

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

STELLA BICALHO SILVA

**EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO HERBICIDA ATRAZINA SOBRE O BALANÇO
OXIDATIVO, REGULAÇÃO HORMONAL E DESEMPENHO PRODUTIVO DE
JUVENIS *Astyanax altiparanae***

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2021**

STELLA BICALHO SILVA

**EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO HERBICIDA ATRAZINA SOBRE O BALANÇO
OXIDATIVO, REGULAÇÃO HORMONAL E DESEMPENHO PRODUTIVO DE
JUVENIS *Astyanax altiparanae***

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*.

Orientador: Mariella Bontempo Duca de Freitas

Coorientadores: Jener Alexandre Sampaio Zuanon
Reggiani Vilela Gonçalves
Ana Lúcia Salaro

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586e
2021
Silva, Stella Bicalho, 1995-
Efeitos toxicológicos do herbicida atrazina sobre o balanço oxidativo, regulação hormonal e desempenho produtivo de juvenis *Astyanax altiparanae* / Stella Bicalho Silva. – Viçosa, MG, 2021.
37 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Mariella Bontempo Duca de Freitas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 33-37.

1. *Astyanax altiparanae*. 2. Herbicidas. 3. Toxicologia ambiental. 4. Stresse oxidativo. 5. Hormônios. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. II. Título.

CDD 22. ed. 597.48

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB6/2552

STELLA BICALHO SILVA

**EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO HERBICIDA ATRAZINA SOBRE O BALANÇO
OXIDATIVO, REGULAÇÃO HORMONAL E DESEMPENHO PRODUTIVO DE
JUVENIS *Astyanax altiparanae***

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: 18 de junho de 2021.

Assentimento:



Stella Bicalho Silva

Autora



Mariella Bontempo Duca de Freitas

Orientadora

*A **Deus**, por me conceder força, sabedoria e perseverança. Aos meus **familiares** por me motivarem e acreditarem de forma imparável em meu potencial.
A toda **comunidade científica** pelo conhecimento compartilhado.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Durante este tempo somei agradecimentos a pessoas que foram de fundamental importância para a execução, conquista e sucesso deste trabalho.

Agradeço infinitamente a **Deus** por toda força, proteção e amparo sem igual.

À **Universidade Federal de Viçosa (UFV)** e ao **Departamento de Biologia Animal (DBA)**, pela contribuição em minha formação profissional, subsidiando toda a pesquisa e oferecendo recursos de qualidade.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de estudos, código de financiamento 001, e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)** pelo financiamento concedido.

Aos **Laboratórios de Ecofisiologia de Quirópteros (LEQ)** e de **Fisiologia Aplicada à Piscicultura (LAFAP)** por me acolherem como membro, possibilitando a realização das atividades experimentais.

À minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Mariella Bontempo Duca de Freitas**, pela paciência, carinho, dedicação, por todo o conhecimento compartilhado e pela confiança em minha pessoa e em meu trabalho.

Aos meus professores e coorientadores **Jener Alexandre Sampaio Zuanon, Ana Lúcia Salaro e Reggiani Vilela Gonçalves**, por todo o apoio, dedicação e por unir seus conhecimentos a este trabalho.

Aos membros da banca, **Prof. Dr^a. Ana Lúcia Salaro e Prof. Dr. César Koppe Grisólia** pela disponibilidade e pelas valiosas considerações.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros, em especial à **Renata Freitas**, pela valiosa ajuda durante a realização das análises, e por ser uma grande amiga. À **Kemilli Gregório**, por ter sido grande companheira de total confiança. À **Ana Luiza Destro** pelo conhecimento compartilhado. Ao **Pedro Henrique Neves** pela amizade e por grandes momentos de descontração. Aos estagiários **Jean Zen, Thaís Alves e Máira Parreira**, por todo o auxílio, interesse e disponibilidade em ajudar. À **Bárbara Linhares**, que mesmo fisicamente distante se fez presente sendo uma grande amiga.

Aos amigos de Departamento, **Juliana Rodrigues, Maria Luiza Rodrigues, Alex Júnio, Felipe Martins, Karina Boechat, e Felipe Iglésias**, pelos dias que estiveram ao meu lado, especialmente nos intervalos do café, proporcionando leveza à minha vida.

Aos **funcionários e funcionárias** do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa, pelo empenho, responsabilidade e disponibilidade.

Aos meus pais, **João Luiz da Silva, Elenice Sartori Bicalho Silva**, à minha irmã **Débora Bicalho Silva** e à minhas avós **Daurília Sartori Bicalho e Tereza Ribeiro da Silva**, pelo amor contínuo e infinito, pela torcida e por não medirem esforços pela minha felicidade. Obrigada por serem motivo de força e um cais ao meu porto!

Ao meu namorado e companheiro de jornada, **João Victor Rocha**, por acreditar sempre em meu potencial, por ser meu companheiro, meu grande incentivador e por sempre estar ao meu lado.

Aos meus **amigos e amigas de Guiricema**, por tornarem este caminho mais divertido através dos finais de semana compartilhados e bem vividos.

“O que eu faço é uma gota no meio de um oceano. Mas sem ela, o oceano será menor”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

SILVA, Stella Bicalho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2021. **Efeitos toxicológicos do herbicida atrazina sobre o balanço oxidativo, regulação hormonal e desempenho produtivo de juvenis *Astyanax altiparanae***. Orientadora: Mariella Bontempo Duca de Freitas. Coorientadores: Jener Alexandre Sampaio Zuanon, Ana Lúcia Salaro e Reggiani Vilela Gonçalves.

A Atrazina (ATZ) é um herbicida sintético amplamente utilizado no controle de plantas daninhas devido a sua capacidade de inibição da fotossíntese. Entretanto, seu uso frequente, associado à sua alta solubilidade na água, tem causado intensa contaminação do ambiente aquático e de espécies não-alvo. Considerando os dados existentes sobre a toxicologia da atrazina, o presente estudo traz uma nova abordagem por meio da avaliação dos efeitos da exposição de doses ambientalmente relevantes do herbicida ATZ sobre o balanço oxidativo, regulação hormonal e desempenho produtivo de peixes juvenis Neotropicais da espécie *Astyanax altiparanae*. Após 35 dias de exposição às concentrações: 0,00 (CTR-controle), 0,56 (ATZ0,56), 1,00 (ATZ1,00) 1,66 (ATZ1,66) e 11,66 µg/L (ATZ11,66) foi observado aumento nos níveis dos marcadores oxidativos malondialdeído (MDA) e proteínas carboniladas (PC) no músculo de peixes do grupo ATZ11,66. Aumentos de MDA também foram observados nas brânquias e fígado dos peixes ATZ11,66. Houve aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) no músculo e fígado de peixes expostos ao grupo ATZ11,66. Nas brânquias, houve aumento de CAT em ATZ11,66 e GST em todos os grupos expostos ao herbicida. Peixes expostos a ATZ11,66 também apresentaram aumento nos níveis de cortisol e glicose sanguínea, bem como diminuição de 36,6% na taxa de sobrevivência. Nossos resultados sugerem que a exposição a concentrações ambientalmente relevantes do herbicida ATZ, sobretudo 11,66 µg/L, provocam danos oxidativos teciduais especialmente em fragmentos de músculo, bem como alterações metabólicas e endócrinas, capazes de comprometer a sobrevivência de peixes juvenis, e, portanto, causar prejuízos à produção desta espécie.

Palavras-chave: Ecotoxicologia. Estresse oxidativo. Hormônios. Sobrevivência.

ABSTRACT

SILVA, Stella Bicalho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2021. **Toxicological effects of the atrazine herbicide on oxidative balance, hormonal regulation and productive performance in juveniles *Astyanax altiparanae*.** Adviser: Mariella Bontempo Duca de Freitas. Co-advisers: Jener Alexandre Sampaio Zuanon, Ana Lúcia Salaro and Reggiani Vilela Gonçalves.

Atrazine (ATZ) is a synthetic herbicide widely used in weed control due to its capacity to inhibit photosynthesis. However, its frequent use, associated with its high solubility in water, has caused contamination of the aquatic environment and non-target species. Considering the existing data on atrazine toxicology, the present study brings a new approach through the evaluation of the effects of exposure to environmentally relevant concentrations of the herbicide ATZ on the oxidative balance, hormonal regulation and productive performance of Neotropical juvenile fish *Astyanax altiparanae* species. After 35 days of exposure to concentrations as follow: 0.00 (CTR-control), 0.56 (ATZ0.56), 1.00 (ATZ1.00), 1.66 (ATZ1.66) and 11.66 µg/L (ATZ11.66), we observed an increase in oxidative markers levels such as malondialdehyde (MDA) and carbonylated proteins (CP) in muscle from fish ATZ11.66. Increase in MDA were also observed in the gills and liver of ATZ11.66 fish. There was an increase in the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST) enzymes in muscle and liver of fish exposed to ATZ11.66 group. In the gills, there was an increase in CAT in ATZ11.66 and GST in all groups exposed to herbicide. Fish from ATZ11.66 group also showed increase in cortisol and blood glucose levels, as well as decrease of 36.6% in survival rate. Our results show that exposure to environmentally relevant doses of the ATZ herbicide, mainly 11.66 µg/L, causes tissue oxidative damage, especially in muscle fragments, as well as metabolic and endocrine changes, impairing fish development, and therefore causes damage to the production of this species.

