

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS LICENCIATURA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ANDRESSA CRISTHYNE FERREIRA DOS SANTOS

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A UM HERBICIDA A BASE DE METRIBUZIN
DURANTE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DO ZEBRAFISH, COM ÊNFASE NO
DESEQUILÍBRIO REDOX**

Maceió

2023

ANDRESSA CRISTHYNE FERREIRA DOS SANTOS

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A UM HERBICIDA A BASE DE METRIBUZIN
DURANTE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DO ZEBRAFISH, COM ÊNFASE NO
DESEQUILÍBRIO REDOX**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito básico à obtenção do título de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Lázaro Wender Oliveira de Jesus.

Coorientadora: Prof. Dr. Jerusa Maria de Oliveira.

Maceió

2023

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

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

S237e Santos, Andressa Cristhyne Ferreira dos.
Efeitos da exposição a um herbicida a base de Metribuzin durante o desenvolvimento inicial do Zebrafish, com ênfase no desequilíbrio redox / Andressa Cristhyne Ferreira dos Santos. – Maceió, 2023.
61 f. : il.

Orientador: Lázaro Wender Oliveira de Jesus.

Co-orientadora: Jerusa Maria de Oliveira.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas: licenciatura) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 47-61.

1. Toxicologia ambiental. 2. Produtos químicos agrícolas. 3. Peixes. 4. Biomarcadores. 5. Estresse oxidativo. 6. Herbicidas - Toxicologia. I. Título.


CDU: 632.954

Folha de Aprovação

ANDRESSA CRISTHYNE FERREIRA DOS SANTOS


EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A UM HERBICIDA A BASE DE METRIBUZIN DURANTE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DO ZEBRAFISH, COM ÊNFASE NO DESEQUILÍBRIO REDOX

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à banca examinadora do curso de Ciências Biológicas Licenciatura da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 10 de Fevereiro de 2023.


Documento assinado digitalmente
 LAZARO WENDER OLIVEIRA DE JESUS
Data: 10/03/2023 16:19:02-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Orientador(a) - Prof. Dr. Lázaro Wender Oliveira de Jesus
Universidade Federal de Alagoas - ICBS

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 ANA CATARINA REZENDE LEITE
Data: 15/03/2023 16:07:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador(a) – Profa. Dra. Ana Catarina Rezende Leite
Universidade Federal de Alagoas- IQB

Documento assinado digitalmente
 VANESSA DORO ABDALLAH KOZLOWISKI
Data: 15/03/2023 11:40:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador(a) – Profa. Dra. Vanessa Doro Abdallah Kozlowiski
Universidade Federal de Alagoas - ICBS

Dedico este trabalho a Deus, que me deu forças e coragem para trilhar essa caminhada, à minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Á Deus pelo dom da vida e por me ajudar a superar os desafios, sem ele eu não teria chegado até aqui.

Aos meus pais, Edmilson Amaro e Andreia dos Santos pela dedicação e apoio ao longo de todo o curso, no qual a altas horas de todas as noites me esperavam voltar para casa.

Ao meu irmão Anderson Felipe e minha avó materna Alaide dos santos por todas as palavras de ânimo e paciência.

Ao meu esposo Alilson Rozendo por ter sido fonte de inspiração nessa jornada e me estimular sempre a não desistir, me ajudando todas as vezes que mais precisei.

Aos meus amigos de turma, Josefa Caroline, Maria Jordana e Luiz Henrique, por terem compartilhado comigo tantos momentos ímpares de alegrias, tristezas, frustrações e vitórias, sem permitir que os pensamentos de desistência se tornassem reais.

Aos meus colegas do laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada, em especial Zaíne Marcyelle, Bianca Carnib, Marciliano Silva e Fernanda Cristina por toda a ajuda e disponibilidade nos experimentos e construção deste e outros trabalhos, conselhos e motivações, que foram de suma importância, principalmente nesta reta final.

Aos docentes que tive durante o curso, que compartilharam suas instruções e com empenho por seus alunos contribuíram para um aprendizado proveitoso e eficaz.

Ao meu orientador Prof. Dr. Lázaro Wender Oliveira de Jesus e minha coorientadora Profa.Dra. Jerusa Maria de Oliveira, pela oportunidade de dividirem comigo seus conhecimentos, pela paciência e dedicação.

À banca, por se fazerem presentes neste momento ímpar da minha formação e por toda contribuição.

Á todos que de forma direta ou indireta contribuíram e agregaram positivamente para a minha formação.

“...não que sejamos capazes, por nós, de pensar alguma coisa, como de nós mesmos; mas a nossa capacidade vem de Deus,...”

(2 Coríntios 3.5)

RESUMO

Metribuzin é um herbicida que pertence ao grupo químico das triazinonas assimétricas, bastante utilizado no controle de plantas daninhas em algumas culturas. Dado ao uso indiscriminado e a sua lixiviação, tem sido encontrado em águas subterrâneas, residuais e apresenta persistência no solo. O acúmulo de radicais livres por exposição a contaminantes pode originar estresse oxidativo, suprimindo a ação das enzimas antioxidantes e alterando os processos celulares dos organismos, causando danos ao DNA e nas biomembranas, mudanças fisiológicas, efeitos teratogênicos e até mesmo neoplasias. Neste estudo foi avaliado o potencial efeitos da exposição a um herbicida à base de metribuzin durante o desenvolvimento inicial do zebrafish (*Danio rerio*) no desequilíbrio redox. Os embriões/larvas de zebrafish foram expostas a diferentes concentrações do herbicida Sencor 480 - Bayer - ($0,0001 \text{ mg L}^{-1}$, $0,001 \text{ mg L}^{-1}$, $0,01 \text{ mg L}^{-1}$) e ao controle negativo (água reconstituída) por 144 horas. A seguir, foram destinados à avaliação da atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione-S-transferase (GST). Os dados paramétricos foram submetidos a ANOVA - ONE WAY seguido de teste Tukey. Os resultados mostraram uma redução na atividade das enzimas CAT e SOD, indicando aumento de espécies reativas e diminuição da capacidade antioxidante. Os níveis da enzima GST estavam reduzidas em todas as concentrações testadas, indicando sobrecarga de espécies reativas, dificultando sua desintoxicação. Estes dados indicam que a exposição ao herbicida à base de Metribuzin induz um quadro de desequilíbrio redox e promove estresse oxidativo, corroborando estudos prévios em peixes e outros modelos animais, chamando atenção para os riscos a saúde animal associados ao uso indiscriminado deste agrotóxico.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; agrotóxico; peixes; biomarcadores; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Metribuzin is a herbicide that belongs to the chemical group of asymmetric triazinones, widely used to control weeds in some crops. Due to its indiscriminate use and leaching, it has been found in groundwater, wastewater and shows persistence in the soil. The accumulation of free radicals due to exposure to contaminants can lead to oxidative stress, suppressing the action of antioxidant enzymes and altering the cellular processes of organisms, causing damage to DNA and biomembranes, physiological changes, teratogenic effects and even cancer. In this study, the potential effects of exposure to a metribuzin-based herbicide during early development of zebrafish (*Danio rerio*) on redox imbalance were evaluated. Zebrafish embryos/larvae were exposed to different concentrations of the herbicide Sencor 480 - Bayer - (0.0001 mg L⁻¹, 0.001 mg L⁻¹, 0.01 mg L⁻¹) and negative control (reconstituted water) for 144 hours. Next, they were destined to evaluate the activity of the enzymes Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione-S transferase (GST). Parametric data were submitted to ANOVA - ONE WAY followed by Tukey test. The results showed a reduction in the activity of CAT and SOD enzymes, indicating an increase in reactive species and a decrease in antioxidant capacity. The levels of the GST enzyme were reduced in all tested concentrations, indicating an overload of reactive species, making its detoxification difficult. These data indicate that exposure to the herbicide based on Metribuzin induces a redox imbalance and promotes oxidative stress, corroborating previous studies in fish and other animal models, calling attention to the risks to animal health associated with the indiscriminate use of this pesticide.

Keywords: Ecotoxicology; pesticide; fish; biomarkers; oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Uso total de agrotóxicos (toneladas) dos dez principais países, nos anos de 2009-2020.....	17
Figura 2	- Total das vendas de agrotóxicos e afins (em toneladas de ingredientes ativos) nas regiões brasileiras, no ano de 2020	18
Figura 3	- Total das vendas de agrotóxicos e afins (em toneladas de ingredientes ativos) nos estados brasileiros da região nordeste, no ano de 2020	18
Figura 4	- Consumo (em volume) de inseticidas, herbicidas e fungicidas no Brasil.....	19
Figura 5	- Vendas totais (ton) por classe de uso nas regiões do Brasil.....	20
Figura 6	- Fórmula estrutural do Metribuzin	21
Figura 7	- Etapas fotoquímica e bioquímica da fotossíntese e seu fluxo de elétron.....	24
Figura 8	- Metabolismo do oxigênio nos organismos e as enzimas antioxidantes de primeira e segunda linha.....	27
Figura 9	- Casal de Zebrafish adulto, macho e fêmea	31
Figura 10	- Fases embrionária e larval do <i>Danio rerio</i>	32
Figura 11	- Imagens do Biotério de Peixes do ICBS - UFAL.....	35
Figura 12	- Procedimento de coleta e viabilidade dos embriões.....	35
Figura 13	- Linha do tempo da exposição dos embriões/larvas de zebrafis	38
Figura 14	- Exposição dos embriões	38
Figura 15	- Estado redox de larvas de zebrafish (<i>Danio rerio</i>) expostas até 144 hpf a diferentes concentrações de Metribuzin (0,0001, 0,001, 0,01 mg L ⁻¹). Atividade da SOD e CAT	42
Figura 16	- Estado redox de larvas de zebrafish (<i>Danio rerio</i>) expostas até 144 hpf a diferentes concentrações de Metribuzin (0,0001, 0,001, 0,01 mg L ⁻¹). Atividade da GST.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Uso agrícola autorizado para o Metribuzin	21
Tabela 2	- Características químicas e físicas do Metribuzin.....	23
Tabela 3	- Estágios de desenvolvimento e comprimento do corpo em zebrafish ..	32
Tabela 4	- Concentrações mínimas e máximas de Metribuzin, encontradas em diferentes localidades e matrizes ambientais.....	36
Tabela 5	- Volumes dos compostos utilizados no preparo dos tratamentos usados no trabalho	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	Alcalina Fosfatase
ATP	Adenosina Trifosfato
ALT	Alanina-aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
BOD	Estufa com demanda bioquímica de oxigênio
°C	Grau Celsius
CAT	Catalase
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CDNB	1-cloro-2,4-nitrobenzeno
CO ₂	Gás carbônico
CCONPES	Coordenação Geral de Avaliação
CGASQ	Coordenação Geral de Avaliação
DAE	Dias Após a Emergência
DMSO	Dimetilsulfóxido
DIGES	Divisão de Gerenciamento de Substâncias
DIQUA	Controle de Substâncias Químicas
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FSII	Fotossistema II
FSI	Fotossistema I
GSH	Glutationa reduzida
GR	Glutationa redutase
GPx	Glutationa Peroxidase
g	grama
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HO·	Hidroxila
HBM	Herbicida à base de Metribuzin

hpf	horas pós-fertilização
Kcl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio dibásico
L	Litro
LPO	Peroxidação Lipídica
LMR	Limite máximo de resíduo
μL	Microlitro
mM/L	Milimol por litro
M	Molar
mg	Miligrama
ml	Mililitro
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio
MTT	Brometo de 3-[4,5dimetiltiazol-2H]-2,5-difeniltetrazolium
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
nm	Nanômetro
Nacl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de Sódio Bibásico anidro
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de Sódio Bibásico heptahidratado
Na ₂ HCO ₃	Bicarbonato de sódio
O ₂ ⁻ •	Radical superóxido
PQ	Platoquinona
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
rpm	Rotação por minuto
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
RNS	Espécie Reativa de Nitrogênio
SOD	Superóxido Dismutase
ton	Toneladas

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
*	Asterisco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Os agrotóxicos e seu uso no Brasil	16
2.2	Metribuzin	20
2.3	Estresse Oxidativo	26
2.3.1	Sistemas antioxidantes enzimáticos.....	29
2.4	O sistema modelo zebrafish	30
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo geral	34
3.2	Objetivos específicos	34
4	METODOLOGIA	34
4.1	Manutenção dos animais e Coleta dos embriões	34
4.2	Exposição ao Metribuzin	36
4.3	Análises bioquímicas	38
	Determinação da atividade da Catalase.....	39
	Determinação da atividade da Superóxido Dismutase.....	39
	Determinação da atividade da Glutathione S-Transferase (GST)	40
	Dosagem de proteínas totais	40
	Análises estatísticas	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
7	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

A atividade agrícola é exercida desde a mais tenra idade da humanidade que passou por muitas mudanças e avanços a fim de melhorar e aumentar cada vez mais a produtividade (BURIGO, 2016). Os agrotóxicos são produtos químicos que possuem o objetivo de manter e aumentar a produtividade agrícola controlando doenças e pragas nas plantações (CARVALHO, 2013; SEMREN, ZUNEC, PIZENT, 2018).

O Brasil apresenta alta atividade agrícola e possui grandes áreas plantadas, principalmente nas culturas de cana-de-açúcar, soja, tomate, dentre outros (BRASIL, 2018; ALVES et al, 2021). Em 2020 foi o segundo país com o maior uso de agrotóxicos do mundo, refletindo os elevados dados quanto à comercialização destes compostos no país (IBAMA, 2020).

Dentre os agrotóxicos, os herbicidas são substâncias químicas que podem eliminar plantas daninhas, as quais impedem o correto desenvolvimento das plantas cultivadas e trazem danos à produtividade agrícola e são bastante utilizados no país (MOURA et al., 2017; ROMAN et al., 2005).

Porém os herbicidas são considerados contaminantes emergentes e, por meio de suas rotas de exposição, podem contaminar águas superficiais e subterrâneas, alimentos e ambientes aquáticos, afetando a saúde dos organismos, estando associados a doenças crônicas e degenerativas (SEMREN, ZUNEC, PIZENT, 2018).

O Metribuzin é um herbicida usado no Brasil e no mundo, com nome químico 4-amino-6-terc-butil-4,5-di-hidro-3-metiltio-1,2,4-triazin-5-ona. Pertence ao grupo químico das triazinonas assimétricas (CARVALHO, 2013; ZHANG et al, 2014; VELISEK et al, 2009). São inibidores do fotossistema II (FSII), usado no tratamento de pré e pós-emergência de gramíneas e plantas daninhas de folhas largas e estreitas, possui alta solubilidade em água e pode ter grande persistência no solo (VELISEK et al., 2009; CARVALHO, 2013).

O acúmulo de radicais livres causado por exposição a contaminantes, pode dar origem ao estresse oxidativo. Esse fenômeno acaba suprimindo os mecanismos de ação das enzimas antioxidantes, que seriam responsáveis por eliminar danos causados por esses radicais, havendo assim um desequilíbrio e alterando os processos celulares nos organismos, como danos ao DNA, mudanças funcionais, desenvolvimento de doenças degenerativas e efeitos teratogênicos (ATES et al., 2018; LARAGY et al., 2017).

Alguns biomarcadores têm sido utilizados para investigar os possíveis danos que poluentes ambientais causam aos organismos. As enzimas antioxidantes como a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione S-transferase (GST) atuam para neutralizar os danos originados pelo estresse oxidativo e são importantes biomarcadores capazes de avaliar esses impactos (LARAGY et al., 2017).

Alguns estudos desenvolvidos em peixes, roedores, algas e plantas vasculares, apontaram que a exposição ao Metribuzin promove efeitos toxicológicos, induz estresse oxidativo e altera o equilíbrio dos processos enzimáticos devido ao aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS), gerado por estes poluentes (PLHALOVA et al., 2012; HUSAK et al., 2016; HOSTOVSKY et al., 2012; BOMANN et al., 2021).

