

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA LICENCIATURA

WANDERSON SILVA MELO

AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DO METRIBUZIN NA ATIVIDADE DE
CATALASE HEPÁTICA DE *Prochilodus argenteus*.

MACEIÓ

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA LICENCIATURA

WANDERSON SILVA MELO

AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DO METRIBUZIN NA ATIVIDADE DE
CATALASE HEPÁTICA DE *Prochilodus argenteus*.

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de licenciado em Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sonia Salgueiro Machado

MACEIÓ
2019

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

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

M528a Melo, Wanderson Silva.

Avaliação do efeito inibitório do metribuzin na atividade de catalase hepática de *Prochilodus argenteus* / Wanderson Silva Melo. – Maceió, 2020. 51 f. : il.

Orientadora: Sônia Salgueiro Machado.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Química : Licenciatura) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 40-51.

1. Catalase. 2. Metribuzin. 3. *Prochilodus argenteus*. 4. Cinética enzimática.
I. Título.

CDU: 661.162.2

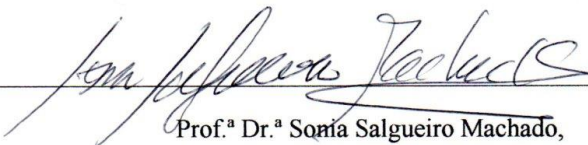
FOLHA DE APROVAÇÃO

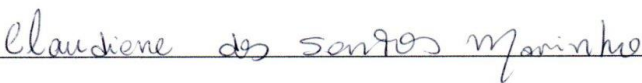
WANDERSON SILVA MELO

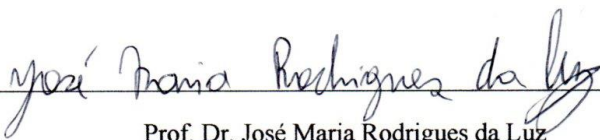
AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DO METRIBUZIN NA ATIVIDADE DE
CATALASE HEPÁTICA DE *Prochilodus argenteus*.

Aprovado em: 09/12/2019

Banca Examinadora:


Prof.^a Dr.^a Sofia Salgueiro Machado,
Universidade Federal de Alagoas (Orientadora)


Dr.^a Claudiane Santos Marinho
(Examinador Interno)


Prof. Dr. José Maria Rodrigues da Luz
(Examinador Externo)

Dedico esse trabalho aos meus pais Nilton e Maria de Lourdes, à minha irmã Ana Beatriz e a você que lê.

AGRADECIMENTOS

Ao criador, seja ele quem for, pela vida;

A meus pais por me darem a vida, por todo amor e paciência empregados para que eu e minha irmã nos tornássemos o que somos hoje;

À Universidade Federal de Alagoas por me proporcionar conhecimento, experiências e amizades que levarei para o resto da vida.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Sonia Salgueiro Machado, minha mãe científica, por me acolher em seu laboratório, por todos os ensinamentos, pela paciência, por todo o apoio e por sempre querer reacender o ânimo e o pensamento científico com uma centelha gerada por um questionamento intrigante.

À Msc. Gabriela Santos Lima que mesmo com todas as suas dificuldades me apoiou, me ensinou, foi paciente e uma das principais incentivadora para que esse trabalho se concretizasse. Meu sincero muito obrigado, Gabi!

À Dr^a Claudiane Marinho, por toda paciência ao passar ensinamentos e sugestões, além da sua prontidão aos pedidos de socorro em diversas ocasiões e horas do dia.

Aos meus companheiros de laboratório Alana Mirely, Allana, Álvaro Edson, Evem Kaline, Marcos e Shaydy, que tornaram mais leves os dias e noites em toda essa jornada cansativa, complicada, porém gratificante que é a pesquisa científica nas universidades brasileiras.

Ao Jurandir pela ajuda com os peixes.

Aos meus colegas da turma de 2013.1 e aos amigos que encontrei durante a jornada acadêmica, por todas as alegrias nos momentos que passamos juntos.

Aos amigos acadêmicos e de vida Allef, Evellyn Patrícia, Gebson, Jamerson, João Wiktór, Jorge Neto, José Cícero (Júnior), Luís Paulo (Pato), Mirlane Santos, Tacyanne Santos, e todos os outros que não me recordo no momento, mas que me fizeram continuar. Meu muito obrigado pela contribuição de cada um, mesmo que indireta, para me tornar a pessoa que sou e pelo incentivo.

RESUMO

A grande utilização de herbicidas no Brasil levanta o questionamento sobre os possíveis danos que esses podem causar tanto ao meio ambiente quanto aos seres que vivem nele devido a dispersão aérea do herbicida, por lixiviação ou carreamento, afetando os animais aquáticos que sofrem diretamente com os impactos dessas aplicações. O metribuzin é um herbicida que sofre lixiviação, sendo amplamente utilizado para eliminar ervas daninhas das culturas como soja, algodão e principalmente cana-de-açúcar. Visto isso, há uma necessidade de aferir o impacto dessa substância nos cursos d'água e nos indivíduos que ali habitam, então optou-se por uma espécie aquática levando em conta sua sensibilidade ou tolerância a diversos tipos de alterações em seu habitat. A espécie sentinela usada foi a Curimatã Pacu (*Prochilodus argenteus*), endêmica do rio São Francisco e de importância para a subsistência ribeirinha, bem como o comércio local. Pensando nesses impactos, esse trabalho tem como objetivo avaliar a atividade de catalase hepática e a concentração proteica total após a exposição ao metribuzin e analisar a cinética enzimática dessa mesma enzima em peixes saudáveis. Os peixes foram submetidos a um experimento correlacionando concentração num período de tempo, onde as concentrações de metribuzin foram 37,32, 74,65, e 111,97 mg.L⁻¹, durante 24 e 96h. Foi constatado uma diminuição significativa (de acordo com o teste estatístico de Tukey) da atividade de catalase com a maior concentração (111,97 mg.L⁻¹), quando comparado ao controle em 24 e 96h, sendo a inibição respectivamente 64,41% e 78,91%. A concentração proteica total diminuiu 36,83% em 24h e 35,94% em 96h. Para a cinética enzimática se utilizou concentrações de H₂O₂ entre 0,5 e 24,26 mM obtendo-se as constantes cinéticas K_m (80,58 ± 12,83 M), V_{máx} (2,06 ± 0,2486 M.min⁻¹). O decaimento de atividade e de proteínas totais mostram o potencial tóxico do metribuzin, a cinética realizada mostrou que a catalase não segue o modelo proposto por Michaelis-Menten e as constantes cinéticas foram obtidas por estimativa de valores.

Palavras-chave: Catalase. Metribuzin. *Prochilodus argenteus*. Cinética enzimática.

ABSTRACT

The widespread use of herbicides in Brazil raises questions about the possible damage they may cause to the environment and the beings that live in it due to the aerial dispersal of the herbicide, by leaching or hauling, affecting aquatic animals that suffer directly from the impacts. of these applications. Metribuzin is a leaching herbicide that is widely used to eliminate weeds from crops such as soybeans, cotton and especially sugar cane. Given this, there is a need to gauge the impact of this substance on the watercourses and individuals living there, so we opted for an aquatic species taking into account its sensitivity or tolerance to various types of changes in its habitat. The sentinel species used was Curimatã Pacu (*Prochilodus argenteus*), endemic to the São Francisco River and of importance to the riverside subsistence, as well as local trade. Thinking about these impacts, this work aims to evaluate liver catalase activity and total protein concentration after exposure to metribuzin and to analyze the enzymatic kinetics of this same enzyme in healthy fish. The fish were subjected to an experiment correlating concentration over a period of time, where metribuzin concentrations were 37.32, 74.65, and 111.97 mg.L⁻¹ over 24 and 96h. It was found a significant decrease (according to Tukey's statistical test) of catalase activity with the highest concentration (111.97 mg.L⁻¹) when compared to control at 24 and 96h, with inhibition respectively 64.41 % and 78.91%. Total protein concentration decreased 36.83% in 24h and 35.94% in 96h. For the enzymatic kinetics H₂O₂ concentrations between 0.5 and 24.26 mM were used to obtain the kinetic constants Km (80.58 ± 12.83 M), Vmax (2.06 ± 0.2486 M.min⁻¹). The activity and total protein decay show the toxic potential of metribuzin, the kinetics performed showed that the catalase does not follow the model proposed by Michaelis-Menten and the kinetic constants were obtained by estimation of values.

Keywords: Catalase. Metribuzin. *Prochilodus argenteus*. Enzyme Kinetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura molecular do Metribuzin.....	17
Figura 2. Integração dos sistemas de defesa enzimático.....	24
Figura 3. Catalase em representação estrutural.....	26
Figura 4. Estruturas dos grupos heme b e d na forma inativa presente no sítio catalítico da catalase.....	27
Figura 5. Etapas de redução do peróxido no sítio catalítico da catalase e conversão do heme b para o heme d.....	28
Figura 6. Velocidade catalítica de catalase hepática obtidos após 24 (a) e 96h (b) de exposição ao Metribuzin.....	35
Figura 7. . Quantificação de proteína obtida após 24 (a) e 96h (b) de exposição ao Metribuzin.	37
Figura 8. Atividade específica de Catalase após 24 (a) e 96h (b) de exposição ao Metribuzin.....	38
Figura 9. Curva cinética utilizando o modelo de Michaelis-Menten para catalase hepática de <i>P. argenteus</i>	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos herbicidas de A à Z, de acordo com o mecanismo de reação.....	14
Tabela 2. Classes toxicológicas dos agrotóxicos com base na DL50.....	16

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Cálculo da atividade enzimática	33
Equação 2 – Cálculo da concentração proteica	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Herbicidas	14
2.1.2 Metribuzin	17
2.2 Contaminação em ambientes aquáticos	18
2.3 Peixes como sentinela.....	18
2.4 A espécie Curimatã-Pacu (<i>Prochilodus argenteus</i>).....	20
2.5 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's)	20
2.5.1 Espécies radicalares	21
2.5.1.1 Radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$).....	21
2.5.1.2 Radical superóxido ($\text{O}_2\text{-}\bullet$).....	21
2.5.1.3 Radicais peroxila ($\text{RO}_2\bullet$) e alcoxila ($\text{RO}\bullet$)	21
2.5.2 Espécies não radicalares	21
2.5.2.1 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2).....	22
2.5.2.2 Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2^*$).....	22
2.5.2.3 Ozônio (O_3).....	22
2.6 Sistema de defesa antioxidante	23
2.7 Biomarcadores enzimáticos	24
2.8 Catalase.....	25
2.9 A importância dos estudos cinéticos	29
3.OBJETIVOS	31
3.1 Geral	31
3.2 Específicos.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Local de origem da espécie	32
4.2 Procedimento Experimental	32
4.3 Preparação do extrato de fígado	32
4.4 Determinação de atividade de Catalase	33
4.5 Quantificação de teor proteico.....	33
4.6 Análise estatística	34

4.7 Determinação das constantes cinéticas.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

O primeiro agrotóxico foi sintetizado por Othomar Zeidler em 1874 e recebeu o nome de DDT (Diclorodifeniltricloroetano). Porém só em 1939 Paul Muller descobriu o efeito inseticida e antimalárico do DDT, recebendo o prêmio Nobel por isso em 1948. Foram inicialmente utilizados como armas químicas, em maior quantidade na segunda guerra mundial. (KATSURAGAWA et al., 2008).

Com o desenvolvimento tecnológico e científico, novos princípios ativos foram desenvolvidos ou reformulados para que se houvesse um menor impacto ao meio ambiente e a quem tem contato direto com esse tipo de produto. Entretanto, a utilização em massa pela maioria dos países, inclusive o Brasil, levanta o questionamento contínuo do quão agressivos esses produtos podem ser, a quem eles podem atingir e como atingirão.

O Brasil é um país de grande produção agropecuária e em especial de monoculturas como a soja, algodão e a cana-de-açúcar com uma crescente expansão na utilização de novas tecnologias e insumos para a produção. No que se diz respeito à utilização de agentes químicos para o controle de pragas, essas culturas utilizam agrotóxicos, que são divididos em 4 grandes grupos: herbicidas, pesticidas, fungicidas e inseticidas. Nas plantações de cana de açúcar, um dos herbicidas mais utilizados é o Metribuzin, por conseguir remover uma ampla variedade de ervas daninhas.

