vantagem de ser semelhante a muitos organismos aquáticos em termos de sensibilidade a contaminantes (Su *et al.*, 2021). Por todas essas características, o zebrafish se apresenta como um modelo animal vantajoso em relação à questão de praticidade, facilidade de manejo e viabilidade econômica dos estudos (Hong *et al.*, 2024).



Figura 2. Fêmea de zebrafish (*Danio rerio*). Fonte: Autora (2025)

Seu processo de desenvolvimento (Figura 3) é bem conhecido e documentado, o que proporciona uma grande eficiência às pesquisas (Bacila *et al.*, 2021). Durante o desenvolvimento embrionário do zebrafish, a fase de blástula se completa por volta das 2 horas pós-fertilização (hpf), e a formação dos principais sistemas orgânicos ocorre até aproximadamente 48 hpf. A partir de 72 hpf, as larvas eclodem, permitindo a avaliação de parâmetros como taxa de eclosão, mortalidade e presença de deformidades. Dessa forma,

a toxicidade aguda pode ser investigada com embriões a partir de 2 hpf ou em larvas recém-eclodidas (Zhao *et al.*, 2024).

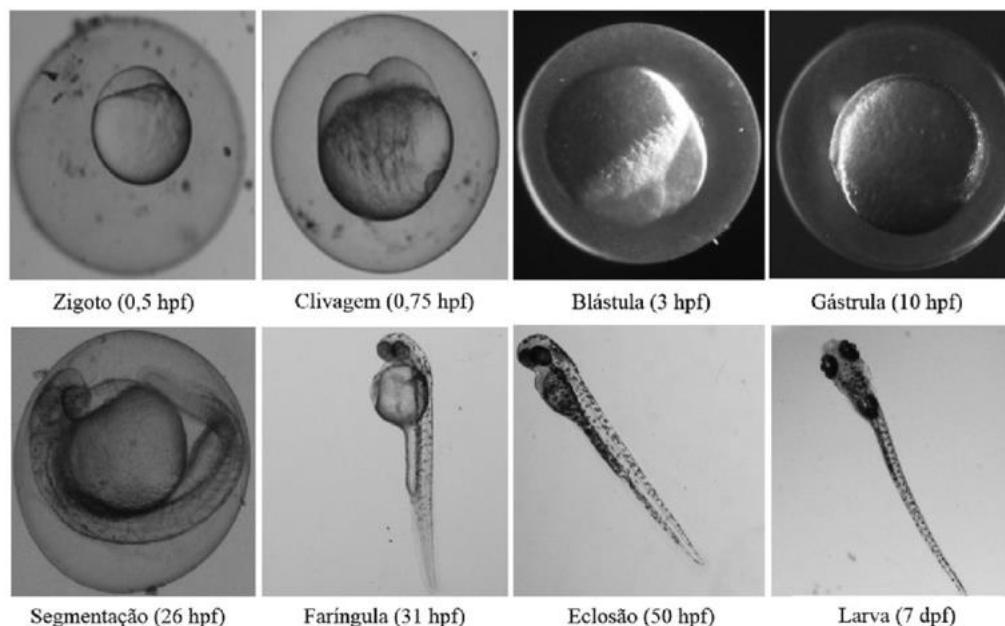


Figura 3. Estágio do desenvolvimento do zebrafish ao longo das primeiras 144 horas pós-fertilização (hpf). Fonte: Siebel (2015)

Além disso, a organização do sistema nervoso central (SNC), os processos envolvidos na neurogênese e os mecanismos específicos de resposta a poluentes no zebrafish apresentam notável similaridade com os observados em outros vertebrados (von Hellfeld *et al.*, 2023). As alterações morfológicas e comportamentais observadas em zebrafish representam evidências macroscópicas diretas dos efeitos tóxicos decorrentes da exposição a poluentes, refletindo respostas sistêmicas a estímulos internos e externos. Essas características tornam a espécie um modelo experimental altamente eficaz para estudos de neurotoxicidade (Lin *et al.*, 2023). Ainda, o uso do zebrafish em substituição a roedores em experimentos toxicológicos está em conformidade com os princípios dos 3Rs — substituição, redução e refinamento — que visam promover o bem-estar animal na pesquisa científica (von Hellfeld *et al.*, 2023).

Durante os estágios iniciais de desenvolvimento, embriões e juvenis passam por processos fundamentais, como a diferenciação celular e a organogênese, tornando-se

especialmente vulneráveis a substâncias tóxicas. Assim, a interferência de poluentes nesses mecanismos pode resultar em anormalidades no desenvolvimento, que se manifestam por meio de alterações morfológicas nesses estágios iniciais (Lin *et al.*, 2023). Além disso, os neurônios são particularmente sensíveis a agentes químicos exógenos, bem como a condições de hipóxia e isquemia induzidas por tais substâncias, sendo, por isso, alvos frequentes de compostos neurotóxicos (von Hellfeld *et al.*, 2023). A exposição a poluentes ambientais pode comprometer a transmissão sináptica entre neurônios, e danos neuronais resultantes podem se refletir em alterações comportamentais nos organismos expostos (Shaw *et al.*, 2020).

O desenvolvimento do comportamento locomotor em embriões de zebrafish pode ser avaliado até aproximadamente 48 horas pós-fertilização (hpf), por meio de contrações espontâneas ou “ensaio de enrolamento” (von Hellfeld *et al.*, 2023). Este ensaio tem sido amplamente reconhecido como uma ferramenta eficaz para detectar efeitos neurotóxicos em embriões (Basnet *et al.*, 2019; Zindler *et al.*, 2019). O comportamento, de forma geral, é considerado um indicador sensível de toxicidade do desenvolvimento neurológico e de disfunções cerebrais em particular (Vorhees *et al.*, 2021).

A partir disso, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar os efeitos tóxicos decorrentes da exposição de embriões de zebrafish ao inseticida SFX em sua forma pura (i.a.) e a uma formulação comercial (Verter). Já como objetivos específicos: (1) investigar parâmetros letais e não letais em embriões de zebrafish expostos ao i.a. SFX e de uma formulação comercial, e (2) avaliar os impactos do i.a. SFX e de uma formulação comercial sobre a cardiotoxicidade e a atividade neuromuscular espontânea nos embriões de zebrafish.

REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. (2019). Registros e autorizações. Recuperado em 9 de dezembro de 2019, de <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>

Ahmad, M. F., Ahmad, F. A., Alsayegh, A. A., Zeyoullah, M., AlShahrani, A. M., Muzammil, K., ... e Hussain, S. (2024). Pesticides impacts on human health and the environment with their mechanisms of action and possible countermeasures. *Heliyon*.

Aldhamin, A. S., Al-Warid, H. S., e Moussawi, A. A. A. (2021). Helminths and their fish hosts as bioindicators of heavy metal pollution: A review. *Int. J. of Aquatic Sciences*, 12(2), 3401-3408.

Alimonda, H. (2011). *La colonialidad de la naturaleza. Una aproximación a la Ecología Política*.

Araya, G., Perfetti-Bolaño, A., Sandoval, M., Araneda, A., e Barra, R. O. (2024). Groundwater Leaching Potential of Pesticides: A Historic Review and Critical Analysis: Groundwater leaching of pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 43(12), 2478-2491.

Bacila, I., Cunliffe, V. T., e Krone, N. P. (2021). Interrenal development and function in zebrafish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 535, 111372.

Basnet, R. M., Zizioli, D., Taweedet, S., Finazzi, D., e Memo, M. (2019). Zebrafish larvae as a behavioral model in neuropharmacology. *Biomedicines*, 7(1), 23.

Brack, W., Barcelo Culleres, D., Boxall, A. B., Budzinski, H., Castiglioni, S., Covaci, A., ... e Zuccato, E. (2022). One planet: one health. A call to support the initiative on a global science-policy body on chemicals and waste. *Environmental Sciences Europe*, 34(1), 21.

Brasil. (2023, 27 de dezembro). Lei nº 14.785, de 27 de dezembro de 2023 – Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem, a rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e das embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, de produtos de controle ambiental, de seus produtos técnicos e afins. *Diário Oficial da União*. Recuperado de https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2023-2026/2023/lei/l14785.htm

Brasil. Ministério da Saúde. (1992, 16 de janeiro). Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992 – Ratifica os termos das Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins nº 1, de 9 de dezembro de 1991. *Diário Oficial da União*. Publicado em fevereiro de 1998.

Brasil. Ministério da Saúde. (2021, 4 de maio). Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021 – Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial da União*. Recuperado de <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-gm/ms-n-888-de-4-de-maio-de-2021-318461562>

Brito, R. S., Canedo, A., Farias, D., e Rocha, T. L. (2022). Transgenic zebrafish (*Danio rerio*) as an emerging model system in ecotoxicology and toxicology: Historical review, recent advances, and trends. *Science of the total environment*, 848, 157665.

Capela, Nuno *et al.* Sub-lethal doses of sulfoxaflozine impair honey bee homing ability. *Science of The Total Environment*, v. 837, p. 155710, 2022.

Carneiro, D. D., Mariotto, S., Sousa, D. A., e Bragotto, A. P. (2025). Presence of Pesticide Residues in Water Resources and Fish in Brazil: Narrative Bibliographic Review. *ACS Food Science e Technology*, 5(5), 1785-1797.

Cartereau, A., Bouchouireb, Z., Kaaki, S., Héricourt, F., Taillebois, E., Le Questel, J. Y., e Thany, S. H. (2024). Pharmacology and molecular modeling studies of sulfoxaflor, flupyradifurone and neonicotinoids on the human neuronal $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 492, 117123.

Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA). Resolução No. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União, 2005. <https://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=2747>.

Damasceno, J. M., Rato, L. D., Simões, T., Morão, I. F., Meireles, G., Novais, S. C., e Lemos, M. F. (2021). Exposure to the insecticide sulfoxaflor affects behaviour and biomarkers responses of *Carcinus maenas* (Crustacea: *Decapoda*). *Biology*, 10(12), 1234.

Dias, M. A., Santos, V. S., Vizioli, B. C., Ferreira, B. S., e Montagner, C. C. (2025). Pesticides in rainwater: A two-year occurrence study in an unexplored environmental compartment in regions with different land use in the State of São Paulo–Brazil. *Chemosphere*, 372, 144093.

Escher, S. E., Aguayo-Orozco, A., Benfenati, E., Bitsch, A., Braunbeck, T., Brotzmann, K., ... e Fisher, C. (2022). Integrate mechanistic evidence from new approach methodologies (NAMs) into a read-across assessment to characterise trends in shared mode of action. *Toxicology in vitro*, 79, 105269.

Escher, B. I., Stapleton, H. M., e Schymanski, E. L. (2020). Tracking complex mixtures of chemicals in our changing environment. *Science*, 367(6476), 388-392.

Fan, Y. L., Hsu, F. R., Wang, Y., e Liao, L. D. (2023). Unlocking the potential of zebrafish research with artificial intelligence: Advancements in tracking, processing, and visualization. *Medical e Biological Engineering e Computing*, 61(11), 2797-2814.

Fantke, P., Cinquemani, C., Yaseneva, P., De Mello, J., Schwabe, H., Ebeling, B., e Lapkin, A. A. (2021). Transition to sustainable chemistry through digitalization. *Chem*, 7(11), 2866-2882.

FAO (2022). FAO's plant production and protection division. Rome: FAO. doi:10.4060/cc2447en

FAO (2024). Pesticides use and trade – 1990–2022. FAOSTAT Analytical Briefs, No. 89. Rome. <https://doi.org/10.4060/cd1486en>

Fitzgerald, Jennifer A. *et al.* Approaches to test the neurotoxicity of environmental contaminants in the zebrafish model: From behavior to molecular mechanisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 40, n. 4, p. 989-1006, 2021.

Gaboardi, S. C., Candioto, L. Z. P., e Panis, C. (2023). Agribusiness in Brazil and its dependence on the use of pesticides. *Hygiene and Environmental Health Advances*, 8, 100080.

Gauthier, J. R., e Mabury, S. A. (2021). The sulfoximine insecticide sulfoxaflor and its photodegradate demonstrate acute toxicity to the nontarget invertebrate species *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(8), 2156-2164

Harper, A. A., Rimmer, K., Dyavanapalli, J., McArthur, J. R., e Adams, D. J. (2020). Ketamine inhibits synaptic transmission and nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in rat intracardiac ganglia in situ. *Neuropharmacology*, 165, 107932.

Hong, T., Park, J., An, G., Song, J., Song, G., e Lim, W. (2024). Evaluation of organ developmental toxicity of environmental toxicants using zebrafish embryos. *Molecules and cells*, 100144.

Kalyabina, V. P., Esimbekova, E. N., Kopylova, K. V., e Kratasyuk, V. A. (2021). Pesticides: formulants, distribution pathways and effects on human health—a review. *Toxicology reports*, 8, 1179-1192.

Kämmer, N., Erdinger, L., e Braunbeck, T. (2022). The onset of active gill respiration in post-embryonic zebrafish (*Danio rerio*) larvae triggers an increased sensitivity to neurotoxic compounds. *Aquatic Toxicology*, 249, 106240.

Kandie, F. J., Krauss, M., Beckers, L. M., Massei, R., Fillinger, U., Becker, J., ... e Brack, W. (2020). Occurrence and risk assessment of organic micropollutants in freshwater systems within the Lake Victoria South Basin, Kenya. *Science of the total environment*, 714, 136748.

Karaca, M., Fischer, B. C., Willenbockel, C. T., Tralau, T., Marx-Stoelting, P., e Bloch, D. (2021). Effects of co-formulants on the absorption and secretion of active substances in plant protection products in vitro. *Archives of Toxicology*, 95(10), 3205-3221.

K'oreje, K. O., Okoth, M., Van Langenhove, H., e Demeestere, K. (2020). Occurrence and treatment of contaminants of emerging concern in the African aquatic environment: Literature review and a look ahead. *Journal of environmental management*, 254, 109752.

Kramer, V. J., e Solomon, K. (2025). Critical review of the potential effects and risks to pollinators and aquatic organisms from the agricultural uses of sulfoxaflor; introductory comments. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 28(5), 265-268.