O ambiente aquático tem sido o destino final de diferentes tipos de contaminantes, como agrotóxicos, produtos farmacêuticos, resíduos domésticos e industriais, dentre outros (TESOLIN et al., 2014; ZHU et al., 2015). Conseqüentemente, os peixes presentes nos ambientes aquáticos contaminados podem ser expostos a esses xenobióticos via pele, ingestão e respiração branquial, o que pode causar conseqüências alterações morfofisiológicas subletais e até mesmo letais (KOEHLER et al., 2004).

O organismo modelo escolhido para este estudo foi o zebrafish (*Danio rerio*), uma vez que apresenta diversas vantagens, como pequenas proporções, possibilitando o fácil manejo, alta taxa de reprodução, embriões transparentes, curto ciclo de desenvolvimento e genoma com 70% de similaridade com o dos seres humanos (PORTO et al., 2023).

Permite a avaliação do desenvolvimento embrionário, de efeitos teratogênicos, alterações comportamentais, cardiovasculares e na resposta imune, dentre outras (ALVES et al., 2022; DAMMSKI et al., 2011; XU et al., 2020). O zebrafish é um animal modelo amplamente utilizado em estudos de toxicidade e ecotoxicidade (TESOLIN et al., 2014; VALADAS et al., 2019; ZHU et al., 2015).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os agrotóxicos e seus uso no Brasil

O termo agrotóxicos é uma nomenclatura adotada no Brasil, mas também apresentam outras designações como defensivos agrícolas, agroquímicos, pesticidas, dentre outros. São produtos químicos utilizados para o controle de doenças e plantas daninhas, a fim de se manter a produtividade nas lavouras agrícolas (CARVALHO, 2013; SEMREN, ZUNEC, PIZENT, 2018). São definidos e conceituados pelo decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002 que regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 como:

Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, que são destinados para uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 2002).

A Lei nº 7.802 também considera estes produtos com potencial perigoso à saúde humana e ao meio ambiente, enfatizando a necessidade de uma legislação específica que discipline a produção, o transporte, o armazenamento, a comercialização e o uso de agrotóxicos, bem como a destinação final dos resíduos e das embalagens destes produtos (BRASIL, 2002).

Dessa forma, os agrotóxicos passam por avaliação de três órgãos, sendo estes o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para avaliar a eficácia do uso na agricultura, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) para avaliação ambiental, analisando o potencial poluidor; e também pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para avaliação toxicológica, a qual prescreve condições para um uso seguro (BRASIL, 2002).

A atividade agrícola é praticada pela humanidade desde os seus primórdios, porém o uso intensivo de agrotóxicos se deu a partir da segunda guerra mundial, período em que o processo tradicional de produção agrícola passou por mudanças com o avanço de novas tecnologias, com o objetivo de aumentar a produtividade (BURIGO, 2016).

O Brasil tem entre suas características a grande produção agrícola e conseqüente uso de agrotóxicos, com destaque para as culturas do milho (*Zea mays L.*) e da soja (*Glycine max*

L.), bem como as culturas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) com produção para açúcar e etanol. Em relação a produção de cana-de-açúcar, o Brasil é um dos maiores produtores no âmbito mundial, sendo o estado de São Paulo o maior produtor do país (BRASIL, 2018; ALVES et al., 2021).

Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), em um ranking com 10 países, dos anos de 2009 a 2020, (Figura 1) o Brasil ocupa o segundo lugar em relação ao uso de agrotóxicos no mundo, perdendo a primeira colocação para os Estados Unidos da América (EUA). No ano de 2020 alcançou a utilização agrícola de 377, 176 toneladas (ton) de agrotóxicos.

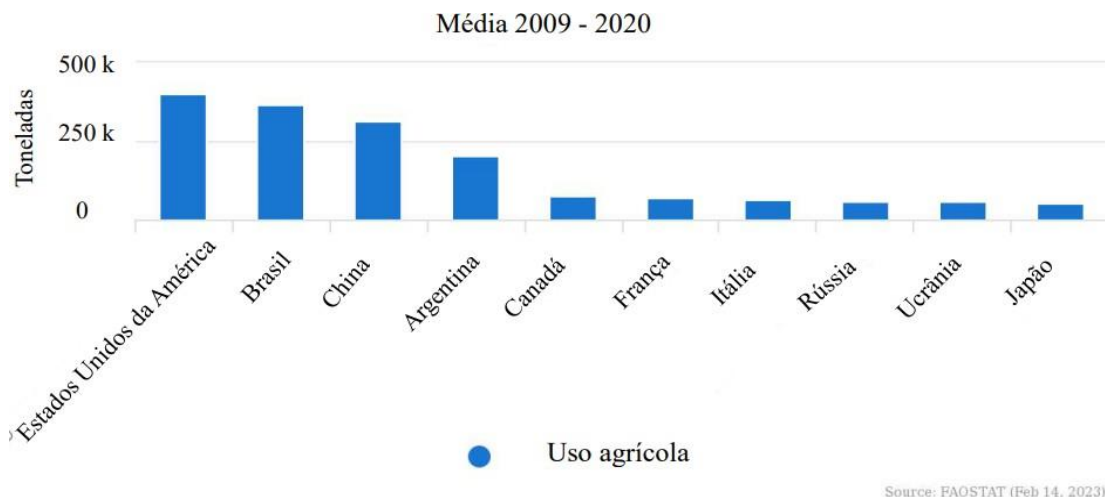


Figura 1 - Uso total de agrotóxicos (toneladas) dos dez principais países, do ano de 2009-2020. Fonte: FAOSTAT/FAO (2020). Adaptado pelo autor.

O Brasil apresenta significativa relação ao uso de agrotóxicos por hectare, pois possui grandes áreas plantadas. Além disso, o país tem clima tropical, o que o torna mais propício à proliferação de pragas. Porém, apesar de haver alguns métodos a fim de evitar o uso excessivo de agrotóxicos, como por exemplo, controle biológico e outras inovações tecnológicas, muitos produtores não os adotam por falta de conhecimento ou mesmo receio das novas práticas, o que perpetua no país as altas taxas de maior aplicação de agrotóxicos por hectare (BRASIL, 2018). Com relação à comercialização no Brasil, segundo dados do IBAMA, a região Nordeste é a quarta com maior total de vendas de agrotóxicos e afins (em toneladas de ingredientes ativos) (Figura 2).

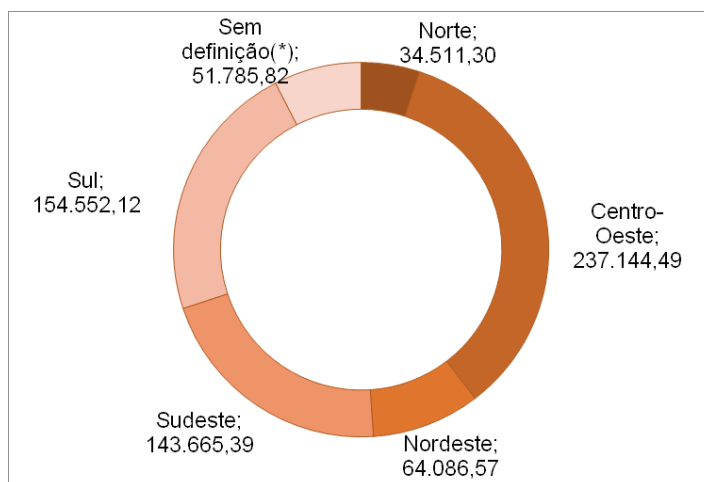


Figura 2 - Total das vendas de agrotóxicos e afins (em toneladas de ingredientes ativos) nas regiões brasileiras, do ano de 2020. Fonte: IBAMA (Decreto nº4.074/02) (2020), dados atualizados em 2021. Adaptado pelo autor.

De acordo com os dados do IBAMA (2020), também é possível observar a comercialização destes agrotóxicos e afins (em toneladas de ingredientes ativos), nos estados da região nordeste, como mostra a Figura 3.

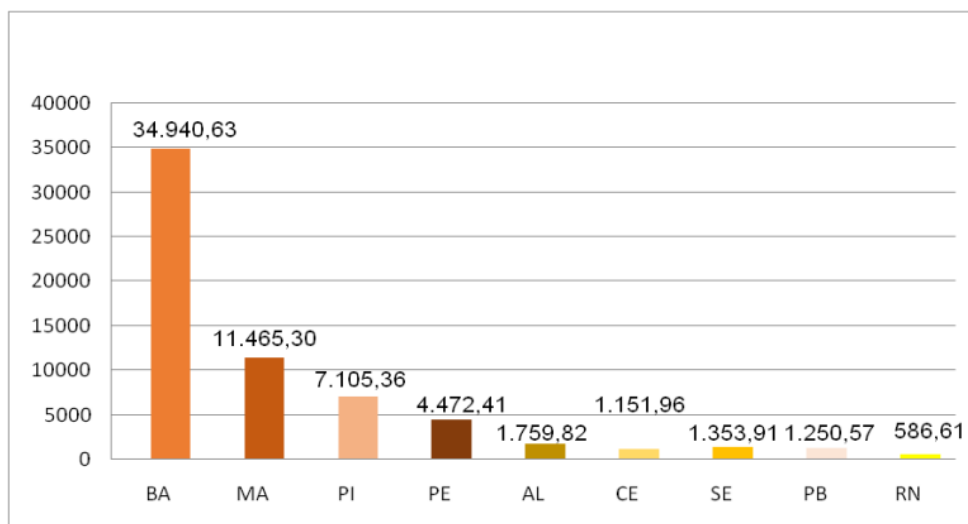


Figura 3 - Total das vendas de agrotóxicos e afins (em toneladas de ingredientes ativos) nos estados brasileiros da região nordeste, do ano de 2020. Fonte: IBAMA (Decreto nº4.074/02) (2020), dados atualizados em 2021. Adaptado pelo autor.

Dentre os agrotóxicos temos a classe dos herbicidas, que podem ser agentes biológicos, como microorganismos (por exemplo, os fungos) ou substâncias químicas, as quais devem ser capazes de causar a morte ou invalidar o crescimento de determinadas

espécies de plantas daninhas (ROMAN et al., 2005). Com o aumento da produção agrícola, os herbicidas passaram a ser abundantemente utilizados com função no controle de plantas daninhas que competem com as culturas por água, nutrientes e luz, impedindo o desenvolvimento da cultura (MOURA et al., 2017).

Um levantamento produzido pela FAO (2019), observou a predominância de três grupos de agrotóxicos mais consumidos no Brasil (Figura 4), os herbicidas, pesticidas e os fungicidas.

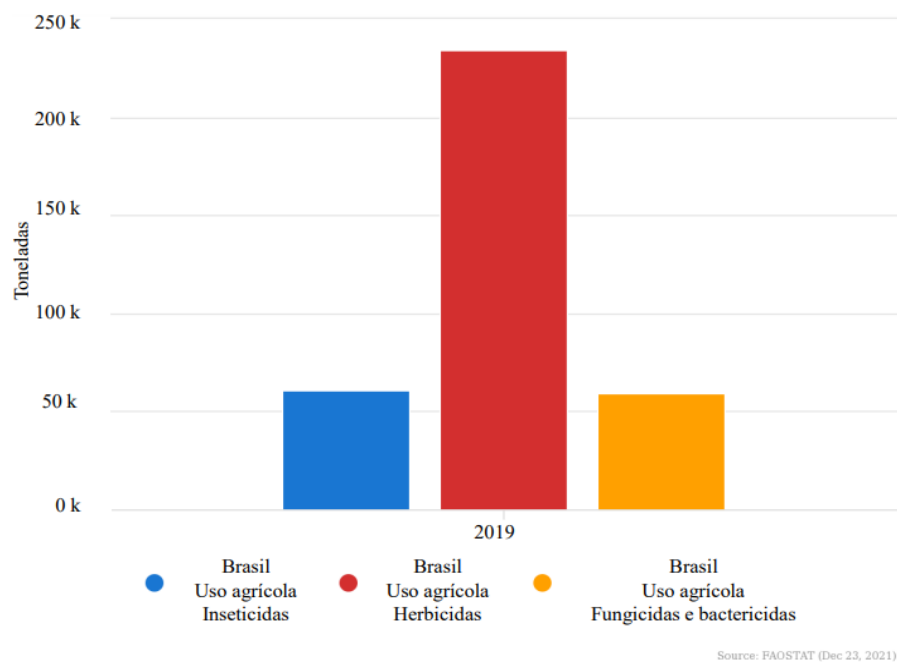


Figura 4 - Consumo (em ton) de inseticidas, herbicidas, fungicidas e bactericidas, do ano de 2019 na agricultura Brasileira. Fonte: FAOSTAT/FAO (2019). Adaptado pelo autor.

Outro levantamento realizado pelo IBAMA (2020) também observou a predominância da classe herbicida quanto a comercialização e exportação, pelos estados do Brasil (Figura. 5).

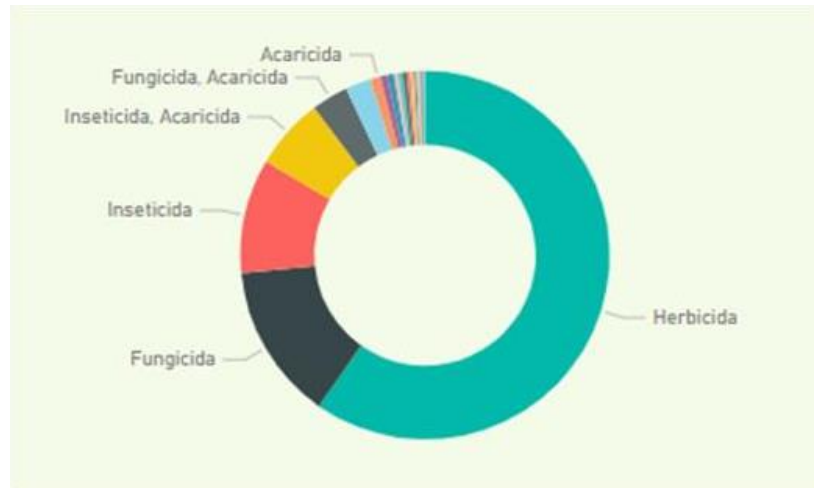


Figura 5 - Vendas totais (ton) por classe de uso dos agrotóxicos, do ano de 2020, no Brasil. Fonte: IBAMA (Decreto nº4.074/02) (2020), dados atualizados em 2021. Elaborado pela Divisão de Gerenciamento de Substâncias (DIGES), Coordenação de Controle Ambiental de Substâncias e Produtos Perigosos (CCONPES), Coordenação Geral de Avaliação (CGASQ) e Controle de Substâncias Químicas (DIQUA).

Na base de dados do IBAMA (2020), para o estado de Alagoas (Figura 3), dos 1.759,82 ton em vendas por ingrediente ativo, a maior quantidade pertence à classe dos herbicidas com 1.660,92 ton.

Os herbicidas são considerados contaminantes emergentes, pois as rotas de exposição indireta a estes compostos e seus produtos de degradação podem ser por meio da água, ar e alimentos, o que pode contaminar os ecossistemas aquáticos bem como afetar a saúde animal e humana. Estudos epidemiológicos em humanos têm sugerido que a exposição a herbicidas podem estar associados a doenças crônicas, déficits neurológicos e distúrbios reprodutivos (SEMREN, ZUNEC, PIZENT, 2018).

Metribuzin

Um dos herbicidas utilizados no Brasil é o metribuzin, cujo nome químico é 4-amino-6-terc-butil-4,5-di-hidro-3-metiltio-1,2,4-triazin-5-ona, o qual foi desenvolvido em 1971 pela empresa Bayer na Alemanha. É um herbicida de base fraca, do grupo químico das triazinonas ou triazinas assimétricas, que possui dois átomos de nitrogênio e dois átomos de carbono adjacentes (Figura 6) (CARVALHO, 2013; ZHANG et al., 2014; VELISEK et al., 2009).

