

## Efeitos do composto 3,4-dicloroanilina na natação de larvas de peixe zebra

O comportamento locomotor dos organismos tem vindo a ser cada vez mais utilizado como parâmetro de avaliação dos efeitos de contaminantes ambientais devido à sua sensibilidade e relevância ecológica. O composto 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA) é um produto da degradação de alguns herbicidas sendo frequentemente encontrado em ambientes aquáticos. Neste trabalho, embriões de peixe zebra foram expostos a concentrações de 3,4-DCA entre 0,0625 e 2 mg L<sup>-1</sup> durante 120 horas e o seu comportamento locomotor analisado usando o sistema de *video-tracking* Zebrabox. Os resultados mostraram grande sensibilidade dos parâmetros comportamentais ao composto visto que foram detetadas alterações nas concentrações mais baixas testadas. Durante a monitorização comportamental observou-se hipoatividade das larvas (diminuição do tempo de natação) durante o período de luz e comportamentos sugestivos de ansiedade (natação errática) durante o período de escuro. Esta dualidade de resposta sugere diferentes modos de ação do composto a nível do sistema neuro-endócrino: por um lado os efeitos depressores da atividade que decorrem da ação narcótica do 3,4-DCA e por outro, os efeitos de ansiedade que podem decorrer do aumento dos níveis de cortisol. Este trabalho corrobora a ação disruptiva do 3,4-DCA no sistema neuro-endócrino realçando a necessidade de se compreenderem as consequências destes efeitos a nível da população.

### Palavras-chave

*Danio rerio*  
Zebrabox  
herbicidas  
comportamento locomotor  
hipoatividade  
natação errática

Sara Reis<sup>1</sup>

Mariachiara Gagliardi<sup>1,2</sup>

Luigi Capone<sup>1,2</sup>

Inês Domingues<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia & CESAM, (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar), Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze e Tecnologie, Università degli studi del Sannio, 82100 Benevento, Itália.

\* inesd@ua.pt

## INTRODUÇÃO

O peixe zebra, *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822), é um peixe da família dos ciprinídeos usado como modelo em estudos de desenvolvimento embrionário, fisiologia, genética e toxicologia. É também um organismo modelo na avaliação de risco ecotoxicológico de químicos (Hill et al., 2005). O teste com embriões de peixe zebra tem metodologias padronizadas pela OCDE- Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OECD, 2013) sendo que uma das vantagens deste modelo é a de ser considerado um método alternativo de experimentação animal. De facto, a diretiva europeia 2010/63/EU, que visa regular o uso de animais em experimentação científica, tem o fim último de substituir a experimentação animal por métodos alternativos. Os estádios embrionários e larvares de vertebrados enquanto não se alimentam externamente não estão protegidos pela diretiva sendo considerados modelos alternativos de experimentação e o seu uso incentivado (Braunbeck et al., 2014; Goldberg and Drnec, 2003). O teste com embriões de peixe zebra tem a duração de 96 horas avaliando vários parâmetros chave no desenvolvimento do embrião como a coagulação do ovo, a formação de somitos, o destacamento da cauda e a existência de batimento cardíaco. São ainda avaliadas anomalias no desenvolvimento embrionário incluindo atrasos no desenvolvimento e eclosão, malformações, edemas, alterações de pigmentação, entre outros que podem ou não condicionar a sobrevivência dos organismos. Recentemente alguns autores têm prolongado o teste até às 120 horas para proceder à análise do comportamento locomotor (natação) das larvas do peixe zebra (p. ex. Andrade et al., 2016). A análise dos efeitos de compostos químicos a nível comportamental é extremamente relevante e tem sido nos últimos tempos muito usada em larvas de peixe zebra devido à crescente disponibilidade de softwares e equipamentos de *video-tracking* que permitem captar e analisar facilmente o movimento dos organismos (Ahmad et al., 2012). Os parâmetros comportamentais são muito sensíveis pois respondem a concentrações muito baixas de químicos. Além disso, do ponto de vista ecológico, são muito relevantes pois alterações na capacidade de locomoção dos organismos podem acarretar limitações na capacidade de alimentação, de fuga a predadores e na reprodução comprometendo a viabilidade da espécie (Scott and Sloman, 2004; Wang et al., 2014). Os efeitos a nível comportamental podem ser mediados pela ação dos compostos químicos a nível metabólico, endócrino e, mais diretamente, a nível neuronal. Por essa razão, o comportamento tem emergido como um indicador de efeitos neurotóxicos (Henriques et al., 2016).