Por sofrer lixiviação, esse herbicida pode chegar a cursos d'água contaminando e gerando impactos na biota aquática daquela região. Tendo em vista a grande utilização e do potencial de lixiviação desse herbicida, faz-se necessário analisar os impactos desse uso e possíveis danos quem venha causar ao ambiente e aos que vivem nele, principalmente quando se analisa o efeito dessa contaminação como aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO's) e a atuação do sistema de defesa antioxidante.

Para analisar um possível impacto desse herbicida em peixes, foram realizados experimentos com uma espécie de peixe endêmica do rio São Francisco, o *Prochilodus argenteus* (curimatã-pacu), para quantificar as alterações da atividade de catalase hepática e quantidade de proteínas totais após a exposição ao metribuzin e a cinética enzimática de catalase hepática dessa mesma espécie (sem exposição) para avaliar o comportamento enzimático.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Herbicidas

Os herbicidas são uma classe de agrotóxicos utilizados no tratamento contra ervas daninhas de diversas culturas. Dados recentes mostram que em 2017 o Brasil comercializou US\$ 8,893 bi de agrotóxicos e que desse valor, apenas com herbicidas, foram gastos aproximadamente 3,1 bilhões de dólares, correspondendo a 35% do total. O custo total foi 7% menor que em 2016, quando foram comercializados US\$ 9,56 bi. Também em 2017, 11,7% do valor da comercialização de agrotóxicos foi direcionado à cana-de-açúcar que correspondeu a pouco mais de um bilhão e quarenta e dois milhões de dólares (1.042.474.723 US\$) (SINDVEG, 2019).

Há diversos modos de classificação dos herbicidas: através da sua seletividade, sendo seletivo ou não-seletivo; a partir da sua translocação, com ação de contato ou ação sistêmica; analisando o período de utilização: pré-plantio, pré e pós-emergencial; e ainda a partir da estrutura química, do mecanismo de ação, propriedades físico-químicas, potencial de lixiviação, solubilidade, polaridade e forma de dissociação (CARVALHO, 2013; OLIVEIRA JR, 2011). Atualmente a classificação é dada a partir do mecanismo de reação dos herbicidas e esses são catalogados como mostra a tabela 1:

Tabela 1. Classificação dos herbicidas de A a Z, de acordo com o mecanismo de reação

Classificação	Mecanismo	Grupo químico	Exemplo
A	Inibidores da acetil CoAcarboxilase – ACCse	Ciclohexadionas e ariloxifenoxipropionatos (ZAMBOLIM, ZUPPI e SANTIAGO, 2008).	Cletodim
B	Inibidores da acetolactase sintase – ALS	Imidazolinonas e sulfoniluréias (ZAMBOLIM, ZUPPI e SANTIAGO, 2008).	Imazapir
C	Inibidores do fotossistema II (C1,C2,C3)	Triazinas e Uréias (ROMAN et al., 2005)	Metribuzim, Diurom e Bentazona
D	Inibidores do fotossistema I	Bipiridilos (RODRIGUES; ALMEIDA, 1998).	Paraquate

E	Inibidores da protoporfirinogênio oxidase – PROTOX	Difenil-éteres, triazolinonas, n-fenil-ftalimidas, oxidazolinas e triazolinonas (CARRETERO, 2008).	Flumioxazina
F2	Inibidores da síntese do caroteno	Isoxazolidinona, piridazinonas, Isoxazol, tricetonas. (ZAMBOLIM, ZUPPI e SANTIAGO, 2008).	Isoxafutol
F4	Inibidores da DOXP-Sintase	Isoxazolidinona (ZAMBOLIM, ZUPPI e SANTIAGO, 2008).	Clomazona
G	Inibidores da EPSP's	Glicina (ZAMBOLIM, ZUPPI e SANTIAGO, 2008).	Glifosato
H	Inibidor de Glutamina	Homoalanina substituída (ANVISA, 2019).	Amônio Glufosinato
I	Inibidor do DHP	Sulfanililcarbamato (AGROLINK FITO, 2019)	Asulam
K1	Inibidores da formação de microtúbulos	Dinitroanilina (AGROLINK FITO, 2019)	Trifuralina
K3	Inibidores da síntese de ácidos graxos de cadeia longa	Tiocarbamatos, Ariloxifenoxipropionatos e Ciclohexanodionas (ROMAN et al., 2005)	S-metolaclo-ro
L	Inibidores da síntese da parede celular	Alquilazina e Acidoquinolinocarboxílico (AGROLINK FITO, 2019)	Indaziflam e Quincloraque.
N	Inibidor da síntese de lipídeos	Ariloxifenoxipropionatos (ZAMBOLIM, ZUPPI e SANTIAGO, 2008).	Tiobencarbe
O	Mimetizadores de Auxina	Ácido benzóico, Ácido ariloxialcanóico, Ácido piridin-carboxílico e Ácido quinolin-carboxílico (ROMAN et al., 2005)	Ácido diclorofenóxiacético (2,4-D)
Z	Organoarsenical	Organoarsênico (AGROLINK FITO, 2019)	Metil arsenato monossódico

Fonte: Adaptado de Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas Daninhas aos Herbicidas – (HRAC-BR), 2018.

Essa extensa quantidade de parâmetros abre um leque de possibilidades de produtos a serem utilizados em diversos tipos de plantio o que acaba aumentando a quantidade de herbicidas utilizados e contribuindo para um aumento da contaminação do solo e de corpos d'água. Dessa forma, tende a aumentar a quantidade de indivíduos não-alvo a serem atingidos e diversificar ainda mais os possíveis danos a esses indivíduos.

Vários estudos realizados comprovam os danos causados tanto em seres humanos – estudo publicado pela Fiocruz (FRIEDRICH, 2014) que avaliou os efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutivo, hormonal e câncer para seres humanos após o uso do ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) – como em peixes (TUREK et al., 2017; HUSAK et al., 2014; NWANI et al., 2010), ratos (ELALFY et al., 2017) e diversas outras espécies.

Segundo a Agência Embrapa de Informação Tecnológica – AGITEC, a toxicidade dos agrotóxicos é quantificada em ensaios de Dose Letal – DL₅₀ que, com esses resultados, classificam os herbicidas em classes toxicológicas como na tabela abaixo:

Tabela 2. Classes toxicológicas dos agrotóxicos com base na DL₅₀¹

Classe Toxicológica	Classificação	Cor da faixa no rótulo da embalagem
	Extremamente Tóxico: as formulações sólidas que apresentam DL 50 oral, para ratos, igual ou inferior a 5 mg/kg;	Vermelho intenso
II	Altamente Tóxico: as formulações sólidas que apresentam DL 50 oral, para ratos, superiores a 5 mg/kg e até 50 mg/kg, inclusive;	Amarelo intenso
III	Medianamente Tóxico: as formulações sólidas que apresentam DL 50 oral, para ratos, superior a 50 mg/kg e até 500 mg/kg, inclusive;	Azul intenso
IV	Pouco Tóxico: as formulações sólidas que apresentam DL 50 oral, para ratos, superior a 500 mg/kg, inclusive;	Verde intenso

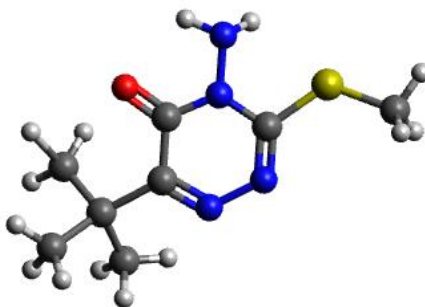
Dose letal 50 aguda - DL 50 - por via oral e dérmica, para animais de laboratório, para os produtos técnicos e produtos formulados. Concentração letal 50 inalatória - CL 50 - para produtos formulados: fumigantes, vaporizáveis, voláteis e pós com partículas de diâmetro igual ou menor que 15 micrometros, nas condições de uso.

Fonte: Adaptado de BARRIGOSI, 2018 e AGITEC, 2018.

2.1.2 Metribuzin

Metribuzin ou 4-amino-6- {1,1-dimetiletil} -3- {metiltio} - 1,2,4-triazina- 5 (4H) -ona é um herbicida pré e pós-emergente pertencente ao grupo químico das triazinonas e é usado para remoção uma ampla variedade de ervas daninhas nas culturas de soja, batata, cana-de-açúcar, tomate, café e outras. Tem uma solubilidade em água, em torno de 1,22 mg / L; uma baixa persistência no solo e uma meia vida entre 5 e 50 dias em solo podendo variar de acordo com cada tipo de solo pois é pouco móvel em solo com alto teor de matéria orgânica e tem sua mobilidade aumenta em solos com pH alto. Possui um valor de DL50 de 1,09 g/kg para ratos (CHAUHAN E KUMARI, 2007; QUESADA-MOLINA et al. 2007; ROMAN et al., 2005).

Figura 1. Estrutura tridimensional molecular do Metribuzin



Em azul: átomos de Nitrogênio; em amarelo: átomo de Enxofre; em cinza: átomos de Carbono; e em branco: átomos de Hidrogênio. Fonte: O autor, 2019.

Parâmetros utilizados para avaliar impactos causados por herbicidas, como a capacidade de transporte de herbicidas proposto pela Environmental Protection Agency (EPA) e o índice proposto por Groundwater Ubiquity Score (GUS), que avalia o potencial de contaminação de água subterrânea por herbicida, indicam o metribuzin como passível de lixiviação e por isso se torna um potencial contaminante de águas subterrâneas (BRITO, 2012).

Esse herbicida age pela inibição da fotossíntese por interferência com o transporte de elétrons na reação de Hill do fotossistema-II (ligam-se a um sítio de ligação da plastoquinona fotossistema II no complexo de proteínas D1 fundado nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos), resultando na destruição das membranas do tilacóide e a morte celular (STEPANOV et al., 2012).

Em organismos não-alvos mostrou alterações histopatológicas no fígado e nos rins, aumento da glicose-6-fosfato desidrogenase e lactato desidrogenase como marcador de lesão tecidual e celular; diminuição da glicose, colesterol, nível de proteína total e enzimas como catalase e acetilcolinesterase e aumento nos parâmetros de estresse oxidativo em estudo de quatro semanas com Gold fish (*Carassius auratus L.*) de acordo com Husak et al., 2014.

2.2 Contaminação em ambientes aquáticos

É de vasto conhecimento que os agrotóxicos são potencialmente tóxicos ao meio ambiente e isso inclui os corpos d'água, sejam eles de águas superficiais ou subterrâneas. A contaminação desses ambientes causa desequilíbrios na biota da região e um possível dano aos moradores locais que se utilizam desses corpos d'água (OLIVEIRA, 2018).

Os agrotóxicos podem chegar aos rios através de um processo de carreamento superficial que é o arraste horizontal do herbicida no solo até os corpos hídricos (AMÉRICO et al., 2015) ou lixiviação que segundo Carvalho (2013), é o processo de carregamento vertical do herbicida no solo, ou seja, em profundidade, e que dependerá de fatores como o tipo de solo, a quantidade de precipitação e a quantidade de matéria orgânica existente no terreno.

Além disso, o

Diversos tipos de agrotóxicos, inclusive herbicidas, foram detectados em águas superficiais por diversos estudos, em vários países como Espanha, Japão, China, Portugal e Brasil. As maiores concentrações são medidas após períodos de chuvas intensas que acabam carreando superficialmente e lixiviando esses compostos (DORES e DE-LAMONICA-FREIRE, 2001; AMÉRICO et al., 2015). No caso dos herbicidas, podem ocasionar alterações tanto em plantas aquáticas, com a inibição da fotossíntese e de enzimas importantes, quanto em moluscos e peixes com a inibição de enzimas e estresse oxidativo (AMÉRICO et al., 2015).

2.3 Peixes como sentinela

Estudos com animais são realizados a fim de compreender a ação de poluentes e avaliar impactos em corpos hídricos atingidos por metais pesados, pesticidas, parasitas ou outro tipo de contaminação a qual esses animais estejam expostos, e as possíveis consequências aos que sofram direta e indiretamente com essa contaminação como os humanos (OLIVEIRA, 2018;

GATTI; MAGALHÃES, 2018; FRANÇA, 2017; KOUTNIK et al., 2017; NEVES, 2016; HUSAK et al., 2014; BERNET et al., 1999).

A poluição da água pode causar diversos distúrbios na biota aquática e essas alterações podem ser bioquímicas, celulares, endócrinas que podem desencadear mudanças na população de determinada espécie em decorrência de possíveis alterações genéticas e de comportamento oriundos da exposição desses animais a esses xenobióticos (FLORES-LOPES; MALABARBA, 2007).