Krewski, D., Andersen, M. E., Tyshenko, M. G., Krishnan, K., Hartung, T., Boekelheide, K., ... e Cote, I. (2020). Toxicity testing in the 21st century: progress in the past decade and future perspectives. *Archives of toxicology*, 94, 1-58.

Kümmerer, K., Amsel, A. K., Bartkowiak, D., Bazzanella, A., Blum, C., e Cinquemani, C. (2021). Key Characteristics of Sustainable Chemistry. Towards a Common Understanding of Sustainable Chemistry. ISC3, Bonn.

Lin, W., Huang, Z., Zhang, W., e Ren, Y. (2023). Investigating the neurotoxicity of environmental pollutants using zebrafish as a model organism: A review and recommendations for future work. *Neurotoxicology*, 94, 235-244.

Loerracher, A. K., e Braunbeck, T. (2020). Inducibility of cytochrome P450-mediated 7-methoxycoumarin-O-demethylase activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquatic Toxicology*, 225, 105540.

Lopes-Ferreira, M., Falcão, M. A. P., Disner, G. R., e Lima, C. (2021). O Modelo Zebrafish e sua Contribuição ao Meio Ambiente. In D. C. V. Rêgo da Silva *et al.* (Orgs.), *Recurso Água: Tecnologias e pesquisas para o uso e a conservação de ecossistemas aquáticos* (pp. 188–219). São Carlos: Cubo.

Maggi, F., Tang, F. H., e Tubiello, F. N. (2023). Agricultural pesticide land budget and river discharge to oceans. *Nature*, 620(7976), 1013-1017.

Mariu, A., Chatha, A. M. M., Naz, S., Khan, M. F., Safdar, W., e Ashraf, I. (2023). Effect of temperature, pH, salinity and dissolved oxygen on fishes. *Journal of Zoology and Systematics*, 1(2), 1-12.

Matlin, S. A., Cornell, S. E., Krief, A., Hopf, H., e Mehta, G. (2022). Chemistry must respond to the crisis of transgression of planetary boundaries. *Chemical Science*, 13(40), 11710-11720.

Ministério da Saúde. (2021, maio 4). Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021: Estabelece os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano. *Diário Oficial da União*. <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-gm/ms-n-888-de-4-de-maio-de-2021-318461562>

Nagy, K., Duca, R. C., Lovas, S., Creta, M., Scheepers, P. T., Godderis, L., e Ádám, B. (2020). Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations. *Environmental Research*, 181, 108926.

Niesen, M., Sappington, K., Ruhman, M., Mroz, R., Leader, R. A. P., Housenger, J., e Chief, B. (2019). Ecological risk assessment for the registration of sulfoxaflo.

NIPHM (2025). National Institute of Plant Health Management. Available at: <https://niphm.gov.in/Recruitments/ASO-PMD.pdf>

OECD (2013), Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris

Ogunbanwo, O. M., Kay, P., Boxall, A. B., Wilkinson, J., Sinclair, C. J., Shabi, R. A., ... e Brown, L. E. (2022). High concentrations of pharmaceuticals in a Nigerian river catchment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 41(3), 551-558.

Pereira, A. G. P., Davico, C. E. D., Oliveira, B. R. F. O. F., e Izídio, G. S. I. (2022). Critical review: regulatory differences among countries expose the permissiveness in the use of hazardous pesticides in Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 17(2), 2-19.

Perobelli, J. E. (2025). Pesticides and public health: discussing risks in Brazilian agro-industrial growth. *Frontiers in Toxicology*, 7, 1442801.

Piner Benli, P., e Çelik, M. (2021). Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to neonicotinoid insecticide sulfoxaflor induced oxidative damage in zebrafish in vivo. *Science Progress*, 104(2), 00368504211028361. (a)

Piner Benli, P., e Çelik, M. (2021). In vivo effects of neonicotinoid-sulfoximine insecticide sulfoxaflor on acetylcholinesterase activity in the tissues of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxics*, 9(4), 73. (b)

Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), 2024. <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>.

Sanches, A. L. M., da Silva Pinto, T. J., Daam, M. A., Teresa, F. B., Vieira, B. H., Reghini, M. V., ... e Espíndola, E. L. G. (2024). Isolated and mixed effects of pure and formulated abamectin and difenoconazole on biochemical biomarkers of the gills of *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology*, 273, 106978.

Seralini, G. E. (2024). Pesticides in formulations: New revolutionary findings. *Toxics*, 12(2), 151.

Shaw, P., Mondal, P., Bandyopadhyay, A., e Chattopadhyay, A. (2020). Environmentally relevant concentration of chromium induces nuclear deformities in erythrocytes and alters the expression of stress-responsive and apoptotic genes in brain of adult zebrafish. *Science of the Total Environment*, 703, 135622.

Souza, V.; Salati, P. Liberação de agrotóxicos e defensivos biológicos bate recorde em 2024, após queda em 2023. *g1*, 2025. <https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2025/01/28/liberacao-de-agrotoxicos-e-defensivos-biologicos-bate-recorde-em-2024-apos-queda-em-2023.ghtml>

Sparks, T. C., Watson, G. B., Loso, M. R., Geng, C., Babcock, J. M., e Thomas, J. D. (2013). Sulfoxaflor and the sulfoximine insecticides: Chemistry, mode of action and basis for efficacy on resistant insects. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107(1), 1-7.

Solomon, K. R., Purdy, J. R., Kramer, V. J., e Giesy, J. P. (2025). Properties, mode of insecticidal action, environmental exposure pathways, and uses of the insecticide sulfoxaflor; sulfoxaflor environmental science review part I. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 28(5), 269-292.

Straw, E. A., e Brown, M. J. (2021). Co-formulant in a commercial fungicide product causes lethal and sub-lethal effects in bumble bees. *Scientific reports*, 11(1), 21653.

Straw, E. A., Thompson, L. J., Leadbeater, E., e Brown, M. J. (2022). 'Inert' ingredients are understudied, potentially dangerous to bees and deserve more research attention. *Proceedings of the Royal Society B*, 289(1970), 20212353.

Su, T., Lian, D., Bai, Y., Wang, Y. Y. L., Zhang, D., Wang, Z., e You, J. (2021). The feasibility of the zebrafish embryo as a promising alternative for acute toxicity test using various fish species: A critical review. *Science of the Total Environment*, 787, 147705.

Szerman, D., Assunção, JJ, Lipscomb, M., e Mobarak, AM (2022). Produtividade agrícola e desmatamento: Evidências do Brasil (nº 1091). Documento de Discussão do Centro de Crescimento Econômico.

Tang, F. H., Lenzen, M., McBratney, A., e Maggi, F. (2021). Risk of pesticide pollution at the global scale. *Nature Geoscience*, 14(4), 206-210.

Tudi, M., Daniel Ruan, H., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., ... e Phung, D. T. (2021). Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *International journal of environmental research and public health*, 18(3), 1112.

von Hellfeld, R., Gade, C., Baumann, L., Leist, M., e Braunbeck, T. (2023). The sensitivity of the zebrafish embryo coiling assay for the detection of neurotoxicity by compounds with diverse modes of action. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(30), 75281-75299.

von Hellfeld, R., Pannetier, P., e Braunbeck, T. (2022). Specificity of time-and dose-dependent morphological endpoints in the fish embryo acute toxicity (FET) test for substances with diverse modes of action: the search for a "fingerprint". *Environmental Science and Pollution Research*, 1-17.

Vorhees, C. V., Williams, M. T., Hawkey, A. B., e Levin, E. D. (2021). Translating neurobehavioral toxicity across species from zebrafish to rats to humans: Implications for risk assessment. *Frontiers in toxicology*, 3, 629229.

Wang, F., Xiang, L., Leung, K. S. Y., Elsner, M., Zhang, Y., Guo, Y., ... e Tiedje, J. M. (2024). Emerging contaminants: a one health perspective. *The Innovation*.

Wang, K., Huang, Y., Cheng, B., Guo, J., Peng, Y., Zeng, S., ... e Lu, H. (2023). Sulfoxafloer induces immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) by activating TLR4/NF-κB signaling pathway. *Fish e Shellfish Immunology*, 137, 108743.

Watson, G. B., Siebert, M. W., Wang, N. X., Loso, M. R., e Sparks, T. C. (2021). Sulfoxafloer—A sulfoximine insecticide: Review and analysis of mode of action, resistance and cross-resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 178, 104924.

Yao, F., Li, Y., Ru, H., Wu, L., Xiao, Z., Ni, Z., ... e Zhong, L. (2020). Thyroid disruption and developmental toxicity caused by triphenyltin (TPT) in zebrafish embryos/larvae. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 394, 114957.

Xiong, Y., Chen, X., Li, F., Chen, Z., e Qin, Z. (2022). Zebrafish larvae acute toxicity test: A promising alternative to the fish acute toxicity test. *Aquatic Toxicology*, 246, 106143.

Zhang, X., Wang, X., Liu, Y., Fang, K., e Liu, T. (2020). The toxic effects of sulfoxaflor induced in earthworms (*Eisenia fetida*) under effective concentrations. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(5), 1740.

Zhao, W., Chen, Y., Hu, N., Long, D., e Cao, Y. (2024). The uses of zebrafish (*Danio rerio*) as an in vivo model for toxicological studies: A review based on bibliometrics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 272, 116023.

Zhou, X., Deng, Y., Wang, R., Wang, F., Cui, H., Hu, D., e Lu, P. (2023). Toxic effects of imidacloprid and sulfoxaflor on *Rana nigromaculata* tadpoles: Growth, antioxidant indices and thyroid hormone-related endocrine system. *Arabian Journal of Chemistry*, 16(6), 104723.

Zindler, F., Beedgen, F., e Braunbeck, T. (2019). Time-course of coiling activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to ethanol as an endpoint for developmental neurotoxicity (DNT)–Hidden potential and underestimated challenges. *Chemosphere*, 235, 12-20.

3 ARTIGO

IMPACTOS DO INSETICIDA SULFOXAFLOLOR E DA SUA FORMULAÇÃO COMERCIAL NO DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL DO ZEBRAFISH

Resumo

O uso intensivo de agrotóxicos na agricultura moderna tem se consolidado como uma das principais ameaças à biodiversidade aquática, especialmente em ecossistemas de alta sensibilidade e riqueza biológica, como os encontrados em diversas regiões tropicais. Entre esses compostos, o inseticida sulfoxaflor (SFX), introduzido recentemente no mercado como alternativa aos neonicotinóides, tem despertado atenção pela sua ampla aplicação, toxicidade em organismos não-alvo e pelo potencial para alcançar ambientes aquáticos. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos ecotoxicológicos do SFX, tanto em sua forma pura/ingrediente ativo (i.a.) quanto em uma formulação comercial (Verter, Corteva[®]), sobre o desenvolvimento embrionário e larval do zebrafish (*Danio rerio*). O teste de embriotoxicidade foi realizada utilizando seis concentrações (0, 4, 4, 40, 400 e 4.000 µg/L) e com os devidos grupos controles, com base em valores de relevância ambiental relatados e da LC50 desse composto, ao longo de 96h e com exposição semi-estática, sendo avaliados parâmetros letais, subletais, cardiotoxicidade, neurotoxicidade e avaliação biométrica. Os resultados revelaram que, embora o ingrediente ativo puro não tenha causado mortalidade significativa nem afetado a taxa de eclosão nas concentrações testadas, foi detectada redução na frequência de contrações espontâneas e no número de batimentos cardíacos a partir de 400 µg/L. Já o inseticida à base de SFX demonstrou maior toxicidade, também induzindo alterações em parâmetros subletais, como o aumento dos batimentos cardíacos desde as menores concentrações testadas, além de neurotoxicidade e diversas alterações morfológicas. Contudo, em análise comparativa, os resultados obtidos não indicaram diferenças significativas entre o ingrediente ativo puro e a formulação comercial de SFX em relação aos biomarcadores avaliados. Essa ausência de diferença sugere que, nas concentrações e condições testadas, os coadjuvantes presentes no produto comercial não exerceram um efeito adicional detectável sobre os

parâmetros morfológicos e fisiológicos analisados em embriões e larvas de zebrafish. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de que efeitos mais sutis, cumulativos ou tardios — não identificáveis pelos biomarcadores utilizados — tenham ocorrido. Essa limitação destaca a necessidade de investigações complementares que incluam outras abordagens, como análises moleculares, comportamentais pós-eclosão ou exposições crônicas.

Palavras-chave: Ecotoxicologia, Poluição ambiental, Agrotóxicos, Peixes, Biomarcadores.

3.1 Introdução

As atividades domésticas, industriais e agrícolas são as principais responsáveis pela poluição dos recursos hídricos (Landrigan *et al.*, 2018). Com o crescimento populacional e a previsão de 10 bilhões de pessoas até 2050, a agricultura tem intensificado o uso de agroquímicos para aumentar a produtividade (Yadav *et al.*, 2020). Estima-se que 64% das terras agrícolas globais estejam contaminadas por agrotóxicos, com maior impacto em regiões da Ásia, África, Europa e Américas, (Elumalai *et al.*, 2025). O Brasil liderou o uso desses produtos em 2021, com 720.000 toneladas aplicadas, sob um sistema regulatório permissivo (FAO, 2023; Souza *et al.*, 2023).

As formulações comerciais de agrotóxicos não são compostas apenas por ingredientes ativos (i.a.) com ação biocida, mas também por diversas substâncias adicionais rotuladas como “adjuvantes”, “aditivos” ou “coformulantes”, cuja função é potencializar a eficácia do produto, aumentando a solubilidade, estabilidade, absorção e penetração dos ingredientes ativos (Sehgal *et al.*, 2024). De acordo com Van de Merwe (2018), os agrotóxicos comerciais com os mesmos ingredientes ativos podem ter diferenças de até 600 vezes em sua toxicidade devido aos aditivos presentes. Embora considerados “inertes”, muitos desses co-formulantes podem ter atividade biológica própria, podendo ser tão ou até mais tóxicos para seres humanos e organismos não-alvo do que os próprios ingredientes ativos, além de apresentarem efeitos sinérgicos quando combinados (Straw, 2024). A avaliação da toxicidade desses produtos, no entanto, historicamente tem se restringido aos ingredientes ativos, desconsiderando os efeitos

potencialmente danosos dos aditivos e o comportamento ambiental das formulações como um todo, o que compromete a precisão das estimativas de risco e a efetividade das políticas de proteção ambiental e à saúde (Nagy *et al.*, 2020).