Neste trabalho foram estudados os efeitos comportamentais do composto 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA), uma amina aromática que é um importante precursor da síntese e degradação de vários herbicidas, como por exemplo o propanil, a atrazina e o diazinon (Giacomazzi and Cochet, 2004). Além disso é também um composto intermediário na produção de vários produtos como tintas e cosméticos. Como tal, é considerado um importante contaminante ambiental tendo por vezes maior toxicidade do que os herbicidas que lhe deram origem e sendo detetado em ambientes aquáticos mais frequentemente do que esses mesmos compostos (Yuan et al., 2017). Num estudo de monitorização realizado em rios da Alemanha e da Holanda detetaram-se concentrações até 680 ng L<sup>-1</sup> (European commission, 2006) enquanto que em poços numa região industrial em Itália detetaram-se concentrações entre 0.01 ng L<sup>-1</sup> e 0.09 ng L<sup>-1</sup> (Fattore et al., 1998).

O 3,4-DCA é também um composto de referência usado para mostrar teratogenicidade em embriões de peixe zebra (é geralmente usado como controlo positivo na concentração de 4 mg L<sup>-1</sup> no teste com embriões de peixe zebra). O objetivo deste trabalho foi assim estudar os efeitos comportamentais do 3,4-

DCA em ovos recém fertilizados de peixe zebra expostos ao composto durante 120 horas usando para isso o sistema de *video-tracking* Zebrabox o qual permite monitorizar a locomoção das larvas em períodos de luz e escuro. Os parâmetros utilizados foram a duração e a distância total do movimento, a duração e distância de movimentos lentos/inatividade, a duração e distância de movimentos rápidos e os ângulos de locomoção.

## METODOLOGIA

### 1. Condições de cultivo do peixe zebra e obtenção de ovos

Os organismos usados neste estudo foram provenientes do biotério de peixe zebra do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro. Os peixes zebra são mantidos em água filtrada por carbono ativado e membrana de osmose reversa, doravante designada água do sistema. A condutividade do meio é mantida a  $550 \pm 50 \mu\text{S cm}^{-1}$  e o pH a  $7,5 \pm 0,5$ . O teor de oxigénio dissolvido é mantido a 95% de saturação e a temperatura é  $28,0 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . O biotério tem um fotoperíodo controlado de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. Os peixes adultos são alimentados duas vezes por dia com alimento comercial (GEMMA micro 500). Para obter os ovos necessários ao teste, foi colocada uma camada de berlindes de aproximadamente 4 cm de altura no fundo do aquário, com a finalidade de evitar o canibalismo dos ovos pelos adultos. Os peixes zebra têm fecundação externa, sendo que a reprodução ocorre à primeira luz da manhã, a qual constitui um estímulo para fêmeas e machos executarem o ritual de acasalamento e libertarem os gâmetas. Após este processo, os peixes adultos e os berlindes são retirados cuidadosamente do aquário e os ovos (que são transparentes, esféricos e não mucilaginosos) são colhidos com o auxílio de um coador ou pipeta de Pasteur, lavados com água do sistema e triados no estereomicroscópio (microscópio estereoscópico - SMZ 1500, Nikon Corporation). Os ovos que não foram fecundados, que estão mortos ou que apresentam danos ou irregularidades são descartados.

### 2. Teste com embriões

O composto 3,4-DCA ( $\text{Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{NH}_2$ , pureza de 98%) foi adquirido na Sigma-Aldrich. Foram testadas várias concentrações do composto entre 0 e  $2 \text{ mg L}^{-1}$  obtidas através de diluições sucessivas em água do sistema. O ensaio foi repetido várias vezes para consistência dos resultados. O ensaio foi efetuado em placas de 24 poços sendo que em cada poço foi colocado um embrião (com 3 a 4 horas pós-fertilização) e 2 ml de solução teste de acordo com as normas da OECD (OECD, 2013) e trabalhos anteriores do grupo (Andrade et al., 2018). Cada poço foi considerado uma réplica independente e foram efetuadas 40 réplicas por concentração. Para evitar diluição excessiva da solução teste no poço aquando da transferência do embrião procedeu-se a um passo intermédio em que os embriões destinados a uma determinada concentração são primeiramente colocados numa placa de Petri contendo a respetiva solução teste e só então são transferidos para o respetivo poço. O teste foi mantido em condições controladas de temperatura e fotoperíodo (semelhantes às condições de cultura).