Esses poluentes podem ser encontrados em concentrações consideradas normais no meio líquido e se acumular em quantidades aceitáveis nos níveis mais baixos da cadeia trófica. Entretanto, ao longo da cadeia a biomagnificação atinge de forma mais intensa os organismos do topo da cadeia trófica, que nesse caso são os peixes, camarões, etc., o que pode impactar não só a biota da região, mas também trazer malefícios ao ser humano que se alimenta desses (MORAES e JORDÃO, 2002).

A exposição pode ser avaliada por medida da concentração do agente químico em amostras ambientais, como o ar (monitorização ambiental), ou através da medida de parâmetros biológicos (monitorização biológica), denominados indicadores biológicos ou biomarcadores (AMORIM, 2003). A utilização de biomarcadores, que de acordo com Van der Oost (2003) é definido como uma resposta biológica, sendo ela de nível molecular, celular, fisiológica, de comportamento ou alterações que podem estar relacionadas com a exposição aos efeitos de produtos químicos ambientais.

Os peixes têm sido escolhidos como organismo sentinela por permitir o monitoramento de diversos parâmetros inclusive da toxicidade aquática porque são, os organismos mais bem compreendidos no meio aquático e possuem relevante importância para o homem como fonte alimentar. Além disso, a mobilidade desses animais permite avaliar o efeito regional em grande escala de uma possível contaminação em determinada região (OSMAN et al., 2010).

Com os avanços dos estudos sobre biomarcadores, as respostas sobre contaminação de ambientes aquáticos se tornaram mais precisas permitindo avaliar aspectos bioquímicos das espécies afetadas. Dentro desse contexto, a análise com biomarcadores, principalmente os oriundos de peixes, pode fornecer dados relevantes para que se realize uma proposta de biorremediação e assim diminuir ou impedir a expansão dos impactos causados naquela região (DELUNARDO, 2010).

2.4 A espécie Curimatã-Pacu (*Prochilodus argenteus*)

O *Prochilodus argenteus* (curimatã-pacu), também conhecido no Brasil como xira, foi descrito e catalogado inicialmente por SPIX e AGASSIZ (1829) em uma expedição ao território brasileiro. Trata-se de uma espécie detritívora, base da cadeia trófica e por isso está mais sujeita à toxicidade provocada pela lixiviação de produtos como agroquímicos. É uma espécie neotropical, migradora (SILVA et al., 2016) com taxonomia:

Classe Actinopterygii;

Ordem Characiformes;

Família Prochilodontidae;

Gênero Prochilodus.

Fonte: Taxonomia da espécie segundo Nelson (2006).

A espécie é originalmente endêmico da bacia do Rio São Francisco, mas também foi distribuído, posteriormente, em várias bacias hidrográficas do Nordeste, sendo de grande importância social e ecológica para essa região do Brasil (SILVA et al., 2016) e chega a representar 40% dos desembarques de pescado em algumas localidades do Baixo São Francisco (SOARES et al., 2011).

Segundo Coimbra et al. (2017), ao longo dos anos houve uma diminuição da aparição do *P. argenteus* no médio e baixo São Francisco, o que incluiu a espécie no programa de conservação das espécies com a inclusão de alevinos. Entretanto, esse processo deve ser acompanhado de um monitoramento genético prévio para que essa inclusão não implique em alguma variabilidade genética futura como as já encontradas por Barroca et al. 2012.

2.5 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's)

O efeito de xenobióticos podem alterar a homeostase dos peixes criando condições onde se favoreça a formação de espécies reativas de oxigênio. As principais ERO's distribuem-se em dois grupos, os radicalares: representados pelos radicais hidroxila (HO•), superóxido (O₂•-), peroxila (ROO•) e alcóxila (RO•) e os não-radicalares como o oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio e ozônio.

2.5.1 Espécies radicalares

2.5.1.1 Radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$)

É o mais reativo e mais lesivo radical conhecido para o qual o organismo humano não dispõe de mecanismo de defesa. Reage com uma série de endobióticos, causa modificação no DNA, danos nas proteínas, inativação enzimática e peroxidação lipídica. É formado principalmente por dois mecanismos: reação de H_2O_2 com metais de transição (reação de Fenton e reação de Haber-Weiss) e homólise da água por exposição à radiação ionizante e devido ao fato da célula possuir metais de transição, facilitando a geração do radical $\text{HO}\bullet$ em seu interior. (VASCONCELOS et al., 2007; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

2.5.1.2 Radical superóxido ($\text{O}_2\text{-}\bullet$)

O ânion superóxido ($\text{O}_2\text{-}\bullet$) é o mais comumente gerado a partir de elétrons que escapam da cadeia transportadora das mitocôndrias e reduzem o O_2 presente nas células. São também gerados continuamente por outros processos celulares que envolvem atuação enzimática (enzimas como xantina oxidase e NADPH oxidase) e pela redução monoelétrica de O_2 . A produção de grande quantidade de $\text{O}_2\text{-}\bullet$ realizada pela NADPH Oxidase (Nox) nas células do sistema imunológico é utilizada com finalidade de matar microrganismos invasores. Rapidamente desaparece em solução aquosa por dismutação e em solução aquosa é um oxidante fraco. (MARTELLI; NUNES, 2014; VASCONCELOS et al., 2007).

2.5.1.3 Radicais peroxila ($\text{RO}_2\bullet$) e alcoxila ($\text{RO}\bullet$)

Formados durante a decomposição de peróxidos orgânicos e reações de carbono radicalar com oxigênio, como na peroxidação lipídica que pode ser catalisada por íons ferro e por conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais alcoxila ($\text{LO}\bullet$) e peroxila ($\text{LOO}\bullet$) (VASCONCELOS et al., 2007; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

2.5.2 Espécies não radicalares

2.5.2.1 Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O H₂O₂ é um metabólito do oxigênio extremamente importante, mas que pode ser igualmente prejudicial, pois participa de reações que produzem o OH· (reações de Fenton e Haber-Weiss). O H₂O₂ tem vida longa, pode atravessar camadas lipídicas, é capaz de reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe⁺⁺. Assim, é altamente tóxico para as células e essa toxicidade pode ser aumentada de dez para mil vezes quando em presença de ferro, como ocorre, por exemplo, na hemocromatose transfusional (acúmulo de ferro nos tecidos a partir de transfusão) (ROVER JÚNIOR et al., 2001; FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

É um intermediário formado pela reação de dismutação de O₂•- catalisada pela enzima Superóxido Dismutase (SOD), pela redução de 2e⁻ na molécula de O₂ e pela ação de diversas enzimas oxidases *in vivo*, localizadas nos peroxissomas. Propaga-se com facilidade dentro e entre as células *in vivo* e pode também inativar algumas enzimas, oxidar moléculas como piruvato e α-cetoglutarato, degradar proteínas como mioglobina, hemoglobina e citocromo c e oxidar o DNA (DNA nuclear e mitocondrial) e lipídeos. (VIZZOTTO, 2017; DA SILVA, GONÇALVES, 2010; VASCONCELOS et al., 2007).

2.5.2.2 Oxigênio singlete (¹O₂*)

É forma excitada de oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. A forma mais deletéria do oxigênio ao organismo é o oxigênio singleto (¹O₂), pois é o estado eletronicamente excitado do oxigênio, não possui elétrons desemparelhados em sua última camada e é produzido por reações fotoquímicas ou por outras radiações; reage com um grande número de moléculas biológicas, incluindo lipídeos da membrana, iniciando processos de peroxidação ¹O₂ (BARREIROS, DAVID, DAVID et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007).

2.5.2.3 Ozônio (O₃)

Produzido no ar atmosférico poluído e por fonte de luz intensa de algumas fotocopiadoras e outros equipamentos. É extremamente danoso ao pulmão, oxidando rapidamente proteínas, DNA e lipídeos. (VASCONCELOS et al., 2007).

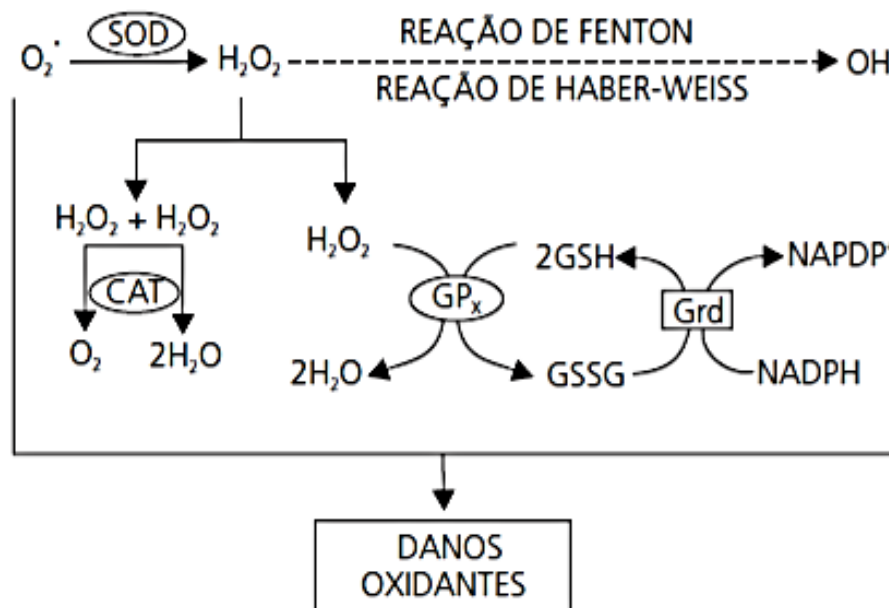
2.6 Sistema de defesa antioxidante

O sistema de defesa antioxidante (SDA) tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicalares (BARBOSA et al., 2010). O SDA inclui enzimas, espécies redutoras (sequestrante de elétrons) e nutrientes; todos encarregados de eliminar e reduzir os efeitos das ERO's na célula. No organismo, existe um equilíbrio entre as ERO's e o SDA; quando este se desequilibra em favor das ERO's, ocorre, na célula, o estresse oxidativo (EO) que é considerado componente central de diversas patologias (VALLE, SÁNCHEZ. 2013; POLJSK. 2011).

As ERO's são produzidas durante o processo metabólico no organismo humano, assim para gerar energia as reações de oxidação-redução são imprescindíveis. Essas reações caracterizam-se na transferência de elétrons de um reagente para outro, desse modo na molécula que doa elétrons há oxidação e a que recebe tem-se redução. No oxigênio (O_2) proveniente da respiração ocorre a redução, nesse processo de ganho de elétrons o O_2 gera as espécies reativas pela redução de um elétron produzindo o ânion superóxido ($O_2\cdot^-$) e pela redução de dois elétrons formando o peróxido de hidrogênio H_2O_2 , além disso, o ânion superóxido é formado nas mitocôndrias durante o processo de respiração celular. (SANTOS et al., 2018).

Os organismos aeróbicos produzem a maior parte da energia química consumindo oxigênio em suas mitocôndrias. Esse processo ocorre na cadeia transportadora de elétrons e produz ERO's como os radicais superóxido ($O_2\cdot^-$), hidroxila ($OH\cdot$) e peroxinitrito ($ONOO^-$), e o íon hidroxila (OH^-) como produtos da reação. As mitocôndrias são, portanto, a principal fonte de armazenamento de oxigênio intracelular. Em contrapartida, o excesso de O_2 nas células é nocivo devido a uma maior formação das espécies reativas geradas durante sua oxidação (BARBOSA et al., 2010; POLJSK. 2011). Para diminuir os efeitos das ERO's o SDA entra em ação para eliminar essas espécies como demonstrado na figura a seguir:

Figura 2. Integração dos sistemas de defesa enzimático



Fonte: BARBOSA et al., 2010.

Entretanto, as ERO's podem ser provenientes fontes não-mitocondriais que incluem fatores ambientais poluentes, poluentes em alimentos, radiação, ou são os subprodutos de outros processos metabólicos nos organismos. As defesas celulares e de tecidos contra ERO's incluem as enzimas superóxido dismutase (Mn-SOD, Cu / Zn-SOD e extracelular (EC) -SOD), catalase, glutathiona peroxidase, peroxirredoxinas e os antioxidantes não enzimáticos, glutathiona (GSH), tioredoxina, ascorbato, α -tocoferol e ácido úrico (POLJSAK, 2011).

2.7 Biomarcadores enzimáticos

O aumento no uso de biomarcadores em estudos toxicológicos se dá pela obtenção de resultados em curto prazo. Esse aumento pode ser explicado pelo fato de o método propiciar uma verificação da intensidade de contaminação e dos efeitos adversos o que favorece a proteção das espécies locais e a detecção precoce de perturbações ambientais de uma possível contaminação por substâncias tóxicas (FREIRE et al., 2008).