Dentre os ingredientes ativos utilizados em inseticidas com potencial de contaminação, destaca-se o sulfoxaflor (SFX) (CAS number: 946578-00-3), nome designado para o composto químico metil(oxo){1-[6-(trifluorometil)-3-piridil]etil}-λ6-sulfanilideno]cianamida, cuja fórmula química é $C_{10}H_{10}F_3N_3OS$, amplamente reconhecido por sua eficácia no controle de insetos (Solomon *et al.*, 2025). Esse composto, desenvolvido pela Dow AgroSciences®, é o primeiro inseticida comercializado da classe das sulfoxaminas, e foi introduzido como solução para a crescente resistência de alguns insetos sugadores de seiva, como pulgões, percevejos e cigarrinhas, a inseticidas convencionais (Capela *et al.*, 2022). O agrotóxico SFX é comercializado na forma de concentrado em suspensão e grânulo dispersível em água, sendo aplicado principalmente por pulverização foliar em diversas culturas, especialmente em culturas de arroz, vegetais e árvores frutíferas (Malhat *et al.*, 2024).

O SFX apresenta propriedades particulares, como baixa adsorção ao solo e sedimentos, com coeficiente de sorção do solo (KD) de 0,103, alta solubilidade em água, com uma solubilidade de 560 mg/L e um coeficiente de partição octanol-água de $\log P=0,802$ (Lewis *et al.* 2016), e uma meia-vida de aproximadamente 13 dias no solo (Gauthier *et al.*, 2021). Em ambientes aquáticos, sua persistência varia entre 37 e 88 dias, sendo resistente à fotólise e à hidrólise tanto na água quanto no solo (Niesen *et al.*, 2019). Tais características aumentam seu potencial de contaminação em corpos d'água superficiais e subterrâneos. Seu modo de ação baseia-se na interação agonista com os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), atuando como ativador desses receptores (Zhu *et al.*, 2011), agindo diretamente no sistema nervoso dos insetos, interferindo na transmissão de impulsos nervosos e resultando em sua paralisia e morte (Sparks *et al.*, 2013).

No entanto, devido às suas características físico-químicas, também pode afetar organismos não-alvos. Além disso, ainda são limitadas as informações sobre os níveis seguros de resíduos de SFX em diferentes compartimentos hídricos, como na água potável, superficial e subterrânea (Zhao *et al.*, 2025). Isso se deve, em parte, ao fato de

que o SFX, assim como outros neonicotinóides recentemente introduzidos no mercado, ainda não serem investigados e detectado nesses ambientes, refletindo uma lacuna nos esforços de monitoramento ambiental (Łukaszewicz *et al.*, 2023). No entanto, já foram relatadas concentrações de até 400 µg/L de neonicotinóides em águas subterrâneas dos Estados Unidos, da Índia, e da Suécia, o que ressalta o potencial risco ecotoxicológico associado a esse grupo de inseticidas (Morrissey *et al.*, 2015).

Dados recentes têm demonstrado os efeitos tóxicos do inseticida SFX em organismos não-alvo. Em abelhas (*Apis mellifera*), uma concentração subletal de 26 ng/abelha do inseticida à base de SFX (Closer[®]) afetou significativamente a capacidade de retorno à colmeia (Capela *et al.*, 2022). Em crustáceos (*Carcinus maenas*), após exposição por até 7 dias ao inseticida comercial à base de SFX (Closer[®]), foram encontradas alterações comportamentais como redução da alimentação e aumento da motricidade, além de maior peroxidação lipídica e redução da atividade da Glutathione S-Transferase (GST), indicando efeitos neurocomportamentais e estresse oxidativo (Damasceno *et al.*, 2021). Zhou *et al.* (2023) investigaram os efeitos do i.a. SFX em girinos de *Rana nigromaculata* usando concentrações subletais 1/10 e 1/100 do LC₅₀ de 427,37 mg/L por 28 dias. Estes autores observaram estresse oxidativo, alterações nos níveis de hormônios da tireoide e perturbação na expressão de genes relacionados à metamorfose, sugerindo um efeito desregulador endócrino. Zhang *et al.* (2020) observaram que o i.a. puro de SFX em concentrações de 0,5 e 1,0 mg/kg no solo causou estresse oxidativo em minhocas (*Eisenia fetida*) com aumento de radicais livres, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e alterações enzimáticas. Em embriões de zebrafish expostos ao i.a. SFX nas concentrações de 0,87, 1,75 e 3,51 mg/L por 96 horas, foi observado aumento significativo na atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e nos músculos, indicando potencial neurotoxicidade (Piner Benli e Çelik, 2021 (a)). Em outro estudo dos mesmos autores, nas mesmas concentrações e tempos de exposição, foi constatado estresse oxidativo nas brânquias, com aumento de glutathione reduzida (GSH), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR), redução de GST e TBARS, sugerindo desregulação do sistema antioxidante e dano oxidativo (Piner Benli e Çelik, 2021b). Wang *et al.* (2023) também expuseram embriões de zebrafish a i.a. SFX nas concentrações de 20, 25 e 30 mg/L por 72 horas, sendo encontrado aumento da mortalidade, retardo no

crescimento, redução de células imunes inatas e ativação da via TLR4/NF- κ B, com aumento na expressão de genes inflamatórios como IL-6, IL-1 β e TNF- α , caracterizando assim a ocorrência de embriotoxicidade e imunotoxicidade.

A avaliação da ecotoxicidade em organismos aquáticos tem se beneficiado significativamente com o emprego de embriões de zebrafish, desde a implementação do teste de toxicidade embrionário-larval do zebrafish, conhecidos como ZELT Test, pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2013), considerado uma alternativa ética e eficiente para testes em peixes adultos. O ZELT test permite uma avaliação ecotoxicológica do desenvolvimento do organismo desde a embriogênese até a fase larval (OECD, 2013), sendo recomendado para avaliação de toxicidade pela União Europeia, Diretiva 86/609/ECC (Comissão Europeia, 1986), o regulamento de Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Produtos Químicos (REACH) da União Europeia (Comissão Europeia, 2006) e diretiva 2010/63/UE (Comissão Europeia, 2010).

Ainda, podem ser analisados outros biomarcadores, como as contrações espontâneas observadas em torno de 24 hpf (horas pós-fertilização), que indicam atividade neuronal e são sensíveis à neurotoxicidade, e a frequência dos batimentos cardíacos, monitorada em 48 hpf, que tem sido amplamente usada para avaliar efeitos cardiotoxicos de substâncias (Velki *et al.*, 2017). Paralelamente, as análises comportamentais vêm ganhando destaque como ferramentas sensíveis para detectar efeitos subletais precoces (Hellou *et al.*, 2011), especialmente em concentrações ambientalmente relevantes. Dessa forma, o uso integrado de análises morfológicas, fisiológicas e comportamentais fornece uma abordagem robusta e sensível para a detecção de toxicidade ambiental em estágios iniciais do desenvolvimento (Michaelis *et al.*, 2024).

Neste contexto, este estudo utilizou embriões e larvas de zebrafish como sistema modelo para investigar os potenciais efeitos ecotóxicos do agrotóxico à base de SFX (Verter[®]), em comparação com seu i.a. puro. Para isso, foi avaliado um conjunto de biomarcadores. Considerando que os aditivos presentes em formulações comerciais podem potencializar os efeitos adversos do princípio ativo, a hipótese de que a formulação comercial induz maior ecotoxicidade em comparação ao composto isolado foi testada. Ao

adotar essa abordagem comparativa, este estudo contribui com uma perspectiva mais realista e abrangente sobre os riscos ambientais associados ao uso desse inseticida em ecossistemas aquáticos.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Animais e coleta dos embriões de zebrafish

Zebrafish adultos da linha AB (6-12 meses) foram criados no biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) e mantidos em um sistema de recirculação contendo água reconstituída (ISO, 1993), sob condições controladas. A água foi mantida a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, com pH $7,0 \pm 0,5$, oxigênio dissolvido em torno de 6 mg/L e ciclo claro/escuro de 14/10 h. Os animais foram alimentados três vezes ao dia com uma dieta composta por ração seca (Maramar[®] Tropical Granules, Lima, Peru; Alcon[®] Spirulina, Genebra, Suíça) e alimento vivo (náuplios de *Artemia salina*, Maramar[®]).

Para a coleta dos embriões, machos e fêmeas foram colocados no final da tarde em tanques de desova, na proporção de 2:1, em quintuplicata, sendo mantidos nessas condições até a manhã seguinte. A desova ocorreu espontaneamente, e os ovos foram coletados, lavados com água destilada para a remoção de impurezas e transferidos para placas de petri contendo água reconstituída. Em seguida, os ovos fertilizados com até 3 horas pós-fertilização (hpf) foram selecionados sob microscópio invertido (AE2000, Motic[®], Barcelona, Espanha). Embriões não fertilizados, coagulados ou inviáveis foram descartados de acordo com as boas práticas laboratoriais e as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O experimento foi conduzido de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o número 1469200524.

3.2.2 Teste toxicidade embrio-larval com zebrafish (ZELT)

O ZET foi conduzido conforme o Guia n. 239 - Teste de embriotoxicidade aguda com embriões de peixes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2013). Para a exposição, os embriões de zebrafish recém-fertilizados (até 3hpf) foram alocados individualmente em placas de 24 poços (KASVI[®]). Foram utilizados 20

embriões por tratamento, por repetição experimental (em triplicata, n=3), conforme indicado pela OECD. O delineamento experimental incluiu um controle negativo contendo apenas água reconstituída (ISO, 1993) e um controle positivo com 4 mg/L de 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA) (OECD, 2013), bem como dois grupos de tratamentos, o primeiro com o ingrediente ativo (i.a.) SFX (CAS number: 946578-00-3, AccuStandard[®], P-1133N, lote: 33160-01), e o segundo com o inseticida à base de SFX, Verter[®] (240,0 g/L) (Corteva[®], lote: CO2101S152). Foi feita uma solução estoque com 100 mg/L para cada composto e então armazenado em vidro âmbar à 4^o C.

Para as exposições foram testados seis tratamentos de ambos os compostos a 0,4, 4, 40, 400 e 4.000 µg/L, diluídos em água reconstituída. Tais concentrações foram determinadas baseadas nas concentrações de relevância ambiental de neonicotinóides, grupo no qual o SFX foi proposto para substituir, que foi detectado no monitoramento de águas subterrâneas em até 400 µg/L (Morrissey *et al.*, 2015). Isso se dá uma vez que o SFX ainda não foi detectado em águas superficiais e subterrâneas, assim como outros neonicotinóides recentemente introduzidos no mercado (Łukaszewicz *et al.*, 2023). A maior concentração (4.000 µg/L) foram baseadas na LC50 (96h) do i.a. puro de SFX em zebrafish adulto, que corresponde a 35,1 mg/L (Benli e Çelik, 2021a).

As placas contendo os embriões foram mantidas em incubadora sob temperatura controlada ($27 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro por 96 horas, com renovação de todos os tratamentos a cada 24h (exposição semi-estática). Ao longo de toda a exposição, todos os embriões/larvas foram analisados diariamente (24, 48, 72 e 96h) com o auxílio do microscópio (Leica DM 750) acoplado à câmera LEICA ICC50W e software Leica Application Suite V4, a fim de avaliar a mortalidade, eclosão e alterações morfológicas. A mortalidade dos embriões foi considerada a partir de quatro possíveis resultados, conforme normas da OCDE (2013): a) Coagulação dos embriões; b) Ausência de somitos; c) Não desprendimento da cauda; d) Ausência de batimento cardíaco.

Os parâmetros não letais avaliados incluíram a taxa de eclosão em diferentes períodos do desenvolvimento embrionário (24, 48, 72 e 96h). Ainda, diariamente foram analisados os efeitos teratogênicos, como a presença de escoliose, raquitismo, edemas, deformação do vitelo, alteração na pigmentação, conforme Beekhuijzen *et al.* (2015).

3.2.3. Avaliação de atividade neuromuscular espontânea e cardiotoxicidade

A taxa de contrações espontâneas por minuto ($n \text{ min}^{-1}$) em embriões com 26–28 hpf, após 24 horas de exposição, foi mensurada com o auxílio de uma lupa Opticam Opzts T1A, e utilizada como indicador da neurotoxicidade. Esse parâmetro subletal é considerado um biomarcador sensível e adequado para a avaliação de neurotoxicidade, uma vez que está relacionado a alterações locomotoras observadas no período pós-eclosão (Krzykwa *et al.*, 2019; Selderslaghs *et al.*, 2010).

A frequência cardíaca por minuto (bpm) em embriões com 48–52 hpf, após 48 horas de exposição, foi mensurada utilizando um microscópio óptico (Leica DM 750) acoplado à câmera Leica ICC50 HD e ao software Leica Application Suite V4.12, com o objetivo de avaliar a cardiotoxicidade das amostras, como descrito por Hoage *et al.* (2012).

3.2.4. Análise morfométrica

Após 96 horas de exposição, foi realizada a eutanásia das larvas com benzocaína (0,1%) para a captura das fotos. Foram fotografados 10 animais de cada tratamento, nas posições dorsal e lateral. A análise morfométrica das larvas foi realizada utilizando um microscópio acoplado a um sistema de captura de imagens (Leica Application Suite V4.12), sendo as medições realizadas no software ImageJ. Os parâmetros morfométricos foram organizados em três categorias: (i) sensorial: diâmetro ocular; (ii) fisiológico: diâmetro da bexiga natatória, do saco vitelino e do saco pericárdico; (iii) estrutural esquelético: altura, largura e comprimento total, conforme metodologia descrita por Ribeiro *et al.* (2020).