Keywords: Ecotoxicology. Hormones. Oxidative stress. Survival.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. <i>Preparo do herbicida.....</i>	13
2.2. <i>Animais</i>	14
2.3. <i>Desenho experimental</i>	14
2.4. <i>Exposição e coleta de amostras.....</i>	14
2.5. <i>Determinação da ATZ na água</i>	15
2.6. <i>Marcadores oxidativos e enzimas antioxidantes</i>	15
2.6.1. <i>Peroxidação lipídica.....</i>	15
2.6.2. <i>Oxidação de proteínas.....</i>	16
2.6.3. <i>Produção de óxido nítrico</i>	16
2.6.4. <i>Atividade da superóxido dismutase</i>	16
2.6.5. <i>Atividade da catalase.....</i>	17
2.6.6. <i>Atividade da glutathione S-transferase</i>	17
2.6.7. <i>Proteínas totais.....</i>	17
2.7. <i>Glicose sanguínea.....</i>	17
2.8. <i>Análises hormonais.....</i>	17
2.9. <i>Desempenho produtivo</i>	18
2.10. <i>Análises estatísticas</i>	18
3. RESULTADOS	19
3.1. <i>Determinação de ATZ na água</i>	19
3.2. <i>Marcadores oxidativos e enzimas antioxidantes</i>	19
3.2.1. <i>Músculo</i>	19
3.2.2. <i>Brânquias.....</i>	22
3.2.3. <i>Fígado.....</i>	24
3.3. <i>Glicose sanguínea.....</i>	26

3.4. <i>Análises hormonais</i>	26
3.5. <i>Desempenho produtivo</i>	28
4. DISCUSSÃO	28
5. CONCLUSÃO	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO

O uso de pesticidas tem se tornado cada vez mais frequente na agricultura moderna (XING *et al.*, 2012). O aumento populacional e a preocupação com a produção de alimentos essenciais são fatores que contribuem para o uso crescente destes pesticidas, afim de otimizar as produções agrícolas nos diferentes campos de cultivo (KUMAR *et al.*, 2019). Entretanto, é notável que quantidades demasiadas destes pesticidas, frequentemente encontrados na água e no solo, representam uma ameaça aos recursos hídricos disponíveis na natureza e ao ecossistema como um todo (GOMES *et al.*, 2020; MONTIEL-LEÓN *et al.*, 2019; XING *et al.*, 2012).

A atrazina (1-chloro-3-ethylamino-5-isopropylamino-2,4,6-triazine, ATZ) é um herbicida sintético de meia-vida longa de 41 a 231 dias, amplamente utilizado em ambientes rurais (MELA *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2018). Introduzida mundialmente pela primeira vez em 1958 pela empresa Suíça Geigy company®, seu uso individual ou em sinergia com outros pesticidas, objetiva suprimir o crescimento de plantas daninhas, provocando efeitos deletérios no fotossistema II em diferentes culturas, principalmente milho, sorgo e cana-de-açúcar, sendo o Brasil um dos maiores produtores mundiais destas culturas em volume anual (GEIER *et al.*, 2009; KARLSSON *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2018).

Apesar de ter seu uso banido pela União Europeia desde agosto de 2005 (STARA; KOUBA; VELISEK, 2018), a ATZ continua sendo considerada o segundo pesticida mais utilizado no Brasil e no mundo, com um consumo mundial anual atingindo valores entre 70.000 e 90.000 toneladas (SINGH *et al.*, 2018). Além disso, sua baixa persistência no solo faz com que repetidas aplicações sejam requeridas nos campos de cultivo (NWANI *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2018). São diversas as formas pelas quais a ATZ pode entrar em contato com o ambiente, entre elas a pulverização, o transporte atmosférico e escoamentos no solo (GALOPPO *et al.*, 2020), o que faz com que alcance os lençóis freáticos e, conseqüentemente, cause contaminação de uma gama de espécies não-alvo (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2020).

Devido ao seu potencial efeito tóxico, no Brasil, o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), estabeleceu valores máximos permitidos para o uso da ATZ, sendo 10 µg/L em águas de irrigação, 5 µg/L para a dessedentação de animais e 2 µg/L para a potabilidade de águas (CONAMA, 2008). Entretanto, valores acima dos estabelecidos, entre 7,0 e 28,3 µg/L, têm sido reportados em ambientes próximos aos campos de cultivo (DELCORSO *et al.*, 2020; PAULINO; SOUZA; FERNANDES, 2012).

A exposição a atrazina, pode induzir a ocorrência de estresse oxidativo, provocado por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e as defesas antioxidantes dos organismos, provocando danos em lipídios, proteínas e no DNA (JABŁOŃSKA-TRYPUĆ *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2018). Bioquimicamente, o mecanismo de ação da atrazina no metabolismo mitocondrial se dá por meio da inibição da ATP sintase, ao qual aumenta a produção de EROS, resultando em disfunções metabólicas em organismos não-alvo (DESTRO *et al.*, 2021; PAULINO; SOUZA; FERNANDES, 2012). Assim, estudos prévios demonstraram que a exposição de doses ambientalmente relevantes, como 2 e 10 µg/L do herbicida ATZ possa exercer efeitos em diferentes vias de organismos não-alvo, resultando na alteração do perfil oxidativo de peixes através do aumento da formação de EROS e atividade de enzimas antioxidantes (SANTOS; MARTINEZ, 2012), provocando hipertrofias e hiperplasias no epitélio lamelar branquial (PAULINO; SOUZA; FERNANDES, 2012), e alterando a estrutura dos folículos tireoideanos em fêmeas de *C. latirostris*, indicando atividade desreguladora endócrina deste herbicida (GALOPPO *et al.*, 2020). Porém, pouco se sabe a respeito dos efeitos toxicológicos da ATZ sobre espécies de peixes juvenis Neotropicais.

Os peixes constituem um extenso grupo de vertebrados que habitam diferentes ecossistemas. Dentre eles, os peixes de água doce atuam no fornecimento de serviços ecossistêmicos de grande importância ecológica, econômica, nutricional e científica, além de oferecer uma importante fonte de proteína para humanos e por isso constituírem o meio de subsistência de comunidades ao redor do mundo (RADINGER *et al.*, 2019). O compartilhamento da água e do espaço físico destinados ao cultivo agrícola e produção do pescado, tem se tornado uma prática frequente, uma vez que os peixes desempenham importantes funções ecológicas na ciclagem de nutrientes e cadeias tróficas (CLASEN *et al.*, 2018). Portanto, é sabido que as atividades antrópicas como o uso excessivo de pesticidas e descarte incorreto das águas de irrigação, capazes de contaminar ambientes hídricos naturais e pisciculturas, são responsáveis por ameaçar a sobrevivência de muitas espécies de peixes, ocasionando prejuízos aos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução, e consequentemente causando uma redução geral da produção do pescado (DE KERCKHOVE; MINNS; CHU, 2015). Ademais, o consumo de peixes contaminados pode ser uma das principais vias de contaminação humana por pesticidas ambientais (CLASEN *et al.*, 2018; FIANKO *et al.*, 2011).

O lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*), é um peixe nativo de água doce com ampla distribuição nos estados brasileiros, sendo uma espécie comerciável devido à sua alta

taxa reprodutiva, curto ciclo de reprodução, alto valor comercial e hábito alimentar onívoro (FERREIRA *et al.*, 2014), frequentemente utilizado na pesca esportiva e no consumo humano (DO NASCIMENTO *et al.*, 2017), razões pelas quais a torna essencialmente importante para a aquicultura Neotropical (CARNEIRO-LEITE *et al.*, 2020). Considerada uma componente importante da ictiofauna, esta espécie é considerada ecologicamente relevante por atuar em diferentes níveis tróficos e contribuir para o equilíbrio de ecossistemas em aquíferos brasileiros (CHEHADE *et al.*, 2014; MARQUES; MOREIRA; GOMES, 2020). Devido ao seu tamanho reduzido e fácil adaptação às condições laboratoriais, esta espécie tem sido escolhida como modelo experimental em pesquisas em ecotoxicologia, incluindo estudos que abordam os efeitos de contaminantes químicos e ambientais (ABDALLA *et al.*, 2019; DE-SIQUEIRA SILVA *et al.*, 2017; MUÑOZ-PENUELA *et al.*, 2021; ZAGANINI *et al.*, 2012).

Em organismos aquáticos, os estágios iniciais do desenvolvimento geralmente representam um período de maior susceptibilidade a perturbações ambientais, se comparado a indivíduos adultos (DEHNERT *et al.*, 2018). De acordo com Mohammed (2013), esse princípio pode ser explicado pela alta taxa de diferenciação no grau de desenvolvimento dos mecanismos homeostáticos, fisiológicos e imunológicos, muitas vezes impulsionados por hormônios. Dentre os mediadores do crescimento e desenvolvimento, os hormônios tireoidianos desempenham um importante papel nas fases iniciais do desenvolvimento por meio do controle metabólico do crescimento (TOVO-NETO *et al.*, 2018). Dessa forma, a avaliação dos efeitos toxicológicos causados pela exposição a contaminantes em peixes em desenvolvimento é de fundamental importância para preservação e conservação das espécies.

Baseado nas informações supracitadas, o objetivo deste estudo consistiu em investigar os efeitos da exposição subcrônica (35 dias) de doses ambientalmente relevantes do herbicida ATZ sobre o balanço oxidativo, regulação hormonal e desempenho produtivo de juvenis de *Astyanax altiparanae*, uma espécie de peixe Neotropical.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparo do herbicida

A formulação comercial Atanor® 50 SC contendo o herbicida atrazina como ingrediente ativo 500 g/L (50,0% m/v) foi adquirida com o fabricante e soluções estoque de concentração

única 7,5 µg/mL foram preparadas semanalmente. As soluções foram mantidas em frascos âmbar e refrigerados à 4°C. Da solução estoque, 1, 2, 4 e 20 mL foram transferidos para 15 L de água, resultando nas concentrações 0,56, 1,00, 1,66 e 11,66 µg/L, respectivamente.

2.2. Animais

Juvenis de *Astyanax altiparanae* (Characiformes: Characidae), 20 dias pós-eclosão, (n=600; peso corporal médio $0,79 \pm 0,076$ g), foram obtidos da Piscicultura PEIXECOM, situada na cidade de Porciúncula (20° 57' 49" Sul, 42° 2' 34" Oeste), RJ, Brasil e trazidos para o Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura (LAFAP) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. Os peixes foram aclimatados por 8 dias em tanques de 500 litros, contendo água desclorificada, em temperatura $26 \pm 1^\circ\text{C}$, sob aeração constante e fotoperíodo (12h claro: 12h escuro). Os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial do tipo extrusada, com teor proteico bruto de 28%. Todos os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com a declaração ética da Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) sob protocolo nº 043/2017.