Os biomarcadores são classificados em biomarcadores de exposição, de efeito e de suscetibilidade. Os biomarcadores de exposição são utilizados para avaliar a exposição individual ou em grupo para uma substância particular (dose interna). Já os de efeito são utilizados para analisar impactos adversos de adaptação do organismo (moleculares, bioquímicas, citológicas, fisiológicas, etc) à contaminação e os de suscetibilidade analisam o

grau de resposta da exposição provocada por um xenobiótico específico em indivíduos, como por exemplo a bioacumulação (LIMA, 2018; AMORIM, 2003).

Pelo fato de a classificação acima ser limitada, alguns autores recorrem a classificação proposta por Peakall (1992), que divide os biomarcadores enzimáticos em: biomarcadores de enzimas de biotransformação, biomarcadores de alteração de proteínas reguladoras, biomarcadores de disfunção endócrina e reprodutiva, biomarcadores de genotoxicidade, biomarcador histopatológicos, biomarcadores de metabolismo energético, biomarcador de neurotoxicidade, biomarcadores comportamentais e biomarcadores de estresse oxidativo (OLIVEIRA, 2014).

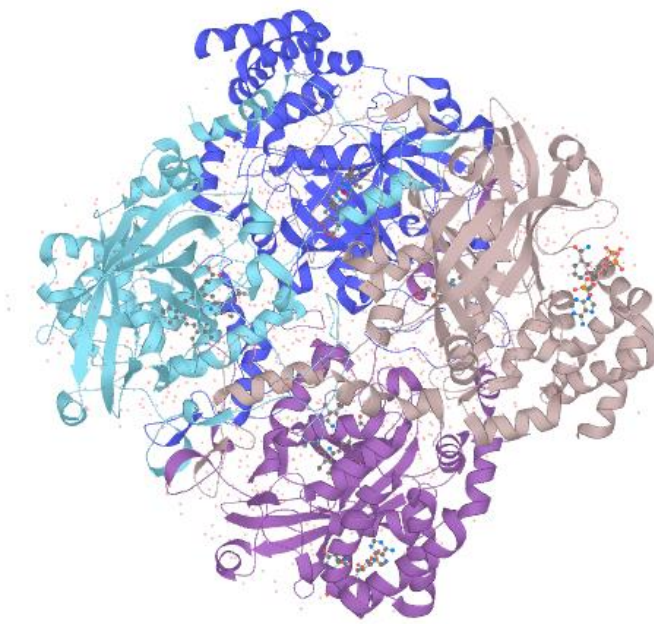
Pertencem à essa classe diversas enzimas responsáveis/auxiliadores de inúmeras reações e dentre os biomarcadores enzimáticos, as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione peroxidase (GPx) são amplamente utilizadas para avaliar as ações de xenobióticos, pois compõem a primeira linha de defesa das células contra as espécies reativas de oxigênio (OLIVEIRA, 2018; FERNANDES, 2012).

A utilização destas metodologias em espécies marinhas, contribuem para o entendimento da saúde dos organismos, principalmente em áreas potencialmente contaminadas já que a variação na atividade das enzimas antioxidantes pode ser utilizada como indicadores do estresse oxidativo mediado por poluentes (OLIVEIRA, 2018; ABHIJITH, RAMESH, POOPAL, 2016).

2.8 Catalase

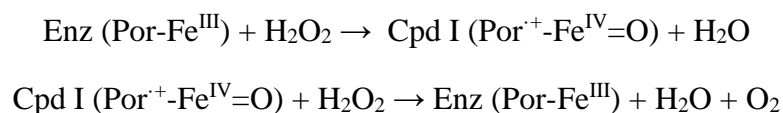
A enzima Catalase, (CAT, EC 1.11.1.6) ($H_2O_2:H_2O_2$) apresentada na figura 3, é uma proteína tetramérica encontrada em todos os organismos aeróbicos que catalisam reação de H_2O_2 em água e oxigênio. A CAT representa uma das várias formas de defesa antioxidante que a célula possui e desempenha um papel importante na eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO's) atuando juntamente com a SOD e a GPx. A ação integrada dessas três enzimas compõe o sistema antioxidante enzimático (PEREIRA, 2018;(CHELIKANI; FITA; LOEWEN, 2004).

Figura 3. Catalase em representação estrutural



Cada cor representa um monômero proteico com seus respectivos sítios ativos contendo um grupo heme representado na figura 4. Fonte: Safo et al., 2001.

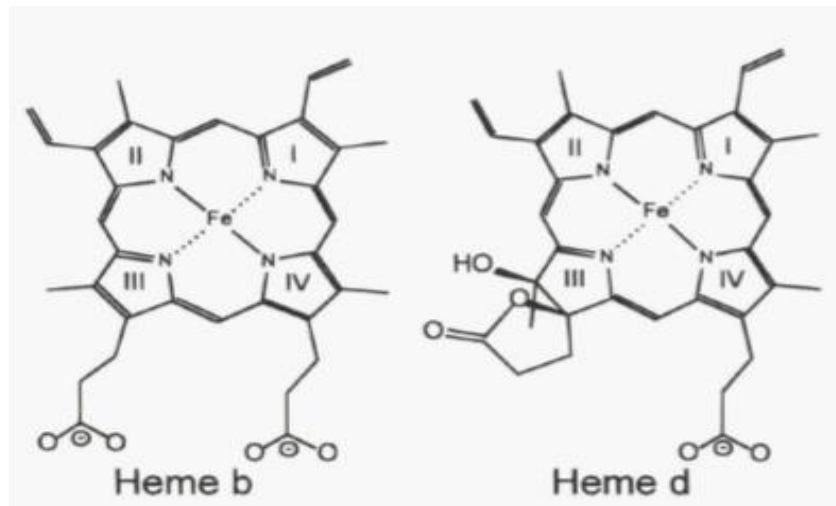
A CAT é classificada como uma enzima da subclasse das Oxidorredutases. Dentro dessa subclasse é classificada como uma peroxidase, pois tem como função a degradação do peróxido de hidrogênio. Acredita-se que a transformação do peróxido em água e oxigênio, em catalases contendo o grupo heme, ocorra em dois momentos:



Na reação 1, o peróxido de hidrogênio, resultante da transformação do íon superóxido (-O_2), oxida o grupo heme ($\text{Enz (Por-Fe}^{\text{III}})$) gerando oxidação do ferro e do anel de porfirina para gerar uma porfirina radical catiônico oxidando-o em íon Fe^{4+} resultando uma espécie oxiferril associada à porfirina ($\text{Por}^{\cdot+}\text{-Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) que seria extremamente instável e atrairia outra molécula de peróxido, em um segundo momento (reação 2), que atua como redutor do composto 1 (Cpd I) permitindo como produto dessa segunda reação o oxigênio molecular e a água (CHELIKANI; FITA; LOEWEN, 2004; AFONSO-PIETRO et al., 2009).

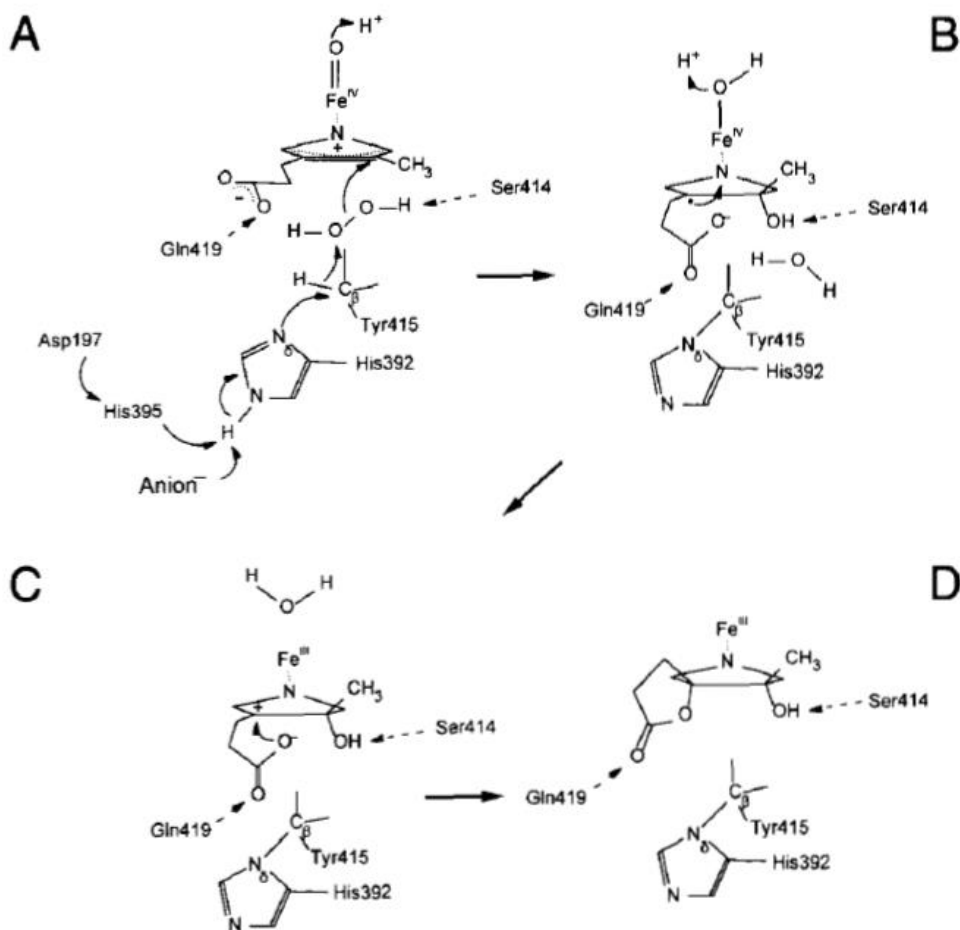
Esse processo fica mais evidente com o a proposta feita por Bravo et al. (1997) apresentada a seguir (figuras 4 e 5), mostrando os tipos de grupo heme, as etapas do processo redução do peróxido no sítio catalítico da catalase e a conversão entre as formas inativas do grupo heme em *Escherichia coli*.

Figura 4. Estruturas dos grupos heme b e d na forma inativa presente no sítio catalítico da catalase.



Fonte: Bravo et al, 1997.

Figura 5. Etapas de redução do peróxido no sítio catalítico da catalase e conversão do heme b para o heme d.



Fonte: Bravo et al, 1997.

O mecanismo começa com a formação do composto I mostrado em (A). O composto I é uma espécie de oxoferril ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) formada, juntamente com a água, na reação de um H_2O_2 com o heme. O ferro está em um estado formal de oxidação, mas um elétron é deslocado do heme para criar o oxo- Fe^{IV} -heme cátion, mostrado como a espécie inicial, composto I. Uma série de reações confirmadas, possivelmente desencadeadas por Asp 197 / His 395 ou por uma espécie aniônica putativa ligada ao composto I, resulta na transferência de um hidroxil para o heme do H_2O_2 e na geração de uma espécie radical neutra em (B). A transferência subsequente de elétrons do heme para o ferro geraria o cátion mostrado em (C), o que facilitaria a ciclagem da espirolactona para formar o produto final contendo a ligação His-Tyr e o heme modificado mostrado em (D) (BRAVO et al., 1997).

O estresse oxidativo é o resultado de um desequilíbrio entre moléculas anti e pró-oxidantes que pode ser proveniente de inúmeros fatores e a CAT é empregada como um

excelente biomarcador para resposta antioxidante em vários estudos (KIM et al., 2010 e por demonstrar boas respostas sobre o indicativo de H_2O_2 sendo a enzima mais importante em condições onde há uma grande concentração de formação H_2O_2 como, por exemplo, os peroxissomas, fígado e eritrócitos, já que ela é o principal regulador da concentração de H_2O_2 nesses locais (PINTO et al., 2015).

A catalase é encontrada em praticamente todos os organismos aeróbicos. A atividade da enzima varia em diferentes tecidos, sendo maior em órgãos com alto potencial oxidativo. O estudo realizado por Vasylykiv et al. (2011) deu força a esse argumento quando seus resultados mostraram que a atividade de CAT diminuiu na seguinte ordem: fígado > rim \approx coração > músculo vermelho > cérebro > músculo branco. As diferenças na atividade da catalase podem ser explicadas pelas funções desses tecidos. Assim, o fígado realiza constantemente atividades biossintéticas e desintoxicantes que necessitam de um suprimento energético extenso proporcionado pelo metabolismo oxidativo. Já o músculo branco possui baixa atividade de catalase, correlacionada com a baixa intensidade do metabolismo oxidativo neste tecido.