3.2.5. Análise estatística

Os dados adquiridos para os parâmetros avaliados foram inicialmente agrupados por tratamento e analisados utilizando os softwares GraphPad Prism 7[®] e R. A normalidade e a homogeneidade das variâncias foram verificadas por meio do teste de Shapiro-Wilk. Uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para explorar os padrões globais de resposta e

similaridade entre os tratamentos, também foram realizadas análise de componentes principais (PCA) e o cálculo do Índice Integrado de Biomarcadores (IBR). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

A análise PCA foi realizada a partir no software R com uso da matriz contendo exclusivamente as variáveis numéricas do experimento, que correspondem às diferentes concentrações testadas (0,4; 4; 40; 400; 4000). Essas variáveis foram previamente padronizadas (média = 0, desvio-padrão = 1), de modo a garantir comparabilidade entre escalas distintas. A PCA permitiu avaliar a distribuição dos grupos formados pelas combinações de biomarcadores e tipos de tratamento (i.a. puro e a formulação comercial à base de SFX) no espaço multivariado. Para testar diferenças estatísticas entre os grupos, foi aplicada uma análise de variância permutacional multivariada (PERMANOVA), utilizando a distância euclidiana e 999 permutações. Essa análise foi realizada separadamente para cada biomarcador, tendo o tipo de tratamento como fator fixo. Além disso, comparações univariadas foram conduzidas por meio do teste de Wilcoxon para cada variável numérica entre os dois tratamentos.

O índice IBR foi calculado conforme proposto por Sanchez et al. (2013). Inicialmente, para cada concentração testada e para cada biomarcador, foi calculada a razão entre o valor médio observado no grupo exposto (X_i) e a média correspondente no grupo controle (X_0), resultando na razão $Y_i = X_i/X_0$. Para reduzir a variância, os valores foram transformados por logaritmo natural: $Y_i = \log(X_i/X_0)$. Em seguida, foi calculada a média geral e o desvio-padrão de todos os valores Y_i para a respectiva concentração, permitindo a padronização por meio do escore-Z: $Z_i = (Y_i - \mu)/\sigma$. O mesmo procedimento foi aplicado aos dados do grupo controle (Z_0), permitindo o cálculo do índice de desvio do biomarcador (A) como $A = Z_i - Z_0$. O valor absoluto desse desvio foi então somado entre todos os biomarcadores para estimar o IBR por concentração: $IBR = \sum|A|$.

3.3 Resultados

3.3.1 Teste toxicidade embrio-larval com zebrafish (ZELT)

A taxa de mortalidade nos embriões e larvas de zebrafish observada nos grupos controles negativo e positivo após 96 horas alcançou valores dentro do esperado, validando assim o teste ZET realizado. Os resultados indicaram que não houve diferença

significativa na mortalidade entre os grupos tratados com o i.a. puro de SFX e o grupo controle negativo (CN) (Figura 1A). De maneira semelhante, os embriões expostos ao inseticida à base de SFX também não apresentaram aumento significativo na taxa de mortalidade (Figura 1A). Em relação à taxa de eclosão dos embriões expostos ao i.a. puro de SFX (Figura 1B) não diferiu estatisticamente do grupo controle. Nos grupos expostos ao inseticida à base de SFX, apenas foi detectado redução na taxa de eclosão para a maior concentração testada em comparação com o grupo CN ($p < 0,01$) (Figura 1B).

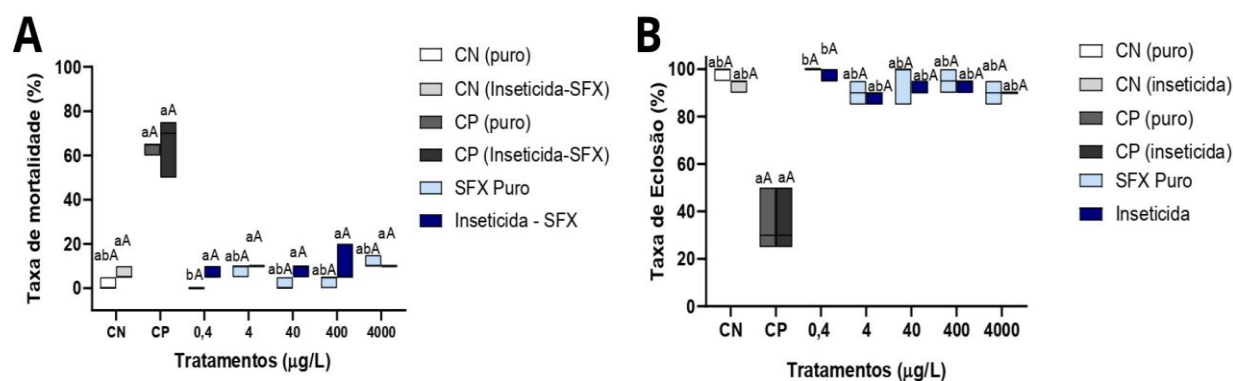


Figura 1. Efeitos de diferentes concentrações do i.a. SFX e do inseticida à base de SFX nas taxas de mortalidade (A) e eclosão (B) de embriões de zebrafish até 96 horas pós-fecundação (hpf), bem como nos grupos controle negativo (CN) e controle positivo (CP). Os dados estão apresentados como média \pm média do erro padrão. As letras minúsculas indicam diferença estatística entre todos os tratamentos de cada composto avaliado ($p < 0,05$), enquanto as letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os compostos i.a. SFX e ao inseticida à base de SFX.

3.3.2 Atividade neuromuscular espontânea

Os embriões expostos ao i.a. puro de SFX apresentaram uma redução significativa na frequência de contrações espontâneas em comparação com o grupo controle negativo após 24 horas de exposição, com efeito observado nas concentrações a partir de 40 $\mu\text{g/L}$. Resultados semelhantes foram observados nos embriões expostos ao inseticida à base de SFX com uma redução na frequência de contrações espontâneas a partir de 4 $\mu\text{g/L}$,

porém com uma redução mais acentuada nas duas maiores concentrações testadas (400 e 4.000 $\mu\text{g/L}$) quando comparado com o controle negativo ($p < 0,0001$; Figura 2).

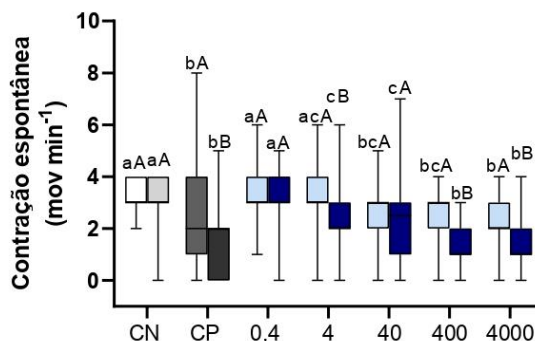


Figura 2. Efeitos de diferentes concentrações do i.a. SFX e do inseticida à base de SFX na taxa de contração espontânea de embriões de zebrafish até 96 horas pós-fecundação (hpf), bem como nos grupos controle negativo (CN) e controle positivo (CP). Os dados estão apresentados como média \pm média do erro padrão. As letras minúsculas indicam diferença estatística entre todos os tratamentos de cada composto avaliado ($p < 0,05$), enquanto as letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os compostos i.a. SFX e ao inseticida à base de SFX.

3.3.3 Cardiotoxicidade

Enquanto os embriões do controle negativo apresentaram uma frequência cardíaca média de 132,1 batimento min^{-1} após 48h de exposição, os embriões expostos aos tratamentos com i.a. puro de SFX nas concentrações de 40 a 400 $\mu\text{g/L}$ apresentaram redução da frequência cardíaca (braquicardia), com as médias 128,9, 126,7 e 120,7 batimento min^{-1} , respectivamente. Entretanto, o contrário foi observado nos embriões expostos ao inseticida à base de SFX, em que todas as concentrações da formulação comercial promoveram um aumento da frequência cardíaca. Na menor concentração (0,4 $\mu\text{g/L}$), observou-se um aumento moderado na frequência de batimentos em relação ao controle negativo, ao passo que nas demais concentrações as alterações foram mais acentuadas (Figura 3).

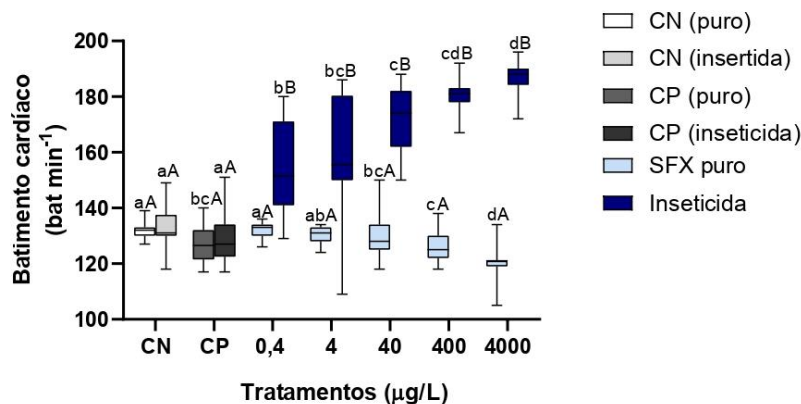


Figura 3. Efeitos de diferentes concentrações do i.a. SFX e do inseticida à base de SFX na taxa de batimento cardíaco de embriões de zebrafish até 96 horas pós-fecundação (hpf), bem como nos grupos controle negativo (CN) e controle positivo (CP). Os dados estão apresentados como média \pm média do erro padrão. As letras minúsculas indicam diferença estatística entre todos os tratamentos de cada composto avaliado ($p < 0,05$), enquanto as letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os compostos i.a. SFX e ao inseticida à base de SFX.

3.3.4 Alterações morfológicas e morfométricas

A análise da frequência de teratogênese em embriões e larvas de zebrafish mostrou que tanto o i.a. puro de SFX quanto sua formulação comercial induziram alterações morfológicas. No caso do i.a. de SFX (Tabela 1), observou-se um aumento progressivo na incidência de edemas no saco pericárdico e no saco vitelínico com o aumento das concentrações (Figura 4), sendo os valores mais elevados registrados na concentração mais alta (4.000 µg/L). Deformações do vitelo e curvaturas das larvas também foram observadas em concentrações elevadas, embora sem diferença estatística significativa.

Para o inseticida à base de SFX, alterações foram registradas em mais parâmetros, incluindo edema pericárdico, curvatura corporal, coluna e cabeça. No entanto, a diferença estatística significativa entre as concentrações foi observada apenas para o edema do saco pericárdico, variando de 0,4 µg/L (2 ± 0) até 4.000 µg/L ($8,33 \pm 0,57$). Alterações na curvatura e em outros parâmetros foram registradas, mas não atingiram significância estatística entre as concentrações. Os dados estão apresentados como média \pm erro

padrão da média, sendo que as letras minúsculas indicam diferença estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), enquanto as letras maiúsculas indicam diferença entre o i.a. puro e o inseticida à base de SFX.

Tabela 1. Efeitos de diferentes concentrações do i.a. SFX e do inseticida à base de SFX na frequência de alterações morfológicas em embriões e larvas até 96 horas pós-fecundação (hpf), bem como nos grupos controle negativo (CN) e controle positivo (CP). Os dados estão apresentados como média \pm média do erro padrão. As letras minúsculas indicam diferença estatística entre todos os tratamentos de cada composto avaliado ($p < 0,05$), enquanto as letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os compostos i.a. SFX e ao inseticida à base de SFX.

	Tratamento ($\mu\text{g/L}$)	Edema pericárdico	Edema vitelínico	Deformação do vitelo	Alteração na coluna	Alteração na cabeça
i.a. SFX	CN	0,33 \pm 0,57 ^{aA}	0 ^{aA}	0 ^{aA}	0 ^{aA}	0 ^{aA}
	CP	11 \pm 1 ^{bA}	4,33 \pm 1,15 ^{aA}	0,33 \pm 0,57 ^{aA}	2,66 \pm 1,15 ^{aA}	0 ^{aA}
	0,4	0,33 \pm 0,57 ^{aA}	0 ^{aA}	0 ^{aA}	0,33 \pm 0,57 ^{aA}	0 ^{aA}
	4	0 ^{aA}	0 ^{aA}	0 ^{aA}	0 ^{aA}	0 ^{aA}
	40	0 ^{aA}	0,33 \pm 0,57 ^{aA}	0 ^{aA}	0 ^{aA}	0 ^{aA}
	400	0,33 \pm 0,57 ^{aA}	0,33 \pm 0,57 ^{aA}	0 ^{aA}	0 ^{aA}	0 ^{aA}
	4000	1,33 \pm 0,57 ^{aA}	1,33 \pm 1,52 ^{aA}	0 ^{aA}	1 ^{aA}	0 ^{aA}
Inseticida - SFX	CN	0,66 \pm 0,57 ^{aA}	0 ^{aA}	0 ^{aA}	0 ^{aA}	0 ^{aA}
	CP	10,66 \pm 0,57 ^{bA}	4,33 \pm 1,15 ^{aA}	0,33 \pm 0,57 ^{aA}	2,66 \pm 1,15 ^{aA}	0,33 \pm 0,57 ^{aA}
	0,4	2 \pm 0 ^{abA}	0,33 \pm 0,57 ^{aA}	0 ^{aA}	0,33 \pm 0,57 ^{aA}	0 ^{aA}
	4	1,5 \pm 0,7 ^{abA}	0,33 \pm 0,57 ^{aA}	0,33 \pm 0 ^{aA}	0,66 \pm 0,57 ^{aA}	0 ^{aA}
	40	2,66 \pm 2,08 ^{abA}	0,33 \pm 0,57 ^{aA}	0 ^{aA}	0,33 \pm 0,57 ^{aA}	0,33 \pm 0,57 ^{aA}
	400	5,66 \pm 2,08 ^{abA}	0,33 \pm 0,57 ^{aA}	0,33 \pm 0,57 ^{aA}	0,66 \pm 1,15 ^{aA}	0 ^{aA}
	4000	6,66 \pm 1,15 ^{abA}	2 \pm 1 ^{aA}	0 ^{aA}	0,66 \pm 0,57 ^{aA}	0,33 \pm 0,57 ^{aA}

