

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**MATEUS CRISTOFARI GAYER**

**TOXICIDADE AGUDA DO HERBICIDA Boral® 500 SC (SULFENTRAZONE) EM *D. melanogaster***

Uruguaiana

2021

**MATEUS CRISTOFARI GAYER**

**TOXICIDADE AGUDA DO HERBICIDA Boral® 500 SC (SULFENTRAZONE) EM *D. melanogaster***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roehrs

**Uruguaiiana**

**2021**

G286t Gayer, Mateus Cristofari  
TOXICIDADE AGUDA DO HERBICIDA Boral® 500 SC (SULFENTRAZONE)  
EM D. melanogaster / Mateus Cristofari Gayer.  
83 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Pampa,  
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2021.  
"Orientação: Rafael Roehrs".

1. Mosca-da-fruta. 2. Toxicidade. 3. Heme. 4. Estresse  
Oxidativo. 5. Demanda Energética. I. Título.

**MATEUS CRISTOFARI GAYER**

TOXICIDADE AGUDA DO HERBICIDA Boral® 500 SC (SULFENTRAZONE) EM *D. melanogaster*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Dissertação defendida e aprovada em: 05, de outubro de 2021.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Rafael Roehrs  
Orientador  
UNIPAMPA

---

Prof. Dr. Carlos Eduardo da Rosa  
FURG

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Daiana Silva de Avila  
UNIPAMPA



Assinado eletronicamente por **Carlos Eduardo da Rosa, Usuário Externo**, em 17/11/2021, às 11:09, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **RAFAEL ROEHRS, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 19/11/2021, às 16:05, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **DAIANA SILVA DE AVILA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 20/11/2021, às 20:59, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0666177** e o código CRC **7E668040**.

“Onde estão o cavalo e o cavaleiro?

Onde está a trombeta que soava?

Os dias de glória escoaram como  
chuva nas montanhas.

Como vento nos prados.

Os dias resplandecentes se  
puseram no Oeste,...

atrás das colinas...

dando lugar à sombra.

Como chegou a esse ponto?”

Rei Théoden de Rohan

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus pais, Ana Rita e Ademir, por sempre me apoiarem nas minhas decisões e estarem ao meu lado (mesmo que a distância) nos momentos bons e ruins. Sem sombra de dúvida, não estaria aqui se não fosse por vocês. Quando decidi vir para Uruguaiana, não mediram esforços para conseguir realizar o sonho de me ver formado em um curso superior (e agora com pós-graduação?). Todas as oportunidades que tive na vida foram oriundas e apoiadas por pais que sabem o quão importante a educação pode ser, mesmo que não tenham tido as oportunidades que eu tive. Um privilégio que muitos não possuem, o que me torna ainda mais grato e orgulhoso pelos pais que possuo. Não esquecendo é claro da minha querida e amada sobrinha, que na maioria das vezes quase me faz repensar a minha opinião sobre crianças. Amo muito vocês!

Ao meu querido orientadorzinho, Rafael Roehrs, que com o tempo se tornou algo além de um orientador. Apesar de na maioria das vezes não me sentir merecedor, foi um pai com uma paciência infinita, que não cansou de me dar conselhos e oportunidades. Sinceramente, não possuo palavras para descrever o quão importante foi para mim e o quão grato eu me sinto pelas oportunidades de aprendizado dentro do laboratório, os conselhos sobre a vida e convivência com os coleguinhas. Apesar do senhor ter me abandonado, eu amo o senhor.

Apesar de algumas coisas, um agradecimento especial aos meus coleguinhas, Murilo, Maria Elisabeth e Bruna (apesar de nos ter abandonado também). Em partes eu sei que não deve ser muito fácil me aguentar, mas o inverso também não deixa de ser verdade. Enfim, obrigado por toda a paciência, ajuda e discussões, vocês são bem legais. O sarcasmo e a sinceridade só são compreendidos por aqueles que realmente nos conhecem.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Análises Químicas Ambientais e Toxicológicas (LAQAT) e Laboratório de Estudos Físico-Químicos e Produtos Naturais (LEFQPN), por toda a “convivência” que tivemos ao longo do tempo. Vários desempenharam papel importantíssimo para o desenvolvimento desse trabalho, meu sincero obrigado.

Agradecimento especial a todos os alunos do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Unipampa. Sem a ajuda de vocês, seja durante as aulas, ou na realização de algum experimento, esse trabalho não teria sido realizado. Sempre me senti particularmente culpado, em situações em que eu necessitava ficar importunando vocês em seus laboratórios (as vezes até tarde) para a utilização de algum equipamento, eu sinto muito mesmo, mas obrigado. Dentro disso, gostaria de destacar a importância que o MatHeus teve no

desenvolvimento desse trabalho, muito obrigado por toda a ajuda, ó excelentíssimo Grande Senhor das Drosophilas, e mais uma vez para não perder o costume, desculpa incomodar.

Á todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Unipampa, por toda a paciência e acessibilidade. Agradeço a todos, com especial carinho ao Professor Elton, por todas as discussões, conselhos, questionamentos e farinhas. Sem sombra de dúvidas, sou muito privilegiado por estar inserido em um laboratório onde dois excelentes orientadores podem ensinar e transmitir seus amplos conhecimentos e experiência de vida.

Por último, mas não menos importante. Meu sincero agradecimento aos membros da banca, Professor Carlos Eduardo e Professora Daiana. Me sinto um pouco envergonhado por estarem lendo algo que eu mesmo escrevi e que poderia ser melhor. Apesar disso, obrigado pelo aceite de participar da banca e por todas as considerações.



## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica  
Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

### **TOXICIDADE AGUDA DO HERBICIDA Boral® 500 SC (SULFENTRAZONE) EM *D. melanogaster***

AUTOR: Mateus Cristofari Gayer

ORIENTADOR: Rafael Roehrs

Data e Local da Defesa: 05 de outubro de 2021, Uruguiana

O herbicida Sulfentrazone (SULF) é utilizado na agricultura para o controle pré-emergente de plantas daninhas mono e dicotiledôneas. Seu mecanismo de ação é pela inibição da enzima Protoporfirinogênio oxidase (PPOX) que participa da via de biossíntese da clorofila e do heme. Devido à sua alta meia vida no solo, baixa concentração necessária para geração de efeito e alta conservação evolutiva da via de biossíntese, o SULF possui alto potencial de causar danos em organismos não alvo, presentes em locais de aplicação. Dentro dos organismos não alvo, é possível incluir insetos que não necessariamente trazem prejuízo às atividades humanas, que estão sendo prejudicados globalmente por diversos fatores, como a utilização de herbicidas. Nessa perspectiva, a *Drosophila melanogaster*, mais conhecida como a mosca-da-fruta, é utilizada como organismo modelo para estudos toxicológico de substâncias em insetos. Assim, a presente dissertação teve como objetivo, avaliar o efeito do Boral® 500 SC (SULF) em *D. melanogaster* expostas a concentrações agudas. Para isso, as mosca-da-fruta foram expostas a concentrações que foram de 10-300 mg.L<sup>-1</sup> do herbicida durante sete dias. Assim, foi possível constatar o aumento da mortalidade de forma dose e tempo-dependente nas moscas expostas. Com base nesse resultado, foram escolhidas as concentrações de 30, 150 e 300 mg.L<sup>-1</sup> para o ensaio de geotaxia negativa, que demonstrou a diminuição significativa da capacidade locomotora de escalada dos animais expostos durante quatro dias. A capacidade locomotora estava diminuída significativamente entre os grupos expostos as concentrações de 30 e 150 mg.L<sup>-1</sup>, mas não entre 150 e 300 mg.L<sup>-1</sup>. Assim, para os ensaios subsequentes, foram avaliadas as moscas expostas as concentrações de 30 e 150 mg.L<sup>-1</sup>. Além da diminuição da capacidade locomotora de escalada (geotaxia negativa), houve redução na capacidade locomotora exploratória (ensaio de campo aberto). Coletivamente nossos resultados sugerem que moscas expostas ao Boral® 500 SC (SULF), possuem uma maior demanda energética para lidar com os efeitos causados pelo herbicida. (1) Isso foi visto pela diminuição do peso e aumento das proteínas totais. (2) Ativação da via de biossíntese do heme, pelo acúmulo de protoporfirina IX (intermediário da síntese do heme), aumento de heme total na cabeça e indução da enzima

PBGS ( $\delta$ -ALA-D em mamíferos). Em conjunto com (3) aumento do dano oxidativo no corpo, visto pelo ensaio de TBARS e (4) aumento da atividade das enzimas SOD e GST. Juntamente com (5) aumento da capacidade de redução do MTT. Assim, neste estudo, foi demonstrado que o aumento da demanda energética, para suprir os processos celulares alterados pela exposição ao herbicida, pode ser o principal sinal metabólicos da toxicidade do Boral® 500 SC (SULF) em *Drosophila melanogaster*.

**Palavras-chave:** Mosca-da-fruta; Toxicidade; Heme; Estresse Oxidativo; Demanda Energética.

## ABSTRACT

Master's dissertation

Graduate Program in Biochemistry

Federal University of Pampa (UNIPAMPA)

**SULFENTRAZONE (Boral® 500 SC) INDUCES ACCUMULATION OF HEME SYNTHESIS INTERMEDIATES AND CHANGES IN LOCOMOTOR BEHAVIOR AND METABOLIC MARKERS IN *D. melanogaster***

AUTHOR: Mateus Cristofari Gayer

SUPERVISOR: Rafael Roehrs

Date and Place of Defense: October 5th, 2021, Uruguaiana

The herbicide Sulfentrazone (SULF) is used in agriculture for pre-emergence control of mono- and dicotyledonous weeds. Its mechanism of action is by inhibiting the enzyme Protoporphyrinogen oxidase (PPOX), which participates in the biosynthesis pathway of chlorophyll and heme. Due to its high half-life in the soil, the low concentration needed to generate an effect, and high evolutionary conservation of the biosynthesis pathway, SULF has a high potential to damage non-target organisms present in application sites. Among non-target organisms, it is possible to include insects that do not necessarily harm human activities, which are being globally affected by various factors, such as the use of herbicides. In this perspective, *Drosophila melanogaster*, better known as the fruit fly, is used as a model organism for toxicological studies of substances in insects. Thus, this dissertation aimed to evaluate the effect of Boral® 500 SC (SULF) on *D. melanogaster* exposed to acute concentrations. For this purpose, the fruit flies were exposed to concentrations ranging from 10-300 mg.L<sup>-1</sup> of the herbicide for seven days. Thus, it was possible to verify the increase in mortality in a dose and time-dependent manner in exposed flies. Based on this result, concentrations of 30, 150, and 300 mg.L<sup>-1</sup> were chosen for the negative geotaxis assay, which demonstrated a significant decrease in the climbing locomotor capacity of animals exposed for four days. The locomotor capacity was significantly reduced among the groups exposed to concentrations of 30 and 150 mg.L<sup>-1</sup>, but not between 150 and 300 mg.L<sup>-1</sup>. Thus, for subsequent assays, flies exposed to concentrations of 30 and 150 mg.L<sup>-1</sup> were evaluated. In addition to the decrease in climbing locomotor capacity (negative geotaxis), there was a reduction in exploratory locomotor capacity (open field assay). Collectively, our results suggest that flies exposed to Boral® 500 SC (SULF) have a higher energy demand to deal with the effects caused by the herbicide. (1) This was seen by decreasing weight and increasing total protein. (2) Activation of the heme biosynthesis pathway, by the accumulation of protoporphyrin IX (intermediate of heme synthesis), increase in total heme in the head, and induction of the PBGS enzyme ( $\delta$ -ALA-D in mammals). In conjunction with (3) increased oxidative damage in the body as seen by the TBARS assay and

(4) increased activity of SOD and GST enzymes. Along with (5) increased MTT abatement capacity. Thus, in this study, it was demonstrated that the increase in energy demand, to supply the cellular processes altered by exposure to the herbicide, maybe the main sign of the Boral® 500 SC (SULF) toxicity in *Drosophila melanogaster*.

**Keywords:** Fruit Fly; Toxicity; Heme; Oxidative stress; Energy Demand.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. ROTA DE BIOSÍNTESE DA CLOROFILA E MECANISMO DE AÇÃO DOS HERBICIDAS INIBIDORES DA PPOX.....	20
FIGURA 2. ESTRUTURA QUÍMICA GERAL DE HERBICIDAS DA CLASSE DIFENIL ÉTER E ALTERAÇÕES QUÍMICAS REALIZADAS DURANTE OS ANOS .....	22
FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA DE HERBICIDAS DA CLASSE DAS ARILTRIAZOLINONAS. ....	22
FIGURA 4. MODELO CONCEITUAL QUE DESCREVE ESTRESSORES, VIAS DE EXPOSIÇÃO E EFEITOS POTENCIAIS PARA ANIMAIS E PLANTAS TERRESTRES PELO USO DO SULFENTRAZONE.....	29
FIGURA 5. MUTAÇÃO NA ENZIMA PROTOPORFIRINOGÊNIO OXIDASE ( <i>PPOX</i> <sup>-/-</sup> ) CAUSA ACÚMULO DE PROTOPORFIRINA IX (AUTOFLUORESCENTE SOB LUZ UV) NO INTESTINO, OENÓCITOS E GLÂNDULA PROTORÁCICA EM LARVAS L3 DE <i>D. MELANOGASTER</i> . ....	36
FIGURA 6. BIOSÍNTESE DO HEME POR ALAS1. ALAS = ÁCIDO AMINOLEVULÍNICO SINTASE; PBGS = PORFOBILINOGÊNIO SINTASE ( $\Delta$ -ALA-D EM MAMÍFEROS [ÁCIDO AMINOLEVULÍNICO DESIDRATASE]); HMBS = HIDROXIMETILBILANO SINTASE; UROS = UROPORFIRINOGÊNIO III SINTASE; UPDO = UROPORFIRINOGÊNIO DESCARBOXILASE; CPOX = COPROPORFIRINOGÊNIO OXIDASE; PPOX = PROTOPORFIRINOGÊNIO OXIDASE; FECH = FERROQUELATASE.....	37
FIGURA 7. PRINCIPAIS PRODUTOS DE METABOLIZAÇÃO DO SULFENTRAZONE EM MAMÍFEROS.....	70

**LISTA DE SIGLAS**

**$\mu\text{g.L}^{-1}$**  – microgramas por litro

**$\mu\text{g.mg}^{-1}$**  – microgramas por miligrama

**$\mu\text{g.mL}^{-1}$**  – microgramas por mililitro

**$\delta$ -ALA-D** – Ácido  $\delta$ -aminolevulínico desidratase

**ALAS** – Ácido Aminolevulínico sintase

**ALAS1** – Gene que codifica a ALAS1

**ALAS2** – Gene que codifica a ALAS2

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**ATP** – Adenosina Trifosfato

**CAT** – Catalase

**CoA** – Coenzima A

**CPOX** – Coproporfirinogênio oxidase

**DCF-DA**– Diacetato de Diclorofluoresceína

**DMSO**– Dimetilsulfóxido

**DNA** – Ácido Desoxirribonucleico

**FAD** – Flavina Adenina Dinucleotídeo

**FECH** – Ferroquelatase

**FISH** – Fluorescence In Situ Hybridization

**G6PDH** – Glicose-6-fosfato desidrogenase

**$\text{g.L}^{-1}$**  – gramas por litro

**$\text{g a.i.ha}^{-1}$**  – gramas de ingrediente ativo por hectare

**GST** – Glutathione *S*-transferase

**HMBS** – Hidroximetilbilano sintase

**IBAMA** – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

**KDH** –  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase

**kg.ha<sup>-1</sup>** – quilogramas por hectare

**L3** – Estágio larval antecessor a pupação

**L.ha<sup>-1</sup>** – Litro por hectare

**MAPA** – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**MDA** – Malondialdeído

**mg** – miligramas

**mg.Kg<sup>-1</sup>** – miligrama por quilograma

**mg.Kg<sup>-1</sup> p.c.** – miligrama por quilograma de peso corporal

**mg.L<sup>-1</sup>** – miligramas por litro

**mL** – mililitros

**MTT** – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

**m/v** – massa por volume

**ng.g<sup>-1</sup> m.s.** – nanogramas por grama de massa seca

**P450** – Citocromo P450

**PBGS** – Porfobilinogênio sintase

**pH** – Potencial hidrogeniônico

**POD** – Peroxidase

**PPOX** – Protoporfirinogênio oxidase

***PPOX<sup>-/-</sup>*** - Cepa de *D. melanogaster* com mutação no gene que codifica a enzima PPOX

**ROS** – Reactive Oxygen Species

**RQ** – Risk Quotient

**RSD** – Relative Standard Deviation

**SOD** – Superóxido dismutase

**SULF** – Sulfentrazone

**TBARS** – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

**UPDO** – Uroporfirinogênio descarboxilase

**UROS** – Uroporfirinogênio III sintase

**US EPA** – *United States Environmental Protection Agency*

**UV** – Ultravioleta

**VLDL** – Lipoproteína de Densidade Muito Baixa

**v/v** – volume por volume



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>20</b>
2.1 Herbicidas Inibidores da Protoporfirinogênio oxidase .....	20
2.2 O Sulfentrazone .....	23
2.2.1. Permanência no Solo e Lixiviação .....	24
2.2.2 Toxicidade em Modelos Animais .....	26
2.2.2.1 <i>Dados Toxicológicos disponibilizados pelas Agências Reguladoras</i> .....	25
2.2.2.2 <i>Dados Toxicológicos do Sulfentrazone Publicados em Artigos Científicos</i> .....	29
2.3 <i>Drosophila melanogaster</i> .....	33
2.3.1 <i>D. melanogaster</i> como modelo para toxicidade em insetos .....	34
2.3.2 HEME em <i>D. melanogaster</i> .....	35
<b>3. OBJETIVO .....</b>	<b>38</b>
3.1. Objetivo geral .....	38
3.2. Objetivo Específico .....	38
<b>4. Boral® 500 SC (Sulfentrazone) induz acúmulo de intermediários da síntese do Heme e alterações no comportamento locomotor e marcadores metabólicos em <i>D. melanogaster</i> .....</b>	<b>39</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAIS .....</b>	<b>68</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>74</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>75</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A crescente atividade humana tem gerado aumento no descarte de substâncias perigosas na natureza. Isso é agravado pelo crescimento populacional, que gera a necessidade de aumento da produção de alimentos, aumento no uso de drogas promotoras da saúde humana e desenvolvimento de novas moléculas e materiais. Seja pela atividade agrícola, industrial ou urbana, a introdução de xenobióticos em ecossistemas aquáticos e terrestres é de preocupação global, visto que essas moléculas podem impactar negativamente os organismos que compõem os mais variados ecossistemas (CARRIÇO et al., 2021).

Na agricultura, muitos agrotóxicos são utilizados para o controle de diversas pragas, com o objetivo de aumentar a produtividade devido a necessidade de produção de alimento para a crescente população mundial. Assim, muitas dessas moléculas são constantemente lançadas na natureza, seja em ecossistemas terrestres ou aquáticos, desencadeando contaminação cumulativa que pode gerar impactos ambientais significativos (AUBERTHEAU et al., 2017; DANESHVAR et al., 2012). Diante disso, estudos mostram a ocorrência de mudanças moleculares e celulares em populações aquáticas e terrestres devido a exposição à contaminantes, mesmo em baixas concentrações. Esses efeitos crônicos são possíveis de ocorrer em organismos expostos em diferentes ecossistemas e podem promover alterações fisiológicas, comportamentais e populacionais nessas espécies (KIDD et al, 2007, 2012; SANTOS et al., 2010; WRUBLESWSKI et al., 2018).

Tendo essa perspectiva em mente, alguns fatores contribuem para que determinados pesticidas sejam mais propensos em causar prejuízos ambientais. Isso é justificado pelo fato de que alguns herbicidas são efetivos em seus mecanismos de ação, mesmo em baixas concentrações e altamente específicos, como no caso dos inibidores da Protoporfirinogênio oxidase (PPOX) (ZAGAR et al., 2019). Além disso, essas moléculas podem ter alta permanência no ambiente, como no caso do herbicida Sulfentrazone (SULF), um herbicida inibidor da PPOX, pertencente a classe das ariltriazolinonas, que possui alta meia vida no solo (146,5 dias) (MARTINEZ et al., 2008). E por fim, a conservação das rotas metabólicas que são alvos da ação das moléculas, assim os efeitos podem ser sentidos por outras espécies, além daquelas alvo. Por exemplo, isso ocorre com os inibidores da PPOX, uma enzima envolvida na síntese, tanto da clorofila quanto do heme, tanto em plantas quanto em animais (ZAGAR et al., 2019). Todas essas considerações alertam para o fato de que organismos não alvo, como as espécies animais, podem ser contaminadas por esses herbicidas no meio ambiente.

Diante dessas considerações, é de grande importância o desenvolvimento de estudos que busquem avaliar a toxicidade de xenobióticos em organismos não alvo. Através da utilização de organismos modelo, é possível elucidar os efeitos de determinada molécula e delimitar estratégias ou legislações para a diminuição do impacto gerado pela sua utilização. Além disso, a utilização de organismos modelo possibilita o esclarecimento de efeitos que são representativos para outras espécies, pois funcionam como modelos genéticos para processos fundamentais e representativos para uma ampla gama de sistemas e processos que ocorrem em outros organismos vivos (LEONELLI e ANKENY, 2013).

A *Drosophila melanogaster*, mais conhecida como a mosca-da-fruta, é amplamente utilizada como organismo modelo para muitos processos fisiológicos e genéticos. A sua utilização é amplamente defendida para o estudo de doenças neurodegenerativas humanas, câncer, envelhecimento e toxicidade de metais, nanomateriais, dentre outros (BILEN e BONINI, 2005; CALAP-QUINTANA et al., 2017; DEMIR, 2020; MIRZOYAN et al., 2019; PIPER e PARTRIDGE, 2018). Portanto, as pesquisas que utilizam esse modelo, podem descrever efeitos que podem ocorrer em outros organismos, inclusive os humanos. Nesse contexto, o estudo de doenças humanas nesse organismo modelo é muito difundido, assim a mosca-da-fruta “é frequentemente descrita como uma pequena pessoa com asas” (SCHNEIDER, 2000). Assim a utilização de *D. melanogaster* para entender melhor a biologia dos insetos, ou a toxicologia de xenobióticos em insetos, não é realizada pelo fato de que os pesquisadores estão interessados em estudar especificamente esta espécie, mas sim pelo fato desse organismo ser o inseto mais simples de manipular (SCHNEIDER, 2000).