Diversos estudos têm demonstrado a importância da CAT como importante biomarcador de condições estressoras. Vutukuru et al. (2006) mostraram a interferência do sulfato de cobre na atividade de CAT de Farpa voadora (*Esomus danricus*) e atenta ao fato de que estudos anteriores demonstram comportamentos diferentes a depender da espécie e que isso demonstra uma variação na defesa antioxidante em respostas a xenobióticos entre espécies.

Husak et al. (2016) também atentaram para o fato de que em resposta a utilização de herbicidas como xenobióticos há uma tendência de diminuição na atividade de CAT. Além disso, descobriu-se que a atividade da catalase era menor no fígado e no rim de peixes-ouro expostos ao metribuzin do que nos tecidos de peixes controle (MAKSYMIV et al., 2015; HUSAK et al., 2014).

2.9 A importância dos estudos cinéticos

Uma forma prática de se estudar os mecanismos de reações catalisadas por enzimas é a determinação da velocidade de reação e como ela se comporta quando sofre variação nos critérios utilizados para determiná-la como temperatura, pH e concentração do substrato. A análise desse comportamento é chamada de cinética enzimática. (NELSON e COX, 2014).

A relação enzima-substrato pode ocorrer de diversas formas a depender de cada tipo de enzima e segue o mecanismo genérico $E+S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E+P$, onde o substrato (S) reage com a enzima (E) para formar o complexo enzima-substrato (ES) e posteriormente formar o produto

da reação enzimática (P) com a enzima retornando ao seu estado inicial (E) para receber uma nova molécula de substrato e repetir o processo (NELSON e COX, 2014).

Para que o funcionamento da enzima seja entendido, algumas constantes são utilizadas para análise como a velocidade máxima de reação ($V_{\text{máx}}$) e a constante de Michaelis (K_m). A $V_{\text{máx}}$ enzimática é um valor aproximado obtido quando o aumento da concentração de substrato já não tem influência sobre a velocidade de reação, atingindo um momento de saturação da enzima e estabilização da velocidade de reação. Já o K_m , é a soma da constante de dissociação do complexo enzima-substrato em enzima + produto ($ES \rightleftharpoons E+P$) com a constante de dissociação do complexo retornando à enzima + substrato ($ES \rightleftharpoons E+S$) dividido pela constante de formação do complexo ES.

Para que o funcionamento da enzima seja entendido, algumas constantes são utilizadas para análise como o número de turnover (K_{cat}) que determina a velocidade limitante da reação catalisada por uma enzima em condições de saturação; a constante de Michaelis-Menten (K_m) que é a soma da constante de dissociação do complexo enzima-substrato em enzima + produto ($ES \rightleftharpoons E+P$) com a constante de dissociação do complexo retornando à enzima + substrato ($ES \rightleftharpoons E+S$) dividido pela constante de formação do complexo ES; a velocidade máxima de reação ($V_{\text{máx}}$) determinada pela velocidade no momento de saturação enzimática; e sua constante de especificidade (K_{cat}/K_m) que é a constante da velocidade para a conversão de enzima + substrato em enzima + produto. Para catalase, os valores de K_{cat} , K_m e K_{cat}/K_m são respectivamente $4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$, 1.1 M (o maior dentre as enzimas) e $4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (NELSON e COX, 2014).

No caso de toxicidades gerada pelas ERO's, o sistema antioxidante atua rapidamente com o intuito de manter as condições favoráveis no meio celular. Como já mencionado, a CAT é uma das principais enzimas desse sistema e quando esse sistema sofre diretamente os impactos dessa toxicidade acaba tendo sua eficiência enzimática comprometida levando a um desequilíbrio no controle de ERO's e causando desde pequenos danos até a morte do animal.

3.OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar o efeito do herbicida Metribuzin sobre a catalase hepática do peixe curimatã-pacu (*Prochilodus argenteus*).

3.2 Específicos

- Quantificar a atividade da catalase hepática;
- Quantificar proteínas totais presentes no fígado do *P. argenteus*;
- Realizar cinética enzimática de Catalase hepática de *P. argenteus* utilizando o modelo de Michaelis-Menten.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de origem da espécie

Foram cedidos pela CODEVASF-5ª SR (Companhia do Desenvolvimento do Vale do São Francisco e do Parnaíba), juvenis de *P. argenteus* com média de comprimento total de 9.5 ± 2.0 cm. A aclimação e o delineamento experimental foram conduzidos no Laboratório de Aquicultura (LAQUA/CECA). Os peixes foram aclimatados durante 15 dias, em tanque de 2500 L com sistema de aeração e recirculação da água, alimentados 4 vezes por dia com ração comercial 45% de Proteína Bruta, foram aferidos parâmetros de qualidade da água como: temperatura de 25.1 ± 0.1 °C, pH 6.60 ± 0.11 e oxigênio dissolvido (OD) de 5.6 ± 0.2 mg L⁻¹, utilizando sonda multiparâmetros (HANNA Instruments, modelo 9828, Woonsocket, USA).

4.2 Procedimento Experimental

Após aclimação, os peixes foram transferidos para aquários de 40 litros (volume útil de 33,5 L) e distribuídos em 12 aquários, sendo 12 animais em cada, utilizando metribuzin de fonte comercial com concentrações: controle-água; 37,32 mg.L⁻¹, 74,68 mg.L⁻¹, e 111,97 mg.L⁻¹. O valor para a CL₅₀ em 48h foi de 149.3 ± 3.1 mg. L⁻¹, obtido anteriormente em um ensaio de toxicidade aguda realizado por uma integrante do mesmo grupo de pesquisa (LIMA, 2018). Foram mantidos em jejum seguindo o protocolo ABNT NBR 2017 - Ecotoxicologia aquática, com duração de 96h em sistema estático (sem alimentação e sem troca d'água).

Os peixes foram sacrificados em 24 e 96 horas depois do início do experimento. Foram insensibilizados com Mesilato de Tricaína - TMS (MS-222) (de acordo com o item 8.2.9.3 da Resolução nº 13/ 2013, das Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – Concea) e tiveram os fígados retirados, congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -20°C em freezer até posteriores análises. Esse experimento foi aprovado pelo comitê de ética da UFAL (protocolo nº36/2017).

4.3 Preparação do extrato de fígado

Os extratos de fígado foram preparados de acordo com Miron et al. (2008). Foram utilizados pools de 3 fígados de cada tratamento, sendo macerados em um homogeneizador do tipo Potter com tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,4 (com Triton a 0,1% X-100 e NaCl

150 mM) na proporção de 1g de tecido : 20 mL de tampão e centrifugado a 10000g durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para quantificação enzimática e proteica, sendo diluído na proporção a qual se obtinha a melhor resposta sobre a absorbância que nesse caso foi de 1:15 (extrato:tampão).

4.4 Determinação de atividade de Catalase

A quantificação de catalase foi determinada espectrofotometricamente de acordo com Miron et al. (2008). O meio reacional consistia em 2856µL de tampão de fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0), 72 µL de extrato diluído (1:15), e 72 µL de H₂O₂ (0,3 M). A avaliação na mudança das absorbâncias foi realizada em 60s. Todas as leituras para catalase foram realizadas em cuvetas de quartzo a 240nm em um espectrofotômetro SHIMADZU, modelo UV – 1800. A atividade da catalase foi calculada em µmol.mg⁻¹.protein.min⁻¹.

A atividade foi calculada através da determinação da absorbância e os valores obtidos com a variação dessa absorbância foram utilizados para obtenção dos valores de atividade através da fórmula:

$$ativ. enz = \frac{(\Delta ABS) * Vr * Fd}{\epsilon * Vh} \quad (\text{Equação 1 – Cálculo da atividade enzimática})$$

Onde:

- *ativ. enz*: atividade enzimática dada em µmol.min⁻¹.ml⁻¹.mg de proteína⁻¹;
- ΔABS : (ABS_{10s} – ABS_{60s});
- *Vr*: Volume reacional (3000 µL);
- *Fd*: Fator de diluição;
- ϵ : Coeficiente de extinção do H₂O₂ à 240nm (43,6. M⁻¹.cm⁻¹);
- *Vh*: Volume do homogenato (72 µL).

4.5 Quantificação de teor proteico

Para a quantificação de proteína optou-se pelo método proposto por Bradford (1976) que utiliza o reagente de Bradford (2500 µL) e utiliza albumina sérica (BSA) (100 µL) como padrão

proteico para construção da curva de calibração. As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 595 nm.

A quantificação proteica foi calculada com base na determinação das absorvâncias aplicadas à fórmula abaixo:.

$$C = \left(\left(\frac{ABS-b}{a} \right) * \frac{Fd}{100} \right) \quad (\text{Equação 2 – Cálculo da concentração proteica})$$

Onde:

- *C*: concentração proteica encontrada em mg/mL;
- *ABS*: absorvância obtida à 595 nm;
- α : Coeficiente angular da equação resultante da curva de calibração do reagente de Bradford;
- *b*: Coeficiente linear da equação resultante da curva de calibração do reagente Bradford;
- *Fd*: Fator de diluição.

4.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram tratados no GraphPad Prism 6 utilizando o método comparativo one-way ANOVA com diferenças consideradas estatisticamente significativas com 95% de nível de confiabilidade ($p \leq 0.05$).

4.7 Determinação das constantes cinéticas

Os valores de absorvância obtidos foram tratados no GraphPad Prism 6 onde foi calculado os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ aparentes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

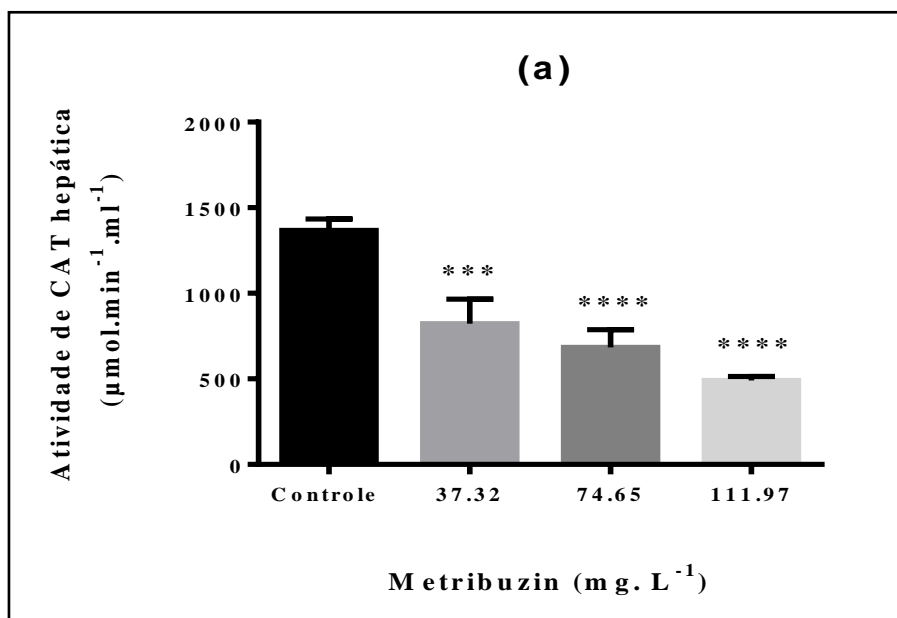
São descritas alterações enzimáticas e metabólicas, inclusive dos constituintes do sistema de defesa antioxidante, em diversas espécies frente a esse xenobiótico. Os efeitos visuais

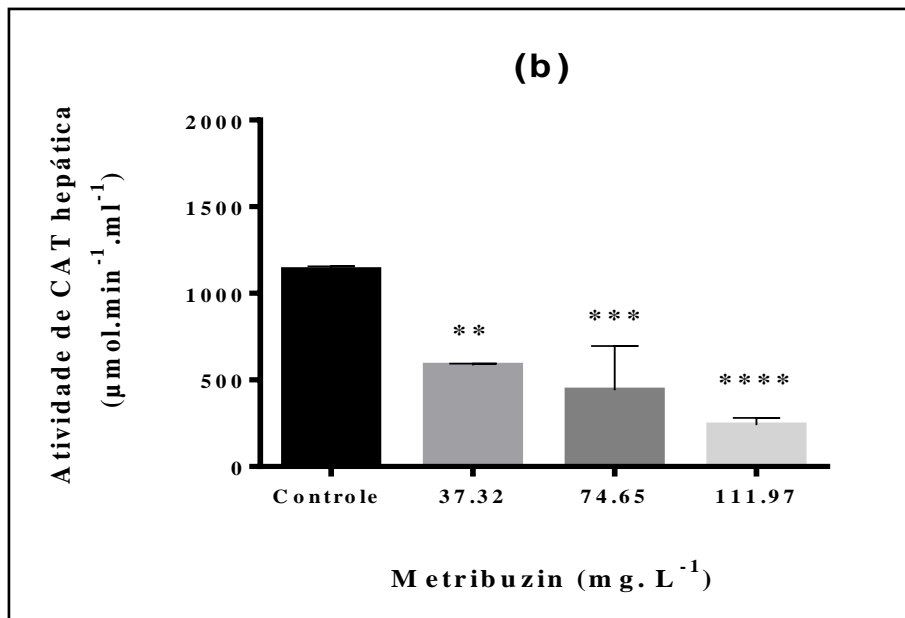
causados pelo metribuzin são diversos, como: aceleração da respiração, diminuição da coordenação motora, convulsões, saltos fora d'água, sangramento opercular e aumento das vísceras (KOUTINIK; STARA; VELISEK, 2015).