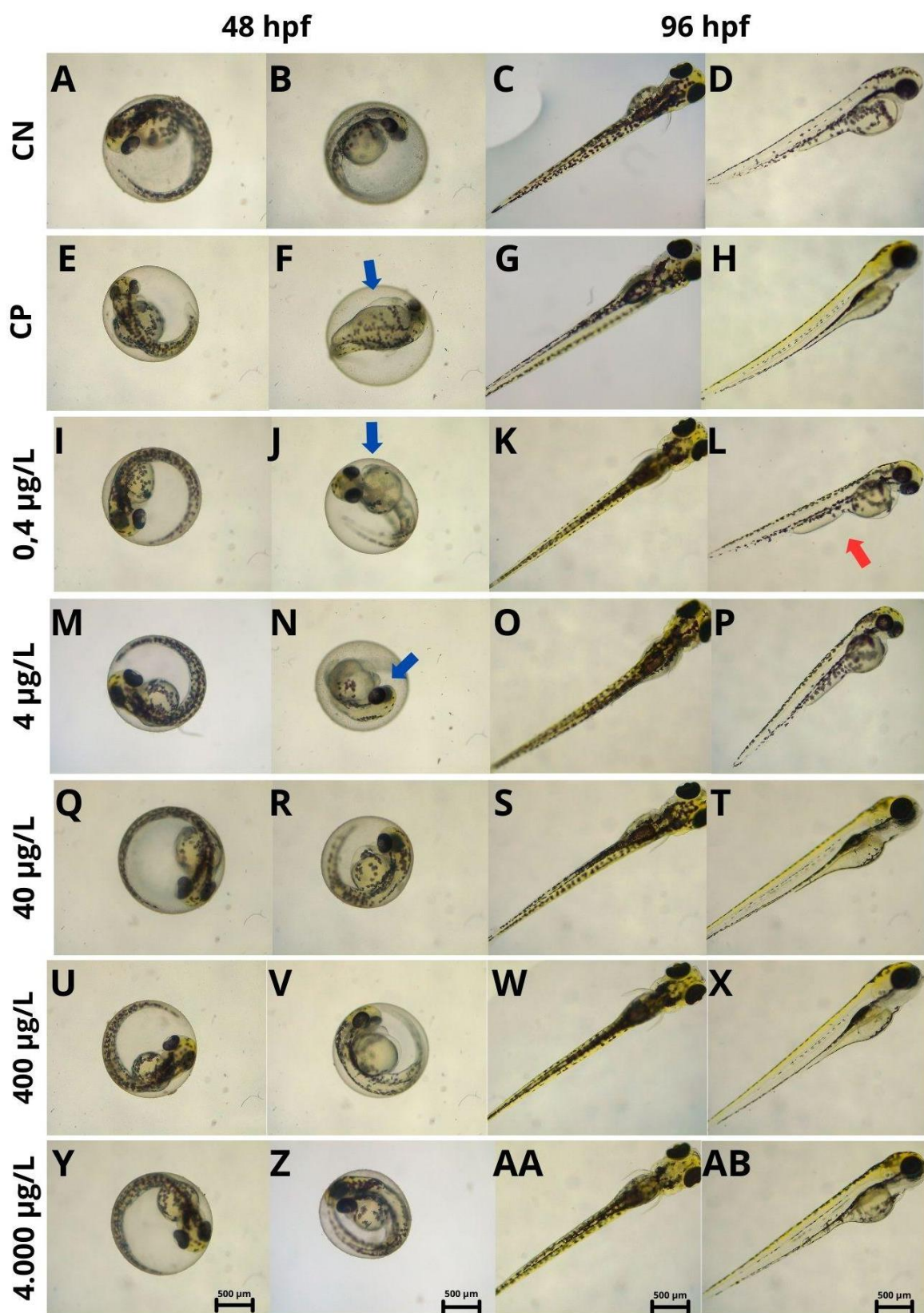


Figura 4. Alterações morfológicas observadas em embriões (48 hpf) e larvas (96 hpf) de zebrafish expostas a diferentes concentrações de i.a. SFX e do inseticida à base de SFX, bem como dos grupos controle negativo (CN) e controle positivo (CP) por 96h. Barra de escala: 500µm

A análise morfométrica das larvas de zebrafish expostas ao i.a. SFX revelou alterações em alguns parâmetros avaliados. O comprimento total (Figura 5A), a área dos olhos (Figura 5D), a altura da cabeça (Figura 5B) e a largura da cabeça (Figura 5E) não apresentaram alterações significativas em nenhuma das concentrações testadas do i.a. SFX. No entanto, observou-se aumento significativo da área da bexiga natatória na concentração de 400 µg/L (Figura 5C). A área do saco pericárdico também apresentou aumento significativo com o i.a. SFX na concentração de 400 µg/L (Figura 5F). Em contraste, os embriões expostos à formulação comercial à base de SFX apresentaram alterações morfométricas mais intensas e frequentes. A área da bexiga natatória (Figura 5C) se mostrou aumentada na concentração de 400 µg/L. Já a área do saco vitelínico (Figura 5G) apresentou um aumento a partir de 4 µg/L até 4.000 µg/L, com efeitos mais pronunciados nas concentrações mais altas, sendo o mesmo padrão observado para a área do saco pericárdico (Figura 5F). Além disso, a largura da cabeça (Figura 5E) apresentou aumento significativo nas concentrações de 40 e 400 µg/L, efeito não observado para o i.a. SFX.

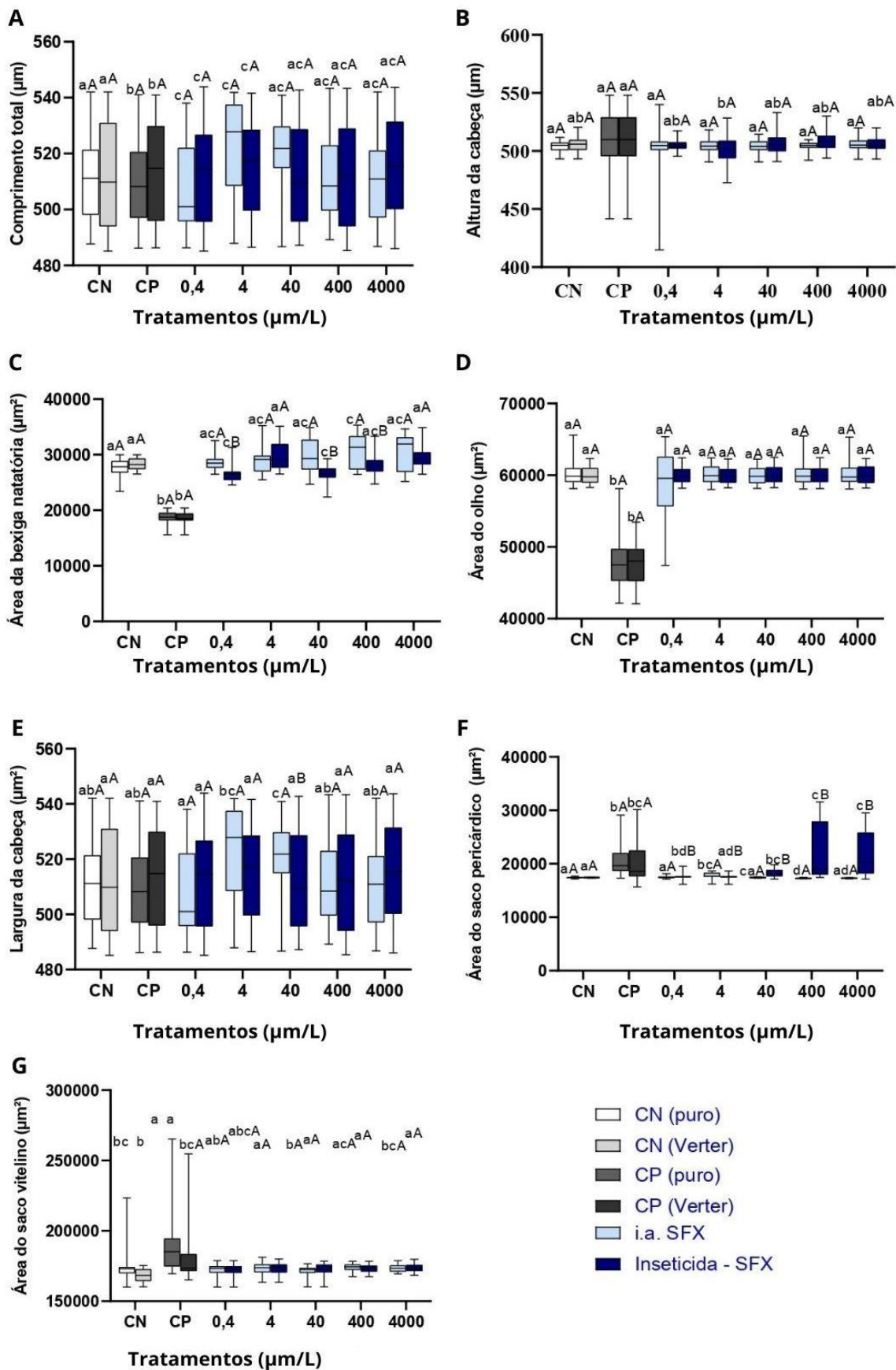


Figura 5. Efeitos de diferentes concentrações de i.a. SFX e do inseticida à base de SFX em diferentes parâmetros morfométricos avaliados nas larvas de zebrafish, bem como aos grupos controle negativo e controle positivo (3,4-dicloroanilina – DCA) por 96h. Os dados estão apresentados como média \pm média do erro padrão. As letras minúsculas indicam diferença estatística entre todos os tratamentos de cada composto avaliado ($p < 0,05$), enquanto as letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os compostos i.a. SFX e ao inseticida à base de SFX.

3.3.5. Análise de componente principal

A fim de identificar padrões de agrupamento entre os diferentes desfechos analisados, foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA) com os parâmetros morfológicos e fisiológicos avaliados em embriões de zebrafish expostos ao i.a. puro e ao inseticida à base de SFX (Figura 6). A análise revelou que os dois primeiros componentes principais explicaram 99,9% da variância total dos dados, sendo 99,8% atribuídos ao PC1 e 0,1% ao PC2. Com base na projeção dos pontos médios dos tratamentos, observou-se uma clara separação entre os grupos expostos ao i.a. puro e à inseticida à base de SFX ao longo do eixo PC1. Os dados referentes aos diferentes biomarcadores apresentaram distribuição diferenciada entre os tratamentos, indicando padrões distintos de resposta entre as duas substâncias testadas.

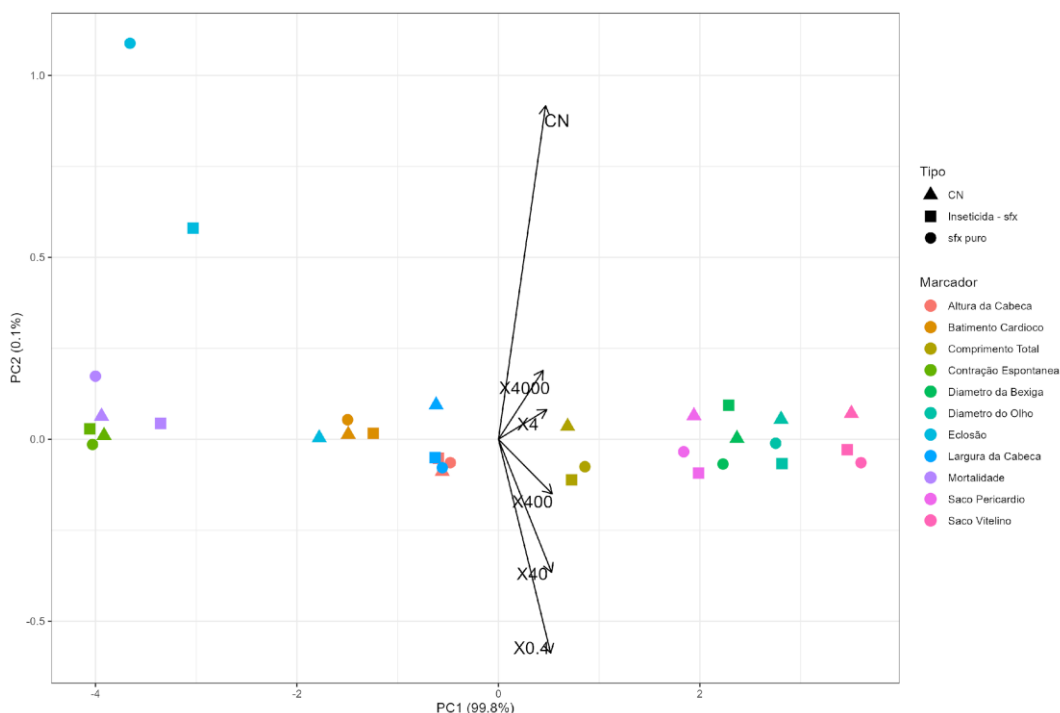


Figura 6. Análise de componentes principais (PCA) do i.a. SFX e do inseticida à base de SFX, com base na resposta de múltiplos biomarcadores (atividade neuromuscular espontânea, cardiotoxicidade, mortalidade, eclósão e morfometria).

3.3.6 Índice de biomarcadores (IBR)

Os gráficos do IBR apresentados para embriões expostos ao SFX em formulação comercial (linha vermelha) e com i.a. SFX (linha azul), em diferentes concentrações (0,4; 4; 40; 400 e 4.000 $\mu\text{g/L}$), considerando como referência o controle negativo (água reconstituída). Os valores de IBR variaram de $0,28 \pm 1,32$ a $0,48 \pm 1,11$ para a formulação comercial e de $0,11 \pm 0,46$ a $0,28 \pm 0,69$ para o composto puro. A resposta dos biomarcadores apresenta variações entre os parâmetros analisados, com maior contribuição para o aumento do IBR observada em variáveis como eclósão, batimento cardíaco, diâmetro do saco pericárdico e largura da cabeça, especialmente no tratamento com a formulação comercial.