Tendo em vista a utilidade da mosca-da-fruta para estudos toxicológicos em insetos, esse modelo pode ser útil para trabalhos que buscam avaliar os efeitos de pesticidas em organismos não alvo. Isso inclui os insetos que não necessariamente representam ameaças a produção agrícola, como os insetos polinizadores, as abelhas, borboletas, moscas, vespas, besouros, dentre outros (RADER et al., 2016). Esses insetos desempenham papel crucial na produtividade agrícola e estão sendo prejudicados pela ampla aplicação de herbicidas (BOHNENBLUST et al., 2015). Herbicidas são utilizados para o controle de plantas daninhas, mas devido à alta semelhança evolutiva de alguns mecanismos fisiológicos, que plantas e animais têm em comum, essas moléculas podem afetar não apenas as plantas alvos, mas também podem ser potencialmente danosas a animais que coexistem nos locais de aplicação. Assim, é de suma importância estabelecer dados que mostrem os efeitos a esses organismos

não alvo para delimitar estratégias não prejudiciais para o controle de plantas daninhas na agricultura.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

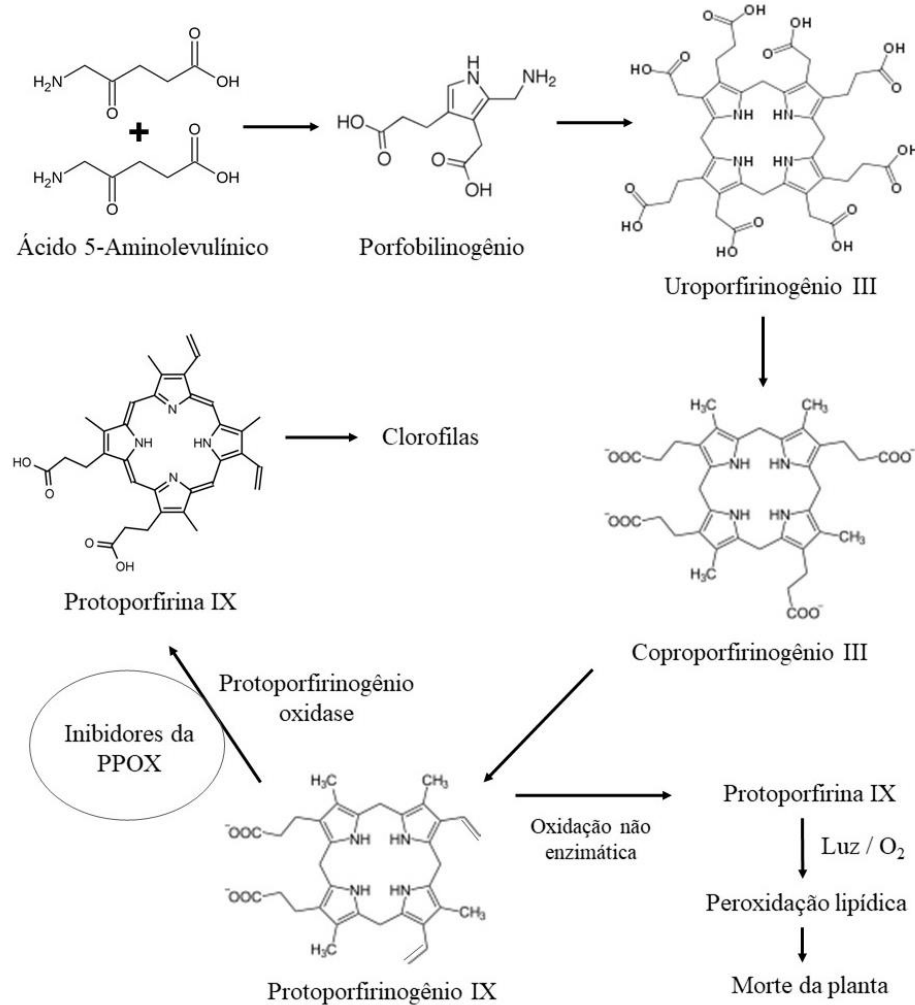
### **2.1 Herbicidas Inibidores da Protoporfirinogênio oxidase**

Na agricultura, o controle químico de ervas daninhas começou há mais de um século com compostos inorgânicos e a partir da década de 1940 fez a transição para a era dos herbicidas orgânicos (KRAEHMER et al., 2014). Isso inclui os herbicidas que tinham como mecanismo de ação a inibição da enzima Protoporfirinogênio oxidase (PPOX, PROTOX ou PPO), que foram disponibilizados comercialmente na década dos anos de 1960. Nessa época, o mecanismo de ação desses herbicidas ainda não era conhecido, sendo elucidado apenas nos primeiros anos da década de 1980. Neste mesmo período, o interesse por esses herbicidas cresceu pela alta especificidade em seu mecanismo de ação, assim houve um esforço em pesquisas para o desenvolvimento de novas moléculas que pudessem atuar na inibição da PPOX. Contudo, alguns problemas foram surgindo no decorrer desse desenvolvimento, como a baixa seletividade dos herbicidas em atuar apenas no controle pré e pós-emergência de plantas daninhas, sem gerar danos as culturas. Essa limitação de seletividade foi contornada com o surgimento de novas moléculas que poderiam controlar plantas daninhas e que possuíam seletividade para algumas culturas, como soja e milho (ZAGAR et al., 2019).

O mecanismo de ação desses herbicidas é a inibição da enzima Protoporfirinogênio oxidase (Figura 1), a sétima enzima responsável pela biossíntese do grupamento heme e da clorofila. Esta enzima catalisa a oxidação do protoporfirinogênio IX em três etapas à protoporfirina IX, utilizando três moléculas de oxigênio molecular ( $3O_2$ ), como acceptor de elétrons, formando peróxido de hidrogênio ( $3H_2O_2$ ). Essa transferência de elétrons é mediada pelo cofator Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD), que transfere os elétrons para o  $O_2$  (SHEPHERD e DAILEY, 2009). Como resultado da inibição da enzima, ocorre o acúmulo da protoporfirina IX, que é o produto da reação, não o substrato. Isso ocorre pela conversão não enzimática do protoporfirinogênio à protoporfirina IX. Assim a protoporfirina IX, em contato com a luz e oxigênio, leva a produção de quantidades substanciais de oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), responsável pela peroxidação de ligações insaturadas de ácidos graxos presentes na membrana celular, danos a proteínas e ao DNA. Em exposição à luz, após a aplicação de herbicidas inibidores da PPOX, os efeitos da peroxidação lipídica irão aparecer nas folhas de plantas expostas. Isso inclui a desestruturação da membrana celular, extravasamento do líquido

intracelular, necrose da folha e morte da planta. Sintomas nas folhas das plantas, como uma aparência “úmida e flácida”, ocorrem horas após a aplicação desses herbicidas, sob luz solar (ZAGAR et al., 2019).

**Figura 1.** Rota de biossíntese da clorofila e mecanismo de ação dos herbicidas inibidores da PPOX.



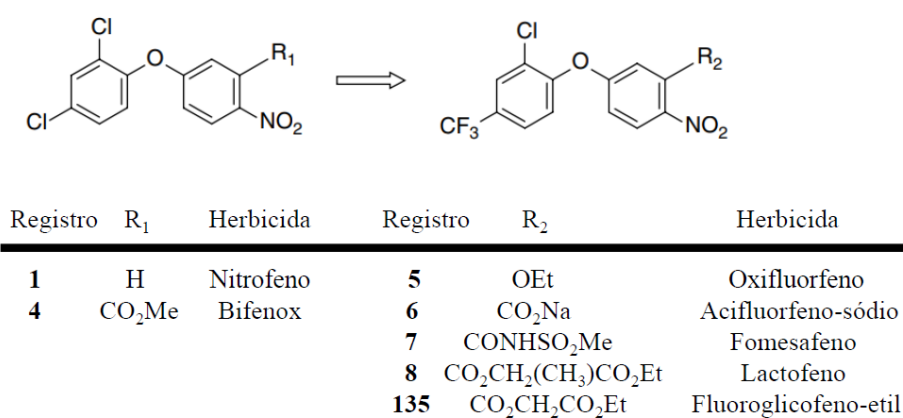
Fonte: adaptado de Zagar et al., 2019.

Entre as classes de herbicidas que possuem a capacidade de inibir a PPOX, pode-se destacar os Difênil Éter, que foi a primeira classe de herbicidas inibidores da PPOX. Na Figura 2, está a estrutura química geral dessa classe e as alterações químicas que foram realizadas com o passar dos anos. Essas alterações estruturais geraram uma maior atividade biológica das moléculas, para o controle mais efetivo quando aplicado de modo pós-emergente de plantas de folha-larga (ZAGAR et al., 2019).

Outra classe que teve destaque durante as décadas de 1980 e 1990, foram os herbicidas baseados em um Anel Fenil ligado a um Heterociclo. A partir da descoberta dessa classe, muitas

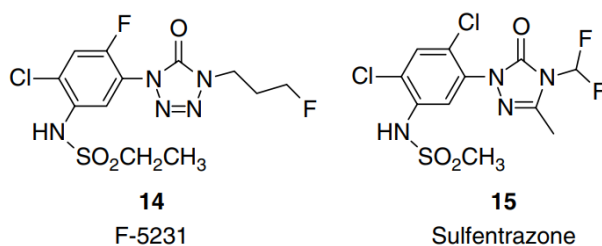
alterações estruturais foram realizadas e muitas moléculas foram criadas com algumas sendo disponibilizadas comercialmente. A F-5231 (Figura 3) foi uma molécula apresentada em 1992, e posteriormente disponibilizada comercialmente, que propiciava um excelente controle de plantas de folha larga com aplicação de baixas quantidades de princípio ativo, no cultivo de soja, milho, arroz e trigo (THEODORIDIS et al., 1992a). Sendo substituída, posteriormente, pelo Sulfentrazone (Figura 3), que aumentou a possibilidade de controle pré-emergente de plantas de folha estreita (THEODORIDIS et al., 1992b).

**Figura 2.** Estrutura química geral de herbicidas da classe Difenil Éter e alterações químicas realizadas durante os anos



Fonte: traduzido de Zagar et al., 2019.

**Figura 3.** Estrutura química de herbicidas da classe das Ariltriazinonas.



Fonte: Zagar et al., 2019.

Existem outras classes de herbicidas inibidores da PPOX, como os Tetrahidrophtalamida Fenil, *N*-Fenil Heterociclo, Fenoxifenil e Benziloxifenil ligado a Heterociclo. A variedade de estruturas desenvolvidas durante o passar dos anos foi ampla, bem como a ação biológica conseguida a partir de modificações estruturais feitas (ZAGAR et al., 2019). O amplo espectro de controle de plantas daninhas, a baixa aplicação de princípio ativo e alta especificidade em seu modo de ação, são fatores que tornam os herbicidas inibidores da PPOX, muito atraentes para indústrias e agricultores. Além disso, têm se dado mais atenção

para os herbicidas inibidores da PPOX nos últimos tempos, devido ao aumento de plantas daninhas resistentes/tolerantes ao Glifosato, que é o herbicida mais utilizado no Brasil, Estados Unidos e União Europeia (WEBSTER e SOSNOSKIE, 2010) e, no desenvolvimento de culturas transgênicas resistentes aos herbicidas inibidores da PPOX (BUSINESS WIRE, 2016; RANGANI et al., 2019).

## 2.2 O Sulfentrazone

Como apresentado anteriormente, o Sulfentrazone (SULF) (2',4'-dichloro-5'-(4-difluoromethyl-4,5-dihydro-3-methyl-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-yl) methanesulfonamide) é um herbicida da classe das Triazolonas, com registro ativo nos Estados Unidos e no Brasil. Segundo o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), em 2019 foram vendidas aproximadamente 1,9 mil toneladas do SULF (princípio ativo) no Brasil. Sendo que, mais de 58% (1,1 mil toneladas) desse total foi adquirido no estado de São Paulo (IBAMA, 2020).

A partir de 2016, várias empresas tiveram registros aceitos junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) de novas formulações comerciais a base de SULF. Em 2016 foram 4 novas formulações, incluindo uma com adição do princípio ativo Imazetapir, que também é um herbicida. Já em 2017, foram 5 novas formulações, 11 em 2018, 6 em 2019 e por fim, em 2020, 11 novas formulações tiveram registros concedidos junto ao MAPA, sendo duas delas com a adição do Imazetapir (MAPA, 2021). Isso demonstra um recente interesse em difundir a utilização desse herbicida na agricultura brasileira. Esse fato pode estar ligado, como descrito anteriormente (item 2.1), ao aparecimento de plantas resistentes ao Glifosato e o desenvolvimento de culturas transgênicas resistentes/tolerantes aos herbicidas inibidores da PPOX. Adicionalmente a isso, pela recente proibição da utilização do herbicida Paraquat, que vinha sendo amplamente utilizado no Brasil. O Paraquat, em 2019 foi o 7º herbicida mais vendido no Brasil, mas por sua alta toxicidade, em 2017 foi dado o prazo de 3 anos para o fim de sua comercialização, que foi estendido até o fim da safra 2020/2021 (IBAMA, 2020; ANVISA, 2020). Assim, é possível que as empresas agroquímicas estejam buscando alternativas para disponibilizar aos agricultores novas soluções para o controle efetivo de plantas daninhas, o que torna imprescindível os estudos em modelos experimentais para elucidar os mecanismos de toxicidade em organismos não alvo.

Atualmente no Brasil, uma das formulações comerciais a base de SULF, é o Boral® 500 SC (FMC Corporation) (MAPA - nº 07495), em forma de suspensão concentrada para a

utilização nas culturas de abacaxi, cana-de-açúcar, citros, café, fumo e soja. Esse herbicida é utilizado para o controle pré-emergente (e pós-emergência no cultivo da soja) de gramíneas, plantas herbáceas e ervas daninhas. Assim, após a aplicação há um intervalo de segurança mínimo de 60 dias para que as culturas possam ser colhidas e comercializadas (FMC, 2010). Para as culturas com fins alimentícios, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) delimita limites máximos de resíduo que variam de 0,01 a 0,5 mg.Kg<sup>-1</sup> nos produtos originários de culturas onde o emprego do Boral® 500 SC é permitido (ANVISA, 2003).

Nessa formulação comercial, o SULF está presente na concentração de 500 g.L<sup>-1</sup> (50% m/v), sendo que outros componentes da formulação estão presentes na concentração de 700 g.L<sup>-1</sup> (70% m/v). A taxa de aplicação dessa formulação nas culturas indicadas varia de 0,2 a 1,6 L.ha<sup>-1</sup>, ou seja, em cada hectare a quantidade de princípio ativo utilizado pode variar de 100 a 800 g (FMC, 2010). Essa taxa de aplicação é recomendada para ser utilizada 1 única vez por ciclo da cultura. Assim, antes da emergência da cultura (no caso da soja) ocorre a aplicação do herbicida. Devido ao seu longo efeito residual, ele combate o surgimento de ervas daninhas durante um determinado tempo, que pode variar dependendo de diversos fatores, como composição do solo, índice pluviométrico, composição microbiológica do solo, dentre outros.

### **2.2.1. Permanência no Solo e Lixiviação**

A permanência da molécula de SULF no ambiente após as aplicações é considerada alta, pois é descrito que a sua meia-vida no solo pode variar de 110 a 280 dias, dependendo das condições ambientais e do solo (HATZIOS, 1998). Já foi demonstrado que a atividade microbiana desempenha papel importante na degradação do SULF. A meia-vida do herbicida em solo esterilizado foi de 198 dias, já em solo não esterilizado, a meia-vida foi de 93 dias (OHMES et al., 2000). Assim, tanto bactéria quanto fungos, podem desempenhar o papel de degradadores do SULF em diferentes tipos de solos (MARTINEZ et al., 2008).

O modo de aplicação do SULF de forma pré-emergente é possível graças a sua alta permanência no solo. Em um estudo de campo desenvolvido em Illinois (EUA), realizado em uma lavoura de 32 hectares por Thorngren e colaboradores (2017), foi demonstrado que após duas aplicações de 174 g a.i.ha<sup>-1</sup> (gramas de ingrediente ativo por hectare), uma em novembro de 2013 e outra em maio de 2014 (seis meses após a primeira aplicação), a maior concentração média do herbicida no solo atingiu 318 ng.g<sup>-1</sup> m.s. (nanogramas de SULF por gramas de massa seca do solo), com picos que atingiram 722 ng.g<sup>-1</sup> m.s. Neste estudo, para que essa concentração diminuísse pela metade, foram necessários 43 dias após a segunda aplicação. Esse trabalho teve



início em janeiro de 2013 e nas primeiras análises do solo, até a primeira aplicação, o SULF vinha sendo detectado, isso era decorrente de aplicações feitas no ano anterior (abril de 2012), demonstrando a alta permanência desse herbicida no solo analisado. Isso também demonstra que a dissipação do herbicida, seja pela atividade microbiana ou lixiviação para águas superficiais ou subterrâneas, pode não ser suficiente para que o SULF não seja detectado em lavouras onde a aplicação é realizada. Assim, o herbicida pode estar se tornando uma molécula presente durante o ano todo em locais onde ocorre a aplicação anual para o controle de plantas daninhas (THORNGREN et al., 2017).

Vale ressaltar que na regulamentação americana para a utilização de formulações comerciais a base de SULF, é possível utilizar até duas aplicações por ciclo da cultura, diferente do que é regulamentado no Brasil. Assim, num somatório da quantidade total utilizada de princípio ativo nos Estados Unidos, como visto na referência citada acima, a quantidade total utilizada é de 348 g a.i.ha<sup>-1</sup> dividido em duas aplicações com 6 meses de intervalo. Já no Brasil, existe um intervalo de concentrações permitidas nas diversas culturas onde é aplicada a formulação comercial Boral® 500 SC, mas o máximo permitido é cerca de 2,3x maior que as duas aplicações Americanas somadas. Assim, no Brasil, o herbicida pode ser utilizado em relativas grandes quantidades em uma única aplicação (FMC, 2010; THORNGREN et al., 2017).

A permanência do herbicida em lavouras onde é realizado o cultivo da soja pode ser problemática para os agricultores. Isso foi demonstrado por Dan e colaboradores (2010), onde o efeito residual do herbicida SULF foi capaz de diminuir a produtividade de grãos de sorgo, mesmo com o plantio da cultura 200 dias após a aplicação pré-emergente do herbicida no cultivo da soja. Além do sorgo, outra cultura que pode ser prejudicada pelo prolongado efeito residual do herbicida, é o algodão, que teve seu rendimento diminuído em 30% quando cultivado em sucessão à soja (MATTE et al., 2019). Assim, fica evidente que, o efeito residual do SULF é considerável, levando à prejuízos às culturas sucessivas ao cultivo da soja, onde o herbicida é aplicado de forma pré-emergente e em alguns casos a concentração aplicada pode ser de 600 g i.a.ha<sup>-1</sup> (FMC, 2010).

Além da ampla capacidade de permanecer no solo, o SULF possui grande capacidade de ser lixiviado pela água, pela sua alta solubilidade em água em pH neutro a básico. Assim, Shaner (2012) alerta que o herbicida pode ser altamente móvel no solo. Neste trabalho fica evidente que em solos compostos por pouca matéria orgânica e alto pH, ocorre a dissipação do herbicida (meia-vida de 30 dias no solo) para águas subterrâneas em condições de pouca

precipitação hídrica. Essa dissipação pode ser ampliada (meia-vida de 14 dias no solo) em condições de precipitações mais consideráveis. Assim, surge a preocupação de que este herbicida possa estar gerando contaminações de recursos hídricos (subterrâneos e superficiais).

No trabalho publicado por Thorngren e colaboradores (2017), os autores também trazem dados sobre a contaminação por SULF dos recursos hídricos no local onde foi realizado o estudo. Os autores trazem que a maior concentração quantificada do herbicida chega a 25,3  $\mu\text{g.L}^{-1}$  em água de escoamento, com concentração média de 10,3  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Já para a água subterrânea, a concentração média detectada foi de 7,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , com maior concentração quantificada de 21,6  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Em outro estudo, desenvolvido em Jaboticabal (São Paulo, BR), as análises de poços semi-artesianos de água para consumo humano e riachos demonstrou a presença do SULF em 29,2% e 20,5% dos locais analisados, respectivamente. As concentrações quantificadas foram de 0,413 a 0,640  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , sendo, juntamente com o Imazetapir e Hexazinona, os únicos pesticidas quantificados em ambos os recursos hídricos, dentre 13 pesticidas diferentes analisados (SANTOS et al., 2015). Tudo isso demonstra que o SULF, além de poder ter uma ampla permanência no solo, pode atingir recursos hídricos com facilidade. Com isso, o desenvolvimento de trabalhos que buscam avaliar a presença desse herbicida no ambiente é de suma importância para que sejam previstos os efeitos causados a organismos não-alvos.

## **2.2.2 Toxicidade em Modelos Animais**

Na literatura, são escassos os trabalhos que buscam avaliar a toxicidade do SULF em modelos animais, além daqueles já utilizados para o registro junto as agências reguladoras. Além disso, os dados relacionados a toxicidade do SULF em modelos animais na *U.S. Environmental Protection Agency* (US EPA) são mais amplos dos que os descritos junto a Bula das formulações comerciais disponíveis no Brasil.

### ***2.2.2.1 Dados Toxicológicos disponibilizados pelas Agências Reguladoras***

No MAPA, o Boral® 500 SC está registrado sob o número 07495 e consta na bula do produto algumas informações toxicológicas sobre exposição animal à essa formulação. Sobre os efeitos agudos já se sabe que pela via de exposição oral, inalatória e cutânea em ratos, a  $DL_{50}$  (Dose Letal Mediana) foi de: 300-2000, e  $>4000 \text{ mg.Kg}^{-1} \text{ p.c.}$  (miligramas de SULF por quilograma de peso corporal) e  $>2,933 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente. Esse herbicida foi classificado como não corrosivo/irritante para exposições cutâneas e oculares em coelhos. Além disso, foi classificado como não mutagênico, quando submetido ao teste de mutação genética reversa (Teste de Ames) e pelo teste de micronúcleos em células da medula óssea de ratos (FMC, 2021).

Os efeitos subcrônicos e crônicos, demonstrados em ensaios realizados com o produto técnico (SULF com alta pureza) em cães, camundongos e ratos, apresentaram alterações nos parâmetros hematológicos, tal como a diminuição dos valores de hemoglobina e hematócrito. Não houve indícios de potencial carcinogênico e genotóxico. Alterações sobre o desenvolvimento embriofetal foram observadas em ratos e coelhos após exposição intrauterina e efeitos sobre os parâmetros reprodutivos masculinos (FMC, 2021). Apesar disso, é citado que, para todos os efeitos observados, doses seguras de exposição ao SULF foram estabelecidas.

Os efeitos agudos, subcrônicos e crônicos citados acima constam na bula de uma das formulações comerciais disponíveis atualmente (FMC, 2021). Não foram encontrados nos bancos de dados das agências reguladoras brasileiras as informações completas sobre a toxicidade do herbicida, para a aquisição do registro no Brasil. Dentre as bulas das diferentes formulações disponíveis, há diferenças entre os valores encontrados, principalmente para as DL<sub>50</sub> agudas para as vias de exposição oral, dérmica e inalatória. Apesar disso, considerando os efeitos descritos, os produtos comerciais, a base de SULF, são considerados pouco tóxicos, sendo assim, pertencem a Classe Toxicológica 4 (FMC, 2021).

Em 2014, a US EPA divulgou a reavaliação de risco relacionada à utilização do herbicida SULF. Para isso, foram utilizados uma série de dados coletados (não publicados) pela agência de experimentos envolvendo a toxicidade do herbicida em diferentes espécies de animais terrestres. Incluindo as espécies de aves *Colinus virginianus* e *Anas platyrhynchos* (Perdiz-da-Virgínia e Pato-Real, respectivamente), uma espécie de mamífero *Rattus norvegicus*, (Rato-Castanho) e a Abelha-Europeia (*Apis mellifera*) para avaliar a toxicidade em insetos. Para todos os ensaios com essas espécies, em uma situação de exposição aguda dietética (Pato-real), oral (Perdiz-da-Virgínia, Rato-Castanho e Abelha-Européia), dérmica (Rato-Castanho) ou de contato (Abelha-Europeia), o herbicida foi considerado praticamente não tóxico pela agência. Isso foi devido à alta concentração ou dose necessária para que houvesse mortalidade dos animais testados (SINCLAIR e BARRETT, 2014). Vale ressaltar que a mortalidade parece ter sido o único parâmetro avaliado nos estudos de exposição aguda e não foram avaliadas espécies de anfíbios e répteis. Para esses, a agência alegou que os estudos realizados com as duas espécies de aves podem ser representativos para essas classes de animais.