### 3. Análise comportamental

Após 5 dias de exposição ao 3,4-DCA, foi efetuada a análise do comportamento locomotor dos organismos expostos usando o equipamento Zebrabox (View Point, France) (Fig.1-A). Este sistema monitoriza o movimento individual de cada larva através de uma câmara de infravermelhos. Neste ensaio o movimento das larvas foi gravado durante 3 minutos de luz e 3 minutos de escuro. Tipicamente as larvas de peixe zebra apresentam pouca atividade à luz e respondem com um pico de hiperatividade após a passagem repentina para o escuro. Estas alterações repentinas de luminosidade funcionam como um fator de stress, um “susto” para os organismos (Fig. 1-B e C). Os parâmetros analisados foram a distância percorrida (mm) e a duração da natação (segundos). Foram ainda analisados os movimentos das larvas em diferentes categorias de velocidades (movimentos lentos/inatividade para movimentos <10 mm/s e movimentos rápidos para movimentos >10 mm/s). O ângulo da trajetória dos organismos fornece informação importante sobre o padrão de natação dos organismos: ângulos de baixa amplitude (Classe 4, Fig. 1-D) indicam trajetórias sem grandes mudanças de direção enquanto que ângulos de grande amplitude (Classe 1) indicam um modo de natação errático (em zig-zag) que normalmente é indicador de aumento de stress. Neste estudo foram usadas as seguintes classes de ângulos: Classe 1: de 90 a 180 e de -90 a -180°; Classe 2: de 50 a 90 e de -50 a -90°; Classe 3: de 25 a 50 e de -25 a -50°; Classe 4: de 25 a -25°.



FIGURA 1: A- Zebrabox; B- Representação esquemática do movimento das larvas de peixe zebra na luz; C- Representação esquemática do movimento das larvas de peixe zebra no escuro.

### 4. Análise estatística

Os valores de  $CL_x$  (concentração de efeito letal a x %) foram calculados através de uma regressão logística usando a função “*dose.p*” na biblioteca MASS do software R (R Core Team, 2014). Para determinar o efeito do 3,4-DCA nos parâmetros medidos foram efetuadas análises de variância (ANOVA) no programa Sigma Plot V.12.5 (Systat Software, 2014). Para discriminar diferenças em relação ao controlo o teste de comparações múltiplas de Dunnett foi efetuado. No caso dos dados não seguirem uma distribuição normal foi usado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. O nível de significância de 0,05 foi considerado para inferir a significância estatística.

## RESULTADOS

Ao fim de 96 horas de exposição ao 3,4-DCA foi observada alguma mortalidade nas concentrações mais altas do composto, nomeadamente 35% na concentração de 1 mg L<sup>-1</sup> e 100% na concentração de 2 mg L<sup>-1</sup>. Foi calculado um valor de CL<sub>50</sub> de 1,11 mg L<sup>-1</sup>

(Tabela I).

TABELA I: Valores de CL para a exposição de embriões de peixe zebra a 3,4-DCA durante 120 horas.

3,4 - DCA	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Erro padrão (mg L <sup>-1</sup> )
CL <sub>10</sub>	0,47	0,08
CL <sub>50</sub>	1,11	0,08
CL <sub>90</sub>	1,75	0,14

Em relação aos efeitos na locomoção, o 3,4-DCA teve um efeito inibidor da natação das larvas de peixe zebra especialmente nos períodos de luz. Tanto na distância total de natação (Fig 2-A) como no tempo total de natação (Fig 2-B) pode observar-se um padrão de inibição da atividade no período de luz, a qual é significativamente diferente do controlo nas duas concentrações mais altas (0,5 e 1 mg L<sup>-1</sup>). A distância percorrida em movimentos lentos (Fig 2-C) e a duração de movimentos lentos (Fig 2-D) seguem este mesmo padrão enquanto que para a distância percorrida em movimentos rápidos (Fig 2-E) e duração de movimentos rápidos (Fig 2-F) a inibição não é tão pronunciada e só é estatisticamente significativa na concentração mais alta (1 mg L<sup>-1</sup>). Os resultados dos testes estatísticos são apresentados na Tabela II.

No que diz respeito aos ângulos de locomoção (Fig 3) pode observar-se uma tendência de diminuição dos ângulos de menor amplitude (Classe 4) e uma tendência de aumento dos ângulos de maior amplitude (Classe 1), no entanto só no período de escuro as diferenças observadas são estatisticamente significativas (Tabela II).

TABELA II: Resultados da ANOVA para os parâmetros comportamentais analisados em períodos de luz e de escuro em larvas de peixe zebra expostas a 3,4-DCA durante 120 horas. Os valores de p com significância estatística encontram-se a negrito para facilitar a interpretação de resultados.

