



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ZOOTECNIA**



**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO DE METRIBUZIN EM CURIMATÃ-
PACU (*Prochilodus argenteus*)**

**Gabriela Santos Lima
Zootecnista**

RIO LARGO – ALAGOAS – BRASIL

2018

GABRIELA SANTOS LIMA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO DE METRIBUZIN EM CURIMATÃ-
PACU (*Prochilodus argenteus*)**

Dissertação apresentada ao **Programa de Pós Graduação em Zootecnia (Área de Concentração: Nutrição de Não-Ruminantes)**, da Universidade Federal de Alagoas como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de **mestra em Produção Animal**.

Orientador: Prof^o. Dr. Emerson Carlos Soares e Silva.

Co-Orientadores: Prof^a. Dr^a. Sônia Salgueiro Machado.

Prof^o. Dr. Elton Lima Santos.

RIO LARGO – ALAGOAS – BRASIL

2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Bibliotecário Responsável: Marcelino de Carvalho

L732a Lima, Gabriela Santos.
 Avaliação do potencial toxicológico de metribuzin em Curimatã-pacu
 (*Prochilodus argenteus*) / Gabriela Santos Lima. – 2019.
 59 f. : il. color.

Orientador: Emerson Carlos Soares e Silva.
Co-orientador: Elton Lima Santos.
Co-orientadora: Sônia Salgueiro Machado.
Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de
Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2018.

Bibliografia: f. 55-59.

1. Metribuzin (Herbicida). 2. *Prochilodus argenteus*. 3. Biomarcadores
ambientais. 4. Toxicologia. 5. Piscicultura. I. Título.

CDU: 639.313:661.162.2

TERMO DE APROVAÇÃO

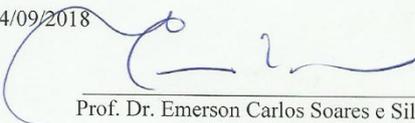
GABRIELA SANTOS LIMA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO DE METRIBUZIN EM CURIMATÁ- PACU (*PROCHILODUS ARGENTEUS*)

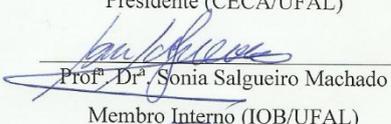
Esta dissertação foi submetida a julgamento como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Zootecnia, outorgado pela Universidade Federal de Alagoas.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Aprovado em 14/09/2018



Prof. Dr. Emerson Carlos Soares e Silva
Presidente (CECA/UFAL)

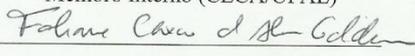


Prof.ª Dr.ª Sonia Salgueiro Machado
Membro Interno (IQB/UFAL)



Prof. Dr. Elton Lima Santos

Membro Interno (CECA/UFAL)



Prof.ª Dr.ª Fabiane Caxico de Abreu Galdino

Membro Externo (UFAL)

Rio Largo – AL

2018

À

Minha riqueza que excede o valor de rubis;
Meu porto seguro em momentos de tempestades;
Meu sorriso mais sincero;
Meu motivador de lutas diárias;
Minha herança divina;
Meu amor profundo;
Meu companheiro;
Meu mundo todo azul;
Pessoa que enxuga minhas lágrimas.

À João Henrique, meu filho, por ele e para ele eu ...

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

À **DEUS** por sua misericórdia (Êxodo 34:6-7), graça imerecida (Efésios 2:8-9), provisão (Jó 10:12), enfim por ser DEUS da minha vida;

Ao meu esposo **PEDRO HENRIQUE**, por ser um dos maiores incentivadores para que eu trilhasse essa jornada, por seu apoio em momentos que eu pensava em desistir, por ouvir minhas reclamações e todas as histórias sobre o mestrado, por me fazer sorrir quando eu estava muito triste, pela preocupação comigo, por ser sempre disposto a me ajudar independente para o que fosse, pelo seu carinho e companheirismo;

Ao meu filho **JOÃO HENRIQUE**, por ser benção de DEUS na minha vida, por ser tão doce e amoroso mesmo quando eu menos merecia;

À minha mãe **RAI LIMA**, por ser meu exemplo de mulher batalhadora, por estar sempre disposta a me ajudar, por lutar por mim e comigo, por ter muitas vezes desistido dos seus sonhos para dar andamento aos meus, por chorar minhas lágrimas e sorrir meus sorrisos;

Ao pai que Deus me deu **SERGIO VALENTIM**, pelo dom imenso de servir, por correr atrás dos meus objetivos comigo, por ter sempre palavras de afago a me dizer;

Às minhas irmãs **SAMARA e SILVIA**, por estarem sempre comigo me ajudando em tudo que eu pedia, por serem “tias/mães” do meu pequeno João, por serem paz de DEUS na minha vida;

Aos meus PADRINHOS, **IVONETE e JOÃO BATISTA** que são sem sombra de dúvida meus segundos pais, exemplos de vida para mim, sempre me dão grandes ensinamentos, estão longe, mas mesmo assim me sinto abraçada e amada quando falo com eles;

Às minhas AVÓS, **JANDIRA** (in memoriam) por ter sido a matriarca dessa família, que com pulso e garra criou a todos, hoje descansa na eternidade, mas sou grata a DEUS pela vida dela, e a vovó **JOSEFA**, seu nome para mim remete mel, alguém doce, amável, que muito me instruiu na vida, tão sábia e tão essencial para mim;

Às minhas TIAS, a tia de longe (**JIVALDA**) que sempre fez questão de mesmo longe mostrar que está comigo e que me ama muito, a tia de perto (**NIVALDA**) que não poupou esforços para me ajudar;

Aos meus TIOS, **NIVALDO, JINALDO, AMILTON, CARLOS** são homens de honra que zelam por mim, meus rapazes amados e suas digníssimas esposas;

Aos meus TIOS em especial, **GENIVALDO** e **JACY** que sempre cuidaram de mim como uma filha e tem uma preocupação imensa comigo, são os “vovôs malôbos” de João;

À minha COMADRE/PRIMA, **LUARA** que me fortalece, me aconselha e que faz dela as minhas vitórias;

Aos demais **PRIMOS e PRIMAS**, que são de suma importância para mim;

À minha SOGRA **M^a. LUIZA**, por sua ajuda;

Ao meu ORIENTADOR, **Dr^o EMERSON CARLOS** por seus grandes ensinamentos, por suas broncas quando necessário, por amar a pesquisa científica e estimular as pessoas a amarem também;

Ao meu CO-ORIENTADOR, **Dr^o ELTON LIMA** por sempre impulsionar seus alunos a serem pessoas e pesquisadores melhores, por não poupar esforços para ver essa pesquisa concluída e por sempre ter um sorriso amigo para me oferecer;

À minha CO-ORIENTADORA, **Dr^a SÔNIA MACHADO** por sua dedicação pela pesquisa, por ser uma professora amorosa e gentil comigo, por me incentivar a não desistir, pelos seus ensinamentos e por sua doce voz a me corrigir;

Aos professores Dr^s que enriqueceram a pesquisa com suas sugestões e críticas construtivas, **LÁZARO DE JESUS** (ICBS) e **FABIANE CAXICO** (IQB);

À todos que fazem parte da família LAQUA, em especial as **PROF.^{as} Dr.^{as} THEMIS DE JESUS, GERUSA OLIVEIRA e MISLENI RICARTE** por todo apoio que me foi concedido, as **AMIGAS DE LABORATÓRIO, VIVIAN VASCONCELOS e MARIZA MARQUES**, por suas palavras e modo de viver que me inspiraram a ser alguém melhor e saber encarar as dificuldades da vida acadêmica;

À todos que fazem parte da família LBE, em especial ao **MSC. FÁBIO FRANCISCO** pela sua rica amizade e total ajuda, **MSC. CLAUDIANNE MARINHO** por sua amizade, imensa ajuda tanto na área espiritual quanto na pesquisa em si, pelos seus conselhos, ensinamentos, pelas risadas e também pelas broncas, aos meus meninos de bancada **ÁVARO JOSÉ** e **WANDERSON MELO** pela ajuda e disposição, a **MSC. MILENA MELO, LUAN BATALHA, IAGO GABRIEL, KALINE TOLEDO, MARCOS MATIAS** pela amizade e companhia;

Ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia (**PPGZ**), coordenadores, funcionários, professores, enfim, a todos do programa que fizeram parte da realização deste sonho;

À **CAPES/ FAPEAL** por ser o(s) órgão(s) o qual me deu apoio financeiro e fomentou minha pesquisa.

À vocês, eu AGRADEÇO!

RESUMO

O uso indiscriminado de pesticidas, em atividades agrícolas ou em outras, causa vários efeitos prejudiciais em organismos aquáticos ou no homem, que os consome. Metribuzin é um herbicida do grupo químico das triazinonas, muito utilizado nas culturas de batata, café e cana-de-açúcar, com ampla utilização no Brasil. Visto que algumas plantações se localizam nas margens de corpos d'água, há uma facilidade de contaminação destes locais, onde está presente organismos aquáticos sensíveis a estes contaminantes. Como é o caso do Curimatã – Pacu (*P. argenteus*) um peixe endêmico do rio São Francisco, reofílico, de suma importância para pesca artesanal e mercadológica das regiões que margeiam o rio. O objetivo deste estudo foi determinar a concentração letal e avaliar o efeito sob a atividade de acetilcolinesterase (AChE) e catalase (CAT) do herbicida metribuzin, com diferentes concentrações e período de exposição, em tecidos de Curimatã-pacu (*P. argenteus*). A concentração de metribuzin responsável por 50% da letalidade em juvenis de *P. argenteus* foi de $149.3 \pm 3.1 \text{ mg L}^{-1}$ durante 48h de exposição. Na maior concentração sub-letal de metribuzin (aproximadamente 112 mg L^{-1}), a atividade das enzimas quantificadas apresentou diferença significativa em todos os períodos de exposição (24 e 96h) ao metribuzin, com porcentagens de inibição de 50.35 e 34.9 % para AChE cerebral, já a atividade de AChE muscular, teve inibição de 61.9 e 74.2 %, respectivamente, para a maior concentração, para CAT hepática, 43.2 e 62.1% respectivamente nos períodos de 24 e 96h. Estes resultados apresentaram que o herbicida foi tóxico para o *P. argenteus*, sugerindo que esta espécie pode ser usada como espécie sentinela de ambientes contaminados com herbicida e as enzimas AChE e CAT podem ser usadas como espécie sentinela de exposição eficazes ao metribuzin.

Palavras-chave: Metribuzin. *Prochilodus argenteus*. Biomarcadores enzimáticos.

ABSTRACT

The indiscriminate use of pesticides in agricultural or other activities causes several harmful effects on aquatic organisms or on the man who consumes them. Metribuzin is a herbicide of the chemical group of triazinones, widely used in potato, coffee and sugarcane crops, widely used in Brazil. Since some plantations are located on the banks of bodies of water, there is an easiness of contamination of these places, where aquatic organisms sensitive to these contaminants are present. As is the case of Curimatã - Pacu (*P. argenteus*), an endemic fish of the São Francisco river, rephilic, of great importance for artisanal and mercadological fishing of the regions bordering the river. The objective of this study was to determine the lethal concentration and to evaluate the effect on the activity of acetylcholinesterase (AChE) and catalase (CAT) of metribuzin herbicide, with different concentrations and period of exposure, in Curimatã-pacu (*P. argenteus*) tissues. The concentration of metribuzin responsible for 50% of lethality in juveniles of *P. argenteus* was $149.3 \pm 3.1 \text{ mg L}^{-1}$ for 48h of exposure. At the highest sub-lethal concentration of metribuzin (approximately 112 mg L^{-1}), the activity of quantified enzymes showed a significant difference in all exposure periods (24 and 96h) to metribuzin, with inhibition percentages of 50.35 and 34.9% for AChE the activity of muscle AChE had inhibition of 61.9 and 74.2%, respectively, for the highest concentration, for hepatic CAT, 43.2 and 62.1% respectively in the periods of 24 and 96h. These results showed that the herbicide was toxic to *P. argenteus*, suggesting that this species can be used as a sentinel species from environments contaminated with herbicide and AChE and CAT enzymes can be used as an effective exposure sentinel species to metribuzin.