O relatório também traz alguns resultados sobre a toxicidade crônica em animais terrestres. Na espécie de ave *Colinus virginianus*, foi demonstrado que o herbicida induz uma redução no peso de 8%, significativamente menor em relação ao controle. Já na espécie de

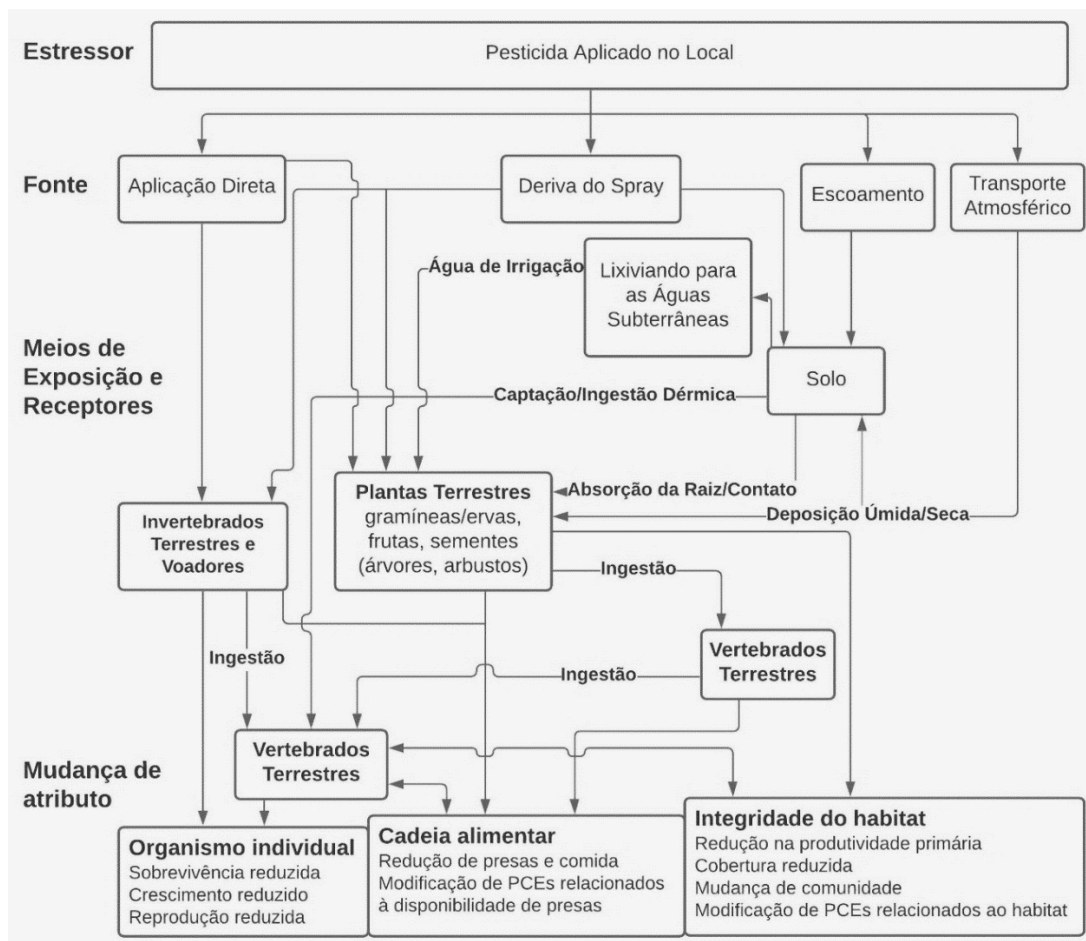
mamífero *Rattus norvegicus*, os efeitos vistos em um estudo de reprodução de 2 gerações com exposição dietética ao SULF foram mais detalhados. Isso inclui a diminuição do peso corporal materno e/ou ganho de peso corporal durante a gestação em ambas as gerações (P e F1). Para ambas as gerações, os seguintes efeitos também foram observados: aumento da duração da gestação, redução da viabilidade pré-natal (fetal e ninhada), redução do tamanho da ninhada, aumento do número de filhotes natimortos, redução da sobrevivência pós-natal do filhote e da ninhada, diminuição do peso corporal dos filhotes durante a lactação, diminuição da fertilidade e alterações histopatológicas nos órgãos reprodutivos dos machos F1 (SINCLAIR e BARRETT, 2014). Com isso, é possível notar que os efeitos sobre os mamíferos aparentam ser mais pronunciados, mas isso pode ser apenas causado pelo desenvolvimento de uma avaliação mais completa dos possíveis efeitos causados pela exposição crônica ao SULF nesse modelo animal. Esse fato é difícil de analisar pela não disponibilização ao público dos resultados completos dos diferentes estudos.

Com o objetivo de fornecer uma métrica de risco potencial a organismos não alvos, o Quociente de Risco (RQ, do inglês: Risk Quotient) é utilizado pela US EPA, levando em consideração as concentrações estimadas de exposição a esses organismos divididas pelos valores de toxicidade aguda e crônica. Assim, através do cálculo do RQ, os valores são utilizados para indicar quando o uso de um pesticida, conforme orientado pelo rótulo, tem o potencial de causar efeitos adversos a espécies não alvo. Assim, quando o RQ excede o que é determinado pela agência, são realizadas avaliações adicionais para determinar a coocorrência dessas espécies nos sítios de aplicação do pesticida em questão. Assim, no caso do SULF apenas aves tiveram seus valores de RQs agudos acima do que é determinado pela agência, dentre os animais terrestres avaliados. Para a Abelha-Europeia os valores de RQs crônicos não foram estipulados por falta de danos sobre a toxicidade do herbicida nessa espécie animal em uma situação de exposição crônica (SINCLAIR e BARRETT, 2014).

Na Figura 4 está representado um modelo conceitual que explora as vias de exposição potencial em animais terrestres. Segundo a agência, é possível esperar que os animais terrestres sejam expostos principalmente (1) pelo consumo de plantas e animais contaminados que foram diretamente pulverizados, sendo organismos esses, que estarão presentes nos locais de aplicação ou que poderão ter contato devido à deriva do herbicida, ocasionada por aplicações em condições meteorológicas inadequadas. Também, através da (2) ingestão de água contaminada, devido a alta capacidade do herbicida em ser lixiviado e por (3) contato dérmico com solo e vegetação contaminados, risco esse que pode ser considerado elevado, pelo fato de

que o herbicida possui alta meia vida no solo. Ainda, devido ao baixo potencial de bioacumulação do herbicida, é esperado que não ocorra exposição secundária, isso quer dizer que não é esperado que ele seja transportado pela cadeia alimentar por acumulação em tecidos corporais animais. (SINCLAIR e BARRETT, 2014). No entanto, devido a possível deriva, alta capacidade de lixiviação e alta permanência no solo, não apenas organismos presentes nos locais de aplicação podem ser afetados.

**Figura 4.** Modelo conceitual que descreve estressores, vias de exposição e efeitos potenciais para animais e plantas terrestres pelo uso do Sulfentrazone.



Fonte: traduzido de Sinclair e Barrett (2014).

Ainda, segundo os autores, de modo geral é possível esperar que ocorram efeitos a organismos individuais, como diminuição da sobrevivência, crescimento e reprodução, tanto de espécies vegetais, quanto de espécies de animais invertebrados e vertebrados. A longo prazo, é possível esperar que ocorram alterações na integridade dos habitats de animais terrestres, por possíveis efeitos em plantas terrestres e disponibilidade de presas, assim a utilização do herbicida SULF poderia levar a alteração na cadeia alimentar, como disponibilidade de alimento para animais herbívoros e carnívoros (SINCLAIR e BARRETT, 2014).

### ***2.2.2.2 Dados Toxicológicos do Sulfentrazone Publicados em Artigos Científicos***

Em artigos científicos, a toxicidade do herbicida SULF foi pouco explorada em modelos animais. Nos estudos publicados há uma tendência de avaliação “sintomática” decorrente da exposição ao herbicida, sendo poucos os artigos que focam nos possíveis efeitos causados pela inibição da enzima PPOX. Ou melhor, na literatura, não foram encontrados artigos que descrevem/correlacionam mecanismos envolvidos pelo acúmulo de intermediários da rota de síntese, com a apresentação dos danos em seus resultados. Apesar disso, aqui serão demonstrados alguns resultados publicados nos últimos anos utilizando diferentes espécies animais.

Em 2007, de Castro e colaboradores publicaram um estudo com o objetivo de avaliar os efeitos do SULF no desenvolvimento de ratos. O estudo foi realizado com a utilização de uma formulação comercial do SULF (Authority®, FMC Corporaton), onde as ratas grávidas foram expostas via gavagem em diferentes estágios gestacionais: 1-6 (Grupo A) ou 6-15 dias de gestação (Grupo B). Foi demonstrado no estudo que os filhotes tiveram um atraso no “aparecimento da geotaxia negativa<sup>1</sup>”, onde, na dose mais alta (50 mg.Kg<sup>-1</sup>), o reflexo diferiu significativamente em relação ao controle no 7º dia de idade para o grupo A e no 7º, 8º e 9º para o grupo B. Os valores de geotaxia negativa para os filhotes dos grupos B alcançaram os valores dos controles a partir do 9º dia de idade, o mesmo resultado foi obtido no teste do reflexo de endireitamento em superfície. No ensaio de reposta a força de pressão foi observado que para o grupo B, nas duas concentrações testadas (25 e 50 mg.Kg<sup>-1</sup>), houve um atraso na resposta em relação ao controle, enquanto para o grupo A, apenas houve significância na maior dose testada. Já no teste de locomoção em campo aberto<sup>2</sup>, houve diminuição na capacidade locomotora nos animais do grupo A nos dias 30, 60 e 90, e 30 e 60 para o grupo B, nas doses testadas. Diante de tudo isso, os autores demonstram que exposição materna ao SULF (Authority®) pode levar a alguns déficits neuromusculares e comportamentais em filhotes de ratos, mas o conhecimento dos efeitos do herbicida não permite afirmar os mecanismos envolvidos nas alterações no desenvolvimento muscular e neurológico.

Como dito anteriormente, consta na bula do produto comercial Boral® 500 SC, que o herbicida não apresenta efeitos genotóxico (FMC, 2021). Apesar disso, Bianchi e colaboradores (2015), ao verificarem a genotoxicidade pelo teste de micronúcleos e cometa, observaram que apenas no teste de micronúcleos houve uma potencial genotoxicidade em células HepG2 (hepatoma humano). Os autores atribuem essa diferença nos resultados encontrados ao fato de que o estudo desenvolvido foi realizado com a formulação comercial e não com o princípio

ativo com alto grau de pureza. Assim, foi demonstrado que o SULF induz perda e quebra cromossômica (técnica de FISH), mas os mecanismos envolvidos nessa ação não puderam ser definidos pelo estudo. Dentro disso surgem duas possibilidades levantadas pelos autores. A primeira delas seria a capacidade do SULF interagir com o DNA de fita simples, demonstrado em um estudo onde um voltamograma de pulso diferencial exibiu diminuições nas correntes de pico nos sinais das bases guanina e adenina, sugerindo interação entre elas e o SULF em solução (LIMA et al., 2010). A segunda possibilidade é referente a capacidade de produção de oxigênio singlete pela inibição da PPOX, via acúmulo de protoporfirina IX, que é descrito por possuir a capacidade predominante de gerar resíduos de guanina modificados ou até, pela produção de outras espécies reativas de oxigênio que induzem a quebras de fita de DNA e locais de perda de base (EPE, 1991).

Em artigos publicados na literatura, diferentes espécies de girinos foram, até o presente momento, os animais mais avaliados em relação a toxicidade do herbicida SULF em sua formulação comercial Boral® 500 SC. As espécies estudadas foram: *Rhinella schneideri* e *Physalaemus nattereri* (FREITAS et al., 2017), *Rana catesbeiana* (WILKENS et al., 2019) e *Melanophryniscus admirabilis* (da SILVA et al., 2020). Os estudos foram realizados por pesquisadores brasileiros, com espécies anfíbias encontradas na nossa biodiversidade.

No primeiro estudo, Freitas e colaboradores (2017) tiveram como objetivo, avaliar os efeitos da interação entre a temperatura ambiental e o herbicida SULF (Boral® 500 SC) em marcadores de estresse oxidativo. Assim, os autores demonstraram que a temperatura pode alterar os efeitos tóxicos do herbicida, prejudicando significativamente a defesa antioxidante e causando estresse oxidativo em girinos. Isso foi visto pelo aumento dos níveis de malondialdeído (MDA) em girinos da espécie *Physalaemus nattereri* expostos por 3 dias ao SULF (50 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), principalmente em temperaturas de 28 e 32 °C. Neste experimento, também foi demonstrado que a atividade de enzimas que participam da resposta antioxidante (Superóxido dismutase: SOD, Catalase: CAT, Glicose-6-fosfato desidrogenase: G6PDH, e Glutathione S-transferase: GST) tiveram seus valores alterados por influência do herbicida em diferentes temperaturas testadas. Ainda, os efeitos do SULF foram menos pronunciados em altas temperaturas após oito dias de exposição, mas incluem mudanças na CAT (100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), G6PDH, GST (10, 50 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), juntamente com o aumento significativo nos níveis de MDA a 36 °C. Por outro lado, para a espécie *Rhinella schneideri*, as alterações vistas nos marcadores de estresse oxidativo foram menos expressivas e não houve variações dos níveis de MDA em qualquer temperatura em ambos os períodos estudados. Assim, os autores concluem,

que a espécie *Physalaemus nattereri* apresenta maior sensibilidade tanto à temperatura quanto ao SULF, demonstrando que a capacidade de adaptação em condições ambientais desfavoráveis pode ser espécie-específica, mesmo para grupos taxonomicamente relacionados.

Em outro estudo, publicado por Wilkens e colaboradores (2019), foi demonstrado que o herbicida SULF (Boral® 500 SC) levou ao aumento de parâmetros metabólicos como triglicerídeos e VLDL (Lipoproteína de Densidade Muito Baixa) de girinos da espécie *Rana catesbeiana*, sem alteração de outros parâmetros como proteínas totais, ácido úrico, glicose e corticosterona na única concentração testada de 130 µg.L<sup>-1</sup> de ingrediente ativo em um experimento de 7 dias. Também foi visto através do estudo, que o herbicida levou ao aumento da GST no fígado, mas não no músculo caudal dos animais expostos. Também, não foram vistas alterações em enzimas de defesa antioxidante (SOD e CAT) e no marcador de peroxidação lipídica TBARS, tanto no fígado, quanto no músculo. Assim, os autores demonstram que o aumento da atividade da GST e manutenção dos níveis de SOD e CAT, parecem ser determinantes para prevenir o aumento da peroxidação lipídica no fígado dos animais tratados.

Similar a esses resultados, da Silva e colaboradores (2021), encontraram que o SULF (Boral® 500 SC) pode causar diminuição dos estoques de glicogênio, atividade da SOD e níveis de peroxidação lipídica, em contrapartida, aumento dos níveis totais de proteínas. Estudo esse que foi realizado com girinos da espécie *Melanophryniscus admirabilis* durante 4 dias nas concentrações de 130 e 980 µg.L<sup>-1</sup> de ingrediente ativo. Assim, os autores discutem que as reservas de glicogênio podem estar sendo consumidas para a síntese de adenosina trifosfato (ATP) e/ou para a manutenção dos níveis de glicose circulante. Já os níveis aumentados de proteínas totais podem representar um mecanismo compensatório que envolve o aumento da síntese proteica para atuar como enzimas antioxidante e/ou como fonte de energia durante o processo de metamorfose.

Com isso, os três trabalhos desenvolvidos com diferentes espécies de girinos demonstram que alterações nos níveis de marcadores metabólicos e de estresse oxidativo são possíveis em animais expostos ao SULF em sua formulação comercial Boral® 500 SC. Vale ressaltar que nos três estudos, os animais foram expostos a concentrações subletais do herbicida, assim, apesar de todas as alterações vistas, não houve mortalidade ao decorrer dos experimentos (da SILVA et al., 2020; FREITAS et al., 2017; WILKENS et al., 2019).

Como primeiro estudo a investigar os efeitos do SULF em algum organismo que vive no solo, Mesak e colaboradores (2018) avaliaram o comportamento e a dinâmica de hemócitos



em *Eisenia fetida* expostas ao SULF, em concentrações ambientalmente relevantes (0,318 e 31,8  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de massa seca de solo). Assim, neste estudo foi demonstrado que a dinâmica hemocitária revelou indução de resposta imune, mas essa resposta foi aparentemente ineficiente, uma vez que a taxa de mortalidade dos indivíduos expostos foi superior ao controle. Ainda, utilizando essa mesma espécie, Li e colaboradores (2020) expuseram os animais a concentrações de 0,2; 1 e 5  $\mu\text{g.g ms}^{-1}$  [microgramas de SULF (pureza de 95%) por grama de massa seca de solo] durante 28 dias. Neste estudo, os autores demonstraram que ocorreu o aumento da atividade de enzimas de defesa antioxidante (SOD, CAT, GST e Peroxidase: POD), mas esse aumento não foi suficiente para que os danos gerados pelo estresse oxidativo não fossem detectados. Isso foi evidenciado pelo aumento dos níveis de peroxidação lipídica (MDA), danos histopatológicos e de DNA, relacionado com o aumento da concentração do herbicida e ao decorrer do tempo (7, 14 e 21 dias de tratamento). Os autores chegam à conclusão de que esses danos podem ser reversíveis pelo fato que no 28º dia de tratamento, muitas das alterações vistas nos biomarcadores (SOD, CAT, POD, MDA) descritos retornaram à níveis de controle. Ainda segundo os autores, a enzima GST parece desempenhar um papel mais importante, por ser mais sensível na detoxificação do SULF e eliminação de espécies reativas de oxigênio do que as outras enzimas avaliadas, pois foi a única que apresentou aumento significativo no 28º dia de tratamento.

É importante ressaltar, que os dados gerados por esses trabalhos não possuem fins regulatórios. Pois é possível notar na reavaliação do registro do SULF junta a US EPA (SINCLAIR e BARRETT, 2014), que avaliações toxicológicas para fins regulatórios necessitam ser realizadas com o produto (Ingrediente Ativo) com alto grau de pureza e não com as formulações comerciais disponíveis. É provável que isso ocorra, pelo fato da importante necessidade da avaliação dos efeitos APENAS do ingrediente ativo, descartando possíveis interações com os chamados “Ingredientes Inertes” ou “Aditivos”. Isso pode ser questionável, uma vez que as aplicações feitas em lavouras são realizadas com a presença destes outros componentes oriundos da formulação comercial. Assim, os resultados encontrados pelas agências reguladoras podem estar sendo subestimados, em relação ao que está realmente acontecendo com os mais variados organismos nos locais de aplicação.

### **2.3 *Drosophila melanogaster***

O modelo experimental *Drosophila melanogaster* vem sendo utilizado em estudos laboratoriais a mais de 100 anos. Esse organismo modelo desempenhou função fundamental para o entendimento do “papel desempenhado pelo cromossomo na hereditariedade” e na

“descoberta da produção de mutações por meio de irradiação de raios-x”. Esses trabalhos desenvolvidos nas duas primeiras décadas dos anos 1900, foram premiados com Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1933 e 1946, respectivamente (revisado por JENNINGS, 2011). Nessas mesmas décadas, esse modelo experimental também vinha sendo utilizado para o estudo do envelhecimento, área essa que a mosca-da-fruta ajudou a entender o conceito de que a expectativa de vida poderia ser determinada pela taxa metabólica de um organismo (revisado por PIPER e PARTRIDGE, 2018).

Desde então, a utilização da mosca-da-fruta foi ampliada para diversos campos. Assim, ela vem sendo utilizada para estudos envolvendo doenças neurodegenerativas humanas, câncer e toxicidade de metais, nanomateriais, dentre outros. Isso se deve pela alta conservação evolutiva de muitos processos genéticos e fisiológicos, juntamente com a fácil manipulação genética que pode ser realizada nesses animais (JENNINGS, 2011). Além disso, a mosca-da-fruta é uma poderosa ferramenta para entender a toxicidade de substâncias em outras espécies, por ser o inseto mais fácil de manter em laboratório, ter um ciclo de vida curto, alta fertilidade e dimorfismo sexual (KIM et al., 2011; SCHNEIDER, 2000).

### **2.3.1 *D. melanogaster* como modelo para toxicidade em insetos**

A utilização de *D. melanogaster* para a avaliação da toxicidade de substâncias em insetos pode ter muitas aplicações. Dentro disso pode ser destacada a busca do entendimento do modo de ação no desenvolvimento de novas moléculas com fins inseticidas, a determinação de como a resistência a inseticidas pode surgir em populações de insetos e a descoberta de novos mecanismos de ação alvo para o controle de insetos (SCHNEIDER, 2000). Tendo em mente que os insetos são responsáveis por consideráveis perdas de produtividade na agricultura e vetores de transmissão de doenças.

Em contrapartida, nem todos os insetos são prejudiciais para as atividades humanas, isso é visto principalmente pelo papel que algumas espécies desempenham como controle natural de pragas, polinização, conservação da estrutura do solo e fertilidade e ciclagem de nutrientes (GRUBISIC et al., 2018). Atualmente, fatores que vêm influenciando negativamente a população desses insetos têm sido muito discutidos, principalmente fatores de grande escala, como mudanças no uso da terra, uso de pesticidas, mudanças climáticas e fragmentação do habitat (GOULSON, 2019; GRUBISIC et al., 2018; RHODES, 2018). Em um estudo desenvolvido na Alemanha, foi identificada a redução de 76% na biomassa de insetos voadores em três décadas, em reservas naturais no país todo (HALLMANN et al., 2017). Essa parece ser

uma tendência global, pois já foi demonstrado redução nas populações de insetos (principalmente polinizadores) em outros diversos países (extensivamente revisado por GOULSON, 2019 e RHODES, 2018). Isso tem sido chamado de “Crise Global de Polinização”, ou até de “Apocalipse Ecológico”, pois as consequências dessa diminuição dos insetos podem levar a perdas de produtividade na agricultura, mas principalmente, perda na biodiversidade animal e vegetal. Dentro disso, a utilização da mosca-da-fruta pode ser de grande importância para compreender alguns fatores que estão envolvidos na diminuição global das populações de insetos.

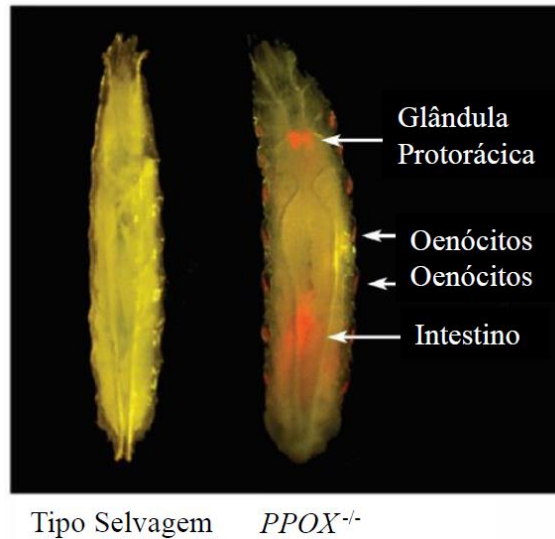
### 2.3.2 Heme em *D. melanogaster*

O heme é uma molécula essencial para a vida e serve como grupo prostético para as hemoproteínas (proteínas que se ligam ao heme) que possuem grande variedade de funções. Na mosca-da-fruta, já foi demonstrado que essa molécula compõe as globinas intracelulares, localizadas principalmente no sistema traqueal e o corpo gorduroso (glob1) e testículo (glob2 e glob3), compondo funções de metabolismo energético aeróbico, espermatogênese e reprodução, respectivamente (BURMESTER et al., 2006; 2018). Além disso, as hemoproteínas possuem função na cadeia transportadora de elétrons, como sensores de gás (NO e CO) e na produção de óxido nítrico (KIM et al., 2012; KLATT et al., 1992; MARVIN et al., 2009). O heme também participa na sinalização de processos de transcrição, envolvendo o ciclo circadiano e a manutenção da homeostase do heme, regulando a si mesmo (PHELPS, 2019; YIN et al., 2010).