2.3. Desenho experimental

Após a aclimação, os peixes foram individualmente contados, pesados, randomicamente divididos em 5 tratamentos (4 repetições/tratamento) e alocados em aquários de 60 litros (n=30/aquário). Os aquários foram previamente identificados e alocados aleatoriamente no laboratório. Por um período de 35 dias, os peixes foram expostos às concentrações de ATZ, tais como: 0,00 (CTR-controle), 0,56 (ATZ0,56), 1,00 (ATZ1,00), 1,66 (ATZ1,66) e 11,66 µg/L (ATZ11,66), quando ao final, ocorreu a eutanásia e coleta dos dados. O período de exposição de 35 dias foi escolhido afim de se investigar os efeitos da exposição subcrônica ao herbicida, além de estreitar a faixa de crescimento dos juvenis. Durante o período de exposição a atrazina, 116 peixes morreram, o equivalente a 19,6%. Entretanto, esta mortalidade esteve bem distribuída por entre os tratamentos, estatisticamente evidenciada nos grupos expostos ao herbicida.

2.4. Exposição e coleta de amostras

A cada 72 horas, 50% da água dos aquários foi renovada e a cada reposição, as concentrações propostas de ATZ foram retiradas da solução estoque e adicionadas aos respectivos aquários, totalizando 35 dias de exposição. Durante o período experimental, as adequações laboratoriais foram mantidas, com adição da determinação dos parâmetros de

qualidade da água, tais como: análise do teor de oxigênio dissolvido: $8 \pm 2 \mu\text{g/mL}$, amônia tóxica: $<2.0 \mu\text{g/mL}$ e pH: 7.0 - 7.2, sendo realizadas através de kits comerciais (LABCON TEST®). Ao final do experimento, os peixes foram contados, pesados, eutanasiados com o uso de mesilato de triclaína (MS222, 500 mg/L) e dissecados. Para as análises do balanço oxidativo, pools de músculo, brânquias e fígado ($n=8/\text{tratamento}$) foram coletados até atingirem o peso mínimo de 100 mg. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente estocadas em freezer -80°C . Imediatamente após a eutanásia, amostras de sangue foram coletadas para a determinação da glicose sanguínea. Para as análises hormonais, pedúnculos caudais ($n=8/\text{tratamento}$) foram coletados por meio de excisão caudal, congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer -80°C .

2.5. Determinação da ATZ na água

Semanalmente, após a renovação da água dos aquários, amostras de água ($n=4/\text{tratamento}$) foram randomicamente coletadas e estocadas em frascos âmbar à -20°C . A determinação da ATZ na água foi realizada através da técnica de imunoenensaio enzimático através do kit Abnova (KA3965; sensibilidade $<0.5 \mu\text{g/L}$) em espectrofotômetro de varredura para microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific).

2.6. Marcadores oxidativos e enzimas antioxidantes

Amostras de músculo, brânquias e fígado (100 mg) foram homogeneizadas em 0.2 mol/L de tampão fosfato, 1 mmol/L de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), pH 7.4 usando um homogeneizador (OMNI). Os homogenatos foram centrifugados a 15000 g a 4°C por 10 minutos. Os sobrenadantes foram usados para as análises de malondialdeído (MDA), óxido nítrico (NO), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e proteínas totais. Os pellets resultantes foram utilizados para a determinação de proteínas carboniladas (PC). Todas as análises foram realizadas em duplicatas, usando espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu, Japan) ou leitora de microplacas (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

2.6.1. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi mensurada de acordo com Buege e Aust (1975). A análise mensura a formação do malondialdeído (MDA) total formado, considerado um marcador da peroxidação lipídica. Dessa forma, 0,2 mL do sobrenadante dos tecidos foram homogeneizados em 0,4 mL de solução a base de ácido tricloroacético (TCA, 15%) / ácido tiobarbitúrico (TBA,

0,375%) / ácido clorídrico (HCl, 0,6%) e vortexado. A mistura foi deixada por 40 minutos 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 minutos e centrifugado durante 10 minutos a 9000 g. A absorbância foi lida a 540 nm em leitora 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 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína.

2.6.2. Oxidação de proteínas

A oxidação de proteínas foi mensurada pelo método de Levine *et al.*, (1994), no qual se utiliza os pellets obtidos após a homogeneização dos tecidos. A análise consiste na reação dos grupos carbonilas com o DNPH. Os pellets foram suspensos com TCA a 10% gelado, centrifugados (5000 g durante 10 min a 4°C). O sobrenadante foi retirado, adicionando 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 minutos e agitadas periodicamente. Posteriormente, 0,5 mL de TCA gelado foi adicionado em cada tubo. O precipitado foi novamente centrifugado e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado três vezes com 1 mL de Acetato de Etila e Etanol (1:1 v/v). Então, 1 mL de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 6% foi adicionado em cada tubo. Os tubos foram centrifugados afim de dissolver os pellets e o sobrenadante foi mensurado pela absorbância de 370 nm. Os resultados foram expressos em nmole/mL de proteína com base no coeficiente de extinção molar de $\epsilon_{370} = 22 \text{ mmol/L} \times \text{cm}$.

2.6.3. Produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico (NO) foi quantificada pela reação padrão de Griess (1879). Resumidamente, 50 μl foram adicionados à volume igual de reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% N-(1-Naftil) etilenodiamina e 2,5% H_3PO_4) e incubados à temperatura ambiente durante 10 minutos. A conversão da absorbância em concentrações micromolares de NO foi deduzida a partir de uma curva padrão usando concentrações conhecidas de nitrito de sódio (NaNO_2). A absorbância foi mensurada a 570 nm em leitora de microplacas e o resultado foi expresso em $\mu\text{mol}/\text{L}$.

2.6.4. Atividade da superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela habilidade da enzima em catalisar a reação do superóxido (O^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) diminuindo a auto oxidação do pirogalol (HEART, 2015). Basicamente, 99 μl de tampão fosfato (5 mmol/L, pH

7.0) foram adicionados à 30 µl de amostra. A reação teve início com a adição de 15 µl de pirogaloil (100 µmol/L). A leitura da absorbância foi realizada em leitora de microplacas a 570 nm. Os resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína.

2.6.5. Atividade da catalase

A atividade da catalase (CAT) foi mensurada de acordo com Aebi (1984), usando H₂O₂ como substrato. Assim, 1 mL de H₂O₂ foi adicionado à reação contendo 10 µl de amostra e 1 mL de tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7.0). A atividade de CAT foi definida pela degradação da enzima pelo peróxido de hidrogênio. A leitura foi monitorada a 240 nm durante 1 minuto com intervalos de 30 segundos. Um coeficiente de extinção molar $\epsilon_{240} = 0.036 \text{ mmol/L cm}$ foi usado nos cálculos. Os resultados foram expressos em U CAT/mg de proteína.

2.6.6. Atividade da glutathiona S-transferase

A atividade da glutathiona S-transferase (GST) foi mensurada pelo método de Habig *et al.*, (1974). Essa atividade é baseada na formação de um conjugado-glutathiona pelo 2,4-dinitroclorobenzeno (CDNB). Adicionou-se 1 mmol/L de CDNB ao tampão contendo 1 mmol/L de GSH e 10 µl da amostra a ser testada. Após a adição do CDNB, monitorou-se a absorbância a 340 nm durante 90 segundos. Utilizou-se o coeficiente de extinção molar $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mmol/L} \times \text{cm}$. Os resultados foram expressos em µmole/min/g.

2.6.7. Proteínas totais

Proteínas totais foram mensuradas de acordo com Lowry *et al.*, (1951) para a padronização dos resultados, utilizando albumina sérica bovina como padrão.

2.7. Glicose sanguínea

Após a eutanásia dos animais, amostras de sangue de *Astyanax altiparanae* (n=16/tratamento) foram coletadas por meio de excisão caudal. As amostras de sangue foram colocadas diretamente sobre tiras de teste unidas ao glicosímetro digital (Accu-Chek Active® Roche, Mannheim, Germany).

2.8. Análises hormonais

Os hormônios foram extraídos do pedúnculo caudal pelo método de Guest (2016), adaptado. Brevemente, cada pedúnculo foi seccionado em pequenas frações, pesado e adicionado à 2 mL de tampão PBS gelado (pH 7.4) contendo 1 mM de 6-propyl-2thiouracil

(PTU) previamente preparado e estocado à -20°C. As amostras foram homogeneizadas, usando um homogeneizador (OMNI) por cerca de 50 segundos. As amostras foram transferidas para tubos de tampa de rosca contendo 10 mL de éter etílico. Os tubos foram agitados em vórtex por 1 minuto e centrifugados a 2000 g à 4°C por 5 minutos. A fase etílica foi transferida para tubos de ensaio. O procedimento foi repetido duas vezes com o sedimento restante e os sobrenadantes coletados foram deixados secar em banho maria a 90°C. As amostras foram reconstituídas em 500 µl de Assay buffer (0,1M HEPES pH 7,4, 0,1M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mg/mL PEG 4000) e mantidas refrigeradas a 4°C durante a noite. Os hormônios Cortisol, Triiodotironina (T₃) e Tiroxina (T₄) foram determinados através de kits comerciais de imunoenensaio enzimático seguindo os protocolos fornecidos pela empresa USA diagnóstica.

