

ANA LUIZA FONSECA DESTRO

**ALTERAÇÕES NO STATUS OXIDATIVO DE PEIXES *Astyanax altiparanae*
SOB EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA A DOSES AMBIENTALMENTE RELEVANTES
DO HERBICIDA ATRAZINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

D477a Destro, Ana Luiza Fonseca, 1992-
2019 Alterações no status oxidativo de peixes *Astyanax altiparanae* sob exposição subcrônica a doses ambientalmente relevantes do herbicida atrazina / Ana Luiza Fonseca Destro. – Viçosa, MG, 2019.
xi, 18 f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Mariella Bontempo Duca de Freitas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 14-17.

1. Lambari (Peixe). 2. Produtos químicos agrícolas.
3. Radicais livres (Química). I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação
em Biologia Animal. II. Título.

CDD 22. ed. 597.48

ANA LUIZA FONSECA DESTRO


**ALTERAÇÕES NO STATUS OXIDATIVO DE PEIXES *Astyanax altiparanae*
SOB EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA A DOSES AMBIENTALMENTE RELEVANTES
DO HERBICIDA ATRAZINA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em Biologia
Animal, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 01 de Março de 2019.



Jener Alexandre Sampaio Zuanon



Mariáurea Matias Sarandy Souza



Mariella Bontempo Duca de Freitas
(Orientador)

DEDICATÓRIAS

À minha família,

Minha mãe, **Ione de Fátima Fonseca Destro**, que me deu apoio, base, e companheirismo durante todos os momentos difíceis.

Meu pai, **Luiz Santos Destro**, que acreditou em mim em todos os momentos, acima de qualquer dificuldade.

Minha irmã, **Letícia Destro**, que foi meu alicerce e meu espelho, cujo caminho vitorioso percorrido serviu de exemplo para que eu pudesse seguir o meu.

Ao amigo Rodolfo Ramos Pereira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo, a Deus.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Animal por toda a estrutura fornecida para que a pesquisa pudesse ser realizada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

Ao Setor de Piscicultura (DBA/UFV) pelos peixes cedidos.

Ao Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura pelo espaço cedido para a criação dos peixes e realização do experimento.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Mariella Bontempo Duca de Freitas, pela paciência, confiança e ensinamentos. Por ter acreditado na minha capacidade e por ainda acreditar.

Aos professores Dr Jener Alexandre Sampaio Zuanon e Dr^a Ana Lúcia Salaro, e a Dr^a Pollyanna de Moraes França Ferreira pelos conhecimentos e suporte com todo o trabalho realizado com peixes.

À Dr^a Jerusa Maria de Oliveira Amorim por ter me proporcionado todo o conhecimento que venho acumulando desde a graduação, quando entrei no laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros a 4 anos atrás. Por ser amiga, companheira, e professora desde os primórdios. Por ter me acompanhado todos os momentos, sanando minhas dúvidas, e rindo das minhas histórias. Tenho certeza que ganhei não só experiência profissional, mas também pessoal desde que iniciei minha trajetória ao seu lado.

Aos Prof. Dr. Leandro Licursi pela ajuda e conselhos profissionais relacionados à pesquisa. Por sempre me receber em sua sala de portas abertas, pronto a ajudar e sempre ajudando. A aluna e amiga Palloma Porto Almeida também sempre disposta a ajudar e a compartilhar bons momentos de conversa.

À Dr^a Mariáurea Matias Sarandy, pela ajuda de prontidão em todos os momentos do experimento.

As estagiárias Kemili Pio Gregório e Stella Bicalho Silva, pela ajuda e companhia nos cuidados com o experimento.

Aos amigos de laboratório Renata Maria Pereira de Freitas, Bárbara Silva Linhares, Anaísa Martins Marques, Pedro Henrique Costa Neves e Dr^a Susana Puga Ribeiro, pela ajuda, convívio e conversas tranquilizantes nos dias difíceis.

Aos Técnicos-administrativos do Departamento de Biologia Animal, principalmente ao Me. Adnilson Antônio Brasileiro, José Braz dos Santos Filho, Nilo Sérgio de Souza e Lúcia Helena Campos pelo grande auxílio desde a graduação até o mestrado.

Ao meu namorado Wynn di Pônzio, por me dar força e apoio. Por estar ao meu lado nos momentos mais complicados sempre disposto a ajudar no que for preciso. Por compartilhar conhecimento e entusiasmo pela Biologia Animal. E principalmente, por

todo respeito e entendimento em relação as dificuldades que a vida de pós-graduando oferece.

A amiga Leticia Valadares Ballotin pela companhia e amizade, principalmente aos sábados. As demais amigas da pós, entre elas Déborah Fantuzzi e Jheneze Guimarães Pereira Rocha pela amizade e ajuda.

Aos demais amigos, professores e familiares que se fazem sempre presente.

Aos peixes, por literalmente, tudo.

SUMÁRIO

Lista de tabelas	vi
Lista de figuras	vii
Resumo	viii
Abstract	x
CAPÍTULO 1: Alterações no status oxidativo de peixes <i>Astyanax altiparanae</i> sob exposição subcrônica a doses ambientalmente relevantes do herbicida atrazina	1
1. Introdução.....	2
2. Material e Métodos.....	4
2.1. Produtos químicos.....	4
2.2. Cuidados com os animais, sistema de exposição, e análises químicas.....	4
2.3. Estresse Oxidativo.....	5
2.4. Análises estatísticas.....	6
3. Resultados.....	8
4. Discussão.....	11
5. Conclusão.....	13
6. Referências Bibliográficas.....	14
Anexos	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis de malondialdeído (MDA), proteína carbonilada (PC) e óxido nítrico (NO) e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) e em brânquias de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) em diferentes grupos de tratamento.....8

Tabela 2. Níveis de malondialdeído (MDA), proteína carbonilada (PC) e óxido nítrico (NO) e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) e em fígado de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) em diferentes grupos de tratamento.....8

Tabela 3. Níveis de malondialdeído (MDA), proteína carbonilada (PC) e óxido nítrico (NO) e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) em testículo de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) em diferentes grupos de tratamento.....9

Tabela 4. Níveis de malondialdeído (MDA), proteína carbonilada (PC) e óxido nítrico (NO) e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) em músculo de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) em diferentes grupos de tratamento.....9