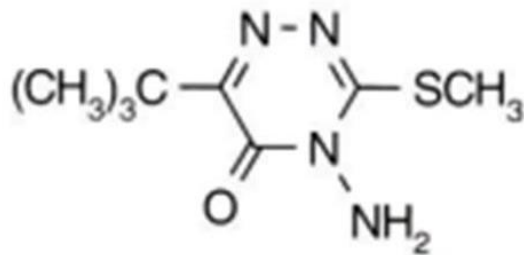


Figura 6 - Fórmula estrutural do Metribuzin. Fonte: ANVISA “gov.br/anvisa”

É amplamente utilizado para o tratamento de pré e pós-emergência de gramíneas e plantas daninhas de folhas largas (dicotiledôneas), causando exclusivamente sua morte, mas é seletivo para folhas estreitas (monocotiledôneas), sendo utilizado em culturas de soja, batata, trigo, tomate, cana-de-açúcar, dentre outros (VELISEK et al., 2009; CARVALHO, 2013). No Brasil, é comumente empregado no cultivo de soja e tomateiros, para o cultivo de tomate de rasteiro para fins industriais (GONÇALVES et al., 2018; CORREIA et al., 2018). Na Tabela 1 podem ser observadas a lista completa de culturas em que o metribuzin pode ser aplicado, bem como informações de aplicação.

Tabela 1 - Uso agrícola autorizado para o Metribuzin. Fonte: ANVISA “gov.br/anvisa”

Culturas	Modalidade de emprego (aplicação)	LMR (mg/kg)	Intervalo de segurança
Aspargo	Pré-emergência	0,1	7 dias
Batata	Pré/pós-emergência	0,1	60 dias
Café	Pré/pós-emergência	0,1	60 dias
Cana-de-açúcar	Pré/pós-emergência	0,1	120 dias
Mandioca	Pré-emergência	0,1	(1)
Soja	Pré-emergência	0,1	(1)
Tomate	Pré/pós-emergência	0,1	60 dias

Trigo	Pré-emergência	0,1	90 dias
-------	----------------	-----	---------

LMR - Limite máximo de resíduo (quantidade de agrotóxico, em miligrama, que pode estar presente em um quilo de alimento após uso do agrotóxico, sem que haja prejuízo à saúde humana).

1. Intervalo de segurança não determinado devido a modalidade de emprego

Dados do IBAMA (2020) sobre a comercialização de agrotóxicos e afins no Brasil, apontaram para a venda total de 13.985,70 ton do ingrediente ativo metribuzin. O Metribuzin é um ingrediente ativo de vários herbicidas cujos nomes comerciais são Sencor, Lexone SC, Artist, Sencorex e Shotgun.

O Metribuzin é registrado pelo MAPA sob nº 04114, com uma classificação toxicológica III – medianamente tóxica e classificação do potencial de periculosidade ambiental II– produto muito perigoso ao meio ambiente (MAPA, 2022). A dose do produto a ser aplicada depende do tipo cultura plantada (MAPA - ANVISA/IBAMA, 2022). Mas para as culturas seletivas do metribuzin, as dosagens sugeridas variam entre 0,144 e 1,92 L ha⁻¹ do ingrediente ativo (LORENZI, 2006).

O Metribuzin é absorvido principalmente pelo sistema radicular, mas também pelo foliar com translocação pelo xilema. Apresenta uma alta solubilidade em água e as reações fotoquímicas com dissociação da água ocorrem de forma rápida, apresentando meia vida de cerca de sete dias em meio aquático natural. Já no solo, pode permanecer por trinta dias a depender do teor de matéria orgânica presente (VELISEK, 2009; RODRIGUES & ALMEIDA, 2011; PLHALOVA et al., 2012).

Herbicidas que possuem uma maior persistência no solo podem causar intoxicação de outras culturas mais sensíveis (MANCUSO et al, 2011), que venham a ser semeadas posteriormente, ocasionando uma redução no crescimento destas (ROBINSON et al, 2008).

Um estudo realizado por Walperes et al. (2015), realizou o cultivo no solo de alho (*Allium sativum*), cebola (*Allium cepa*) e feijão (*Phaseolus*), expostos a concentrações de metribuzin (0; 6; 12; 24; 48; 96; 144; 192; 240 e 480) partes por bilhão (ppb) por 7, 14, 21 e 28 dias após a emergência (DAE), evidenciando que as plantas de alho, cebola e feijão são sensíveis ao efeito do Metribuzin. Sendo assim, os resíduos de metribuzin no solo tem potencial para trazer complicações ao plantio sucessivo destas culturas.

Segundo Velisek et al. (2009), o aumento no uso deste herbicida tem contribuído para boas safras, porém pode ocorrer escoamento e contaminação de águas superficiais, devido sua solubilidade em água, gerando preocupação com relação à contaminação da água doce e os efeitos a longo prazo nos organismos do ambiente aquático.

Dores et al. (2006) realizaram um estudo na região de Primavera do leste, Mato Grosso, Brasil. Avaliaram a presença de herbicidas nas águas subterrâneas que são geralmente utilizadas para consumo humano e constataram que o metribuzin foi o herbicida mais detectado (com concentração de $0,351 \mu\text{g L}^{-1}$), e apresentou maior mobilidade segundo o índice de GUS - índice de lixiviação de pesticidas proposto por Gustafson (1989).

As propriedades de adsorção e mobilidade do metribuzin, depende do teor de matéria orgânica presente no solo e do pH, havendo uma mobilidade reduzida pelo aumento desse teor, bem como se torna muito móvel com pH alto (ROMAN et al., 2005). Outras propriedades podem ser observadas, na tabela 2, de acordo com o perfil ambiental, com fundamento legal para avaliação ambiental pelo IBAMA.

Tabela 2 - Características químicas e físicas do Metribuzin. Fonte: IBAMA, Decreto nº 4.074/02 de 04/01/2002.

Massa molar	Aspecto, cor	Fórmula molecular	Solubilidade (água)	ph	Ponto de fusão	Densidade
214.29 g/mol	Sólido branco amarelado	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_4\text{OS}$	1,2 g/L (20° C)	7,7-7,9 (solução 5%)	119°C	456 g/L (solta) 614 g/l (compacta)

Com relação ao mecanismo de ação do metribuzin, eles são inibidores do FSII (P680) (não-enzimáticos). Esse mecanismo de inibição é largamente utilizado na agricultura, sendo proveniente do bloqueio no transporte de elétrons por intermédio da inativação de carregadores desse transporte (ROMAN et al., 2005). A primeira etapa fotoquímica

corresponde ao FSII (P680), quando há absorção da energia luminosa pela clorofila, ela chega ao seu centro de reação e irá excitar um elétron, este irá ser recebido pela feofitina, elemento da cadeia de transportadores de elétrons, deixando o centro de reação reduzido por sua perda (ROMAN et al., 2005). A molécula da água mantém o fluxo, pois ela se divide em íons H^+ e oxigênio produzindo elétron e suprindo o que foi perdido (ROMAN et al., 2005).

O elétron então passa por várias moléculas transportadoras até chegar ao $NADP^+$, que será reduzido a NADPH. Então os elétrons chegam a um carreador capaz de se movimentar (Figura 7), chamado plastoquinona A (PQa) que se liga a uma proteína (D1), interrompendo a produção de Adenosina trifosfato (ATP) e $NADPH_2$, e fixação de CO_2 , na segunda etapa bioquímica FSI (P700) (ROMAN et al., 2005; MARCHI, MARCHI, GUIMARÃES, 2008).

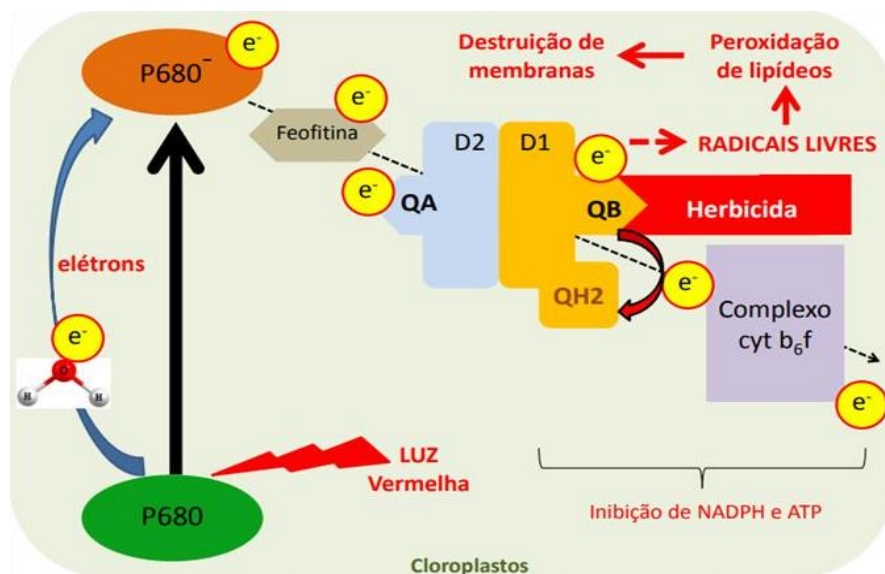


Figura 7 - Etapas fotoquímica e bioquímica da fotossíntese e seu fluxo de elétrons. Fonte: (Carvalho., 2013).

Porém, o herbicida também possui a capacidade de se ligar a D1 onde acopla a PQb, competindo com ela, a deixando parcialmente reduzida. PQb então não consegue ser protonada pela interrupção de fluxo dos elétrons com a PQA, e assim a $PQBH_2$ não consegue realizar transferência de elétrons para o citocromo (CARVALHO, 2013; MARCHI, MARCHI, GUIMARÃES, 2008).

As plantas não morrem pela ausência de alimento, embora a fotossíntese tenha sido interrompida, mas sim pela carga energética elevada, pois a planta continua a captação de energia luminosa e há formação de radicais livres. A clorofila se torna muito reativa sendo chamada de clorofila triplete. Ela irá reagir com o oxigênio molecular e ROS serão produzidas (MARCHI, MARCHI, GUIMARÃES, 2008).

Essas moléculas irão reagir com lipídios nas membranas celulares, causando peroxidação lipídica (LPO), dando origem a mais radicais livres e potencializando os danos nas membranas celulares, causando clorose e necrose (CARVALHO, 2013; MARCHI, MARCHI, GUIMARÃES, 2008). Em condições normais, os carotenóides, defesas naturais da planta, tem ação contra o estresse oxidativo, entretanto quando exposto ao metribuzin, sua ação protetora não é suficiente para impedir a LPO (RODRIGUES & ALMEIDA, 2011; ROMAN et al., 2005).

Alguns estudos têm demonstrado os efeitos toxicológicos que a exposição ao metribuzin pode ocasionar em organismos não alvo. Em estudo realizado por Plhalova et al. (2012) com juvenis do peixe zebrafish expostos a diferentes concentrações de metribuzin (1,5, 5, 16, 33 e 53 mg L⁻¹) por 28 dias, foi constatada maior taxa de mortalidade na maior concentração (53 mg L⁻¹).

Foi demonstrado por Husak et al. (2016), que após exposição de 96 horas do peixe dourado (*Carrasius auratus L.*) ao metribuzin (Sencor), observou-se, na concentração mais baixa (7,14 mg L⁻¹), aumento nos níveis de proteínas carboniladas nas brânquias, bem como aumento na atividade das enzimas antioxidantes Glutathione Peroxidase (GPx) e GST. Já a exposição a 71,4 mg L⁻¹ resultou em níveis mais baixos de proteínas carboniladas e aumento na atividade da SOD, bem como da GPx e GST.

No estudo conduzido por Hostovsky et al. (2012), embriões de carpa comum (*Cyprinus carpio L.*) foram expostos ao metribuzin (0,9, 4, 14 e 32 mg L⁻¹), por 30 dias. Foi verificado que a atividade da GST estava aumentada, sobretudo na maior concentração, bem como a atividade da Glutathione Redutase (GR) nas concentrações de 0,9, 4 e 14 mg L⁻¹ e os níveis de LPO foram mais altos na concentração de 0,9 mg L⁻¹.

Os estudos de Velisek et al. (2008) relataram alterações histopatológicas nos rins e brânquias de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) na concentração de 62,51 mg L⁻¹ de metribuzin Sencor 70 WG por 96 horas. Nos estudos de Velisek et al. (2008, 2009) foram observadas perda de coordenação motora e dos movimentos, respiração acelerada, bem como curtos estágios de excitação (convulsões, nado em círculos).

Na literatura também existem estudos que avaliaram a toxicidade do metribuzin em modelos de mamíferos. Bomann et al. (2021) realizaram estudos para avaliar a toxicidade crônica e um potencial oncogênico do metribuzin, em ratos Fischer 344 machos e fêmeas. O herbicida foi utilizado na dieta em concentrações de 30, 300 e 900 partes por milhão (ppm),

com exposição durante dois anos. Foram observadas redução de peso corporal, alterações na enzima hepática uridina 5' -difosfo-glucuronosiltransferase (UDPGT ou UGT), que pode ser a responsável por uma redução e aumento do nível de tiroxina (T4), bem como por alterações histopatológicas encontradas. Também ocorreu redução, de forma dose dependente, das enzimas fosfatase alcalina (AP), alanina-aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), bem como um aumento dos níveis de colesterol no grupo exposto a maior dose.

Já no trabalho de Porter et al. (1993), fêmeas de ratos Sprague-Dawley foram expostos a 10.000 ppb de metribuzin puro por 6 semanas apresentaram hipertireoidismo. Já os machos, quando expostos a mesma concentração por 16 semanas, apresentaram altos níveis de tiroxina (T4), bem como os níveis de somatotropina se apresentaram alterados a partir da 13ª semana (PORTER et al., 1993). Estes dados evidenciam uma potencial toxicidade do metribuzin nos sistemas nervoso, endócrino e imune, os quais são importantes para a reprodução, crescimento e desenvolvimento dos vertebrados. Para além disso, foi verificado que a exposição ao metribuzin causa alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e glicoproteínas no fígado de porquinhos-da-índia expostos ao metribuzin por gavagem seis vezes por semana, durante 30 e 90 dias (TOMASZEWSKI et al., 1985).

Em estudo desenvolvido por Delancey et al. (2009) com trabalhadores dos estados de Iowa e Carolina do Norte (EUA) que aplicam o herbicida metribuzin nas plantações, constatou-se uma potencial associação entre a exposição ocupacional ao metribuzin e certos tipos de câncer linfomatóides.

Estresse oxidativo

O estresse oxidativo acontece quando o equilíbrio interno do organismo é alterado por meio de alguns fatores como nutricionais (por exemplo, a dieta), físicos (por exemplo, o sedentarismo ou atividade em excesso), metabolização de xenobióticos como agrotóxicos, metais, medicamentos farmacológicos dentre outros (CONSTANTINI., 2010; LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009).

Na célula acontece uma movimentação dos elétrons entre os átomos, uma oxidação e redução, ou seja, uma perda e ganho de elétrons desemparelhados na sua última camada de valência, os quais são muito instáveis e reativos (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2007).

Isso resultará na produção de radicais livres, que poderão ser combatidos pelos mecanismos de defesa antioxidante, os tornando estáveis, ou ainda interagirem de forma inespecífica com outras biomoléculas presentes nas células e resultar em estresse oxidativo (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2007).

Neste processo são geradas ROS que tem origem do radical superóxido e espécies reativas de nitrogênio (RNS) como, por exemplo, o óxido nítrico. É um processo natural nos organismos aeróbicos e a produção de ROS ocorre de forma semelhante em organismos aquáticos e mamíferos (MASSARSKY, KOSAL, GIULIO, 2016).

Existem alguns mecanismos responsáveis pela produção das ROS nos organismos. Na maioria das vezes eles serão produtos secundários do metabolismo do oxigênio, sendo as mitocôndrias a fonte principal de ROS celulares, no processo de respiração celular (CONSTANTINI., 2010; MASSARSKY, KOSAL, GIULIO., 2016). Dessa forma, em organismos aeróbicos, mais de 90% do oxigênio que é consumido é diminuído a água por intermédio de quatro elétrons através da enzima Citocromo c oxidase na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (Figura 8), com o objetivo na produção de energia em forma de ATP (OTT et al., 2007; SKULACHEV, 2012).