2.9. Desempenho produtivo

Ao final do experimento, os peixes foram novamente contados e individualmente pesados para o cálculo das seguintes variáveis de desempenho produtivo:

Taxa de sobrevivência (TS) = (número final de peixes/número inicial de peixes) x 100;

Ganho em peso (GP) = peso final – peso inicial;

Consumo de ração aparente (CR) = peso da ração inicial – peso da ração final;

Conversão alimentar (CA) = CR / GP;

Taxa de crescimento específico (TCE) utilizando, a equação proposta por Ricker (1979), apresentada a seguir:

$$TCE = \frac{\ln PF (g) - \ln PI (g)}{\text{Tempo (dias)}} \times 100,$$

Em que: PI = Peso inicial médio dos peixes (g) e PF = Peso final médio dos peixes (g).

2.10. Análises estatísticas

A distribuição dos dados foi determinada pelo teste Shapiro-Wilk, usando o software GraphPad Prism (versão 6.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Todos os dados apresentaram distribuição normal e foram submetidos à análise de variância (one-way ANOVA), seguidos de teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas. Os dados foram expressos como média e erro padrão da média. A significância estatística foi estabelecida em P<0,05.

3. RESULTADOS

3.1. Determinação de ATZ na água

Nenhum resíduo de atrazina foi detectado nas amostras de água dos grupos controle. As concentrações de atrazina mensuradas estão descritas na tabela 1.

Tabela 1: Concentrações de ATZ mensuradas em diferentes tratamentos e expressas em Média \pm EPM (n=4/tratamento).

Tratamento	Concentração mensurada de ATZ ($\mu\text{g/L}$)
CTR (controle)	ND
ATZ0,56	0,56 \pm 0,04
ATZ1,00	1,00 \pm 0,06
ATZ1,66	1,66 \pm 0,15
ATZ11,66	11,66 \pm 1,87

ND = Não detectado

3.2. Marcadores oxidativos e enzimas antioxidantes

3.2.1 Músculo

No músculo de *Astyanax altiparanae*, a concentração de MDA aumentou em ATZ11,66 quando comparada ao grupo controle ($F_{(4,34)} = 8,197$; $P=0,0001$) e aos grupos ATZ0,56 ($P=0,0003$), ATZ1,00 ($P=0,0114$) e ATZ1,66 ($P=0,0031$) (Fig.1-A). Houve aumento na formação de proteínas carboniladas em ATZ11,66 quando comparadas ao grupo controle ($F_{(4,30)} = 3,50$ $P=0,0185$) e ATZ0,56 ($P=0,0407$) (Fig. 1-B). Houve aumento da atividade de SOD em ATZ11,66 quando comparada ao controle ($F_{(4,35)} = 2,551$; $P=0,0278$) (Fig. 1-D). A atividade de CAT aumentou nos grupos ATZ1,00 e ATZ1,66 quando comparada ao grupo controle ($F_{(4,35)} = 28,44$; $P=0,0072$ e $P=0,0278$). Valores mais altos de CAT também foram encontrados no grupo ATZ11,66 quando comparada ao grupo controle e aos demais grupos ($P<0,0001$) (Fig. 1-E). A atividade de GST aumentou nos grupos ATZ0,56 ($F_{(4,35)} = 87,16$; $P<0,0001$), ATZ1,00 ($P<0,0001$), ATZ1,66 ($P<0,0001$) e ATZ11,66 ($P<0,0001$) quando comparadas ao grupo controle. A atividade de GST também foi alta em todos os grupos com relação ao controle ($P<0,0001$), estando evidentemente elevada em ATZ11,66 ($P<0,0001$) quando comparada aos grupos

ATZ0,56 ($P < 0,0001$), ATZ1,00 ($P < 0,0001$) e ATZ1,66 ($P < 0,0001$) (Fig. 1-F). Não houve diferenças entre os grupos quanto à produção de óxido nítrico no músculo de *Astyanax altiparanae* (Fig. 1-C).

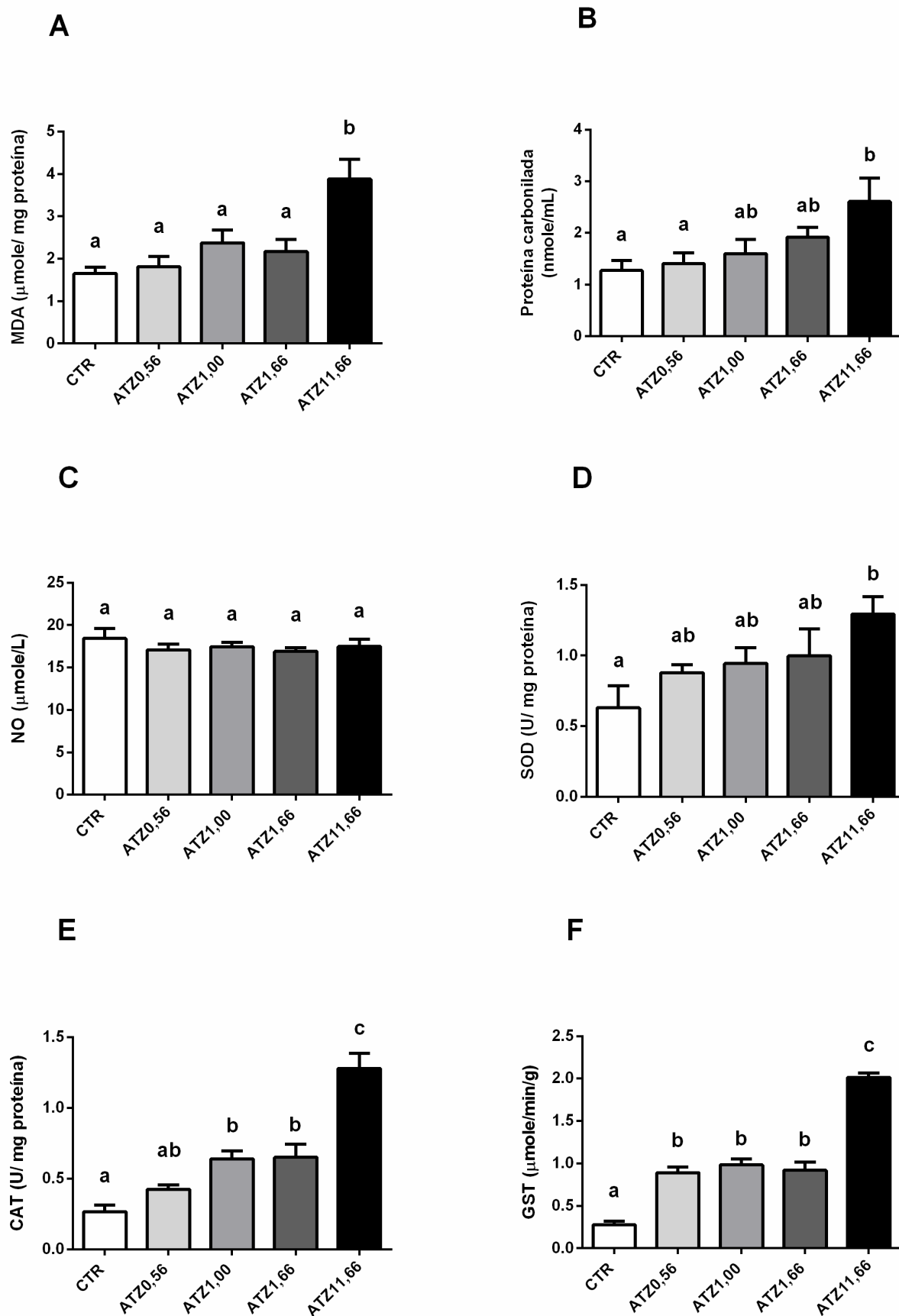


Figura 1: Efeito do herbicida atrazina sobre os marcadores do estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes no músculo de *A. altiparanae* após 35 dias de exposição. (A) malondialdeído – MDA, (B) proteína carbonilada - PC, (C) óxido nítrico – NO, (D) superóxido dismutase - SOD, (E) catalase - CAT, (F) glutathione S-transferase - GST. CTR: grupo controle, ATZ0,56: 0,56 µg/L. ATZ1,00: 1,00 µg/L. ATZ1,66: 1,66 µg/L. ATZ11,66: 11,66 µg/L. Os dados foram expressos em Média ± EPM. ^{a, b, c} Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos ($P \leq 0,05$).

3.2.2. Brânquias

Nas brânquias de *Astyanax altiparanae*, a concentração de MDA aumentou em ATZ11,66 comparada ao controle ($F_{(4,35)} = 3,258$; $P=0,0151$) (Fig. 2-A). A atividade de CAT aumentou no grupo ATZ 11,66 quando comparada ao controle e aos demais grupos ($F_{(4,35)} = 15,64$; $P < 0,0001$ e $P < 0,0001$) (Fig. 2-E). Houve aumento da atividade de GST nos grupos ATZ0,56 ($F_{(4,35)} = 35,88$ $P < 0,0001$), ATZ1,00 ($P < 0,0001$), ATZ1,66 ($P < 0,0001$) e ATZ11,66 ($P < 0,0001$) quando comparados ao controle. A atividade de GST também se mostrou elevada em ATZ11,66 quando comparada aos grupos ATZ0,56 ($P < 0,0001$), ATZ1,00 ($P < 0,0001$) e ATZ1,66 ($P=0,0004$) (Fig. 2-F). Não houve diferenças estatísticas nos demais parâmetros analisados nas brânquias (Fig. 2-B, 2-C e 2-D).