Parâmetro	Período de escuro		Período de luz		
	Valor de F <sup>a</sup> ou H <sup>b</sup>	Valor de p	Valor de F <sup>a</sup> ou H <sup>b</sup>	Valor de p	
<b>Distância</b>	<b>Total</b>	2,51	0,77	23,01	<b>&lt;0.001</b>
	<b>Movimentos lentos</b>	12	<b>0,03</b>	25,55	<b>&lt;0.001</b>
	<b>Movimentos rápidos</b>	1,71	0,89	24,67	<b>&lt;0.001</b>
<b>Tempo</b>	<b>Total</b>	25,68	<b>&lt;0.001</b>	22,79	<b>&lt;0.001</b>
	<b>Movimentos lentos</b>	5,7	0,34	20,28	<b>&lt;0.001</b>
	<b>Movimentos rápidos</b>	3,47	0,63	26,43	<b>&lt;0.001</b>
<b>Ângulos</b>	<b>Classe 1</b>	11,6	<b>0,02</b>	1,72	0,79
	<b>Classe 2</b>	3,62	0,46	1,07	0,9
	<b>Classe 3</b>	1,2	0,32	7,45	0,11
	<b>Classe 4</b>	13,11	<b>0,01</b>	1,44	0,84

<sup>a</sup> O valor de F corresponde ao valor do teste estatístico que é realizado na ANOVA paramétrica; <sup>b</sup> O valor de H corresponde ao valor do teste estatístico de Kruskal-Wallis, o equivalente não paramétrico ao teste de F.

## DISCUSSÃO

O composto 3,4-DCA apresentou um valor de  $CL_{50}$  de  $1,1 \text{ mg L}^{-1}$  para embriões de peixe zebra após 120 h de exposição. Na literatura são reportados valores de  $CL_{50}$  para peixe zebra entre as  $1,5$  e  $4,4 \text{ mg L}^{-1}$  (OECD, 2011). A ligeira disparidade de valores pode dever-se ao tempo de exposição mais longo usado no presente trabalho. Philippe et al. (2018) fez uma revisão da toxicidade aguda do 3,4-DCA em estádios larvares e juvenis de peixes tendo reportado um valor de  $CL_{50}$  de  $3,76 \text{ mg L}^{-1}$  para peixe zebra e valores entre  $3$  e  $9 \text{ mg L}^{-1}$  para outras espécies de peixes.

A nível subletal o 3,4-DCA mostrou interferir com a capacidade natatória das larvas de peixe zebra mesmo às menores concentrações testadas: o tempo total de natação sofreu alterações na concentração de  $0,0625 \text{ mg L}^{-1}$  enquanto que as proporções das diferentes classes de ângulos foram alteradas a  $0,125 \text{ mg L}^{-1}$ . Estas concentrações são mais elevadas do que as concentrações encontradas no ambiente (p. ex.  $0,68 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , (European commission, 2006)). No entanto ao contrário do presente trabalho, no ambiente os organismos sofrem exposições prolongadas aos compostos que poderão originar o mesmo tipo de efeitos.