Keywords : Metribuzin. *Prochilodus argenteus*. Enzymatic biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ranking dos países com maior produção aquícola em 2012.....	16
Figura 2. Curimatã Pacu (<i>Prochilodus argenteus</i>) Spix e Agassiz 1829.....	19
Figura 3 - Composição das capturas de pescado em Penedo/AL, 2009.....	20
Figura 4 - Balanço do resultado de incidência de agrotóxicos em alimentos realizado pela ANVISA.....	22
Figura 5 - Fórmula estrutural do Metribuzin.....	23
Figura 6 - Ilustração das rotas de entrada dos pesticidas no meio aquático por aplicação direta ou por mobilização a partir do seu uso na agropecuária.....	25
Figura 7 - Reação de hidrólise da Ach.....	29
Figura 8 - Sinapse colinérgica na ausência e na presença de um IACHe.....	30
Figura 9 - As principais espécies reativas de oxigênio.....	31
Figura 10 - Biometria de exemplares de Curimatã Pacu, para experimento de toxicidade aguda.....	35
Figura 11 - Biometria de exemplares de Curimatã Pacu, para experimento de toxicidade aguda.....	36
Figura 12 - Órgãos coletados para análises.....	38
Figura 13 - Procedimento de preparo de homogenato de células cerebral.....	39
Figura 14 - Mortalidade dos animais expostos às distintas concentrações de Metribuzin.....	42
Figura 15 - Atividade específica de acetilcolinesterase cerebral exposto ao Metribuzin nos períodos de 24 e 96h.....	44
Figura 16 - Atividade específica de acetilcolinesterase muscular exposto ao Metribuzin nos períodos de 24 e 96h.....	45
Figura 17- Atividade específica da catalase hepática exposto ao Metribuzin nos períodos de 24 e 96h.....	47
Figura 18 - Concentração proteica do tecido hepático, cerebral e muscular de <i>Prochilodus argenteus</i> exposto ao Metribuzin nos períodos de 24 e 96h.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção aquícola brasileira em toneladas (t) em 2013.....	17
Tabela 2 - Sistema de classificação de pesticidas no solo, potencial de lixiviação de pesticidas (PLP).....	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABNT/ NBR	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABRASCO	Associação Brasileira de Saúde Coletiva
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCh	Acetiltiocolina
BCh	Butirilcolina
BTCh	Butiriltiocolina
BuChE	Butirilcolinesterase
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de Ética em Uso de Animais
ChE	Colinesterase
CL	Concentração letal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)
ERO'S	Espécies Reativas de oxigênio
IACHe	Inibidores de Acetilcolinesterase
MS	Metano Sulfonato
OMS	Organização Mundial Saúde
ONU	Organizações Nações Unidas
PLP	Potencial de lixiviação de pesticidas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Aquicultura no Brasil e no Mundo	16
2.1.1 Piscicultura	17
2.1.2 Peixes como biomarcadores de qualidade ambiental	18
2.1.3 A espécie curimatã pacu (<i>Prochilodus argenteus</i>)	19
2.2 Herbicidas	21
2.2.1 Metribuzin	22
2.2.2 Contaminação no ambiente aquático	24
2.3 Ecotoxicologia e uso de biomarcadores como ferramenta na piscicultura	26
2.3.1 Biomarcadores	27
2.3.1.1 Acetilcolinesterase	28
2.3.1.2 Catalase	30
3.OBJETIVOS	32
3.1 Geral	32
3.2 Específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Caracterização do local e experimental	33
4.2 Local de origem da espécie curimatã pacu.....	33
4.3 Delineamento experimental I	34
4.4 Teste de toxicidade aguda	35
4.5 Delineamento experimental II	36
4.6 Teste de toxicidade sub-crônica	37
4.7 Preparação extrato do cérebro	38
4.8 Determinação atividade de AChE.....	39
4.9 Determinação atividade de CAT	40
4.10 Quantificação teor proteico	41
4.11 Análise estatística	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Toxicidade aguda	42
5.2 Toxicidade sub-crônica	43

6. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

Os pesticidas são produtos químicos utilizados para proteger algumas culturas de pragas e doenças. O uso de pesticidas tem ajudado muito a aumentar e melhorar a produção mundial de alimentos. Contudo, os resíduos destes pesticidas podem causar um impacto adverso sobre organismos não-alvo, entre eles água, biota e seres humanos.

Os resíduos de pesticidas podem entrar no ambiente como resultado de pulverização, vaporização, escoamento superficial, atos ilícitos, derramamentos e descargas de drenagem e através de lixiviação ou poeira do solo. Os efeitos nocivos ou indesejados que podem decorrer da aplicação ou utilização de pesticidas vão desde a morte de organismos não-alvos como peixes, a contaminação das águas superficiais e subterrâneas.

Os seres humanos podem ser expostos a resíduos de pesticidas por meio de água contaminada e por ingestão de animais não-alvos contaminados. Os pesticidas podem persistir no ambiente por um longo período, pois são bio-acumulativos e tóxicos. Grande parte dos pesticidas afetam diretamente na homeostase animal, interferindo na cadeia trófica natural.

Frizando esse ponto há necessidade de avaliar o risco destes tóxicos tanto ao meio ambiente, quanto ao ecossistema, utiliza-se espécies sentinelas que são sensíveis a determinados pesticidas, onde com a exposição do mesmo ao meio contaminado, sua resposta, traz para a ciência fatores de risco e possíveis soluções.

Biomarcadores enzimáticos são os mais utilizados no mundo para indicar a condição do animal frente à contaminação, órgãos são coletados e análises são feitas, posterior a isso diante do exposto na bibliografia sabe-se o potencial toxicológico e até o fator de risco de cada contaminante.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

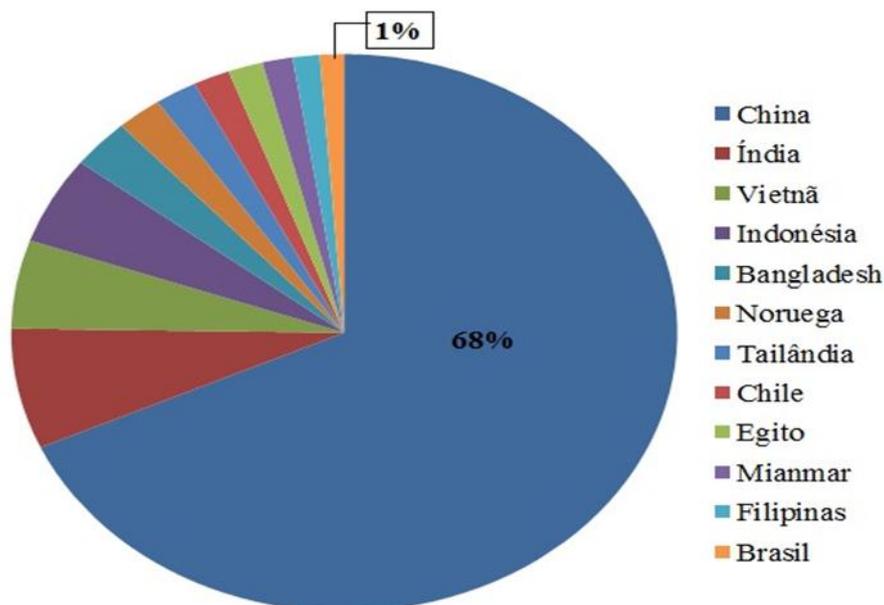
2.1 Aquicultura no Brasil e no Mundo

Sabe-se que o pescado é fonte de proteína de alto valor biológico, vitaminas, ácidos graxos insaturados, apresenta baixo teor de colesterol, dando ao consumidor uma opção mais saudável em relação às demais carnes (GONÇALVES, 2011).

Em 2016, o mesmo demonstra que em 2016 a produção global aquícola (incluindo plantas aquáticas) foi de 110,2 milhões de toneladas, estimando-se um valor comercial de primeira venda em 243.500 milhões de dólares. Mais uma vez, o grupo mais produzido foi o de peixes com 54,1 milhões de toneladas, seguido de algas, com 30,1 milhões de toneladas, moluscos com 17,1 milhões de toneladas e crustáceos com 7,9 milhões de toneladas produzidas (FAO, 2018).

Os países ilustrados na Figura 1 indicam a produção aquícola mundial em 2016, onde a China e o Brasil são responsáveis por 68% e 1% de toda a produção, respectivamente.

Figura 1 - Ranking dos países com maior produção aquícola em 2016.



Fonte: Adaptado de FAO, 2018.

Segundo os dados oficiais do Ministério da Pesca e Aquicultura, a produção brasileira de pescado em 2013 foi de 1.241.807 toneladas, sendo que 61,6% foram de origem da pesca e 38,4% de origem da aquicultura (MPA/IBGE, 2016). A **Tabela 1** mostra a produção brasileira de pescado via aquicultura em 2013.

Tabela 1 - Produção aquícola brasileira em toneladas (t) em 2013.

REGIÃO	PRODUÇÃO (t)
Nordeste	140.748
Sul	107.448
Sudeste	50.297
Centro-oeste	105.010
Norte	73.009
Total	476.512

Fonte: MPA/IBGE ,2016

2.1.1 Piscicultura

A Organização das Nações Unidas (ONU) considera a pesca e a aquicultura como atividades estratégicas para a segurança alimentar sustentável do planeta, onde são capazes de ofertar alimento proteico de boa qualidade (ARANA, 2007).

A piscicultura brasileira é representada em 83% pelas tilápias e pelo grupo dos peixes redondos, em que se incluem o tambaqui, tambacu, pacu e tambatinga. Somente as tilápias contribuem com 47% da produção nacional. Atualmente, as carpas ocupam a 4ª posição no ranking de produção e a tendência é que outras espécies aumentem a produção (IBGE, 2015).

O sistema de criação de peixes em tanques-rede é uma categoria de criação intensiva, onde se utiliza uma alta densidade de estocagem e, conseqüentemente, requer constante renovação de água para a dispersão dos resíduos metabólicos dos peixes no meio ambiente. Sampaio (2005) relata que os principais parâmetros para manter os peixes saudáveis são: temperatura, oxigênio, pH, transparência e etc.

2.1.2 Peixes como espécie sentinela de qualidade ambiental

Espécie sentinela são organismos vivos que identificam alterações ambientais, geralmente causadas por ações antropogênicas como poluição orgânica, assoreamento, construção de barragens, pesca predatória, entre outras (AGOSTINHO et al. 2005).

Entre as principais espécies aquáticas utilizadas como bioindicadores, os peixes são amplamente representados, pois são bem disseminados no território brasileiro com 1.297 espécies de peixes marinhos (MENEZES et al., 2003) e 3000 espécies de peixes de água doce (MARTINS; BIANCHINI, 2011).

Os peixes são os organismos mais viáveis para controle de poluição nos sistemas aquáticos e são importantes veículos para transferência de contaminantes a população humana e podem indicar uma exposição potencial aos poluentes (AL-SABTI E METCALFE, 1995). A comunidade de peixes inclui uma variedade de espécies e níveis tróficos que seguramente pode ter reflexo no grau de distúrbio ambiental.

Os peixes são sensíveis à presença de xenobióticos (toxinas ambientais) e apresentam, como resposta, mudanças em nível celular e tecidual, fato que pode ocorrer até mesmo antes de uma mudança comportamental. Estudos toxicológicos são utilizados para identificar, letalidade, mutagênese, carcinogênese e efeitos fisiológicos diversos (BAUDO, 1987).

Outra característica de suma importância nesses estudos, diz respeito à origem das espécies. Ou seja, busca-se estudar o impacto de xenobióticos em animais que fazem parte do agrossistema em questão, naturalmente (LACHER e GOLDSTEIN, 1997).

2.1.3 A Espécie Curimatã-Pacu (*Prochilodus argenteus*)

O peixe Curimatã-Pacu (**Figura 2**) foi descrito por SPIX e AGASSIZ no ano de 1829 e desde então ficou conhecido entre a população como Xira. Segundo Nelson (2006), a taxonomia da espécie é:

Classe Actinopterygii;

Ordem Characiformes;

Família Prochilodontidae;

Gênero Prochilodus;

Figura 2 - A espécie Curimatã Pacu (*Prochilodus argenteus*) SPIX e AGASSIZ, 1829



Fonte: O AUTOR, 2017.

