



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MATHEUS ALVES SOARES DE CARVALHO

TOXICIDADE CRÔNICA DO HERBICIDA ATRAZINA:
IMPACTOS NA REPRODUÇÃO DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)

João Pessoa, PB

2025

MATHEUS ALVES SOARES DE CARVALHO

**TOXICIDADE CRÔNICA DO HERBICIDA ATRAZINA:
IMPACTOS NA REPRODUÇÃO DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Davi Felipe Farias

Coorientador: Me. Rafael Xavier Martins

João Pessoa, PB

2025

MATHEUS ALVES SOARES DE CARVALHO

**TOXICIDADE CRÔNICA DO HERBICIDA ATRAZINA:
IMPACTOS NA REPRODUÇÃO DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Data: 03/10/2025

Resultado: Aprovado (10,0)



Documento assinado digitalmente

DAVI FELIPE FARIAS

Data: 13/10/2025 16:13:55-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador: Prof. Dr. Davi Felipe Farias
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Documento assinado digitalmente



LUIS FERNANDO MARQUES DOS SANTOS

Data: 13/10/2025 14:05:45-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador I: Prof. Dr. Luís Fernando Marques dos Santos
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Documento assinado digitalmente

LEONARDO ROGÉRIO VIEIRA

Data: 13/10/2025 08:40:41-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador II: Dr. Leonardo Rogério Vieira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C331t Carvalho, Matheus Alves Soares de.

Toxicidade crônica do herbicida atrazina : impactos na reprodução de peixe-zebra (*Danio rerio*) / Matheus Alves Soares de Carvalho. - João Pessoa, 2025.
58 p. : il.

Orientação: Davi Felipe Farias.

Coorientação: Rafael Xavier Martins.

TCC (Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas) - UFPB/CCEN.

1. Agrotóxicos. 2. Biomarcadores. 3. Concentrações ambientais. 4. Desenvolvimento embrionário. 5. Estresse oxidativo. 6. Gônadas. I. Farias, Davi Felipe. II. Martins, Rafael Xavier. III. Título.

UFPB/CCEN

CDU 57 (043.2)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Euscepes postfasciatus*. A. Adulto. B. Larva madura. C. Câmara pupal contendo a pupa. D. Pupa em vista ventral (Fotos: Jorge Anderson Guimarães) (Embrapa, 2021)

Figura 2. Estrutura química da atrazina (Canevaroli et al., 2021).

Figura 3. Tabela indicando quantidade, espécies alvo e tempo de aplicação. Tabela retirada da bula da atrazina Nortox™ 500 SC.

Figura 4. Efeitos adversos causados pela atrazina nos túbulos seminíferos e tecidos circundantes (Sadeghnia et al., 2021).

Figura 5. Rede de AOP's para toxicidade reprodutiva via estresse oxidativos. Retângulos amarelos indicam MIE's, azuis indicam KE's e verdes indicam AO's (Vieira et al., 2024).

Figura 7. Peixes-zebra adultos. A fêmea (acima) pode ser facilmente distinguida do macho (abaixo) devido a seu abdômen maior e sua coloração mais prateada.

Figura 8. Representação esquemática da distribuição dos peixes por sexo e tratamento experimental: Controle = água declorada; Low = 0,4 µg de atrazina/L e High = 2,0 µg de atrazina/L. Cada tanque foi povoado com 6 animais, independente do sexo e tratamento, em 6,0 L de solução controle ou teste.

Figura 9. Diferentes qualidades de embriões. A) um ovo não fertilizado, não apresenta nenhuma clivagem, apesar de ter morfologia conservada. B) um embrião fertilizado com aproximadamente 3 hpf (horas pós-fertilização) com padrão de clivagem e morfologia normais. C) um embrião coagulado, apresentando degeneração completa.

Figura 10. Variação da frequência de desovas ao longo das semanas de exposição à diferentes concentrações de atrazina em comparação ao grupo controle. Controle: peixes machos e fêmeas mantidos somente em água declorada; Low: peixes mantidos em água declorada contendo 0,4 µg/L; High: peixes mantidos em água declorada contendo 2,0 µg/L. Dados analisados por teste Chi-quadrado de independência e com asterisco significando diferença significativa do controle (*: $p < 0.05$).

Figura 11. Análise da variação da viabilidade total ao longo das quatro primeiras semanas de exposição de . Dados analisados por teste Chi-quadrado de

independência e com asterisco significando diferença significativa do controle (*:p<0.05).

Figura 12. Análise da variação da incidência de endpoints de toxicidade. Os endpoints analisados foram a coagulação (topo), atraso na eclosão (meio) e ausência de pigmentação (baixo). A incidência foi calculada como uma porcentagem do total de embriões analisados. Dados foram analisados por teste Chi-quadrado de independência e com asterisco significando diferença significativa do controle (*:p<0.05).

Figura 13. Biomarcadores enzimáticos e de peroxidação lipídica em gônadas de peixes machos e fêmeas expostos à atrazina em diferentes concentrações ou mantidos somente em água decolorada. A) Lactato desidrogenase (LDH); B) Glutathione-S-transferase (GST); C) Glutathione peroxidase (GPx); D) Catalase (CAT); Controle: peixes machos e fêmeas mantidos somente em água decolorada; Low: peixes mantidos em água decolorada contendo 0,4 µg/L; High: peixes mantidos em água decolorada contendo 2,0 µg/L. Dados estão dispostos como média ± desvio padrão e foram analisados por ANOVA seguido de teste pós-hoc de Tukey (para dados normais) ou teste de Kruskal-Wallis seguindo por teste pós-hoc de Dunn e com asterisco significando diferença significativa do controle (*:p<0.05).

Figura 14. Análise da concentração de malondialdeído (MDA). Dados estão dispostos como média ± desvio padrão. Dados foram analisados por teste de Kruskal-wallis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise do peso úmido relativo dos órgãos reprodutivos [(peso úmido da gônada/peso úmido do animal)*100] de peixes machos e fêmeas expostos de forma crônica (35 dias) à atrazina em diferentes concentrações. Controle: peixes machos e fêmeas mantidos somente em água decolorada; Low: peixes mantidos em água decolorada contendo 0,4 µg/L; High: peixes mantidos em água decolorada contendo 2,0 µg/L. Dados estão apresentados como média ± desvio padrão. Não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nos grupos teste quando comparados ao controle por ANOVA.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

et al.: Et alli (latim, “e outros”)

FAO: Food and Agriculture Organization

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

HPG: Hipotálamo-hipófise-gonadal

AOP: Adverse Outcome Pathway (via de efeito adverso)

ROS: Reactive oxygen species (espécies reativas de oxigênio)

DDT: Dicloro-difenil-tricloroetano

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

PSII: Photosystem II (fotossistema II)

FSH: Follicle-stimulating hormone (hormônio folículo estimulante)

LH: Luteinizing hormone (hormônio luteinizante)

LDH: Lactato desidrogenase

SDH: Succinato desidrogenase

GPx: Glutathione peroxidase

GST: Glutathione S-transferase

CAT: Catalase

MDA: Malondialdeído

4-HNE: 4-hidroxinonenal

STAR: Steroidogenic Acute Regulatory protein (Proteína reguladora aguda esteroidogênica)

CYP19A1: Citocromo P450, família 19, subfamília A, membro 1 (aromatase)

LHCGR: luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor (Receptor do Hormônio Luteinizante/Coriogonadotropina)

NADH: Nicotinamida-adenina dinucleotídeo, forma reduzida

MIE: Molecular initiating event (evento molecular de iniciação)

KE: Key event (evento chave)

AO: Adverse outcome (efeito adverso)

DNA: Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

[™] e ®: Trademark (marca registrada)

CAS: Chemical abstract services (número de identificação de compostos químicos)

L: litro

mg: miligrama

µg: micrograma

g: grama

°C: Grau Celsius

UniPOM: Unidade de Produção de Organismos Modelo Não-Convencionais

DBM: Departamento de Biologia molecular

UFPB: Universidade federal da Paraíba

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CEUA: Comitê de Ética de Uso Animal

GA: Geórgia

EUA: Estados unidos da américa

g: grama

%: porcentagem

M: molar

mM: milimolar

µMol: micromol

mMol: milimol

nMol: nanomol

min: minuto

rpm: rotações por minuto

ZIRC: Zebrafish international resource center (centro Internacional de recursos de Peixe-zebra)

TCA: Trichloroacetic acid (ácido tricloroacético)

ANOVA: Analysis of variance (Análise de variância)

hpf: Horas pós-fertilização

TPM: Tags per million, transcritos por milhão

amh: hormônio anti-Mulleriano

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre os ombros de gigantes”

-Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Desejo demonstrar a mais pura gratidão a todos que me acompanharam nesta importante etapa da minha vida, tanto aos que continuam quanto aos que não estão mais comigo. Foi uma fase longa e extenuante mas também cheia de aprendizado e crescimento pessoal, e agora encerro-a com a certeza de que estou no caminho certo e, com sorte, este é apenas o começo.