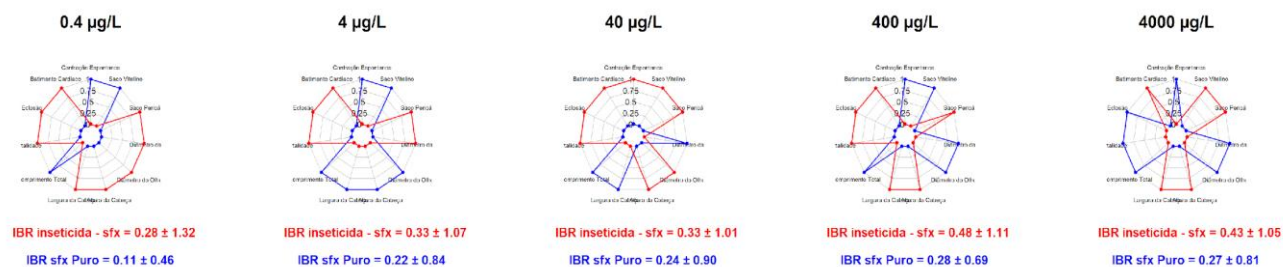


Figura 7. Índice Integrado de Biomarcadores (IBR) obtidos a partir de múltiplos biomarcadores avaliados ao longo do desenvolvimento embriolar de zebrafish expostos ao i.a. SFX (linha azul) e ao inseticida à base de SFX (linha vermelha), baseados nas concentrações de 0,0 (controle negativo). Os valores de IBR (média \pm desvio padrão) estão apresentados abaixo de cada gráfico.

4. Discussão

O inseticida sulfoxaflor (SFX) foi introduzido no mercado como uma alternativa aos neonicotinoides tradicionais devido à sua eficácia no controle de pragas resistentes. O seu modo de ação baseia-se na interação agonista com os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), atuando como ativador desses receptores (Zhu *et al.*, 2011), interferindo diretamente no sistema nervoso dos insetos e assim na transmissão de impulsos nervosos e resultando em sua paralisia e morte (Sparks *et al.*, 2013). Apesar de seu uso crescente, ainda são limitados os dados sobre seus efeitos ecotoxicológicos em peixes, especialmente durante as fases iniciais do ciclo de vida deste grupo.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o i.a. SFX e a formulação do inseticida à base de SFX (Verter[®]) testado exercem diferentes padrões de toxicidade ao longo do desenvolvimento embrio-larval do zebrafish, visto que o inseticida à base de SFX apresentou um maior potencial na indução de alterações subletais nas concentrações mais altas, tais como alterações morfológicas e morfométricas. Estudos prévios já demonstraram que formulações comerciais de agrotóxicos, incluindo outros neonicotinóides, tendem a apresentar toxicidade significativamente maior em organismos aquáticos do que seus ingredientes ativos isolados (Santos *et al.*, 2021; Pisa *et al.*, 2021; Da Cuña *et al.*, 2020). Isso ocorre porque essas formulações contêm aditivos, como

solventes, surfactantes e co-formulantes, que frequentemente não são divulgados pelos fabricantes, sob a justificativa de segredo industrial (Mesnage e Antoniou, 2018; Cox e Sorgan, 2020). Tais aditivos podem modificar os processos de absorção, metabolismo, toxicidade e eliminação do princípio ativo nos organismos expostos, aumentando seu potencial tóxico (Mesnage *et al.*, 2021).

Nas concentrações testadas no presente estudo, ambos os compostos não causaram letalidade nos embriões, diferindo do estudo de Wang *et al.* (2023) em que embriões de zebrafish expostos por 72h a concentrações de 20, 25 e 30 mg/L de i.a. SFX apresentaram aumento da taxa de mortalidade. Entretanto, uma redução na taxa de eclosão dos embriões expostos à maior concentração do inseticida à base de SFX foi detectada, indicando que a eclosão do córion e liberação da larva foram comprometidos, semelhante aos resultados de Wang *et al.* (2023). O rompimento do córion em embriões de zebrafish é um processo crucial para a eclosão, que ocorre geralmente entre 48 e 72 hpf. Esse processo envolve a secreção de enzimas, como a metaloproteinase de matriz 13 (MMP13), que degradam componentes estruturais do córion (Small *et al.*, 2020), facilitando sua ruptura. Fatores ambientais podem impactar significativamente esse processo, obstruindo os poros do córion (Duan *et al.*, 2020) ou causando desregulação na expressão de proteínas essenciais para esse processo (Vasamsetti *et al.*, 2023), resultando em falhas na eclosão. Essa interferência na taxa de eclosão indica que a contaminação dos ambientes aquáticos pela formulação comercial do SFX pode representar um risco ambiental relevante, reforçando a importância da avaliação de outros parâmetros subletais, os quais podem demonstrar maior sensibilidade na detecção de efeitos adversos (Reinwald *et al.*, 2022).

Somado a isso, estudos prévios com outros inseticidas neonicotinoides têm demonstrado causar efeitos significativos no desenvolvimento embrionário de diversos organismos aquáticos, resultando em aumento da letalidade e redução nas taxas de eclosão. Por exemplo, a exposição de embriões de bagre africano (*Clarias gariepinus*) ao Imidacloprido nas concentrações de 10, 30, 100 e 500 µg/L por 72h causou uma diminuição significativa na taxa de eclosão, além de efeitos teratogênicos como ruptura do saco vitelino e edema pericárdico (Alarape *et al.*, 2023). No caso do zebrafish, foi observado que a exposição crônica dos embriões ao imidacloprido, em concentrações

ambientalmente relevantes de 0,15 e 1,5 µg/L por um período de 5 dias, induziu a eclosão precoce (Xu *et al.*, 2024). Esse efeito pode comprometer a sobrevivência das larvas por expô-las mais cedo a condições ambientais adversas, resultando em maior vulnerabilidade durante os estágios iniciais de vida (Stinson *et al.*, 2023).

A análise do número de contrações espontâneas em embriões de zebrafish tem sido utilizada como indicador de atividade neuromotora, servindo como um teste sensível para avaliar potenciais efeitos neurotóxicos dos compostos testados (Krzykwa *et al.*, 2019; Selderslaghs *et al.*, 2010). As contrações espontâneas foram quantificadas em embriões por volta das 24 hpf, o qual é período crítico para o desenvolvimento inicial do sistema nervoso (Pinheiro-da-Silva *et al.*, 2021). No presente estudo foi detectado uma redução na frequência de movimentos espontâneos para ambos os compostos avaliados. Esse padrão indica um potencial comprometimento do desenvolvimento neuromuscular nos embriões, afetando tanto a formação do sistema nervoso central quanto a inervação e funcionamento da musculatura esquelética (Xuereb *et al.*, 2009). As alterações mais pronunciadas com a exposição ao inseticida à base de SFX sugerem ainda que os aditivos presentes podem potencializar os efeitos do ingrediente ativo, contribuindo para uma maior toxicidade. Apesar de não haver outros estudos avaliando as contrações espontâneas em embriões de zebrafish após a exposição com o SFX, estudos com outros neonicotinóides, como o Acetamiprido e o Imidacloprido puros, a partir da concentração de 50 µM, também causou reduções significativas na duração média dos surtos de movimento e na frequência de contrações espontâneas por minuto (von Hellfeld *et al.*, 2022), semelhante ao observado para o SFX.

A redução do número de contrações espontâneas detectadas em nosso estudo corrobora os achados de Deng *et al.* (2022), os quais demonstraram que o i.a. SFX em concentrações de 1 e 10 mg/L causa uma redução na atividade da acetilcolinesterase. De maneira oposta a Piner Benli *et al.* (2021), o quais observaram um aumento na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em adultos de zebrafish expostos ao inseticida à base de SFX, Transform 500 WG[®] (50% ingrediente ativo SFX). Os autores relataram que concentrações equivalentes a 0,87, 1,75 e 3,51 mg/L provocaram aumento na atividade da AChE tanto no encéfalo quanto no tecido muscular, com elevações variando entre 10 – 83% e 19 – 79%, respectivamente, apontando para um efeito neuroestimulante induzido

pelo inseticida. Considerando que a AChE desempenha papel essencial na regulação da transmissão colinérgica, sua desregulação pode comprometer o funcionamento do sistema nervoso central e periférico dos organismos aquáticos (Ren *et al.*, 2017). Embora nosso estudo não avaliou a atividade da AChE, nossos dados reforçam a hipótese de que o SFX promove neurotoxicidade ao longo do desenvolvimento embrio-larval dos peixes, evidenciando potenciais riscos à integridade neurológica de espécies não alvo em ecossistemas aquáticos. Essa constatação é particularmente relevante do ponto de vista ecológico, pois alterações neurocomportamentais podem afetar diretamente funções vitais como a natação, alimentação, fuga de predadores e reprodução, com implicações para a conservação da biodiversidade aquática (Ren *et al.*, 2017).

De modo geral, os neonicotinóides também têm sido associados a efeitos cardiotoxicos significativos em organismos aquáticos, especialmente durante os estágios embrionários. Em embriões de medaka (*Oryzias latipes*), a exposição ao composto neonicotinóide 6-cloro-3-piridilmetilamina (CPC) puro em concentrações de 10 a 20 mg/L resultou em formação de trombos, atraso no desenvolvimento e parada cardíaca. Esses efeitos foram observados entre o 4^o e o 7^o dia de exposição, com a frequência cardíaca reduzida para 32 batimentos por 20 segundos em comparação aos 38,7 batimentos no grupo controle, indicando comprometimento da função cardíaca (Kai *et al.*, 2023). Em embriões de zebrafish, o acetamiprido puro demonstrou causar diminuição da frequência cardíaca em concentrações de 107, 537 e 760 ppm, avaliadas em 48, 60 e 72 horas pós-fertilização. Além disso, foram observadas malformações como edema pericárdico e curvatura da coluna vertebral, com a concentração efetiva média para malformações (EC₅₀) estimada em 323 ppm (Malhotra *et al.*, 2021). No presente trabalho, a frequência de batimentos cardíacos (bpm) foi registrada em embriões com aproximadamente 48 hpf, etapa em que o coração já se encontra funcionalmente ativo e sensível a alterações fisiológicas (Boonruangkan *et al.*, 2021). Foi verificado que o i.a. SFX induziu braquicardia, sendo esta mais pronunciada nas concentrações mais elevadas, ao passo que o inseticida à base de SFX provocou taquicardia, a partir de 0,4 µg/L. Esses dados sugerem que enquanto o ingrediente ativo isolado compromete diretamente a função cardíaca, os aditivos presentes na formulação comercial podem interferir de maneira distinta na

fisiologia cardiovascular, o que reforça a necessidade de avaliação diferenciada entre ingredientes puros e produtos formulados.

As alterações morfológicas observadas frente a exposição ao i.a. de SFX e à formulação comercial, como os edemas pericárdico e vitelínico, são reconhecidas como biomarcadores clássicos de toxicidade cardiovascular e comprometimento na osmorregulação ou na permeabilidade vascular em embriões de zebrafish (Incardona *et al.*, 2016). Tais edemas, caracterizados como um acúmulo de fluidos em espaços extracelulares, podem prejudicar funções essenciais, como a oxigenação tecidual, comprometendo a sobrevivência dos organismos no ambiente aquático (Incardona *et al.*, 2016). Além disso, a curvatura da medula espinhal, particularmente evidente nas altas concentrações do inseticida à base de SFX, sugere potenciais efeitos neurotóxicos ou perturbações no desenvolvimento musculoesquelético, que podem limitar a mobilidade e a capacidade de predação pós-eclosão (Li *et al.*, 2022). Esse conjunto de parâmetros subletais indicam que o i.a. de SFX interfere pontualmente em processos fisiológicos críticos, afetando estruturas associadas à flutuação, circulação e nutrição, ainda que sem causar um padrão amplo de teratogênese. Em contraste, o inseticida à base de SFX apresentou maior frequência e tipos de alterações morfológicas, mesmo em concentrações mais baixas, apontando para um maior potencial teratogênico, o que também pode estar relacionado aos efeitos sinérgicos dos aditivos presentes na formulação comercial de agrotóxicos (Mesnage *et al.*, 2014; Mesnage e Antoniou, 2017). Essas alterações também são vistas em outros inseticidas, tal como o Metomil, um inseticida com potencial neurotóxico semelhante ao SFX, já foi analisado que a sua formulação comercial (BrilhanteBR[®]; Ourofino Química LTDA), testada nas concentrações 0,5; 1,0; 2,2; 4,8; 10,6; e 23,3 mg/L em larvas de zebrafish por 144 hpf, também demonstram efeitos morfológicos significativos, com redução no comprimento corporal, na distância interocular nas duas maiores concentrações, na área ocular, e na área da bexiga natatória, além dos desvios na coluna vertebral nas três maiores concentrações, demonstrando efeitos teratogênicos dose-dependentes da formulação de metomil (Jablonski *et al.*, 2022), assim como acontece no SFX.

Embora o i.a. de SFX tenha causado alterações específicas — como o aumento da área da bexiga natatória, do saco pericárdico e do saco vitelínico em concentrações mais

elevadas — o inseticida à base de SFX induziu um espectro mais amplo e uma maior frequência de alterações, inclusive em concentrações mais baixas. Deformidades do saco vitelínico e edema pericárdico são indicadores comuns de cardiotoxicidade e absorção prejudicada de nutrientes em peixes, frequentemente associados ao estresse oxidativo e vias metabólicas interrompidas (Yang *et al.*, 2023). A ocorrência precoce de edemas e malformações morfológicas, como o aumento da largura da cabeça e curvaturas espinhais, evidencia que os aditivos presentes no inseticida podem potencializar ou modificar os efeitos tóxicos do SFX, à medida que as alterações nos sacos vitelínico e pericárdico apontam para disfunções circulatórias, osmóticas e linfáticas durante o desenvolvimento embrionário (Zhang *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2020). Além disso, Piner Benli *et al.* (2021b) observaram que a exposição de zebrafish adultos por 96h em um sistema estático com concentrações subletais do inseticida à base de SFX 500 WG[®] (50% p/p ingrediente ativo) (0,87; 1,75 e 3,51 mg/L), sem distinção entre fêmeas e machos, levou à indução do sistema antioxidante relacionado ao glutatona (GSH), com aumento dos níveis de GSH, GPx e GR, e redução da atividade da GST nas brânquias de zebrafish, além de aumento nos níveis de TBARS, indicando peroxidação lipídica e, portanto, estresse oxidativo. Esses achados evidenciam que mesmo em níveis que não afetam diretamente a sobrevivência, o SFX pode provocar respostas celulares e moleculares significativas, com potencial para afetar o desenvolvimento, a imunocompetência e a integridade fisiológica de organismos aquáticos.