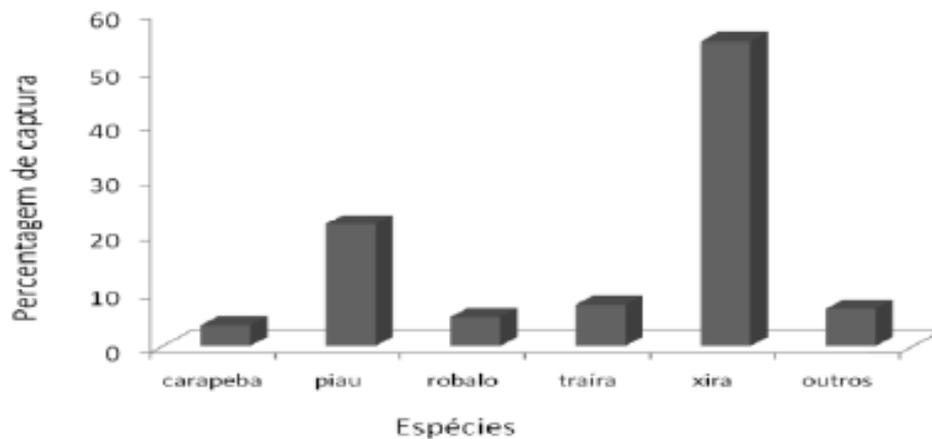
O Curimatã é uma espécie endêmica do Rio São Francisco, tem grande importância na pesca artesanal continental brasileira e na década de 1980, chegou a representar 20% de todo o pescado capturado nas águas interiores do Brasil.

A ordem Characiforme pode ser distinguida das demais por causa da existência de escamas revestindo todo o corpo, exceto a cabeça; por apresentar pré-maxilar fixo ao crânio, ou seja, não protátil, nadadeira pélvica em posição abdominal e uma nadadeira sem raios localizada entre a dorsal e a caudal (nadadeira adiposa).

A família Prochilodontidae ingere sedimentos dos fundos dos rios (iliófagos), apresentando lábios espessos e protáteis, onde se localizam vários denticulos, dispostos em duas fileiras na frente das maxilas e numa fileira lateralmente. Um espinho procumbente precede a nadadeira dorsal (BRITSKI et al., 1986).

Pesquisas feitas no Baixo São Francisco detectou que a curimatã pacu é responsável por 40% do total da biomassa de capturas nas micro regiões de Penedo, Igreja nova e Piaçabuçu, conforme ilustra a **figura 3** (SOARES, 2009).

Figura 3 - Composição das capturas de pescado desembarcadas no município de Penedo/AL, no ano de 2009.



Fonte: SOARES, 2009

No ano de 2014 a produção do curimatã pacu em todo Brasil chegou a 2.403.129 kg, com percentual de 0,5% de toda produção de peixe contabilizada naquele ano. Neste mesmo ano o estado de Alagoas ficou na posição de 13º colocado com uma produção de 7 toneladas, incluindo também as curimatãs (Modificado IBGE, 2014).

Reprodutivamente é uma espécie reofílica, ou seja, conhecida como peixe que faz piracema ou migração. Esse ato de fazer piracema ou migrar é necessário para sua maturação sexual, uma vez que seus hormônios sexuais precisam de estímulos e isso acontece quando ele nada de águas lânticas (sem movimento) para lóaticas (com movimento). Esses peixes em alguns casos percorrem trajetos de vários quilômetros até as áreas de reprodução, desovando em águas abertas (ARAÚJO, 1998).

O período reprodutivo ocorre no período de chuvas mais intensas, o período de desova ocorre de dezembro a março, em condições normais, podendo ocorrer variações de acordo com as condições climáticas. As fêmeas desovam uma vez por ano, podendo produzir de 200 mil a 2 milhões de ovos, a depender do tamanho das

mesmas. A primeira maturação sexual pode ocorrer a partir de 200 g de peso corpóreo, na época das chuvas.

2.2 Herbicidas

A agricultura é praticada pela humanidade há mais de 10 mil anos e o uso intensivo de agrotóxicos iniciou após a segunda guerra mundial, onde as indústrias químicas fabricantes de venenos usados como armas químicas ganharam grandes impulsos. O uso de herbicidas tem sido método de controle para erva daninha mais utilizado na agricultura, especialmente os mais tecnificados (MELO *et al.*, 2010).

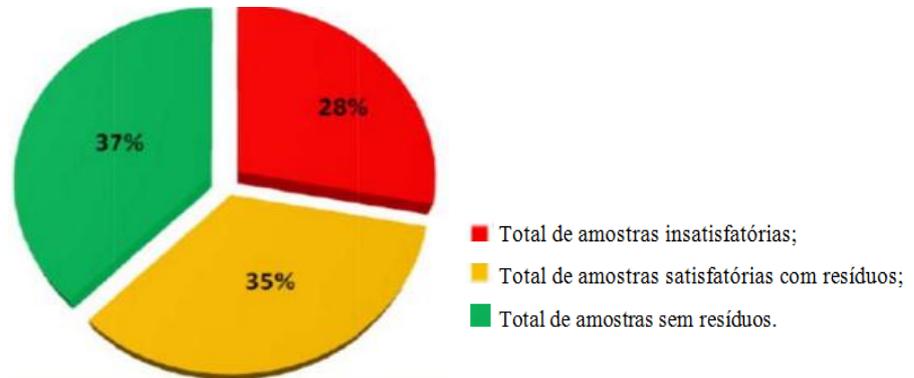
Alguns destes herbicidas têm um efeito residual no solo, ou seja, permanecem ativos no solo permitindo o controle de ervas daninhas por um período de tempo mais longo (Melo *et al.*, 2010). No entanto, o resíduo de herbicidas no solo pode aumentar o risco de contaminação de águas superficiais e subterrâneas (MARCHESAN *et al.*, 2010, Otto *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2015), além de causar intoxicação das culturas cultivadas (Artuzi e Contiero, 2006; Dan *et al.*, 2010; Mancuso *et al.*, 2011).

Os herbicidas podem ser classificados de diversas maneiras, de acordo com as características de cada um. Essas características individuais permitem estabelecer grupos afins de herbicidas com base em sua seletividade, época de aplicação, translocação, estrutura química e mecanismo de ação (WELLER, 2003).

Segundo o dossiê da Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO) “dos 50 agrotóxicos mais utilizados nas lavouras de nosso país, 22 são proibidos na União Europeia” (CARNEIRO *et al.*, 2012), tornando o Brasil, o maior consumidor de agrotóxicos já banidos no exterior.

Vale ressaltar também a preocupação de órgãos como a ANVISA (Agência de Vigilância Sanitária) a quantidade de produto químico que fica em forma de resíduos em alimentos e na água. A **Figura 4** ilustra melhor esse fator preocupante.

Figura 4 - Balanço do resultado de incidência de agrotóxicos em alimentos realizados pela ANVISA



Fonte: ANVISA, 2010.

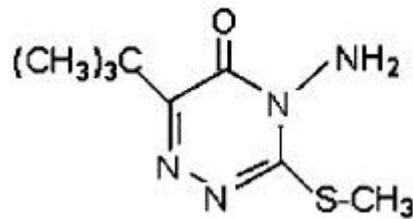
Na última década houve um aumento de 190% no mercado interno do uso de pesticidas, fazendo do país um recorde mundial no consumo desses produtos. Esses contaminantes causam vários malefícios à biota aquática e conseqüentemente aos seres humanos quando utilizam destes como alimentos (SINDAG, 2009)..

De modo geral, a poluição ambiental provocada pelo o uso de pesticidas, principalmente nos ecossistemas aquáticos tem sido registrada em todo o mundo e representa um grande problema, tanto a nível local quanto global (CEREJEIRA *et al.*, 2003; SPALDING *et al.*, 2003).

2.2.1 Metribuzin

O herbicida metribuzin [4-amino-6-tert-butil-3-metiltio-1,2,4-triazina-5-(4H)-ona], com fórmula estrutural assimétrico apresentado na Figura 5, é do grupo químico das triazinonas. No Brasil, o metribuzin está registrado para controle de plantas daninhas mono e dicotiledôneas, sendo aplicado em pré e pós-emergência das plantas daninhas das culturas de cana-de-açúcar, batata, tomate, entre outras (RODRIGUES e ALMEIDA, 2005).

Figura 5 - Fórmula estrutural do Metribuzin.



Fonte: UNDABEYTIA et al., 2010

O Metribuzin age como um inibidor da fotossíntese por interferência do transporte de elétrons no fotossistema-II, resultando na destruição da clorofila e morte celular da planta (DELORENZO *et. al.*, 2001; STEPANOV *et al.*, 2012). O metribuzin é moderadamente adsorvido em solos com alto teor de matéria orgânica e/ou argila. Quando aplicado na superfície de solo seco e permanece por sete dias, é desativado por fotodegradação (SILVA, 1989).

Metribuzin é um ingrediente ativo de muitos herbicidas que são usados em todo o mundo, como Lexone, Artist, Sencor, Sencorex e Shotput. Na cultura de soja, esse ingrediente ativo é usado com outros herbicidas, especialmente com trifluralina e metolacoloro (DAS *et. al.*, 2000).

O uso intensivo de herbicidas contendo metribuzin na agro-cultura, bem como a alta solubilidade em água ($1,22 \text{ mg.L}^{-1}$) e meia-vida de 30 dias desse ingrediente ativo, resultam na presença de quantidades significativas desses herbicidas no solo e em águas (PAULI *et al.*, 1990; WAUCHOPE *et al.*, 1992). O metribuzin é um dos pesticidas mais lixiviado no solo, conforme descrito na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Sistema de Classificação de Pesticidas. Potencial de Lixiviação de Pesticidas (PLP).

PESTICIDA	PLP
Lactofen	22
Metolacoloro	55
Metribuzin	44
Pendimentalina	29
Setoxidina	24
Trifluralina	28

Fonte: KOVACH et al., 1994.

Em estudos recentes lidando com a disponibilidade de herbicida em águas superficiais, o metribuzin foi detectado (em quantidades vestigiais) no Brasil (DORES *et al.*, 2006), no Canadá (XING *et al.*, 2012) e na República (PLHALOVA *et al.*, 2012).

Embora benéfico para a agricultura devido à melhoria da produção das colheitas, o uso descontrolado de herbicidas do grupo das triazinonas que tem persistência em águas superficiais e subterrâneas podem afetar organismos não alvos, como os peixes (MALOSCHIK *et al.*, 2007), macrófitas de água doce, algas, invertebrados e outros vertebrados (FAIRCHILD E SAPPINGTON, 2002; QUEDNOW E PÜTTMANN, 2007).

2.2.2 Contaminação em ambientes aquáticos

Cada região determina a dinâmica dos produtos utilizados, e na maioria das vezes, o destino final dos compostos é o recurso hídrico (ARIAS *et al.*, 2007). Os ambientes aquáticos tem sido os depósitos de diferentes tipos de descargas antropogênicas, no caso de escoamento provenientes de lavouras, onde foram aplicados pesticidas.

Resultando num sério problema de envenenamento, para peixes e outras formas de vida aquática causando efeitos ambientais em longo prazo, além de comprometer a saúde da população local (MARTINS; BIANCHINI, 2011.)

Dependendo das características físico-químicas, esses resíduos de agrotóxicos tanto podem se ligar ao material particulado em suspensão, como se depositar no sedimento do fundo ou ser absorvido por organismos vivos (VAN DER OOST, 2003).

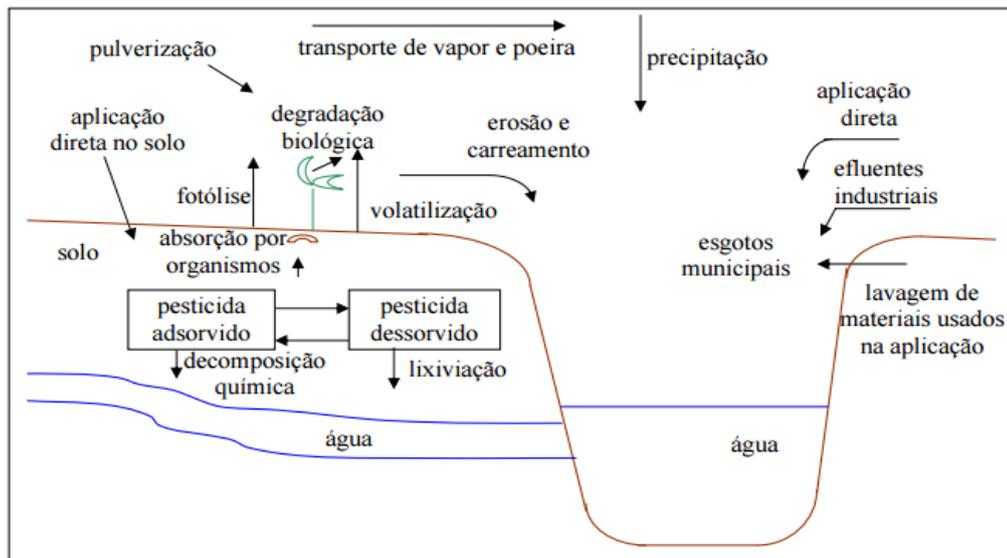
A contaminação de ambientes aquáticos por agrotóxicos pode não ser percebida pelo fato de muitos desses compostos permanecerem em níveis subletais no ambiente aquático por períodos curtos e por serem pouco estudados por não causarem morte imediata nos peixes (FANTA, 2003).