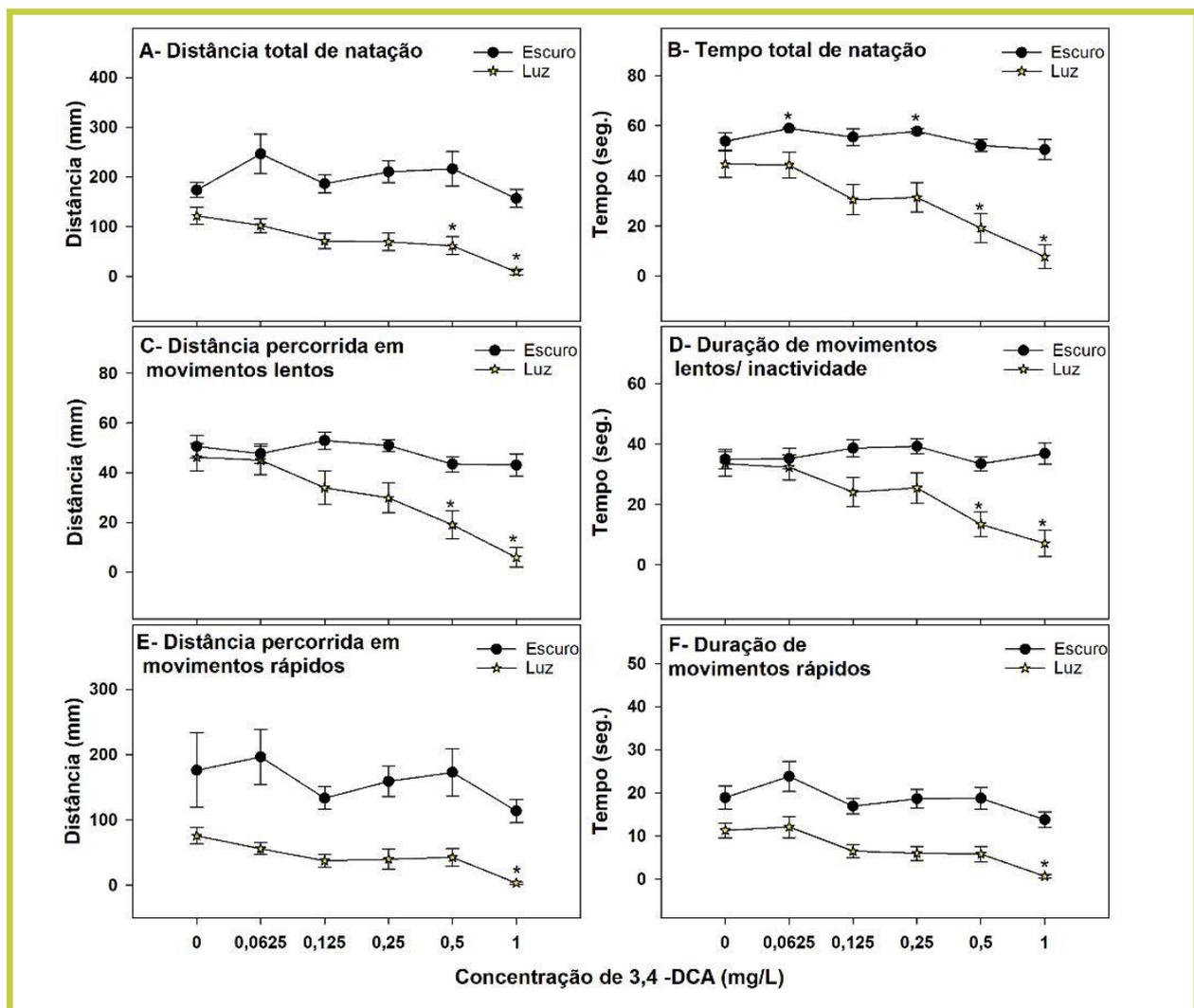


FIGURA 2: Parâmetros comportamentais (distância e tempo de natação) analisados em períodos de luz e de escuro em larvas de peixe zebra expostas a 3,4-DCA. Os símbolos representam a média e as barras de erro representam o erro padrão. Os asteriscos indicam concentrações cuja resposta foi significativamente diferente da do controle.

De um modo geral, o 3,4-DCA causou hipoatividade das larvas de peixe zebra nos períodos de luz enquanto que nos períodos de escuro observou-se uma tendência para a diminuição da percentagem de ângulos de menor amplitude (classe 4) e aumento da percentagem de ângulos de maior amplitude (classe 1). O aumento da percentagem de ângulos de classe 1 sugere que o composto provoca um padrão de natação errática, o que nos peixes pode ser considerado um comportamento indicativo de ansiedade (Almeida et al., 2019). Trata-se de uma dualidade de resposta: por um lado o 3,4-DCA promove hipoatividade das larvas durante o período de luz; por outro lado, promove comportamentos sugestivos de ansiedade durante o período de escuro.

Na literatura vários estudos têm reportado efeitos do 3,4-DCA a diferentes níveis. Por exemplo, em mamíferos o 3,4-DCA tem como alvo o sistema hematopoético causando meta-hemoglobinemia, anemia hemolítica e toxicidade para o baço (Monteiro et al., 2006). Em estádios embrionários de peixes tem sido reportada teratogenicidade, nomeadamente edemas cardíacos e do saco vitelínico em peixe zebra expostos a concentrações acima de 1 mg L<sup>-1</sup> (num período de exposição de 96 horas) (Scheil et al., 2009).