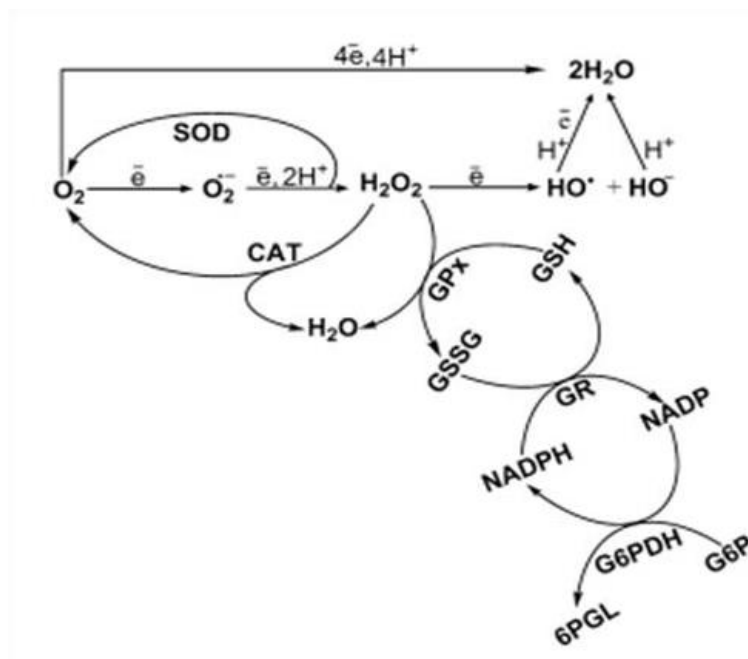


Figura 8 - Metabolismo do oxigênio nos organismos e as enzimas antioxidantes de primeira e segunda linha. O esquema mostra, na parte superior, redução de oxigênio de quatro elétrons com formação de água. Mais abaixo mostra sucessivas reduções de um elétron, formando espécies reativas de oxigênio, sendo estes radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet}). A transformação de ($O_2^{\bullet-}$) e (H_2O_2)

é acelerada pela primeira enzima antioxidante SOD que catalisa sua dismutação para produção de oxigênio molecular e (H_2O_2), já a CAT converte este em oxigênio molecular e água. A glutathione peroxidase (GPx) reduz (H_2O_2) a água. Restauração da glutathione oxidada (GSSG) à sua forma reduzida (GSH) é catalisada pela glutathione redutase (GR) com uso de NADPH fornecido pela reação da desidrogenase (G6PDH). Fonte: Lushchak (2015, p.03)

Entretanto, menos de 10% do oxigênio consumido é reduzido por meio de um elétron que irá converter o oxigênio molecular a radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (com potencial para adentrar nas membranas biológicas e inutilizar determinadas enzimas), podendo ser mais reduzido e formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (não possuem propriedade de radical, pois não tem elétrons desemparelhados, mas é altamente reativo), hidroxila (HO^{\cdot}) e água (Figura 8) (CONSTANTINI., 2010; MASSARSKY, KOSAL, GIULIO., 2016).

Neste processo há também participação dos íons Ferro e cobre (Fe^{2+} e Cu^+), estes são altamente ativos em reações de oxidação e redução, possuindo dessa forma grande capacidade catalisadora nas reações de produção dos radicais livres por meio da reação de Fenton, onde há produção do radical HO^{\cdot} pela reação do Fe^{2+} ou Cu^+ com o H_2O_2 , bem como também pela reação de Haber-Weiss onde os referidos íons catalisam a reação entre H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$ para gerar o radical HO^{\cdot} (BARBOSA et al., 2010; BARBOSA et al., 2014).

A segunda fonte de geração de ROS nas células é no retículo endoplasmático, sendo algumas quantidades também produzidas no citosol e peroxissomos por diferentes oxidases (YELDANDI, RAO, REDDY., 2000; BARTOSZ, 2009). Há contínua formação de ROS e eliminação, ocorrendo, portanto um equilíbrio nas concentrações, porém quando acontece esse equilíbrio é perturbado, ocorrendo o chamado estresse oxidativo (YELDANDI, RAO, REDDY., 2000; BARTOSZ, 2009), já descrito anteriormente. Caso o aumento de ROS não seja contido, ocasionará danos celulares, levando a oxidação química de biomoléculas, com modificações em suas estruturas que pode resultar em perda de sua função e a longo prazo promover o envelhecimento celular, algumas doenças cardiovasculares, distúrbios neurodegenerativos e até mesmo câncer (CONSTANTINI., 2010; LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT., 2009).

Porém é preciso salientar também que as moléculas de espécies reativas são importantes para a sinalização intracelular e regulação do metabolismo celular, visto que os organismos necessitam destes processos para que haja comunicação celular e coordenação dos mecanismos fisiológicos, bem como na modulação da expressão gênica (DRÖGE, 2002; LANDAR et al., 2005). As ROS também possuem papel na fagocitação de neutrófilos e macrófagos (SLAINOVA et al., 2009).

2.3.1 Sistemas antioxidantes enzimáticos

Existem defesas naturais contra os danos causados pelas espécies reativas, porém quando o equilíbrio de produção e eliminação de ROS não é suficiente, ou seja, quando as defesas não conseguem mitigar o dano celular ocasionado, ocorre o estresse oxidativo. Portanto, o sistema de defesa antioxidante tem como principal objetivo controlar ou neutralizar a ação da produção excessiva de ROS (COSTANTINI & VERHULST, 2009; LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009).

Os antioxidantes são uma família de compostos que podem ter origem endógena e exógena. Existem os antioxidantes de baixa massa molecular como os dietéticos (vitamina C, vitamina E, carotenóides, etc) que neutralizam as espécies reativas. (CATONI, PETERS, SCHAEFER., 2008; COHEN et al., 2008; COSTANTINI, 2010). Quando, por exemplo, há exposição do organismo a xenobióticos, mecanismos de desintoxicação entram em ação para tentar neutralizar os efeitos nocivos que ameaçam o bom funcionamento do organismo por meio de atividades enzimáticas de alta massa molecular como SOD, CAT e GST (SOLÉ et al., 2010; LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT., 2009; VALAVANIDIS et al., 2006).

Durante a exposição à xenobióticos, geralmente há duas fases de metabolização e excreção destes. A primeira fase é basicamente catalisada pelas enzimas do complexo citocromo P450 e está relacionada com a oxidação, redução e hidrólise dos poluentes, na qual estão envolvidas CAT, SOD e GPx. (KROON, STRETEN, HARRIES, 2017). Na biotransformação da segunda fase estão envolvidas as glutationas como a enzima GST, catalisando a conjugação de xenobióticos, GR e a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (Figura 8). Estes processos facilitam a eliminação dos xenobióticos tornando-os mais hidrofílicos (KROON, STRETEN, HARRIES, 2017).

As enzimas antioxidantes da família SOD são proteínas que contêm metais. Como detalhado na Figura 8, catalisam a dismutação do radical superóxido, em H₂O₂ e água (LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT., 2008). Existem três cofatores metálicos presentes nas células eucarióticas, a Superóxido Dismutase de manganês (MnSOD) que ocorre principalmente na mitocôndria, ao passo que a Superóxido Dismutase cobre/zinco (Cu/ZnSOD) e ferro (Fe-SOD) ocorrem no citoplasma e espaço intermembranas da mitocôndria (MARGIS et al., 2008; BARBOSA et al., 2010).

As enzimas antioxidantes CAT são de suma importância para a defesa celular, uma vez que ela exerce a decomposição do H_2O_2 , em água e oxigênio (Figura 8) (VASYLKIV et al., 2011). A CAT é encontrada em muitos tecidos com variação nos níveis de sua atividade frente a contaminantes, sejam metálicos ou orgânicos, que a depender da espécie, níveis e concentração de exposição, podem ter sua atividade inibida ou não (ATLI et al., 2006).

A enzima GST faz parte de uma família de proteínas envolvida no processo de biotransformação celular. GST catalisa a conjugação da Glutathione Reduzida (GSH) a compostos endógenos ou exógenos, como radicais hidroxila, peróxidos de lipídios de membrana, aumentando sua solubilização e facilitando a excreção. Desta forma, possui um papel importante na desintoxicação de xenobióticos (CARLETTI et al., 2007; HUBER, ALMEIDA, FÁTIMA, 2008). Esta defesa antioxidante faz parte de um sistema de ação combinada com outras enzimas e também com transportadores que eliminarão os conjugados de GSH (CATANEO et al., 2003).

A LPO, uma reação induzida pelo excesso de ROS, causa a incorporação de um oxigênio molecular nos ácidos graxos dos fosfolipídios, causando a destruição das membranas celulares, alteração nos mecanismos de transporte através da membrana e até mesma pode resultar em morte celular. A LPO é um dos principais biomarcadores os para se avaliar o estresse oxidativo nas células e tecidos, por meio do MDA, que é produto final da LPO (WANG et al., 2015; VALKO, MORRIS, CRONIN, 2007).

As atividades das enzimas antioxidantes são usadas como biomarcadores de estresse oxidativo no organismo, pois fornecem evidências de efeitos nocivos de xenobióticos como resultado do desbalanço redox (VALAVANIDIS et al., 2006; TIMME-LARAGY et al., 2017). O aumento ou redução dos níveis e atividade das enzimas antioxidantes pode depender do tempo de exposição, intensidade e concentração dos estressores nos organismos aquáticos, como os peixes (ORUÇ & USTA, 2007). Para além disso, Massarsky, Kosal, Giulio. (2016) ressaltam que as semelhanças entre as defesas antioxidantes em peixes e mamíferos exprimem a relevância no uso de modelos de peixes, a fim de se avaliar o estresse oxidativo em estudos de toxicidade de poluentes.

O sistema modelo zebrafish

O *Danio rerio*, popularmente conhecido como zebrafish, paulistinha ou peixe zebra, é um peixe nativo do sul e sudeste da Ásia, região com estações bem definidas, ambientes

alagados e alterações na qualidade da água, parâmetros que conferem características de tolerância e resistência a esta espécie tanto em seus habitats naturais quanto em biotério (DAMMSKI et al, 2011).

É um teleósteo de água doce que pertence à família Cyprinidae e que pode chegar a 4-5 cm de comprimento total quando adulto (Figura 9). De hábitos diurnos, possui fecundação externa e um desenvolvimento embrio-larval que dura entre 48-72 horas pós-fertilização. Tornam-se adultos com cerca de três meses, com um ciclo de vida entre 3 e 4 anos (DAMMSKI et al, 2011; SILVEIRA, SCHNEIDER, HAMMES, 2012).



Figura 9 - Casal de Zebrafish adulto, macho (esquerda) e fêmea (direita). Fonte: “aquarismopaulista.com”

Sete estágios são definidos para a fase embrionária do zebrafish, são elas: fase de zigoto, clivagem, blástula, gástrula, segmentação, farínghula, e com a eclosão dá-se início a fase larval (Figura 10), na qual ocorre a finalização do sistema digestivo rudimentar e abertura da boca, com início da alimentação exógena (DAMMSKI et al, 2011). Na tabela 3 é possível visualizar os estágios do desenvolvimento do zebrafish e as principais características fenotípicas de cada fase.

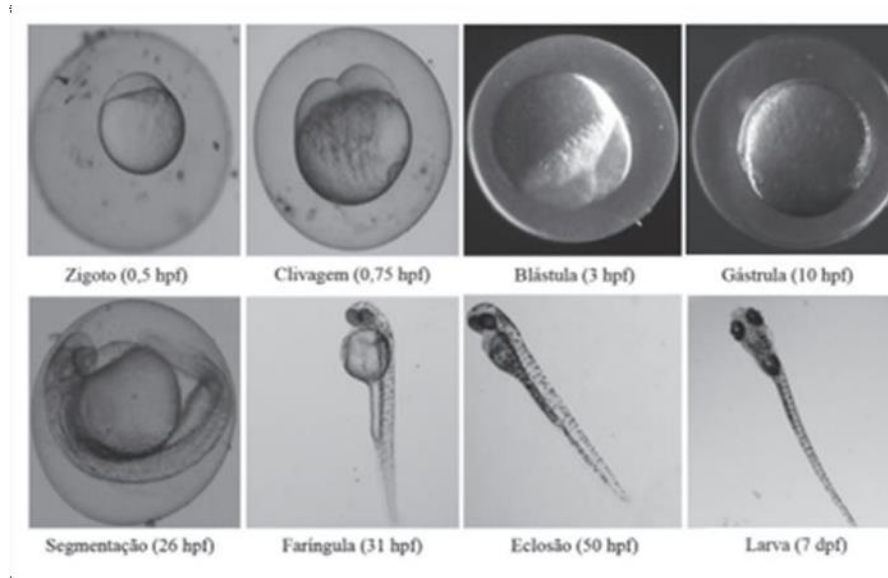


Figura 10- Fases embrionária e larval do *Danio rerio*. Fonte: Resende & Soccol (2015, p.16)

Quando o animal apresenta o fenótipo de um mini-adulto, em início à fase juvenil, caracterizada por um rápido crescimento e desenvolvimento, com a completa maturação e funcionamento de todos os órgãos e sistemas orgânicos. Ao completar a primeira maturação sexual e estarem aptos à reprodução, os animais atingem a fase adulta, sendo aptos a reproduzirem de forma contínua. O completo conhecimento sobre os estágios do ciclo de vida do zebrafish possibilita saber quais ferramentas utilizar em cada estudo e a forma correta de determinada exposição para o modelo animal (RESENDE & SOCCOL, 2015; DAMMSKI et al, 2011).

Tabela 3 - Estágios de desenvolvimento e comprimento do corpo em zebrafish. Fonte: DAMMSKI et al (2011, p.19).

Estágio (dias)	Comprimento (mm)	Descrição
Larva jovem (3)	3,5	Nada livremente; posicionamento vertical.
Larva (14)	6	Bexiga natatória cheia; procura de alimento; crescimento
Juvenil (30)	10	Nadadeiras e padrão de pigmentação dos adultos.

Adulto jovem (90)	20	Reprodução
Adulto (1000)	40-50	Final da vida.

O zebrafish tem se destacado na comunidade científica e cada vez mais aplicado em diferentes estudos como modelo experimental, por possuir diversas vantagens, tais como: pequenas proporções corporais, facilidade no manejo em biotério, alta taxa de reprodução, embriões transparentes, curto ciclo de desenvolvimento e por apresentar o genoma sequenciado, bem como similaridade genética e funcional de cerca de 70% os seres humanos (ALVES et al, 2022; DAMMSKI et al, 2011; XU et al, 2020). Ainda, 84% dos genes relacionados a doenças em humanos apresentam ortólogos no zebrafish (HOWE et al., 2013).

A importância do zebrafish nas pesquisas científicas tem se tornado cada vez mais perceptível diante da gama de estudos que o mesmo pode ser utilizado (HOSTOVSKY et al, 2012; SEMREM, ZUNEC, PIZENT, 2018), como estudos envolvendo o desenvolvimento embrionário, na avaliação de efeitos teratogênicos, alterações neurocomportamentais, na avaliação ecotoxicológicas de agrotóxicos, produtos químicos, farmacêuticos, metais e microplásticos, os quais causam a poluição dos ecossistemas aquáticos, estudos cardiovasculares, sobre o sistema imune, visual, endócrino e reprodução, dentre outras (ALVES et al, 2022; ARAUJO et al, 2021; TESOLIN et al, 2014; XU et al., 2020; ZHU et al, 2015).

O ambiente aquático tem sido alvo de contaminantes como metais pesados, agrotóxicos, produtos químicos, dentre outros poluentes (TESOLIN et al, 2014; ZHU et al, 2015). Os organismos aquáticos, como os peixes por exemplo, quando expostos a esses xenobióticos, podem absorvê-los e resultar em danos ao indivíduo exposto, bem como ao nível de população e comunidades, com consequências ecológicas para os ecossistemas aquáticos (KOEHLER et al, 2004). De forma contínua os organismos aquáticos são expostos a produtos químicos que resultam da produção agrícola de forma direta como o escoamento superficial ou indireta por intermédio das cadeias tróficas (LAKRA & NAGPURE, 2009).