No entanto, a contaminação subletal pode alterar significativamente vários processos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos ao penetrarem nos órgãos dos organismos aquáticos (SANCHO, 1992; LINS, 2010).

Contaminantes como os pesticidas podem entrar no ambiente aquático através de diversos caminhos, tendo como fontes principais o uso na agropecuária, esgoto industrial e municipal e no controle de ervas aquáticas e insetos. Conforme ilustrado

na **Figura 6**, enquanto o esgoto envolve aplicação direta no meio aquático, os pesticidas usados na agropecuária geralmente seguem rotas indiretas.

Figura 6 - Ilustra as rotas de entrada de pesticidas no meio aquático por aplicação direta ou por mobilização a partir de seu uso na agropecuária.



Fonte: Modificado de SOLOMON, 1992.

A pluviosidade do local é um fator determinante, pois as chuvas são responsáveis por carrear o produto nos sentidos vertical e horizontal do solo, em direção a reservatórios ou rios. A precipitação também condensa moléculas de herbicidas suspensas no ar retornando-as para o solo ou depositando-as em lagos (GOOLSBY et al. 1997).

No Brasil, a expansão agrícola foi caracterizada por falta de planejamento e consequente destruição dos recursos naturais. Como resultado dessa expansão, somente na última década houve um aumento de 190% no mercado interno de pesticidas, fazendo do Brasil um recorde mundial no consumo desses produtos (SINDAG, 2009).

Os agroquímicos, contaminantes aquáticos de alto grau, provocam diversos malefícios aos organismos aquáticos e consequentemente aos seres humanos ao utilizarem estes como alimentos. Poluição ambiental causada por pesticidas, especialmente nos ecossistemas aquáticos tem sido documentada em todo o mundo e representa um grande problema, tanto em escala local como global (CEREJEIRA et al. 2003; SPALDING et al. 2003).

2.3 Ecotoxicologia e o uso de biomarcadores como ferramentas na piscicultura

Ecotoxicologia pode ser definida como a junção das ciências de ecologia e toxicidade. Ecologia é o estudo da interação dos seres vivos entre si e com o meio ambiente em que vivem; toxicologia é uma ciência que procura entender os tipos de efeitos causados por substâncias químicas, bioquímicas e os processos biológicos responsáveis por tais efeitos.

Levando em conta a sensibilidade de diferentes tipos de organismos à exposição de substâncias químicas e as relativas toxicidade de diferentes substâncias, o objetivo da ecotoxicologia seria então entender e prever efeitos de substâncias químicas em seres vivos e comunidades naturais (CHAPMAN, 2002).

As análises com biomarcadores têm sido utilizados com sucesso em programas de biomonitoramento. Eles servem como um sistema de alerta para a presença de compostos poluentes porque as respostas de biomarcadores aparecem antes que os danos irreversíveis ocorram no ecossistema (JOSENDE *et al.* 2015).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2000), os biomarcadores compreende toda substância ou seu produto de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado, avalie a intensidade de exposição e o risco à saúde.

Os biomarcadores, por definição, consistem variedade de respostas biológicas relacionadas à exposição a contaminantes e podem incluir molecular, celular, fisiológico e comportamentais (Montserrat *et al.*, 2003).

Fatores de importância biológica em nível de agrossistema devem também ser priorizados, principalmente se tratando da origem do contaminante. E, para isso, a utilização de peixes como bioindicadores é muito recomendada (SMITH *et al.*, 1997).

Considerando ainda, a nocividade dos herbicidas à vida aquática, para obtenção de registro e legalização do uso de determinado produto comercial, diversos testes toxicológicos são realizados, utilizando-se de outros modelos biológicos. Também são realizados testes em organismos não alvos, tais como microrganismos do solo, abelhas, micro crustáceos, dentre outros.

2.3.1 Biomarcadores

Os biomarcadores podem ser classificados como de exposição, efeito ou suscetibilidade. Os biomarcadores de exposição são alterações biológicas mensuráveis que evidenciam a exposição dos organismos a um poluente, ou seja, que indicam a dose interna ou a biodisponibilidade do xenobiótico ou de seus metabólitos no organismo.

Os biomarcadores de efeito que indicam uma resposta adaptativa do organismo (moleculares, bioquímicas, citológicas, fisiológicas, etc); e os biomarcadores de susceptibilidade, que representam a capacidade do organismo-teste responder a exposição a um xenobiótico específico (VAN DER OOST *et al.*, 2003; JESUS e CARVALHO, 2008).

Dentre a classificação do biomarcadores como forma de monitoramento de ambientes aquáticos, os enzimáticos tem se destacado, pois visa a quantificação de enzimas que desempenham papel-chave em processos fisiológicos e podem ser induzida ou inibida após a exposição a xenobióticos.

Entre os biomarcadores enzimáticos mais empregados incluem a inibição da acetilcolinesterase (AChE) e parâmetros relacionados ao estresse oxidativo que envolvem a quantificação de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase e glutathione redutase (COGO, 2009).

As enzimas de estresse oxidativo são de extrema importância para a manutenção da vida por estarem ligadas ao processo de detoxificação de compostos formados nos seres vivos, decorrentes das atividades metabólicas das células, e são consideradas importantes ao viabilizar a sobrevivência de organismos em ambientes contaminados (HERMES-LIMA *et al.*, 2001).

2.3.1.1 Acetilcolinesterase

As Colinesterases (ChEs) são serina hidrolases que envolvem dois tipos: acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BuChE, EC 3.1.1.8), com base em seus substratos específicos, acetilcolina (ACh) e butirilcolina (BCh), respectivamente. Acetilcolinesterase tem função fisiológica na terminação das sinapses colinérgicas do sistema nervoso central e periferal (LEONCINI, 2016).

Nas sinapses colinérgicas estão presentes essas colinesterases, que são enzimas que catalisam a hidrólise da ACh em ácido acético e colina na fenda sináptica, e assim, permitem que o neurônio colinérgico retorne ao seu estado de repouso após ser ativado (COLOVIC, 2013).

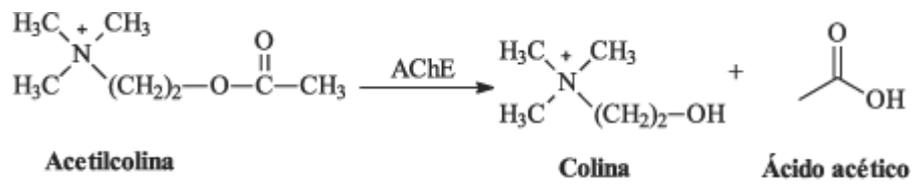
Embora sejam evolutivamente semelhantes, estas enzimas diferenciam-se quanto a sua distribuição nos tecidos, as suas propriedades cinéticas e pela especificidade para com os seus substratos. A AChE encontra-se mais abundantemente no sistema nervoso central esqueléticos e na membrana dos eritrócitos. Enquanto que a BuChE encontra-se, em sua maioria, no plasma sanguíneo sendo por este motivo conhecida também como colinesterase plasmática (MULLER, 2002).

A AChE e BuChE apresentam semelhanças estruturais, sendo que seus aminoácidos apresentam aproximadamente 50% de homologia. Os outros 50% de heterogenia entre os aminoácidos são responsáveis pelas diferenças de seletividade tanto dos substratos quanto dos inibidores destas enzimas. A AChE hidrolisa preferencialmente a ACh enquanto que a BuChE é menos seletiva e atua hidrolisando tanto a ACh quanto a Butirilcolina (BuCh) em quantidades comparáveis (PEZZEMENTI, 2011).

Na fenda sináptica a AChE é responsável por degradar a ACh, uma molécula simples que possui um grupo éster e uma amina quaternária. No neurônio pré-sináptico, a ACh é sintetizada a partir da colina e acetilcoenzima A (Acetil-CoA), sob catálise da colina acetiltransferase. Após sua formação, ela é armazenada em vesículas, onde fica depositada até que haja um estímulo que resulte em sua liberação na fenda sináptica (ARAÚJO, 2016).

A partir desse ponto, a ACh se liga no receptor pós-sináptico propagando a informação. Após transmitir a mensagem, a molécula de ACh se desliga do receptor pós-sináptico e volta à fenda sináptica, onde ela sofre hidrólise catalisada pela AChE, dando origem a ácido acético e a colina, como ilustrado na Figura 7 (FIFER, 2007).

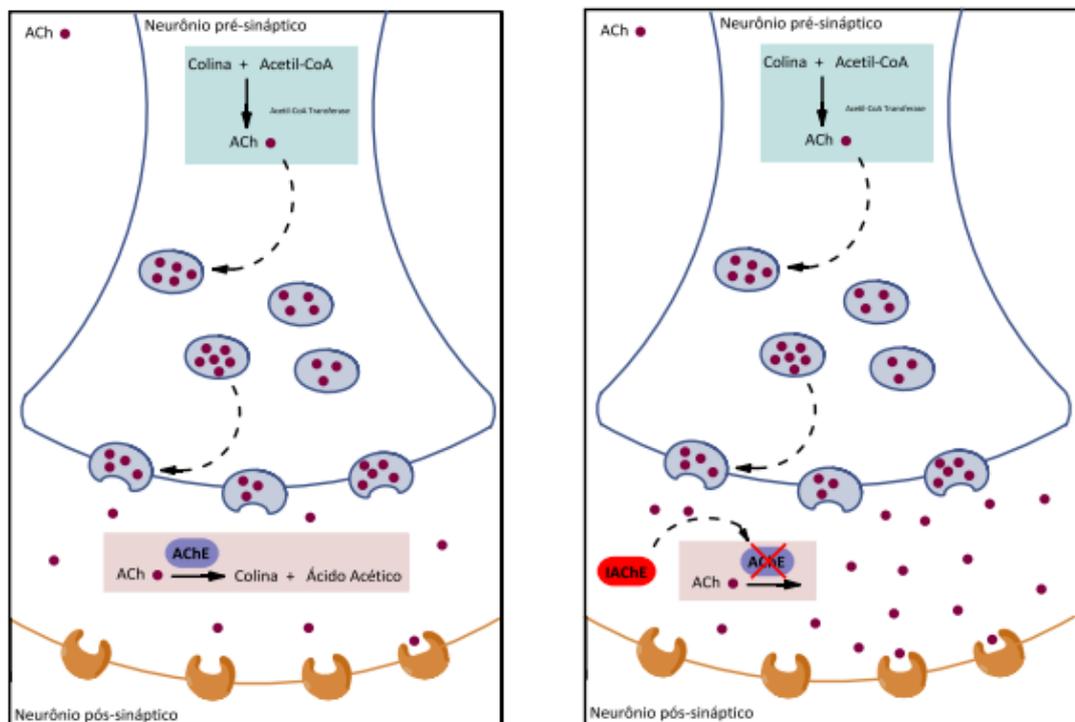
Figura 7 - Reação de hidrólise da ACh



Fonte: REBELLO et. al., 2007.

Em sua maioria, a enzima AChE é inibida por pesticidas, onde há a presença dos compostos anticolinesterásicos: fisostigmina, neostigmina e piridostigmina. Outros inibidores da acetilcolinesterase (IACHe) também podem ser fármacos e metais pesados que chegam até as sinapses colinérgicas (ARAÚJO *et al.*, 2016). A Figura 8 apresenta a sinapse colinérgica na ausência e presença de um IACHe, onde este inibidor inativa a enzima impedindo que esta hidrolise seu substrato.

Figura 8 - Sinapse colinérgica na ausência e na presença de um IACHe



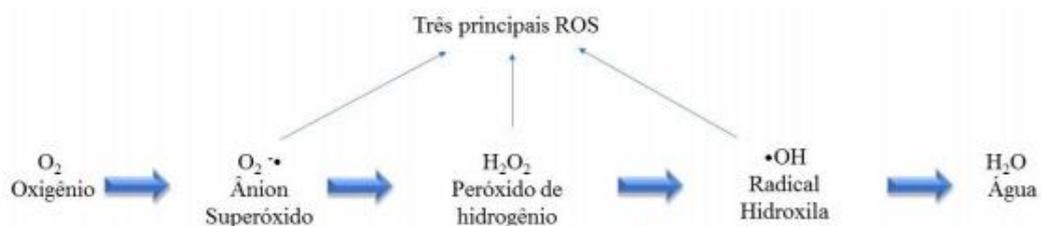
Fonte: ARAÚJO et. al., 2016.