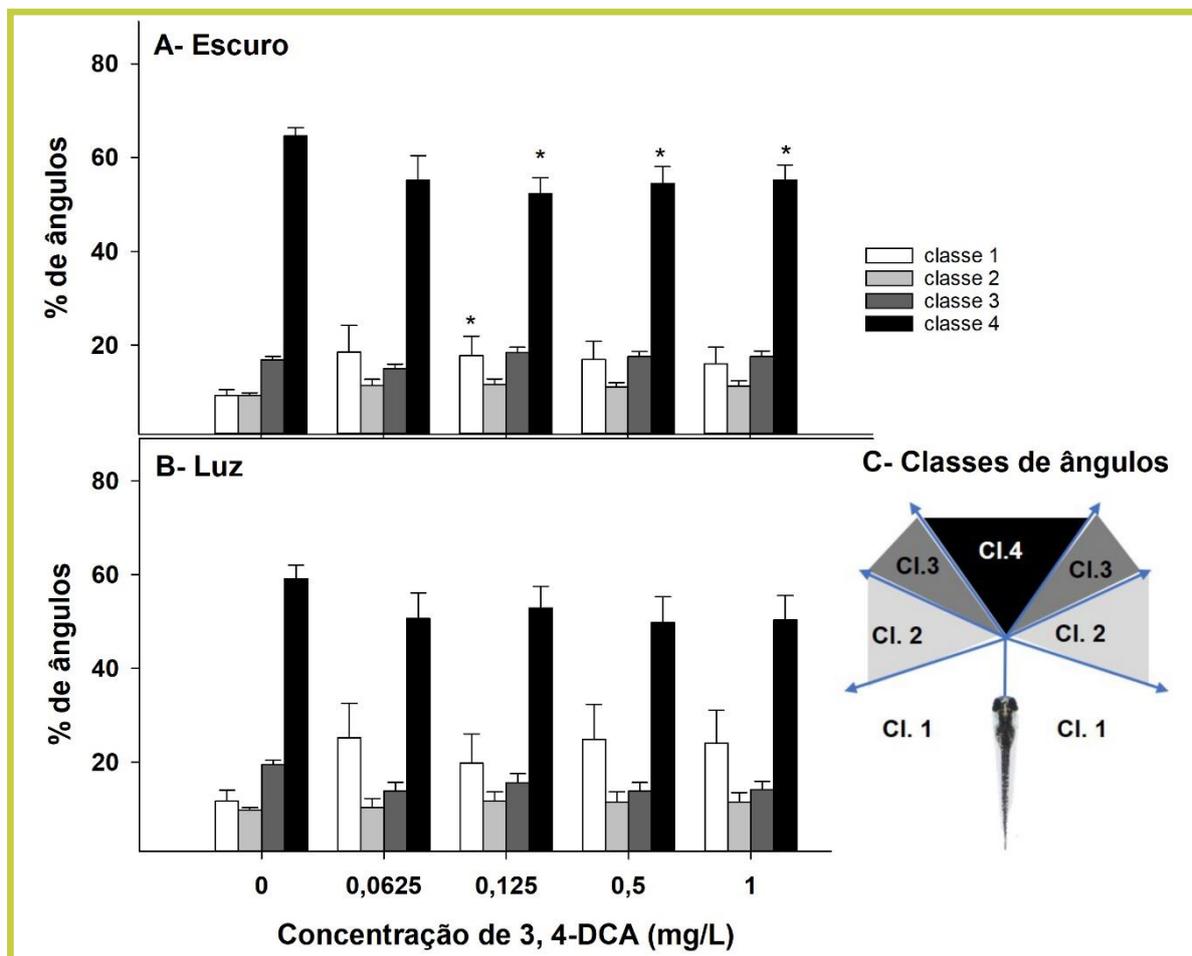


FIGURA 3: Percentagens das várias classes de ângulos de locomoção analisadas em períodos de luz e de escuro em larvas de peixe zebra expostas a 3,4-DCA. As barras representam a média e as barras de erro representam o erro padrão. Os asteriscos indicam concentrações cuja resposta foi significativamente diferente da do controle.

A nível bioquímico foi reportado para tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) após 7 dias de exposição a 40 e 200 ng L<sup>-1</sup> de 3,4-DCA, stress oxidativo, alteração de parâmetros relacionados com a biotransformação de tóxicos e resposta anti-oxidante (Felicio et al., 2018). A nível comportamental, Boscolo et al. (2018) observaram que machos de tilápia do nilo (*O. niloticus*) expostos durante 10 dias a 100 ng L<sup>-1</sup> de 3,4-DCA apresentaram uma diminuição do comportamento agressivo, diminuição dos níveis de dopamina e testosterona e aumento dos níveis de cortisol. Os autores sugerem que a redução do comportamento agressivo resulta da disrupção do sistema endócrino através da redução da produção de androgénios como responsável para as alterações comportamentais observadas. O mesmo efeito (redução da síntese de androgénios) foi observado em machos de *Gasterosteus aculeatus* tratados com concentrações entre 200 e 400 µg L<sup>-1</sup> de 3,4-DCA. Neste caso, foram observadas alterações nas características sexuais secundárias incluindo perda do comportamento de corte e da coloração usual dos machos (European commission, 2006). Em peixe zebra, foi observada uma redução do tempo total de natação (em concentrações acima de 0,5 mg L<sup>-1</sup>) em organismos expostos a 3,4-DCA durante 11 dias desde a fertilização (Scheil et al., 2009). Este último trabalho corrobora a hipoatividade observada no presente estudo em larvas de peixe zebra nos períodos de luz e é suportado por um dos principais mecanismos de ação atribuídos às anilinas, incluindo o 3,4-DCA, que é a narcose polar (Bradbury et al., 1989). A narcose é um mecanismo não específico de toxicidade que resulta na depressão da atividade biológica. A narcose polar ou do tipo II é provocada por exposição a compostos polares e manifesta-se por um primeiro momento de aumento de atividade antes de se verificar a depressão generalizada, descoordenação e ausência de resposta a estímulos característicos da narcose (Bradbury et al., 1989). Por outro lado, os resultados obtidos no período de escuro mostram a indução de comportamentos de ansiedade (natação errática) em resposta à súbita mudança de luminosidade, sugerindo diferentes modos de ação do composto. Este comportamento pode dever-se ao aumento dos níveis de cortisol, uma hormona de mediação da resposta ao stress (Petitjean et al., 2019). Esta hipótese é apoiada por trabalhos como o de Boscolo et al. (2018) que, como referido anteriormente, observou um aumento dos níveis desta hormona em tilápia do Nilo exposta a 3,4-DCA.