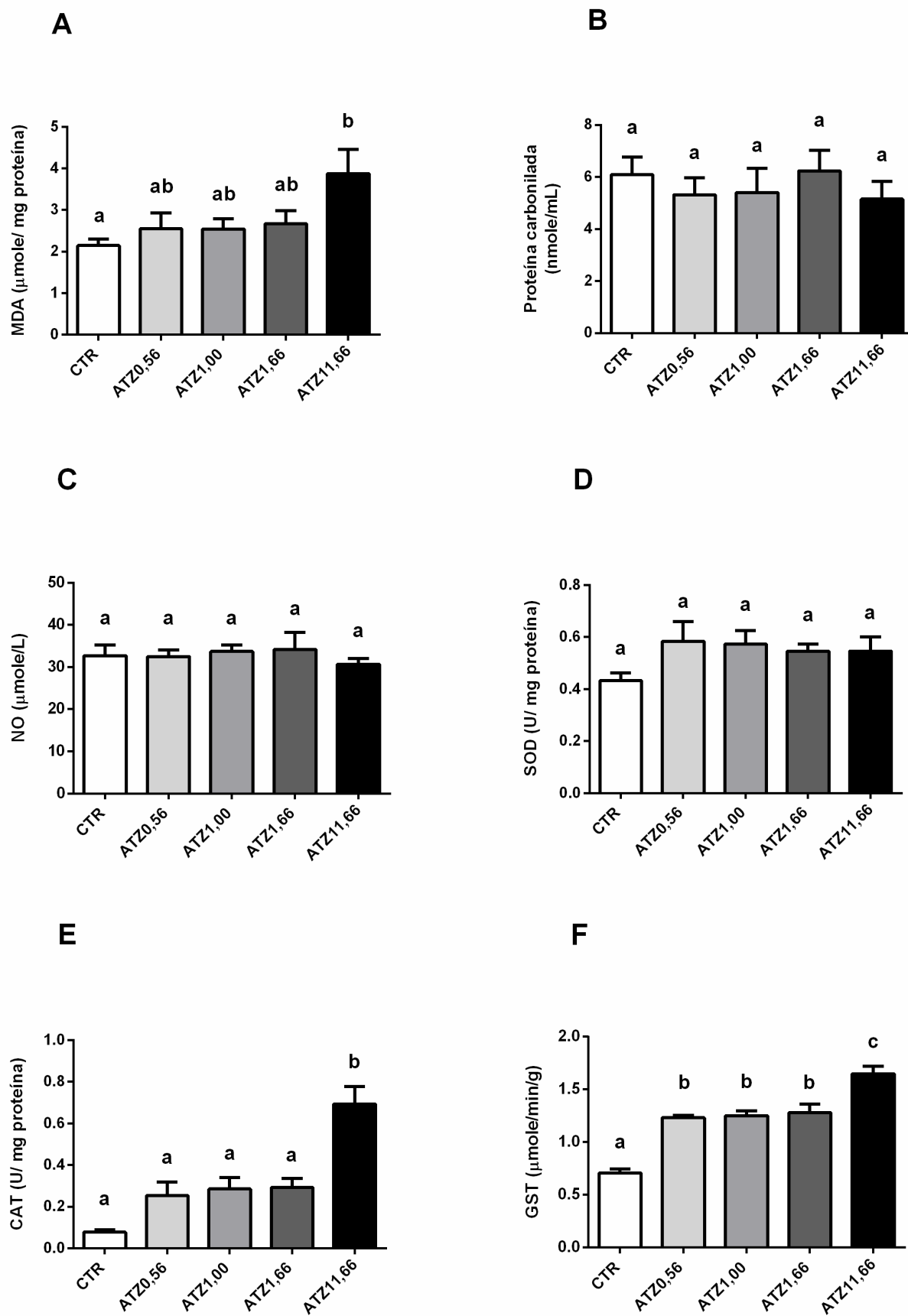


Figura 2: Efeito do herbicida atrazina sobre os marcadores do estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes nas brânquias de *A. altiparanae* após 35 dias de exposição. (A) malondialdeído – MDA, (B) proteína carbonilada - PC, (C) óxido nítrico – NO, (D) superóxido dismutase - SOD, (E) catalase - CAT, (F) glutathione S-transferase - GST. CTR: grupo controle, ATZ0,56: 0,56 µg/L. ATZ1,00: 1,00 µg/L. ATZ1,66: 1,66 µg/L. ATZ11,66: 11,66 µg/L. Os dados foram expressos em Média ± EPM. ^{a, b, c} Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos ($P \leq 0,05$).

3.2.3. Fígado

No fígado, a concentração de MDA aumentou em ATZ11,66 quando comparado ao controle ($F_{(4,35)} = 2,638$; $P=0,0284$) (Fig. 3-A). Houve aumento das atividades de SOD e CAT em ATZ11,66 quando comparadas ao controle ($F_{(4,33)} = 4,470$; $P=0,0017$; ($F_{(4,35)} = 3,273$; $P=0,0131$, respectivamente) (Fig. 3-D e 3-E). A atividade de GST aumentou em ATZ11,66 quando comparada aos grupos controle ($F_{(4,35)} = 5,116$; $P=0,0009$) e ATZ0,56 ($F_{(4,35)} = 5,116$; $P=0,0399$) (Fig. 3-F). Não houve alterações estatísticas nos demais parâmetros analisados no fígado de *Astyanax altiparanae* (Fig. 3-B e 5-C).

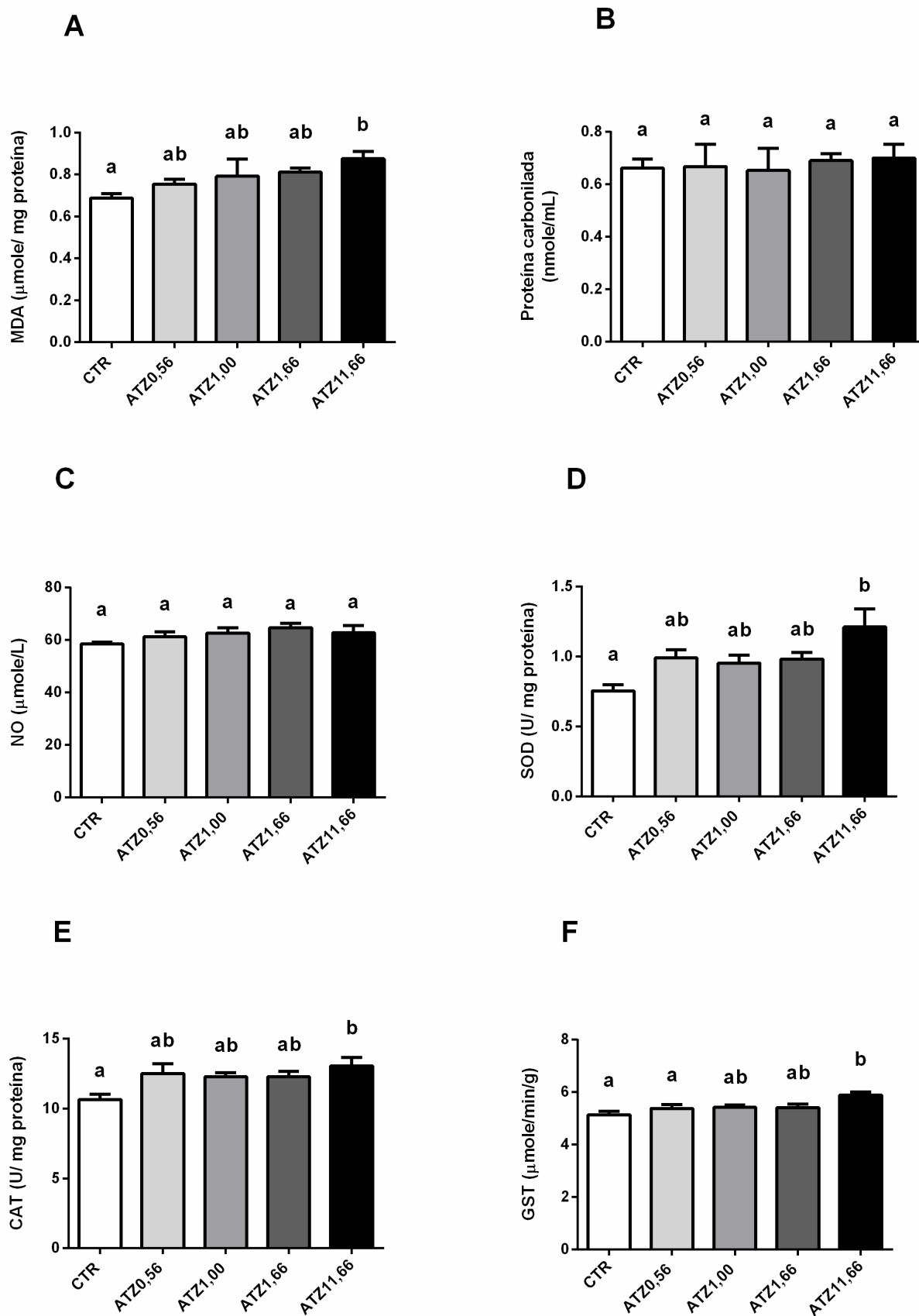


Figura 3: Efeito do herbicida atrazina sobre os marcadores do estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes no fígado de *A. altiparanae* após 35 dias de exposição. (A) malondialdeído – MDA, (B) proteína carbonilada - PC, (C) óxido nítrico – NO, (D) superóxido dismutase - SOD, (E) catalase - CAT, (F) glutaciona S-transferase - GST. CTR: grupo controle, ATZ0,56: 0,56 µg/L. ATZ1,00: 1,00 µg/L. ATZ1,66: 1,66 µg/L. ATZ11,66: 11,66 µg/L. Os dados foram expressos em Média ± EPM. ^{a, b, c} Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos ($P \leq 0,05$).

3.3. Glicose sanguínea

Houve aumento na concentração de glicose sanguínea em peixes do grupo ATZ11,66 quando comparado ao controle ($F_{(4,70)} = 3,482$; $P = 0,0064$) (Fig. 4).