2.3.1.2 Catalase

O estresse oxidativo é gerado pelo excedente de espécies reativas de oxigênio (ERO's) nas células. As ERO's possuem elétrons desemparelhados em sua camada mais externa, os quais reagem facilmente com outras moléculas a fim de alcançar a estabilidade (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990).

As principais ERO's, como esquematizado na Figura 9, são ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que apesar de não ser radicalar, participa da reação de formação do radical hidroxila, sendo que o radical hidroxila (OH^\bullet) é mais deletério e reativo às proteínas e DNA, sendo capaz de oxidar grupos sulfidrilas e pontes dissulfeto (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SCHIEBER e CHANDEL, 2014).

Figura 9 - As principais espécies reativas de oxigênio



Fonte: adaptado de SCHEIBMEIR et al., 2005.

A enzima catalase (CAT, EC 1.11.1.6) exerce duas funções importantes: a decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a água e oxigênio ($H_2O + O_2$) e a oxidação de compostos hidrogenados, como metanol, etanol, ácido fórmico, fenóis, com o consumo de um mol de peróxido (COGO, 2009).

A maneira que a célula encontrou para se defender das ERO's foi a formação de peroxissomos, pequenas vesículas envoltas por membrana, onde ocorrem as reações devido a grande quantidade de catalase (ATLI & CANLI, 2007).

A atividade da catalase é importante para o monitoramento, por ser uma enzima que apresenta elevada atividade quando o organismo se encontra em estresse oxidativo (CHANDRAN *et al.* 2005; AVILEZ *et al.* 2008). Por esse motivo, é utilizada como biomarcador em diversos estudos que analisam o impacto ambiental como descrito por Ventura *et al.* (2002), Atli & Canli (2007) e Zanette *et al.* (2008).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a ecotoxicidade da formulação comercial do Metribuzin (Unimark – UPL, 700g/Kg) através do efeito agudo e sub-crônico utilizando como organismo alvo juvenis de Curimatã-Pacu (*Prochilodus argenteus*), avaliando mudança comportamental do peixe e alterações na atividade de biomarcadores específicos.

3.2 Específicos

- ✓ Analisar a mudança comportamental dos juvenis de *P. argenteus* quando exposto ao metribuzin no ensaio agudo;
- ✓ Determinar a concentração letal média (CL50) do metribuzin no período de 48h em juvenis de *P. argenteus* no ensaio agudo;
- ✓ Quantificar a atividade da acetilcolinesterase do tecido cerebral e muscular dos peixes expostos ao metribuzin no ensaio de toxicidade sub-crônica;
- ✓ Quantificar a atividade da catalase do tecido hepático dos peixes expostos ao metribuzin no ensaio de toxicidade sub-crônica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização do local do experimento

O trabalho experimental foi conduzido parte no Laboratório de Aquicultura/Piscicultura (LAQUA), localizado no Centro de Ciências Agrárias – CECA, quanto à acomodação dos peixes e contaminação do ambiente aquático, e parte no Laboratório de Bioquímica e Enzimologia (LBE), localizado no Campus A. C. Simões – UFAL, para as análises laboratoriais.

4.2 Local de origem da espécie Curimatã Pacu

Os peixes utilizados no experimento foram cedidos pela CODEVASF (Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e Parnaíba), 5ª SR, Centro Integrado de Itiúba, localizada no município de Porto Real do Colégio, distando 1 Km do Rio São Francisco.

Os peixes foram trazidos da CODEVASF para o LAQUA no dia 30 de agosto de 2017 às 16h 45min., no total de 2.500 exemplares na fase de alevinos com peso médio de $3,5g \pm 1,0g$ e $3,0cm \pm 0,5cm$ de comprimento.

Iniciou-se o processo de aclimação destes animais no qual frisou aferir parâmetros de qualidade de água todos os dias, os parâmetros aferidos foram temperatura ($^{\circ}C$), pH (potencial hidrogeniônico), oxigênio dissolvido (mg/L) e salinidade (ppt), sendo respectivamente seus valores $25,1^{\circ}C \pm 0,1^{\circ}C$, $6,60 \pm 0,11$, $5,6mg/L \pm 0,2mg/L$ e $0,64ppt \pm 0,14ppt$ de ambos os ambientes aquáticos, tanto do saco de transporte, como também do tanque de lona com capacidade para litros d'água 2.500L.

Depois de aferir algumas vezes e em pontos distintos do tanque e saco para maior acurácia dos dados, colocou-se os sacos de transporte no tanque por exatos 30 minutos, tornando ambos locais agradáveis para a possível acomodação dos peixes. Há também a necessidade de ir introduzindo a água do tanque no saco de transporte, para que não haja uma mudança abrupta de ambiente.

Os peixes foram alimentados 4 vezes ao dia (7:00, 10:00, 13:00 e 16:00h) com a ração Nutripiscis Starter 45% PB (Proteína Bruta). O tanque continha um sistema

de recirculação de água, onde a cada 24h toda a água do tanque de lona passava por um filtro Canister Jebo 838.

Posteriormente era despejada em uma caixa d'água plástica com capacidade de 250L, onde a mesma foi feita de filtro biológico, constituído de unidades de pedras britadas, carvão ativado, areia lavada que servem de suporte de fixação de microorganismos aeróbios responsáveis pela conversão e oxidação de matéria orgânica e nutrientes, neste processo a água retorna a ter suas características imprescindíveis para a homeostase animal.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – UFAL, sob o número 36/2017, de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009.

4.3 Delineamento experimental I

O delineamento experimental constou de um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com 6 tratamentos e 4 repetições, totalizando em 24 aquários experimentais, com 8 animais em cada um deles.

Os aquários foram sorteados ao acaso e em todos haviam condições laboratoriais iguais quanto à qualidade de água (média de temperatura $27.4^{\circ}\text{C} \pm 0.4^{\circ}\text{C}$, oxigênio dissolvido $6.7\text{mg/L} \pm 0.3\text{mg/L}$ e pH 6.95 ± 0.5), luminosidade, aeração constante e quantidade útil de água nos aquários.

Para que os peixes pudessem ser transportados para os aquários experimentais houve a necessidade de fazer uma biometria, conforme mostra a figura 11. Estes parâmetros de qualidade da água nos aquários experimentais foram aferidos utilizando o equipamento por meio de sonda multiparâmetros (HANNA Instruments, modelo 9828, Woonsocket, USA). Todos estes parâmetros foram medidos e registrados a cada 24 horas pelas normas da ABNT (1993).

Figura 10 - Biometria de exemplares de Curimatã Pacu, para experimento de toxicidade aguda.



Fonte: O AUTOR, 2017.

Os exemplares de Curimatã Pacu apresentaram peso médio de $3,0 \pm 0,3\text{g}$ e comprimento médio de $5,5 \pm 0,5\text{cm}$. Os mesmos foram transferidos para os aquários experimentais onde passaram 5 dias sendo alimentados para que se habituassem ao novo ambiente, durante esses dias cada aquário passou por troca parcial de água.

Os animais passaram por um jejum de 24h antes de serem submetidos à contaminação do xenobiótico, seguindo as normas da ABNT NBR 2017 - Ecotoxicologia aquática, com duração de 48h e em sistema estático (sem alimentação e sem troca d'água).

4.4 Teste de toxicidade aguda

O primeiro teste a ser feito foi o de toxicidade aguda, o qual teve como objetivo observar a CL50 (concentração letal que dizima 50% da população), seguindo as normas da ABNT NBR 2017 - Ecotoxicologia aquática, com duração de 48h e em sistema estático (sem alimentação e sem troca de água) e também observar mudanças comportamentais.

Neste teste optou-se usar 33,5L d'água em cada aquário, uma vez que cada um destes tinha capacidade total para 40,0L d'água. A substância utilizada foi o METRIBUZIN da marca UPL – UNIMARK com 700g/kg de concentração, sendo realizados testes com 0, 60, 105, 150, 195 e 240 mg/L desta substância.

No término do experimento os peixes que sobreviveram foram anestesiados com TRICAÍNA METANO SULFONATO (MS222), com dose de 150mg/L, causando inconsciência e posterior perfuração craniana, de acordo com o item 8.2.9.3 da Resolução nº 13/ 2013, das Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

4.5 Delineamento experimental II

O delineamento experimental II, foi um DIC, com 4 tratamentos e 3 repetições, totalizando em 12 aquários experimentais, com 12 animais em cada um deles. Os aquários foram sorteados ao acaso e em todos haviam condições laboratoriais iguais quanto à qualidade de água (média de temperatura $26.8^{\circ}\text{C} \pm 0.3^{\circ}\text{C}$, oxigênio dissolvido $6.5\text{mg/L} \pm 0.6\text{mg/L}$ e pH 6.97 ± 0.1), luminosidade, aeração constante e quantidade útil de água nos aquários.

A média de comprimento dos peixes variou de $9,5 \pm 2,0\text{cm}$, como veremos na figura 12. Para que tivesse uma maior precisão quanto à homogeneidade da distribuição destes peixes, houve a necessidade de colocar em todos os aquários a mesma quantidade de peixes do mesmo tamanho.

Figura 11 - Biometria de exemplares de Curimatã Pacu, para experimento de toxicidade sub-crônica.



Fonte: O AUTOR, 2017.

Os animais passaram 4 dias nos aquários antes da contaminação da água, a alimentação e troca d'água não diferiu do experimento I (teste de toxicidade aguda). O mesmo ocorreu com o jejum de 24h, como foi dito no experimento acima.

4.6 Teste de toxicidade sub-crônica

O teste de toxicidade sub-crônica, teve caráter de avaliar o animal externamente, assim como também internamente, levando em consideração a bioacumulação do mesmo, para concretizar qualquer suspeita é necessário avaliar alguns órgãos dos animais expostos ao pesticida, seguindo as normas da ABNT NBR 2017 - Ecotoxicologia aquática, com duração de 96h em sistema estático (sem alimentação e sem troca d'água).

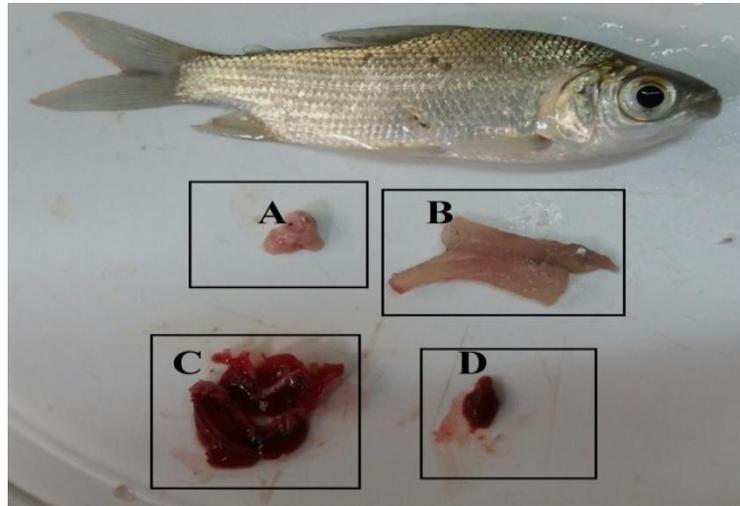
O aquário continuou sendo utilizado um volume útil de 33,5L d'água em cada um deles, a substância não diferenciou do outro teste citado acima, que foi o METRIBUZIN da marca UPL – UNIMARK com 700g/kg de concentração, sendo realizados testes com 0 (controle), 37.32 (25% da CL50), 74.65 (50% da CL50) e 111.97 (75% da CL50) mg/L desta substância.

No final de cada 24h, 3 exemplares eram anestesiados com TRICAÍNA METANO SULFONATO (MS222), com dose de 150mg/L, causando inconsciência e posterior perfuração craniana, de acordo com o item 8.2.9.3 da Resolução nº 13/2013, das Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

O cérebro, brânquias, fígado e músculo foram removidos (figura 13), etiquetados, embalados em papel alumínio com seu respectivo tratamento, período de exposição, congelados em nitrogênio líquido e depois em freezer -20°C para posterior análise.

Figura 12 - Órgãos coletados para análises.

A- Cérebro. **B-** Músculo. **C-** Brânquias. **D-** Fígado



Fonte: O AUTOR, 2017.