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: Resumo das diferenças dos marcadores oxidativos/nitrosativos e de atividade enzimática de brânquias, fígado, testículo e músculo de peixes lambaris contaminados com atrazina.....	8
---	---

RESUMO

DESTRO, Ana Luiza Fonseca, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2019. **Alterações no status oxidativo de peixes *Astyanax altiparanae* sob exposição subcrônica a doses ambientalmente relevantes do herbicida atrazina.** Orientador: Mariella Bontempo Duca de Freitas. Coorientadora: Reggiani Vilela Gonçalves

A Atrazina está entre os pesticidas mais utilizados no mundo. Sua alta solubilidade, aliada à meia-vida de 41-231 dias, a torna um potencial contaminante para o meio aquático devido à capacidade deste herbicida de atingir aquíferos naturais por meio de processos como a lixiviação. Embora seu uso seja proibido na Europa, no Brasil e nos Estados Unidos, a atrazina ainda é comercializada e encontrada em ambientes aquáticos, onde pode afetar organismos não-alvo, como vertebrados aquáticos silvestres. Nosso estudo teve como objetivo investigar os efeitos de uma exposição crônica à formulação comercial de atrazina (Atanor®) (ATZ) no sistema oxidativo de lambaris-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). Peixes adultos (8 meses pós-eclosão) foram alocados em 20 aquários de vidro (5 tratamentos; 4 replicatas por tratamento, N=20 por aquário) de 72 L e expostos por 30 dias a concentrações ambientalmente relevantes de atrazina: 0 (CTL), 0.5 (ATZ0.5), 1 (ATZ1), 2 (ATZ2) e 10 (ATZ10) µg/L. A formulação foi adicionada à água e a qualidade da água foi verificada semanalmente. Após esse período os animais foram eutanasiados com mesilato de triclaína (MS-222) e porções das brânquias, fígado, testículo e músculo foram retirados, pesados e armazenados a -80°C. Posteriormente foi feito um homogenato destes tecidos para análise da atividade de marcadores do estresse oxidativo tecidual, como a espécie reativa de oxigênio Óxido Nítrico (NO), as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST), e os produtos do estresse oxidativo malondialdeído (MDA) e proteína carbonilada (PC). As medias entre os grupos foram comparadas usando one-way ANOVA. Nossos resultados mostraram diminuição na atividade da enzima GST em todos os grupos em relação ao CTL em brânquias. No fígado, houve aumento na formação de MDA nos grupos ATZ 1,0 µg/L e ATZ 2 em relação ao controle e diminuição da CAT no grupo ATZ 2. No testículo, também houve aumento na atividade da enzima CAT no grupo ATZ 1 em relação ao controle. Em porções de músculos, também houve aumento na atividade de enzimas antioxidantes, porém a SOD é que se mostrou elevada no grupo ATZ1 em relação ao CTL. No músculo, houve aumento no MDA do grupo ATZ2 e na atividade de SOD no ATZ1 em relação ao controle.

Nossos resultados fornecem indícios de que concentrações ambientalmente relevantes de ATZ são suficientes para produzir alterações no balanço oxidativo tecidual de lambaris adultos com possíveis danos celulares. Embora todos os tecidos de animais expostos analisados tenham apresentado alterações em relação a animais não expostos, nossos resultados não são conclusivos e necessitam de mais análises para uma afirmação segura sobre a toxicidade do composto analisado.

ABSTRACT

DESTRO, Ana Luiza Fonseca, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2019. **Changes in the oxidative status of *Astyanax altiparanae* fish under subchronic exposure to environmentally relevant doses of the herbicide atrazine.** Advisor: Mariella Bontempo Ducan de Freitas. Co-advisor: Reggiani Vilela Gonçalves

Atrazine is among the most widely used pesticides in the world. Its high solubility, coupled with the life-time of 41-231 days, makes it a potential contaminant for the aquatic environment due to the herbicide's ability to reach natural aquifers through processes such as leaching. Although its use is banned in Europe, Brazil and the United States, atrazine is still marketed and found in aquatic environments where it can affect non-target organisms such as wild aquatic vertebrates. Our study aimed to investigate the effects of chronic exposure to the commercial atrazine (Atanor®) (ATZ) formulation on the oxidative system of yellow-tailed lambaris (*Astyanax altiparanae*). Adult fish (8 months after hatching) were allocated to 20 glass aquariums (5 treatments, 4 replicates per treatment, N = 20 per aquarium) of 72 L and exposed for 30 days to environmentally relevant concentrations of atrazine: 0 (CTL), 0.5 (ATZ0.5), 1 (ATZ1), 2 (ATZ2) and 10 (ATZ10) µg / L. The formulation was added to the water and the water quality was checked weekly. After this period the animals were euthanized with tricaine mesylate (MS-222) and portions of the gills, liver, testis and muscle were removed, weighed and stored at -80 ° C. Later, a homogenate of these tissues was made to analyze the activity of tissue oxidative stress markers, such as the reactive oxygen species Nitric Oxide (NO), the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST), and oxidative stress products malondialdehyde (MDA) and carbonylated protein (PC). The means between groups were compared using one-way ANOVA. Our results showed a decrease in GST enzyme activity in all groups in relation to CTL in gills. In the liver, there was an increase in MDA formation in the ATZ 1.0 µg / L and ATZ 2 groups in relation to the control and decrease of CAT in the ATZ 2 group. In the testis, there was also an increase in CAT activity in the ATZ 1 group in relation to control. In portions of muscles, there was also an increase in the activity of antioxidant enzymes, but SOD was shown to be elevated in the ATZ1 group in relation to CTL. In the muscle, there was an increase in the MDA of the ATZ2 group and in the SOD activity in the ATZ1 in relation to the control. Our results provide evidence that environmentally relevant concentrations of ATZ are sufficient to produce changes in the tissue oxidative balance

of adult lambaris with possible cellular damage. Although all the tissues of exposed animals tested showed alterations in relation to non-exposed animals, our results are not conclusive and require further analysis for a safe assertion about the toxicity of the compound analyzed.