Além disso, é possível destacar a importância do heme como cofator para atividade das enzimas Citocromo P450s (CYPs). No estágio larval da mosca-da-fruta, 85 genes P450s são expressos no intestino, túbulos de Malpighi e corpo adiposo, sugerindo papéis importantes nos processos de desintoxicação e proteção contra xenobióticos exógenos (CHUNG et al., 2009). Também, CYPs atuam na descarboxilase oxidativa, catalisando a etapa final na produção de hidrocarbonetos nos oenócitos, local conhecido pela biossíntese dessas moléculas que compõem a cutícula dos insetos (QIU et al., 2012). Por fim, na Glândula Protorácica, existe alta necessidade de CYPs para a síntese hormonal, mais especificamente ecdisona, que atua como sinalizador sistêmico, controlando a expressão gênica em tecidos-alvo para coordenar a incubação, muda e metamorfose em larvas da mosca-da-fruta (HUYNH et al., 2019). O heme como cofator para os CYPs demanda atenção pelo fato de que larvas *PPOX*<sup>-/-</sup> (*PPOX* mutante) apresentam acúmulo de protoporfirina IX nesses três tecidos (Figura 5), assim demonstrando a

alta demanda de heme nesses tecidos, onde diferentes CYPs também são extremamente requeridos (PHELPS, 2019).

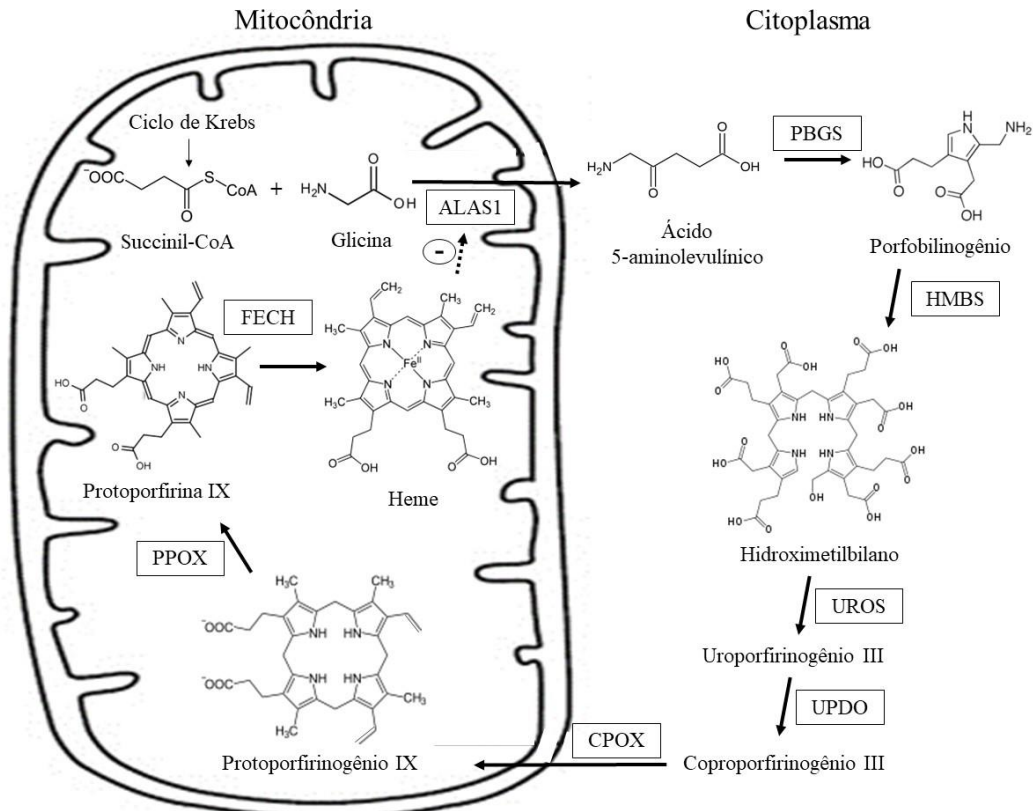
**Figura 5.** Mutação na enzima Protoporfirinogênio oxidase ( $PPOX^{-/-}$ ) causa acúmulo de protoporfirina IX (autofluorescente sob luz UV) no Intestino, Oenócitos e Glândula Prototorácica em larvas L3 de *D. melanogaster*.



Fonte: recortada e traduzida de Phelps (2019).

O heme é sintetizado por oito enzimas altamente conservadas evolutivamente a partir de succinil-CoA e glicina (Figura 6). A síntese do heme é realizada por quatro enzimas mitocondriais (passos 1, 6, 7 e 8) e quatro enzimas citoplasmáticas (passos 2, 3, 4 e 5). *ALAS1* codifica a primeira enzima na via de biossíntese do heme e é a etapa limitante em vertebrados e provavelmente, também limitante em *D. melanogaster* devido à alta conservação da via de biossíntese e a grande indução na expressão de *ALAS1* quando os níveis de heme diminuem (PHELPS, 2019). Em humanos, existe mais um gene que codifica essa enzima, *ALAS2*, que é expresso apenas nos eritrócitos e é regulado pelos níveis de ferro. Na formação dos eritrócitos, quando ocorre alta demanda da produção do heme, o succinil-CoA necessário não será proveniente do ciclo do ácido cítrico, mas sim, oriundo da glutamina via desaminase e  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase (KDH), devido a interação física das duas enzimas [*ALAS2* (Ácido Aminolevulínico Sintase 1) e KDH]. Já a *ALAS1*, expressa em outros tecidos, codifica a enzima em locais onde não há necessidade de grandes quantidades de heme, quando comparado com a formação do eritrócito, assim o succinil-CoA pode ser proveniente do ciclo do ácido cítrico (Figura 6) (BURCH et al., 2018). Ainda não está claro, quando o succinil-CoA será priorizado para fins energéticos, ou quando será desviado para a biossíntese do heme (via *ALAS1*), tanto em humanos quanto em *D. melanogaster*.

**Figura 6.** Biossíntese do heme por *ALAS1*. ALAS = Ácido Aminolevulínico sintase; PBGS = Porfobilinogênio sintase ( $\delta$ -ALA-D em mamíferos [ácido aminolevulínico desidratase]); HMBS = Hidroximetilbilano sintase; UROS = Uroporfirinogênio III sintase; UPDO = Uroporfirinogênio descarboxilase; CPOX = Coproporfirinogênio oxidase; PPOX = Protoporfirinogênio oxidase; FECH = Ferroquelatase.



Fonte: adaptado de Simon e Herkes (2011) e baseado em Phelps (2019).

Após a etapa quatro da via de biossíntese do heme, um anel porfirínico é formado (Figura 6). A protoporfirina IX, o último intermediário da via, comum da biossíntese do heme e clorofila, é o único intermediário da biossíntese que possui a capacidade de autofluorescer na presença de luz ultravioleta, já foi descrito que produtos de oxidação do heme por espécies reativas ou intermediários de degradação, também podem apresentar fluorescência (LEET et al., 2015; NAGABABU e RIFKIND, 1998). A ferroquelatase, a última enzima na via de biossíntese do heme, incorpora um íon de ferro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) no anel porfirínico para formar o heme na mitocôndria, que abole a propriedade autofluorescente (PHELPS, 2019).

Mutações nas enzimas envolvidas na rota de biossíntese do heme geram, em humanos, um grupo de doenças raras chamadas de porfirias. Já foi relatado, mutações em todas as etapas da rota, com complicações características de cada deficiência. Em um aspecto geral, as porfirias são doenças caracterizadas pelo acúmulo de porfirinas e precursores de porfirinas e podem ser divididas em porfirias hepáticas agudas, com sintomas de dor abdominal, sintomas

neuropsiquiátricos e neuropatia, e porfirias eritropoiéticas, que não causam sintomas neurológicos, mas estão associadas a erupções dermatológicas fotossensíveis e podem estar associadas a lesão hepática adicional e/ou hemólise. A porfiria variegata, causada pela mutação autossômica dominante da PPOX, dentro do quadro clínico dessa doença, é incluída a fotossensibilidade cutânea, causada pela produção de espécies reativas de oxigênio pela protoporfirina IX em contato com a luz e oxigênio (revisado por SIMON e KERKES, 2011). Ataques agudos também podem ser incluídos no quadro da doença, eles podem ser induzidos pelo uso de drogas que são metabolizadas pelo P450s. Durante esses ataques, o gene *Alas1* é regulado positivamente, pois o organismo identifica a necessidade de síntese do heme, que é requerido para a atividade dos P450s, agravando o estado da doença pelo acúmulo de intermediários tóxicos. Em pacientes com porfiria variegata, pode ocorrer o aparecimento de autofluorescência vermelha na urina, fezes e sangue, similar a acumulação que ocorre em larvas de *D. melanogaster PPOX<sup>-/-</sup>* (EDEL e MAMET, 2018; KAUPPINEN e MUSTAJOKI, 1992; PHELPS, 2019; SIMON e KERKES, 2011).

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar os efeitos tóxicos do Boral® 500 SC (Sulfentrazone) em *Drosophila melanogaster*.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

Avaliar os efeitos do herbicida Boral® 500 SC na taxa de sobrevivência de *D. melanogaster*.

Analisar os efeitos do herbicida Boral® 500 SC no comportamento locomotor de *D. melanogaster*.

Verificar o acúmulo de intermediários da via de síntese do grupamento heme em *D. melanogaster* expostas ao herbicida.

Estudar os efeitos metabólicos causados em consequência da inibição da enzima Protoporfirinogênio oxidase em *D. melanogaster* expostas ao herbicida Boral® 500 SC.

#### **4. Boral® 500 SC (Sulfentrazone) induz acúmulo de intermediários da síntese do Heme e alterações no comportamento locomotor e marcadores metabólicos em *D. melanogaster***

Os dados referentes a avaliação toxicológica de *Drosophila melanogaster* expostas a formulação comercial Boral® 500 SC (Sulfentrazone), estão apresentados no formato de manuscrito organizado e formatado nas orientações para autores na revista *Ecotoxicology and Environmental Safety* (<https://www.elsevier.com/journals/ecotoxicology-and-environmental-safety/0147-6513/guide-for-authors>), Qualis B1 (F. I. 6.291) na área de CBII (ano 2013-2016).

1 **Boral® 500 SC (Sulfentrazone) induces accumulation of Heme synthesis intermediates**  
2 **and changes in locomotor behavior and metabolic markers in *D. melanogaster***

3 Mateus Cristofari Gayer<sup>a</sup>, Matheus Chimelo Bianchini<sup>b</sup>, Murilo Ricardo Sigal Carriço<sup>a</sup>, Maria  
4 Elizabeth Gomes Paz<sup>a</sup>, Caroline Lacerda Nogueira<sup>c</sup>, Elton Luis Gasparotto Denardin<sup>c</sup>, Robson  
5 Luiz Puntel<sup>b</sup>, Rafael Roehrs<sup>a\*</sup>

6 <sup>a</sup> Laboratório de Análises Químicas Ambientais e Toxicológicas (LAQAT). Universidade  
7 Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, BR 472 - Km 592, CEP 97508-000, Uruguaiana, RS,  
8 Brazil.

9 <sup>b</sup> Grupo de Estudos em Nutrição, Saúde e Qualidade de Vida (GENSQ). Universidade Federal  
10 do Pampa, Campus Uruguaiana, BR 472 Km 592, CEP 97508-000, Uruguaiana, RS, Brazil.

11 <sup>c</sup> Laboratório de Estudos Físico-Químicos e Produtos Naturais (LEFQPN). Universidade  
12 Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, BR 472 Km 592, CEP 97508-000, Uruguaiana, RS,  
13 Brazil.

14 \*Corresponding author: Rafael Roehrs - Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana,  
15 BR 472 - Km 592, Uruguaiana, CEP 97508-000, RS, Brazil. + (55) 55999524367.

16 E-mail address: rafael.roehrs@unipampa.edu.br

17 **1 Introduction**

18 Some insect species play a crucial role in natural pest control, pollination, conservation  
19 of soil structure and fertility, and nutrient cycling (GRUBISIC et al., 2018). These insects play  
20 an important role in agricultural productivity, and the use of herbicides may be among the  
21 factors that contribute to the decrease in populations of these species. This has been called the  
22 “Global Pollination Crisis”, or even the “Ecological Apocalypse”, as the consequences of this  
23 population decline can lead to losses in animal and plant biodiversity (Goulson, 2019; Rhodes,



24 2018). Thus, it is of great importance to produce evidence showing the effects of herbicides on  
25 these non-target organisms to outline non-harmful strategies for weed control in agriculture.

26 Protoporphyrinogen oxidase (PPOX) inhibitor herbicides are described in the literature  
27 for being highly specific in their mode of action and acting at low concentrations (Zagar et al.,  
28 2019). In the case of Sulfentrazone (SULF), a PPOX inhibitor belonging to the class of  
29 aryltriazolinones herbicides, it has a long residual effect due to its high half-life in the soil  
30 (146.5 days) (Martinez et al., 2008). PPOX is an enzyme involved in the synthesis of both  
31 chlorophyll and heme, this synthesis pathway is highly evolutionarily conserved, both in plants  
32 and animals. All these considerations alert to the fact that non-target organisms, such as animal  
33 species, can be contaminated by these herbicides at application sites.

34 Despite the SULF toxicity, few studies seek to assess the effects of the toxicity in animal  
35 models, other than those used for registration in regulatory institutions. However, it has been  
36 shown that SULF can affect neurolocomotor development in rats exposed during the prenatal  
37 period (de Castro et al., 2007). It has also been shown that metabolic changes (glycogen, VLDL,  
38 triglycerides, total proteins) and oxidative stress markers (ROS, TBARS) can be effects related  
39 to exposure to SULF, both in tadpoles (da Silva et al., 2021; Freitas et al., 2017; Wilkens et al.,  
40 2019) and in earthworms (Li et al., 2020).

41 Considering its mechanism of action in plants (inhibition of PPOX), SULF may have as  
42 its main effect the excessive production of reactive oxygen species (ROS), leading to oxidative  
43 stress in organisms exposed to it. The consequence of PPOX inhibition is an accumulation of  
44 intermediates of the porphyrin ring synthesis pathway, more specifically protoporphyrin IX,  
45 which is the product of the reaction, not the substrate. This occurs through the non-enzymatic  
46 conversion of protoporphyrinogen IV to protoporphyrin IX, which in contact with light and  
47 oxygen generates excessive amounts of ROS (Zagar et al., 2019), more specifically singlet  
48 oxygen, responsible for lipid peroxidation and DNA damage (Epe, 1991).

49 *Drosophila melanogaster*, better known as the fruit fly, is a model organism for toxicity  
50 studies in insects. In this species, it has been described that heme is a cofactor for Cytochrome  
51 P450 (CYP) activity and its location/synthesis in tissues is directly linked where there is greater  
52 CYPs activities, such as in the gastrointestinal tract (detoxification) (Chung et al., 2009),  
53 prothoracic gland (hormonal synthesis) (Phelps, 2019) and oenocytes (synthesis of long-chain  
54 fatty acids that make up the insect's cuticle) (Qiu et al., 2012). In *PPO*<sup>-/-</sup> mutant *D. melanogaster*  
55 larvae, the accumulation of intermediates of heme biosynthesis occurs mainly in these tissues  
56 (Phelps, 2019). However, the damage caused by exposure of these intermediates to the presence  
57 of light has not been fully explored. In this sense, the present work aimed to evaluate the toxic  
58 effects in terms of heme synthesis, oxidative stress, and metabolic markers in *Drosophila*  
59 *melanogaster* after acute exposure to the herbicide Boral® 500 SC (Sulfentrazone).

## 60 **2 Materials and Methods**

### 61 **2.1 Chemicals**

62 The commercial formulation of the herbicide Sulfentrazone used was Boral® 500 SC,  
63 a FMC Corporation product composed of Sulfentrazone - 50% m/v with other ingredients -  
64 70% m/v, registered with the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brazil) –  
65 N° 07495).

66 The chemical reagents used 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), L-glutathione  
67 reduced (GSH), bovine serum albumin (BSA), thiobarbituric acid (TBA), aminolevulinic acid  
68 hydrochloride (ALA), blue bromide thiazolyl tetrazolium (MTT), dichlorofluoroscein diacetate  
69 (DCF-DA), *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED), ethylenediaminetetraacetic acid  
70 (EDTA), and quercetin were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other  
71 chemicals used were commercial products of the highest degree of purity available.

### 72 **2.2 *Drosophila melanogaster* stock**

73 *Drosophila melanogaster* wild-type (Harwich strain) was obtained from the National  
74 species Stock Center (Bowling Green, OH, USA). The flies were reared and maintained on  
75 standard cornmeal medium (11.12% m/v coarse cornmeal; 8.9% m/v medium cornmeal; 2.22%  
76 m/v sucrose; 2.22% m/v wheat germ; 0.32% m/v powdered milk; 0.25% m/v brewer's yeast;  
77 0.15% m/v sodium chloride and 0.08% m/v methylparaben) under conditions of constant  
78 temperature ( $23 \pm 1$  °C), with humidity and environmental light/dark cycle until treatment.

### 79 **2.3 In vivo assays**

80 **2.3.1 Experimental Design - Exposure to Boral® 500 SC.** Twenty flies (male only, 0-4 days  
81 old) were exposed to Boral® 500 SC (10, 30, 60, 100, 150 and 300 mg/L of SULF) in the  
82 treatment medium (1% m/v of sucrose, 1% m/v powdered milk, 1% m/v agar and 0.08% m/v  
83 methylparaben) and observed daily for the mortality count. Thus, the survival rate was obtained,  
84 determined by counting the number of dead flies for 7 days, while the survivors were transferred  
85 to freshly prepared media every two days without using ice anesthesia. The experiments were  
86 carried out under conditions of constant temperature ( $23 \pm 1$  °C) and 12 h light/dark cycle. Data  
87 represent the mean of 5 exposure-independent treatments performed over 3 separate weeks ( $n$   
88 = 15). After treatments, data were analyzed and transformed into the percentage of surviving  
89 flies in relation to the total number of flies. Based on the results of this trial, concentrations of  
90 30, 150, and 300 mg/L of SULF were chosen to be used for 4 consecutive days as an exposure  
91 regimen for the Negative Geotaxis assay.

92 **2.3.2 Negative Geotaxis assay.** The locomotor and climbing capacity were evaluated in the  
93 Control and Boral® 500 SC groups (30, 150, and 300 mg/L of SULF). For this, the flies were  
94 evaluated according to a previously described negative geotaxis assay (Sudati et al., 2013). In  
95 summary, 10 flies were randomly counted under brief ice anesthesia and placed in a vertical  
96 glass column (length: 20 cm, diameter: 2 cm/10 flies each). After recovery from cold exposure  
97 (approximately 30 min), flies were lightly tapped at the bottom of the column. Flies that reached

98 the top of the column (14 cm) were counted separately for 15 s. The results represent the average  
99 number of flies on top ( $n_{top}$ ) as a percentage of the total number of flies ( $n_{tot}$ ). Values represent  
100 the mean of five independent sequential repeats for each column. The results were expressed  
101 as the percentage of flies that reach a minimum distance of 14 cm in 15 s from three independent  
102 experiments carried out in three different weeks ( $n = 9$ ). Therefore, data are expressed as % of  
103 flies that reach the top within 15 s. Based on the result of this trial, the 300 mg/L group was  
104 excluded from subsequent tests.

105 **2.3.3 Open field locomotion assay.** Locomotor activity in an open field arena was assessed  
106 according to the method described below (Feany and Bender, 2000). Thus, the flies were briefly  
107 anesthetized on ice and randomly counted. Thus, they were kept in an arena divided into squares  
108 ( $1 \times 1$  cm) 9 cm in diameter, covered by a Petri dish (3 flies per dish). The activity and  
109 movement of the flies were recorded with a video camera after a period of adaptation and  
110 recovery from anesthesia (30 min). Thus, the number of crossed squares (number of crossings)  
111 for each fly in a given time window (60 s) was analyzed later. Values represent the mean of  
112 three independent experiments performed in three separate weeks ( $n = 9$ ).

## 113 **2.4 Ex vivo assays**

114 **2.4.1 Sample preparation for biochemical assays.** After the completion of the behavioral  
115 performance tests, new treatments were carried out with a greater number of flies for the *ex vivo*  
116 tests, for the Control and Boral® 500 SC groups (30 and 150 mg/L of SULF). On the 4<sup>o</sup> day of  
117 treatment, the flies were removed from the treatment bottles and stored at -70 °C for a maximum  
118 of 4 days until use. The head region was carefully separated from the body, keeping the flies at  
119 -70 °C (minimum of 30 min) with subsequent vortexing (repeated twice). Subsequently, the  
120 heads and bodies were counted, weighed, and homogenized separately in microtubes with 250  
121  $\mu$ L of phosphate buffer (TFK) 50 mmol/L (pH 7.5), the homogenate was centrifuged at  $3000 \times$   
122 g for 10 min at 4 °C and the supernatant was used for biochemical assays [10 heads/bodies:

123 CAT and DCF-DA reactive species; 30 heads/bodies: GST; 50 heads/bodies: MTT and SOD;  
124 and 100 heads/bodies: thiobarbituric acid reactive substances (TBARS assay)].

125 For the  $\delta$ -ALA-D assay, flies were anesthetized on ice, counted, and weighed  
126 immediately after the end of treatment, 80 whole flies were homogenized in 210  $\mu$ L of Tris-  
127 HCl 5 mmol/L (pH 8.5) and centrifuged at  $1000 \times g$  for 10 min at 4 °C.

128 For the protoporphyrin IX autofluorescence assay and heme levels, 10 heads/bodies  
129 were used, homogenized in PBS, and centrifuged at  $3000 \times g$  for 10 min at 4 °C. The entire  
130 procedure was performed under the lowest possible lighting conditions.

131 The protein concentration of the homogenates was determined as described above using  
132 BSA as the standard (Bradford, 1976). All biochemical assays were performed with  $n = 6$ , using  
133 flies from 3 independent flasks, with two replications.

#### 134 **2.4.2 Determination of protoporphyrin IX autofluorescence levels and total heme levels.**

135 The determination of relative protoporphyrin IX autofluorescence and total heme levels (heme  
136 protein plus free heme) was performed as described above using a large amount of oxalic acid  
137 and heat to remove the iron ion from the heme group, resulting in a protoporphyrin IX ring  
138 fluorescent (Phelps, 2019). For this, 50  $\mu$ L of the sample were added to a tube containing 1000  
139  $\mu$ L of 2 mol/L oxalic acid. The contents of the tube were divided in half, one tube was used as  
140 a control (no heating, kept at 37 °C for 30 min.) and the other was used as an experimental (with  
141 heating) which was immediately incubated at 95 °C for 30 min. Afterward, 200  $\mu$ L of each tube  
142 (with and without heating) were pipetted into a microplate (two wells for each tube). The  
143 autofluorescence intensity was measured in a microplate reader (SpectraMax M5™, Molecular  
144 Device), with excitation at 400 nm and emission was read at 662 nm. Protoporphyrin IX  
145 autofluorescence levels were determined by readings of control samples (no heating) and heme

146 levels were determined by calculation: with heating – without heating = Result. Results were  
147 expressed as % of the control mean after correction for total protein content.