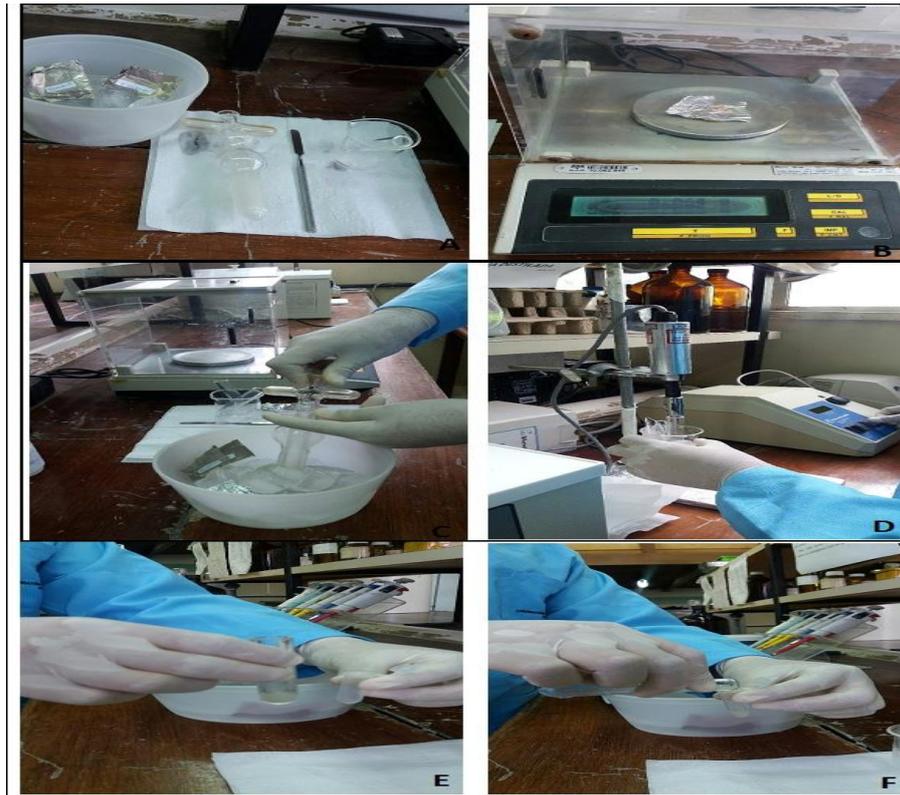
4.7 Preparação do extrato de cérebro

Para o preparo do extrato de cérebro, reuniram-se um pool de três cérebros que foram medidas as massas e macerados sob banho de gelo em uma solução refrigerada de NaCl a 0,9% (v/v) (80 mg:1mL NaCl a 0,9%) e em seguida transferidos para homogeneizador de vidro Potter, parcialmente submerso em banho de gelo. A ruptura de células foi realizada em Ultrassom Fisher Scientific Sonic (5 ciclos de 15'' com intervalos de 15'') a uma frequência 22,5 KHz.

Os intervalos foram em banho de gelo para resfriamento da haste metálica do ultrassom (figura 14). Este procedimento foi realizado nos cérebros tanto dos animais expostos ao herbicida, como também nos animais do grupo controle. Em seguida, o homogenato de células de cérebro foi utilizado para determinar a atividade da enzima acetilcolinesterase.

Figura 13 - Procedimento de preparo do homogenato de células cerebral.

A - Descongelamento do cérebro. **B** - Pesagem em balança analítica. **C** – Homogeneização. **D** - Disruptor de células. **E** - Homogenato bruto. **F** - Transferência para eppendorf para leitura em espectrofotômetro.



Fonte: MARINHO, 2017.

4.8 Determinação de atividade da enzima AChE

A metodologia utilizada para o ensaio da atividade de acetilcolinesterásica para os tecidos cerebrais e musculares do peixe, foi baseada no método de Ellman *et al.* (1961). Essas atividades foram quantificadas a um comprimento de onda de 412nm em espectrofotômetro UV/VIS (Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2) usando acetiltiocolina (ATCh) como substrato.

O ensaio foi realizado em uma mistura de reação contendo tampão fosfato de potássio ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) a 0,1 M e pH 8,0; solução 0,01 M de ácido 5,5- Ditiobis-[2-nitrobenzóico (DTNB), solução 0,075 M de iodeto de acetiltiocolina (ATCh) como substrato para ChE, e a diluição dos extratos de cérebro respectivamente.

Para a leitura do branco, foi adicionado água desmineralizada ao invés do substrato ATCh. O tempo de reação foi de 5 minutos e todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A unidade da atividade colinesterásica (U) representa uma quantidade de enzima catalisando a hidroxilação de 1 μmol de substrato por minuto ($U = \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$). A atividade da enzima foi calculada de acordo com:

$$U / \text{mL} = \frac{\Delta A / \Delta t}{\varepsilon} \times \frac{V}{V_e / D}$$

Onde:

V é o volume total da mistura reacional ($V = 1,5 \text{ mL}$);

$\Delta A / \Delta t$ é a inclinação da reta;

ε é o coeficiente de extinção molar do DTNB ($\varepsilon = 14,15 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$);

Ve é o volume do extrato enzimático.

4.9 Determinação atividade de CAT

Atividade de catalase (CAT) foi determinada de acordo com Miron et al., 2008. Os fígados foram pesados, macerados com homogeneizador de células (1g de fígado: 20mL de tampão) com tampão fosfato (20mM, pH 7.5 com 0.1% de Triton x-100 e 150mM de NaCl) e centrifugados à 10000xg por 10 minutos a 4°C.

Para ensaio espectrofotométrico para determinação da atividade de CAT, o preparo da mistura reacional consistiu de 2856 μL de tampão fosfato (50mM, pH 7), 72 μL de extrato e 72 μL de peróxido de Hidrogênio (0,3M). A reação foi iniciada pela adição do material protéico e a atividade determinada seguindo-se a decomposição do H_2O_2 por 1min, através da redução na absorbância a 240nm. A atividade foi calculada a partir e expressa em U/mg de proteína:

$$U / \text{mg} = \frac{A_{10} - A_{60}}{\varepsilon} \times \frac{V \cdot D}{V_e \cdot C}$$

onde:

V é o volume total da mistura reacional ($V = 3 \text{ mL}$);

A₁₀ absorvância em 10 segundos;

A₆₀ absorvância em 60 segundos;

ϵ é o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 à 240nm ($\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$);

V_e é o volume do extrato enzimático;

D é a diluição do extrato;

C é a concentração proteica ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)

4.10 Quantificação do teor proteico

A quantificação de proteína foi determinada segundo método de Bradford *et al.*(1976). Para a preparação do reagente de Bradford, dissolveu-se 102,4 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de etanol 95%. A solução foi agitada durante 60 minutos e, em seguida, adicionou-se 100mL de ácido fosfórico 85%. A solução assim obtida foi avolumada para 1 L com água deionizada e agitada por 10 minutos. Após filtração em papel de filtro, o reagente foi armazenado em ambiente escuro e seu recipiente coberto com papel alumínio.

Todas as dosagens de proteína foram realizadas em triplicatas. O conteúdo protéico do extrato foi expresso em $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. A curva de calibração de proteínas foi construída empregando-se albumina de soro bovino como padrão. A leitura das absorvâncias foi realizada a 595 nm determinadas em espectrofotômetro (Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2), utilizando-se água em lugar de solução-padrão para o branco.

4.11 Análise estatística

Todos os resultados foram tratados utilizando o modo one-way ANOVA e teste Dunnett no GraphPad6. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com 5% de nível de probabilidade ($p \leq 0.05$).

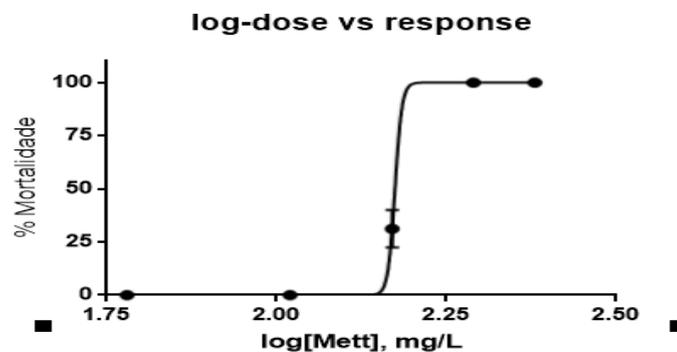
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Herbicidas do grupo das triazinas e triazinonas são propensos a escoar para águas superficiais devido às suas características físicas e químicas. Estudos de modelagem indicaram que metribuzin pode atingir concentrações tão altas quanto 390 g.L^{-1} em escoamento de águas superficiais (PAULI *et al.*, 1990).

5.1 Toxicidade aguda

Determinou-se a CL50 do metribuzin de acordo com os índices de mortalidade no período de 48h, conforme figura 15. A taxa de mortalidade de 100% foi obtida a partir das maiores concentrações do ingrediente ativo (195 e 240 mg/L), mas na concentração de $149.3 \pm 3.1 \text{ mg/L}$ houve 50% de mortalidade, logo sua CL50-48h foi de $149.3 \pm 3.1 \text{ mg/L}$.

Figura 14 - Mortalidade dos animais expostos às distintas concentrações do Metribuzin



Segundo Nwani *et al.* (2010) os valores de concentração letal de atrazina para *Channa punctatus* é dependente do tempo e da concentração. No entanto, outros pesquisadores mostraram que o tempo de exposição não é significativo nas determinações da CL50 para peixes (LAKOTA *et al.*, 1989).

Valores similares da CL50-48h, de metribuzin para o *P. argenteus*, foram encontradas para *Cyprinus carpio* (175.1 mg.L^{-1}) (VELISEK *et al.*, 2009) e *Rasbora borapetensis* (145 mg.L^{-1}) (TOOBY *et al.*, 1975).

Durante a exposição aguda do Curimatã ao metribuzin, o peixe apresentou natação errática, sangramento do opérculo, pigmentação escura na pele e perda da escama. Os peixes no fundo tinha pouca movimentação e respiração lenta enquanto na superfície do aquário, os peixes se movimentavam em círculos, com respiração aumentada, seguido de convulsões.

Velisek *et al.* (2008) também observou sintomas similares de respiração acelerada e convulsões, quando juvenis de *Oncorhynchus mykiss* foram expostos a metribuzin em concentrações em torno de 90 mg.L⁻¹.

5.2 Toxicidade sub-crônica

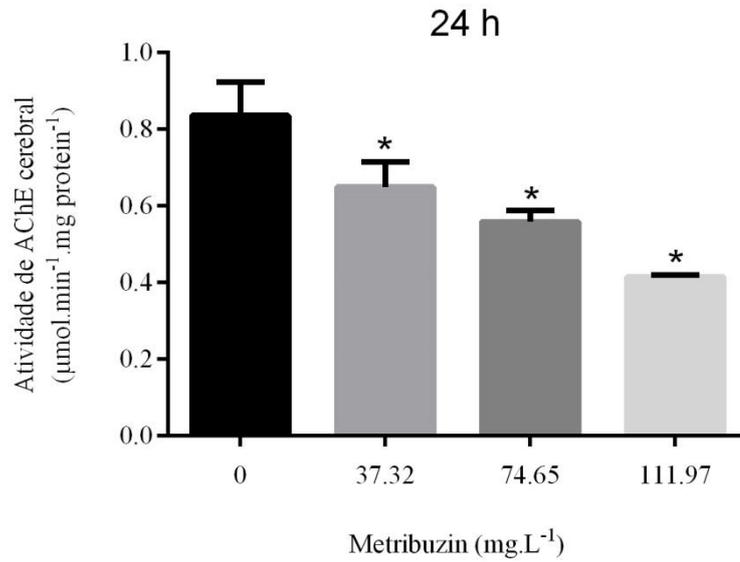
Existem estudos sobre toxicidades de herbicidas do grupo das triazina; no entanto, existe pouca informação disponível sobre a sua toxicidade e efeitos nos peixes e organismos aquáticos, especialmente na exposição sub-crônica.

Acetilcolinesterase vem sendo empregada como biomarcador enzimático de diferentes pesticidas (RICKWOOD *et al.*, 2004; NG *et al.*, 2009; MDEGELA *et al.*, 2010; TU *et al.*, 2009), visto que esta enzima é inibida irreversivelmente por organofosforados (ČOLOVIĆ *et al.*, 2013) e por ser uma das enzimas responsáveis pela finalização dos impulsos nervosos no sistema nervoso no tecido cerebral e muscular.