CAPÍTULO 1

ALTERAÇÕES NO STATUS OXIDATIVO DE PEIXES *Astyanax altiparanae* SOB EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA À DOSES AMBIENTALMENTE RELEVANTES DO HERBICIDA ATRAZINA

INTRODUÇÃO

A atrazina (ATZ) (6-cloro-N-etil-NO-(1-metiletil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina) é um herbicida sintético do tipo triazina, usado em plantações como milho, sorgo e soja [1]. A ATZ é atualmente o segundo pesticida mais consumido no mundo, sendo o consumo anual entre 70000 e 90000 toneladas [2]. A meia-vida deste herbicida é de 41-231 dias [2], o que, aliado à moderada solubilidade [3], resulta em contaminação do meio aquático. Devido a essa possibilidade de contaminação e persistência do composto em ambiente aquático [4,5], no ano de 2003, a União Europeia anunciou o banimento da ATZ. No entanto, outras agências, como a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (USEPA), ainda autorizam o uso deste herbicida [6]. Independentemente de sua proibição em alguns locais, a ATZ é frequentemente encontrada nos aquíferos em valores maiores aos permitido. No Brasil, foi estabelecido o valor máximo permitido de 10 µg/L para águas utilizadas em irrigação, 5µg/L para uso na criação de animais [7] e 2 µg/L para potabilidade da água [8].

Não se sabe ao certo os efeitos da ATZ sobre a capacidade antioxidante de seres vivos, estudos anteriores sugerem que a ATZ inibe a atividade da ATP sintase mitocondrial, comprometendo o metabolismo energético em geral e consequentemente, aumentando os níveis de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (EROS/RNS) [9,10]. O equilíbrio no status oxidativo é fundamental para a preservação das condições ideais em tecidos de diversos organismos, inclusive os peixes, e desvios pró-oxidativos nos ajustes desse equilíbrio podem causar danos fisiológicos [11]. O excesso da produção de EROS/RNS em relação à capacidade antioxidante de um sistema pode acarretar aumento de doenças, comprometer funções essenciais fisiológicas e reduzir o tempo de vida [12]. Os EROS/RNS, como óxido nítrico (NO), podem ter sua produção aumentada em função de diversos fatores, dentre ele, a presença de xenobióticos no ambiente tais como os pesticidas [13]. Após serem produzidos, os sistemas de defesa antioxidante endógenos, como as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST), irão tentar neutralizar esses radicais e, se a defesa não for efetiva, os radicais reagem com ácidos graxos insaturados nas membranas gerando produtos de peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA), ou com as proteínas, formando produtos de oxidação nas cadeias laterais de aminoácidos, as proteínas carboniladas (PC) [11,14].

O aumento na produção de EROS/RNS pode ocasionar mudanças na capacidade antioxidante do animal. Em peixes, diversos biomarcadores de estresse oxidativo foram alterados em brânquias de curimatás e jundiás expostos à ATZ [15,16]. Alterações histopatológicas também já foram reportadas para brânquias de peixes expostos a este herbicida [15,17,18]. Outros tecidos como o fígado, músculos e testículo também têm função biológica importante e ainda não foram estudados completamente em peixes neotropicais expostos à ATZ. Além disso, poucos estudos envolvem concentrações ambientalmente relevantes e exposições crônicas do herbicida ATZ.

Devido ao contato direto, organismos aquáticos podem ser prejudicados pela ação tóxica de contaminantes como a ATZ. Este herbicida pode afetar a capacidade reprodutiva e diversos outros processos fisiológicos regulados por hormônios em organismos aquáticos, e por isso, é considerada um desregulador endócrino [19–21]. Os peixes, vertebrados aquáticos, são um dos principais modelos de estudos ecotoxicológicos devido a facilidade relacionada ao pequeno tamanho de muitas espécies, fecundidade, sensibilidade e manutenção em laboratório [22]. Estes animais vêm sendo estudados e já demonstraram alterações genotóxicas [23], citotóxicas [24], histopatológicas e bioquímicas [18,25,26] relativos à exposição a ATZ. O gênero *Astyanax* sp, conhecido popularmente como lambaris no Brasil são peixes de pequeno porte, endêmicos da região neotropical que possuem importância fundamental na cadeia alimentar sendo alimento de vários peixes de maior porte e outros animais. Além disso, possuem importância comercial como alimento e iscas em pesca esportiva [27]. Devido ao seu menor tamanho e facilidade de manutenção, alguns estudos ecotoxicológicos vêm utilizando lambaris como espécie neotropical alvo, dentre eles o lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) [28–32].

Desta forma, tivemos por objetivo investigar os efeitos sobre marcadores do estresse oxidativo tecidual após 30 dias de exposição por contato (água) a concentrações ambientalmente relevantes de ATZ em lambari-do-rabo-amarelo, um peixe neotropical.

MATERIAL E MÉTODOS

Toda a pesquisa foi aprovada e está de acordo com as normas do comitê de ética no uso de animais de produção da Universidade Federal de Viçosa sob protocolo nº 043/2017.

Preparo do herbicida

A formulação comercial Atrazina Atanor® contendo herbicida Atrazina (50%) foi adquirido do fabricante. Soluções estoques de concentração única de 7,5 µg/mL foram preparadas semanalmente. As soluções foram mantidas em frascos âmbar a 4° C. Dessa solução foram retirados 1, 2, 4 e 20 mL para cada 15 L de água, resultando nas concentrações alvo de 0,5, 1, 2 e 10 µg/L, respectivamente.

Cuidados com os animais, sistema de exposição, e análises químicas

Os peixes *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae) foram escolhidos por serem nativos, neotropicais, facilmente encontrados e criados em pisciculturas. Fêmeas e machos adultos de lambaris-do-rabo-amarelo (N= 400; peso corporal: 1,5-6,0 g) foram obtidos no setor de piscicultura do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa(UFV), trazidos para o Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura também na UFV e mantidos em tanques de 1000 L com aeração, sob fotoperíodo de 12:12 h claro:escuro, água desclorada, e temperatura de 26 ± 1°C. Os peixes foram alimentados com ração comercial extrusada com 32% de proteína bruta. Os animais ficaram em tanques de aclimatação por 6 semanas e posteriormente foram sexados, pesados e alocados aleatoriamente em aquários com 60 L de água (N=20 por aquário) onde foram aclimatados por mais 12 dias. O sistema de alocação dos peixes era semi-estático. A água repostada era desclorada e continha as concentrações referentes de cada tratamento. Os aquários não possuíam filtros para diminuir a interferência na concentração do herbicida. Foram formados 5 grupos de exposição, com 4 replicatas cada, denominados de acordo com a concentração da formulação do herbicida na água, sendo as concentrações 0,0 (CTR), 0,5 (ATZ0,5), 1,0 (ATZ1), 2,0 (ATZ2) e 10,0 µg/L (ATZ10). A temperatura foi medida diariamente mantendo os parâmetros da aclimatação, pH 7,0 – 7,2, amônia total < 2,0 ppm, oxigênio dissolvido 8 ± 2 ppm, foram medidos semanalmente por meio de kits comerciais. Cada aquário continha 2 refúgios feitos em canos de PVC, a fim de evitar o estresse de cativeiro e minimizar interações entre os animais.