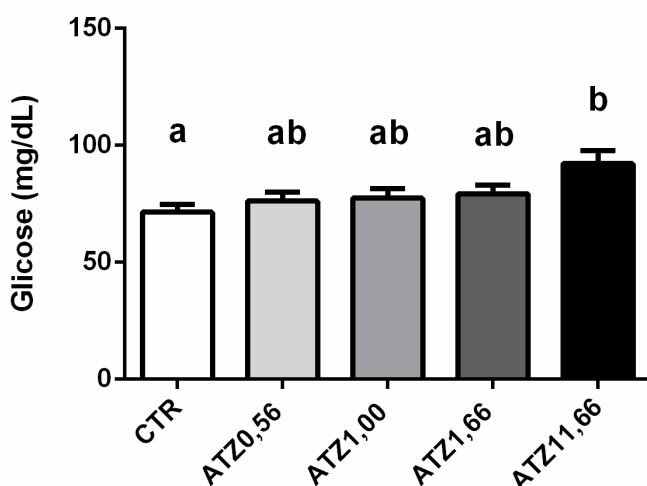


Figura 4: Variação da glicose plasmática (mg/dL) em juvenis de *Astyanax altiparanae* expostos a ATZ por 35 dias. CTR: grupo controle, ATZ0,56: 0,56 µg/L. ATZ1,00: 1,00 µg/L. ATZ1,66: 1,66 µg/L. ATZ11,66: 11,66 µg/L. Os resultados foram expressos em Média ± EPM. ^{a, b} Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos ($P \leq 0,05$).

3.4. Análises hormonais

Houve aumento dos níveis de cortisol nos peixes expostos ao tratamento ATZ11,66 quando comparado ao grupo controle ($F_{(4,31)} = 3,403$; $P = 0,0219$) (Fig. 5-A). Não houve diferenças estatísticas quanto à concentração dos hormônios tireoidianos avaliados (Fig. 5-B e 5-C).

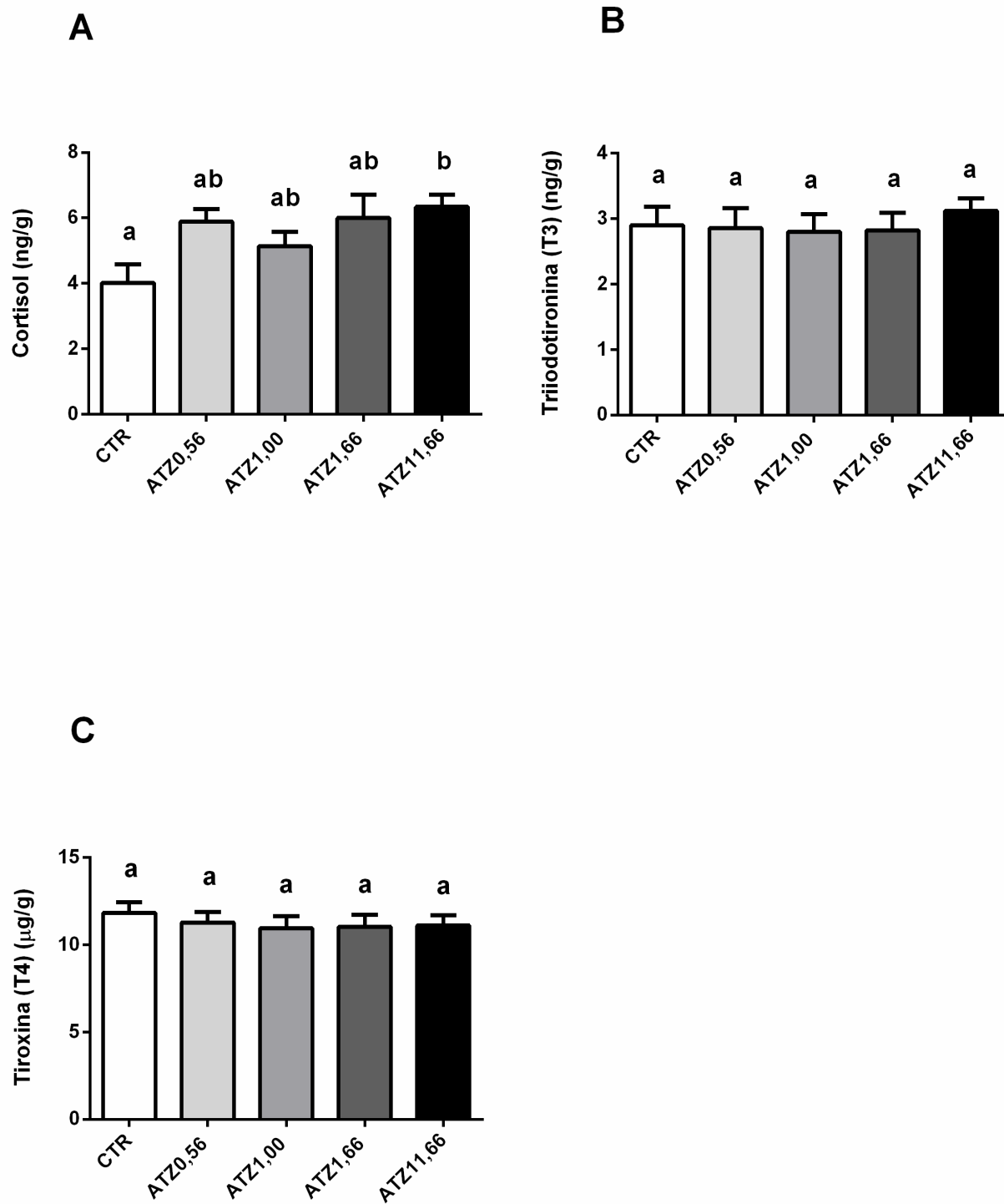


Figura 5: Concentração dos hormônios cortisol (A), triiodotironina – T₃ (B) e tiroxina – T₄ (C) em *Astyanax altiparanae* expostos a ATZ por 35 dias. CTR: grupo controle, ATZ0,56: 0,56 µg/L. ATZ1,00: 1,00 µg/L. ATZ1,66: 1,66 µg/L. ATZ11,66: 11,66 µg/L. Os resultados foram expressos em Média ± EPM. ^{a, b} Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (P≤0,05).

3.5. Desempenho produtivo

Foi observada uma diminuição na taxa de sobrevivência (TS) dos peixes expostos ao tratamento ATZ11,66 quando comparados ao controle ($F_{(4,15)} = 10,16$; $P < 0,001$). Não houve diferenças estatísticas quanto às demais variáveis de desempenho produtivo analisadas (Tabela 2).

Tabela 2: Variáveis de desempenho produtivo analisadas em juvenis de *Astyanax altiparanae* expostos a ATZ por 35 dias.

Variáveis	Tratamentos				
	CTR	ATZ0,56	ATZ1,00	ATZ1,66	ATZ11,66
TS	95,83 ± 1,59 ^a	83,33 ± 2,72 ^{ab}	80,83 ± 4,57 ^{ab}	80,00 ± 4,90 ^{ab}	63,34 ± 3,04 ^b
GP	0,98 ± 0,05 ^a	1,01 ± 0,05 ^a	1,03 ± 0,14 ^a	1,06 ± 0,06 ^a	1,06 ± 0,03 ^a
CR	1,55 ± 0,05 ^a	1,54 ± 0,07 ^a	1,67 ± 0,12 ^a	1,76 ± 0,01 ^a	1,75 ± 0,01 ^a
CA	1,61 ± 0,12 ^a	1,55 ± 0,16 ^a	1,69 ± 0,16 ^a	1,67 ± 0,09 ^a	1,65 ± 0,09 ^a
TCE	2,32 ± 0,06 ^a	2,33 ± 0,09 ^a	2,37 ± 0,24 ^a	2,40 ± 0,08 ^a	2,42 ± 0,08 ^a

TS – Taxa de sobrevivência, GP – Ganho em peso, CR – Consumo aparente de ração, CA – Conversão alimentar, TCE – Taxa de crescimento específico. CTR: grupo controle, ATZ0,56: 0,56 µg/L. ATZ1,00: 1,00 µg/L. ATZ1,66: 1,66 µg/L. ATZ11,66: 11,66 µg/L. Os resultados foram expressos em média ± EPM. ^{a, b} Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (P≤0,05).

4. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a investigar os efeitos da exposição subcrônica de doses ambientalmente relevantes de um herbicida de formulação comercial e como este interfere no

balanço oxidante-antioxidante, regulação hormonal e no desempenho produtivo de peixes juvenis, de elevada importância ecológica e comercial, da espécie *Astyanax altiparanae*. Este estudo encontrou alterações nos diferentes parâmetros avaliados. Entretanto, estas alterações variaram conforme a concentração de ATZ testada. Observou-se que exposição a 11,66 µg/L de atrazina provocou redução da taxa de sobrevivência, induziu desequilíbrio oxidativo, alterações metabólicas e endócrinas, bem como provocou a redução da taxa de sobrevivência de peixes juvenis Neotropicais.

Em peixes, as brânquias, rins e intestino desempenham uma importante função na biotransformação e excreção de xenobióticos. Entretanto, o fígado é considerado o primeiro órgão onde todos estes processos são metabolizados (PAULINO; SOUZA; FERNANDES, 2012). Assim, verificamos um aumento da atividade das enzimas SOD, CAT e GST em fígado e músculo, bem como aumentos de CAT e GST nas brânquias de peixes juvenis expostos a ATZ. Entretanto, esta atividade enzimática não foi suficiente para atenuar os danos causados em lipídios e proteínas, visto pelas concentrações aumentadas de MDA e PC. A atividade acentuada de SOD e CAT sugere a ativação de um potente sistema de defesa antioxidante específico para eliminar as EROS e radicais livres induzidos pela ATZ, uma vez que estas enzimas formam uma importante linha de defesa primária e suas atividades estão relacionadas (FREITAS *et al.*, 2021; PANDEY *et al.*, 2003). A SOD catalisa a reação de radicais superóxido (O^{*}) em peróxido de hidrogênio (H₂O₂), enquanto a CAT degrada o peróxido de hidrogênio em moléculas de oxigênio e água. Já a enzima GST, atua em uma segunda linha de defesa antioxidante, envolvendo a biotransformação de moléculas e toxinas, tornando-as facilmente excretáveis e contribuindo para o processo de desintoxicação celular (CLASEN *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2018). Dessa forma, o aumento da atividade destas enzimas pode ser interpretado como uma tentativa de mitigar os danos causados pela formação de EROS e radicais livres após exposição ao herbicida.