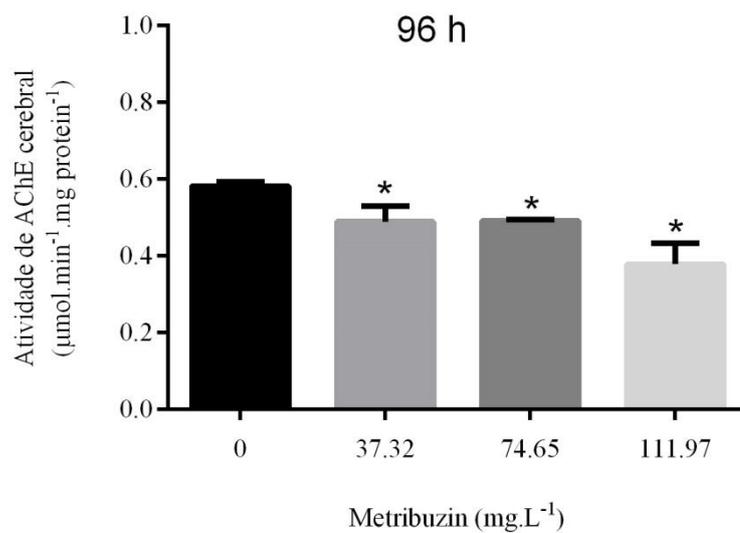
As atividades específicas de AChE cerebral de *P. argenteus* durante 24 e 96 h de exposição a metribuzin são mostrados na Figura 17. Observa-se que nos período de 24 e 96h de exposição, a atividade de AChE cerebral apresentou uma diminuição significativa ($p < 0.05$) em todas as concentrações de metribuzin, quando comparado ao controle, com inibição de 50.35 e 34.9 %, respectivamente, para a maior concentração.

Figura 15 - Atividade específica de acetilcolinesterase cerebral exposto a metribuzin nos períodos de: (A) 24h e (B) 96h. * Indica diferença significativa ($p \leq 0.05$) quando comparado ao controle.

(A)



(B)

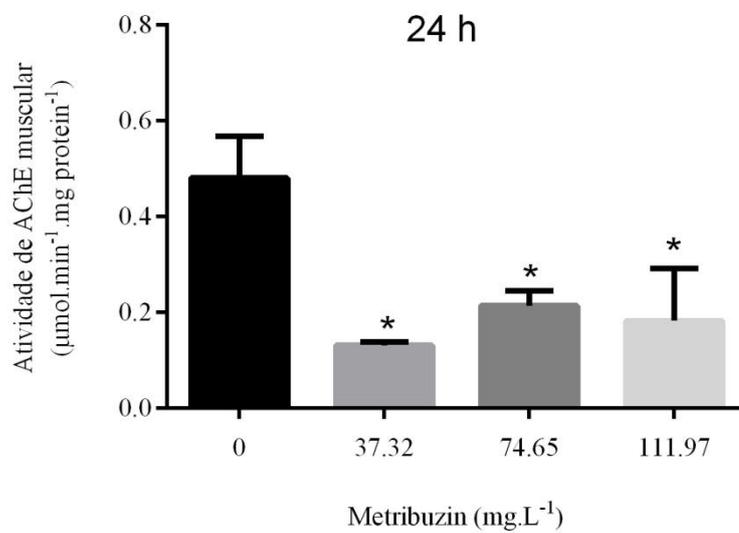


As atividades específicas de AChE muscular de *P. argenteus* durante 24 e 96 h de exposição a metribuzin são mostrados na Figura 18. Observa-se que nos período de 24 e 96h de exposição, a atividade de AChE muscular apresentou uma

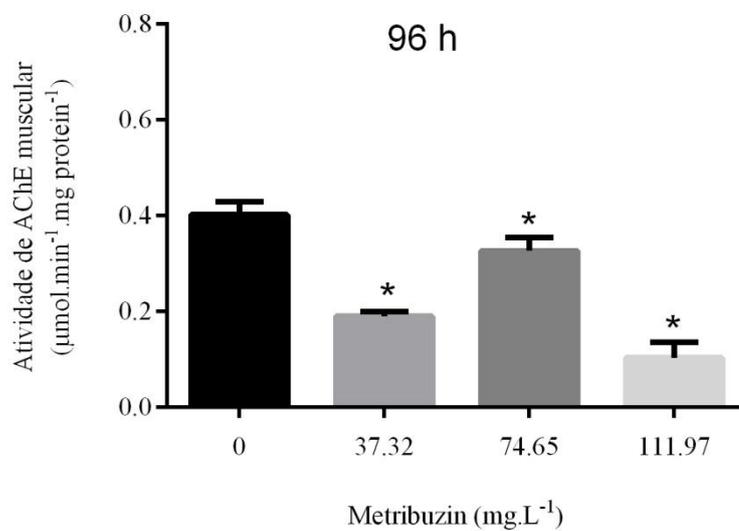
diminuição significativa ($p < 0.05$) em todas as concentrações de metribuzin, quando comparado ao controle, com inibição de 61.9 e 74.2 %, respectivamente, para a maior concentração.

Figura 16 - Atividade específica de acetilcolinesterase muscular exposto a metribuzin nos períodos de: (A) 24h e (B) 96h. * Indica diferença significativa ($p \leq 0.05$) quando comparado ao controle.

(A)



(B)



Quando comparado as inibições encontradas da atividade de AChE cerebral e muscular na concentração de metribuzin de 111.97 mg/L, observa-se que a AChE muscular apresentou maior sensibilidade quando o peixe foi exposto ao herbicida.

A diminuição da atividade de AChE observada para todas as concentrações estudadas e para todos os períodos de exposição sugere que o herbicida inibiu a enzima. Estes resultados de inibição foram similares por aqueles obtidos por outros autores.

Hussein *et al.* (1996) observou que as atividade de AChE sérica e AChE cerebral das espécies de peixes de água doce *Oreochromis niloticus* e *Chrysichthyes auratus* teve redução significativa quando comparado ao controle, como resposta dependente do aumento da concentração do herbicida atrazina e sugeriu que esta redução foi devido a capacidade de inibir a AChE em várias partes do sistema nervoso e, assim, interromper a transmissão nervosa nesse local ou pelo acúmulo de AChE nos sítios colinoceptivos e, portanto, ser potencialmente capaz de produzir efeitos equivalentes à estimulação contínua das fibras colinérgicas em todo o sistema nervoso central e periférico.

Husak *et al.* (2014) também observou um decaimento da atividade de AChE em 31%, no rim do peixe dourado exposto a 35,7 mg.L⁻¹ do herbicida Sencor (metribuzin, como ingrediente ativo) por 96h, quando comparado ao controle.

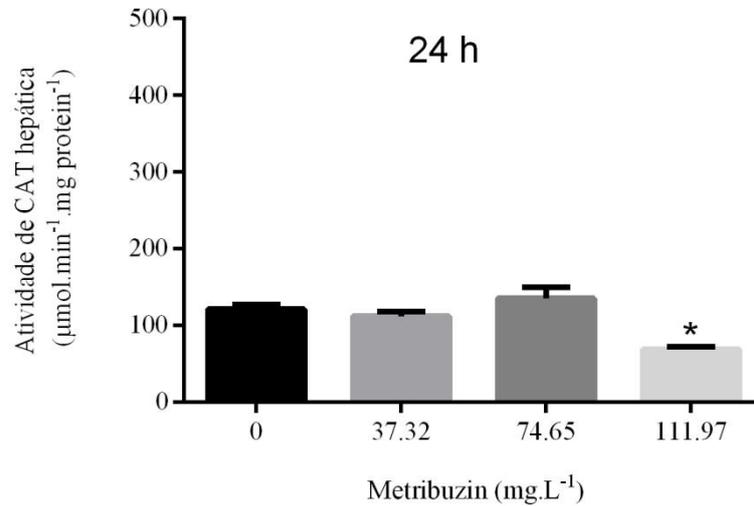
Uma vez que os peixes ingerem toxinas ambientais, estas substâncias passarão pelo fígado antes de chegar ao resto do organismo, na qual o fígado desempenhará um papel fundamental na desintoxicação xenobiótica. Relativamente pouco é conhecido sobre a toxicidade aguda ou crônica do metribuzin no fígado de várias espécies de peixes.

A CAT é a enzima principal no sistema de defesa antioxidante na eliminação de ERO's durante a bioativação de xenobióticos em tecidos hepáticos. As atividades específicas de CAT hepática durante 24 e 96 h de exposição à metribuzin são mostrados na Figura 19. Observa-se que no período de 24h de *P. argenteus* exposto a diferentes concentrações de metribuzin, a atividade de CAT apresentou apenas diferença significativa para maior concentração com redução da atividade em 43.2%, quando comparado ao controle.

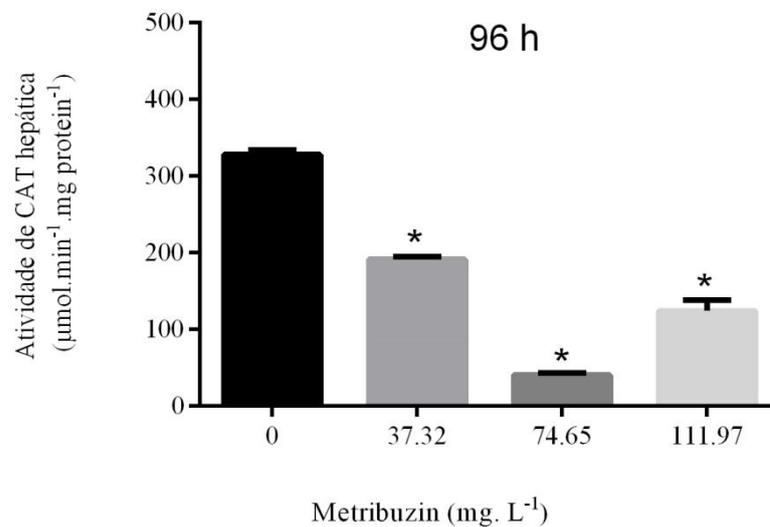
Após 96h de exposição, observa-se diferença significativa da atividade de CAT em todas as concentrações estudadas, quando comparada ao controle, com inibição para maior concentração de 62.1%.

Figura 17 - Atividade específica de catalase hepática exposto a metribuzin nos períodos de: (A) 24h e (B) 96h. * Indica diferença significativa ($p \leq 0.05$) quando comparado ao controle.

(A)



(B)



A diminuição da atividade de CAT no fígado de *P. argenteus* em resposta à exposição do metribuzin, sugere uma diminuição da taxa de reação em resposta ao excesso de ERO's, ou seja, as concentrações subletais do herbicida induziram estresse oxidativo.

A inibição induzida pelo grupo das triazinas e a indução da atividade da catalase por xenobióticos foram relatadas para várias espécies de peixes. Nwani et

al. (2010) observou diminuição na atividade de CAT hepática de *Channa Punctatus* após 7 dias de exposição à doses de atrazina.

Husak *et al.* (2014) observou redução da atividade da catalase, em 31 e 34%, em rim de peixe dourado exposto a 35,7 e 71,4 mg L⁻¹ de Sencor durante 96h, respectivamente, em comparação aos valores de controle. Koutnik *et al.* (2014) analisou o efeito subcrônico em lagosta exposta à concentração de 3,06 mg L⁻¹ de metribuzin por 30 dias e observou estresse oxidativo, quando houve diminuição significativa nos níveis de SOD e catalase.

Stara *et al.* (2012) realizou um estudo crônico do herbicida simazina na carpa comum, onde foram expostos a concentrações sub-letais por 14, 28 e 60 dias e observou que a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona reduzida (GSH) em altas concentrações (2 e 4 mg L⁻¹) aumentou aos 14 e 28 dias, mas diminuiu significativamente após 60 dias de exposição em comparação ao grupo controle.

Tais alterações na atividade enzimática foram principalmente no fígado, mas também nas brânquias e no cérebro e concluiu que a exposição prolongada à simazina resultou na formação excessiva de ERO's, resultando finalmente em danos oxidativos aos lipídios e proteínas celulares e também inibiu as capacidades antioxidantes no tecido comum da carpa.