Plhalova et al. (2012), realizou experimentos com juvenis de zebrafish, expostos às

concentrações de 33 e 53 mg L⁻¹ de metribuzin e constatou uma diminuição da ingestão de alimentos desses animais, e uma diminuição significativa no crescimento e peso corporal dos peixes, bem como lesões histopatológicas foram observadas no fígado, na concentração mais alta de metribuzin (53 mg L⁻¹). Entretanto, ainda não estão claros os possíveis efeitos ecotoxicológicos que a exposição a concentrações de relevância de metribuzin pode causar ao longo do desenvolvimento embrionário e larval dos peixes.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o estado redox do zebrafish (*Danio rerio*) após exposição ao herbicida à base de Metribuzin durante seu desenvolvimento inicial.

Objetivo específico

- Avaliar se ocorre desbalanço da defesa antioxidante em zebrafish expostos ao herbicida à base de Metribuzin até 144 horas.

4 METODOLOGIA

Manutenção dos animais e coleta dos embriões

Os espécimes adultos de zebrafish foram mantidos no Biotério de Peixes do Setor de Histologia e Embriologia do ICBS – UFAL, de acordo com as recomendações descritas em Dammski et al. (2011). O peixes foram acondicionados em aquários de 3 litros de policarbonato na proporção de 5 peixes por litro, mantidos em sistema de recirculação de água, com temperatura controlada de 26 °C e fotoperíodo de 14 horas claro/10 horas escuro, sendo alimentados três vezes ao dia com ração comercial granulada e náuplios de artêmia. Para a coleta dos embriões, machos e fêmeas na proporção de 2:1 foram colocados em um único aquário para reprodução, com uma divisória separando-os (Figura 11), para que no dia seguinte com o início do ciclo de luz, esta reprodução ocorresse.

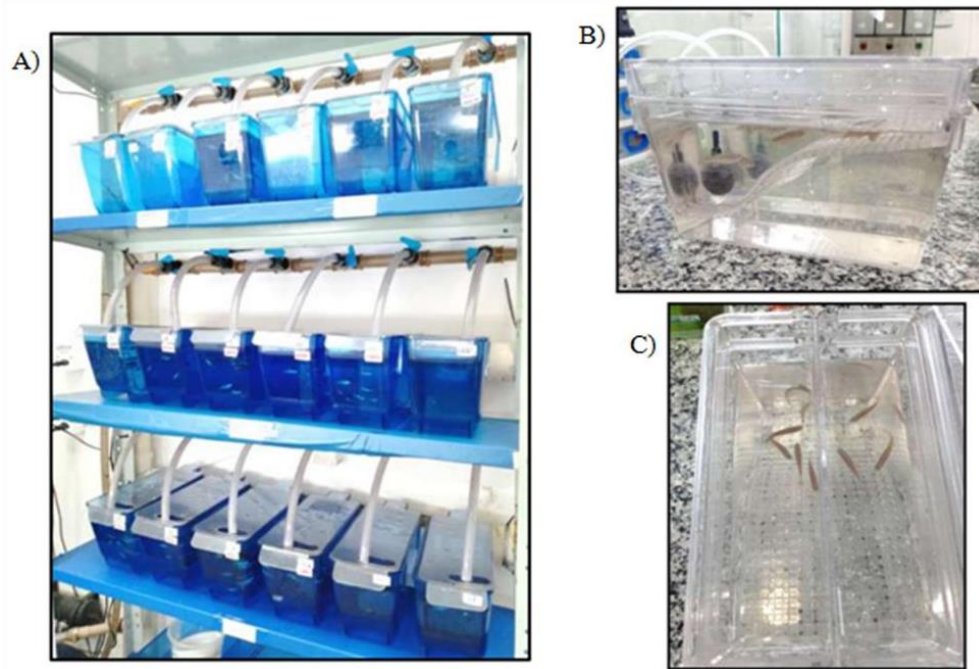


Figura 11- Imagens do Biotério de Peixes do ICBS - UFAL. (A) Estante com sistema de recirculação de água na qual são mantidos os adultos de zebrafish. (B) Vista lateral e (C) superior dos aquários utilizados para a reprodução e coleta de embriões. Fonte: elaborado pelo autor.

Após a reprodução, os embriões foram coletados do fundo dos aquários, lavados rapidamente em solução de 0,01% de Azul de Metileno e analisados em lupa para seleção dos embriões viáveis e descarte dos inviáveis (Figura. 12). Todos os procedimentos experimentais adotados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – UFAL, nº 25/2020.

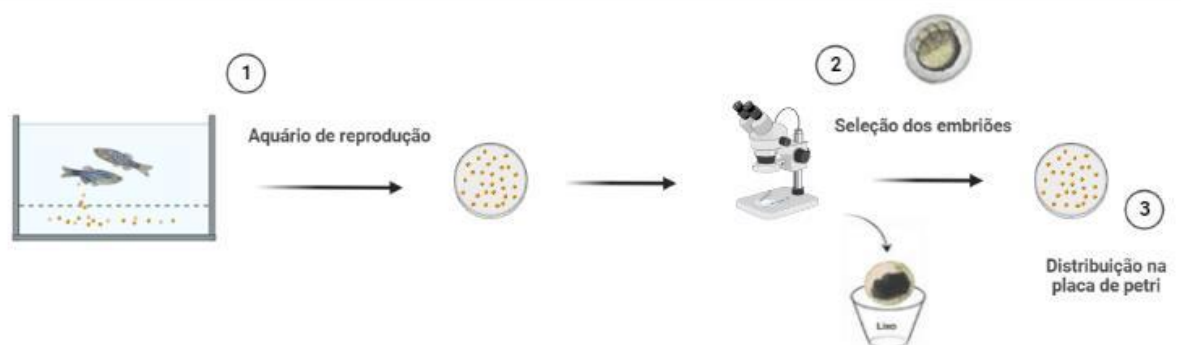


Figura 12- Procedimento de coleta e viabilidade dos embriões. Fonte: Adaptado de Lammer et al. (2009).

Exposição ao Metribuzin

Foi preparada uma solução estoque de herbicida à base metribuzin (HBM) a 10 mg L^{-1} , a partir da formulação comercial Sencor 480, produzido pela Bayer, contendo 480 g L^{-1} e 680 g L^{-1} de ingredientes inertes. Após agitação e dissolução, esta solução estoque foi armazenada em tubo falcon envolto com papel alumínio e armazenado em geladeira.

As concentrações estabelecidas para o HBM neste estudo ($0,0001 \text{ mg L}^{-1}$, $0,001 \text{ mg L}^{-1}$, $0,01 \text{ mg L}^{-1}$) possuem relevância ambiental (ver tabela 4) e foram escolhidas uma vez que causam $<50\%$ de mortalidade ao longo do período embrionário e larval em zebrafish, conforme os dados de Santos et al. (em preparo).

Tabela 4 – Concentrações mínimas e máximas de Metribuzin, encontradas em diferentes Localidades e matrizes.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Local	Água	Sedimento	Peixe	Autor/ano
Estuário do rio Sado, Portugal em 2017	$0,88 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$	$0,027 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$		Rodrigues, E. T. et al., 2019
Bacia hidrográfica do rio Baima, China	$0.01\text{--}0.16 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$; $0\text{--}0.09 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$; $0.08 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$		$5600 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$	Sun,X; Liu, F; Fan, Y, 2019
Região marítima, Canadá, de 2003-2007 2005	$0,35 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$; $0,63 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$; $0,041 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$; $35;1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$; $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ $2,0 - 75,00 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$			Xing, Z. et al., 2012
Sudeste de Ontário, Canadá	$0,22 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$; $0,14 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$			Sanford,M; Prosser, R.S. Prosser, 2020

Rio Samambaia, Brasil	0.0017 $\mu\text{g L}^{-1}$; 0.8217 $\mu\text{g L}^{-1}$; 0.0007 $\mu\text{g L}^{-1}$; 0.2897 $\mu\text{g L}^{-1}$			Correia, N.B; Carbonari, C.A; Velini, E.D, 2020
Rio Tejo, Portugal	0.48 ng L^{-1} ; 15.6 ng L^{-1}			Rico, A. et al., 2019

Essas concentrações foram obtidas a partir da diluição da solução estoque em água reconstituída (ISO, 1996). Na tabela 5 estão descritos os volumes de cada solução utilizados.

Tabela 5- Volumes dos compostos utilizados no preparo dos tratamentos usados no trabalho. Fonte: Elaborado pelo autor.

Concentrações teste (mg L^{-1})	Volume (ml) de água reconstituída - Proveta	Volume (μl) de água reconstituída - Micropipeta	Volume (μl) de solução mãe a base de Metribuzin - Micropipeta
Controle água (CA)	100	-	-
0,0001	99	999	1 μl
0,001	99	990	10 μl
0,01	99	900	100 μl

A seguir, os embriões viáveis foram expostos em placas de petri (Kasvi) (Figura 13), até o limite de 3 horas pós fertilização (hpf), contendo 30 embriões por placa (em duas placas, para a obtenção de 60 larvas/tratamento) em 30 ml de cada uma das três diferentes

concentrações de metribuzin e do controle negativo (água reconstituída= CA), totalizando 60 embriões expostos por tratamento em cada experimento.

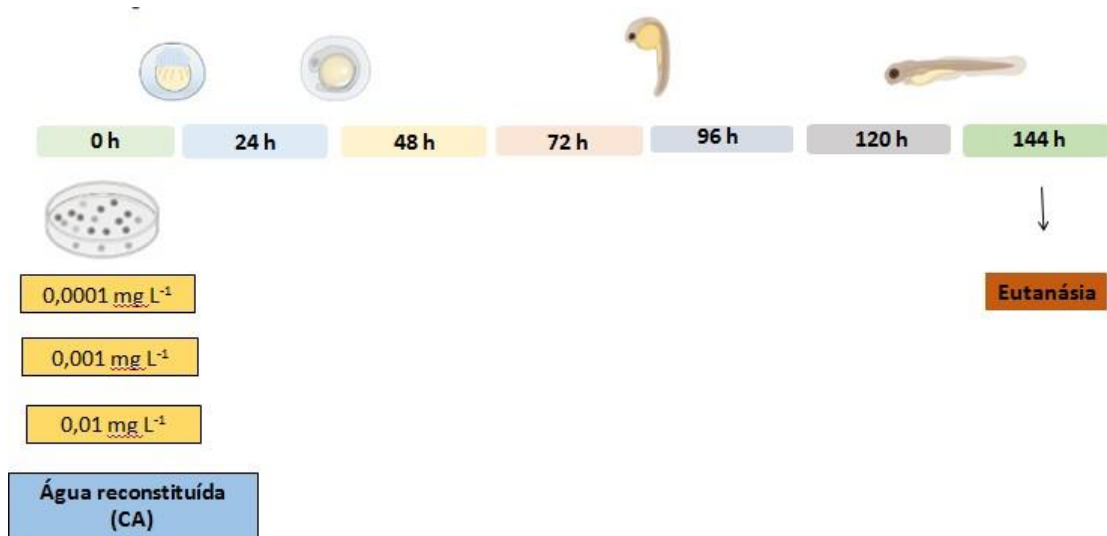


Figura 13- Linha do tempo da exposição dos embriões/larvas de zebrafish a diferentes concentrações de metribuzin e grupo controle, até 144 h. Fonte: elaborado pelo autor.

Cada exposição foi realizada sete vezes (n=7), de modo a ter rigor estatístico para as análises bioquímicas, conforme já padronizado em nosso laboratório. A exposição foi conduzida de forma semi-estática, com troca dos tratamentos a cada 48 horas (Figura 14). Os embriões foram mantidos a 26°C por 6 dias (144 horas) em uma estufa com demanda bioquímica de oxigênio (BOD) e ciclo claro-escuro de 14:10.



Figura 14- Exposição dos embriões. Placas de petri com concentrações de metribuzin e grupo controle (CA). Fonte: elaborado pelo autor.

Ao final da exposição, as larvas de cada tratamento foram contadas e alocadas em microtubo de 1,5 ml e então eutanasiadas em solução de 0,1% de benzocaína. Após a remoção de toda a solução, as larvas foram congeladas em nitrogênio líquido e então armazenadas em freezer -80°C. Todas as condições necessárias para a exposição foram adaptadas a partir das normas da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico 236 (OECD, 2013).

Análises bioquímicas

As larvas foram retiradas do -80 e em cada eppendorf de 1,5 ml devidamente identificado havia grupos (pools) de 60 larvas dos quatro tratamentos utilizados no estudo, por controle negativo e concentrações, Foi adicionado, em cada eppendorf, 200µl de tampão fosfato de potássio e ácido etilenodiaminotetracético EDTA (0,1M), pH 7.4, procedendo a seguir a homogeneização de cada amostras com o homogenizador Dlab D -160. Após homogeneizados, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 12.000 rpm e a 4 °C. A seguir, o sobrenadante de cada amostra foi coletado, aliqotado e a armazenados a -80 °C até a realização das análises bioquímicas. De cada tubo e foi recolhido 200 µl de sobrenadante de cada concentração e controle. Os pellets depositados no fundo de cada tubo também foram armazenados a -80 °C para futuras análises.

Determinação da atividade da Catalase

Esta análise foi realizada segundo Hadwan & Abed (2016), que se baseia na reação do H₂O₂ com o molibdato de amônia, formando um produto de cor amarelada.

Na placa de 96 poços foi adicionado 100 µl de tampão fosfato de sódio e potássio pH 7.4, nos poços da curva padrão (exceto nos dois primeiros poços), do branco e dos testes controle. Depois, em cada poço, de acordo com o desenho do mapa da placa, foram adicionados 5 µl de cada homogenato.

Então pipetou-se 100 µl de H₂O₂ (20 mmol/ L) nos poços com amostra sem ser os de teste controle e esperou-se 3 minutos, enquanto isso foi feita a pipetagem da curva padrão com o H₂O₂. Foi colocado 100 µl nos dois primeiros poços e nos dois segundos da curva, com uma diluição seriada.

Foi colocado em todos os poços 150 µl de molibdato de amônia (32,4 mmol/L) e feita

a leitura da absorbância a 374 nm, em leitor de microplacas e expresso em kU/ mg de proteína. A análise foi realizada em triplicata para cada amostra.

Determinação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Foi determinada pelo método utilizado por Madesh & Balasubramanian (1998), que se baseia na capacidade da enzima em realizar a dismutação do radical superóxido, proveniente da auto-oxidação do pirogalol, em peróxido de hidrogênio.

Para tal, 30 µl do homogenato foi adicionado em cada poço da microplaca de 96 poços, nos poços do branco foi pipetado 45 µl de tampão fosfato de potássio, pH 7.0, já nos poços da curva padrão apenas 30 µl desta solução. E em todos os outros poços restantes foi adicionado 100 µl de tampão fosfato de potássio pH 8.0. A seguir, em cada poço foi adicionado 6 µl de brometo de 3-[4,5dimetiltiazol-2H]-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (1,25 mmol/ L). Por fim, foi pipetado 15 µl de solução de ácido pirogálico (100 µmol/ L) em todos os poços, exceto nos dois poços do branco.

A placa foi incubada a 37°C por 5 minutos, posterior a isso foi pipetado 150 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância foi medida a 570 nm, em leitor de microplacas. A análise foi realizada em duplicata. A atividade da SOD foi calculada como unidades por miligrama de proteína, com uma U de SOD definido como a quantidade que inibiu a taxa da auto-oxidação de 50% do pirogalol.

Determinação da atividade da Glutathione S-Transferase (GST)

A atividade da GST foi realizada pelo método utilizado por Habid, Pabst & Jacaby (1976), que se baseia na metabolização do 1-cloro-2,4-nitrobenzeno (CNDB) pela GST conjugado à glutathione reduzida (GSH), com aumento da absorbância. A atividade da GST foi avaliada em espectrofotômetro (IL- 226-NM) com absorbância de 340 nm. Para o branco, foi adicionado na cubeta de quartzo, seguindo esta ordem, 686 µL de tampão fosfato, pH 7.0, 7 µL de CNDB (0.1 mmol/L) e 7 µL de GSH (100 mmol/ L) (manuseada no gelo).