No primeiro dia de exposição, houve mortalidade de 100% dos animais em um dos aquários (n=20) por possível contaminação por fungo. Em função da mortalidade ter sido restrita a este aquário, estando os demais 19 tanques com índices de sobrevivência acima de 95%, optamos por dar continuidade ao experimento.

Ao final da exposição, os animais foram eutanasiados com 500mg/L de MS-222. Os peixes eutanasiados foram dissecados. Para análise de estresse oxidativo foi feito pools de tecido, cada pool correspondia a 1 amostra totalizando 8 amostras por tratamento. Sendo assim os tecidos utilizados foram: gônada, músculo e brânquias de machos, e fígado de machos e fêmeas. Os tecidos removidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer -80° C até o dia da análise.

Perfil oxidativo

Para as análises de perfil oxidativo, 150 mg de fígado, músculo, brânquias e testículo foram homogeneizado (OMNI) em tampão fosfato de potássio (0,2 M, pH 7.4) com EDTA e centrifugado (13,8 g por 10 minutos a 4° C). O sobrenadante resultante foi utilizado para as análises dos níveis de óxido nítrico (NO), da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) e Malondialdeído (MDA). O precipitado foi utilizado para análise de Proteína Carbonilada (PC). As análises foram feitas em espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu) ou leitor de microplacas (Multiskan GO User Manual, Thermo Scientific, Ratastie 2 e Finlândia). Todas as análises foram feitas em duplicatas.

Marcadores oxidativos/nitrosativos

Análise de NO

A produção de nitrito/nitrato, subprodutos do NO, foi quantificada pela reação padrão de Griess [33]. Resumidamente, 50 µL de homogenato foram adicionados à volume igual de reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% N-(1-Naftil) etilenodiamina e 2,5% H₃PO₄) e incubados à temperatura ambiente durante 10 min. A absorbância foi mensurada a 540 nm em espectrofotômetro de microplacas. O resultado da conversão em concentrações micromolares do NO foi obtido a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (0 a 100 µM) e expressa em NO µmol/L.

Determinação de malondialdeído

A extensão da peroxidação lipídica (LPO) foi medida de acordo com Buege e Aust (1978)[34]. Análise mensura a formação do malondialdeído total (MDA), principal produto da peroxidação lipídica. Para isso, 0.2 ml do homogenato foram adicionados em 0.4 ml de uma solução de ácido tricloroacético (15%) / ácido tiobarbitúrico (0,375%) / ácido clorídrico (0,6%) e vortexado. A mistura foi deixada por 40 min em banho maria a 90°C. Depois de esfriar sobre o gelo, foi adicionado 0,6 ml de álcool butanol e o soluto foi vortexado por 2 min e centrifugado durante 10 min a 9000 g. A absorbância foi lida usando o sobrenadante a 535 nm em espectrofotômetro de varredura de microplacas. A concentração de MDA foi determinada usando curva padrão de concentrações conhecidas de 1,1,3,-tetrametoxipropano (TMPO). Os resultados foram expressos em µmol/L por mg de proteína.

Oxidação de proteínas

O teor de proteína carbonilada foi medido pelo método de Levine et al., (1994)[35]. Os precipitados resultantes dos homogeneizados de tecido das extrações anteriores foram usados para quantificação. Os precipitados foram suspensos com TCA a 10% gelado. Depois de centrifugado (5000 g durante 10 min a 4 ° C), foi retirado o sobrenadante e adicionado 0,5 ml de solução DNPH 10mmol/L diluída em ácido

clorídrico (7%), misturados em vortéx e mantidos à temperatura ambiente no escuro durante 30 min. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas, retirado o sobrenadante e adicionou-se 0,5 ml de TCA gelado a cada tubo, centrifugou-se (5000 g durante 10 min a 4 ° C) e rejeitou-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 1 mL de acetato de etilo e etanol (1: 1 v / v). O procedimento de lavagem repetiu-se três vezes. Finalmente, adicionou-se 1 ml de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 6%, centrifugou-se e mediu-se o sobrenadante por absorvância a 370 nm. Os resultados foram expressos em nmol por ml de proteína com base no coeficiente de extinção molar de $\epsilon_{370} = 22 \text{ mmol/L} \times \text{cm}$.

Enzimas antioxidantes

Atividade de superóxido dismutase

A atividade da SOD foi determinada adaptada segundo Dieterich et al. (2000)[36]. De forma resumida, 15 μL de pirogalo (100 $\mu\text{mol} / \text{L}$) em tampão fosfato (pH 8.0) foram adicionados a 99 μL de tampão fosfato de potássio (pH 8.0) e 30 μL de homogenato das amostras, as amostras foram incubadas por 10 minutos em estufa a 37° C. Foi adicionado 150 μL de dimetilsulfoxido (DMSO) para parar a reação. A absorvância (570 nm) foi mensurada em espectrofotômetro. A atividade da SOD foi calculada como unidades por miligrama de proteína, com um U de SOD definido como a quantidade que inibiu a taxa de auto-oxidação do pirogalo em 50%.