De futuro, para um melhor esclarecimento da ação do composto no comportamento das larvas de peixe zebra sugere-se um estudo da expressão génica após exposição. Além disso, deverão ser planeados ensaios que possam dar resposta a questões chave tais como: i) se há manutenção dos efeitos observados até à idade adulta e ii) quais as consequências a nível de funções de reprodução, alimentação, fuga a predadores, sociais e outras que possam comprometer o equilíbrio da espécie.

Os resultados do presente estudo, tanto a hipoatividade nos períodos de luz como a natação errática nos períodos de escuro, podem ter relevância ecológica e efeitos a nível da população, pois influenciam diretamente processos chave como a capacidade de alimentação e fuga a predadores. Os dados sugerem ainda que o 3,4-DCA, utilizado normalmente como controlo positivo para demonstrar teratogenicidade em ensaios FET (OECD, 2013) poderá também ser usado como controlo positivo para efeitos comportamentais, tendo para isso de se proceder a uma padronização e análise mais aprofundada destes parâmetros.

## CONCLUSÃO

Neste trabalho pretendeu-se estudar os efeitos comportamentais de 3,4-DCA em larvas de peixe zebra após uma exposição de 120 horas. Os resultados mostraram grande sensibilidade dos parâmetros comportamentais ao composto visto que foram detetadas alterações nas mais baixas concentrações testadas. Durante a monitorização comportamental observou-se hipoatividade das larvas (diminuição do tempo de natação) durante os períodos de luz e comportamentos sugestivos de ansiedade (natação errática) durante os períodos de escuro. Esta dualidade de respostas sugere diferentes modos de ação do composto a nível do sistema neuro-endócrino. Por um lado os efeitos depressores da atividade que decorrem da ação narcótica do 3,4-DCA e por outro os efeitos de ansiedade que podem decorrer do aumento dos níveis de cortisol. Os resultados deste trabalho sugerem assim efeitos importantes do 3,4-DCA a nível da população que devem ser tidos em consideração em análises de risco ambiental.