148 **2.4.3 Determination of  $\delta$ -aminolevulinatase ( $\delta$ -ALA-D) activity.** The  $\delta$ -ALA-D  
149 activity was determined as previously described (Sassa, 1982) by measuring the rate of  
150 porphobilinogen (PBG) production. The assay reaction mixture was 25  $\mu$ L of the sample with  
151 10  $\mu$ L of TFK 500 mmol/L (pH 8.5), in two separate tubes, one of which had 8  $\mu$ L of ALA  
152 31.25 mmol/L (8  $\mu$ L of water in the second tube), with subsequent incubation at 37 °C for 3 h  
153 and centrifugation at  $3000 \times g$  for 10 min at 4 °C. The reaction product was determined at 555  
154 nm using 100  $\mu$ L of Erlich reagent and 25  $\mu$ L of H<sub>2</sub>O, with a final addition of 75  $\mu$ L of the  
155 incubated and centrifuged sample. The calculation of enzyme activity was performed as  
156 follows: tube with ALA – tube without ALA = Result. The results were corrected for total  
157 protein content and expressed as % of the control mean.

158 **2.4.4 Determination of levels of dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) reactive species.**  
159 The levels of DCF-DA reactive species were determined as a ratio of ROS production,  
160 according to a method previously described (Park et al., 2012). Briefly, 20  $\mu$ L of the sample  
161 was used, with 160  $\mu$ L of distilled H<sub>2</sub>O and 20  $\mu$ L of 1 mmol/L DCF-DA to trigger the reaction.  
162 The fluorescence emissions of DCF resulting from the oxidation of DCF-DA were monitored  
163 for 60 min, with excitation at 485 nm and emission at 530 nm. The resulting fluorescence  
164 measure was expressed as % relative to the control mean.

165 **2.4.5 Determination of levels of thiobarbituric acid reactive species (TBARS).** The TBARS  
166 levels as an indicator for damage produced by oxidative stress were determined as previously  
167 described (Ohkawa et al., 1979) with some modifications (Bianchini et al., 2019). In summary,  
168 100  $\mu$ L of the sample were incubated for 1 h in a water bath at 37 °C. Then, the samples were  
169 incubated at 95 °C for 120 min with the addition of 100  $\mu$ L of acetic acid buffer (pH 3.7) and  
170 100  $\mu$ L of 0.6% TBA (m/v, pH 4.0). After the boiling step, 20  $\mu$ L of 8.1% SDS (w/v) was added

171 and centrifuged at  $3000 \times g$  for 15 min at 4 °C. The reaction product was determined at 532 nm  
172 and the results were expressed as % of the control mean after correction for total protein content.

173 **2.4.6 Determination of MTT reduction.** The MTT reduction was determined as described  
174 previously (Babot et al., 2005). The assay reaction mix was 50  $\mu$ L of the sample with 150  $\mu$ L  
175 of 50 mmol/L TFK Saline (pH 7.5) and 20  $\mu$ L of 1 mg/mL MTT (in ethanol). This mixture was  
176 incubated at 37°C for 30 min. Then 200  $\mu$ L of DMSO was added and the mixture was incubated  
177 again for 30 min. Finally, 200  $\mu$ L of 8.1% SDS (w/v) was added, and the resulting supernatant  
178 was centrifuged at  $3000 \times g$  for 20 min. The resulting formazan was measured at 570 and 630  
179 nm. The MTT reduction was calculated as  $545 \text{ nm} - 630 \text{ nm} = \text{Result}$ . Values were standardized  
180 by total protein content and expressed as % to the control mean.

181 **2.4.7 Determination of glutathione-S-transferase (GST) activity.** The GST activity was  
182 evaluated according to the procedure described by Habig and Jakoby (1981), using CDNB as  
183 substrate. The assay reaction mix was 20  $\mu$ L of the sample with 60  $\mu$ L of 100 mmol/L TFK (pH  
184 7.5). The reaction was started with the addition of 20  $\mu$ L of 10 mmol/L GSH and subsequent  
185 rapid addition of 20  $\mu$ L of 10 mmol/L CDNB (in ethanol). The reaction was monitored for 3  
186 min (15 s intervals) at 340 nm. GST activity was standardized by total protein level and  
187 expressed as % of the control mean.

188 **2.4.8 Determination of superoxide dismutase (SOD) activity.** The SOD activity was  
189 determined according to a previously published method (Kostyuk and Potapovich, 1989). The  
190 reaction medium contained 40  $\mu$ L of sample and 200  $\mu$ L of 20 mmol/L TFK (pH 7.4, containing  
191 0.08 mmol/L EDTA and 1.25  $\mu$ L/mL of TEMED). To trigger the reaction, 10  $\mu$ L of quercetin  
192 0.15 mg/mL (in DMSO) were pipetted. The reaction was analyzed at time 0 and after 20 min  
193 under laboratory conditions, being monitored at 406 nm. SOD activity was standardized by  
194 total protein level and expressed as % of the control mean.

195 **2.4.9 Determination of catalase (CAT) activity.** CAT activity was measured as previously  
196 described (Aebi, 1984). Briefly, the reaction medium contained 160  $\mu\text{L}$  of TFK 50 mmol/L (pH  
197 7.5), 20  $\mu\text{L}$  of 1 mol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ , and 20  $\mu\text{L}$  of the sample. The reaction was analyzed for 2 min (15  
198 s intervals) at 240 nm. Results were expressed as % of the control mean after correction for  
199 total protein content.

## 200 **2.5 Statistical analysis**

201 For all assays, the values obtained in each group were compared using *one-way*  
202 ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparisons post-test. Differences between groups  
203 were considered significant when  $P < 0.05$  (\*). *In vivo* and *ex vivo* results were expressed as  $\pm$   
204 S.E.M. To perform the statistical analysis and construction of graphs, GraphPad Prism 5.0 was  
205 used.

## 206 **3 Results and Discussion**

207 In this work, we demonstrate that the exposure of *D. melanogaster* to Boral® 500 SC  
208 (SULF), can decrease survival in a dose- and time-dependent manner. Also, we found a  
209 decrease in the locomotor capacity of the treated flies compared to the control. Overall, our  
210 study demonstrated a decrease in weight and an increase in total protein levels in flies exposed  
211 to the herbicide. Exposure to Boral® 500 SC also caused an accumulation of protoporphyrin  
212 IX, an increase in total heme and an increase in the level of lipid peroxidation. There was also  
213 an increase in the activity of  $\delta$ -ALA-D, SOD, GST enzymes and MTT reduction.

### 214 **3.1 Sulfentrazone-induced dose-dependent mortality**

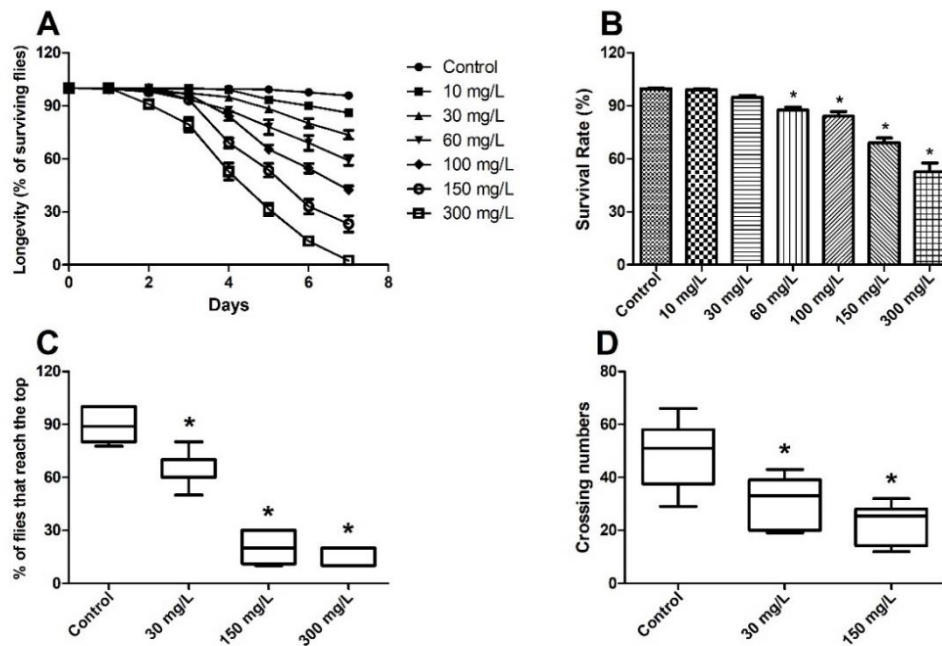
215 In the literature, there were no studies that seek to assess the toxicity of the herbicide  
216 SULF on insects. The herbicide was considered “practically non-toxic” for the species *Apis*  
217 *mellifera* (Honeybee) by the US EPA (Sinclair et al., 2014), being the only record of herbicide  
218 toxicity in an insect species (unpublished study). As for aquatic invertebrates, the agency



219 considers that the reference concentration for acute toxicity is 30.2 mg/L and 0.2 mg/L for  
220 chronic toxicity ([Aquatic Life Benchmarks](#)). As it is the only reference value available for acute  
221 toxicity in invertebrates, we decided to use this concentration (30 mg/L) as the basis for the  
222 development of our study.

223         Initially, we evaluated the survival of the flies at increasing concentrations of Boral®  
224 500 SC (SULF) (Fig. 1A). Statistical analysis of the survival rate revealed a dose-dependent  
225 behavior in the concentrations of the active ingredient (10-300 mg/L). At the end of the  
226 experiment (7<sup>o</sup> day), only  $2.1 \pm 0.8\%$  of the flies in the highest concentration treated group were  
227 alive, while  $95.7 \pm 1.4\%$  of the flies in the untreated group remained alive (Fig. 1A). The  
228 Median Lethal Concentration (LC50), calculated based on mortality at the end of the  
229 experiment (7<sup>o</sup> day, Fig. 1A), revealed that the concentration leading to 50% mortality of flies  
230 was 76.1 mg/L ( $R^2 = 0.924$ , data not shown). In addition, all groups, except the one exposed to  
231 a concentration of 10 mg/L, showed a significant difference from the control.

232         When analyzing the survival of the groups on the 4<sup>o</sup> day of exposure to Boral® 500 SC  
233 (Fig. 1B), it was observed that there was a significant difference for concentrations between 60-  
234 300 mg/L to the control. Thus, on the 4<sup>o</sup> day, exposure to Boral® 500 SC decreased the fly  
235 survival to 87.5, 84.1, 69.0, and 52.8% for the groups of the following concentrations 60, 100,  
236 150, and 300 mg/L, respectively. Based on survival on the 4<sup>o</sup> day of treatment, the concentration  
237 of 30 mg/L was chosen for subsequent trials as it was the highest concentration tested that did  
238 not induce significant mortality compared to the control (sublethal concentration). We also  
239 chose to use the concentration of 150 and 300 mg/L because the flies exposed to these  
240 concentrations had intermediate mortality ( $31.0 \pm 2.7\%$ ) and close to 50% ( $47.2 \pm 4.8\%$ ),  
241 respectively, in the 4 days of exposure.



242

243 **Fig. 1.** Survival Rate and Locomotor Behavior in *Drosophila melanogaster* exposed to a commercial formulation  
 244 of Boral® 500 SC (SULF). (A) Longevity of *D. melanogaster* exposed to Boral® 500 SC (10-300 mg/L for 7  
 245 days), and (B) survival rate of *D. melanogaster* exposed to Boral® 500 SC on the 4<sup>o</sup> day, represent the sum of 5  
 246 independent experiments, performed 3 times ( $n = 15$ , 300 flies per group). (C) Negative Geotaxis Assay (30-300  
 247 mg/L), the total number of flies (90 per group) represents the sum of 3 independent experiments performed 3 times  
 248 ( $n = 9$ ). (D) Open Field Assay (30-150 mg/L), the total number of flies (27 per group) represents the sum of 3  
 249 independent experiments performed 3 times ( $n = 9$ ). \*Significant difference compared to the control group by  
 250 Tukey's multiple comparisons test ( $P < 0.05$ ). Values expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

### 251 3.2 Locomotor behavior altered by Boral® 500 SC (Sulfentrazone)

252 The effects of exposure to the herbicide Boral® 500 SC (30, 150, and 300 mg/L of  
 253 SULF) on the locomotor behavior of *D. melanogaster* were analyzed by the negative geotaxis  
 254 assay (Fig. 1C). In this trial, the percentage of flies that reached the top was significantly lower  
 255 for the groups exposed to the herbicide ( $62.1 \pm 1.3\%$ ,  $19.7 \pm 1.3\%$ , and  $15.3 \pm 0.8\%$  at  
 256 concentrations of 30, 150, and 300 mg/L, respectively). Between 150 and 300 mg/L groups,  
 257 there was no significant difference. Therefore, the exposure of fruit flies at a concentration of  
 258 300 mg/L was excluded from further tests because it generated greater mortality and did not  
 259 induce greater locomotor damage when compared to the group exposed to a concentration of  
 260 150 mg/L (Fig. 1C).

261 The data obtained in the open field assay, referring to the exploratory locomotor  
262 capacity, showed that there was a reduction in the number of crossings performed by the treated  
263 flies at both concentrations of 30 and 150 mg/L (Fig. 1D). On average, flies exposed at these  
264 concentrations had a  $34.2 \pm 2.7\%$  and  $52.2 \pm 1.9\%$  reduction in numbers of crossed squares  
265 compared to the control. Therefore, there were changes in locomotor behavior in adult *D.*  
266 *melanogaster* exposed to the herbicide Boral® 500 SC, even in a sublethal concentration. The  
267 delay in neurolocomotor development in rats exposed to SULF in the prenatal period has been  
268 previously demonstrated (de Castro et al., 2007), but the mechanisms involved have not been  
269 presented.

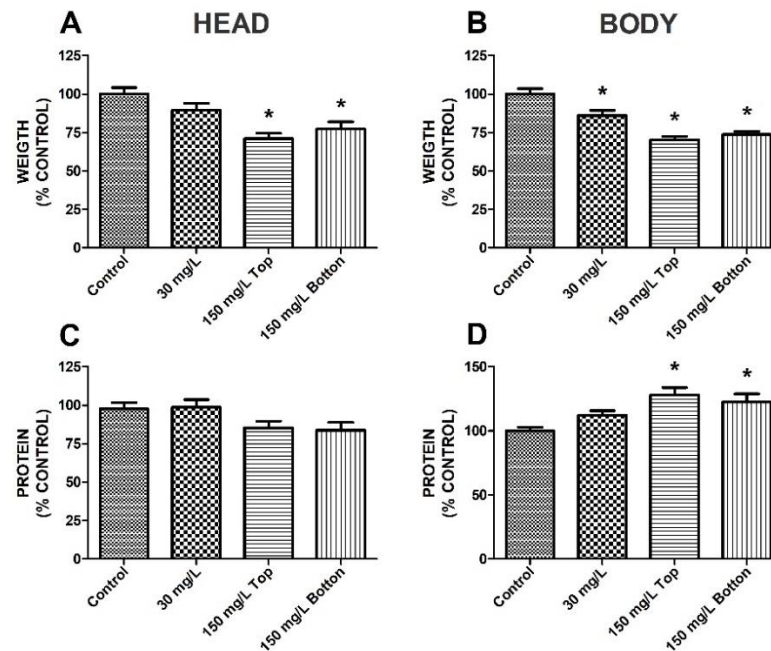
270 After the end of the behavioral tests, we chose to divide the group of *D. melanogaster*  
271 exposed to a concentration of 150 mg/L between the flies that could reach the top of the  
272 treatment tube (150 mg/L Top) and those that remained in the lower part (150 mg/L Botton).  
273 Due to the distinct locomotor capacity among these groups of fruit flies exposed to the same  
274 concentration of SULF, we carried out tests to show which metabolic and biochemical  
275 parameters could be causing this resistance to the herbicide.

### 276 **3.3 Changes in energy demand mediated by Boral® 500 SC (Sulfentrazone)**

277 The dose and time-dependent mortality and reduced locomotor capacity led us to some  
278 hypotheses that would be behind these effects. These hypotheses were based on the increased  
279 energy demand in the metabolism of *D. melanogaster*, due to the metabolic consequences that  
280 occurred after exposure to the herbicide.

281 **3.3.1 Weight and Total Proteins:** In previously published results, sublethal concentrations of  
282 SULF had no significant effect on tadpole weight (da Silva et al., 2021; Freitas et al., 2017;  
283 Wilkens et al., 2019). In contrast to our results, exposure to Boral® 500 SC was able to  
284 significantly decrease the head weight of flies exposed to the concentration of 150 mg/L (Fig.

285 2A). And the results related to the body (Fig. 2B) showed a decrease in weight even at the  
 286 sublethal concentration of 30 mg/L and an increase in the amount of total protein in the body  
 287 (Fig. 2D). This may be due to the decrease in the stock of energy reserves from macromolecules,  
 288 such as glycogen (da Silva et al., 2021) since during the detoxification processes and response  
 289 to oxidative stress, there is a high demand for these highly energetic compounds, which is  
 290 required by the body. Within this, there is a need to increase protein synthesis, so that the body  
 291 can deal with the toxicity caused by Boral® 500 SC, requiring special energy attention for this  
 292 purpose (Riahi et al., 2019).

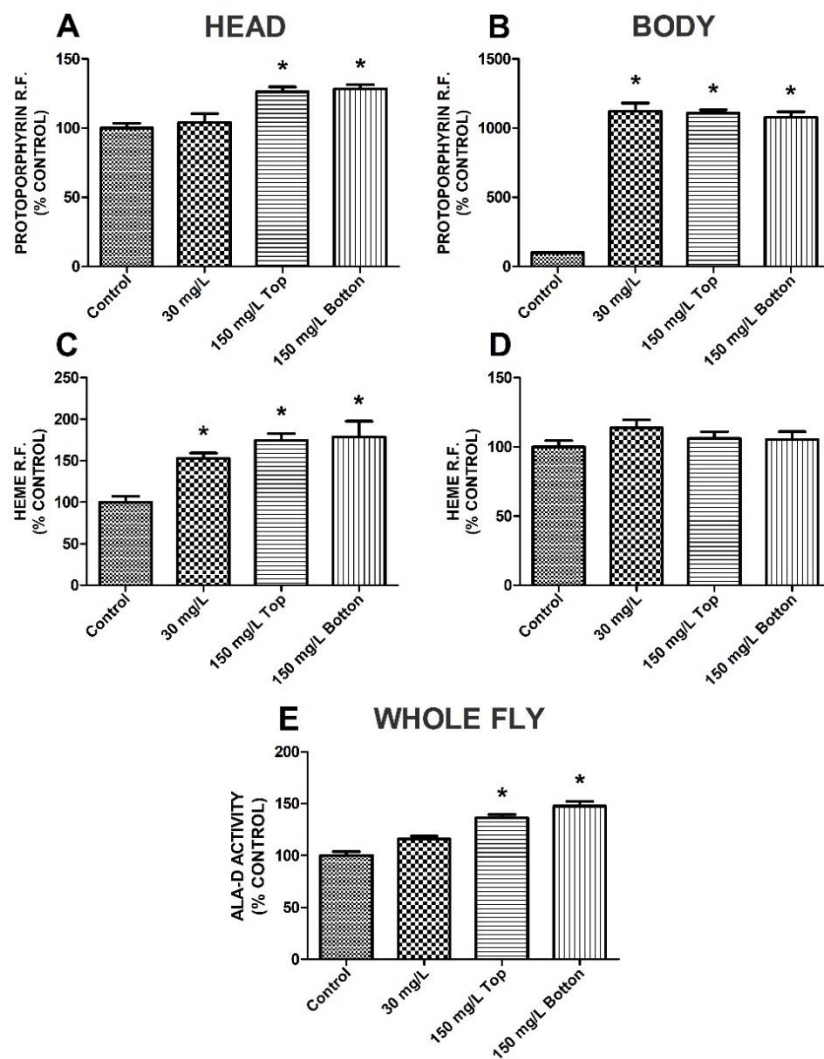


293

294 **Fig. 2.** Metabolic Parameters in *Drosophila melanogaster* exposed to Boral® 500 SC (SULF). (A) Head weight  
 295 and (B) Body weight. (C) Total proteins in the head and (D) Total proteins in the body. \*Significant difference  
 296 compared to the control group by Tukey's multiple comparisons test ( $P < 0.05$ ). Values expressed as mean  $\pm$  S.E.M  
 297 ( $n = 12$ ).

298 **3.3.2 Heme biosynthesis:** The results demonstrated that the accumulation of protoporphyrin IX  
 299 is significantly greater in the body (Fig. 3B) of *D. melanogaster* exposed to Boral® 500 SC,  
 300 than in the head region (Fig. 3A). This could be happening for the maintenance of cellular  
 301 homeostasis. It is already known that heme self-regulates by increasing the expression of the  
 302 gene that encodes the first enzyme in its biosynthesis pathway, ALAS1 (present in vertebrates

303 and invertebrates), and thus promotes the accumulation of protoporphyrin IX (Ogawa, et al.  
 304 2001). In addition, this regulation can also lead to the induction of other enzymes of the route  
 305 (Phelps, 2019), such as PBGS ( $\delta$ -ALA-D in mammals), which, in our results, had its activity  
 306 increased in flies exposed to Boral® 500 SC (Fig. 3E). For the first step of heme biosynthesis,  
 307 catalyzed by ALAS1, the use of succinyl-CoA is required, which is an important intermediate  
 308 in the citric acid cycle. It is not completely clear when succinyl-CoA will be prioritized for  
 309 energy purposes or when it will be diverted to heme biosynthesis (Burch et al., 2018). However,  
 310 we can assume that large amounts of this intermediate may have been diverted from the citric  
 311 acid cycle, for the accumulation of protoporphyrin IX visualized in Fig. 3A and 3B.



312

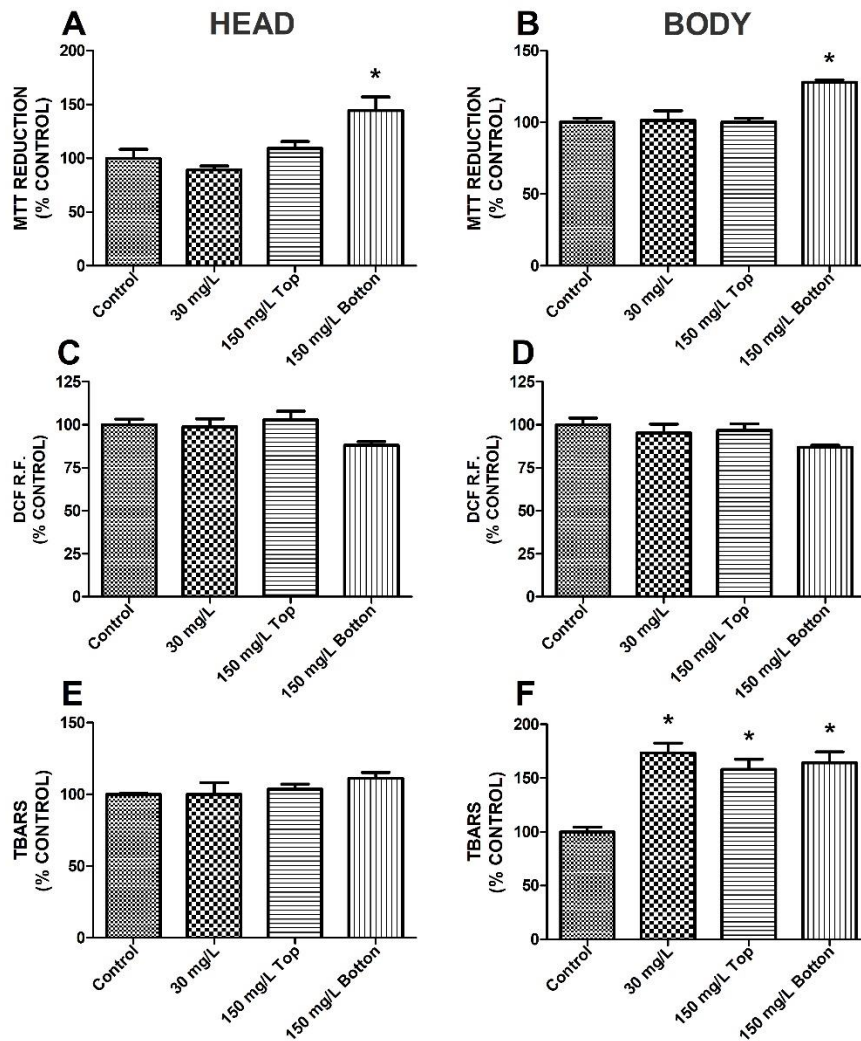
313 **Fig. 3.** Heme Biosynthesis Pathway parameters in *Drosophila melanogaster* exposed to Boral® 500 SC (SULF).  
 314 (A) Protoporphyrin IX autofluorescence relative levels in the head. (B) Protoporphyrin IX autofluorescence

315 relative levels in the body. (C) Heme relative levels in the head. (D) Heme relative levels in the body. (E)  $\delta$ -ALA-  
316 D activity in the whole fly. \*Significant difference compared to the control group by Tukey's multiple comparisons  
317 test ( $P < 0.05$ ). Values expressed as mean  $\pm$  S.E.M ( $n = 6$ ). R.F. – Relative Fluorescence.