A atividade de catalase do fígado de *P. argenteus* expostos a diferentes concentrações de metribuzin após 24 e 96 h de exposição está representada na figuras 6. Após 24h de exposição ao metribuzin (figura 6a) observou um decaimento significativo na atividade de catalase no tecido dos animais expostos a todas as concentrações; seguindo um perfil de quanto maior a concentração do herbicida menor atividade de catalase. Este decaimento resultou em uma diminuição de 64,41% da atividade quando o tecido foi exposto à maior concentração do xenobiótico (111,97 mg/L) quando comparado ao controle.

Em 96 horas de exposição às mesmas concentrações de metribuzin (figura 6b) o perfil se manteve e o maior decréscimo significativo da atividade ocorreu com a exposição a maior concentração tendo uma redução de 78,91% da atividade quando comparado ao controle.

Figura 6. Velocidade catalítica de catalase hepática obtidos após 24 (a) e 96h (b) de exposição ao Metribuzin.





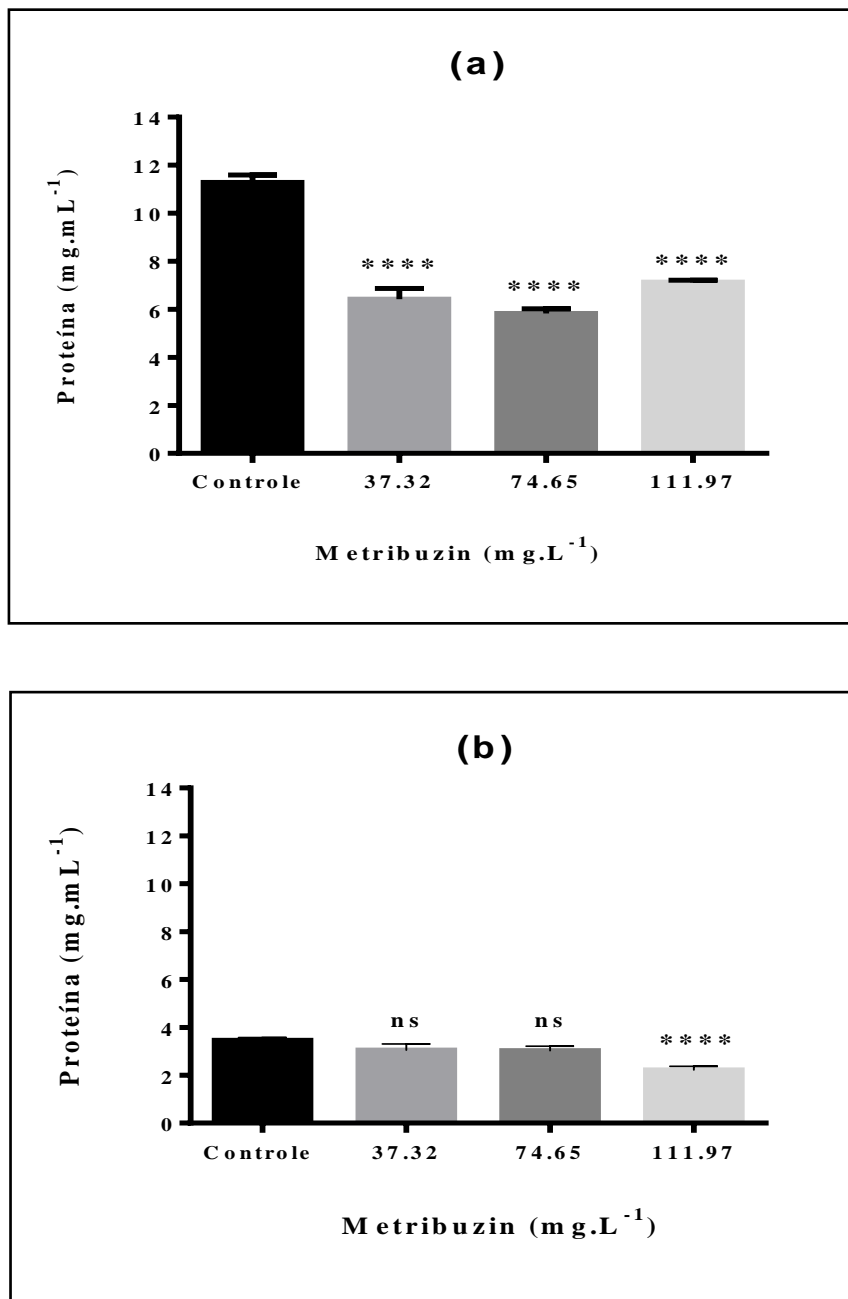
(*) Indica diferença significativa ($p \leq 0.05$) quando comparado ao controle. Fonte: O autor, 2019.

Os indivíduos também podem sofrer variações na quantidade de proteínas totais devido a exposição. Essa possibilidade foi verificada ao longo do experimento e expressa nas figuras 7a e 7b.

Os valores de proteína totais obtidos nas primeiras 24 h (figuras 7a) mostram um decréscimo significativo quando se comparam os indivíduos controle com os que sofreram a exposição. Houve uma redução de 36,83% para maior concentração de metribuzin quando comparado os resultados dos tratamentos com o controle, demonstrando que há uma influência inicial da exposição na quantidade de proteínas totais e que há uma proximidade de concentração mesmo com o aumento da exposição.

Em 96h (figuras 7b), comparando o controle com os demais tratamentos, apenas o tratamento mais concentrado obteve uma diminuição significativa com redução de 35,94%. Esse comportamento também foi observado em outros peixes, como em truta arco-íris (*rainbow trout*) expostos a concentração de 89,3 mg/L de metribuzin durante 96h (VELISEK et al., 2008) e em esturjão-ventre-nú (*Acipenser nudiventris*) expostos a 25, 37.5, 50 e 100 mg/L de atrazina durante 96 horas. (NAJI; YOUSEFI; HOSSEINZADEH, 2019).

Figura 7. Quantificação de proteína obtida após 24 (a) e 96h (b) de exposição ao Metribuzin.

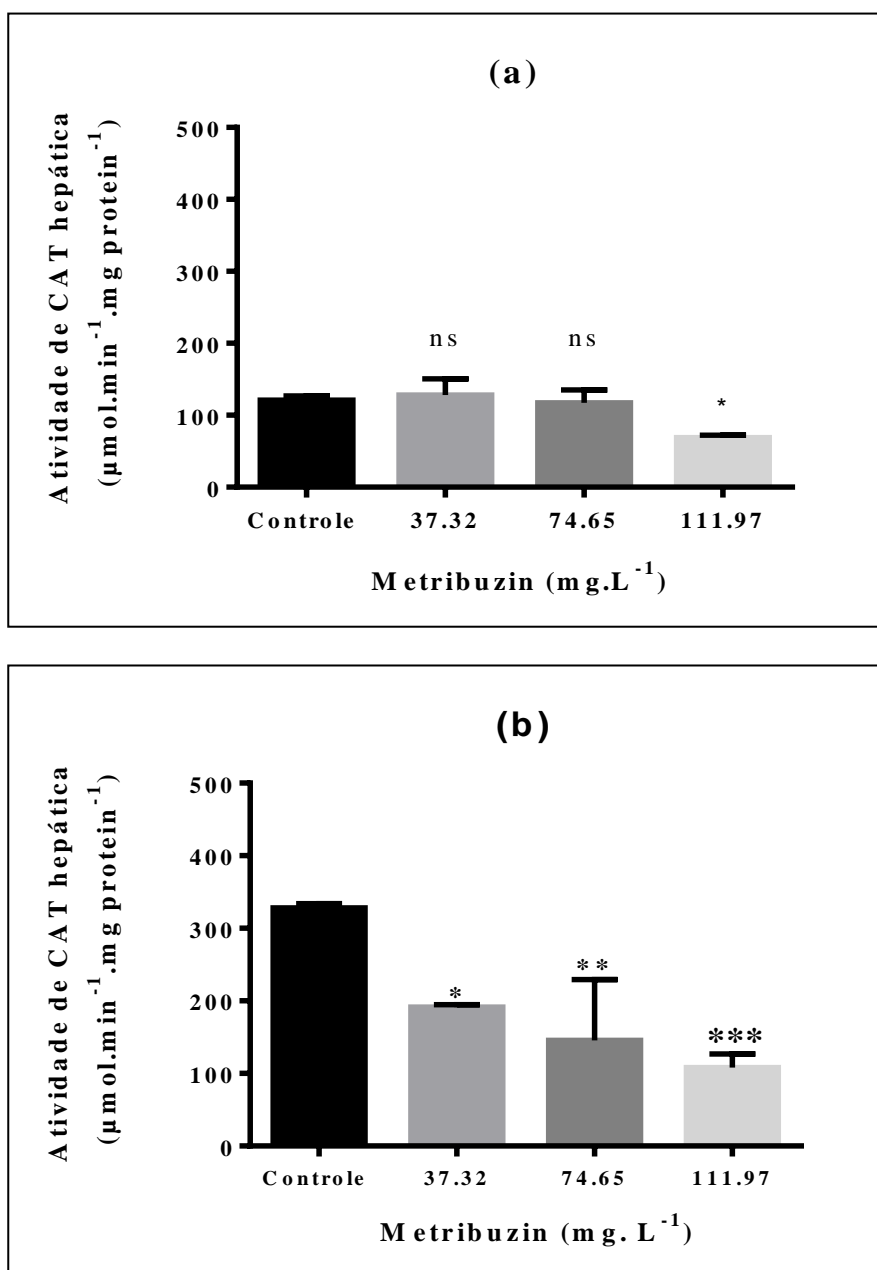


ns: Não significativo. Fonte: O autor, 2019.

Analisando os valores de proteína dos dois períodos observou-se também que houve um decréscimo de proteína tanto nos indivíduos controle quanto os que sofreram exposição. Esse comportamento pode ter relação com o jejum prolongado, o estresse causado pelo confinamento ou outro fator que contribuiu para diminuição da concentração proteica.

A figura 8a mostra a atividade específica da catalase após exposição ao metribuzin nas primeiras 24h onde apenas a maior concentração (111,97 mg/L) apresentou uma significância na diminuição da atividade de catalase com uma redução 43,2%. Já na figura 8b, durante 96h houve uma diminuição significativa da atividade em todas as concentrações analisadas, sendo 41,63%, 55,63% e 67,08%, respectivamente.

Figura 8. Atividade específica de Catalase após 24 (a) e 96h (b) de exposição ao Metribuzin.



Variações de atividade de catalase hepática em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína⁻¹ quando comparadas aos valores obtidos pelo controle . Fonte: O autor, 2019.