**agradecimentos** • São devidos agradecimentos à FCT/MCTES pelo apoio financeiro ao CESAM (UID/AMB/50017/2019) através de fundos nacionais. Inês Domingues foi financiada por fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito da celebração do contrato-programa previsto nos números 4, 5 e 6 do art. 23.º do D.L. n.º 57/2016, de 29 de agosto, alterado pela Lei n.º 57/2017, de 19 de julho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad F, Noldus LPJJ, Tegelenbosch RAJ, Richardson MK (2012). Zebrafish embryos and larvae in behavioural assays. *Behaviour*, 149, 1241–1281. <http://doi.org/10.1163/1568539X-00003020>
- Almeida AR, Tacão M, Machado AL, Golovko O, Zlabek V, Domingues I, Henriques I. (2019). Long-term effects of oxytetracycline exposure in zebrafish: A multi-level perspective. *Chemosphere*, 222, 333–344. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.147>
- Andrade TS, de Oliveira R, da Silva ML, Von Zuben MV, Grisolia CK, Domingues I, Caldas ED, Pic-Taylor, A (2018). Exposure to ayahuasca induces developmental and behavioral alterations on early life stages of zebrafish. *Chemico-Biological Interactions*, 293, 133–140. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.08.001>
- Andrade TS, Henriques JF, Almeida AR, Machado AL, Koba O, Giang PT, Soares AMVM, Domingues, I (2016). Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, 170, 390–399. <http://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2015.11.017>
- Boscolo CNP, Pereira TSB, Batalhão IG, Dourado PLR, Schlenk D, de Almeida EA (2018). Diuron metabolites act as endocrine disruptors and alter aggressive behavior in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere*, 191, 832–838. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.009>
- Bradbury SP, Carlson RW, Henry TR (1989). Polar Narcosis in Aquatic Organisms. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*, 12, 59–73. Retrieved from [http://works.bepress.com/steven\\_bradbury/49/](http://works.bepress.com/steven_bradbury/49/)
- Braunbeck T, Kais B, Lammer E, Otte J, Schneider K, Stengel D (2014). The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(21), 16247–61. doi: 10.1007/s11356-014-3814-7
- European commission (2006). *3,4-Dichloroaniline (3,4-DCA)- Risk Assessment Report*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. Retrieved from <https://echa.europa.eu/documents/10162/b41f2253-824c-48f8-b494-df54bd901e6a>
- Fattore E, Mèuller L, Davoli E, Castelli D, Benfenati E (1998). Industrial pollutants in ground waters from northern Milan. *Chemosphere*, 36(9), 2007–2017. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)10085-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)10085-6)
- Felicio AA, Freitas JS, Scarin JB, de Souza Ondei L, Teresa FB, Schlenk D, de Almeida EA (2018). Isolated and mixed effects of diuron and its metabolites on biotransformation enzymes and oxidative stress response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 149, 248–256. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.009>

- Giacomazzi S, Cochet N (2004). Environmental impact of diuron transformation : a review. *Chemosphere*, 56, 1021–1032. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.04.061>
- Goldberg AM, Drnec K (2003). Alternatives : Refinement , Reduction , and Replacement of Animal Use in the Life Sciences. In: Jann Hau, Gerard L Van Hooiser Jr (eds) Handbook of Laboratory Animal Science, Second Edition: Essential Principles and Practices. pp 539–545
- Henriques JF, Almeida AR, Andrade T, Koba O, Golovko O, Soares AMVM., Oliveira M, Domingues, I (2016). Effects of the lipid regulator drug gemfibrozil: A toxicological and behavioral perspective. *Aquatic Toxicology*, 170, 355–364. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.09.017>
- Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE (2005). Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicological Sciences*, 86(1), 6–19. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfi110>
- Monteiro M, Quintaneiro C, Pastorinho M, Pereira ML, Morgado F, Guilhermino L, Soares AMVM (2006). Acute effects of 3, 4-dichloroaniline on biomarkers and spleen histology of the common goby *Pomatoschistus microps*. *Chemosphere*, 62, 1333–1339. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.07.038>
- OECD (2013) Guideline for testing of chemicals. Test N236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, 236. Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD (2011) Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 157: Validation report (Phase 1) for the zebrafish embryo toxicity test Part I. Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Petitjean Q, Jean S, Gandar A, Cote J, Laffaille P, Jacquin L (2019). Stress responses in fish: From molecular to evolutionary processes. *Science of the Total Environment*, 684, 371–380. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.357>
- Philippe C, Gregoir AF, Thore ESJ, Brendonck L, De Boeck G, Pinceel T (2018). Acute sensitivity of the killifish *Nothobranchius furzeri* to a combination of temperature and reference toxicants (cadmium, chlorpyrifos and 3,4-dichloroaniline). *Environmental Science and Pollution Research*, 25(10, SI), 10029–10038. <http://doi.org/10.1007/s11356-018-1278-x>
- R Core Team (2014). R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Scheil V, Kienle C, Osterauer R, Gerhardt A, Kohler HR (2009). Effects of 3, 4-dichloroaniline and diazinon on different biological organisation levels of zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. *Ecotoxicology*, 18, 355–363. <http://doi.org/10.1007/s10646-008-0291-0>
- Scott GR, Sloman KA (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour : integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic toxicology*, 68, 369–392. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.016>
- Systat Software I (2014). SigmaPlot for Windows Version 12.5, G, Germany.
- Wang Y, Chen J, Du C, Li C, Huang C, Dong Q (2014). Characterization of retinoic acid-induced neurobehavioral effects in developing zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(2), 431–437. <http://doi.org/10.1002/etc.2453>
- Yuan Y, Zhang P, Schaeffer A, Schmidt B (2017). 3,4-Dichloroaniline revisited: A study on the fate of the priority pollutant in a sediment-water system derived from a rice growing region in Italy. *Science of the Total Environment*, 574, 1012–1020. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.099>