Gostaria de agradecer a minha família. Às minhas mães, Maria Joselha Soares de Carvalho e Rizolene Inocências Alves, ao meu pai, Manuel Soares de Carvalho Neto, ao meu irmão, Raphael Soares de Carvalho, e a minha irmã, Thais Caroline Soares de carvalho, que nunca mediram esforços para apoiar meus sonhos de todas as formas possíveis e necessárias.

Aos meus amigos, Os Casas, que me acompanharam desde muito antes da universidade e com quem eu dividi tantos momentos e risadas. Espero aproveitar a companhia desse grupo até o fim.

Às minhas amigas, Karol e Thais, pela companhia, risadas e momentos ao longo de toda graduação. Nossa amizade tornou tranquila uma fase difícil da vida.

Aos meus amigos de turma, mesmo que a corrida do curso e da vida tenha nos afastado, dividimos momentos muito bons e vocês foram parte importante desta fase.

À toda equipe do Labrisco, os quais foram muito mais do que simples colegas de trabalho, foram verdadeiros amigos com quem dividi muitos momentos e risadas. Especialmente a Rafael Xavier, Maria Eduarda e Leo Vieira, que foram grandes amigos e me acompanharam de perto desde o começo e me ensinaram tudo que sei dentro do laboratório.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Davi Felipe Farias, por todo aprendizado e orientação durante essa jornada e pelo seu jeito leniente e compassivo de ensinar, que mostra que a experiência acadêmica não precisa ser traumatizante e pode ser leve e proveitosa. Obrigado por ser um modelo de cientista e professor.

Aos componentes da banca, por aceitarem o convite com tanta prontidão e pela contribuição com o presente trabalho.

Ao Sr. Bosco e Dione por toda a ajuda indispensável no trabalho e pela companhia.

Ao Sci-hub, Z-Library, Library Genesis e Anna's archive pela luta contra a mercantilização da ciência e pela liberdade do conhecimento.

Às pedras no meu caminho, pessoas e circunstâncias, por me fazerem quem eu sou e me ensinarem o que não fazer.

A mim, sem a quem este trabalho não existiria, pela disciplina e perseverança nessa jornada, é só o começo.

Por fim, agradeço a Universidade Federal da Paraíba (UFPB), à Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPESQ), à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ) e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), por todo o apoio financeiro e institucional que tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho.

Resumo

A atrazina é um dos agrotóxicos mais utilizados no Brasil e no mundo, sendo frequentemente encontrado em águas superficiais. No entanto, seus efeitos adversos à saúde ambiental e humana em concentrações ambientalmente relevantes (i.e. concentrações realísticas) e por longos períodos de exposição permanecem majoritariamente desconhecidos. Dado o exposto, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da exposição crônica à atrazina sobre parâmetros reprodutivos e biomarcadores de toxicidade em peixe-zebra (*D. rerio*), utilizando concentrações teste que contemplam desde o limite legal deste contaminante em água potável até concentrações ambientalmente relevantes. Para tanto, os animais foram separados por sexo e expostos a duas concentrações de atrazina, uma concentração Low (0,4 µg/L) e uma concentração High (2 µg/L), ou somente a água (Controle) durante 35 dias. Os animais foram reproduzidos durante este período para avaliar sua frequência de desova e viabilidade da prole. Os embriões obtidos ao logo da exposição foram monitorados quanto à mortalidade e presença de malformações durante 4 dias. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados e dissecados para remoção das gônadas. Os peixes e suas gônadas foram pesados para cálculo do peso úmido relativo (%). Os órgãos removidos foram ainda submetidos a ensaios de atividade enzimática (LDH, CAT, GST e GPx) e medição de conteúdo de malondialdeído (MDA). Os grupos expostos apresentaram diminuição significativa na viabilidade dos ovos quando comparados com o controle. Além disso, a prole também apresentou atraso na eclosão significativo nos dois grupos expostos. As enzimas LDH e CAT apresentaram, respectivamente, aumento e diminuição em suas atividades nos machos expostos, enquanto a GST foi aumentada nas fêmeas. O peso úmido relativo dos órgãos, a atividade de GPx e o acúmulo de MDA não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. Os resultados mostraram que concentrações ambientalmente relevantes de atrazina não são seguras e são capazes de desregular o metabolismo de ROS dos animais. Dito isso, a legislação brasileira necessita ser revisada quanto ao limite máximo permitido de atrazina em água potável, visto que sua presença pode acarretar riscos à saúde ambiental e, possivelmente, humana.

Palavras-chave: agrotóxicos; biomarcadores; concentrações ambientais; desenvolvimento embrionário; estresse oxidativo; gônadas.

Abstract

Atrazine is one of the most widely used pesticides in Brazil and worldwide, and it is frequently detected in surface waters. However, its adverse effects on environmental and human health at environmentally relevant concentrations (i.e., realistic concentrations) and under long-term exposure remain largely unknown. Given this, the aim of this study was to investigate the effects of chronic atrazine exposure on reproductive parameters and toxicity biomarkers in zebrafish (*D. rerio*), using test concentrations ranging from the legal limit of this contaminant in drinking water to environmentally relevant concentrations. For this purpose, animals were sex-separated and exposed for 35 days to two atrazine concentrations, Low (0.4 µg/L) and High (2 µg/L), or only water (Control). During this period, the fish were allowed to reproduce to assess their spawning frequency and offspring viability. The embryos obtained throughout the exposure were monitored for mortality and malformations over 4 days. At the end of the experiment, animals were euthanized and dissected for gonad removal. Fish and gonads were weighed to calculate relative wet weight (%). The dissected organs were also subjected to enzymatic activity assays (LDH, CAT, GST, and GPx) and measurement of malondialdehyde (MDA) content. Exposed groups showed a significant decrease in egg viability compared with the control. In addition, offspring from exposed groups displayed significant hatching delay. LDH and CAT activities were respectively increased and decreased in exposed males, while GST activity was elevated in females. Relative wet weight of the organs, GPx activity, and MDA accumulation showed no significant differences among treatments. The results demonstrated that environmentally relevant concentrations of atrazine are not safe and are capable of deregulating ROS metabolism in zebrafish. Therefore, Brazilian legislation needs to be revised regarding the maximum permitted limit of atrazine in drinking water, since its presence may pose risks to environmental and possibly human health.

Keywords: biomarkers; embryonic development; environmental concentrations; gonads; oxidative stress; pesticides.