318           Initially, it would be possible to assume that with the inhibition of the PPOX enzyme,  
319 caused by the mechanism of action of SULF, a reduction in heme levels could occur. But, in  
320 our results, total heme levels remained at the level of the control group in the body of flies (Fig.  
321 3D) and increased in the head (Fig. 3C) of flies exposed to Boral® 500 SC at both  
322 concentrations. This is because protoporphyrinogen is accumulated due to inhibition of the  
323 PPOX enzyme, through the mechanism of action of SULF, and undergoes autooxidation to  
324 protoporphyrin IX. This initially occurs in the mitochondria (site of synthesis), but later diffuses  
325 to other sites in the cell (Lehnen Jr et al., 1990). Thus, it is possible to assume that  
326 protoporphyrin IX, even with PPOX inhibition, could be formed in the mitochondria, and will  
327 be available to be used by Ferrochelatase to produce heme. Thus, the fact that heme levels are  
328 increased in the head (Fig. 3C) can be correlated with the increased need for this molecule for  
329 hemoenzyme activity. This can include CYPs, being involved in the detoxification of  
330 xenobiotics, since CYPs with this function can also be expressed in the head region of *D.*  
331 *melanogaster* (Chung et al., 2009), but also the electron transport chain (Kim et al., 2012), as  
332 heme participates in electron transfer and can serve as evidence to demonstrate the activation  
333 of the electron transport chain to supply the energy demand required in fruit flies exposed to  
334 the herbicide Boral® 500 SC.

335 **3.3.3 MTT reduction:** The results of the MTT reduction assay (Fig. 4A and B) demonstrated  
336 that flies exposed at the concentration of 150 mg/L, which remained at the bottom (150 mg/L  
337 Bottom), had a greater ability to reduce MTT. This result may demonstrate an increase in the  
338 activity of mitochondrial dehydrogenases, as MTT is reduced by the activity of dehydrogenases,  
339 mainly from mitochondria (Caughlan et al., 2004). Thus, this result can be correlated with  
340 possible evidence of the acceleration of electron transfer due to the increased activity of

341 dehydrogenase enzymes. This acceleration may be occurring in conjunction with the increase  
 342 in oxygen consumption and NADH oxidation, to produce ATP (Maioli et al., 2009). On the  
 343 other hand, the MTT reduction assay can also indicate the conservation of cell viability (Wang,  
 344 2011), even during a situation of toxicity, as in exposure to Boral® 500 SC.



345

346 **Fig. 4.** Oxidative Stress Markers in *Drosophila melanogaster* exposed to Boral® 500 SC (SULF). (A) MTT  
 347 reduction in the head. (B) MTT reduction in the body. (C) DCF-DA reactive species in the head. (D) DCF-DA  
 348 reactive species in the body. (E) TBARS levels in the head. (F) TBARS levels in the body. \*Significant difference  
 349 compared to the control group by Tukey's multiple comparisons test ( $P < 0.05$ ). Values expressed as mean  $\pm$  S.E.M  
 350 ( $n = 6$ ). R.F. – Relative Fluorescence.

351 **3.3.4 Oxidative stress:** It is well described in the literature that protoporphyrin IX is  
 352 photodynamic, and due to its accumulation, high amounts of singlet oxygen and superoxide  
 353 anion are generated when light is radiated onto this molecule (Cox and Whitten, 1982; Yanagida

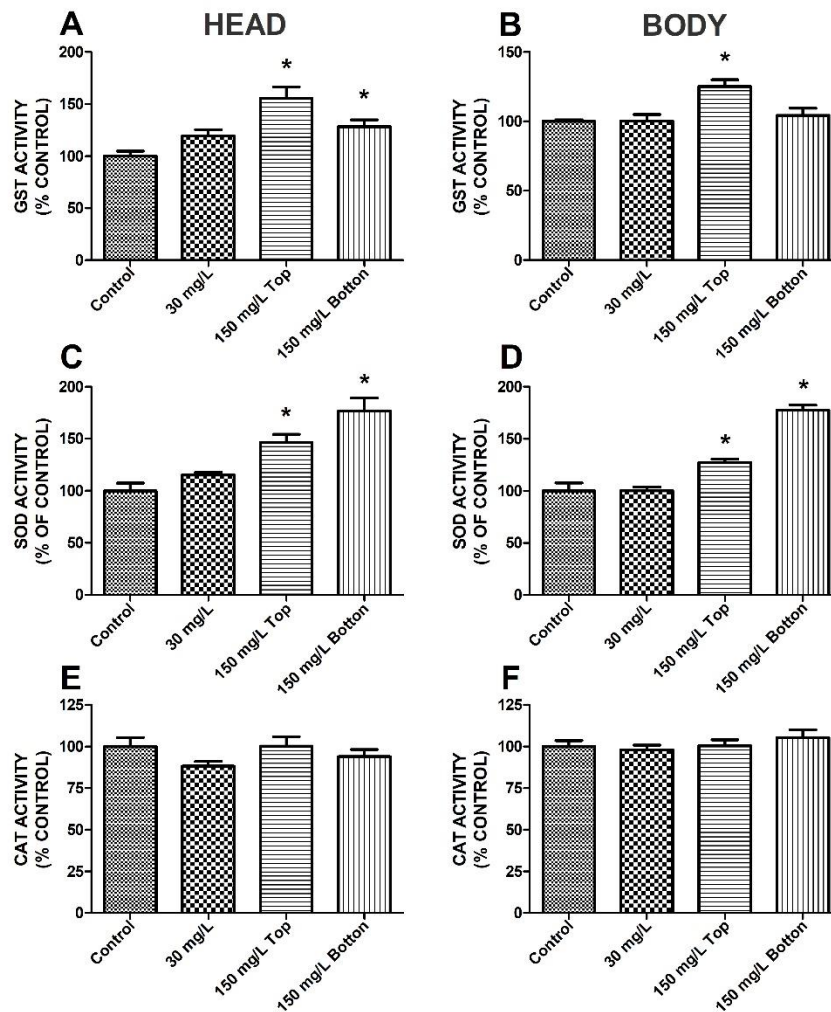
354 et al., 2000). Therefore, both the light intensity and the direct or indirect incidence of light can  
355 affect the toxicity of the herbicide. This is due to the incidence of wavelengths that are more  
356 absorbed by the protoporphyrin IX molecule, generating greater amounts of ROS. Thus, it is  
357 evident that the generation of ROS in fruit flies exposed to Boral® 500 SC and subsequent  
358 damage caused by oxidative stress is attributed to this molecule and its photodynamic property.  
359 Data from fruit flies exposed to Boral® 500 SC at both concentrations (30 and 150 mg/L of  
360 SULF) showed no change in relative fluorescence in the DCF-DA reactive species assay, both  
361 in the head (Fig. 4C) and in the body (Fig. .4D). This can be explained by the fact that, during  
362 the entire assay performance, the samples were not exposed to light, as DCF-DA can easily  
363 undergo photochemical oxidation (Setsukinai et al., 2003), which could be mistakenly confused  
364 with the capacity of the sample generate DCF. Furthermore, we believe that significant amounts  
365 of ROS were generated by protoporphyrin IX, but were not able to be detected during the assay,  
366 because they have an extremely low half-life in aerobic organisms (Pryor, 1986).

367         However, in our study, the effect of oxidative stress was seen by the increase in  
368 thiobarbituric acid reactive species (TBARS assay), which occurred in the body of flies exposed  
369 to the two concentrations of SULF (Fig. 4F), but not in the head (Fig. 4E). The increased levels  
370 of TBARS show us the occurrence of oxidative damage, even in flies exposed to sublethal  
371 concentration of the herbicide. Within the response to oxidizing agents, the increase in  
372 antioxidant defenses (enzymatic and non-enzymatic) and repair of damage caused by reactive  
373 species are key factors for the organism's survival. These actions require special energy  
374 expenditure so that cells can alleviate the stressful situation, and this can be extremely  
375 exhausting for the body (Gusarov et al., 2017; Riahi et al., 2019).

376 **3.3.5 Antioxidant Enzymes:** In studies where animals were exposed to SULF, increased activity  
377 of the antioxidant enzymes CAT and GST in tadpoles has already been shown (Freitas et al.,  
378 2017; Wilkens et al., 2019), in addition to SOD and peroxidase in earthworms (Li et al., 2017;



379 al., 2020). Our results showed that in *D. melanogaster* there was a significant increase in the  
380 activity of the GST enzyme in the head (Fig. 5A) at a concentration of 150 mg/L. However, in  
381 the body (Fig. 5B), there was an increase in GST only in flies that could reach the top (150  
382 mg/L Top). During SULF poisoning, the GST enzyme family seems to play a key role in  
383 animals exposed to the herbicide. However, we suggest that these enzymes are mainly involved  
384 in the detoxification of lipid hydroperoxides (e.g., 4-hydroxynonenal), which are products of  
385 lipid peroxidation (Singh et al., 2001), and not in the conjugation of SULF itself with GSH.  
386 Because, in the study of the detoxification of the herbicide in animals, it has already been shown  
387 that SULF is mostly excreted in the unconjugated form [3-hydroxymethyl sulfentrazone (88-  
388 95%) and its carboxylic acid derivative (0.3-5%)] in the urine and feces of rat and goat, and in  
389 hen excreta (Leung et al., 1991). However, this comparison is limited, since to date, no studies  
390 have been conducted that aim to elucidate the route of the herbicide detoxification in insects.



391

392 **Fig. 5.** The Antioxidant Enzymes Activity from *Drosophila melanogaster* exposed to Boral® 500 SC (SULF). (A)  
 393 GST activity in the head. (B) GST activity in the body. (C) SOD activity in the head. (D) SOD activity in the body.  
 394 (E) CAT activity in the head. (F) CAT activity in the body. \*Significant difference compared to the control group  
 395 by Tukey's multiple comparisons test ( $P < 0.05$ ). Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 6$ ).

396

Since the incidence of light on the accumulated protoporphyrin IX generates high  
 397 amounts of singlet oxygen and superoxide anion, the SOD enzyme is the first line of defense  
 398 against superoxide anions, playing a fundamental role in the antioxidant function. This enzyme  
 399 catalyzes the conversion of superoxide anions to hydrogen peroxide. This mechanism was  
 400 observed in our results, as there was a significant increase in the activity of the SOD enzyme  
 401 both in the head (Fig. 5C) and in the body (Fig. 5D) of the flies exposed to the concentration of  
 402 150 mg/L (Top and Bottom) of the herbicide Boral® 500 SC to control. Also, there was a  
 403 significant difference in the results of SOD enzyme activity in the body of *D. melanogaster* that  
 404 could reach the top (150 mg/L Top) and those that remained at the bottom (150 mg/L Bottom).

405 It has been shown that enzyme activity increases a few hours after administration of  
406 protoporphyrin IX in rats (Afonso et al., 1999) and increases from the 7<sup>o</sup> day on in earthworms  
407 exposed to SULF (Li et al., 2020). Thus, the hydrogen peroxide generated in the SOD reaction  
408 will have to be metabolized, and this reaction is mainly catalyzed by two enzymes, CAT and  
409 glutathione peroxidase. However, in our results, the CAT enzyme was not significantly  
410 different from the control group, both in the head (Fig. 5E) and in the body (Fig. 5F). Despite  
411 this, it is believed that the enzyme is involved in the decomposition of hydrogen peroxide in *D.*  
412 *melanogaster* exposed to Boral® 500 SC but is being inhibited and/or limited by the action of  
413 the herbicide. This is because, during the catalytic activity of the CAT enzyme, the so-called  
414 Compound II is formed, which is the inactive state of the enzyme and spontaneously reverses  
415 slowly. Thus, during exposure to hydrogen peroxide that is generated at a constant rate, CAT  
416 can reach a steady state in which a certain part of the total enzyme is inactive by the action of  
417 its substrate (Kirkman and Gaetani, 2007). On the other hand, with the limitation of heme  
418 synthesis in the body, it may not be possible to increase the production of viable CAT for the  
419 detoxification of hydrogen peroxide, which is constantly produced. This is because the gene  
420 encoding the enzyme may be being induced and new enzymes may be being synthesized but  
421 without the introduction of heme into the active center, which is responsible for the activity of  
422 the CAT enzyme (Mancini and Imlay, 2015).

#### 423 **4. Conclusion**

424 This work demonstrated that the exposure of *D. melanogaster* to the commercial  
425 formulation Boral® 500 SC, was considered toxic due to a decrease in survival in a dose and  
426 time-dependent manner, as well as to a decrease in the locomotor capacity of fruit flies.  
427 Furthermore, the effects generated in exposed fruit flies may come from the accumulation of  
428 protoporphyrin IX which, in the presence of light, is responsible for the action of the herbicide.  
429 The SOD enzyme seemed to play a fundamental role in combating the generation of ROS, and

430 the GST enzyme in the detoxification of lipid peroxidation products. GST being the likely  
431 candidate for greater resistance to locomotor damage caused by the herbicide. In this sense, our  
432 work may direct future studies to describe in more detail the mechanisms involved in  
433 intraspecific variation in response to herbicide Boral® 500 SC toxicity in *Drosophila*  
434 *melanogaster* species.

#### 435 **CRedit authorship contribution statement**

436 **Mateus Cristofari Gayer:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis,  
437 Investigation, Methodology, Writing – original draft & editing. **Matheus Chimelo Bianchini:**  
438 Formal analysis, Investigation, Methodology. **Murilo Ricardo Sigal Carriço:** Formal analysis,  
439 Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **Maria Elizabeth Gomes Paz:**  
440 Investigation, Methodology. **Caroline Lacerda Nogueira:** Investigation, Methodology. **Elton**  
441 **Luis Gasparotto Denardin:** Supervision, Writing – review. **Robson Luiz Puntel:** Supervision,  
442 Writing – review. **Rafael Roehrs:** Conceptualization, Supervision, Writing – review & editing.

#### 443 **Declaration of Competing Interest**

444 The authors declare that they have no known competing financial interests or personal  
445 relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### 446 **Acknowledgements**

447 This work was supported and funded by Federal University of Pampa (UNIPAMPA)  
448 and financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -  
449 Brazil (CAPES).

#### 450 **References**

451 [Aebi, H., 1984. \[13\] Catalase in vitro. \*Methods Enzymol.\*, 105, 121-126.](#)

452 [Afonso, S., Vanore, G., Batlle, A., 1999. Protoporphyrin IX and oxidative stress. \*Free Radic.\*  
453 \*Res.\*, 31\(3\), 161-170.](#)

- 454 [Babot, Z., Cristòfol, R., Suñol, C., 2005. Excitotoxic death induced by released glutamate in](#)  
455 [depolarized primary cultures of mouse cerebellar granule cells is dependent on GABAA](#)  
456 [receptors and niflumic acid-sensitive chloride channels. Eur. J. Neurosci., 21\(1\), 103-112.](#)
- 457 [Bianchini, M.C., Gularte, C.O.A., Nogara, P.A., Krum, B.N., Gayer, M.C., Bridi, J.C., Roos,](#)  
458 [D.H., Roehrs, R., Fachinetto, R., Pinton, S., Ávila, D.S., Hirth, F., Rocha, J.B.T., Puntel,](#)  
459 [RL., 2019. Thimerosal inhibits \*Drosophila melanogaster\* tyrosine hydroxylase \(Dm TyrH\)](#)  
460 [leading to changes in dopamine levels and impaired motor behavior: implications for](#)  
461 [neurotoxicity. Metallomics, 11\(2\), 362-374.](#)
- 462 [Bilen, J., Bonini, N.M., 2005. Drosophila as a model for human neurodegenerative disease.](#)  
463 [Annu. Rev. Genet., 39, 153-171.](#)
- 464 [Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram](#)  
465 [quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72\(1-2\),](#)  
466 [248-254.](#)
- 467 [Burch, J.S., Marcero, J.R., Maschek, J.A., Cox, J.E., Jackson, L.K., Medlock, A.E., Phillips,](#)  
468 [J.D., Dailey Jr, H.A., 2018. Glutamine via  \$\alpha\$ -ketoglutarate dehydrogenase provides succinyl-](#)  
469 [CoA for heme synthesis during erythropoiesis. Blood, 132\(10\), 987-998.](#)
- 470 [Caughlan, A., Newhouse, K., Namgung, U.K., Xia, Z., 2004. Chlorpyrifos induces apoptosis](#)  
471 [in rat cortical neurons that is regulated by a balance between p38 and ERK/JNK MAP](#)  
472 [kinases. Toxicol. Sci., 78\(1\), 125-134.](#)
- 473 [Chung, H., Sztal, T., Pasricha, S., Sridhar, M., Batterham, P., Daborn, P.J., 2009.](#)  
474 [Characterization of \*Drosophila melanogaster\* cytochrome P450 genes. PNAS, 106\(14\), 5731-](#)  
475 [5736.](#)
- 476 [Cox, G.S., Whitten, D.G., 1982. Mechanisms for the photooxidation of protoporphyrin IX in](#)  
477 [solution. J. Am. Chem. Soc., 104\(2\), 516-521.](#)
- 478 [da Silva, P.R., Borges-Martins, M., Oliveira, G.T., 2021. \*Melanophryniscus admirabilis\*](#)  
479 [tadpoles' responses to sulfentrazone and glyphosate-based herbicides: An approach on](#)  
480 [metabolism and antioxidant defenses. Environ. Sci. Pollut. Res., 28\(4\), 4156-4172.](#)
- 481 [de Castro, V.L., Destefani, C.R., Diniz, C., Poli, P., 2007. Evaluation of neurodevelopmental](#)  
482 [effects on rats exposed prenatally to sulfentrazone. Neurotoxicology, 28\(6\), 1249-1259.](#)

- 483 [Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid](#)  
484 [colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. \*Biochem. Pharmacol.\*, 7\(2\), 88-95.](#)
- 485 [Epe, B., 1991. Genotoxicity of singlet oxygen. \*Chem.-Biol. Interact.\*, 80\(3\), 239-260.](#)
- 486 [Feany, M.B., Bender, W.W., 2000. A \*Drosophila\* model of Parkinson's disease. \*Nature\*,](#)  
487 [404\(6776\), 394-398.](#)
- 488 [Freitas, J.S., Teresa, F.B., de Almeida, E.A., 2017. Influence of temperature on the](#)  
489 [antioxidant responses and lipid peroxidation of two species of tadpoles \(\*Rhinella schneideri\*](#)  
490 [and \*Physalaemus nattereri\*\) exposed to the herbicide sulfentrazone \(Boral 500SC®\). \*Comp.\*](#)  
491 [Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol., 197, 32-44.](#)
- 492 [Goulson, D. 2019. The insect apocalypse, and why it matters. \*Curr. Biol.\*, 29\(19\), R967-R971.](#)
- 493 [Gusarov, I., Pani, B., Gautier, L., Smolentseva, O., Eremina, S., Shamovsky, I., Katkova-](#)  
494 [Zhukotskaya, O., Mironov, A., Nudler, E., 2017. Glycogen controls \*Caenorhabditis elegans\*](#)  
495 [lifespan and resistance to oxidative stress. \*Nat. Commun.\*, 8\(1\), 1-12.](#)
- 496 [Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. \[51\] Assays for differentiation of glutathione S-](#)  
497 [Transferases. \*Methods Enzymol.\*, 77, 398-405.](#)
- 498 [Kim, H.J., Khalimonchuk, O., Smith, P.M., Winge, D.R., 2012. Structure, function, and](#)  
499 [assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. \*BBA – Mol. Cell. Res.\*,](#)  
500 [1823\(9\), 1604-1616.](#)
- 501 [Kim, S.I., Jung, J.W., Ahn, Y.J., Restifo, L.L., Kwon, H.W., 2011. \*Drosophila\* as a model](#)  
502 [system for studying lifespan and neuroprotective activities of plant-derived compounds. \*J.\*](#)  
503 [Asia-Pacific. \*Entomol.\*, 14\(4\), 509-517.](#)
- 504 [Kirkman, H.N., Gaetani, G.F., 2007. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new](#)  
505 [mysteries. \*Trends Biochem. Sci.\*, 32\(1\), 44-50.](#)
- 506 Kostyuk, V.A., Potapovich, A.I., 1989. Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple  
507 sensitive assay for determination of superoxide dismutase. *Biochem. Int.*, 19(5), 1117-1124.
- 508 [Lehnen Jr, L.P., Sherman, T.D., Becerril, J., Duke, S.O., 1990. Tissue and cellular](#)  
509 [localization of acifluorfen-induced porphyrins in cucumber cotyledons. \*Pestic. Biochem.\*](#)  
510 [Physiol., 37\(3\), 239-248.](#)

- 511 [Leung, L.Y., Lyga, J.W., Robinson, R.A., 1991. Metabolism and distribution of the](#)  
512 [experimental triazolone herbicide F 6285 \[1-\[2,4-dichloro-5-\[N-](#)  
513 [\(methylsulfonyl\)amino\]phenyl\]-1,4-dihydro-3-methyl-4-\(difluoromethyl\)-5H-triazol-5-one\]](#)  
514 [in the rat, goat, and hen. J. Agric. Food Chem., 39\(8\), 1509-1514.](#)
- 515 [Li, M., Ma, X., Saleem, M., Wang, X., Sun, L., Yang, Y., Zhang, Q., 2020. Biochemical](#)  
516 [response, histopathological change and DNA damage in earthworm \(\*Eisenia fetida\*\) exposed](#)  
517 [to sulfentrazone herbicide. Ecol. Indic., 115, 106465.](#)
- 518 [Maioli, E., Torricelli, C., Fortino, V., Carlucci, F., Tommassini, V., Pacini, A., 2009. Critical](#)  
519 [appraisal of the MTT assay in the presence of rotlerin and uncouplers. Biol. Proced. Online,](#)  
520 [11\(1\), 227-240.](#)
- 521 [Mancini, S., Imlay, J. A., 2015. The induction of two biosynthetic enzymes helps \*Escherichia\*](#)  
522 [coli sustain heme synthesis and activate catalase during hydrogen peroxide stress. Mol.](#)  
523 [Microbiol., 96\(4\), 744-763.](#)
- 524 [Martinez, C.O., Silva, C.M.M., Fay, E.F., Maia, A.D.H.N., Abakerli, R.B., Durrant, L.R.,](#)  
525 [2008. Degradation of the herbicide sulfentrazone in a Brazilian Typic Hapludox soil. Soil](#)  
526 [Biol. Biochem., 40\(4\), 879-886.](#)
- 527 [Ogawa, K., Sun, J., Taketani, S., Nakajima, O., Nishitani, C., Sassa, S., Hayashi, N.,](#)  
528 [Yamamoto, M., Shibahara, S., Fujita, H., Igarashi, K., 2001. Heme mediates derepression of](#)  
529 [Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. EMBO J.,](#)  
530 [20\(11\), 2835-2843.](#)
- 531 [Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by](#)  
532 [thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem., 95\(2\), 351-358.](#)
- 533 [Park, J.H., Jung, J.W., Ahn, Y.J., Kwon, H.W., 2012. Neuroprotective properties of](#)  
534 [phytochemicals against paraquat-induced oxidative stress and neurotoxicity in \*Drosophila\*](#)  
535 [melanogaster. Pestic. Biochem. Physiol., 104\(2\), 118-125.](#)
- 536 Phelps, B. T. (2019). DHR51 as a coordinator of heme biosynthesis and steroid hormone  
537 production to time metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. Master's thesis. University of  
538 Alberta.
- 539 [Piper, M. D., Partridge, L., 2018. \*Drosophila\* as a model for ageing. Biochim. Biophys. Acta](#)  
540 [Mol. Basis. Dis., 1864\(9\), 2707-2717.](#)