Atividade de Catalase

A atividade da catalase (CAT) foi determinada por adaptação do método Hadwan e Abed (2016) [37] usando H_2O_2 como substrato. Foi pipetado 100 μL de peróxido de hidrogênio (20mM) em 5 μL amostras. Após 3 minutos 150 μL molibdato de amônia (32,4 mmol/L) para interromper a reação. O branco das amostras foi feito substituindo o peróxido de hidrogênio por tampão pH fosfato de sódio e potássio (50mM, pH 7,0). A leitura foi feita 374 nm em espectrofotômetro. Para calcular o valor de CAT, foi feita uma curva padrão com a diluição seriada de albumina bovina. Os valores de teste foram subtraídos dos valores do teste controle, e usados para obter a concentração a partir da curva. A atividade da CAT foi expressa em U de CAT por mililitro.

Atividade da glutathione S-transferase

A atividade da glutathione S-transferase foi avaliada de acordo com a formação de 2,4-dinitroclorobenzeno conjugado com glutathione (CDNB)[38]. Adicionou-se 1 mmol / L de CDNB ao tampão contendo 1 mmol / L de GSH e a alíquota (10 μL) da amostra a ser testada. Após adição de CDNB, a alteração foi monitorizada com absorvância a 340 nm durante 90 s. O coeficiente de extinção molar usado para CDNB foi de $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mmol} / \text{L} \times \text{cm}$. Uma unidade de atividade de GST foi definida como a quantidade de enzima que catalisou a formação de um μmole de produto / min / ml. A atividade da GST foi expresso em $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{ml}$

Análise estatística

A distribuição normal dos dados foi determinada pelo teste de Shapiro-Wilk, utilizando o programa SigmaPlot (versão 12.0). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (Media \pm DP). Os dados foram submetidos à Análise de Variância unifatorial (ANOVA) seguida do teste post hoc de Duncann para comparações múltiplas. Quando a distribuição não foi considerada normal foi utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. A significância estatística foi estabelecida em 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Nas brânquias, foi observado uma queda na atividade da enzima GST (DF=4,28; F=9,864; p<0,001) no grupo ATZ0,5 µg/L (p<0,001), ATZ1 (p<0,001) e ATZ 2 (p<0,0001) e ATZ10 (p=0,013) em relação ao controle (Tabela 1). Não houve alteração nos outros biomarcadores analisados.

Tabela 1. Níveis de óxido nítrico (NO) (µmol/l), malondialdeído (MDA) (µmole/mg proteína) e proteína carbonilada (PC) (nmol/ml), e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) (U/mg proteína), catalase (CAT) (KU/ml) e glutathione S-transferase (GST) (µmol/min/ml) em brânquias de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) em diferentes grupos de tratamento.

Brânquias	Controle	ATZ0,5	ATZ1	ATZ2	ATZ10
NO	78,302±38,47	96,033±47,812	92,439±53,716	95,570±52,209	70,868±15,632
MDA	0,089±0,025	0,085±0,014	0,086±0,033	0,091±0,018	0,089±0,019
PC	3,864±1,255	3,497±2,027	4,274±1,705	3,436±0,573	4,214±0,3534
SOD	4,640±1,191	4,197±0,826	3,410±0,514	4,748±1,149	4,233±0,611
CAT	3,164±0,625	5,556±2,476	4,465±1,956	3,523±1,482	6,381±3,107
GST	1,198±0,287	0,677±0,079*	0,716±0,288*	0,396±0,210*	0,871±0,172*

Resultados estão representados como Média ± SD. * Diferenças significantes entre grupos tratados e controle (p < 0.05)

No fígado, houve diminuição na atividade da catalase (CAT) (DF=4,28; F=5,368 p=0,002) no grupo ATZ 2 (p = 0,003) houve aumento na formação de malondialdeído (MDA) (DF= 4, 27; F= 4,716; p=0,005) nos grupos ATZ1 (p=0,020) e ATZ2 µg/L (p=0,008) em relação ao controle (Tabela 2). Não houve alteração nos outros biomarcadores analisados.

Tabela 2. Níveis de óxido nítrico (NO) (µmol/l), malondialdeído (MDA) (µmol/mg proteína) e proteína carbonilada (PC) (nmol/ml), e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) (U/mg proteína), catalase (CAT) (KU/ml) e glutathione S-transferase (GST) (µmol/min/ml) em fígado de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) em diferentes grupos de tratamento.

Fígado	Controle	ATZ 0,5	ATZ1	ATZ2	ATZ 10
NO	401,560±94,516	400,260±87,283	399,026±90,585	377,083±48,022	383,929±46,143
MDA	0,042±0,009	0,052±0,003	0,068±0,013*	0,071±0,022*	0,057±0,011
PC	4,081±1,319	3,755±2,052	2,439±1,142	2,578±1,001	2,839±1,253
SOD	4,640±1,191	4,197±0,826	3,410±0,514	4,748±1,149	4,233±0,611
CAT	110,9±20,50	121,300±10,340	110,400±12,670	91,280±23,600*	120,000±9,940
GST	5,030±2,673	4,844±1,751	4,089±0,8122	3,021±1,127	5,243±0,777

Resultados estão representados como Média ± SD. * Diferenças significantes entre grupos tratados e controle (p < 0.05)

Nas testículo houve aumento na atividade da enzima catalase (CAT) (DF(4,28); F=3,533; p=0,019) no grupo ATZ1 µg/L (p = 0,0405) em relação ao controle (Tabela

3). Os demais biomarcadores analisados para esse órgão não demonstraram alterações em relação ao controle.

Tabela 3. Níveis de óxido nítrico (NO) ($\mu\text{mol/l}$), malondialdeído (MDA) ($\mu\text{mole/mg}$ proteína) e proteína carbonilada (PC) (nmol/ml) e atividade das enzimas antioxidantes superoxide dismutase (SOD) (U/mg proteína), catalase (CAT) (KU/ml) e glutathione S-transferase (GST) ($\mu\text{mol/min/ml}$) em testículo de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) em diferentes grupos de tratamento.