Sumário

1. Introdução.....	15
2. Fundamentação teórica.....	17
2.1. Agrotóxicos.....	17
2.2. Atrazina.....	19
2.3. Efeitos tóxicos da atrazina em organismos não alvo.....	21
2.3.1 Toxicidade reprodutiva.....	21
2.3.2 Biomarcadores de estresse oxidativo e metabólico.....	23
2.3.3. AOP 492.....	24
2.4 Peixe-zebra.....	27
2.4.1. Biologia da reprodução do peixe-zebra.....	28
3. Objetivos.....	30
3.1 Objetivos gerais.....	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4. Metodologia.....	31
4.1. Reagentes.....	31
4.2. Definição das concentrações teste de atrazina.....	31
4.3. Adultos de peixe-zebra.....	31
4.4. Exposição crônica à atrazina.....	32
4.4.1. Adaptação dos peixes às condições experimentais.....	32
4.4.2. Exposição crônica.....	32
4.4.3. Acompanhamento do desenvolvimento dos embriões.....	34
4.4.4. Cálculo do peso úmido relativo dos órgãos reprodutivos.....	35
4.5. Biomarcadores enzimáticos.....	35
4.6. Quantificação de malondialdeído (MDA).....	36
4.7. Análise estatística.....	36
5. Resultados.....	37
5.1. Reprodução, viabilidade e desenvolvimento dos embriões.....	37
5.2. Acompanhamento do desenvolvimento.....	38
5.3. Peso úmido relativo (%) dos órgãos reprodutivos.....	40
5.4. Biomarcadores enzimáticos e peroxidação lipídica.....	41
6. Discussão.....	44
6.1 Reprodução e viabilidade.....	44
6.2 Desenvolvimento dos embriões.....	45
6.3 Biomarcadores enzimáticos e peroxidação lipídica.....	46
7. Conclusão.....	50
Referências.....	51

1. Introdução

Com o crescimento populacional e, conseqüentemente, maior demanda por alimentos, surgiu a necessidade de uma agricultura mais eficiente por meio de melhores práticas agrícolas, uso de culturas mais produtivas e o uso massivo de agrotóxicos (Lopes & Albuquerque, 2018). Devido ao seu modelo econômico predominantemente agroexportador, o Brasil é o maior usuário de agrotóxicos do mundo segundo estatísticas de 2023 da Food and Agriculture Organization (FAO), utilizando mais de 800 mil toneladas neste ano. Estes dados levantam uma inevitável preocupação com a contaminação dos ambientes por essas substâncias e, conseqüentemente, com a saúde humana e ambiental.

Dentre os agrotóxicos mais utilizados no Brasil e no mundo, destaca-se a atrazina. Este é um herbicida da classe das triazinas, utilizado para eliminar ervas daninhas em plantações de cana-de-açúcar, milho e sorgo. Segundo relatório de comercialização de agrotóxicos do Ibama (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), em 2023, a atrazina foi o 6º agrotóxico mais comercializado no Brasil, vendendo mais de 26 mil ton. do ingrediente ativo nesse ano. A revisão de Araújo et al. (2022) mostrou que a atrazina é o agrotóxico mais comumente encontrado em amostragens ambientais pontuais e o segundo mais comum em amostragens passivas ao redor do mundo. Para se ter uma ideia, 60 a 70% dos artigos incluídos nessa revisão reportaram a presença de atrazina em corpos d'água doce superficiais.

No Brasil, a resolução nº 357 do Conama estabelece que o limite máximo de atrazina em corpos d'água é de 2 µg/L (Conama, 2005). Todavia, as concentrações encontradas no ambiente ocasionalmente excedem esse valor, como relataram as revisões de Brovini et al. (2021) e Araújo et al. (2022). Na revisão de Brovini e colaboradores, alguns artigos reportaram concentrações de atrazina superiores ao limite e, no caso do estado do Ceará, até mesmo dados governamentais mostram que concentrações acima do permitido foram encontradas.

Efeitos negativos da atrazina na reprodução de diversos organismos modelo têm sido relatados (Solomon et al., 2008), principalmente em murinos, com destaque para a meta-análise de Guimarães-Ervilha et al. (2025). Neste trabalho, os autores concluíram que a atrazina desregula de forma significativa o eixo HPG (eixo Hipotálamo-Hipófise-

Gonadal) por meio de estresse oxidativo, levando ao decréscimo de hormônios como a testosterona, o que leva a danos reprodutivos. Todavia, a maioria dos estudos foram realizados em curtos períodos de exposição e com concentrações mais altas do que aquelas reportadas no ambiente.

Recentemente, o nosso grupo de pesquisa publicou o AOP 492 (do inglês, “Adverse Outcome Pathway”): Conjugação com glutathione levando à disfunção reprodutiva (Vieira et al., 2023), que de forma conceitual descreveu que o evento molecular inicial de conjugação da glutathione reduzida desencadeia eventos intermediários de dano oxidativo e morte celular, que culminam no efeito adverso de dano à reprodução. Apesar da natureza agnóstica de um AOP, Vieira e colaboradores utilizaram como químico modelo do AOP 492 a atrazina, em virtude do grande volume de dados toxicológicos mecanísticos, experimentais e computacionais, que favoreceram a verificação dos eventos de forma progressiva e causal. Posteriormente, essa via foi integrada a uma rede de AOP's, ampliando a compreensão dos efeitos da atrazina sobre a reprodução (Vieira et al., 2024).

Dado o exposto, é sabido que a atrazina é capaz de causar toxicidade reprodutiva em vertebrados, especialmente em condições de exposição aguda e em concentrações mais altas. No entanto, seus efeitos sobre a reprodução a longo prazo e em concentrações ambientalmente relevantes permanecem pouco conhecidos (Ricci et al., 2024; Harper et al., 2020).

O peixe-zebra (*Danio rerio*) tem-se consolidado como sistema modelo em estudos ecotoxicológicos, sendo uma escolha comum para testagem de substâncias tóxicas em meio aquático (Gonçalves et al., 2020). De acordo com nosso conhecimento, apenas um estudo realizou exposições crônicas de peixe-zebra à atrazina, mas, ainda assim, utilizando concentrações consideravelmente altas (Corvi et al., 2012). Outro aspecto que vale ser mencionado é que esse mesmo estudo realizou somente análises histopatológicas para avaliar os efeitos da exposição crônica à atrazina. Dito isso, faz-se também necessária a aplicação de métodos capazes de detectar perturbações mais sutis em marcadores moleculares e enzimáticos, que possibilitarão a verificação de mecanismos de toxicidade.

Dado o exposto, o presente trabalho propõe investigar os efeitos da exposição crônica à atrazina sobre parâmetros reprodutivos e biomarcadores de toxicidade em peixe-zebra (*D. rerio*), utilizando concentrações teste que contemplam desde o limite legal deste contaminante em água potável a concentrações ambientalmente relevantes.

2. Fundamentação teórica

2.1. Agrotóxicos

Dada a maior demanda agrícola de uma população em constante crescimento (Lopes & Albuquerque, 2018), agrotóxicos vem sendo cada vez mais usados ao redor do mundo para controle de pragas e proteção dos cultivos.

A Lei Federal no 7.802, Artigo 2, Inciso I, define pesticidas/agrotóxicos da seguinte maneira:

“ Produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso no setor de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbano, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento”.

Desta maneira, pesticidas, comumente conhecidos como agrotóxicos ou ainda defensivos agrícolas, são frequentemente descritos como substâncias químicas tóxicas utilizadas para controlar pestes como insetos, fungos, bactérias, ervas daninhas e ratos. Estas substâncias pertencem a diversos grupos, sendo classificados quanto a seu uso (herbicidas, inseticidas, fungicidas etc) e/ou quanto a seu grupo químico, sendo os mais comuns os organoclorados, organofosforados, carbamatos e os piretróides (Lima et al., 2023). Os organoclorados possuem cloro em sua composição, uma substância notável deste grupo é o DDT, que afeta o sistema nervoso de insetos e é altamente persistente no ambiente (Abbasi et al. 2022). Piretróides são inseticidas usados como alternativas menos tóxicas aos organoclorados e funcionam causando paralisia nos insetos (Santos et al., 2008). Organofosforados e carbamatos também são largamente usados como inseticidas e funcionam por inibição da acetilcolinesterase, um importante neurotransmissor, prejudicando a transmissão neuromuscular (Pavani, 2016).