- 541 [Pryor, W.A., 1986. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions.](#)  
542 [Annu. Rev. Physiol., 48\(1\), 657-667.](#)
- 543 [Qiu, Y., Tittiger, C., Wicker-Thomas, C., Le Goff, G., Young, S., Wajnberg, E., Fricaux, T.,](#)  
544 [Taqat, N., Blomquist, G.J., Feyereisen, R., 2012. An insect-specific P450 oxidative](#)  
545 [decarbonylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. PNAS, 109\(37\), 14858-14863.](#)
- 546 [Riahi, H., Brekelmans, C., Foriel, S., Merklung, S.H., Lyons, T.A., Itskov, P.M., Kleefstra, T.,](#)  
547 [Ribeiro, C., van Rif, R.P., Kramer, J. M., Schenck, A. 2019. The histone methyltransferase](#)  
548 [G9a regulates tolerance to oxidative stress–induced energy consumption. PLoS Biol., 17\(3\),](#)  
549 [e2006146.](#)
- 550 [Rhodes, C.J. 2018. Pollinator decline—an ecological calamity in the making? Sci. Prog.,](#)  
551 [101\(2\), 121-160.](#)
- 552 [Sassa, S., 1982. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. Enzyme, 28, 133-145.](#)
- 553 [Schneider, D., 2000. Using Drosophila as a model insect. Nat. Rev. Genet., 1\(3\), 218-226.](#)
- 554 [Setsukinai, K.I., Urano, Y., Kakinuma, K., Majima, H.J., Nagano, T., 2003. Development of](#)  
555 [Novel Fluorescence Probes That Can Reliably Detect Reactive Oxygen Species and](#)  
556 [Distinguish Specific Species. J. Biol. Chem., 278\(5\), 3170-3175.](#)
- 557 [Shepherd, M., Dailey, H.A., 2015. Peroxidase activity of cytochrome c facilitates the](#)  
558 [protoporphyrinogen oxidase reaction. Cell. Mol. Biol., 55\(1\), 6-14.](#)
- 559 [Singh, S.P., Coronella, J.A., Beneš, H., Cochrane, B.J., & Zimniak, P., 2001. Catalytic](#)  
560 [function of \*Drosophila melanogaster\* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 \(GST-2\) in](#)  
561 [conjugation of lipid peroxidation end products. Eur. J. Biochem., 268\(10\), 2912-2923.](#)
- 562 [Sudati, J.H., Vieira, F.A., Pavin, S.S., Dias, G.R.M., Seeger, R.L., Golombieski, R., Athayde,](#)  
563 [M.L., Soares, F.A., Rocha, J.B.T., Barbosa, N. V., 2013. \*Valeriana officinalis\* attenuates the](#)  
564 [rotenone-induced toxicity in \*Drosophila melanogaster\*. Neurotoxicology, 37, 118-126.](#)
- 565 [Wang, S., Yu, H., Wickliffe, J.K., 2011. Limitation of the MTT and XTT assays for](#)  
566 [measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO<sub>2</sub>. Toxicol. In](#)  
567 [Vitro, 25\(8\), 2147-2151.](#)
- 568 [Wilkens, A.L., Valgas, A.A., Oliveira, G.T., 2019. Effects of ecologically relevant](#)  
569 [concentrations of Boral® 500 SC, Glifosato® Biocarb, and a blend of both herbicides on](#)



- 570 [markers of metabolism, stress, and nutritional condition factors in bullfrog tadpoles. Environ.](#)  
571 [Sci. Pollut. Res., 26\(23\), 23242-23256.](#)
- 572 [Yanagida, M., Matsumoto, H., Usui, K., 2000. Determination of Porphyrin-Induced](#)  
573 [Peroxidation of Plant Lipids by Oxygen Electrode. J. Weed Sci. Tech., 45\(1\), 26-33.](#)
- 574 [Yin, L., Wu, N., Lazar, M.A., 2010. Nuclear receptor Rev-erb \$\alpha\$ : a heme receptor that](#)  
575 [coordinates circadian rhythm and metabolism. Nucl. Recept. Signal., 8\(1\), 1-6.](#)
- 576 [Zagar, C., Liebl, R., Theodoridis, G., Witschel, M., 2019. Protoporphyrinogen IX oxidase](#)  
577 [inhibitors. In \*Modern Crop Protection Compounds\*, 3, 173-211.](#)

## 5. Appendix

### Appendix 1 - Highlights

Boral® 500 SC (SULF) induced mortality and decreased locomotor behavior in *D. melanogaster*.

Fruit flies that were able and unable to reach the top were analyzed separately.

Increased energy demand seems to be the likely hypothesis for the negative effects seen in the fruit fly.

GST appears to play a key role in herbicide resistance.

### Appendix 2 - Abstract

Sulfentrazone (SULF) is an herbicide Protoporphyrinogen oxidase inhibitor (PPOX) that participates in the chlorophyll and heme biosynthesis pathway. Due to its high half-life in the soil, the low concentration needed to generate an effect, and high evolutionary conservation of the biosynthesis pathway, SULF has a high potential to damage non-target organisms present in application sites. In this perspective, this study aimed to evaluate the effect of the commercial formulation Boral® 500 SC (SULF) on *D. melanogaster* exposed to acute concentrations. For this purpose, the fruit flies were exposed to concentrations ranging from 10-300 mg/L of the herbicide for seven days. Thus, it was possible to verify the increase in mortality in a dose and time-dependent manner in exposed flies. Based on this result, flies exposed to concentrations of 30 and 150 mg/L on the 4th day of treatment were evaluated. In addition to the decrease in climbing locomotor capacity (negative geotaxis assay), there was a reduction in exploratory locomotor capacity (open field assay). Collectively our results suggest that flies exposed to Boral® 500 SC have a higher energy demand to deal with the effects caused by the herbicide. (1) This was seen by decreasing weight and increasing total protein. (2) Activation of the heme

biosynthesis pathway, by the protoporphyrin IX accumulation, increase in total heme in the head, and induction of the PBGS enzyme ( $\delta$ -ALA-D in mammals). (3) Increase in TBARS levels and (4) increase in SOD activity in flies exposed to a concentration of 150 mg/L Botton group and GST in 150 mg/L Top group and (5) increase in MTT reduction in flies from the 150 mg/L Botton group. GST being the likely candidate for greater resistance to locomotor damage caused by the herbicide.

### **Appendix 3 - Keywords**

Fruit Fly; Protoporphyrinogen oxidase inhibitor; Toxicity; Heme; Oxidative stress; Energy Demand.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAIS

Neste trabalho, nós demonstramos que a exposição de *D. melanogaster* ao Boral® 500 SC (SULF), possui a capacidade de diminuir a sobrevivência de modo dose e tempo-dependente. Também, constatamos a diminuição na capacidade locomotora das moscas tratadas em relação ao controle. De modo geral, nosso estudo demonstrou a diminuição do peso e aumento dos níveis de proteínas totais em moscas expostas ao herbicida. A exposição ao Boral® 500 SC também ocasionou acúmulo de protoporfirina IX, aumento do heme total e do nível de peroxidação lipídica. Houve também aumento na atividade das enzimas  $\delta$ -ALA-D, SOD, GST e redução do MTT. Assim, nossos resultados mostram os efeitos tóxicos agudos causados pelo herbicida SULF em uma espécie não alvo.

### 5.1 Efeito da luz na toxicidade do Boral® 500 SC (Sulfentrazone)

A mosca-da-fruta, *Drosophila melanogaster*, vem sendo utilizada nas últimas décadas como modelo genético para estudos nas áreas da biologia e medicina, incluindo doenças neurodegenerativas humanas e envelhecimento (BILEN e BONINI, 2005; PIPER e PARTRIDGE, 2018), mas também, como modelo para toxicidade em insetos (SCHNEIDER, 2000). A mosca-da-fruta é uma poderosa ferramenta para entender a toxicidade de substâncias em outras espécies, por ser o inseto mais fácil de manter em laboratório, além de ser de fácil manipulação genética, ter um ciclo de vida curto, alta fertilidade e dimorfismo sexual (KIM et al., 2011; SCHNEIDER, 2000). Assim, a mosca-da-fruta pode ser utilizada como um animal modelo para estudos toxicológicos e os efeitos vistos aqui podem servir de exemplos para estimar os resultados a outros insetos decorrentes da exposição ao SULF.

O SULF é um herbicida inibidor da PPOX, é utilizado na agricultura para o controle pré-emergente de plantas daninhas em diversas culturas. O mecanismo de ação envolve a inibição da enzima e acumulação de intermediários dessa rota de síntese. Inicialmente ocorre o acúmulo do protoporfirinogênio na mitocôndria, que por difusão, espalha-se pela célula sendo convertido não-enzimaticamente a protoporfirina IX. Com isso, no citoplasma a protoporfirina IX não pode ser utilizada na última etapa de síntese do heme (Ferroquelatase é mitocondrial). Com isso, a protoporfirina IX acumulada, sob luz e oxigênio, leva a produção de consideráveis quantidades de oxigênio singlete e ânion superóxido. Assim, as espécies reativas causam danos aos constituintes celulares, incluindo peroxidação lipídica e perda da integridade celular (LEHNEN Jr et al., 1990; ZAGAR et al., 2019).

Tendo isso em mente, é importante destacar que a toxicidade do SULF é mediada pela luz, assim, é necessário levar em consideração que os efeitos vistos em nosso estudo, foram decorrentes da exposição das moscas-da-fruta tratadas a uma intensidade luminosa constante ( $280 \pm 20 \text{ lm/m}^2$ ). Além disso, não apenas a intensidade luminosa pode ser uma variável a afetar a toxicidade do herbicida, mas também a exposição direta ou não à luz. Isso se deve pela incidência de comprimentos de onda que são mais absorvidos pela protoporfirina IX, gerando maiores quantidades de oxigênio singlete. Em nosso estudo, não realizamos experimentos para avaliar essas questões, apenas destacamos a condicionalidade da mortalidade e/ou toxicidade do herbicida em questão.

## 5.2 Aumento da demanda energética?

A mortalidade dose e tempo-dependente e diminuição da capacidade locomotora nos levaram a buscar algumas evidências dos fatores que estariam por trás desses efeitos. Como veremos a seguir, essas evidências podem estar diretamente ligadas aos custos fisiológicos, expressos principalmente em consumo de energia necessário para ativar a via de síntese do heme, manter as defesas antioxidantes reguladas positivamente, ativar vias de detoxificação e, possivelmente, ativar os sistemas de reparo ocasionados por estresse oxidativo. Assim, nossas evidências foram baseadas na hipótese do aumento da demanda energética do metabolismo da *D. melanogaster*, devido as consequências metabólicas que ocorreram perante a exposição ao herbicida.

A primeira delas está relacionada com alterações no peso e conteúdo total de proteínas em moscas expostas ao Boral® 500 SC. Assim os resultados demonstram que a exposição ao Boral® 500 SC foi capaz de diminuir significativamente o peso do corpo das moscas expostas nas concentrações de 30 e 150  $\text{mg.L}^{-1}$ . Porém, os dados relacionados à cabeça mostraram diminuição apenas na concentração mais alta, em contraste com resultados de outros estudos, onde concentrações subletais de SULF não exerceram efeito significativo sobre o peso de girinos expostos (da SILVA et al., 2021; FREITAS et al., 2017; WILKENS et al., 2019). Além disso, houve aumento na quantidade de proteínas totais apenas no corpo das *D. melanogaster* tratadas com o Boral® 500 SC. Isso pode ser devido a diminuição do estoque de reservas energéticas, oriundas de macromoléculas como glicogênio e lipídeos (da SILVA et al., 2021), visto que durante os processos de detoxificação e resposta ao estresse oxidativo existe uma alta demanda de energia requerida ao organismo. Dentro disso, é incluída a necessidade de aumento de síntese proteica, para que o organismo consiga lidar com a toxicidade ocasionada pelo Boral® 500 SC, requerendo atenção energética especial para esse fim (RIahi et al., 2019).

A segunda evidência é relacionada a síntese do heme e a acumulação de protoporfirina IX. Os resultados evidenciaram o acúmulo de protoporfirina IX, sendo expressivamente maior no corpo de *D. melanogaster* expostas ao Boral® 500 SC, mas também ocorre na região da cabeça. Isso se deve pelo fato de que, para a manutenção da homeostase, o heme se autorregula pelo aumento da expressão do gene que codifica a primeira enzima da rota de biossíntese, a ALAS1 (presente em vertebrados e invertebrados) (OGAWA, et al. 2001). Além disso, também pode ocorrer indução de outras enzimas da rota (PHELPS, 2019), como a PBGS ( $\delta$ -ALA-D em mamíferos), onde em moscas expostas ao Boral® 500 SC, apresentou atividade aumentada. Para a primeira etapa de biossíntese do heme, catalisada pela ALAS1, é requerida a utilização do succinil-CoA, importante intermediário do ciclo do ácido cítrico. Não está completamente claro quando o succinil-CoA será priorizado para fins energéticos ou quando será desviado para a biossíntese do heme (BURCH et al., 2018), mas podemos pressupor que grandes quantidades desse intermediário foi desviado do ciclo do ácido cítrico, devido a extensão de acúmulo de protoporfirina IX.

Inicialmente, seria possível pressupor que com a inibição da enzima PPOX poderia ocorrer a diminuição dos níveis de heme, mas os resultados demonstram que os níveis de heme total permaneceram a nível de controle no corpo e aumentaram na cabeça das moscas expostas ao Boral® 500 SC em ambas as concentrações. Isso ocorre pelo fato de que o protoporfirinogênio é acumulado, pela inibição da enzima, e sofre autooxidação em protoporfirina IX. Isso ocorre inicialmente na mitocôndria (local de síntese), mas sofre posterior difusão para outros locais da célula (LEHNEN Jr et al., 1990). Assim, é possível presumir que substanciais quantidades de protoporfirina IX, mesmo com a inibição da PPOX, serão formados na mitocôndria e estarão disponíveis para serem usados pela Ferroquelatase para a produção do heme. Com isso, o fato de os níveis de heme estarem aumentados na cabeça pode ser correlacionado com o aumento da necessidade dessa molécula para a atividade de importantes hemoenzimas. O que pode incluir os CYPs, estando envolvidos na detoxificação de xenobióticos, uma vez que CYPs com essa função também podem expressos na região da cabeça de *D. melanogaster* (CHUNG et al., 2009), mas também na cadeia transportadora de elétrons (KIM et al., 2012), pois o heme participa na transferência de elétrons, podendo servir de evidência para demonstrar a ativação da cadeia transportadora de elétrons para suprir a demanda energética requerida nas moscas-da-fruta expostas ao herbicida Boral® 500 SC.

Como terceira evidência, é possível destacar a influência da exposição das *D. melanogaster* no ensaio de redução do MTT. Os resultados vistos neste ensaio demonstraram

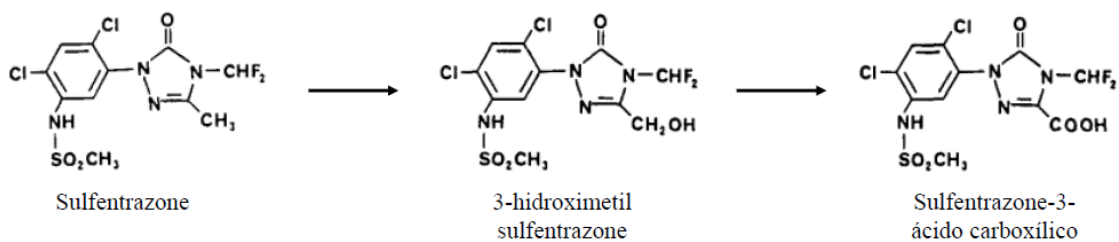
uma capacidade maior das moscas expostas a concentração de 150 mg.L<sup>-1</sup>, que permaneciam na parte inferior, em reduzir o MTT. Esse resultado pode demonstrar aumento na atividade das desidrogenases mitocondriais, pois o MTT é reduzido pela atividade de desidrogenases, principalmente da mitocôndria (CAUGHLAN et al., 2004). Assim, esse resultado pode ser correlacionado como uma evidência da aceleração da transferência de elétrons pelo aumento da atividade das desidrogenases, em conjunto com um aumento do consumo de oxigênio e oxidação do NADH, para a produção de ATP (MAIOLI et al., 2009). Por outro lado, a manutenção dos níveis da redução do MTT também podem indicar a conservação da viabilidade celular (WANG, 2011), mesmo durante uma situação de exposição ao Boral® 500 SC.

A quarta evidência está relacionada com o fato de que a protoporfirina IX é fotodinâmica e devido a sua acumulação, substâncias quantidades de oxigênio singlete e ânion superóxido são gerados, quando luz é irradiada sobre essa molécula (COX e WHITTEN, 1982; YANAGIDA et al., 2000). Assim, fica evidente que a geração de ROS em moscas-da-fruta expostas ao Boral® 500 SC e subsequentes danos por estresse oxidativo, são atribuídos a essa molécula e sua propriedade fotodinâmica. No entanto, em moscas expostas ao Boral® 500 SC, em ambas as concentrações (30 e 150 mg.L<sup>-1</sup> de SULF) não houve alteração na fluorescência relativa no teste de espécies reativas ao DCF-DA, tanto na cabeça quanto no corpo. Isso pode ser justificado pelo fato de que, durante toda a realização do ensaio, as amostras não foram expostas à luz, pois a DCF-DA pode facilmente sofrer oxidação fotoquímica (SETSUKINAI et al., 2003), que poderia ser erroneamente confundida com a capacidade da amostra em gerar DCF. Além disso, acreditamos que significativas quantidades de ROS foram gerados pela protoporfirina IX, mas não foram capazes de serem detectadas durante o ensaio, pelo fato de que possuem uma meia-vida extremamente baixa no organismo (PRYOR, 1986).

No entanto, o efeito do estresse oxidativo foi visto pelo aumento das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (ensaio TBARS), no corpo das moscas expostas as duas concentrações de Boral® 500 SC estudadas, mas na cabeça não foi visto. Os níveis aumentados de TBARS demonstram a ocorrência de danos oxidativos, mesmo em moscas expostas a concentração subletal do herbicida. Dentro da resposta à oxidantes, o aumento das defesas antioxidantes (enzimáticas e não-enzimáticas) e reparo de danos causados por espécies reativas, são fatores chave para a sobrevivência do organismo. Essas ações requerem despesas energéticas especiais para que as células possam lidar com a situação estressante, podem ser extremamente exaustivas para o organismo (GUSAROV et al., 2017; RIAHI et al., 2019).

Dentro disso, surge a quinta evidência, correlacionada com o aumento da atividade de enzimas relacionadas a detoxificação/ação antioxidante em *D. melanogaster* expostas ao Boral® 500 SC. Em estudos com animais expostos ao herbicida, já foi demonstrado o aumento da atividade das enzimas antioxidantes CAT e GST em girinos (FREITAS et al., 2017; WILKENS et al., 2019), além da SOD e peroxidase em minhocas (LI et al., 2020). Assim, os resultados demonstraram que ocorreu aumento significativo da atividade da enzima GST na cabeça dos animais expostos a concentração de 150 mg.L<sup>-1</sup>, enquanto no corpo, houve aumento apenas nas moscas que possuíam a capacidade de alcançar o topo. Durante a intoxicação por SULF, a família de enzimas GSTs parecem desempenhar papel fundamental em animais expostos. No entanto, essas enzimas parecem estar envolvidas majoritariamente na detoxificação de hidroperóxidos lipídicos (e.g. 4-hidroxinonenal), produtos da peroxidação lipídica (SINGH et al., 2001), e não na conjugação do próprio SULF com a GSH. Pois, em ratos, o SULF é excretado majoritariamente na forma não-conjugada pela urina, 3-hidroximetil sulfentrazone (88-95%) e seu derivado ácido carboxílico (0.3-5%) (Fig. 7), formando os principais produtos de excreção do herbicida (LEUNG et al., 1991). Contudo, a comparação é limitada, visto que até o presente momento, não foram realizados estudos que visam elucidar a rota de detoxificação do herbicida em insetos.

Figura 7. Principais produtos de metabolização do Sulfentrazone em mamíferos.



Fonte: editado de Leung et al., 1991.

Como dito anteriormente, a incidência de luz sobre a protoporfirina IX acumulada gera substanciais quantidades de ROS, majoritariamente oxigênio singlete e ânion superóxido (COX e WHITTEN, 1982; YANAGIDA et al., 2000). A enzima SOD é a primeira linha de defesa contra os ânions superóxido, desempenhando papel fundamental na função antioxidante. Essa enzima catalisa a conversão dos ânions superóxido em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os resultados demonstram o aumento significativo da atividade da enzima na cabeça e no corpo das moscas expostas à concentração de 150 mg.L<sup>-1</sup> do herbicida SULF. Já foi demonstrado que a atividade da enzima aumenta poucas horas após a administração de protoporfirina IX em ratos (AFONSO et al., 1999), e aumenta a partir do 7º dia em minhocas expostas ao SULF (LI et al., 2020). Assim, o



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerado terá que ser metabolizado e essa reação é catalisada principalmente por duas enzimas, a CAT e a glutathiona peroxidase. No entanto, os resultados demonstram que a enzima CAT não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, tanto na cabeça, quanto no corpo. Apesar disso, é possível que a enzima esteja envolvida na decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *D. melanogaster* expostas ao Boral® 500 SC, mas esteja sendo inibida e/ou limitada pela ação do herbicida. Isso corre pelo fato que durante a atividade catalítica da enzima, é formado o chamado Composto II, que é o estado inativo da enzima revertido espontaneamente de forma lenta. Desta forma, durante exposição a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que é gerado a uma taxa constante, a CAT pode atingir um estado estacionário no qual certa parte do total de enzima fica inativa pela ação do seu próprio substrato (revisado por KIRKMAN e GAETANI, 2007). Por outro lado, com a limitação da síntese do heme, pode ocorrer a diminuição da produção de CAT viável para a detoxificação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que é constantemente produzido. Isso ocorre pelo fato de que o gene codificador da enzima pode estar sendo induzido e novas enzimas podem estar sendo sintetizadas, mas sem a introdução do heme no centro ativo, que é responsável pela atividade da enzima (MANCINI e IMLAY, 2015).