Outros estudos também já analisaram comparativamente a toxicidade de ingredientes ativos com as formulações comerciais de agrotóxicos. Por exemplo, Cossi *et al.* (2020) evidenciaram que a formulação comercial do neonicotinóide Acetamiprido (Assail[®] 70) apresentou toxicidade significativamente maior sobre o molusco aquático *Biomphalaria straminea* do que o ingrediente ativo isolado, evidenciando efeitos mais intensos nos sistemas de defesa antioxidante e metabolismo celular (Cossi *et al.*, 2020). Uma revisão sistemática conduzida por Nagy *et al.* (2019) analisou 36 estudos e concluiu que, em 24 deles, as formulações comerciais foram mais tóxicas que seus ingredientes ativos, sendo essa maior toxicidade atribuída principalmente aos adjuvantes presentes nas misturas. Além disso, Van de Merwe *et al.* (2018) demonstraram que agrotóxicos domésticos comerciais apresentaram toxicidade até 600 vezes maior do que os

ingredientes ativos isolados, reforçando que os aditivos desempenham papel central no aumento dos impactos ambientais desses compostos.

Dentre as análises comparativas realizadas no presente estudo, a análise de componentes principais (PCA) apresentada demonstrou que o primeiro componente (PC1) explicou praticamente toda a variação dos dados (99,8%), enquanto o segundo componente (PC2) contribuiu de forma marginal (0,1%). A separação observada ao longo do PC1 indica que os grupos experimentais diferem principalmente em função das respostas dos biomarcadores associadas às diferentes concentrações e tipos de exposição ao SFX. Nota-se que as amostras do controle negativo se posicionam de forma distinta das expostas ao inseticida, refletindo menor variação e proximidade entre os biomarcadores avaliados. Entre os tratamentos, a formulação comercial e o composto puro apresentaram padrões de resposta parcialmente sobrepostos, embora com deslocamentos que sugerem diferenças sutis na magnitude e direção das alterações. As variáveis como eclosão, diâmetro do olho e contração espontânea mostraram maior contribuição para a separação dos grupos, evidenciando que essas respostas biológicas foram determinantes para a diferenciação entre os tratamentos.

Já na análise do Índice Integrado de Biomarcadores (IBR) evidenciou que, em todas as concentrações testadas, a formulação comercial do SFX apresentou valores superiores aos observados para o composto puro, sugerindo que a presença de adjuvantes potencializa os efeitos tóxicos do inseticida. Esse padrão indica que, embora ambos os tratamentos promovam alterações biológicas detectáveis, a formulação comercial exerce maior influência sobre a resposta integrada dos biomarcadores, mesmo em concentrações relativamente baixas. Entre os parâmetros analisados, destacam-se a eclosão, o batimento cardíaco, o diâmetro do saco pericárdico e a largura da cabeça como principais contribuintes para o aumento do IBR, refletindo impactos em processos-chave do desenvolvimento embrionário.

Por fim, este estudo representa, até onde se tem conhecimento, a primeira abordagem experimental que compara diretamente os efeitos do ingrediente ativo puro do SFX e sua formulação comercial em embriões e larvas de zebrafish, com base em um conjunto integrado de biomarcadores morfológicos e fisiológicos. Enquanto pesquisas anteriores se concentraram exclusivamente no ingrediente ativo isolado, esta investigação

incorpora uma perspectiva mais realista ao considerar os aditivos presentes nas formulações comerciais, os quais podem modificar significativamente a toxicidade do composto. A análise simultânea de parâmetros como letalidade, teratogênese, cardiotoxicidade, atividade neuromuscular e comportamento locomotor permite uma compreensão mais abrangente dos riscos potenciais associados à exposição ambiental ao SFX. Os resultados abordados no presente estudo apontam que a formulação comercial do SFX apresentou maior toxicidade em comparação ao composto puro, independentemente da concentração testada. Além disso, o i.a. SFX e o inseticida à base de SFX representam um risco potencial para organismos aquáticos, sobretudo quando considerados os efeitos sobre diversos parâmetros subletais avaliados ao longo do desenvolvimento embrio-larval de zebrafish.

O presente estudo reforça a necessidade de regulamentações que avaliem a toxicidade dos produtos comerciais na íntegra, e não apenas de seus ingredientes ativos, em consonância com abordagens de avaliação de risco mais realistas (Mesnage *et al.*, 2014; Mesnage e Antoniou, 2017) com o emprego de concentrações de relevância ambiental, bem como reforça a necessidade de monitoramento das concentrações de SFX em ambientes aquáticos e solos de áreas próximas às lavouras.

5. Conclusão

Este estudo demonstrou que tanto o sulfoxaflor (SFX) em sua forma pura quanto a formulação comercial Verter[®] provocaram efeitos ecotoxicológicos significativos no desenvolvimento de embriões e larvas de zebrafish. Os resultados obtidos demonstram que a formulação comercial do SFX apresenta maior toxicidade quando comparada ao i.a. puro, evidenciada por valores mais elevados de IBR e por maior afastamento do grupo controle na análise de PCA. Além disso, enquanto o i.a. puro foi associado a alterações morfométricas pontuais, a formulação comercial resultou em múltiplas alterações morfológicas e morfométricas, além do potencial efeito neurotóxico e cardiotoxico mais pronunciado. Os resultados reforçam a importância de avaliar não apenas os i.a. isolados, mas também as formulações comerciais completas, uma vez que os aditivos presentes podem potencializar os efeitos tóxicos, com implicações ecotoxicológicas significativas para organismos aquáticos.

Referências

Adhish, M., e Manjubala, I. (2023). Effectiveness of zebrafish models in understanding human diseases-A review of models. *Heliyon*, 9(3), e14557.

Ahmad, M. F., Ahmad, F. A., Alsayegh, A. A., Zeyaulah, M., AlShahrani, A. M., Muzammil, K., ... e Hussain, S. (2024). Pesticides impacts on human health and the environment with their mechanisms of action and possible countermeasures. *Heliyon*.

Alarape, S. A., Tongo, I., e Ezemonye, L. I. N. (2023). Developmental toxicity of imidacloprid in embryos of the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 99, 104044.

Ali, S., Champagne, D. L., e Richardson, M. K. (2012). Behavioral profiling of zebrafish embryos exposed to a panel of 60 water-soluble compounds. *Behavioural brain research*, 228(2), 272-283.

Beekhuijzen, M., de Koning, C., Flores-Guillén, M. E., de Vries-Buitenweg, S., Tobor-Kaplon, M., van de Waart, B., e Emmen, H. (2015). From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. *Reproductive Toxicology*, 56, 64-76.

Bhardwaj, J. K., Mittal, M., Saraf, P., e Kumari, P. (2020). Pesticides induced oxidative stress and female infertility: a review. *Toxin Reviews*.

Boonruangkan, J., Farrokhi, H., Rohith, T. M., Kwok, S., Carney, T. J., Su, P. C., e Kim, Y. J. (2021). Label-free quantitative measurement of cardiovascular dynamics in a zebrafish embryo using frequency-comb-referenced-quantitative phase imaging. *Journal of Biomedical Optics*, 26(11), 116004-116004.

Boran, M., Altinok, İ., Capkin, E., Karacam, H., e Bicer, V. (2007). Acute toxicity of carbaryl, methiocarb, and carbosulfan to the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and guppy (*Poecilia reticulata*). *Turkish Journal of Veterinary e Animal Sciences*, 31(1), 39-45.

Capela, N. *et al.* Sub-lethal doses of sulfoxafloflor impair honey bee homing ability. *Science of The Total Environment*, v. 837, p. 155710, 2022.

Choi, T. Y., Choi, T. I., Lee, Y. R., Choe, S. K., e Kim, C. H. (2021). Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Experimental e molecular medicine*, 53(3), 310–317.

Cossi, P. F., Herbert, L. T., Yusseppone, M. S., Pérez, A. F., e Kristoff, G. (2020). Toxicity evaluation of the active ingredient acetamiprid and a commercial formulation (Assail® 70) on the non-target gastropod *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 192, 110248.

Cox, C., e Surgan, M. (2006). Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. *Environmental health perspectives*, 114(12), 1803-1806.

Cserhádi, T. (1995). Alkyl ethoxylated and alkylphenol ethoxylated nonionic surfactants: interaction with bioactive compounds and biological effects. *Environmental Health Perspectives*, 103(4), 358-364.

Cuenca, A. L., Simonato, J. D., e Meletti, P. C. (2022). Acute exposure of embryo, larvae and adults of *Danio rerio* to fipronil commercial formulation reveals effects on development and motor control. *Ecotoxicology*, 1-10.

Da Cuña, R. H., Lo Nostro, F. L., Shimabukuro, V., Ondarza, P. M., e Miglioranza, K. S. B. (2020). Bioaccumulation and distribution behavior of endosulfan on a cichlid fish: Differences between exposure to the active ingredient and a commercial formulation. *Environmental toxicology and chemistry*, 39(3), 604-611.

Damasceno, J. M., Rato, L. D., Simões, T., Morão, I. F., Meireles, G., Novais, S. C., e Lemos, M. F. (2021). Exposure to the insecticide sulfoxaflor affects behaviour and biomarkers responses of *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda). *Biology*, 10(12), 1234.

de Oliveira, A. A., Benvindo-Souza, M., Dos Santos, H. V. R., Barradas, M. C., Marques, L. P., Costa, A. G., ... e de Souza Saraiva, A. (2024). The impact of neonicotinoid insecticides on amphibians: A comprehensive review and future research challenges. *Environmental Research*, 120595.

Deng, X., Wang, D., Liu, Y., Wei, Y., Li, X., Wang, J., e Chen, J. (2022). Enantioselective bioaccumulation and toxicity of sulfoxaflor in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Hazardous Materials*, 429, 128345.

Duan, Z., Duan, X., Zhao, S., Wang, X., Wang, J., Liu, Y., Peng, Y., Gong, Z., e Wang, L. (2020). Barrier function of zebrafish embryonic chorions against microplastics and nanoplastics and its impact on embryo development. *Journal of hazardous materials*, 395, 122621.

Elumalai, P., Gao, X., Parthipan, P., Luo, J., e Cui, J. (2025). Poluição agroquímica: uma séria ameaça à saúde ambiental. *Current Opinion in Environmental Science e Health*, 100597.

Espíndola, J. C., Scaccia, N., Barbosa Segundo, I., Diniz, D. D. S., Diniz, J. U., e Mierzwa, J. C. (2024). Evaluation of the pathway of contaminants in the environment: a case study of different aquatic environmental compartments. *Sustainability*, 16(10), 3927.

Foucault, A., Vallet, N., Ravalet, N., Picou, F., Bene, M. C., Gyan, E., e Herault, O. (2021). Occupational pesticide exposure increases risk of acute myeloid leukemia: a meta-analysis of case-control studies including 3,955 cases and 9,948 controls. *Scientific reports*, 11(1), 2007.

Gauthier, J. R., e Mabury, S. A. (2021). The sulfoximine insecticide sulfoxaflor and its photodegradate demonstrate acute toxicity to the nontarget invertebrate species *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(8), 2156-2164.

Hellou, J. (2011). Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environmental Science and Pollution Research*, 18, 1-11.

Hernández-Mariano, J. Á., Baltazar-Reyes, M. C., Salazar-Martínez, E., e Cupul-Uicab, L. A. (2022). Exposure to the pesticide DDT and risk of diabetes and hypertension: Systematic review and meta-analysis of prospective studies. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 239, 113865.

Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., e Peterson, R. E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences*, 86(1), 6–19.

Hoage, T., Ding, Y., e Xu, X. (2012). Quantifying cardiac functions in embryonic and adult zebrafish. In X. Xu (Ed.), *Cardiovascular development: Methods and protocols* (pp. 11–20). Humana Press.

Incardona, J. P., e Scholz, N. L. (2016). The influence of heart developmental anatomy on cardiotoxicity-based adverse outcome pathways in fish. *Aquatic Toxicology*, 177, 515-525.

ISO (1996) International Standards. *Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]*.

ISO 7346-3: Flow-through method. Available: [<http://www.iso.org>].

Jablonski, C. A., Pereira, T. C. B., Teodoro, L. D. S., Altenhofen, S., Rübensam, G., Bonan, C. D., e Bogo, M. R. (2022). Acute toxicity of methomyl commercial formulation induces morphological and behavioral changes in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology and Teratology*, 89, 107058.

Kai, H., Mita, A., e Yamaguchi, M. (2023). Effects of neonicotinoid pesticide metabolic compounds on Medaka (*Oryzias latipes*) embryo development. *Biology*, 12(12), 1460.

Kiani, Z., Ahmadi, E., Karami, F., Asadi, A., Khosravian, F., Sadeghi, A., e Sadeghi-Bazargani, H. (2022). Pesticide exposure and Alzheimer’s disease: A case-control study. *Current Alzheimer Research*, 19(13), 892–903.

Kumar, R., Sankhla, M. S., Kumar, R., e Sonone, S. S. (2021). Impact of pesticide toxicity in aquatic environment. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(3), 10131-10140.

Krzykwa, J. C., Saeid, A., e Jeffries, M. K. S. (2019). Identifying sublethal endpoints for evaluating neurotoxic compounds utilizing the fish embryo toxicity test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, 521-529.