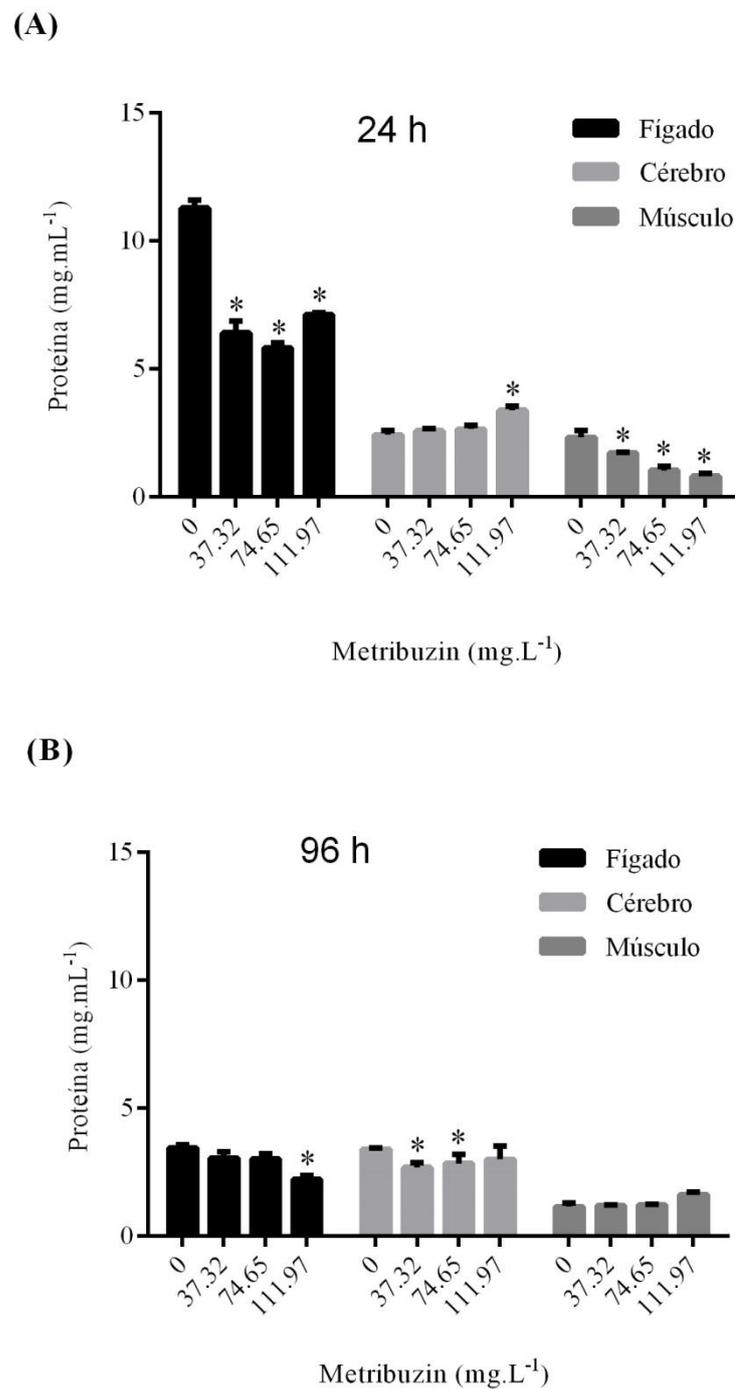
A Figura 20 A e B apresentam as concentrações proteica do tecido hepático, cerebral e muscular de *P. argenteus* exposto a Metribuzin nos períodos de 24 e 96h, respectivamente. Observa-se que a concentração proteica do tecido hepático, do peixe exposto à 24h ao herbicida, diminuiu para todas as concentrações quando comparado ao controle, enquanto que em 96h de exposição à concentração proteica apresentou uma diminuição significativa apenas para a maior concentração do herbicida.

Para a concentração proteica do tecido cerebral houve um aumento significativo na maior concentração quando exposto por 24h e quando exposto por 96h houve apenas uma diminuição significativa na concentração de 37.3 e 74.6 mg/L do herbicida.

Em contraste, apenas no período de 24h de exposição ao metribuzin foi observado diferença significativa dos tratamentos quando comparado ao controle, apresentando uma diminuição para todas as concentrações do herbicida.

Por fim, também se observa ao comparar ambas as figuras, que com o aumento do tempo de exposição dos peixes ao herbicida, houve uma diminuição na concentração proteica hepática.

Figura 18 - Concentração proteica do tecido hepático, cerebral e muscular de *P. argenteus* exposto a Metribuzin nos períodos de: (A) 24h e (B) 96h. * Indica diferença significativa ($p \leq 0.05$) quando comparado ao controle.



Alguns autores relataram reduções na proteína total sérica em peixes expostos a triazina (HUSSAIN *et al.*, 2012; VELISEK *et al.* 2008). A variação da concentração proteica observada no tecido hepático e cerebral *P. argenteus* após 24 e 96h de exposição ao metribuzin também foi observado por Begam *et al.* (2016) que identificou uma diminuição e aumento na concentração proteica no tecido hepático e cerebral, respectivamente, em machos e fêmeas de zebrafish exposto à $5\mu\text{g.L}^{-1}$ de deltametrina.

Os resultados deste estudo evidencia que às respostas bioquímicas são dependentes do tipo de xenobiótico, espécie e tempo de exposição. O xenobiótico em estudo causou alterações nas medidas de atividades de biomarcadores enzimáticos na exposição em *P. argenteus*.

6. CONCLUSÃO

O estresse animal reflete muito na atividade metabólica compensatória dos órgãos, e alterando assim toda homeostase animal. Mediante a essa situação o desempenho deste é afetado de forma negativa, algumas mensurações são feitas para prevenir ou remediar este problema. Visou-se então conferir parâmetros enzimológicos frente a uma exposição toxicológica. O presente estudo indicou que o metribuzin foi tóxico para juvenis de *P. Argenteus*, causando letalidade e alterações nas atividades enzimáticas e mostrou que esta espécie de peixe pode ser uma espécie sentinela para o baixo São Francisco. Com base nos resultados, há necessidade de unir novas pesquisas para apurar o quanto que este herbicida afeta o ecossistema de modo geral, frisando parâmetros zootécnicos em total acurácia destes dados.

BIBLIOGRÁFICAS

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

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

ČOLOVIĆ, M. B.; DANIJELA Z KRSTIĆ, TAMARA D LAZAREVIĆ-PAŠTI, ALEKSANDRA M BONDŽIĆ, AND VESNA M VASIĆ. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology*, v. 11, n. 3, p. 315–335, 2013.

DAS, P.C., MCELROY, W.K., COOPER, R.L. Differential modulation of catecholamines by chlorotriazine herbicides in pheochromocytoma (PC12) cells in vitro. *Toxicol. Sci.* 56 (2), 324–331, 2000.

DELORENZO, G.I. SCOTT, P.E. ROSS, Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review, *Environ. Toxicol. Chem.* 20 . 84–98, 2001.

DORES, S. NAVICKIENE, M.L.F. CUNHA, L. CARBO, M.L. RIBEIRO, E.M. DE-LAMONICA-FREIRE, Multiresidue determination of herbicides in environmental waters from Primavera do Leste region (MiddleWest of Brazil) by SPE-GC-NPD, 233–244,2012.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.J.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, pp 88-95, 1961.

FAO, Produção aquícola mundial 2016. Disponível em : <http://www.aquaculturebrasil.com/2018/07/09/fao-atualiza-dados-da-pesca-e-aquicultura-mundial/>. Acessado em: 09 ago. 2018.

FAIRCHILD, J.F., SAPPINGTON, L.C., Fate and effects of the triazinone herbicide metribuzin in experimental pond mesocosms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43 (2), 198–202, 2002.

HUSAK, VIKTOR V; NADIA M. MOSIICHUKA, IVAN V. MAKSYMIVA, IRYNA Y. SLUCHYKB, JANET M. STOREYC, KENNETH B. STOREYC, VOLODYMYR I. LUSHCHAK. Histopathological and biochemical changes in goldfish kidney due to exposure to the herbicide Sencor may be related to induction of oxidative stress. *Aquatic Toxicology* 155 181–189, 2014.

HUSSAIN, R. F. MAHMOOD, A. KHAN, M.T. JAVED, S. REHAN, T. MEHDI, Cellular and biochemical effects induced by atrazine on blood of male Japanese quail (*Coturnix japonica*), *Biochem. Physiol.* 103. 38–42, 2012.

HUSSEIN, S.Y., EL-NASSER, M.A., AHMED, S.M. Comparative studies on the effects of herbicide atrazine on freshwater fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysichthys auratus* at Assiut, Egypt. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 503–510, 1996.

KOUTNIK DALIBOR, STARA ALZBETA, ZUSKOVA ELISKA, KOUBA ANTONIN, VELISEK JOSEF. The effect of subchronic metribuzin exposure on signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana 1852), *Neuroendocrinology Letters*; 35:2, 2014.

LAKOTA, S.; RAZSKA, A.; UTRACKI, T.; CHMIEL, Z. Side effect of deltamethrin and cypermethrin in the environment of water biocenoses. *Organika*, 71, 71–77, 1989.

MALOSCHIK, A. ERNST, G. HEGEDUS, B. DARVAS, A. SZEKACS, Monitoring waterpolluting pesticides in Hungary, *Microchem. J.* 85 . 88–97, 2007.

MDEGELA, R.H.; MOSHA, R.D.; SANDVIK, M.; SKAARE, J.U. Assessment of acetylcholinesterase activity in *Clarias gariepinus* as a biomarker of organophosphate and carbamate exposure. *Ecotoxicology*, 19(5):855-63, 2010.

MIRON, D.S.; PRETTO, A.; CRESTANI, M.; GLUSCZAK, L. et al. Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere*, 74 (1–5), 2008.

NG, V.; KOH, D.; WEE, A.; CHIA, S.E. Salivary acetylcholinesterase as a biomarker for organophosphate exposure. *Occup Med (Lond)*, 59 (2):120-2, 2009.

NWANI, C. D.; LAKRA, W. S.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, R. et al.. Toxicity of the Herbicide Atrazine: Effects on Lipid Peroxidation and Activities of Antioxidant Enzymes in the Freshwater Fish *Channa Punctatus* (Bloch). *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 7, 3298-3312, 2010.

PAULI, B.D., KENT, R.A., WONG, M.P. Canadian water quality guidelines for metribuzin. *Environ. Can. Sci. Ser.* 179, 135–145, 1990.

PAULI, B.D.; KENT, R.A.; WONG, M.P. Canadian water quality guidelines for metribuzin. Ottawa :Inland Waters Directorate, Water Quality Branch, 1990. Disponível em: < http://publications.gc.ca/collections/collection_2018/eccc/En36-502-179-eng.pdf >. Acessado em: 09 ago. 2018.

PLHALOVA, S. STEPANOVA, E. PRASKOVA, L. CHROMCOVA, L. ZELNICKOVA, L. DIVISOVA, The effects of subchronic exposure to metribuzin on *Danio rerio*, *Sci. World J.* ,2012.

QUEDNOW, K., PÜTTMANN, W., Monitoring terbutryn pollution in small rivers of Hesse, Germany. *J. Environ. Monit.* 9 (12), 1337–1343, 2007.

RICKWOOD, C.J.; GALLOWAY, T.S. Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect. A study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. *Aquat Toxicol.*, 30;67(1):45-56, 2004.

STARA, A., MACHOVA, J., VELISEK, J. Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33, 334–343, 2012.

STEPANOV STANISLAVA , DOLEZELOV PETRA, PLHALOV LUCIE, PROKES MIROSLAV, MARSALEK PETR, SKORIC MISA, SVOBODOV ZDENKA. The effects of metribuzin on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*), *Pesticide Biochemistry and Physiology* ;103: 152–158, 2012 .

TOOBY, T.E.; HURSEY, P.A.; ALABASTER, J.S. Acute toxicity of 102 pesticides and miscellaneous substances to fish. *Chem Ind (Lond.)*, 21: 523–6, 1975.

TU, H.T.; SILVESTRE, F.; SCIPPO, M.L.; THOME, J.P. et al. Acetylcholinesterase activity as a biomarker of exposure to antibiotics and pesticides in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Ecotoxicol Environ Saf.* , 72(5):1463-70, 2009.

VELISEK, J.; SVOBODOVA, Z.; PIACKOVA,V.; NOVOTNY, L. et al. Effects of metribuzin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinarni Medicina*, 53, (6): 324–332, 2008.

VELISEK, J.; SVOBODOVA, Z.; PIACKOVA, V.; SUDOVA, E. Effects of acute exposure to metribuzin on some hematological, biochemical and histopathological parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bull Environ Contam Toxicol.*, 82: 492–5, 2009.

WAUCHOPE, R.D., BUTTLER, T.M., HORNSBY, A.G., AUGUSTIJN-BECKERS, P.W., BURT, J.P. The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 123, 1–155, 1992.

XING, X. WANG, G. SUN, X. GAO, S. XU, X. WANG, Effects of atrazine and chlorpyrifos on activity and transcription of glutathione S-transferase in common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33. 2006.