Quanto ao seu uso, os agrotóxicos possuem diversas classificações. Os fungicidas focam em combater infecções fúngicas que atingem as culturas, como, por exemplo, a podridão branca causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, que atinge culturas como feijão, soja e cebola (Purdy, 1979). Um químico representante desta classe é o mancozebe, líder de vendas entre os fungicidas no Brasil (Ibama, 2023). Os inseticidas

são utilizados para o controle de insetos-praga nos cultivos, como a broca-da-raiz (*Euscepes postfasciatus*), um besouro que ataca cultivos de batata-doce (Figura 1). Exemplos de inseticidas são os organoclorados e organofosforados de maneira geral, que atuam principalmente pela paralisia dos insetos, como por exemplo o acefato, que é o inseticida mais vendido no Brasil (Ibama, 2023).

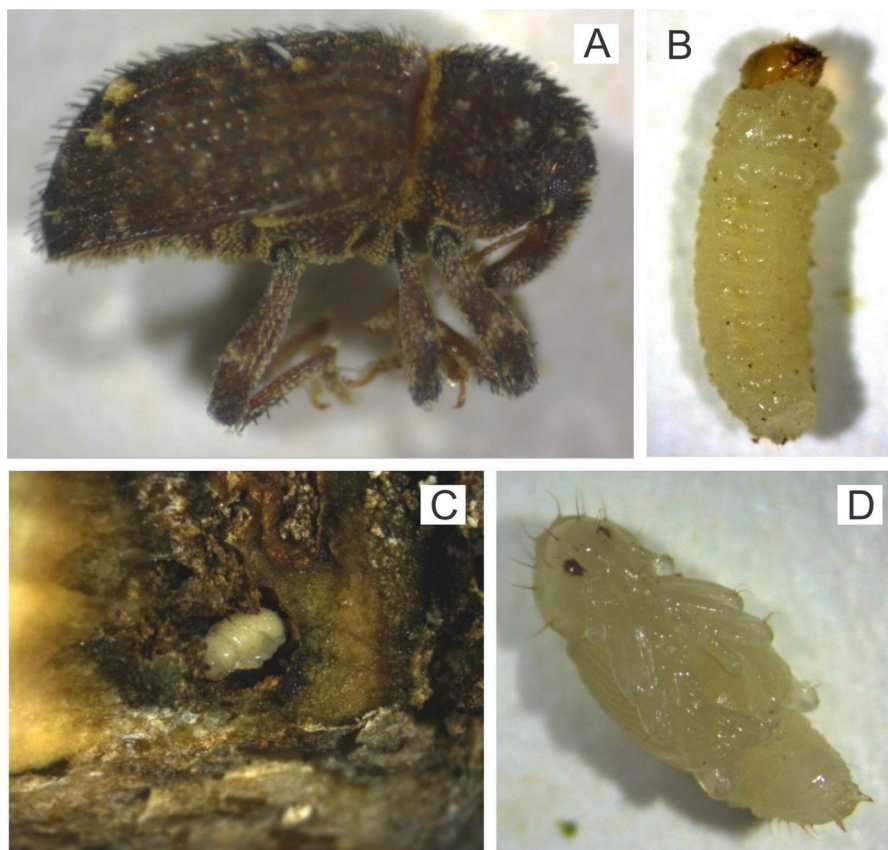


Figura 1. *Euscepes postfasciatus*. A. Adulto. B. Larva madura. C. Câmara pupal contendo a pupa. D. Pupa em vista ventral (Embrapa, 2021). (Fotos: Jorge Anderson Guimarães)

Os herbicidas são agrotóxicos focados em combater outras plantas, como ervas daninhas, que possam prejudicar as culturas. O glifosato, um herbicida organofosfonato derivado do ácido fosfônico, é um dos principais herbicidas utilizados no Brasil e no mundo, sendo responsável por quase 50% das vendas de agrotóxicos no país (Ibama, 2023). Esta substância age inibindo a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase, central na via do chiquimato e na síntese de aminoácidos nas plantas (Bradbarry et al. 2012).

Apesar da sua utilidade na proteção de cultivos e aumento da eficiência da produção agrária, os agrotóxicos são altamente lesivos para organismos não-alvos e

muitos persistem no ambiente e sofrem bioacumulação, podendo afetar não só a saúde humana como a saúde ambiental (Islam et al., 2018). Segundo estimativas, apenas 0,1% dos agrotóxicos aplicados em cultivos realmente atingem seus alvos, enquanto grandes quantidades são lixiviadas para corpos d'água próximos ou penetram no solo e afetam a saúde do solo, podendo contaminar reservatórios de água subterrâneos (Islam et al., 2018).

2.2. Atrazina

Segundo o boletim de 2023 do Ibama, a classe de uso mais comercializada no Brasil são os herbicidas, somando mais de 50% das vendas no país, sendo a atrazina o terceiro herbicida mais vendido. A atrazina, de nomenclatura IUPAC 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine e fórmula $C_8H_{14}ClN_5$, pertence a classe das triazinas, grupo caracterizado pela sua estrutura heterocíclica, possuindo anéis com 3 nitrogênios na sua composição (Figura 2). Esta família contém não só a atrazina como também a ametrina, a simazina e a propazina. No caso específico da atrazina, esta é considerada uma clorotriazina, devido à presença do cloro na sua composição (Pathak & Dikshit, 2011).

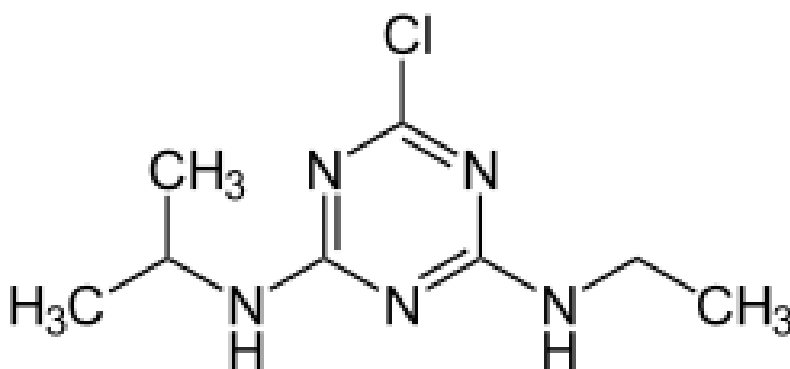


Figura 2. Estrutura química da atrazina (Canevaroli et al., 2021).

Na sua forma pura, a atrazina é um pó branco inodoro, pouco reativo, volátil e inflamável. Está disponível comercialmente em diversas formas, desde várias fórmulas comerciais até sua forma pura (Pathak & Dikshit, 2011). Seu mecanismo de ação em

plantas é por inibição da fotossíntese (Jones & Winchell, 1984), interrompendo a função do fotossistema II (PSII) (Fan et al., 2018).

A atrazina é recomendada principalmente para uso em cultivos de cana-de-açúcar, milho, milheto, pastagem e sorgo, segundo a própria bula do produto produzido pela Nortox™ (Figura 3). Serve para combater ervas daninhas pré e pós emergência. A sua classificação toxicológica é categoria 5: produto pouco provável de causar dano agudo, mas é classificado como periculosidade ambiental II: produto muito perigoso ao meio ambiente.