Gônada	Controle	ATZ0,5	ATZ1	ATZ2	ATZ10
NO	267,619 \pm 141,314	278,730 \pm 44,023	280,714 \pm 137,396	355,714 \pm 59,285	262,177 \pm 96,281
MDA	0,035 \pm 0,007	0,037 \pm 0,009	0,033 \pm 0,007	0,041 \pm 0,007	0,036 \pm 0,004
PC	149,326 \pm 27,670	127,836 \pm 44,452	159,238 \pm 18,861	118,607 \pm 64,506	147,287 \pm 34,887
SOD	4,826 \pm 1,359	5,424 \pm 2,018	4,054 \pm 1,055	4,535 \pm 1,370	5,253 \pm 1,295
CAT	5,770 \pm 1,098	5,760 \pm 0,894	8,079\pm1,832*	7,448 \pm 1,456	7,219 \pm 1,450
GST	3,772 \pm 1,601	2,753 \pm 1,360	3,613 \pm 1,468	3,250 \pm 1,886	2,694 \pm 0,531

Resultados estão representados como Média \pm SD. * Diferenças significantes entre grupos tratados e controle ($p < 0.05$)

Já para músculo, houve aumento na formação de MDA (DF= 4,31; F=3,324; $p=0,022$) no grupo ATZ2 ($p=0,033$). Houve aumento na atividade de SOD (DF=4,33; F=3,757; $p=0,013$) no grupo ATZ1 $\mu\text{g/L}$ ($p=0,005$) (Tabela 4) e para os demais biomarcadores analisados, não foi observado alterações estatísticas.

Tabela 4. Níveis de óxido nítrico (NO) ($\mu\text{mol/l}$), malondialdeído (MDA)($\mu\text{mol/mg}$ proteína) e proteína carbonilada (PC) (nmol/ml) e atividade das enzimas antioxidantes superoxide dismutase (SOD) (U/mg proteína), catalase (CAT) (KU/ml) e glutathione S-transferase (GST) ($\mu\text{mol/min/ml}$) em músculo de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) em diferentes grupos de tratamento.

Músculo	Controle	ATZ0,5	ATZ1	ATZ2	ATZ10
NO	19,560 \pm 11,720	16,630 \pm 5,521	15,070 \pm 1,071	13,780 \pm 6,364	17,020 \pm 5,849
MDA	0,108 \pm 0,023	0,111 \pm 0,017	0,119 \pm 0,019	0,134\pm0,183*	0,095 \pm 0,021
PC	1,242 \pm 0,450	1,057 \pm 0,869	0,893 \pm 0,294	0,966 \pm 0,821	0,628 \pm 0,323
SOD	1,603 \pm 0,274	2,181 \pm 0,553	3,434\pm1,293*	2,496 \pm 0,693	2,108 \pm 0,982
CAT	3,389 \pm 3,056	1,509 \pm 0,7952	1,761 \pm 0,8214	3,419 \pm 2,089	2,776 \pm 2,487
GST	0,856 \pm 0,287	0,692 \pm 0,208	0,879 \pm 0,407	0,660 \pm 0,350	0,625 \pm 0,242

Resultados estão representados como Média \pm SD. * Diferenças significantes entre grupos tratados e controle ($p < 0.05$)



Fig. 1: Resumo das diferenças dos marcadores oxidativos/nitrosativos ou atividade enzimática de brânquias, fígado, testículo e músculo de peixes lambaris contaminados com atrazina

DISCUSSÃO

Este estudo avaliou os efeitos da exposição crônica a concentrações ambientalmente relevantes de ATZ sobre marcadores do estresse oxidativo tecidual em lambaris-do-rabo-amarelo adultos, a fim de se investigar se mesmo baixas concentrações alteram o balanço oxidativo tecidual nesta espécie neotropical, que inclusive apresenta interesse comercial.

Em nosso trabalho, foram observadas alterações de diversos biomarcadores oxidativos em todos os tecidos analisados. No entanto, essas alterações variaram entre os tecidos analisados, conforme a concentração e o biomarcador.

Nas brânquias dos peixes deste estudo foram observadas a diminuição da atividade enzimática da GST nos grupos exposto a todas as concentrações de ATZ. A queda na atividade da enzima GST em brânquias e outros órgãos de animais expostos a altas doses de ATZ já foi relatada e estudada em *Cyprinus carpio L* [39] e uma das hipóteses levantadas pelo estudo é de que a ATZ pode exercer ação direta sobre a enzima ou sobre a regulação de genes relacionados. Entre fígado, cérebro, rim e brânquias, as brânquias foi o que demonstrou os menores valores de expressão de mRNA relativo a classes de GST e é possível que por isso ela seja mais sensível à quedas na atividade dessa enzima, sendo a única que apresentou resultados estatísticos em nosso estudo [39]. Apesar das alterações nas enzimas antioxidantes, não foi observada nenhuma diferença em relação ao MDA, PC e NO em animais expostos. As brânquias estão em contato contínuo e direto com a água e contaminantes aquáticos, isso confere a esse órgão um sistema de defesa eficiente [12] que, possivelmente, protegeu as células de danos maiores como carbonilação de proteínas e oxidação lipídica.

No fígado dos peixes deste estudo não houve alteração nos níveis de NO e nem das atividades das enzimas GST e SOD. Houve diminuição na atividade da CAT no grupo ATZ2, mesmo resultado foi encontrado em fígado de *Prochilodus lineatus*, um peixe também neotropical, nas concentrações 2,0 e 10,0 µg/L, por 24 e 48h[40], o tempo prolongado de exposição pode ter sido um fator importante na ausência de resultados na concentração de 10,0 µg/L. Nós encontramos um aumento nos níveis de MDA nos grupos expostos a concentração 1.0 e 2.0 µg/L, e isso reforça a teoria de que baixas doses de ATZ a uma exposição subcrônica pode ocasionar danos hepáticos. A exposição a longo tempo a um tóxico pode acarretar, entre outras consequências, ao retorno dos níveis de defesa antioxidantes à uma faixa estacionária[12]. Portanto, a ausência de resultados mais conclusivos pode se dar pela exposição prolonga. Nossos resultados vão de acordo com o estudo realizado com peixes africanos *Clarias gariepinus* [41] expostos por 28 dias a concentrações de 7, 7,5, 8 e 8,5 µg/L de ATZ que obtiveram aumento dos níveis de MDA no fígado.