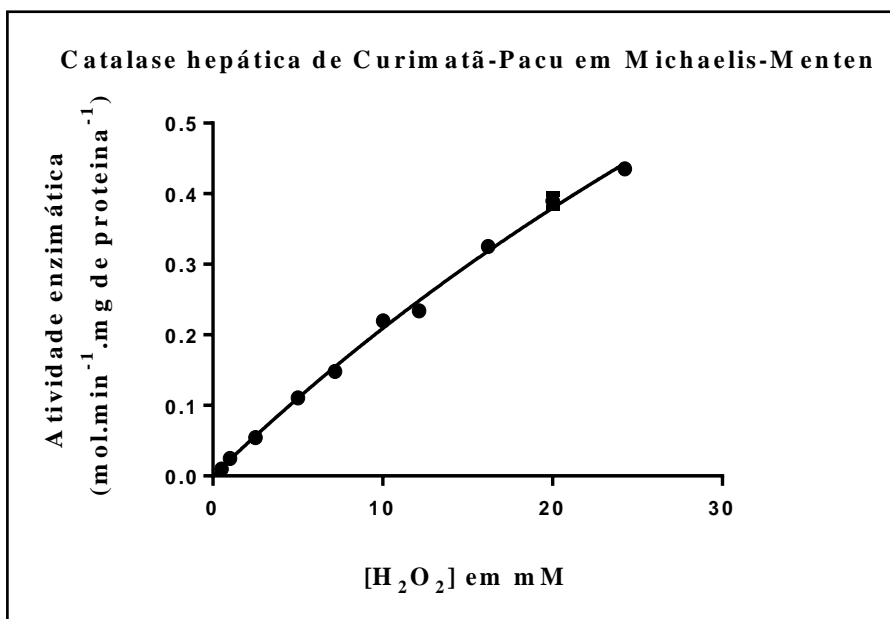
A diminuição de atividade de catalase hepática é identificada em diversos estudos com agrotóxicos pertencentes ao grupo das triazinas. Verifica-se essa diminuição de atividade de catalase quando comparados os tecidos de peixes controle com os que sofreram exposição em diversos estudos e em várias espécies como em peixes-ouro (*Gold fish*) submetidos ao metribuzin em concentrações de 7.14, 35.7 e 71.4 mg L^{-1} , constatando uma redução significativa de atividade de catalase hepática e glutathione redutase após um período de 96 h de exposição (MAKSYMIV et al., 2015; HUSAK et al, 2014).

Também é observado esse comportamento em juvenis de common carp (*Cyprinus carpio*) expostos a atrazina em concentrações de 4.28, 42.8 e 428 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ que ocasionou diminuição de atividade de catalase e SOD hepática e branquial após 40 dias de exposição (XING et al., 2012); em juvenis de Zerbrafish (*danio rerio*) sob exposição de atrazina com concentrações de 0.3, 3, 30 e 90 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ que também demonstrou diminuição da atividade de catalase hepática (BLAHOVA et al., 2013) e em Spotted snakehead (*Channa punctatus*) após 7 dias de exposição à atrazina em concentrações de 0, 4.238, 5.300 e 10.600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (NWANI et al., 2010).

Esses resultados mostram o potencial inibitório do metribuzin e dos xenobióticos pertencentes ao grupo químico das triazinas sob a atividade de catalase, levantando uma preocupação sobre a que nível pode chegar o impacto causado pela contaminação desses herbicidas em ambientes aquáticos, tendo em vista a diversidade de espécies que atinge e a importância dessa enzima para o sistema de defesa antioxidante.

Um dos aspectos importantes no estudo das enzimas é determinar a velocidade da reação e como ela se modifica em resposta a mudanças nos parâmetros experimentais. Esse estudo é conhecido como cinética enzimática (NELSON, COX, 2014). No que diz respeito ao comportamento enzimático pode-se observar a $V_{\text{máx}}$ e K_m de cada enzima e com a catalase não seria diferente já que os parâmetros cinéticos da catalase difere entre as espécies. Para isso, foi realizado o teste de cinética enzimática da CAT hepática de *P. argenteus* pelo modelo de Michaelis-Menten com o gráfico expresso abaixo.

Figura 9. Curva cinética utilizando o modelo de Michaelis-Menten para catalase hepática de *P. argenteus*



Fonte: O autor, 2019.

A figura mostra uma tendência de comportamento linear em que o aumento da atividade foi proporcional ao aumento da concentração do peróxido. A atividade de CAT dentre as concentrações mostradas acima, não atingiu um platô. Esse comportamento também foi observado em catalases de bactérias, fungos e vegetais que acabam não se ajustando ao modelo cinético de Michaelis-Menten. Essa condição não permite uma precisão nos parâmetros cinéticos, mas fornece uma estimativa desses valores e isso permite analisar a tendência de comportamento da enzima (ÖZTÜRK et al., 2007; SWITALA, LOEWEN, 2002).

Os termos clássicos, $V_{m\acute{a}x}$, K_{cat} e K_m , não podem ser diretamente identificados no caso acima pelo fato de a catalase não apresentar comportamento cinético de Michaelis-Menten, mesmo com aumento da concentração de substrato. Em concentrações abaixo de 200 mM, as subunidades pequenas de catalase apresentam uma velocidade com uma dependência da concentração como em Michaelis-Menten, mas os valores são usados para calcular K_m e $V_{m\acute{a}x}$ teóricos. Acima de 200 mM, a catalase não segue esse modelo cinético e as atividades tendem a cair bruscamente, o que pode indicar um dano a enzima causada pela alta concentração do próprio peróxido (SWITALA, LOEWEN, 2002).

A catalase hepática de curimatã-pacu apresentou valores cinéticos aproximados de K_m ($80,58 \pm 12,83$ M), $V_{m\acute{a}x}$ ($2,06 \pm 0,2486$ M.min⁻¹). Esses valores mostram a dificuldade experimental de se obter a cinética dessa enzima pois seria necessário um aumento da

concentração do substrato em um valor tão alto que o próprio peróxido oxidaria a estrutura proteica da enzima, como o relatado por Switala e Loewen (2002). Além disso, Switala e Loewen (2002) utilizaram o método de oxigrafia que permitiu o uso de concentrações maiores de H₂O₂. Na análise espectrofotométrica, em concentrações maiores que as demonstradas na figura 9, as absorvâncias extrapolavam a lei de Lambert-Beer interferindo na determinação da absorvância.

Vale ressaltar que a regulação da expressão da catalase em eucariotos ocorre como parte de um mecanismo de resposta generalizado ao estresse, seja ele por temperatura, inanição, osmose com diversas variáveis e estímulos dependendo de cada espécie. A imagem é ainda mais complicada por respostas sobrepostas a estresses ambientais, como patogênese, radiação, hormônios e temperaturas extremas (NICHOLLS, FITA, LOEWEN, 2000). Além disso, tanto a grandeza quanto o significado real de Km e V_{máx} são diferentes de uma enzima para outra (NELSON e COX, 2014).

Além disso, as condições ambientais (por exemplo, irradiação UV, temperatura da água, oxigênio dissolvido etc.) e poluição gerada por atividades antropogênicas são conhecidas por causar tais tensões oxidativas que elevam os níveis de ERO's e podem danificar muitas biomoléculas importantes, incluindo DNA e proteínas, modificando seus mecanismos (KIM et al., 2010).

6. CONCLUSÕES

- Vale destacar que a utilização indiscriminada do metribuzin afeta os ecossistemas, visto que os peixes possuem grande influência para o equilíbrio por estarem no topo da cadeia trófica e que desequilibrando qualquer nível da cadeia, todo o ecossistema aquático de uma região é afetado.
- O peixe curimatã-pacu demonstrou ser uma boa espécie sentinela para estudo toxicológico por ser um peixe de fácil acesso ao longo do rio São Francisco.
- A quantificação da atividade da enzima catalase apresentou um decaimento quando observada tanto a relação de concentração com o tempo como a relação de proteína com o tempo demonstrando um efeito do metribuzin sobre a atividade da enzima;
- A cinética realizada mostrou que a catalase não segue o modelo proposto por Michaelis-Menten e a obtenção das constantes cinéticas é obtida por estimativa de valores.;
- O presente estudo precisa ser complementado com novas análises para avaliar o real efeito desse herbicida. Conclui-se que apesar de não se conhecer o mecanismo de ação do metribuzin em peixes, fica notório o potencial inibitório dele em relação à catalase hepática de *P. argenteus*.

REFERÊNCIAS

ABNT/CEE-106 Análises Ecotoxicológicas. Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda — Método de ensaio com misídeos (Crustacea). **ABNT NBR 15308**. 20p, 2017.

ABHIJITH, B. D.; RAMESH, M.; POOPAL, R. K. *Responses of metabolic and antioxidant enzymatic activities in gill, liver and plasma of Catla catla during methyl parathion exposure*. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, v. 77, p. 31–40, 2016.

ABRASCO - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA. *Um alerta sobre os impactos dos Agrotóxicos na Saúde: Parte 2 - Agrotóxicos, saúde, ambiente e sustentabilidade*. **Cúpula dos Povos e Rio +20**, Rio de Janeiro, 2012.

AGROLINK FITO. Disponível em: <<https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/>> acessado em 08/11/2019.

ALFONSO-PRIETO, M.; BIARNE´S, X.; VIDOSSICH, P.; ROVIRA, C. The Molecular Mechanism of the Catalase Reaction. **Journal of the American Chemical Society**. v.131, p.11751–11761, 2009.

AMÉRICO, J. H. P.; MANOEL, L. de O.; TORRES, N. H.; FERREIRA, L. F. R. *O uso de agrotóxicos e os impactos nos ecossistemas aquáticos*. **Revista Científica ANAP Brasil**, 8, 13, p. 101-115, 2015.

AMORIM, L. C. A. *O Uso dos Biomarcadores na Avaliação da Exposição Ocupacional a Substâncias Químicas*. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho**, v. 1, 2, p. 124-132, Out-Dez, 2003.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C.G.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. *Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios*. **Revista de Nutrição**, Campinas, 23(4), p. 629:643, jul/ago, 2010.

BARRIGOSI, J. A. F. **Uso de agrotóxicos. AGITEC – Agência Embrapa de informação e tecnologia.**

<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fohgb6co02wyiv8065610dc2ls9ti.html>, acessado em 27/01/2018.

BARROCA, T.; ARANTES, F.; MAGALHAES, B.; SIQUEIRA, F.; HORTA, C.; PENA, I.; DERGAM, J.; KALAPOTHAKIS, E. *Genetic diversity and population structure of *Prochilodus costatus* and *Prochilodus argenteus* preceding dam construction in the Paraopeba River, São Francisco River Basin, Minas Gerais, Brazil.* **Open J Genet** **2**, p.121–130, 2012.

BERNET D.H.; SCHMIDT, W.; MEIER, P.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. *Histopatology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution.* **Journal of Fish Diseases**, **22**, p. 25-34, 1999.

BLAHOVÁ, J.; PLHALOVÁ, L.; HOSTOVSKÝ, M.; DIVISOVA, L.; DOBSÍKOVÁ, R.; MIKULÍKOVÁ, I.; STEPÁNOVÁ, S.; SVOBODOVÁ, Z. *Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine.* **Food and Chemical Toxicology**, v. 61, p. 82-85, 2013.

BRADFORD, M. M. *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding.* **Annal. Biochem.**, v. 72, p.248–254, 1976.

BRAVO, J.; VERDAGUER, N.; TORMO, J. BETZEL, C. SWITALA, J. ; LOEWEN P. C.; FITA, I. *Crystal structure of catalase HPII from *Escherichia coli*.* **Structure** **3**: p.491-502, 1995.

BRAVO, J.; FITA; I.; FERRER, C.; ENS, W.; HILLAR, A.; SWITALA, J.; LOEWEN, P. C. *Identification of a novel bond between a histidine and the essential tyrosine in catalase HPII of *Escherichia coli*.* **Protein Science**, p. 6101-1023. Cambridge University Press. USA, 1997.

BRITTO, F. B.; VASCO, A. N.; PEREIRA, A. P. S.; JÚNIOR, A. V. M.; NOGUEIRA, L. C. *Herbicidas no alto rio Poxim, Sergipe e os riscos de contaminação dos recursos hídricos.* **Revista Ciência Agronômica**, **43**, 2, abr-jun, 2012, p. 390-398.

CARRETERO, D. M. **Efeitos da inibição da protoporfirinogênio IX oxidase sobre trocas gasosas e fluorescência da clorofila Alfa em plantas de soja (Glycine Max L. Merrill).**

Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

CARVALHO, L. B. de. **Herbicidas**. Editado pelo autor, Lages, 2013, p. 9-19.

CHAUHAN, S. M. S.; KUMARI, P. *Biomimetic oxidation of metribuzin with hydrogen peroxide catalyzed by 5,10,15,20-tetraarylporphyrinatoiron(III) chlorides*. **Tetrahedron Letters**, 48, p.5035–5038, 2007.

CHELIKANI, P; FITA I.; LOEWEN, P. C. *Diversity of structures and properties among catalases*. **Cellular and Molecular Life Sciences** 61, p.192-208, 2004.

DA SILVA, A. A.; GONÇALVES, R. C. *Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais*. **Ciencia Rural**, v. 40, n. 4, p. 994–1002, 2010.