- Landrigan, P. J., Fuller, R., Acosta, N. J., Adeyi, O., Arnold, R., Baldé, A. B., ... e Zhong, M. (2018). The Lancet Commission on pollution and health. *The lancet*, 391(10119), 462-512.
- Lee, J.-Y., Park, H., Lim, W., e Song, G. (2020). Benfuresate induces developmental toxicity in zebrafish larvae by generating apoptosis and pathological modifications. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 172, 104751.
- Li, H., Liu, Y., Chen, Q., Jin, L., e Peng, R. (2023). Research progress of zebrafish model in aquatic ecotoxicology. *Water*, 15(9), 1735.
- Li, X., Chen, C., He, M., Yu, L., Liu, R., Ma, C., ... e Li, L. (2022). Lead exposure causes spinal curvature during embryonic development in zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9571.
- Li, Y., Zhang, J., Wang, W., Lu, Y., Sun, L., e Zhang, Y. (2024). Ecological Risk Assessment of Three Pesticide Additives in Soil and Application to the Remediation of Contaminated Soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 43(7), 1677-1689.
- Łukaszewicz, P., Stepnowski, P., e Haliński, Ł. P. (2023). The first fully optimized and validated SPE-LC-MS/MS method for determination of the new-generation neonicotinoids in surface water samples. *Chemosphere*, 310, 136868.
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology*, 101(1), 13-30.
- MacRae, C. A., e Peterson, R. T. (2023). Zebrafish as a Mainstream Model for In Vivo Systems Pharmacology and Toxicology. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 63, 43–64.
- Malhat, F., Hegazy, A., Barakat, D. A., Ibrahim, E. D., Hussien, M., Saber, E. S., e Saber, A. N. (2024). Sulfoxaflo residues and exposure risk assessment in grape under Egyptian field conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(39), 52038-52048.
- Malhotra, N., Chen, K. H. C., Huang, J. C., Lai, H. T., Uapipatanakul, B., Roldan, M. J. M., ... e Hsiao, C. D. (2021). Physiological effects of neonicotinoid insecticides on non-target aquatic animals—an updated review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9591.
- Marit, J. S. (2010). Swim performance as an effective, environmentally relevant measure of sublethal toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) (Doctoral dissertation, University of Saskatchewan).
- Maurya, P. K., Malik, D. S., e Sharma, A. (2019). Impacts of pesticide application on aquatic environments and fish diversity. *Contaminants in agriculture and environment: health risks and remediation*, 1, 111.
- Mesnage, R., e Antoniou, M. N. (2017). Facts and fallacies in the debate on glyphosate toxicity. *Frontiers in Public Health*, 5, 316.

Mesnager, R., Bernay, B., e Séralini, G. E. (2014). Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology*, 313(2-3), 122-128

Michaelis, P., Klüver, N., Aulhorn, S., Bohring, H., Bumberger, J., Haase, K., ... e Busch, W. (2025). Leveraging zebrafish embryo phenotypic observations to advance data-driven analyses in toxicology. *Environmental Science e Technology*, 59(9), 4304-4317.

Morrissey, C. A., Mineau, P., Devries, J. H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M. C., e Liber, K. (2015). Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: a review. *Environment international*, 74, 291-303.

Nagy, K., Duca, R., Lovas, S., Creta, M., Scheepers, P., Godderis, L., e Ádám, B. (2019). Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations. *Environmental Research*, 179, 108926.

Nagy, K., Duca, R. C., Lovas, S., Creta, M., Scheepers, P. T., Godderis, L., e Ádám, B. (2020). Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations. *Environmental Research*, 181, 108926.

Niesen, M., Sappington, K., Ruhman, M., Mroz, R., Leader, R. A. P., Housenger, J., e Chief, B. (2019). Ecological risk assessment for the registration of sulfoxaflo.

OECD (2013), Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris,

Olmeda, C., e Sánchez-Vázquez, F. J. (2011). Zebrafish spontaneous activity as a neurotoxicity indicator. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology e Pharmacology*, 153(4), 345-351.

Pan, Y. X., Luo, Z., Zhuo, M. Q., Wei, C. C., Chen, G. H., e Song, Y. F. (2018). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction mediated Cd-induced hepatic lipid accumulation in zebrafish *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology*, 199, 12-20.

Panzica-Kelly, J. M., Zhang, C. X., e Augustine-Rauch, K. A. (2010). Morphological assessment of zebrafish (*Danio rerio*) as a screen for developmental toxicity. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today*, 90(1), 36–44.

Patton, E. E., Zon, L. I., e Langenau, D. M. (2021). Zebrafish disease models in drug discovery: from preclinical modelling to clinical trials. *Nature reviews. Drug discovery*, 20(8), 611–628.

Perrin, L., Spinosi, J., Chaperon, L., Kab, S., Moisan, F., e Ebaz, A. (2021). Pesticides expenditures by farming type and incidence of Parkinson disease in farmers: A French nationwide study. *Environmental research*, 197, 111161.

Pesticides Use. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) , 2023.

Piner Benli, P., e Çelik, M. (2021). Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to neonicotinoid insecticide sulfoxaflor induced oxidative damage in zebrafish in vivo. *Science Progress*, 104(2), 00368504211028361. (a)

Piner Benli, P., e Çelik, M. (2021). In vivo effects of neonicotinoid-sulfoximine insecticide sulfoxaflor on acetylcholinesterase activity in the tissues of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxics*, 9(4), 73. (b)

Pinheiro-da-Silva, J., e Luchiari, A. C. (2021). Embryonic ethanol exposure on zebrafish early development. *Brain and Behavior*, 11(6), e02062.

Pisa, L. W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Downs, C. A., Goulson, D., Kreuzweiser, D. P., Krupke, C., Liess, M., McField, M., Morrissey, C. A., Noome, D. A.,

Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J. D., Van der Sluijs, J. P., Van Dyck, H., e Wiemers, M. (2021). An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 3: Environmental transport, fate and toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 11749–11791.

Rafeeina, A., Asadikaram, G., Moazed, V., e Darabi, M. K. (2023). Organochlorine pesticides may induce leukemia by methylation of CDKN2B and MGMT promoters and histone modifications. *Gene*, 851, 146976.

Rajak, P., Ganguly, A., Nanda, S., Mandi, M., Ghanty, S., Das, K., ... e Sarkar, S. (2024). Toxic contaminants and their impacts on aquatic ecology and habitats. In *Spatial Modeling of Environmental Pollution and Ecological Risk* (pp. 255-273). Woodhead Publishing.

Rani, L., Thapa, K., Kanojia, N., Sharma, N., Singh, S., Grewal, A. S., ... e Kaushal, J. (2021). An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal of cleaner production*, 283, 124657.

Reinwald, H., Alvincz, J., Salinas, G., Schäfers, C., Hollert, H., e Eilebrecht, S. (2022). Toxicogenomic profiling after sublethal exposure to nerve- and muscle-targeting insecticides reveals cardiac and neuronal developmental effects in zebrafish embryos. *Chemosphere*, 291(Pt 1), 132746.

Ren, Q., Zhao, R., Wang, C., Li, S., Zhang, T., Ren, Z., ... e Wang, X. (2017). The role of AChE in swimming behavior of *Daphnia magna*: correlation analysis of both parameters affected by deltamethrin and methomyl exposure. *Journal of toxicology*, 2017(1), 3265727.

Ribeiro, R. X., da Silva, J., Gualtieri, S. C. J., Domingues, I., Lopes, I., e Soares, A. M. V. M. (2020). Ecotoxicological assessment of effluents from Brazilian wastewater treatment plants using zebrafish embryotoxicity test: A multi-biomarker approach. *Science of the Total Environment*, 735, 139036.

Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N., e Seralini, G. E. (2005). Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental Health Perspectives*, 113(6), 716–720.

Santos, D., Rodrigues, A. C., Gonçalves, C., e Nogueira, A. J. A. (2021). Mixture toxicity of three neonicotinoids and their commercial formulations to *Daphnia magna*. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(3), 3712–3722.

Saravi, S. S. S., e Shokrzadeh, M. (2011). Role of pesticides in human life in the modern age: a review. *Pesticides in the modern world-risks and benefits*, 5, 3-12.

Scholz, N. L., Incardona, J. P., Baldwin, D. H., Berejikan, B. A., Dittman, A. H., Feist, B. E., e Jordan, C. (2003). Evaluating the sublethal impacts of current use pesticides on the environmental health of salmonids in Columbia River Basin. *Bonneville Power Administration FY*, 1-41.

Sehgal, N., Barr, D. B., e Eick, S. M. (2024). Invited Perspective: The Far Reach of PFAS—Inert Ingredients and Adjuvants in Pesticide Formulations. *Environmental Health Perspectives*, 132(7), 071304.

Selderslaghs, I. W., Hooyberghs, J., De Coen, W., e Witters, H. E. (2010). Locomotor activity in zebrafish embryos: a new method to assess developmental neurotoxicity. *Neurotoxicology and teratology*, 32(4), 460-471.

Silvestre, F. (2020). Signaling pathways of oxidative stress in aquatic organisms exposed to xenobiotics. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 333(6), 436-448.

Singh, N. S., Sharma, R., Parween, T., e Patanjali, P. K. (2018). Pesticide contamination and human health risk factor. *Modern age environmental problems and their remediation*, 49-68.

Small, C. D., El-Khoury, M., Deslongchamps, G., Benfey, T. J., e Crawford, B. D. (2020). Matrix metalloproteinase 13 activity is required for normal and hypoxia-induced precocious hatching in zebrafish embryos. *Journal of Developmental Biology*, 8(1), 3.

Souza, M. C. O., Cruz, J. C., Cesila, C. A., Gonzalez, N., Rocha, B. A., Adeyemi, J. A., Nadal, M., Domingo, J. L., e Barbosa, F. (2023). Recent trends in pesticides in crops: A critical review of the duality of risks-benefits and the Brazilian legislation issue. *Environmental research*, 228, 115811.

Sparks, T. C., Watson, G. B., Loso, M. R., Geng, C., Babcock, J. M., e Thomas, J. D. (2013). Sulfoxaflo and the sulfoximine insecticides: Chemistry, mode of action and basis for efficacy on resistant insects. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107(1), 1-7.

Stinson, M. E., Belanger, S. E., e Ankley, G. T. (2023). Chronic exposure to environmentally relevant concentrations of imidacloprid impacts survival and ecologically-relevant behaviors of fathead minnow larvae. *Aquatic Toxicology*, 259, 106455.

Straw, E. A. (2024). End co-formulant secrecy. *Environmental Science e Policy*, 154, 103701.

Van den Belt, K., Wester, P. W., Van der Ven, L. T., Verheyen, R., e Witters, H. (2002). Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): time dependency and reversibility. *Environmental toxicology and chemistry*, 21(4), 767-775.

van de Merwe, J. P., Neale, P., Melvin, S., e Leusch, F. (2018). In vitro bioassays reveal that additives are significant contributors to the toxicity of commercial household pesticides. *Aquatic Toxicology*, 199, 263–268.

Vandergragt, M. L., Warne, M. S. J., Borschmann, G., e Johns, C. V. (2020). Pervasive pesticide contamination of wetlands in the Great Barrier Reef catchment area. *Integrated environmental assessment and management*, 16(6), 968-982.

Vasamsetti BMK, Chon K, Choi JY, Kim J, Yoon CY. Transcriptome Analysis of Thiram-Treated Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos Reveals Disruption of Reproduction Signaling Pathways. *Biology (Basel)*. 2023 Jan 19;12(2):156.

Velki, M., Hackenberger, B. K., e Kopjar, N. (2017). Toxicity and genotoxicity of imidacloprid and its transformation product desnitro-imidacloprid in zebrafish embryos. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(19), 19205–19215.

von Hellfeld, R., Brotzmann, K., Baumann, L., Strecker, R., e Braunbeck, T. (2020). Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Sciences Europe*, 32, 1-18.

Von Hellfeld, R., Ovcharova, V., Bevan, S., Lazaridi, M. A., Bauch, C., Walker, P., ... e Braunbeck, T. (2022). Zebrafish embryo neonicotinoid developmental neurotoxicity in the FET test and behavioral assays. *ALTE X. Alternatives to Animal Experimentation*, 39(3), 367-387.

Xu, Z., Xie, L., Li, H., e You, J. (2024). Sensitivity variations in developmental toxicity of imidacloprid to zebrafish embryos at different neurodevelopmental stages. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 00, 1–11.

Xuereb, B., Lefèvre, E., Garric, J., e Geffard, O. (2009). Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aquatic Toxicology*, 94(2), 114-122.

Wan, M., Huang, L., Liu, J., Liu, F., Chen, G., Ni, H., ... e Cao, Z. (2021). Cyclosporine A induces cardiac developmental toxicity in zebrafish by up-regulation of wnt signaling and oxidative stress. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 747991.

Wang, K., Huang, Y., Cheng, B., Guo, J., Peng, Y., Zeng, S., .. e Lu, H. (2023). Sulfoxafloer induces immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) by activating TLR4/NF-κB signaling pathway. *Fish e Shellfish Immunology*, 137, 108743. (a)

Wang, C., Yao, X., Li, X., Wang, Q., Jiang, N., Hu, X., ... e Wang, J. (2024). Fosthiazate, a soil-applied nematicide, induces oxidative stress, neurotoxicity and transcriptome aberrations in earthworm (*Eisenia fetida*). *Journal of Hazardous Materials*, 463, 132865. (b)

Yadav, H., Kumar, R., e Sankhla, M. S. (2020). Residues of pesticides and heavy metals in crops resulting in toxic effects on living organism. *J. Seybold Rep*, 1533, 9211.

Yang, D., Li, X., Dong, S., Zhao, X., Li, X.-Y., Zhang, M., Shi, Y.-J., e Ding, G. (2023). Developmental Toxicity and Cardiotoxicity Induced by PFOS and its Novel Alternative OBS in Early Life Stage of Zebrafish (*Danio rerio*). *Water, Air, e Soil Pollution*, 234(1), 1–13.

Zhang, J., Qian, L., Teng, M., Mu, X., Qi, S., Chen, X., Zhou, Y., Cheng, Y., Pang, S., Li, X., e Wang, C. (2019). The lipid metabolism alteration of three spirocyclic tetramic acids on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Pollution*, 248, 715–725.

Zhang, X., Wang, X., Liu, Y., Fang, K., e Liu, T. (2020). The toxic effects of sulfoxaflor induced in earthworms (*Eisenia fetida*) under effective concentrations. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(5), 1740.

Zhao, Y. X., Shen, Y., Chen, L. W., Yang, J., e Li, J. (2025). Neonicotinoid insecticide sulfoxaflor in the environment: a critical review of environmental fate, degradation mechanism, and toxic effects. *Environmental Science: Processes e Impacts*.

Zhou, X., Deng, Y., Wang, R., Wang, F., Cui, H., Hu, D., e Lu, P. (2023). Toxic effects of imidacloprid and sulfoxaflor on *Rana nigromaculata* tadpoles: Growth, antioxidant indices and thyroid hormone-related endocrine system. *Arabian Journal of Chemistry*, 16(6), 104723.

Zhu, Y., Loso, M. R., Watson, G. B., Sparks, T. C., Rogers, R. B., Huang, J. X., .. e Thomas, J. D. (2011). Discovery and characterization of sulfoxaflor, a novel insecticide targeting sap-feeding pests. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 59(7), 2950-2957.