CULTURA	DOSE DE P.C (L/ha)			ALVO BIOLÓGICO	APLICAÇÃO PLANTA DANINHA
	SOLO LEVE	SOLO MÉDIO	SOLO PESADO	Nome comum Nome científico	
CANA-DE- AÇÚCAR	5,0	6,5	8,0	Beldroega <i>Portulaca oleracea</i>	Pré e Pós
				Capim-colchão <i>Digitaria horizontalis</i>	
				Capim-carrapicho <i>Cenchrus echinatus</i>	
				Capim-marmelada <i>Brachiaria plantaginea</i>	
				Capim-pé-de-galinha <i>Eleusine indica</i>	
MILHO SORGO	3,0	5,0	6,5	Carrapicho-de-carneiro <i>Acanthospermum hispidum</i>	
				Caruru-roxo <i>Amaranthus hybridus</i>	
				Guanxuma <i>Sida rhombifolia</i>	
				Poaia-branca <i>Richardia brasiliensis</i>	
				Nabo-bravo <i>Raphanus raphanistrum</i>	
CANA-DE- AÇÚCAR	5,0	6,5	8,0	Caruru-de-mancha <i>Amaranthus viridis</i>	Pré
				Flor-de-ouro <i>Melampodium divaricatum</i>	
				Flor-amarela <i>Melampodium perfoliatum</i>	
MILHO SORGO	3,0	5,0	6,5	Malva-branca <i>Sida cordifolia</i>	
				Picão-preto <i>Bidens pilosa</i>	
				Pega-Pega <i>Desmodium adscendens</i>	
				Tiririca <i>Cyperus sesquiflorus</i>	

Figura 3. Tabela, com informações de uso, retirada da bula da formulação comercial Nortox™ 500 SC, que contém atrazina como ingrediente ativo majoritário.

Ainda de acordo com informações da bula da formulação Nortox™ 500 SC, este herbicida é altamente perigoso para o meio ambiente. Seus efeitos adversos em organismos não-alvo são conhecidos até certa extensão. Guimarães-Ervilha et al. (2025) realizaram uma meta-análise e encontraram fortes evidências na literatura de que a atrazina desregula o eixo HPG e também causa estresse oxidativo, levando a danos reprodutivos. Outros trabalhos também corroboram a via de estresse oxidativo, como Maia et al. (2024), que reportaram desregulação nas enzimas do metabolismo de ROS (do inglês, “Reactive Oxygen Species”), e Vieira et al. (2024), que sugeriram uma rede de AOP's para toxicidade da atrazina por meio de estresse oxidativo e morte celular. Entretanto, a maioria dos estudos com atrazina utilizaram concentrações altas, incompatíveis com as concentrações encontradas no ambiente, além de terem sido realizados em abordagens de curta duração (i.e. exposições agudas). Portanto, a literatura científica carece de dados oriundos de estudos crônicos com atrazina, em concentrações ambientalmente relevantes.

2.3. Efeitos tóxicos da atrazina em organismos não alvo

2.3.1 Toxicidade reprodutiva

Dada sua ação no eixo HPG, é plausível que a atrazina possua efeitos reprodutivos devido à disrupção hormonal. Guimarães-Ervilha et al. (2025) demonstraram em sua meta-análise de modelos murinos que a atrazina causa desbalanço no hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), testosterona no soro, testosterona intratesticular, estradiol e progesterona. Todos estes hormônios interferem no desenvolvimento e comportamento sexual dos animais, resultando em toxicidade reprodutiva.

A revisão de Sadeghnia et al. (2021) também revela extensa literatura sobre os danos reprodutivos da atrazina. Atrofia gonadal, dano aos tubos seminíferos e disrupção da linhagem de células germinativas estão entre os efeitos observados após administração de atrazina por 90 dias em ratos. Além disso, diminuição do volume testicular e aplasia também são comumente observados. Tão importante quanto as células germinativas são as células de Sertoli, responsáveis por dar sustentação,

proteção e nutrição às células germinativas, e as células de Leydig, responsáveis pela produção da testosterona. Esses dois tipos celulares também se encontraram alterados nos animais expostos a atrazina, apresentando menor quantidade de mitocôndrias e, muitas destas, apresentaram membranas rompidas e vacuolização da matriz mitocondrial.

Song et al. (2014) também revelaram danos bioquímicos causados pela atrazina. Nesse trabalho, os autores encontraram diminuição na lactato desidrogenase (LDH), que é importante no metabolismo anaeróbico do piruvato, e na succinato desidrogenase (SDH), também conhecida como complexo II na cadeia da fosforilação oxidativa. Estes resultados mostram um dano ao metabolismo aeróbico dos testículos. A atrazina também leva a apoptose patológica das células espermáticas (Fani et al., 2018). Esta apoptose está muito provavelmente ligada a estresse oxidativo, visto que diversos artigos já reportaram disrupção do metabolismo de ROS causado pela atrazina (Blahová et al. 2013, Maia et al. 2024, Song et al. 2014), corroborando com o mecanismo proposto por Vieira et al. (2024).

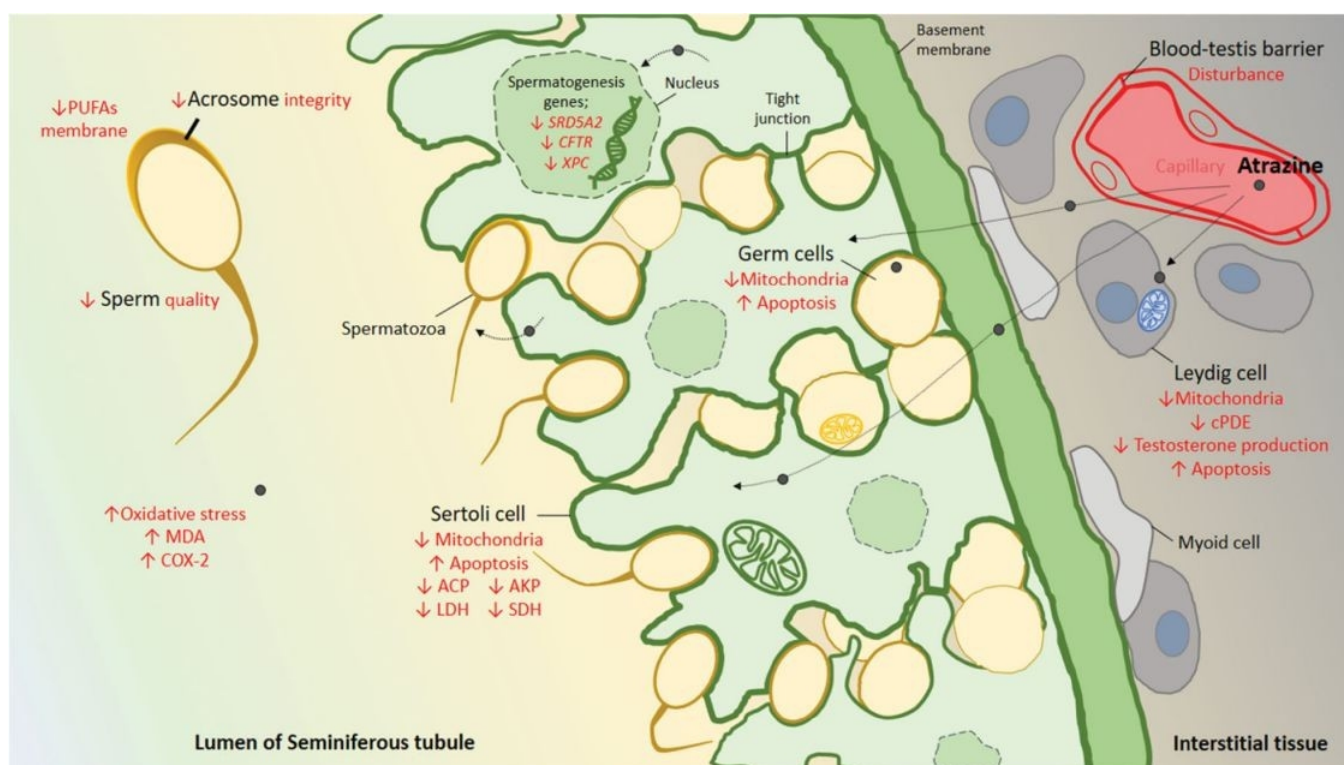


Figura 4. Efeitos adversos causados pela atrazina nos túbulos seminíferos e tecidos circundantes. Imagem retirada de Sadeghnia et al. (2021).