Apesar de estudos demonstrarem que a ATZ pode comprometer a função reprodutiva de peixes [42–44], em testículos dos lambaris expostos, houve aumento da atividade de CAT apenas para os animais expostos a concentração 1.0 µg/L de ATZ. Não houve diferença para os outros biomarcadores. Aumentos na atividade da enzima CAT já foi relatado para doses LC₅₀ de ATZ em fígado de *Channa Punctatus*, esse aumento foi acompanhado por um aumento na atividade da SOD [45]. Além

disso, a concentrações de 10 e 100 µg/L de ATZ por 11 dias diminuíram a expressão gênica relacionada com a SOD e reparo de DNA em testículo de peixe-zebra [44]. No entanto, nosso estudo avalia concentrações mais baixas e prolongadas, que podem não ter sido suficiente para ocasionar grandes danos, ou pode ter induzido homeostase redox.

No músculo dos animais expostos a concentração 1.0 µg/L de ATZ houve aumento da atividade da enzima SOD. As outras enzimas CAT e GST, ambas complementares à atividade da SOD, não demonstraram diferença entre as exposições, assim como os níveis de NO e PC. No entanto, houve aumento nos níveis de MDA em músculo de animais expostos a 2 µg/L. O aumento nos níveis de MDA no músculo são indícios de dano na membrana celular e já foram relatados para *Cyprinus carpio* coletadas em ambientes com contaminação por simazina, um herbicida da mesma classe que a atrazina [46].

CONCLUSÃO

Nosso estudo apresenta indícios que concentrações baixas e ambientalmente relevantes 0.5, 1.0, 2.0 e 10.0 µg/L de ATZ podem interferir no status oxidativo de brânquias, fígado, músculo e testículo de peixe neotropicais sobre exposição crônica. O músculo, assim como fígado também demonstrou ser afetado pela ATZ. No entanto, nossos resultados não são conclusivos e necessitam de mais análises e mais pesquisas para confirmar o grau de citotoxicidade e como ela age no status oxidativo do animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lizotte R, Locke M, Bingner R, Steinriede RW, Smith S. 2017. Effectiveness of Integrated Best Management Practices on Mitigation of Atrazine and Metolachlor in an Agricultural Lake Watershed. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 98:447–453.
2. Singh S, Kumar V, Chauhan A, Datta S, Wani AB, Singh N, Singh J. 2018. Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. *Environ. Chem. Lett.* 16:211–237.
3. ZHOU Q, PANG L, XIE G, XIAO J, BAI H. 2009. Determination of Atrazine and Simazine in Environmental Water Samples by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction with High Performance Liquid Chromatography. *Anal. Sci.* 25:73–76.
4. Sass JB, Colangelo A. 2006. European Union bans atrazine, while the United States negotiates continued use. *Int. J. Occup. Environ. Health.* 12:260–267.
5. AlMBERG KS, Turyk ME, Jones RM, Rankin K, Freels S, Stayner LT. 2018. Atrazine contamination of drinking water and adverse birth outcomes in community water systems with elevated atrazine in Ohio, 2006–2008. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 15:12–15.
6. Mahía J, Martín A, Carballas T, Díaz-Raviña M. 2007. Atrazine degradation and enzyme activities in an agricultural soil under two tillage systems. *Sci. Total Environ.* 378:187–194.
7. CONAMA. 2008. RESOLUÇÃO CONAMA nº396,. *Qual. DA ÁGUA.*
8. MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2017. *Portaria de Consolidação nº 5:*360.
9. Hase Y, Tatsuno M, Nishi T, Kataoka K, Kabe Y, Yamaguchi Y, Ozawa N, Natori M, Handa H, Watanabe H. 2008. Atrazine binds to F1F0-ATP synthase and inhibits mitochondrial function in sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366:66–72.
10. Figueira FH, Aguiar LM de, Rosa CE da. 2017. Embryo-larval exposure to atrazine reduces viability and alters oxidative stress parameters in *Drosophila melanogaster*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 191:78–85.
11. Sies H, Berndt C, Jones DP. 2017. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* 86:715–748.
12. Lushchak VI. 2016. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiol. Biochem.* 42:711–747.
13. Pisoschi AM, Pop A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* 97:55–74.

14. Bar-Or D, Bar-Or R, Rael LT, Brody EN. 2015. Oxidative stress in severe acute illness. *Redox Biol.* 4:340–345.
15. Paulino MG, Souza NES, Fernandes MN. 2012. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80:6–13.
16. Mela M, Guiloski IC, Doria HB, Randi MAF, De Oliveira Ribeiro CA, Pereira L, Maraschi AC, Prodocimo V, Freire CA, Silva de Assis HC. 2013. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 93:13–21.
17. Jayachandran K, Pugazhendy K. 2009. Histopathological Changes in the Gill of *Labeo rohita* (Hamilton) Fingerlings Exposed to Atrazine. *Am. J. Sci. Res.* 4:219–221.
18. Khoshnood Z, Jamili S, Khodabandeh S. 2015. Histopathological effects of atrazine on gills of Caspian kutum *Rutilus frisii kutum* fingerlings. *Dis. Aquat. Organ.* 113:227–234.
19. Gomes ID, Nascimento AA, Sales A, Araújo FG. 2012. Can fish gill anomalies be used to assess water quality in freshwater Neotropical systems? *Environ. Monit. Assess.* 184:5523–5531.
20. Omran NE, Salama WM. 2013. The endocrine disruptor effect of the herbicides atrazine and glyphosate on *Biomphalaria alexandrina* snails. *Toxicol. Ind. Health.* 32:656–665.
21. McMahon TA, Boughton RK, Martin LB, Rohr JR. 2017. Exposure to the Herbicide Atrazine Nonlinearly Affects Tadpole Corticosterone Levels. *J. Herpetol.* 51:270–273.
22. Law JM. 2004. Issues Related to the Use of Fish Models in Toxicologic Pathology: Session Introduction. *Toxicol. Pathol.* 31:49–52.
23. Cavas T. 2011. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. *Food Chem. Toxicol.* 49:1431–1435.
24. Sai L, Dong Z, Li L, Guo Q, Jia Q, Xie L, Bo C, Liu Y, Qu B, Li X, Shao H, Ng JC, Peng C. 2016. Gene expression profiles in testis of developing male *Xenopus laevis* damaged by chronic exposure of atrazine. *Chemosphere.* 159:145–152.
25. Michael PO. 2018. Toxicity effect of atrazine on histology , haematology and biochemical indices of *Clarias gariepinus*. 6:87–92.
26. Oliveira SE, Costa PM, Nascimento SB, Castro WV, Ribeiro RIM de A, Santos HB, Thomé RG. 2018. Atrazine promotes immunomodulation by melanomacrophage centre alterations in spleen and vascular disorders in gills from *Oreochromis niloticus*. *Aquat. Toxicol.* 202:57–64.