## 6. CONCLUSÃO

Nesta dissertação, nós demonstramos que a exposição de *D melanogaster* a formulação comercial Boral® 500 SC (SULF), possui a capacidade de diminuir a sobrevivência de modo dose e tempo-dependente, bem como diminuir a capacidade locomotora das moscas-da-fruta tratadas com o herbicida. A SOD parece desempenhar papel fundamental no enfrentamento as ROS e a GST na detoxificação dos produtos de peroxidação lipídica. Sendo essa última, a provável candidata pela maior resistência/tolerância aos danos causados pelo herbicida. Nesse sentido, nosso trabalho traz uma direcionalidade para que futuros estudos possam descrever com mais detalhes os mecanismos envolvidos na variação intraespecífica em resposta ao herbicida Boral® 500 SC em *Drosophila melanogaster*.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Após a realização desse trabalho, algumas questões ainda precisa ser esclarecidas:

Avaliar como o organismo da *D. melanogaster* reagiria após o término da exposição ao herbicida. Tendo em vista que já foi demonstrado que embriões de *Danio rerio* (peixe-zebra) conseguem eliminar o excesso de protoporfirina acumulada ao serem expostos a um inibidor da PPOX (Butafenacil). Esse processo requer mais de 24 h para ocorrer (LEET et al., 2015). Nesse sentido, com o término da exposição ao Boral® 500 SC, as moscas possivelmente requereriam determinado período para a normalização da concentração fisiológica da protoporfirina IX. No entanto, seria interessante demonstrar se as moscas tratadas teriam a capacidade de reparar os danos causados pela exposição ao herbicida, revertendo a capacidade locomotora a níveis de controle.

Elucidar em maiores detalhes o papel que a via da glutatona desempenha na tolerância/resistência das *D. melanogaster* frente a exposição ao herbicida. Ou melhor, o que tornou possível que no grupo das moscas exposta a concentração de 150 mg.L<sup>-1</sup>, que possuíam a capacidade de alcançar o topo, houvesse aumento na atividade da enzima GST. Esse mecanismo precisa ser identificado, para que haja a compreensão dos processos envolvidos na tolerância/resistência de uma parcela da população de insetos perante a exposição a um herbicida. Além disso, a enzima GST parece ter desempenhado papel importante em moscas-da-fruta expostas ao Boral® 500 SC. Como discutimos na seção 5.2, a GST pode ter agido detoxificando peróxidos lipídicos, mas outras enzimas da via da glutatona não foram analisadas, muito menos o conteúdo total de GSH. Assim, essa via poderia estar agindo de outra forma (via GPx talvez), que possibilitaria um maior ação contra os efeitos tóxicos causados pelo herbicida.

E por fim, avaliar a longo prazo os efeitos do herbicida em moscas-da-fruta. Visto que no ambiente, as fontes prováveis de exposição em animais terrestres podem ser “pelo consumo de plantas e animais contaminados que foram diretamente pulverizados, ingestão de água contaminada e contato dérmico com solo e vegetação contaminados” (SINCLAIR e BARRETT, 2014). Além disso, uma vez que não é esperado que os insetos nativos sejam expostos a concentração agudas no meio ambiente, o desenvolvimento de um estudo crônico pode ser mais representativo ao que pode vir a ocorrer nos locais de aplicação.

## 8. REFERÊNCIAS

AFONSO, S., VANORE, G., BATLLE, A. Protoporphyrin IX and oxidative stress. **Free Radical Research**, v. 31, n. 3, p. 161-170, 1999.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 436, de 5 de novembro de 2020**. Brasil. Disponível em: <[http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6053710/RDC\\_436\\_2020\\_.pdf/b36028dd-b15a-4f6a-97d9-4b90a337cdac](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6053710/RDC_436_2020_.pdf/b36028dd-b15a-4f6a-97d9-4b90a337cdac)>. Último acesso em junho de 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **S09 - Sulfentrazona**. 2003. Brasil. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/q-r-s/4513json-file-1>>. Último acesso em junho de 2021.

AUBERTHEAU, E., STALDER, T., MONDAMERT, L., PLOY, M. C., DAGOT, C., LABANOWSKI, J. Impact of wastewater treatment plant discharge on the contamination of river biofilms by pharmaceuticals and antibiotic resistance. **Science of the Total Environment**, v. 579, p. 1387-1398, 2017.

BIANCHI, J., CABRAL-DE-MELLO, D. C., MARIN-MORALES, M. A. Toxicogenetic effects of low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individually and in combination in in vitro tests with HepG2 cells and *Salmonella typhimurium*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 174-183, 2015.

BILEN, J., BONINI, N. M. Drosophila as a model for human neurodegenerative disease. **Annual Review of Genetics**, v. 39, p. 153-171, 2005.

BOHNENBLUST, E. W., VAUDO, A. D., EGAN, J. F., MORTENSEN, D. A., TOOKER, J. F. Effects of the herbicide dicamba on nontarget plants and pollinator visitation. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 144-151, 2016.

BURCH, J. S., MARCERO, J. R., MASCHEK, J. A., COX, J. E., JACKSON, L. K., MEDLOCK, A. E., PHILLIPS, J. D., DAILEY JR, H. A. Glutamine via  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase provides succinyl-CoA for heme synthesis during erythropoiesis. **Blood**, v. 132, n. 10, p. 987-998, 2018.

BURMESTER, T., STORF, J., HASENJAGER, A., KLAWITTER, S., HANKELN, T. The hemoglobin genes of *Drosophila*. **The FEBS Journal**, v. 273, n. 3, p. 468-480, 2006.

BURMESTER, T., WAWROWSKI, A., DIEPENBRUCK, I., SCHRICK, K., SEIWERT, N., RIPP., F., PROTHMANN, A., HANKELN, T. Divergent roles of the *Drosophila melanogaster* globins. **Journal of Insect Physiology**, v. 106, p. 224-231, 2018.

BUSINESS WIRE®. Monsanto and Sumitomo Chemical Enter New Global Crop Protection Collaboration for Next Generation PPO Technologies. 2016. Disponível em: <<http://www.businesswire.com/news/home/20160627006284/en/Monsanto-Sumitomo-Chemical-Enter-Global-Crop-Protection>>. Último acesso em junho de 2021.

CALAP-QUINTANA, P., GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, J., SEBASTIÁ-ORTEGA, N., LLORENS, J. V., MOLTÓ, M. D. *Drosophila melanogaster* models of metal-related human diseases and metal toxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1456, 2017.

CARRIÇO, M. R. S., GAYER, M. C., RODRIGUES, M. R., RODRIGUES, C. F., SCHMITT, M. L. V., DENARDIN, E. L. G., ROEHRS, R. The Influence of Light Quality in Plants: A New Perspective for the Decontamination of Organic Compounds. **The Future of Phytoremediation**. p. 57-104, 2021.

CAUGHLAN, A., NEWHOUSE, K., NAMGUNG, U., XIA, Z. Chlorpyrifos induces apoptosis in rat cortical neurons that is regulated by a balance between p38 and ERK/JNK MAP kinases. **Toxicological Sciences**, v. 78, n. 1, p. 125-134, 2004.

CHUNG, H., SZTAL, T., PASRICHA, S., SRIDHAR, M., BATTERHAM, P., DABORN, P. J. Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 14, p. 5731-5736, 2009.

COX, G. S., WHITTEN, D. G. Mechanisms for the photooxidation of protoporphyrin IX in solution. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, n. 2, p. 516-521, 1982.

da SILVA, P. R., BORGES-MARTINS, M., OLIVEIRA, G. T. *Melanophryniscus admirabilis* tadpoles' responses to sulfentrazone and glyphosate-based herbicides: An approach on metabolism and antioxidant defenses. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 4, p. 4156-4172, 2021.

DAN, H. A., DAN, L. G. M., BARROSO, A. L. L., PROCÓPIO, S. O., OLIVEIRA JR, R. S., SILVA, A. G., LIMA, M. D. B. Residual activity of herbicides used in soybean agriculture on grain sorghum crop succession. **Planta Daninha**, v. 28, p. 1087-1095, 2010.

DANESHVAR, A., ABOULFADI, K., VIGLINO, L., BROSÉUS, T., SAUVÉ, S., MADOUX-HUMERY, A. S., WEYHENMEYER, G. A., PRÉVOST, M. Evaluating pharmaceuticals and caffeine as indicators of fecal contamination in drinking water sources of the Greater Montreal region. **Chemosphere**, v. 88, n. 1, p. 131-139, 2012.

de CASTRO, V. L., DESTEFANI, C. R., DINIZ, C., POLI, P. Evaluation of neurodevelopmental effects on rats exposed prenatally to sulfentrazone. **Neurotoxicology**, v. 28, n. 6, p. 1249-1259, 2007.

DEMIR, E. Drosophila as a model for assessing nanopesticide toxicity. **Nanotoxicology**, v. 14, n. 9, p. 1271-1279, 2020.

EDEL, Y., MAMET, R. Porphyria: what is it and who should be evaluated? **Rambam Maimonides Medical Journal**, v. 9, n. 2, 2018.

EPE, B. Genotoxicity of singlet oxygen. **Chemico-Biological Interactions**, v. 80, n. 3, p. 239-260, 1991.

FMC Corporation. **BL herbicida BORAL® 500 SC**. 2021. Disponível em: <<https://fmcagricola.com.br/Content/Fotos/Bula%20-%20Boral.pdf>>. Último acesso em junho de 2021.

FREITAS, J. S., TERESA, F. B., DE ALMEIDA, E. A. Influence of temperature on the antioxidant responses and lipid peroxidation of two species of tadpoles (*Rhinella schneideri* and *Physalaemus nattereri*) exposed to the herbicide sulfentrazone (Boral 500 SC®). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 197, p. 32-44, 2017.

GOULSON, D. The insect apocalypse, and why it matters. **Current Biology**, v. 29, n. 19, p. R967-R971, 2019.

- GRUBISIC, M., VAN GRUNSVEN, R. H. A., KYBA, C. C. M., MANFRIN, A., HOLKER, F. Insect declines and agroecosystems: does light pollution matter? **Annals of Applied Biology**, v. 173, n. 2, p. 180-189, 2018.
- GUSAROV, I., PANI, B., GAUTIER, L., SMOLENTSEVA, O., EREMINA, S., SHAMOVSKY, I., KATVOKA-ZHUKOTSKAYA, O., MIRONOV, A., NUDLER, E. Glycogen controls *Caenorhabditis elegans* lifespan and resistance to oxidative stress. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2017.
- HALLMANN, C. A., SORG, M., JONGEJANS, E., SIEPEL, H., HOFLAND, N., STENMANS, W., MULLER, A., SUMSER, H., HORREN, T., GOULSON, D., DE KROON, H. More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. **PloS ONE**, v. 12, n. 10, p. e0185809, 2017.
- HUYNH, N., OU, Q., COX, P., LILL, R., KING-JONES, K. Glycogen branching enzyme controls cellular iron homeostasis via Iron Regulatory Protein 1 and mitoNEET. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2019.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. **Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto n° 4.074/2002**. 2020. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Último acesso em junho de 2021.
- JENNINGS, B. H. Drosophila—a versatile model in biology & medicine. **Materials Today**, v. 14, n. 5, p. 190-195, 2011.
- KAUPPINEN, R., MUSTAJOKI, P. Prognosis of acute porphyria: occurrence of acute attacks, precipitating factors, and associated diseases. **Medicine**, v. 71, n. 1, p. 1-13, 1992.
- KIDD, K. A., BLANCHFIELD, P. J., MILLS, K. H., PALACE, V. P., EVANS, R. E., LAZORCHAK, J. M., FLICK, R. W. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 21, p. 8897-8901, 2007.
- KIDD, K. A., PATERSON, M. J., RENNIE, M. D., PODEMSKI, C. L., FINDLAY, D. L., BLANCHFIELD, P. J., LIBER, K. Direct and indirect responses of a freshwater food web to

a potent synthetic oestrogen. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1656, p. 20130578, 2014.

KIM, H. J., KHALIMONCHUK, O., SMITH, P. M., WINGE, D. R. Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 9, p. 1604-1616, 2012.

KIM, S., JUNG, J. W., AHN, Y. J., RESTIFO, L. L., KWON, H. W. Drosophila as a model system for studying lifespan and neuroprotective activities of plant-derived compounds. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 14, n. 4, p. 509-517, 2011.

KIRKMAN, H. N., GAETANI, G. F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 1, p. 44-50, 2007.

KLATT, P., SCHMIDT, K., MAYER, B. Brain nitric oxide synthase is a haemoprotein. **Biochemical Journal**, v. 288, p. 15, 1992.

KRAEHMER, H., LABER, B., ROSINGER, C., SCHULZ A. Herbicides as weed control agents: state of the art: I. Weed control research and safener technology: the path to modern agriculture. **Plant Physiology**, v. 166, n. 3, p. 1119-1131, 2014.

LEET, J. K., HIPSZER, R. A., VOLZ, D. C. Butafenacil: A positive control for identifying anemia-and variegate porphyria-inducing chemicals. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 976-983, 2015.

LEHNEN Jr, L. P., SHERMAN, T. D., BECERRIL, J. M., DUKE, S. O. Tissue and cellular localization of acifluorfen-induced porphyrins in cucumber cotyledons. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 3, p. 239-248, 1990.

LEONELLI, S., ANKENY, R. A. What makes a model organism? **Endeavour**, v. 37, n. 4, p. 209-212, 2013.

LEUNG, L. Y., LYGA, J. W., ROBINSON, R. A. Metabolism and distribution of the experimental triazolone herbicide F 6285 [1-[2, 4-dichloro-5-[N-(methylsulfonyl) amino] phenyl]-1, 4-dihydro-3-methyl-4-(difluoromethyl)-5H-triazol-5-one] in the rat, goat, and hen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 1509-1514, 1991.

- LI, M., MA, X., SALEEM, M., WANG, X., SUN, L., YANG, Y., ZHANG, Q. Biochemical response, histopathological change and DNA damage in earthworm (*Eisenia fetida*) exposed to sulfentrazone herbicide. **Ecological Indicators**, v. 115, p. 106465, 2020.
- LIMA, A. C. A., MELO, A. M. S., PIRES, E. V., FERREIRA, R. C. S., SANT'ANA, A. E., GOULART, M. O., DE ABREU, F. C. Electroanalytical studies of sulfentrazone in protic medium, its degradation by the electro-Fenton process, and toxicity assessment using ss-DNA. **Chemosphere**, v. 81, n. 7, p. 884–889, 2010.
- MAIOLI, E., TORRICELLI, C., FORTINO, V., CARLUCCI, F., TOMMASSINI, V., PACINI, A. Critical appraisal of the MTT assay in the presence of rottlerin and uncouplers. **Biological Procedures Online**, v. 11, n. 1, p. 227-240, 2009.
- MANCINI, S., IMLAY, J. A. The induction of two biosynthetic enzymes helps *Escherichia coli* sustain heme synthesis and activate catalase during hydrogen peroxide stress. **Molecular Microbiology**, v. 96, n. 4, p. 744-763, 2015.
- MARTINEZ, C. O., SILVA, C. M. M. S., FAY, E. F., MAIA, A. H. N., ABAKERLI, R. B., DURRANT, L. R. Degradation of the herbicide sulfentrazone in a Brazilian Typic Hapludox soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 4, p. 879-886, 2008.
- MARVIN, K. A., REINKING, J. L., LEE, A. J., PARDEE, K., KRAUSE, H. M., BURSTYN, J. N. Nuclear receptors Homo sapiens Rev-erb $\beta$  and *Drosophila melanogaster* E75 are thiolate-ligated heme proteins which undergo redox-mediated ligand switching and bind CO and NO. **Biochemistry**, v. 48, n. 29, p. 7056-7071, 2009.
- MATTE, W. D., CAVALIERI, S. D., PEREIRA, C. S., IKEDA, F. S., SHENG, L. Y. Residual activity of sulfentrazone applied to soybean on cotton crop in succession. **Planta Daninha**, v. 37, art. no. e019187015, 2019.
- MESAK, C., DE CAMPOS, R. P., DE MELO, M. A., MENDES, B. O., MALAFAIA, G. Behavioral response and dynamics of *Eisenia fetida* hemocytes exposed to environmentally relevant concentration of sulfentrazone. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 30, p. 30728-30736, 2018.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, MAPA. **Registros concedidos - 2005 – 2021**. Brasil. Disponível em:



<<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas>>. Último acesso em junho de 2021.

MIRZOYAN, Z., SOLLAZZO, M., ALLOCCA, M., VALENZA, A. M., GRIFONI, D., BELLOSTA, P. *Drosophila melanogaster*: a model organism to study cancer. **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 51, 2019.

NAGABABU, E., RIFKIND, J. M. Formation of fluorescent heme degradation products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 247, n. 3, p. 592-596, 1998.

OGAWA, K., SUN, J., TAKETANI, S., NAKAJIMA, O., NISHITANI, C., SASSA, S., HAYASHI, N., YAMAMOTO, M., SHIBAHARA, S., FUJITA, H., IGARASHI, K. Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. **The EMBO journal**, v. 20, n. 11, p. 2835-2843, 2001.

OHMES, A. G., HAYES, R. M., MUELLER, T. C. Sulfentrazone Dissipation in a Tennessee Soil. **Weed Technology**, v. 14, n. 1, p. 100-105, 2000.

PHELPS, B. T. **DHR51 as a coordinator of heme biosynthesis and steroid hormone production to time metamorphosis in *Drosophila melanogaster***. Tese (PhD em Biologia Molecular e Genética) – Universidade de Alberta. 2019.

PIPER, M. D. W., PARTRIDGE, L. *Drosophila* as a model for ageing. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1864, n. 9, p. 2707-2717, 2018.

PRYOR, W. A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. **Annual review of Physiology**, v. 48, n. 1, p. 657-667, 1986.

QIU, Y., TITTIGER, C., WICKER-THOMAS, C., LE GOFF, G., YOUNG, S., WAJNBERG, E., FRICAUX, T., TAQUAT, N., BLOMQUIST, G. J., FEYEREISEN, R. An insect-specific P450 oxidative decarbonylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 37, p. 14858-14863, 2012.

SANTOS, L. H. M. L. M., ARAÚJO, A. N., FACHINI, A., PENA, A., DELERUE-MATOS, C., MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Ecotoxicological aspects related to the presence of

pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of hazardous materials**, v. 175, n. 1-3, p. 45-95, 2010.

SETSUKINAI, K., URANO, Y., KAKINUMA, K., MAJIMA, H. J., NAGANO, T.  
Development of Novel Fluorescence Probes That Can Reliably Detect Reactive Oxygen Species and Distinguish Specific Species\* 210. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 5, p. 3170-3175, 2003.

RADER, R., et al. Non-bee insects are important contributors to global crop pollination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 1, p. 146-151, 2016.

RANGANI, G., SALAS-PEREZ, R. A., APONTE, R. A., KNAPP, M., CRAIG, I. R., MIETZNER, T., LANGARO, A. C., NOGUEIRA, M. M., PORRI, A., ROMA-BURGOS, N.  
A novel single-site mutation in the catalytic domain of protoporphyrinogen oxidase IX (PPO) confers resistance to PPO-inhibiting herbicides. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 568, 2019.

RHODES, C. J. Pollinator decline—an ecological calamity in the making? **Science Progress**, v. 101, n. 2, p. 121-160, 2018.

RIAHI, H., BREKELMANS, C., FORIEL, S., MERKLING, S. H., LYONS, T. A., KLEEFSTRA, T., RIBEIRO, C., van RIJ, R. P., KRAMER, J. M., SCHENCK, A. The histone methyltransferase G9a regulates tolerance to oxidative stress–induced energy consumption. **PLoS Biology**, v. 17, n. 3, p. e2006146, 2019.

SANTOS, E. A., CORREIA, N. M., SILVA, J. R. M., VELINI, E. D., PASSOS, A. B. R. J., DURIGAN, J. C. Herbicide detection in groundwater in Córrego Rico-SP watershed. **Planta Daninha**, v. 33, n. 1, p. 147-155, 2015.

SCHNEIDER, D. Using *Drosophila* as a model insect. **Nature Reviews Genetics**, v. 1, n. 3, p. 218-226, 2000.

SHANER, D. L. Field dissipation of sulfentrazone and pendimethalin in Colorado. **Weed Technology**, v. 26, n. 4, p. 633-637, 2012.

SHEPHERD, M., DAILEY, H. A. Peroxidase activity of cytochrome c facilitates the protoporphyrinogen oxidase reaction. **Cellular and Molecular Biology**, v. 55, n. 1, p. 6-14, 2015.

SIMON, N. G., HERKES, G. K. The neurologic manifestations of the acute porphyrias. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 18, n. 9, p. 1147-1153, 2011.

SINCLAIR, G., BARRETT, M. **Preliminary Ecological Risk Assessment for the Registration Review of Sulfentrazone and Proposed New Uses on Apples**. 2014.

Disponível em: <<https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2009-0624-0017>>.

Último acesso em junho de 2021.

SINGH, S. P., CORONELLA, J. A., BENES, H., COCHRANE, B. J., ZIMNIAK, P. Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 10, p. 2912-2923, 2001.

THEODORIDIS, G., HOTZMAN, F. W., SCHERER, L. W., SMITH, B. A., TYMONKO, J. M., WYLE, M. J. Design and Synthesis of 1-Aryl-4-substituted-1, 4-dihydro-5 H-tetrazol-5-ones: A Novel Pre-and Postemergence Class of Herbicides. **Synthesis and Chemistry of Agrochemicals III**, cap. 13, p. 122-133, 1992a.

THEODORIDIS, G., BAUM, J. S., HOTZMAN, F. W., MANFREDI, M. C., MARAVETZ, L. L., LYGA, J. W., TYMONKO, J. M., WILSON, K. R., POSS, K. M., WYLE, M. J. Synthesis and herbicidal properties of aryltriazolinones: a new class of pre-and postemergence herbicides. **Synthesis and Chemistry of Agrochemicals III**, cap. 14, p. 134-146, 1992b.

THORNGREN, J. L., HARWOOD, A. D., MURPHY, T. M., HARTZ, K. E. H., FUNG, C. Y., LYDY, M. J. Fate and risk of atrazine and sulfentrazone to nontarget species at an agriculture site. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 5, p. 1301-1310, 2017.

WANG, S., YU, H., WICKLIFFE, J. K. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO<sub>2</sub>. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 8, p. 2147-2151, 2011.

WEBSTER, T. M., SOSNOSKIE, L. M. Loss of glyphosate efficacy: a changing weed spectrum in Georgia cotton. **Weed Science**, v. 58, n. 1, p. 73-79, 2010.

WILKENS, A. L. L., VALGAS, A. A. N., OLIVEIRA, G. T. Effects of ecologically relevant concentrations of Boral® 500 SC, Glifosato® Biocarb, and a blend of both herbicides on markers of metabolism, stress, and nutritional condition factors in bullfrog tadpoles.

**Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 23, p. 23242-23256, 2019.

WRUBLESWSKI, J., REICHERT JR., F. W., GALON, L., HARTMANN, P. A., HARTMANN, M. T. Acute and chronic toxicity of pesticides on tadpoles of *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae). **Ecotoxicology**, v. 27, n. 3, p. 360-368, 2018.

YANAGIDA, M., MATSUMOTO, H., USUI, K. Determination of Porphyrin-Induced Peroxidation of Plant Lipids by Oxygen Electrode. **Journal of Weed Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 26-33, 2000

YIN, L., WU, N., LAZAR, M. A. Nuclear receptor Rev-erb $\alpha$ : a heme receptor that coordinates circadian rhythm and metabolism. **Nuclear Receptor Signaling**, v. 8, n. 1, 08001, 2010.

ZAGAR, C., LIEBL, R., THEODORIDIS, G., WITSCHERL, M. Protoporphyrinogen IX oxidase inhibitors. **Modern Crop Protection Compounds**, v. 3, cap. 3, p. 173-211, 2019.