Os machos são especialmente afetados pela atrazina dada a diminuição da testosterona e aumento no estradiol e progesterona, no entanto, as fêmeas não ficam ilesas. Cragin et al. (2011) estudaram o efeito da atrazina na água do estado de Illinois,

EUA. Os autores aplicaram questionários a mulheres na pré-menopausa (18-40 anos) para obter dados do consumo individual de água, região onde moravam e características do seu ciclo menstrual. Com essa metodologia, os autores revelaram que a exposição à atrazina resultava em maior irregularidade no ciclo menstrual e alongamento da fase folicular.

Pogrmic-Majkic et al. (2018) também demonstraram que exposição de células da granulosa a atrazina causaram diminuição na produção de estradiol e progesterona estimuladas por FSH, além de diminuir a expressão de genes como STAR (proteína reguladora aguda esteroidogênica), CYP19A1 (citocromo P450) e LHCGR (Receptor do Hormônio Luteinizante/Coriogonadotrofina). Estes alvos são importantes no processo de ovulação, demonstrando a capacidade da atrazina de interferir neste processo. Yuan et al. (2017) também mostraram que, assim como nos machos, estresse oxidativo é fundamental para o prejuízo reprodutivo. Neste trabalho o autor mostra um aumento claro de ROS e uma diminuição de GSH em oócitos

2.3.2 Biomarcadores de estresse oxidativo e metabólico

O estresse oxidativo resulta do desbalanço entre o mecanismo antioxidante natural do indivíduo e a produção de ROS, por quaisquer motivos (Halliwell, 2007). Neste contexto, alguns biomarcadores se mostram úteis para medir e prever dano oxidativo, o que inclui as atividades das enzimas glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (Ho et al. 2013).

GST é uma enzima responsável por ligar xenobióticos a glutathione e facilitar sua eliminação, fazendo parte do sistema de detoxificação do organismo. Portanto, esta enzima é um importante biomarcador de dano oxidativo, por eliminar as substâncias químicas tóxicas (Pour et al. 2014). Além disso, GST também desempenha o papel de eliminar os produtos de peroxidação lipídica como MDA (malondialdeído) e 4-HNE (4-Hidroxinonenal), formados durante o estresse oxidativo (Singhal et al. 2015).

A GPx é responsável por converter o peróxido de hidrogênio, um dos principais precursores de radicais livres e causador de dano oxidativo, em água, prevenindo a formação de espécies altamente reativas. A CAT também tem como alvo o peróxido de hidrogênio, mas diferentemente da GPx, quebra o peróxido em água e oxigênio. Dito isso, ambas são de grande importância no metabolismo de ROS e servem como biomarcadores para medição do estresse oxidativo (Fanucchi, 2004).

LDH é uma importante enzima do metabolismo anaeróbico, responsável pela transformação de piruvato em lactato em condições anaeróbicas, neste processo, NADH é oxidado para que a transformação de gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato possa acontecer. Essa enzima é frequentemente utilizada como biomarcador de estresse em peixes e também é associada a dano oxidativo (Mokwatsi et al. 2016, Maharajan et al. 2018).

Yang et al. (2021) demonstraram o uso de CAT e MDA como biomarcadores de dano oxidativo causado pela atrazina em lagostim-vermelho, e de fato foram 2 dos marcadores mais afetados pela exposição, demonstrando sua sensibilidade. Adicionalmente, Santos & Martinez (2012) também mostraram que a atrazina é capaz de desregular não só CAT como também GST e GPx, confirmando mais uma vez a sensibilidade destes marcadores. Quanto a LDH, Maia et al. (2024) reportaram diferenças na atividade desta enzima em todas as concentrações de atrazina testadas em embriões de peixe-zebra, o que mostra a utilidade desse marcador.

2.3.3. AOP 492

AOP é uma abordagem que visa auxiliar órgãos regulatórios a tomar decisões baseadas no rápido acesso a dados mecanísticos de substâncias. Os AOP's descrevem relações entre um evento de iniciação molecular ("Molecular Initiating Event, MIE") a um efeito adverso ("Adverse Outcome, AO"), ou seja, um "endpoint" de toxicidade. Estes eventos são ligados por eventos-chave ("Key events, KE"), que medeiam o mecanismo de toxicidade (Delrue et al. 2016, OECD, 2017).

O AOP 492, publicado por Vieira et al. 2023, descreve um mecanismo de ação iniciado pela conjugação de um químico com a glutatona reduzida (GSH), levando sequencialmente à depleção da mesma, aumento de ROS, aumento da peroxidação lipídica e culminando em dano reprodutivo (Figura 5).

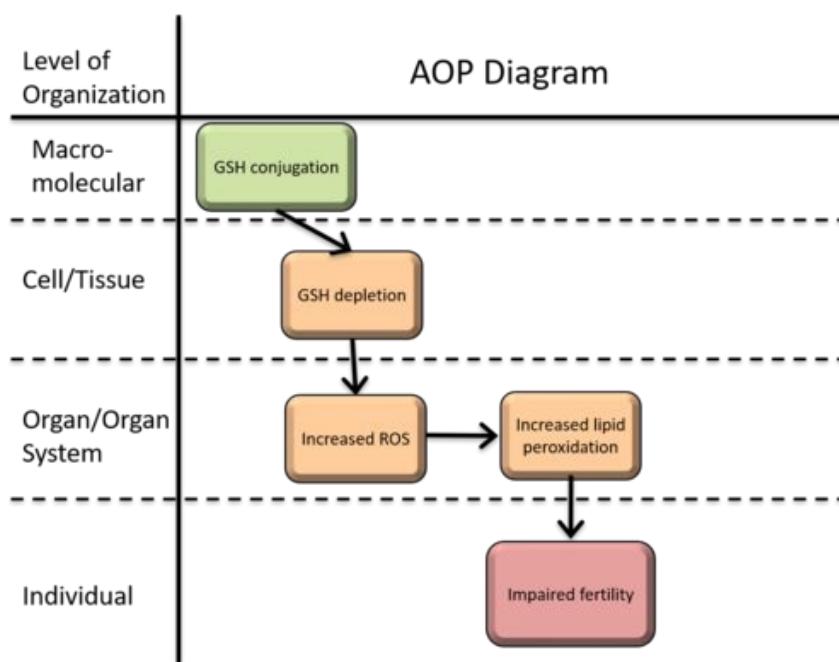


Figura 5. Fluxograma representativo do AOP 492.

Durante a construção do AOP 492, os autores usaram como estressor modelo a atrazina. Este herbicida foi utilizado para apoiar o estabelecimento dos eventos-chave (KEs) e das relações entre eventos-chave (“Key events relationships, KERs”) desse AOP. A atrazina é conhecida por induzir estresse oxidativo em vertebrados, por meio de conjugação com GSH, seguida pela depleção dos níveis de GSH.

Em 2024, Vieira e colaboradores ampliaram a compreensão mecanística da toxicidade reprodutiva da atrazina a partir da proposição de uma rede de AOP’s. Esta rede integra o conhecimento de outros AOP’s ao AOP 492, expandindo e aprofundando o mecanismo proposto para toxicidade reprodutiva da atrazina (Vieira et al. 2024). Neste trabalho, KE’s como apoptose e aumento de ROS são centrais para o dano reprodutivo, possuindo o maior “outdegree”, ou seja, levam/causam um maior número de eventos, como é possível ver na Figura 6.