Para as amostras, foi adicionado na cubeta de quartzo, seguindo esta ordem, 679 µL de tampão fosfato, 7 µL de CNDB, 7 µL de GSH, todos nas mesmas concentrações descritas acima, bem como 7 µL de cada homogenato e a reação foi observada durante 90 s. Para

cálculo, foi feita a subtração do tempo 90s por 30s. Este ensaio foi realizado em triplicata e a atividade de GST expressa como mmol/ min/g de amostra.

Quantificação de proteínas totais

A determinação da concentração de proteínas totais presentes em cada homogenato foi realizada pelo teste de Bradford (1976). Para tal foi preparada uma curva padrão de 1,0 mg L⁻¹ de albumina em tampão fosfato de potássio pH 7.0, contendo 7 pontos. Em eppendorfs o homogenato foi diluído (20x), sendo pipetado 5 µl em 395 µl de tampão fosfato de potássio pH 7.0. Posterior a isso, foram pipetados desta diluição, 10 µl na placa de 96 poços e então adicionado, na ausência de luz, 200 µl da solução de Bradford, visto que a análise se baseia na reação deste reagente com as proteínas presentes. Após 5 minutos, a leitura foi realizada em leitor de microplacas a 595 nm, sendo cada amostra analisada em duplicata.

Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e o teste de Bartlett. Os dados paramétricos foram submetidos a ANOVA- ONE WAY seguido de teste Tukey com nível de significância de 5%. As análises estatísticas e plotagem dos gráficos foram executadas no software GraphPad (versão 8.01).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estresse oxidativo tem sido um importante biomarcador em estudos de ecotoxicologia aquática, ocorrendo quando a produção de ROS é superior a ação das enzimas envolvidas na defesa antioxidante (LIVINGSTONE, 2003; ADEYEMI, MARTINS-JUNIOR, BARBOSA, 2015).

Estudos anteriores mostraram que diferentes agrotóxicos, tais como inseticidas, herbicidas e fungicidas, têm a capacidade de alterar o status redox aceitando ou doando elétrons e podem elevar o nível de ROS ocasionando danos oxidativos em peixes (SLANINOVA et al., 2009; LUSHCHAK, 2011). Por isso, neste trabalho, utilizando o zebrafish como sistema modelo, foi avaliado se a exposição a concentrações de relevância ambiental de um HBM desregula a defesa antioxidante e causa estresse oxidativo em larvas e

embriões de zebrafish.

Após a exposição de um animal a um contaminante ambiental, com a entrada e metabolismo do mesmo em diferentes tipos celulares, são produzidos radicais livres como $O_2^{\cdot-}$ e HO e substratos enzimáticos como o H_2O_2 (SHARMA et al., 2004). As enzimas antioxidantes como SOD, CAT e GST exercem papel importante como mecanismo de defesa das células contra a síntese exacerbada de espécies reativas impedindo que ocorram danos, como por exemplo a oxidação das membrana plasmática da célula, como é refletido na peroxidação lipídica e conseqüente estresse oxidativo (BEZERRA et al.,2004).

As enzimas SOD e CAT fazem parte da primeira linha de defesa, inativando e eliminando algumas espécies reativas. A enzima SOD tem função de catalisar a reação de dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e oxigênio molecular (O_2). A CAT promove a degradação da molécula de H_2O_2 em água e oxigênio para desintoxicação e evitando a acumulação destas espécies reativas na célula (MAHARAJAN et al., 2018; BARBOSA et al., 2010). No presente estudo, no qual os espécimes foram expostos à diferentes concentrações de um HBM por 144 horas, a atividade das enzimas CAT e SOD apresentou redução significativa ($p < 0.05$) apenas para a maior concentração testada ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$), quando comparado ao grupo controle (Fig. 15 A, B).

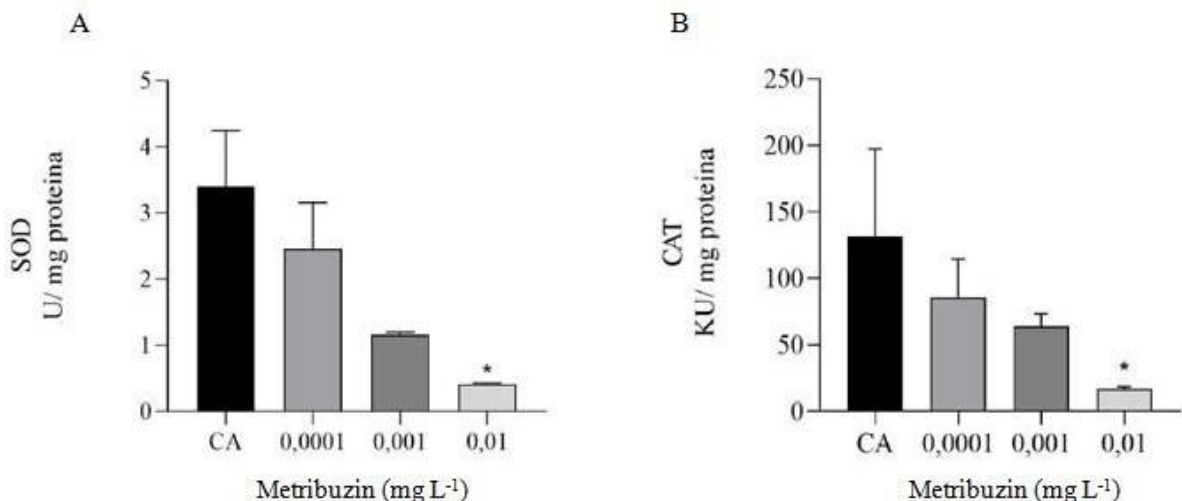


Figura 15. Estado redox de larvas de zebrafish (*Danio rerio*) expostas até 144 hpf a diferentes concentrações de Metribuzin ($0,0001$, $0,001$, $0,01 \text{ mg L}^{-1}$). No grupo controle (CA) foi usado água reconstituída. (A) Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD), (B) Atividade da enzima Catalase (CAT). *Os asteriscos representam diferença estatística das concentrações de metribuzin e o grupo controle, pela Anova- One Way seguido de teste Tukey ($p < 0,05$). Dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

A redução da atividade enzimática observada em nosso estudo aponta para ocorrência de um aumento das espécies reativas após a exposição ao agrotóxico, a qual pode ter sobrecarregado metabolicamente e interferido na produção de SOD e CAT, resultando assim na exaustão e depleção enzimática, com conseqüente comprometimento de suas funções (OLIVEIRA et al., 2017).

É sabido que quando a geração de radicais livres consegue ser mais rápida que a sua eliminação, as enzimas sofrem inativação e o estresse oxidativo continua a ocorrer no organismo (CONG et al., 2020). A redução de forma significativa das atividades de SOD e CAT pode ter induzido a uma maior geração de estresse oxidativo pela exposição ao HBM, reduzindo a capacidade de SOD em catalisar a dismutação do radical em H_2O_2 e da CAT em convertê-lo. Portanto há uma ineficiência dos organismos com relação a neutralizar as implicações dos peróxidos de hidrogênio (PIANCINI et al., 2015).

Em um estudo realizado por Blahová et al. (2013), foi verificado que a exposição de juvenis de zebrafish à concentrações subletais de 0,3, 3, 30 ou 90 $\mu g L^{-1}$ de Atrazina (a qual é uma triazina, mesmo grupo químico do herbicida metribuzin) por 28 dias, resultou na redução da atividades de SOD no grupo expostos a maior concentração de atrazina (90 $\mu g L^{-1}$). Neste mesmo estudo, já para a CAT, houve inibição de sua atividade em todos os grupos avaliados, levando os autores a concluir que a redução da atividade poderia ser o reflexo de uma ineficácia no sistema antioxidante dos peixes ocasionado pela atrazina (BLAHOVÁ et al., 2013).

O estudo de Maksymiv et al. (2015) também mostrou que a exposição do peixe dourado *Carassius auratus* ao herbicida Metribuzin - formulação Sencor 70 WG - nas concentrações de 7; 14; 35,7 e 71,4 $mg L^{-1}$ por 96 horas, promoveu uma diminuição na atividade de CAT para a maior concentração testada. Tal resultado aponta para estresse oxidativo, provavelmente causado por altas concentrações de H_2O_2 , resultando em um comprometimento na atividade da enzima.

Em consoante, os achados de Moura et al. (2017) mostraram que a exposição de embriões de zebrafish por 96 h ao herbicida triazínico Ametrina, nas concentrações de 0.004; 0.023; 0.190; 0.833; 5 e 10 $mg L^{-1}$, também resultou na inibição da CAT nas maiores concentrações (5 e 10 $mg L^{-1}$).

Ainda, em um estudo conduzido por Chang et al. (2020) em adultos (machos ou fêmeas) de zebrafish expostos a concentrações nominais do acaricida e inseticida etoxazol - do grupo químico grupo químico Difenil oxazolina - ($0,145 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,45 \text{ mg L}^{-1}$) por 15 dias, resultou na diminuição da atividade da SOD no fígado dos animais testados para a concentração mais alta, com mudança significativa em 8 e 15 dias.

No presente estudo a atividade da enzima GST apresentou uma redução significativa nas larvas de zebrafish para todas as concentrações testadas em comparação ao grupo controle, mostrando ainda, uma redução mais acentuada para a menor concentração ($0,0001 \text{ mg L}^{-1}$) (Figura 16 C). Tal dado evidencia que os mecanismos de ação das enzimas de primeira fase da defesa antioxidante não conseguiram reduzir a toxicidade do herbicida à base de metribuzin nas larvas de zebrafish, bem como sugere para a ocorrência de uma maior produção de ROS na concentração de $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$ de metribuzin.

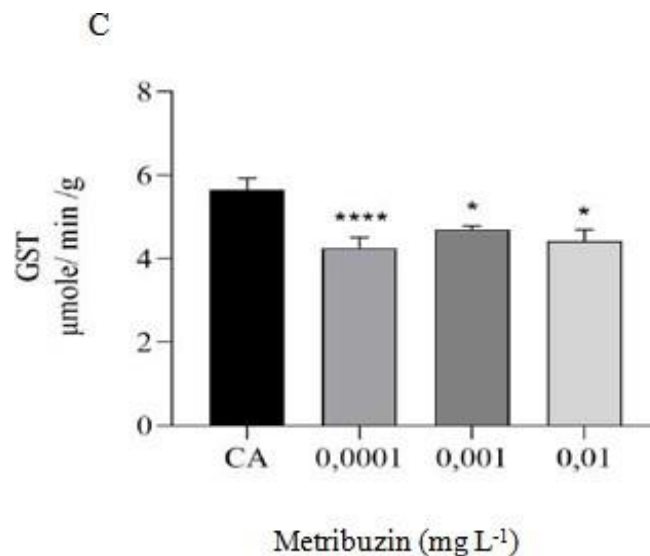


Figura 16. Estado redox de larvas de zebrafish (*Danio rerio*) expostas até 144 hpf a diferentes concentrações de Metribuzin ($0,0001$, $0,001$, $0,01 \text{ mg L}^{-1}$). No grupo controle (CA) foi usado água reconstituída. (C) Atividade da enzima Glutathione S-transferase (GST). *Os asteriscos representam diferença estatística das concentrações de Metribuzin e o grupo controle, pela Anova- One Way seguido de teste Tukey ($p < 0,05$). Dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

As GST's fazem parte das principais enzimas antioxidantes (YANG & LEE, 2015). Esta enzima desempenha um papel vital na fase II da biotransformação realizando a desintoxicação de xenobióticos, como herbicidas, tornando esses compostos químicos mais solúveis em água através da conjugação com a glutathione (GSH) e consequentemente

reduzindo a toxicidade dos mesmos e facilitando a sua eliminação pelas células (CATANEO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2017).

A atividade diminuída da enzima GST em resposta à exposição do herbicida verificada em nosso estudo, sugere um comprometimento do mecanismo de resposta antioxidante ao excesso de ROS, culminando na indução do estresse oxidativo. A depleção nos níveis de GST pode ser oriunda de sua forma oxidada, e esse aumento pode resultar na inativação oxidativa da glutathione redutase (LUSHCHAK, 2011).

Corroborando nossos dados, o estudo de Gaaied et al. (2019) desenvolvido em embriões e larvas de zebrafish expostos a concentrações subletais (0,02, 0,051, 0,128, 0,32, 0,8 mg L⁻¹) do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) por 96h, mostrou que a atividade da GST foi inibida nas concentrações a partir de 0,051 mg L⁻¹. Tal inibição é atribuída ao comprometimento da via GST, em resultado a um aumento significativo do estresse oxidativo.

Já no mesmo estudo de Blahová et al. (2013) descrito acima, também foi detectado que a exposição de juvenis de zebrafish a 90 µg L⁻¹ por 28 dias, diminuiu a atividade da GST. Sendo assim, a diminuição da atividade de GST, bem como dos níveis de GSH, pode ter causa na produção demasiada de ROS, ocorrendo depleção de GSH e inativando a GST.

Por outro lado, Hostovsky et al. (2012), observou que em embriões de carpa comum (*Cyprinus carpio*) expostos ao Metribuzin nas concentrações de 0,9, 4, 14 e 32 mg L⁻¹, por 30 dias que a atividade da GST estava aumentada na maior concentração, bem como a atividade da GR nas concentrações de 0,9, 4 e 14 mg L⁻¹.

É importante salientar que, os níveis da atividade da GST e outras enzimas antioxidantes podem diferenciar entre as espécies, estágio do desenvolvimento, tecidos e órgãos avaliados (BEAULIEU & COSTANTINI, 2014; CONSTANTINE 2019), além do tipo de xenobiótico, concentração/dose e tempo de exposição (HOSTOVSKY et al., 2012).

Assim, os resultados obtidos neste estudo reforçam que o HBM pode ter um efeito prejudicial ao meio ambiente afetando a saúde dos organismos aquáticos, como os peixes, expostos a este xenobiotico, diante da inibição da defesa antioxidante e aumento do estresse oxidativo, gerando dano celular. Bem como também é importante salientar o potencial risco a saúde humana diante da contaminação no consumo da água, alimentos ou intoxicações via pele, podendo comprometer o sistema endócrino e causar cânceres (SAMIR, OM SELMA,

ASMA, 2020).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos apontam que a exposição de embriões/larvas de zebrafish a concentrações de relevância ambiental do herbicida Metribuzin Sencor 480, por 144 hpf, perturba o equilíbrio redox e promove estresse oxidativo, visto que induziu reduções significativas nas atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT na concentração mais alta ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$) e GST em todas as concentrações testadas, alterações subletais que podem comprometer a homeostase animal.

Os herbicidas triazínicos são um grupo de agrotóxicos muito utilizado no Brasil e no mundo, porém seu impacto sobre a biota a nível de indivíduo, população, comunidade e ecossistemas ainda são incipientes, sendo necessário outros estudos que envolvam a avaliação de múltiplos biomarcadores, a nível celular, tecidual, fisiológico e comportamental, dentre outros.

7 REFERÊNCIAS

ADEYEMI, Joseph A.; MARTINS-JUNIOR, Airton da Cunha; BARBOSA, Fernando. Teratogenicity, genotoxicity and oxidative stress in zebrafish embryos (*Danio rerio*) co-exposed to arsenic and atrazine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 172-173, p. 7-12, jun. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.04.001>. Acesso em: 04.dez.2022.

ALVES, Lazaro Quintino; FRANCO, Petrus Narciso; ZANETTI, Willian Aparecido L.; CÉSAR, Bruno. Performance of sugarcane culture production in the main producing states. *Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas*, v. 15, n. 2, p. 303-317, out. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.18011/bioeng2021v15n2p303-317>. Acesso em: 04.dez.2022.