27. Barassa B, Cordeiro NS, Arana S. 2003. A New Species of *Henneguya*, a Gill Parasite of *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae) from Brazil, with Comments on Histopathology and Seasonality. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98:761–765.
28. dos Santos DCM, do Carmo Cupertino M, da Matta SLP, de Oliveira JA, dos Santos JAD. 2015. Histological alterations in liver and testis of *Astyanax aff. bimaculatus* caused by acute exposition to zinc. *Rev. Ceres.* 62:133–141.
29. Marcon L, Mounteer AH, Bazzoli N, Benjamin L dos A. 2016. Effects of insecticide Thiodan® on the morphology and quantification of ovarian follicles in lambaris *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) in different treatments. *Aquac. Res.* 47:2407–2418.
30. Turek JA, Noleto RB. 2017. Efeitos citotóxicos de um herbicida a base de glifosato no peixe *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski , 2000.:6–12.
31. Cimbaluk GV, Ramsdorf WA, Perussolo MC, Santos HKF, Da Silva De Assis HC, Schnitzler MC, Schnitzler DC, Carneiro PG, Cestari MM. 2018. Evaluation of multiwalled carbon nanotubes toxicity in two fish species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 150:215–223.
32. Fernandes K, Gomes A, Calado L, Yasui G, Assis D, Henry T, Fonseca A, Pinto E. 2019. Toxicity of Cyanopeptides from Two *Microcystis* Strains on Larval Development of *Astyanax altiparanae*. *Toxins (Basel).* 11:220.
33. Tsikas D. 2007. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 851:51–70.
34. John BA, D AS. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52:302–310.
35. Levine Rodney L, Williams Joy A, Stadtman Earl P, Shacter Emily. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233:346–357.
36. Prestle J, Dieterich S, Bieligg U, Beulich K, Hasenfuss G. 2000. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart - Increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation.* 101:33–39.
37. Hadwan MH, Abed HN. 2016. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data Br.* 6:194–199.
38. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249:7130–9.
39. Xing H, Wang X, Sun G, Gao X, Xu S, Wang X. 2012. Effects of atrazine and chlorpyrifos on activity and transcription of glutathione S-transferase in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33:233–244.

40. Santos TG, Martinez CBR. 2012. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. *Chemosphere*. 89:1118–1125.
41. Owolabi OD, Omotosho JS. 2018. Atrazine-Mediated Oxidative Stress Responses and Lipid Peroxidation in the Tissues of *Clarias gariepinus*. *Iran. J. Toxicol.* 11:29–38.
42. Nascimento CRB, Souza MM, Martinez CBR. 2012. Copper and the herbicide atrazine impair the stress response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 155:456–461.
43. Weber GJ, Sepúlveda MS, Peterson SM, Lewis SS, Freeman JL. 2013. Transcriptome Alterations Following Developmental Atrazine Exposure in Zebrafish Are Associated with Disruption of Neuroendocrine and Reproductive System Function, Cell Cycle, and Carcinogenesis. *Toxicol. Sci.* 132:458–466.
44. Bautista FEA, Varela Junior AS, Corcini CD, Acosta IB, Caldas SS, Primel EG, Zanette J. 2018. The herbicide atrazine affects sperm quality and the expression of antioxidant and spermatogenesis genes in zebrafish testes. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 206–207:17–22.
45. Nwani CD, Lakra WS, Nagpure NS, Kumar R, Kushwaha B, Srivastava SK. 2010. Toxicity of the Herbicide Atrazine: Effects on Lipid Peroxidation and Activities of Antioxidant Enzymes in the Freshwater Fish *Channa Punctatus* (Bloch). *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 7:3298–3312.
46. Oropesa A-L, García-Camero JP, Soler F. 2009. Glutathione and malondialdehyde levels in common carp after exposure to simazine. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 27:30–38.

ANEXO

Anexo 1 – Certificado de aprovação do comitê de ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO
CEUAP/UFV

Campus Universitário – Viçosa, MG – 36570-900 – Telefone: (31) 3899.3275 – e-mail: ceuap@ufv.br – site: www.ceuap.ufv.br

Viçosa, 04 de Out. de 2017

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da ação desreguladora endócrina do herbicida atrazina no crescimento, desenvolvimento e reprodução de peixes: lambaris (*Astyanax altiparanae*) como espécie nativa de modelo experimental", protocolo nº 043/2017, sob a responsabilidade de Mariella Bontempo Freitas - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo conselho nacional de controle da experimentação animal (concea), e foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais de produção da universidade federal de viçosa (ceuap-ufv) em reunião de 18 de Ago. de 2017.

Finalidade: Pesquisa Ensino

Vigência do Projeto: de 04 de Out. de 2017 a 01 de Out. de 2019

Espécie/linhagem: Peixes (*Astyanax altiparanae*) Nº de animais: 600

Peso: 1,6 g Idade: 30 dias Sexo: "-----" Origem: Setor de Piscicultura/UFV - CPF/CNPJ: 25.944.455/0001-96

CERTIFICATE

We certify that the project entitled "Potential endocrine-disrupting effects of atrazine on fish growth, development and reproduction: the yellowtail tetra (*Astyanax altiparanae*) as a native fish model", protocol nº 043/2017, under the responsibility of Mariella Bontempo Freitas - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum chordata, subphylum vertebrata (except man), for scientific research purposes (or education) - is in accordance with the law nº. 11.794, of October 8, 2008, Decree nº. 6899 of July 15, 2009, and the rules issued by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and was approved by the Ethics Commission on the use of farm animals of Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) in its meeting on Aug, 18th, 2017.

Finality: Research Education

Duration of the Project: from Oct, 04th, 2017 to Oct, 01st, 2019.

Species / strain: Fish (*Astyanax altiparanae*) Nº of animals: 600

Weight: 1,6 g Age: 30 days Sex: "-----" Source: Setor de Piscicultura/UFV - CPF/CNPJ: 25.944.455/0001-96

Luciana Navajas Rennó
Coordenadora da CEUAP/UFV