Um estudo semelhante revelou um aumento da atividade das enzimas CAT e SOD nos ovários de fêmeas adultas de peixes zebra expostas por 14 dias à concentração ambientalmente relevante de ATZ (10 µg/L) e aumento da concentração de MDA no fígado de fêmeas expostas a 100 µg/L de ATZ, sugerindo que a peroxidação lipídica pode ser atribuída à indução pelas EROS, que aumentam a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, levando à peroxidação lipídica (JIN *et al.*, 2010). A atividade aumentada destas enzimas pareceu ser suficiente para combater os danos causados pela exposição a 10 µg/L, mas não a 100 µg/L, visto pelos níveis aumentados de MDA após a exposição a esta concentração. Similarmente, um estudo realizado

com peixes juvenis da espécie *Prochilodus lineatus* expostos por 14 dias a concentração 10 µg/L de ATZ, revelou um aumento da atividade enzimática de SOD, CAT e GST, bem como da peroxidação lipídica nas brânquias (PAULINO; SOUZA; FERNANDES, 2012). Em contrapartida, adultos de *Astyanax altiparanae* expostos a concentrações semelhantes de ATZ por 30 dias, apresentaram um aumento de MDA no fígado, embora as brânquias não tenham sido afetadas, sugerindo que juvenis desta espécie são mais sensíveis do que os adultos. Os autores também observaram aumento da atividade de CAT e GST nas brânquias (DESTRO *et al.*, 2021).

No presente estudo, foi observado um aumento das concentrações de MDA em músculo, brânquias e fígado de peixes expostos às diferentes concentrações de ATZ, bem como a formação de proteínas carboniladas em fragmentos de músculo. Estes resultados sugerem que a exposição à ATZ, especialmente na maior concentração testada, provocou danos oxidativos em todos os tecidos analisados de *Astyanax altiparanae*. Danos às membranas celulares, causados pela peroxidação lipídica, podem alterar a permeabilidade seletiva e levar ao mau funcionamento das células (FERREIRA-SOUZA *et al.*, 2018). Ademais, a ATZ induziu a oxidação de proteínas do músculo o que leva a formação de grupos proteicos não funcionais, que podem a longo prazo, comprometer as funções natatórias. Radicais livres altamente reativos, como o hidroxila (OH•), formados durante o metabolismo elevado do oxigênio, são responsáveis pela formação de grupos carbonilas derivados da modificação de aminoácidos, os quais prejudicam a estrutura e integridade de proteínas (PARVEZ; RAISUDDIN, 2005). Carpas comuns expostas a 2 µg/L de ATZ por 96 horas, apresentaram concentrações aumentadas de proteínas carboniladas em fragmentos de músculo (MARINS *et al.*, 2018).

Alguns estudos têm demonstrado que muitos poluentes podem atuar como desreguladores endócrinos em peixes (DORVAL; LEBLOND; HONTELA, 2003; LIU *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2016), estimulando ou inibindo a síntese e secreção de certos hormônios. A resposta neuroendócrina ao estresse envolve a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais (HHA) que se inicia por meio da secreção imediata do hormônio liberador de corticosteroides (CRH), que induz a liberação do hormônio adrenocorticotrópico, subsequentemente estimulando a liberação de cortisol pelo córtex das adrenais (TORT, 2011). O aumento de cortisol é importante para fornecer mobilizar energia a curto prazo para responder prontamente ao estresse causado por contaminantes, mas pode gerar consequências negativas no crescimento e desenvolvimento, especialmente a longo prazo, por diminuir as funções imunes e possibilitar o surgimento de doenças (NIEVES-PUIGDOLLER; BJÖRNSSON; MCCORMICK, 2007).

No presente estudo, as concentrações de glicose e cortisol foram utilizadas como ferramentas para monitorar as respostas de estresse frente à exposição ao herbicida. Dessa forma, foi observado um aumento na concentração de cortisol em peixes expostos ao tratamento ATZ11,66 quando comparado ao controle. Este resultado sugere uma ativação do eixo HHA como resposta imediata ao estresse causado pela exposição à ATZ. Juntas, as secreções aumentadas de cortisol e glicose sugerem a ativação de uma via de resposta ao estresse resultante da exposição ao herbicida. Adultos da espécie *Astyanax altiparanae* expostos por 30 dias às mesmas concentrações aqui testadas, não apresentaram aumento nos níveis de cortisol, sugerindo que peixes juvenis desta espécie são mais sensíveis que adultos (DESTRO *et al.*, 2021). Conjuntamente, as modificações no metabolismo da glicose tendem a acompanhar as variações fisiológicas, ambientais e à presença de agentes estressores, uma vez que dentre as influências exercidas por estes agentes no metabolismo de carboidratos, estão as alterações das concentrações de glicose sanguínea (KUMARI *et al.*, 2017; POLAKOF *et al.*, 2012). Níveis aumentados de cortisol podem elevar a produção de glicose por meio dos processos de glicogenólise e gliconeogênese, fornecendo glicose à corrente sanguínea para garantir uma resposta celular imediata e bem sucedida para reparar o estresse causado pela exposição a contaminantes (SHELLEY *et al.*, 2012; TELES *et al.*, 2017). Neste estudo, a elevação da glicose sanguínea em peixes do grupo ATZ11,66 provavelmente se deve ao aumento dos níveis de cortisol observados em peixes expostos à mesma concentração.

A síntese dos hormônios tireoidianos, essenciais para o desenvolvimento e balanço metabólico dos vertebrados, se inicia com a secreção do hormônio liberador de tireotrofina (TRH) que estimula a hipófise a secretar o hormônio tireoestimulante (TSH) e este subsequentemente estimula os folículos tireoidianos a liberarem seus hormônios (ZHANG; LAZAR, 2000). Em peixes, o T₄ é o hormônio predominante secretado e a conversão em T₃ ocorre nos tecidos periféricos por remoção enzimática por meio da ação de deiodinases (POWER *et al.*, 2001). Em nosso estudo, não houve alterações nas concentrações dos hormônios T₃ e T₄ em função da exposição à ATZ. Nossos achados estão de acordo com os encontrados para juvenis de salmão do atlântico expostos por 21 dias a 10 µg/L de ATZ onde não foi relatada alteração nos níveis plasmáticos de T₃. Uma diminuição nos níveis de T₃ e T₄ foi encontrada em peixes submetidos a 100 µg/L de ATZ, concentração superior à testada no presente estudo (NIEVES-PUIGDOLLER; BJÖRNSSON; MCCORMICK, 2007). Em soma, estes resultados sugerem que concentrações de até 10 µg/L de atrazina, são insuficientes para

provocar alterações nos níveis dos hormônios tireoidianos em juvenis de *A. altiparanae* e *S. salar*.

A produção de peixes pela aquicultura tem crescido gradativamente nos últimos anos, gerando impactos econômicos positivos em diversas regiões ao redor do mundo (FAZIO, 2019). Entretanto, resíduos de pesticidas, frequentemente encontrados próximos a setores de pisciculturas, causam impactos negativos a saúde animal e à qualidade da carne como um todo (LAZARTIGUES *et al.*, 2013). Neste estudo, apesar da exposição a ATZ não ter resultado em alterações na maioria das variáveis de desempenho produtivo analisadas, tais como a ingestão de alimentos, crescimento e eficiência de utilização dos nutrientes, a redução da taxa de sobrevivência observada no tratamento ATZ11,66 sugere que a ATZ pode causar danos nos estoques pesqueiros em ambientes naturais e prejuízos para os criadores desta espécie. Os prejuízos na cadeia produtiva podem ser ainda maiores se considerarmos o efeito da peroxidação lipídica muscular no tempo de prateleira do pescado, que por sua vez, pode diminuir a durabilidade da iguaria ao comprometer o sabor e odor (SECCI e PARISI, 2016). Além, disso peixes submetidos a estresse pouco antes ou durante o abate tem a qualidade da carne comprometida em função da produção de espécies reativas, como hidroperóxidos, representando uma desvantagem econômica no que diz respeito a comercialização desta espécie. Peixes juvenis de água doce, pertencentes a seis diferentes famílias, expostos a baixas concentrações do herbicida 2,4-D por 90 dias, apresentaram redução na taxa de sobrevivência, apesar dos adultos não terem sido afetados, novamente sugerindo que peixes juvenis são mais susceptíveis a ação tóxica de contaminantes ambientais do que os adultos (DEHNERT *et al.*, 2020).

Em síntese, as alterações no balanço oxidante-antioxidante, metabólicas e endócrinas aqui relatadas provavelmente estão relacionadas com a redução da sobrevivência dos peixes juvenis analisados neste estudo.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo fornece evidências de que a exposição a concentrações ambientalmente relevantes do herbicida atrazina, sobretudo na concentração 11,66 µg/L, induziu estresse oxidativo causado por meio do aumento dos marcadores oxidativos e enzimas antioxidantes em brânquias, fígado e especialmente em músculo. Além disso, provocou aumento dos níveis de cortisol da glicemia plasmática, ao mesmo tempo em que reduziu a

sobrevivência de peixes expostos ao herbicida. Este estudo evidencia os riscos causados pela exposição de doses ambientalmente realistas em peixes juvenis Neotropicais de grande interesse comercial e relevância ecológica, sugerindo que outras espécies nativas podem estar ameaçadas em função desta exposição.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, R. P. *et al.* Exposure to aluminum, aluminum+ manganese and acid pH triggers different antioxidant responses in gills and liver of *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes: Characidae) males. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 215, p. 33-40, 2019.

AEBI, H. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, v. 105, n. C, p. 121-126, 1984.

BLAHOVÁ, J. *et al.* Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine. *Food and chemical toxicology*, v. 61, p. 82-85, 2013.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, v. 52, p. 302-310, 1978.

CHEHADE, C. *et al.* Morphologic study of the liver of lambari (*Astyanax altiparanae*) with emphasis on the distribution of cytokeatin. *Fish physiology and biochemistry*, v. 40.2, p. 571-576, 2014.