ALVES, Andreia C. Fonseca; SAIKI, Patrícia T. Onofri; BRITO, Rafaella da Silva; SCALIZE, Paulo Sérgio; ROCHA, Thiago Lopes. How much are metals for next-generation clean technologies harmful to aquatic animal health? A study with cobalt and nickel effects in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Hazardous Materials Advances*, p. 100160, set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2022.100160>. Acesso em: 04.dez.2022.

ARAÚJO, Amanda P. da Costa; LUZ, Thiarlen Marinho da; ROCHA, Thiago; AHMED, Mohamed A. Ibrahim; SILVA, Daniela de Melo e; MALAFAIA, Guilherme. Toxicity Evaluation of the Combination of Emerging Pollutants with Microplastics in Zebrafish: Perspective Study of Genotoxicity, Mutagenicity and Redox Unbalance. *SSRN Electronic Journal*, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.2139/ssrn.3990787>. Acesso em: 15.dez.2022.

ATLI, Gülüzar; ALPTEKIN, Özlem; TÜKEL, Seyhan; CANLI, Mustafa. Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 143, n. 2, p. 218-224, jun. 2006b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.02.003>. Acesso em: 20.nov.2022.

ATEŞ, Perihan Seda; ÜNAL, İsmail; ÜSTÜNDAĞ, Ünsal Veli; ALTURFAN, Ahmet Ata; YİĞİTBAŞI, Türkan; EMEKLI-ALTURFAN, Ebru. Methylparaben induces malformations and alterations on apoptosis, oxidant-antioxidant status, cnd1 and myca expressions in zebrafish embryos. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 32(3), e22036. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jbt.22036>. Acesso em: 20.nov.2022.

BARBOSA, Kiriaque.B.F; COSTA, Neuza. M.B; ALFENAS, Rita de.C.G; DE PAULA, Sérgio.O; MINIM, Valéria .P.R; BRESSAN, Josefina. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, ago. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1415-52732010000400013>. Acesso em: 11.nov.2022.

BARBOSA, Marta Ribeiro; SILVA, Marina Medeiros de A.; WILLADINO, Lilia; ULISSES, Claudia; CAMARA, Terezinha Rangel. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, mar. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0103-84782014000300011>. Acesso em: 8 mar. 2023.

BARTOSZ, Grzegorz. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers. **Biochemical Pharmacology**. 77 1303– 1315, 2009.

BEZERRA, Francisco.J.L; REZENDE, Adriana.A; RODRIGUES, Sara J.; ALMEIDA, Maria das Graças. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico como indicador da peroxidação lipídica em ratos tratados com sevoflurano. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 5, p. 640-649, out. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0034-70942004000500004>. Acesso em: 11.nov.2022.

BEAULIEU M.; COSTANTINI D. Biomarkers of oxidative status: missing tools in conservation physiology. **Conservation physiology**, 2(1), cou014. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/conphys/cou014>. Acesso em: 11.nov.2022.

BRADFORD, Marion.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n. 1-2, p.248-254, 1976. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3). Acesso em: 11.nov.2022.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - **ANVISA**. Uso agrícola para metribuzin, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/m-n-o/4425json-file-1> . Acesso em: 20.set.2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Agrofit**: sistema de agrotóxicos fitossanitário. Brasília, DF, 2018. Disponível em: <<https://bit.ly/2cQGd6g>>. Acesso em: 20.set.2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. Agrotóxicos na ótica do Sistema Único de Saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. – Brasília: **Ministério da Saúde**, 1. ed, 2018. Acesso em: 20/09/2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - **MAPA**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - **ANVISA**. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - **IBAMA**. Classificação do potencial de periculosidade ambiental. 222. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/avaliacao-ambiental>>. classificação em: <Planilha para classificação do Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA)>. Acesso em: 22.set.2022.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ano 139, n. 5, p. 1-12, jan. 2002.

BLAHOVÁ, Jana; PLHALOVÁ, Lucie ; HOSTOVSKÝ, Martin ; DIVIŠOVÁ, Lenka; DOBŠÍKOVÁ, Radka; MIKULÍKOVÁ, Ivana; ŠTĚPÁNOVÁ, Stanislava; SVOBODOVÁ, Zdeňka. Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 61, p. 82-85, nov. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.041>. Acesso em: 6. jan. 2023.

BURIGO, André. **Impacto dos Agrotóxicos na alimentação, saúde e meio ambiente**. 2016. Disponível em: <<http://www.mobilizadores.org.br/wp-content/uploads/2016/08/CartilhaAgrotoxicos-final.pdf>>. Acesso em: 03.dez 2022.

BOMANN, Werner; TINWELL, Helen; JENKINSON, Peter; KLUXEN, Felix M. Metribuzin-induced non-adverse liver changes result in rodent-specific non-adverse thyroid effects via uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase (UDPGT, UGT) modulation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 122, p. 104884, jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.104884>. Acesso em: 6 jan. 2023.

CARVALHO, Leonardo Blanco de. **Herbicidas**. 1.ed, Lages, SC, p.62, 2013.

CARLETTI, Monica; CANTIELLO, Michela; GIANTIN, Mery; NEBBIA, Carlo;

CANNIZZO, Tiziana. F; BOLLO, Enrico; DACASTO, Mauro. Serum antioxidant enzyme activities and oxidative stress parameters as possible biomarkers of exposure in veal calves illegally treated with dexamethasone. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 2, p. 277-283, mar. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.09.001>. Acesso em: 6 jan. 2023.

CATANEO, Ana. C.; DÉSTRO, Guilherme. F. G; FERREIRA, Leonardo. C.; CHAMMA, K. L.; SOUSA, D. C F. Atividade de glutatona S-transferase na degradação do herbicida glyphosate em plantas de milho (*Zea mays*). **Planta Daninha**, v. 21, n. 2, p. 307-312, ago. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-83582003000200017>. Acesso em: 6 jan. 2023.

CATONI, Carlo; PETERS, Anne; SCHAEFER, H.M. Life history trade-offs are influenced by the diversity, availability and interactions of dietary antioxidants. **Animal Behaviour**, v. 76, n. 4, p. 1107-1119, out. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2008.05.027>. Acesso em: 22 jan. 2023.

CHANG, Weixia; NIE, Jiyun; GENG, Yue; ZHANG, Danyang; WANG, Qi; FAROOQ, Saqib. Etoxazole stereoselective determination, bioaccumulation, and resulting oxidative stress in *Danio rerio* (zebrafish). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 192, p. 110287, abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110287>. Acesso em: 6 jan. 2023.

CONG, Bailin; LIU, Cong ; WANG, Lujie ; CHAI, Yingmei. The Impact on Antioxidant Enzyme Activity and Related Gene Expression Following Adult Zebrafish (*Danio rerio*) Exposure to Dimethyl Phthalate. **Animals : an open access journal from MDPI**, 10(4), 717. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani10040717>. Acesso em: 02 dez. 2022.

COHEN, Alan. A; MCGRAW, Kevin. J; WIERSMA, Popko; WILLIAMS, Joseph. B; ROBINSON, Douglas. W; ROBINSON, Tara. R ; BRAWN, Jeffrey. D; RICKLEFS, Robert. E. Interspecific Associations between Circulating Antioxidant Levels and Life-History Variation in Birds. **The American Naturalist**, v. 172, n. 2, p. 178-193, ago. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/589456>. Acesso em: 19 nov. 2022.

CORREIA, Núbia Maria; CARBONARI, Caio Antônio; VELINI, Edivaldo Domingues. Detection of herbicides in water bodies of the Samambaia River sub-basin in the Federal District and eastern Goiás. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 55, n. 6, p. 574-582, 19 mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03601234.2020.1742000>. Acesso em: 14 fev. 2023.

COSTANTINI, David. Redox physiology in animal function: The struggle of living in an oxidant environment. **Current Zoology**, v. 56, n. 6, p. 687-702, 1 dez. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/czoolo/56.6.687>. Acesso em: 02 dez. 2022.

COSTANTINI, David; VERHULST, Simon. Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress? **Functional Ecology**, v. 23, n. 3, p. 506-509, jun. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2009.01546.x>. Acesso em: 02 dez. 2022.

COSTANTINI, D. Understanding diversity in oxidative status and oxidative stress: the opportunities and challenges ahead. **The Journal of experimental biology**, 222(Pt 13), 2019. Disponível em: jeb194688. <https://doi.org/10.1242/jeb.194688>. Acesso em: 22 jan. 2023.

CORREIA, Núbia Maria; ARCOS, Matías González; FONSECA, Maria Esther de N.; BOITEUX, Leonardo Silva. Tolerância diferencial de genótipos de tomate ao herbicida metribuzin. Boletim de pesquisa e desenvolvimento 165, Brasília, DF: **Embrapa Hortaliças**, p. 20 : il. color, 2018. ISSN 1677-2229.

DAMMSKI, Ana Paula; MULLER, Bruno.Roberto; GAYA, Carolina; REGONATO, Daiane. Zebrafish - Manual de Criação em Biotério. Curitiba, **UFPR- Universidade Federal do Paraná**. 1. ed, 2011.

DELANCEY, John Oliver L; ALAVANJA, Michael C R; BLAIR, Joseph; COBLE, Aaron; HOPPIN, Jane A.; AUSTIN, Harland D.; FREEMAN, Laura E. Beane. Occupational Exposure to Metribuzin and the Incidence of Cancer in the Agricultural Health Study. **Annals of Epidemiology**, v. 19, n. 6, p. 388-395, jun. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2008.12.018>. Acesso em: 30 jan. 2023.

DORES, Eliana F G C; NAVICKIENE, Sandro; CUNHA, Marcelo L F; CARBO, Leandro; RIBEIRO, Maria Lúcia; DE-LAMONICA-FREIRE, Ermelinda M. Multiresidue determination of herbicides in environmental waters from Primavera do Leste Region (Middle West of Brazil) by SPE-GC-NPD. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 5, p. 866-873, out. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0103-50532006000500008>. Acesso em: 03. nov.2022.

DRÖGE, Wulf. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 1 jan. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>. Acesso em: 03. nov.2022.

FAO. **Food And Agriculture Organization Of The United Nations**. Consumo de inseticidas, fungicidas, herbicidas. 2021. Disponível em: < <https://www.fao.org/faostat/en/#home> >, acesso em: 20.set.2022.

FAO. **Food And Agriculture Organization Of The United Nations**. FAOSTAT - Estatística. Pesticides Use. 2020. Disponível em: < <https://www.fao.org/faostat/en/?#data/RP/visualize> > ,

acesso em: 14.nov.2022.

GAAIED, Sonia; OLIVEIRA, Miguel; BIHANIC, Florane Le; CACHOT, Jérôme; BANNI, Mohamed. Gene expression patterns and related enzymatic activities of detoxification and oxidative stress systems in zebrafish larvae exposed to the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide. **Chemosphere**, v. 224, p. 289-297, jun. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.125>. Acesso em: 6 jan. 2023.

GONÇALVES, Felipe Augusto.R; MELO, Christiane Augusta D.; QUEIROZ, Paulo César de; ENDO, Ricardo Tsuyoshi; SILVA, Daniel Valadão da; REIS, Marcelo Rodrigues dos. Atividade residual de herbicidas nas culturas do milho e da soja. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 61, n 7, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.22491/rca.2018.2570>. Acesso em: 6 dez. 2022.

GUTTERIDGE, John; HALLIWELL, Barry. *Free Radicals in Biology and Medicine*. [S. l.]: **Oxford University Press**, USA, 2007. 704 p. ISBN 9780198568698.

HADWAN, Mahmoud Hussein; ABED, Hussein Najm. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. **Data in Brief**, v. 6, p. 194-199, mar. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.12.012>. Acesso em: 6 dez. 2022.

HABIG, William H.; PABST, Michael J.; JAKOBY, William B. Glutathione S-transferase AA from rat liver. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 175, n. 2, p. 710-716, ago. 1976. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(76\)90563-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(76)90563-4). Acesso em: 10 dez. 2022.

HOSTOVSKY, Martin; BLAHOVA, Jana. A; PLHALOVA, Lucie ; STEPANOVA, Stanislava; PRASKOVA, Eva; MARSALEK, Petr; SVOBODOVA, Zdenka. Oxidative stress parameters in early developmental stages of common carp (*Cyprinus carpio L.*) after subchronic exposure to terbuthylazine and metribuzin. **Neuroendocrinology Letters**; 33(Supp.3):124–129, 2012. Acesso em: 08 nov. 2022.

HOWE, Kerstin; CLARK, Matthew D.; TORROJA, Carlos F.; TORRANCE, James; BERTHELOT, Camille et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 17 abr. 2013. Disponível em:

<https://doi.org/10.1038/nature12111>. Acesso em: 30 jan. 2023.

HUBER, Paula C.; ALMEIDA, Wanda P.; FÁTIMA, Ângelo de. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-40422008000500046>. Acesso em: 24 out. 2022.

HUSAK, Viktor V. ; MOSIICHUKA, Nadia M. ; MAKSYMIVA, Ivan V.; STOREYC, Janet M. ; STOREYC, Kenneth B.; LUSHCHAKA, Volodymyr I. Oxidative stress responses in gills of goldfish, *Carassius auratus* , exposed to the metribuzin-containing herbicide Sencor. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 163-169, jul. 2016b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.05.028>. Acesso em: 24 out. 2022.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos>>. Dados extraídos da <lista de Perfis ambientais elaborados pelo Ibama>. Acesso em: 22.set.2022.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Perfil ambiental metribuzin**, Decreto nº 4.074/02 de 04/01/2002. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/phocadownload/agrotoxicos/perfis-ambientais/2020/2020-12-03-Ibama-Perfil-Ambiental-Metribuzin>>. Acesso em: 22.set.2022.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatório de comercialização de agrotóxicos**, Decreto nº 4.074/02 de 04/01/2002. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>>. Acesso em: 14. nov.2022.

ISO. International Organization for Standardization. Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. **ISO 7346-3: Flow-through method**. 1996. Disponível em: <<http://www.iso.org>>. Acesso em: 08. out.2022.

KOEHLER, Angela; ALPERMANNA, Tilmann; LAURITZENA, Bjarne; CORNELIS, J.F. Van Noordenb. Clonal xenobiotic resistance during pollution-induced toxic injury and hepatocellular carcinogenesis in liver of female flounder (*Platichthys flesus* (L.)). **Acta Histochemica**, v. 106, n. 2, p. 155-170, maio 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2004.02.002>. 14. dez.2022.

KROON, Frederieke; STRETEN, Claire; HARRIES, Simon. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. *PLOS ONE*, v. 12, n. 4, p. e0174762, abr. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174762>. 14. dez.2022.

LANDAR, A; ZMIJEWSKI, J. W; WATANABE, N; DICKINSON, D. A; NOGUCHI, N; DARLEY-USMAR, V. M. Cell signalling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochemical Society Transactions*, v. 33, n. 6, p. 1385, dez. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bst20051385>. 19. nov.2022.

LAKRA, Wazir S.; NAGPURE, Naresh S. Genotoxicological studies in fishes: A review. *Indian journal of animal sciences* January, Vol.79 No.1 pp.93-97, Jan. 2009. 79(1):93-98. Acesso em: 07 jan. 2023.

LIVINGSTONE, D.R. Estresse oxidativo em organismos aquáticos em relação à poluição e aquicultura. *Revue Med. Veterinario*. 154, 427e430. 2003. Acesso em: 07 jan. 2023.

LORENZI, Harri. Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional. **Nova Odessa**: Instituto Plantarum, 6. ed, p. 384, 2006.

LUSHCHAK, Volodymyr I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, v. 101, n. 1, p. 13-30, jan. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>. Acesso em: 29 dez. 2022.

MADESH, M, BALASUBRAMANIAN, K.A. Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*;35(3):184-188. 1998. PMID: 9803669.

MANCUSO, Mauricio A. Cuzato; NEGRISOLI, Eduardo; PERIM, Lucas. Efeito residual de herbicidas no solo (“Carryover”). *Revista Brasileira de Herbicidas*, v. 10, n. 2, p. 151, ago. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.7824/rbh.v10i2.106>. Acesso em: 29 dez. 2022.