O aumento de ROS causa uma grande ramificação na rede, levando a genotoxicidade secundária, aumento na peroxidação lipídica, aumento no dano ao DNA e aumento da ativação de fator nuclear kappa B, relacionado à sobrevivência celular. Já a apoptose está no final da cascata de eventos e é responsável por causar os principais efeitos adversos como diminuição na produção de ovos e fertilidade cumulativa, fertilidade prejudicada e diminuição na contagem de espermatozoides, revelando, novamente, como estes dois eventos são centrais para a toxicidade da atrazina.

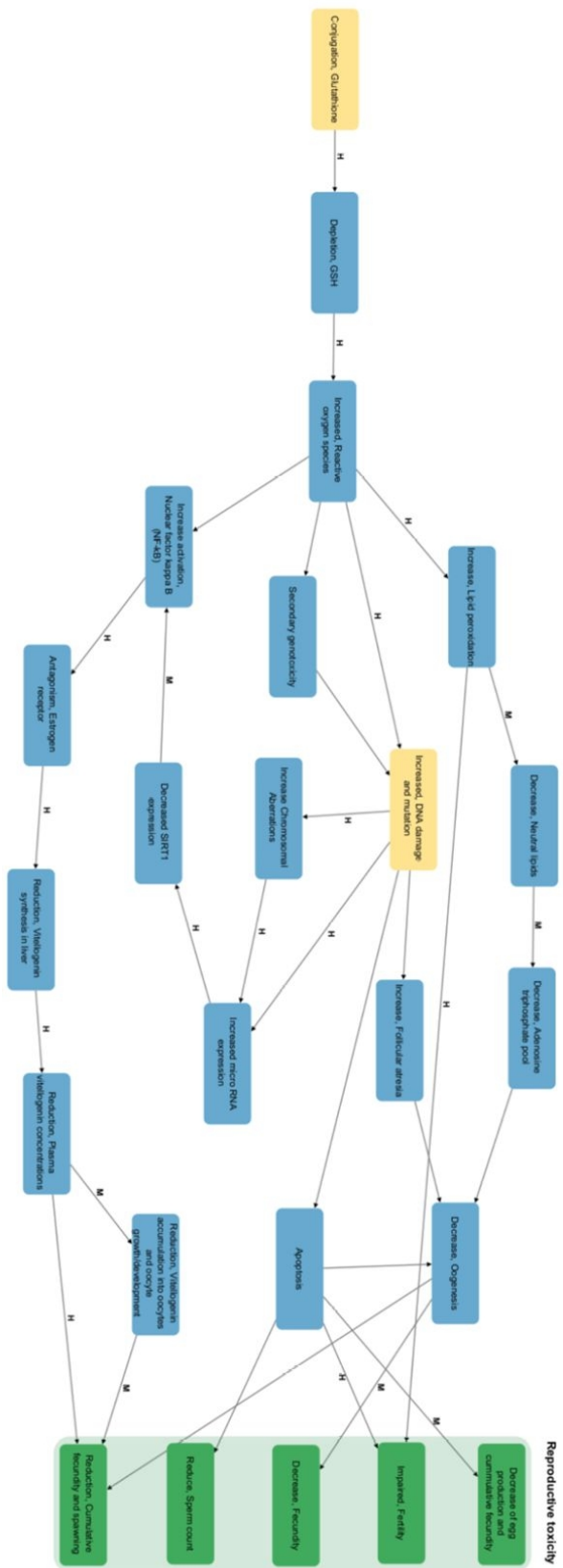


Figura 6. Rede deAOP's para toxicidade reprodutiva via estresse oxidativo. Retângulos amarelos indicam MIE's, azuis indicam KE's e verdes indicam AO's. Imagem retirada de Vieira et al. 2024.

2.4 Peixe-zebra

O peixe-zebra (*Danio rerio* ou *Brachydanio rerio*, em nomenclaturas mais antigas), também conhecido como paulistinha, é um peixe de águas doces tropicais nativo do sul asiático e pertencente à família dos ciprinídeos, que é compartilhada também pelos peixinhos-dourados (*Caurassius auratus*) e carpas (*Cyprinius carpio*). Seu nome deriva da presença de listras azuis horizontais, lembrando uma zebra. Podem medir até 4-5 cm de comprimento e vivem aproximadamente de 2 a 3 anos. Seu dimorfismo sexual se apresenta nas cores, onde os machos possuem listras alaranjadas/avermelhadas alternadas com as listras azuis, já as fêmeas possuem listras prateadas. Além disso, as fêmeas possuem um abdômen maior devido à presença dos ovários, como pode ser observado na Figura 7.



Figura 7. Peixes-zebra adultos. A fêmea (acima na imagem) pode ser facilmente distinguida do macho (abaixo) devido a seu abdômen maior e sua coloração mais prateada. Imagem retirada de Braunbeck & Lammer (2006).

O peixe-zebra vem se consolidando ao longo dos anos como um sistema modelo extremamente útil para estudos em toxicologia e ecotoxicologia. Isso se deve a algumas características da espécie que ajudam a pesquisa científica. Comparado aos modelos murinos, o peixe-zebra é muito menor e, portanto, requer consideravelmente menos espaço, recursos e mão de obra no seu cuidado. Além disso, seu ciclo de vida rápido acelera a obtenção de resultados nas pesquisas científicas. Adicionalmente, o embrião do peixe-zebra é transparente e permite uma fácil visualização de qualquer modificação no seu desenvolvimento, isto o tornou um modelo popular em estudos de desenvolvimento e toxicologia (Gonçalves et al., 2020).

Seu genoma já foi totalmente sequenciado, o que facilita a obtenção de linhagens sensíveis a determinadas condições ou linhagens com *Knockout/knockin* de genes específicos. Aproximadamente 85% dos alvos de drogas nos seres humanos possuem ortólogos de peixe-zebra e suas vias biológicas também são altamente compartilhadas, tornando-o um ótimo modelo também para estudos preliminares de drogas direcionadas a humanos (Gonçalves et al., 2020).

2.4.1. Biologia da reprodução do peixe-zebra

O peixe-zebra possui um ciclo de vida relativamente rápido, atingindo sua maturidade reprodutiva com aproximadamente 3 a 6 meses de idade. Fêmeas conseguem pôr centenas de ovos por reprodução, e uma média de 200 a 300 ovos por semana, o que permite análises de alto rendimento e experimentos de larga escala (Gonçalves et al., 2020).

Estes animais normalmente se reproduzem pela manhã e apresentam um comportamento de cortejo que difere entre macho e fêmea e pode ser dividido em algumas fases. Do lado do macho, o cortejo inicia-se com (i) a perseguição da fêmea, quando ele a segue de perto; em seguida, (ii) estabelece contato com o nariz ou a cauda dela; depois, (iii) passa a circular ao seu redor e (iv) nadar em torno da fêmea descrevendo um padrão em forma de “8”; por fim, (v) move rapidamente a cauda contra o corpo da fêmea. Já o comportamento das fêmeas envolve (i) aproximar-se repentinamente dos machos e (ii) nadar ao seu lado ou permanecer imóveis enquanto são seguidas; em seguida, (iii) escolhem um local adequado e (iv) realizam a deposição dos ovos. Caso a fêmea não seja agradada pela aproximação do macho, ela irá persegui-lo agressivamente, do contrário, caso ela seja receptiva ao cortejo do macho e permita

que ele execute as outras fases do cortejo, os dois indivíduos irão para um local de escolha da fêmea e alinham seus poros genitais e agitam suas nadadeiras caudais ao mesmo tempo que liberam seus respectivos gametas na água (Hoo et al., 2016).

O comportamento reprodutivo do peixe-zebra é afetado por diversos fatores, especialmente fotoperíodo, sendo o regime de 14 horas de luz e 10 horas de escuridão o mais comumente empregado. Além disso, estes animais preferem reproduzir próximos a objetos como plantas subaquáticas (Hoo et al., 2016).