CLASEN, B. *et al.* Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* reared in rice-fish system. *Science of The Total Environment*, v. 626, p. 737-743, 2018.

CONAMA, 2008. RESOLUÇÃO CONAMA nº396,. *QUALIDADE DA ÁGUA*.

DE ALBUQUERQUE, F. P., de Oliveira, J. L., Moschini-Carlos, V., & Fraceto, L. F. An overview of the potential impacts of atrazine in aquatic environments: Perspectives for tailored solutions based on nanotechnology. *Science of The Total Environment*, v. 700, 2020.

DE KERCKHOVE, D. T.; MINNS, C. K.; CHU, C. Estimating fish exploitation and aquatic habitat loss across diffuse inland recreational fisheries. *PloS one*, v. 10.4, p. 121895, 2015.

DEHNERT, G. K. *et al.* Effects of low, subchronic exposure of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and commercial 2,4-D formulations on Early Life Stages of Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology*, v. 37, p. 2550-2559, 2018.

DEHNERT, G. K. *et al.* Impacts of subchronic exposure to a commercial 2, 4-D herbicide on developmental stages of multiple freshwater fish species. *Chemosphere*. 263, 127638, 2020.

DELCORSO, M. C. *et al.* Effects of sublethal and realistic concentrations of the commercial herbicide atrazine in Pacu (*Piaractus mesopotamicus*): Long-term exposure and recovery assays. *Veterinary World*, v. 13.1, p. 147, 2020.

DESTRO, A. L. F. *et al.* Effects of subchronic exposure to environmentally relevant concentrations of the herbicide atrazine in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 208, p. 111601, 2021.

DIETERICH, S. *et al.* Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: Increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*, v. 101, p. 33–39, 2000.

DO NASCIMENTO, N. F. *et al.* Growth, fatty acid composition, and reproductive parameters of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. *Aquaculture*, v. 471, p. 163-171, 2017.

DORVAL, J.; LEBLOND, V. S.; HONTELA, A. Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorine pesticide. *Aquatic Toxicology*, v. 63.3, p. 229-24, 2003.

FAZIO, F. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: A review. *Aquaculture*, v. 500, p. 237-242, 2019.

FERREIRA, P. M. F. *et al.* Essential oregano oil as a growth promoter for the yellowtail tetra, *Astyanax altiparanae*. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 45, n. 1, p. 28-34, 2014.

FERREIRA-SOUZA, A. C. *et al.* Arsenic aggravates oxidative stress causing hepatic alterations and inflammation in diabetic rats. *Life Sciences*, v. 209, p. 472-480, 2018.

FIANKO, J. R. *et al.* Health Risk Associated with Pesticide Contamination of Fish From the Densu River Basin in Ghana. *Journal of Environmental Protection*, v. 2, p. 115-123, 2011.

FREITAS, R. M. P. *et al.* Tebuconazole-induced toxicity and the protective effect of *Ficus carica* extract in Neotropical fruit-eating bats. *Chemosphere*, v. 275, p. 129985, 2021.

GALOPPO, G. H. *et al.* Long-term effects of in ovo exposure to an environmentally relevant dose of atrazine on the thyroid gland of *Caiman latirostris*. *Environmental Research*, v. 186, n. 1, 2020.

GEIER, P. W. *et al.* Preemergence Herbicide Efficacy and Phytotoxicity in Grain Sorghum. *Weed Technology*, v. 23, n. 2, p. 197-201, 2009.

GRIESS, P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, v. 12, n. 1, p. 426-428, 1879.

GOMES, H. O. *et al.* A socio-environmental perspective on pesticide use and food production. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 197, p. 110627.

GUEST, T. W.; BLAYLOCK, R. B.; EVANS, A. N. Development of a modified cortisol extraction procedure for intermediately sized fish not amenable to whole-body or plasma extraction methods. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 42, n. 1, p. 1–6, 2016.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; WILLIAM B. JAKOBY. Glutathione S-Transferases. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 25, n. 22, p. 7130–7139, 1974.

HEART, H. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. 2015.

JABŁOŃSKA-TRYPUĆ, A. *et al.* The impact of pesticides on oxidative stress level in human organism and their activity as an endocrine disruptor. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. 52, n. 7, p. 483–494, 2017.

JIN, Y. *et al.* Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, v. 78.7, p. 846-852, 2010.

KARLSSON, A. S. *et al.* Field scale boscalid residues and dissipation half-life estimation in a sandy soil. *Chemosphere*, v. 145, p. 163-173, 2016.

KUMAR, S. *et al.* Nano-based smart pesticide formulations: Emerging opportunities for agriculture. *Journal of Controlled Release*, v. 294, n. November 2018, p. 131–153, 2019.

KUMARI, B. *et al.* Toxicology of arsenic in fish and aquatic systems. *Environmental chemistry letters*, v. 15.1, p. 43-64, 2017.

LAZARTIGUES, A. *et al.* Pesticide pressure and fish farming in barrage pond in Northeastern France. Part II: residues of 13 pesticides in water, sediments, edible fish and their relationships. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 20, p. 117-125, 2013.

LIU, X-H. *et al.* The secretion, synthesis, and metabolism of cortisol and its downstream genes in the H–P–I axis of rare minnows (*Gobiocypris rarus*) are disrupted by acute waterborne cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 185, p. 112-121, 2016.

LEVINE, R. L. *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 464–478, 1990.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265–275, 1951.

MARINS, A. T. *et al.* Integrated biomarkers response confirm the antioxidant role of diphenyl diselenide against atrazine. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 151, p. 191-198, 2018.

MARQUES, V. H.; MOREIRA, R. G.; GOMES, A. D. Influence of tropical reservoirs eutrophication on the polyunsaturated fatty acid profile in *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae). *Science of The Total Environment*, v. 717, p. 137182, 2020.

MELA, M. *et al.* Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 93, p. 13–21, 2013.

MOHAMMED, A. Why are early life stages of aquatic organisms more sensitive to toxicants than adults. *New insights into toxicity and drug testing*, v. 1, p. 49-62, 2013.

MONTIEL-LEÓN, J. M. *et al.* Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine, and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and tributary rivers. *Environmental Pollution*, v. 250, p. 29-39, 2019.

MUÑOZ-PEÑUELA, M. Diclofenac and caffeine inhibit hepatic antioxidant enzymes in the freshwater fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 240, p. 108910, 2021.

NIEVES-PUIGDOLLER, K.; BJÖRNSSON, B. T.; MCCORMICK, S. D. Effects of hexazinone and atrazine on the physiology and endocrinology of smolt development in Atlantic salmon. *Aquatic Toxicology*, v. 84.1, p. 27-37, 2007.

NWANI, C. D. *et al.* Toxicity of the herbicide atrazine: Effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 7, n. 8, p. 3298-3312, 2010.

OLIVEIRA, J. M. *et al.* Exposure to deltamethrin induces oxidative stress and decreases of energy reserve in tissues of the Neotropical fruit-eating bat *Artibeus lituratus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 148, p. 684-692, 2018.

PANDEY, S. *et al.* Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish Wallago attu (Bl. & Schn.). *Science of the total environment*, v. 309, p. 105-115, 2003.

PARVEZ, S.; RAISUDDIN, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 20, p. 112-117, 2005.

PAULINO, M. G.; SOUZA, N. E. S.; FERNANDES, M. N. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 80, p. 6-13, 2012.

PEREIRA, A. E. S. *et al.* Application of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 268, p. 207–215, 2014.

POLAKOF, S. *et al.* Glucose metabolism in fish: a review. *Journal of Comparative Physiology B*, v. 182.8, p. 1015-1045, 2012.

POWER, D. M. *et al.* Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 130.4, p. 447-459, 2001.

RADINGER, J. *et al.* Effective monitoring of freshwater fish. *Fish and Fisheries*, v. 20.4, p. 729-747, 2019.

RICKER, W.E. Growth rates and models In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.R. (Eds), *Fish Physiology: Bioenergetics and Growth*. Academic Press, London, v.8, p. 677- 743, 1979.

SANTOS, T. G.; MARTINEZ, C. B. R. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. *Chemosphere*, v. 89, n. 9, p. 1118–1125, 2012.

SECCI, G., PARISI, G. From farm to fork: Lipid oxidation in fish products. A review. *Italian Journal of Animal Science*. 15(1), 124-136, 2016.

SHELLEY, L. K. *et al.* Toxicity of atrazine and nonylphenol in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on general health, disease susceptibility and gene expression. *Aquatic Toxicology*, v. 125, p. 127-226, 2012.

SINGH, S. *et al.* Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. *Environmental Chemistry Letters*, v. 16, n. 1, p. 211–237, 2018.

STARA, A.; KOUBA, A.; VELISEK, J. Biochemical and histological effects of sub-chronic exposure to atrazine in crayfish *Cherax destructor*. *Chemico-Biological Interactions*, v. 291, n. June, p. 95–102, 2018.

TELES, M. *et al.* Linking cortisol response with gene expression in fish exposed to gold nanoparticles. *Science of The Total Environment*, v. 584, p. 1004-1011, 2018.

TORT, Lluís. Stress and immune modulation in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 35.12, p. 1366-1375, 2011.

TOVO-NETO, A. *et al.* Thyroid hormone actions on male reproductive system of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, v. 265, p. 230-236, 2018.

XING, H. *et al.* Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 103, n. 1, p. 74–80, 2012.

ZAGANINI, R. L. *et al.* Isolation and characterization of microsatellite loci in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes) and cross-species amplification. *Journal of genetics*, v. 91, n. 1, p. 24–27, 2012.

ZHANG, J., LAZAR, M. A. The mechanism of action of thyroid hormones. *Annual review of physiology*, p. 62, 2000.

ZHANG, Q-F. *et al.* Reproductive toxicity of inorganic mercury exposure in adult zebrafish: histological damage, oxidative stress, and alterations of sex hormone and gene expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Aquatic Toxicology*, v. 177, p. 417-424, 2016.