MARCHI, Giuliano; MARCHI, Edilene C. S.; GUIMARÃES, Tadeu G. Herbicidas: mecanismos de ação e uso. Documentos 227, **Embrapa**, Cerrados Planaltina - DF. p. 36, 2008. ISSN 1517-5111.

MARGIS, Rogerio; DUNAND, Christophe;. TEIXEIRA, Felipe. K; MARGIS-PINHEIRO, Marcia. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS Journal*, v. 275, n. 15, p. 3959-3970, jul. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1742->

4658.2008.06542.x. Acesso em: 12 dez. 2022.

MASSARSKY, Andrey; KOZAL, Jordan S.; DI GIULIO, Richard T. Glutathione and zebrafish: Old assays to address a current issue. **Chemosphere**, v. 168, p. 707-715, fev. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.004>. Acesso em: 29 out. 2022.

MAHARAJAN, Kannan; MUTHULAKSHMI, Sellamani; NATARAJ, Bojan; RAMESH, Mathan; KADIRVELU, Krishna. Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study. **Aquatic Toxicology**, v. 196, p. 132-145, mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.010>. Acesso em: 2 fev. 2023.

MAKSYMIV, Ivan V.; HUSAK, Viktor V.; MOSIICHUK, Nadia M.; MATVIISHYN, Tetiana M.; SLUCHYK, Iryna Y.; STOREY, Janet M; STOREY, Kenneth B.; LUSHCHAK, Volodymyr I. Hepatotoxicity of herbicide Sencor in goldfish may result from induction of mild oxidative stress. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 122, p. 67-75, jul. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.12.020>. Acesso em: 6 jan. 2023.

MOURA, Monica A M; OLIVEIRA, Rhaul; JONSSON, Claudio M.; DOMINGUES, Inês; SOARES, Amadeu M V M; NOGUEIRA, António J A. The sugarcane herbicide ametryn induces oxidative stress and developmental abnormalities in zebrafish embryos. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 14, p. 13416-13425, jul. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9614-0>. Acesso em: 6 jan. 2023.

OECD. Test No. 236: FishEmbryoAcuteToxicity (FET) Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, **OECD Publishing**, n. July, p. 1–22, 2013.

OLIVEIRA, Jerusa. M; BRINATI, Alessandro; MIRANDA, Liany. D. L; MORAIS, Danielle B; ZANUNCIO, José C; GONÇALVES, Reggiani V; PELUZIO, Maria do. C. G.; FREITAS, Mariella B. Exposure to the insecticide endosulfan induces liver morphology alterations and oxidative stress in fruit-eating bats (*Artibeus lituratus*). **International journal of experimental pathology**, 98(1), 17–25. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/iep.12223>. Acesso em: 5 nov. 2022.

OTT, Martin; GOGVADZE, Vladimir; ORRENIUS, Sten; ZHIVOTOVSKY, Boris. Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis**, v. 12, n. 5, p. 913-922, fev. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0756-2>. Acesso em: 8 jan. 2023.

ORUÇ, Elif Özcan; USTA, Demet. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. **Environmental Toxicology and**

Pharmacology, v. 23, n. 1, p. 48-55, jan. 2007. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.06.005>. Acesso em: 5 nov. 2022.

PLHALOVA, Lucie; STEPANOVA, Stanislava; PRASKOVA, Eva; CHROMCOVA, Lucie; ZELNICKOVA, Lenka; DIVISOVA, Lenka; SKORIC, Misa; PISTEKOVA, Vladimira; BEDANOVA, Iveta; SVOBODOVA, Zdenka. The Effects of Subchronic Exposure to Metribuzin on *Danio rerio*. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-6, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1100/2012/728189>. Acesso em: 5 nov. 2022.

PIANCINI, L. D S; GUILOSKI, I. C.; DE ASSIS, H. C Silva; CESTARI, M. M. Mesotrione herbicide promotes biochemical changes and DNA damage in two fish species. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 1157-1163, 2015. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.08.007>. Acesso em: 6 jan. 2023.

PORTO, Viviane Amaral; JÚNIOR, Edmilson Rodrigues da Rocha; URSULINO, Jeferson Santana; PORTO, Ricardo Silva; SILVA, Marciliano da; JESUS, Lázaro Wender Oliveira de; OLIVEIRA, Jerusa Maria de; CRISPIM, Alexandre Carmo; SANTOS, Josué Carinhanha Caldas; AQUINO, Thiago Mendonça de. NMR-based metabolomics applied to ecotoxicology with zebrafish (*Danio rerio*) as a prominent model for metabolic profiling and biomarker discovery: Overviewing the most recent approaches. **Science of The Total Environment**, v. 868, p. 161737, abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161737>. Acesso em: 28 jan. 2023.

PORTER, W. P.; GREEN, M.; DEBBINK, N. L.; CARLSON, I.. Groundwater pesticides: Interactive effects of low concentrations of carbamates aldicarb and methomyl and the triazine metribuzin on thyroxine and somatotropin levels in white rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 40, n. 1, p. 15-34, set. 1993b. Disponível em:
<https://doi.org/10.1080/15287399309531773>. Acesso em: 30 jan. 2023.

RESENDE, Rodrigo .R; SOCCOL, Carlos. R. Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações. **Blucher**, Coleção Biotecnologia Aplicada à Saúde, vol. 1, São Paulo, 2015.

ROMAN, Erivelton Scherer; VARGAS, Leandro; RIZZARD, Mauro Antoni; HALL, Linda; BECKIE, Hug; WOLF, Thomas M. Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação. **Gráfica Editora Berthier**. 1 .ed, Passo Fundo, 2005, CDD 632.5, 2.

RODRIGUES, Elsa T. ; ALPENDURADA, Maria Fátima; GUIMARÃES, Ana; AVÓ, Romeu; FERREIRA, Bárbara; PARDAL , Miguel A. The environmental condition of an estuarine ecosystem disturbed by pesticides. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 23, p. 24075-24087, 21 jun. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05751-5>. Acesso em: 14 fev. 2023.

RODRIGUES, Benedito. N.; ALMEIDA, Fernando. S. Guia de herbicidas. **IAPAR**, 6 .ed, Londrina, p. 697, 2011.

ROBINSON, Darren E. Atrazine Accentuates Carryover Injury from Mesotrione in Vegetable Crops. **Weed Technology**, v. 22, n. 4, p. 641-645, dez. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1614/wt-08-055.1>. Acesso em: 29 nov. 2022.

RICO, Andreu ; ARENAS-SÁNCHEZ, Alba; ALONSO-ALONSO ,Covadonga; LÓPEZ-HERAS, Isabel; NOZAL, Leonor ; RIVAS-TABARES, David; VIGHI, Marco. Identification of contaminants of concern in the upper Tagus river basin (central Spain). Part 1: Screening, quantitative analysis and comparison of sampling methods. **Science of The Total Environment**, v. 666, p. 1058-1070, maio 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.250>. Acesso em: 14 fev. 2023.

SAMIR, Derouiche; OM SELMA, Rezzag Mohcem; ASMA, Serouti. The Effect of Herbicide Metribuzin on Environment and Human: A Systematic Review. **Pharmaceutical and Biosciences Journal**, v. 8, n. 4, p. 10, 1 jul. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.20510/ukjpb/8/i4/1593522789>. Acesso em: 14 fev. 2023.

SANFORD, M.; PROSSER, R. S. High-Frequency Sampling of Small Streams in the Agroecosystems of Southwestern Ontario, Canada, to Characterize Pesticide Exposure and Associated Risk to Aquatic Life. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 39, n. 12, p. 2570-2587, 10 nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/etc.4884>. Acesso em: 14 fev. 2023.

SEMREN, Tanja Živković; ŽUNEC, Suzana; PIZENT, Alica. Oxidative stress in triazine pesticide toxicity: a review of the main biomarker findings. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 69, n. 2, p. 109-125, jun. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3118>. Acesso em: 30 out. 2022.

SENCOR 480. Formulação do herbicida a base de Metribuzin Sencor 480.
BULA_03.05.2022, **Agro Bayer do Brasil**.

SLAINOVA, Andrea ; SMUTNA, Miriam; MODRA, Helena; SVOBODOVA, Zdenka. A review: Oxidative stress in fish induced by pesticides. **Neuroendocrinology Letters** Vol. 30 Supl. 1, 2009. Disponível em: <http://node.nel.edu>. Acesso em: 30 out. 2022.

SILVEIRA, Themis Reverbel da; SCHNEIDER, Ana Claudia; HAMMES, Thais Ortiz. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2, p. 4-5, jun. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.21800/s0009-67252012000200002>. Acesso em: 13 jan. 2023.

SOLÉ Montserrat; ANTÓ, Meritxell; BAENA, Miguel; CARRASSON, Maite; CARTES, Joan E.; MAYNOU, Francesc. Hepatic biomarkers of xenobiotic metabolism in eighteen marine fish from NW Mediterranean shelf and slope waters in relation to some of their biological and ecological variables. **Marine Environmental Research**, v. 70, n. 2, p. 181-188, ago. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2010.04.008>.

SUN, Xiaoyin; LIU, Fei; SHAN, Ruifeng; FAN, Yuna. Spatiotemporal distributions of Cu, Zn, metribuzin, atrazine, and their transformation products in the surface water of a small plain stream in eastern China. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 191, n. 7, 13 jun. 2019b. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7556-3>. Acesso em: 14 fev. 2023.

SHARMA, Rajendra; YANG, Yusong; SHARMA, Abha; AWASTHI, Sanjay; AWASTHI, Yogesh C. Antioxidant Role of GlutathioneS-Transferases: Protection Against Oxidant Toxicity and Regulation of Stress-Mediated Apoptosis. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 6, n. 2, p. 289-300, abr. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/152308604322899350>. Acesso em: 5 nov. 2022.

SKULACHEV, Vladimir P. Mitochondria-Targeted Antioxidants as Promising Drugs for Treatment of Age-Related Brain Diseases. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 28, n. 2, p. 283-289, jan. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/jad-2011-111391>. Acesso em: 8

jan. 2023.

TESOLIN, Gabrielli.A.S; MARSON, Marina.M; JONSSON, Claudio.M; NOGUEIRA, António.J.A; FRANCO, Daniel .A.S; ALMEIDA, Sydnei.D.B; MATALLO, Marcus.B; MOURA, Monica.A.M. Avaliação da toxicidade de herbicidas usados em cana-de-açúcar para o Paulistinha (*Danio rerio*). **O Mundo da Saúde**, p. 86-97, 31 mar. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.15343/0104-7809.20143801086097>. Acesso em: 15 nov. 2022.

TIMME-LARAGY, Alicia R.; HAHN, Mark E.; HANSEN, Jason M.; RASTOGI, Archit; ROY, Monika A. Redox stress and signaling during vertebrate embryonic development: Regulation and responses. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 80, p. 17-28, ago. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.09.019>. Acesso em: 15 nov. 2022.

TOMASZEWSKI, J.; ZWIERZ, K.; MNICH, Z.; JEZYNA, C. Carbohydrate, protein and glycoprotein metabolism by the guinea-pig liver in chronic metribuzin poisoning. **Acta biologica Hungarica**, 36(1), 15–23. 1985.

VALKO, Marian; MORRIS, H.; CRONIN, M. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 1161-1208, maio 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>. Acesso em: 15 nov. 2022.

VALAVANIDIS, Athanasios; VLAHOIANNI, Thomais; DASSENAKIS, Manos; SCOULLOS, Michael. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n. 2, p. 178-189, jun. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>. Acesso em: 20 nov. 2022.

VALADAS, Jéssica; MOCELIN, Ricieli; SACHETT, Adrieli; MARCON, Matheus; ZANETTE, Régis A.; DALLEGRAVE, Eliane; HERRMANN, Ana P.; PIATO, Ângelo. Propiconazole induces abnormal behavior and oxidative stress in zebrafish. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 27, p. 27808-27815, jul. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05977-3>. Acesso em: 17 set. 2022.

VALKO, Marian; MORRIS, H.; CRONIN, M. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 1161-1208, 1 maio 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>. Acesso em: 20 nov. 2022.

VASYLKIV, Olena Yu; KUBRAK, Olga I.; STOREY, Kenneth B.; LUSHCHAK, Volodymyr I. Catalase activity as a potential vital biomarker of fish intoxication by the herbicide aminotriazole. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 101, n. 1, p. 1-5, set. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.05.005>. Acesso em: 15 nov. 2022.

VELISEK, Josef; SVOBODOVA, ZVeronika; PIACKOVA, L. Novotny ; Blahova, J; SUDOVA, Eliska. Effects of metribuzin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Veterinární Medicína**, v. 53, No. 6, p. 324-332, jun. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.17221/1857-vetmed>. Acesso em: 19 dez. 2022.

VELISEK, Josef; SVOBODOVA, Z; PIACKOVA, Veronika; SUDOVA, Eliska. Effects of Acute Exposure to Metribuzin on Some Hematological, Biochemical and Histopathological Parameters of Common Carp (*Cyprinus carpio L.*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n. 4, p. 492-495, jan. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9648-1>. Acesso em: 19 dez. 2022.

WALPERES, Kellem Camila; REIS, Marcelo R. dos; CARNEIRO, Gabriella D. O. Pessoa; ROCHA, Bruno Henrique; DIAS, Roque De Carvalho; MELO, Christiane A. Diniz; GONÇALVES, Clebson Gomes. Residual de metribuzin no solo sobre o crescimento do alho, cebola e feijão. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 14, n. 1, p. 64, mar. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.7824/rbh.v14i1.390>. Acesso em: 15 nov. 2022.

WANG, Yao; XU, Li; LI, Dongzhi; TENG, Miaomiao; ZHANG, Renke; ZHOU, Zhiqiang; ZHU, Wentao. Enantioselective bioaccumulation of hexaconazole and its toxic effects in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 138, p. 798-805, nov. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.015>. Acesso em: 7 jan. 2023.

XU, Zhaopeng; NI, Huiwen; HUANG, Yong; MENG, Yunlong; CAO, Zigang; LIAO, Xinjun; ZHANG, Shouhua; GUO, Xinchun; HUIQIANG. Effect of fomesafen on the embryonic

development of zebrafish. **Chemosphere**, v. 259, p. 127380, nov 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127380>. Acesso em: 19 out. 2022.

XING, Zisheng; CHOW, Lien; COOK, Art; BENOY, Glenn ; REES, Herb; ERNST, Bill; MENG, Fanrui; LI, Sheng; ZHA, Tianshan; MURPHY, Clair; BATCHELOR, Suzanne; HEWITT, L. Mark. Pesticide Application and Detection in Variable Agricultural Intensity Watersheds and Their River Systems in the Maritime Region of Canada. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 63, n. 4, p. 471-483, 19 ago. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9789-9>. Acesso em: 14 fev. 2023.

YANG, Hee-Young; LEE, Tae-Hoon. Antioxidant enzymes as redox-based biomarkers: a brief review. **BMB Reports**, v. 48, n. 4, p. 200-208, abr. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2015.48.4.274>. Acesso em: 7 jan. 2023.

YELDANDI, Anjana V.; RAO, M. Sambasiva; REDDY, Janardan K. Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 448, n. 2, p. 159-177, mar. 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(99\)00234-1](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(99)00234-1). Acesso em: 2 nov. 2022.

ZHU, Lizhen; MU, Xiyan; WANG, Kai; CHAI, Tingting; YANG, Yang; QIU, Lihong; WANG, Chengju . Cyhalofop-butyl has the potential to induce developmental toxicity, oxidative stress and apoptosis in early life stage of zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Pollution**, v. 203, p. 40-49, ago. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.044>. Acesso em: 19 out. 2022.

ZHANG, Hao; ZHANG, Yubin; HOU, Zhiguang; WU, Xian; GAO, Henan; SUN, Fengjie; PAN, Hongyu. Biodegradation of triazine herbicide metribuzin by the strain *Bacillus* N1. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 49, n. 2, p. 79-86, dez. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03601234.2014.844610>. Acesso em: 19 dez. 2022.