DELUNARDO, F. A. C. **Danos genotóxicos, mutagênicos e morfológicos em *hippocampus reidi* exposto ao petróleo**. 2018. 78. Dissertação (Mestre em Ecologia de Ecossistemas) – Centro Universitário de Vila Velha, Vila Velha – ES, 2018.

ELALFY, M.M.; MONA, E. G.; SABOUMOSALAM, M.; ALI, F.R. *biochemical and cytotoxic effect metribuzin herbicide on albino rats in short term of toxicity*. **International Journal of Development Research**, 7, 10, p.16117-16123, 2017.

FERNANDES, M.S. **Determinação de parâmetros oxidativos e bioquímicos em indivíduos multitransfundidos**. 2012. 77p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Pampa, Uruguaiiana – RS.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. *Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo*. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, São Paulo, Jan./Mar, 1997.

FERRO, C. de O.; CHAGAS, V. L. A.; OLIVEIRA, M. F. de; OLIVEIRA, P. L. de; SCHANAIDER, A. *Atividade da catalase no pulmão, rim e intestino delgado não*

isquemiado de ratos após reperfunção intestinal. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões, 37, 1, Jan/Feb. 2010.

FERSHT, A. Structure and Mechanism in Protein Science: *A guide to enzyme catalysis and protein folding*. **W. H. Freeman and Company**, Nova Iorque, p. 166, 1999

FLORES-LOPES, F.; MALABARBA, L. R. *Revisão de alguns aspectos da assembléia de peixes utilizados em programas de monitoramento ambiental. Vittal*, v. 19, n. 1, p. 45–58, 2007.

FRANÇA, A. de J. *Dinâmica espaço temporal e influência do metilmercúrio em peixes do Lago Janauacá, AM*. 2017. 85 f. Dissertação (Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - **Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia**, Manaus, 2017.

FREIRE, M. M.; SANTOS, V. G.; GINUINO, I. S. F.; ARIAS, A. R. L. *Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. Oecologia Brasiliensis*, 12, 3, p.347-354, 2008.

FRIEDRICH, K. *Avaliação dos efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutivo, hormonal e câncer para seres humanos após o uso do herbicida 2,4-d. NOTA TÉCNICA - NCQS/FIOCRUZ*, 2014.

GATTI, G. O. ; MAGALHÃES, L. F. *Identificação citológica de ectoparasitas e avaliação histopatológica, da área parasitada, de pele e brânquia do peixe Carassius Auratus (Linnaeus, 1758). ANAIS – VII Congresso de Iniciação Científica da Fundação Educacional de Ituverava - 22 a 24 de out. 2018*

ANVISA. GLUFOSINATO

<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/G05%2B%2BGlufosinato.pdf/de84a98a-b0ff-4f98-8724-a44a19732ce8>>. Acessado em 25 de março de 2019.

HUSAK, V. V; MOSIICHUKA, N. M.; MAKSYMIVA, I. V.; SLUCHYKB, I. Y.; STOREYC, J. M.; STOREYC K. B.; LUSHCHAKA, V. I. *Histopathological and biochemical changes in goldfish kidney due to exposure to the herbicide Sencor may be related to induction of oxidative stress. Aquatic Toxicology*, vol.155, p. 181–189, 2014.

KATSURAGAWA, T. H.; GIL, L. H. S.; TADA, M. S.; SILVA, L. H. P. da. *Endemias e epidemias na Amazônia: malária e doenças emergentes em áreas ribeirinhas do Rio Madeira. Um caso de escola. Estudos Avançados.*, v.22, n.64, p.111-141, 2008.

KERAMATI, V.; JAMILI, S.; RAMIN, M. *Effect of Diazinon on Catalase Antioxidant Enzyme Activity in Liver Tissue of Rutilus rutilus. Journal of Fisheries and Aquatic Science*, v.5, p.368-376, 2010.

KIM, J. et al. *Molecular cloning of Daphnia magna catalase and its biomarker potential against oxidative stresses. Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, v. 152, n. 3, p. 263–269, 2010.

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

KOUTNIK, D.; STARA, A.; ZUSKOVA, E.; KOUBA, A.; VELISEK, J. *The chronic effects of terbuthylazine-2-hydroxy on early life stages of marbled crayfish (Procambarus fallax f. virginalis). Pesticide Biochemistry and Physiology*, 136, p. 29–33, 2017.

LIMA, G. S. *Avaliação do potencial toxicológico de metribuzin em curimatã-pacu (Prochilodus argenteus)*. 2019. 56 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2018.

MAKSYMIV, I.V.; HUSAK, V.V.; MOSIICHUK, N.M.; MATVIISHYN, T.M.; SLUCHYK, I.Y.; STOREY, J.M.; STOREY, K.B.; LUSHCHAK, V.I. *Hepatotoxicity of herbicide Sencor in goldfish may result from induction of mild oxidative stress. Pesticide Biochemistry and Physiology*, 122, p.67-7, 2015.

MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. *Radicais livres: em busca do equilíbrio. Ciência e Cultura*, v.66, 3, p.54-57, 2014.

MIRON, D. DOS S.; PRETTO, A.; CRESTANI, M.; GLUSCZAK, L.; SCHETINGER, M. R.; LORO, V. L.; MORSCH, V. M. *Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (Leporinus obtusidens). Chemosphere*, v.74, p. 1–5, 2008.

MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B. Q. *Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. Revista de Saúde Pública*, 36, 3 p.370-374, 2002.

NAJI, M.; YOUSEFI, J. Y.; HOSSEINZADEH, S. H. *Impacts of Atrazine on some blood and biochemical indices in farmed Acipenser nudiventris*. **Journal of Survey in Fisheries Sciences**, v. 5, n. 2, p. 19–27, 2019.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

Nelson J.S. *Fishes of the World*. 4ª ed. **John Wiley & Sons, Hoboken**, New Jersey, 601 p. 2006.

NEVES, M.P. **Biomarcadores histológicos em um peixe loricarideo (*Ancistrus mullerae*): relação entre uso antrópico do solo no entorno de riachos neotropicais e histopatologias mais severas**. 2017. 53 f. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2016.

NICHOLLS, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. *Enzymology and structure of catalases*. **Advances in inorganic chemistry**, vol. 51, 2000.

NWANI ,C.D. ; NAGPURE , N.S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; KUMAR, P.; LAKRA, W.S. *Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 31, 2, 2011, p.314-322.

OLIVEIRA JR, R. S de. *Introdução ao controle químico*. In. OLIVEIRA JR, R. S de; CONSTANTIN, J.; Inoue. M. H. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011. p.125-140.

OLIVEIRA, L. L. D. de. **Biomarcadores enzimáticos e testes ecotoxicológicos na avaliação da toxicidade de fármacos em invertebrados aquáticos**. 2014. 279f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

OLIVEIRA, S. R. S. **Biomarcadores enzimáticos e histológicos em *Ucides cordatus* LINNAEUS, 1763 (Crustacea, Decapoda) para avaliação de impacto antrópico na região portuária de São Luis**. 2018. 94p. Dissertação (Mestrado em Oceanografia), Universidade Federal do Maranhão, São Luis-MA, 30/01/2018.

OSMAN, A. G. M.; EL REHEEM, A. M. A.; ABUELFADL, K. Y.; GADEL-RAB, A. G. *Enzymatic and histopathologic biomarkers as indicators of aquatic pollution in fishes. Natural Science*, v.2, p. 1302-1311, 2010.

ÖZTÜRK, L.; BÜLBÜL, M.; ELMASTAŞ, M.; ÇİFTÇİ, M. *Purification and some kinetic properties of catalase from parsley (*Petroselinum hortense Hoffm.*, Apiaceae) leaves. Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 37, n. 3, p. 229–238, 2007.

PEAKALL, D. W. *Biomarkers: the way forward in environmental assessment. Toxicology Ecotoxicology News*, v.1, p.55-60, 1992.

PEREIRA, B. V. R. **Efeitos agudos e crônicos dos fármacos paracetamol e propranolol em diferentes biomarcadores de uma espécie de peixe neotropical.** 2018. 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Centro de Ciências e Tecnologias para a Sustentabilidade, Programa De Pós-Graduação Em Biotecnologia E Monitoramento Ambiental – UFSCAR, Sorocaba, 2018.

PIGNATI, W. A.; SOUZA E LIMA, F. A. N. de; DE LARA, S.; CORREA, M. M.; BARBOSA, J. R.; LEÃO, L. H. da C.; PIGNATTI, M. G. *Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. Revista Ciência & Saúde Coletiva*, v.22, n.10, p. 3281-3293, 2017.

PINTO, W.J.; FERNANDES, C. C.; SANTOS, F.G.A.; LACERDA, R.F.; TRETO, R.R.R. *O paradoxo da vida aeróbica. Journal of Amazon Health Science*. v.1, n.1, p.11-35, 2015.

POLJSAK B. *Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011, ID 194586, 15 p., 2011.

PROTEIN DATA BANK – **Catalase**. <<https://pdb101.rcsb.org/motm/57>>. Acessado em fevereiro de 2019.

QUESADA-MOLINA, C.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; OLMO-IRUELA, L.; OLMO, M. *Large volume sample stacking in capillary zone electrophoresis for the monitoring of the degradation products of metribuzin in environmental samples. Journal of Chromatography A*, v.1164, p. 320–328, 2007.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. *Guia de herbicidas: contribuição para uso adequado em plantio direto*. 4.ed. **Londrina: IAPAR**, p. 648, 1998.

ROMAN, E. S.; VARGAS, L.; RIZZARDI, M. A.; HALL, L.; BECKIE, H.; WOLF, T. M. *Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação*. Editado por Erivelton Scherer Roman, Leandro Vargas. Passo Fundo: **Gráfica Editora Berthier**, 2005. 152p.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. *Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo*. **Química Nova**. v. 24, n. 1, p. 112–119, 2001.

SANTOS, E.L.; OLIVEIRA, W.D.S.; SOARES, E.C.; LIMA, M. R.; SILVA, L.L.A.; MACHADO, S.S.; SILVA, J.M.; SILVA, C.F.; SILVA, F. F. *Exigência de proteína bruta para juvenis de curimatã-pacu*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 70, 3, p.921-930, 2018.

SATO, Y., FENERICH-VERANI, N., GODINHO, H.P. *Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco*. In: GODINHO, H.P. e GODINHO, A.L. *Águas e peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. **Editora PUC Minas**, Belo Horizonte. p. 275-290, 2003.

SILVA, E. T. L.; DIAS, M. L. F.; PEDREIRA, M.M.; SANTOS, J.B. *Concentração letal do glifosato para juvenis de curimatã-pacu*. **Boletim do Instituto de Pesca**, 42, p.759-764, 2016.

SOARES, E. C.; BRUNO, A. M. S.; LEMOS, J. M.; SANTOS, R. B. *Ictiofauna e pesca no entorno de Penedo, Alagoas*. **Biotemas**, 24, p.61-67, 2011.

STEPANOV, S.; DOLEZELOV, P; PLHALOV, L; PROKES M.; MARSALEK P.; SKORIC M.; SVOBODOV, Z. *The effects of metribuzin on early life stages of common carp (Cyprinus carpio)*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.103, p.152–158, 2012.

SWITALA, J.; LOEWEN, P. C. *Diversity of properties among catalases*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.401, p.145-154, 2002.

TUREK, J.; GHISI, N. C.; MATOZO, F.; NOLETO, R. B. *Efeitos citotóxicos de um herbicida a base de glifosato no peixe Astyanax altiparanae*. **Luminária**, 19, 2, 2017.

VASYLKIV, O. Y.; KUBRAK, O. I.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. *Catalase activity as a potential vital biomarker of fish intoxication by the herbicide aminotriazole*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.101, p.1–5, 2011.

VELISEK, J.; SVOBODOVA, Z.; PIACKOVA, V.; NOVOTNY L.; BLAHOVA, J.; SUDOVA1, E.; MALY, V. *Effects of metribuzin on rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. **Veterinarni Medicina**, v. 53, n. 6, p. 324–332, 2008.

VIZZOTTO, E. Radicais livres e mecanismos de proteção antioxidante. **Disciplina de Fundamentos Bioquímicos dos Transtornos Metabólicos**, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017. 10p.

WHO. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. **Environmental Health Criteria**. 155, Geneva, World Health Organization, 1993.

XING, H. J.; LI, S.; WANG, Z. L.; GAO, X.; XU, S.; WANG, X. *Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v.103, p. 74-80, 2012.

ZAMBOLIM, L.; ZUPPI, M.; SANTIAGO, T. **O Que Engenheiros Agrônomos Devem Saber para Orientar Uso de Produtos Fitossanitários**. 3ª Ed. UFV, 464p, 2008.