O desenvolvimento sexual em mamíferos é regulado por muitos genes, um dos mais notórios dentre estes é o gene SRY (sex determining region Y). Todavia, o peixe-zebra carece deste gene e sua determinação sexual é complexa, podendo ser afetada por fatores ambientais como temperatura e disponibilidade de oxigênio. Geneticamente, é provável que o cromossomo 4 seja o cromossomo sexual. Já em termos de desenvolvimento, o peixe-zebra apresenta muita homologia, apresentando vários genes que também são importantes no desenvolvimento sexual de mamíferos, como o hormônio anti-Mulleriano (amh) e CYP19A1 (aromatase). Adicionalmente, estes animais também estão sujeitos a ação dos hormônios sexuais presentes em mamíferos como a testosterona e o estrogênio (Hoo et al., 2016).

3. Objetivos

3.1 Objetivos gerais

Investigar os efeitos da exposição crônica à atrazina sobre parâmetros reprodutivos e biomarcadores de toxicidade em peixe-zebra (*D. rerio*), utilizando concentrações teste que contemplam desde o limite legal deste contaminante em água potável até concentrações ambientalmente relevantes.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da exposição crônica a duas concentrações de atrazina sobre parâmetros reprodutivos de adultos peixe-zebra;
- Investigar os efeitos da exposição crônica à atrazina sobre a viabilidade e desenvolvimento dos embriões produzidos, no que concerne à presença de letalidade e efeitos subletais;
- Determinar biomarcadores de estresse oxidativo e metabólico nos órgãos reprodutivos em adultos de peixe-zebra expostos cronicamente à atrazina;
- Realizar análises histopatológicas dos órgãos reprodutivos de adultos de peixe-zebra expostos cronicamente à atrazina;
- Elucidar os impactos de uma concentração realística de atrazina em vertebrados aquáticos;
- Contribuir para avaliação da segurança do limite legal de atrazina em água potável no Brasil.

4. Metodologia

4.1. Reagentes

O herbicida atrazina (CAS 1912-24-9, 45330, 98% pureza) foi obtido do fabricante Merck Sigma-Aldrich® (Barueri, Brasil). O herbicida foi diluído em água deionizada para obter uma solução estoque de 10 mg/L, que foi mantida congelada (- 20 °C) até o momento das análises. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2. Definição das concentrações teste de atrazina

Foram escolhidas duas concentrações da atrazina para a exposição crônica de adultos de peixe-zebra. A mais baixa, de 0,4 µg/L, foi definida a partir da revisão de Brovini et al. (2021), que reportou diversos artigos que encontraram concentrações próximas a esta. Por sua vez, a mais alta, de 2,0 µg/L, é o limite máximo permitido pela legislação brasileira para sua presença em água potável (Conama, 2005; Ministério da saúde, 2021).

4.3. Adultos de peixe-zebra

Animais adultos, 54 machos e 54 fêmeas, com 6 meses de idade da linhagem AB, geração F4, foram fornecidos pela Unidade de Produção de Organismos Modelo Não-Convencionais (UniPOM), do Departamento de Biologia molecular (DBM) da Universidade federal da Paraíba (UFPB). Machos e fêmeas foram mantidos juntos em tanques de polipropileno com 20 L de água filtrada e decolorada, numa proporção de 1 peixe/L, contendo um filtro externo para filtração física, química e biológica da água. Os tanques foram mantidos em uma sala de experimentação com temperatura ($26 \pm 1^\circ \text{C}$) e fotoperíodo (14 h de claro e 10 h de escuro) controlados, além de monitoramento a cada 7 dias de parâmetros físico-químicos (pH, amônia, nitrito) da água. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (ColorBits, Tetra, Melle, Alemanha) e náuplios de artêmia 3 vezes por semana. Os peixes foram mantidos nestas condições durante o período de adaptação às condições experimentais e durante a exposição crônica à atrazina.

Todos os procedimentos com animais foram conduzidos de acordo com a Resolução Normativa CONCEA n 61 de 02 de maio de 2023, sendo previamente

aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) 1984040523.

4.4. Exposição crônica à atrazina

4.4.1. Adaptação dos peixes às condições experimentais

Previamente à exposição crônica à atrazina, os peixes foram submetidos a um período de adaptação às condições experimentais durante 2 semanas. Para tanto, os animais foram morfologicamente sexados e acomodados em grupos de 6 indivíduos do mesmo sexo em tanques de vidro, contendo 6 litros de água e aeração constante. A água utilizada durante o período adaptação às condições experimentais e de exposição ao herbicida foi oriunda de um sistema de circulação fechada de 500 L com todos os parâmetros de qualidade da água adequados e com uma microbiota bem estabelecida. Durante o período de adaptação, foi adicionado suplemento biológico (Stability, Seachem Laboratories, Madison, GA, EUA) e removedor de matéria orgânica (Pristine Seachem Laboratories, Madison, GA, EUA) de acordo com as orientações do fabricante, bem como foi feita troca total de água sempre que os níveis de amônia e nitrito estavam alterados.

Em paralelo, machos e fêmeas foram aleatoriamente selecionados para estimulação da reprodução. Assim, os animais, na proporção de 2 machos para 1 fêmea, foram colocados em tanques de reprodução de 1,7 L (Sloping Breeding Tank, Buggugiate, Itália) às 17h e, no dia seguinte, ao acender das luzes, foi removida a divisória do tanque para que machos e fêmeas pudessem ter contato e reproduzir. Após 1 h, os peixes foram devolvidos para os tanques de origem e, então, verificada a produção e viabilidade dos embriões. Durante o período de adaptação, foi oportunizado a todos os peixes terem contato com o tanque de reprodução e, consequentemente, ao condicionamento reprodutivo.

4.4.2. Exposição crônica

Ao término do período de adaptação, os peixes foram aleatoriamente reagrupados por sexo, para evitar reprodução dentro dos tanques de exposição, com 6 animais/tanque para obter 18 grupos experimentais conforme mostrado na Figura 8. Estes grupos foram divididos em três tratamentos: (i) Controle (água do sistema), (ii) Low (0,4 µg/L de atrazina) e (iii) High (2,0 µg/L de atrazina). Cada tratamento foi dividido em machos e

fêmeas, com três repetições por sexo. A exposição durou 5 semanas (i.e. 35 dias). Para avaliar os efeitos dos diferentes tratamentos com atrazina, machos e fêmeas do mesmo tratamento e repetição (p.ex. Controle Macho 1 (CM1) e Controle Fêmea (CF1); Low Macho 1 (LM1) e Low Fêmea 1 (LF1); High Macho 1 (HM1) e High Fêmea 2 (HF2)) foram selecionados aleatoriamente para reprodução conforme descrito no item anterior. As reproduções foram avaliadas em janelas semanais, onde foram realizadas até 3 tentativas de reprodução/tratamento/repetição a fim de se obter pelo menos uma reprodução. Após cada tentativa, os animais retornaram aos seus respectivos tanques e o sucesso ou falha da reprodução foi registrado. Foi estimada a frequência semanal de desovas a partir do cálculo: Frequência de desovas (%) = número de desovas por semana / número total de tentativas x 100.

Em seguida, os ovos foram retirados dos tanques de reprodução e sua quantidade e viabilidade foram inspecionados por microscopia óptica, num aumento de 40x (Televal 31, Zeiss, Alemanha). A viabilidade dos embriões com até 3 horas pós fertilização (hpf) foi atestada de acordo com as características morfológicas a seguir: (i) integridade do córion; (ii) distribuição uniforme do vitelo; (ii) clivagem regular e simétrica; (iv) delimitação do blastodisco; e (v) ausência de sinais de degeneração. Na Figura 9 é possível observar as diferenças entre um embrião viável e um inviável com sinal de degeneração. A viabilidade dos embriões foi calculada da seguinte forma: Viabilidade dos embriões (%) = número de embriões viáveis da mesma ninhada / número total de embriões x 100.

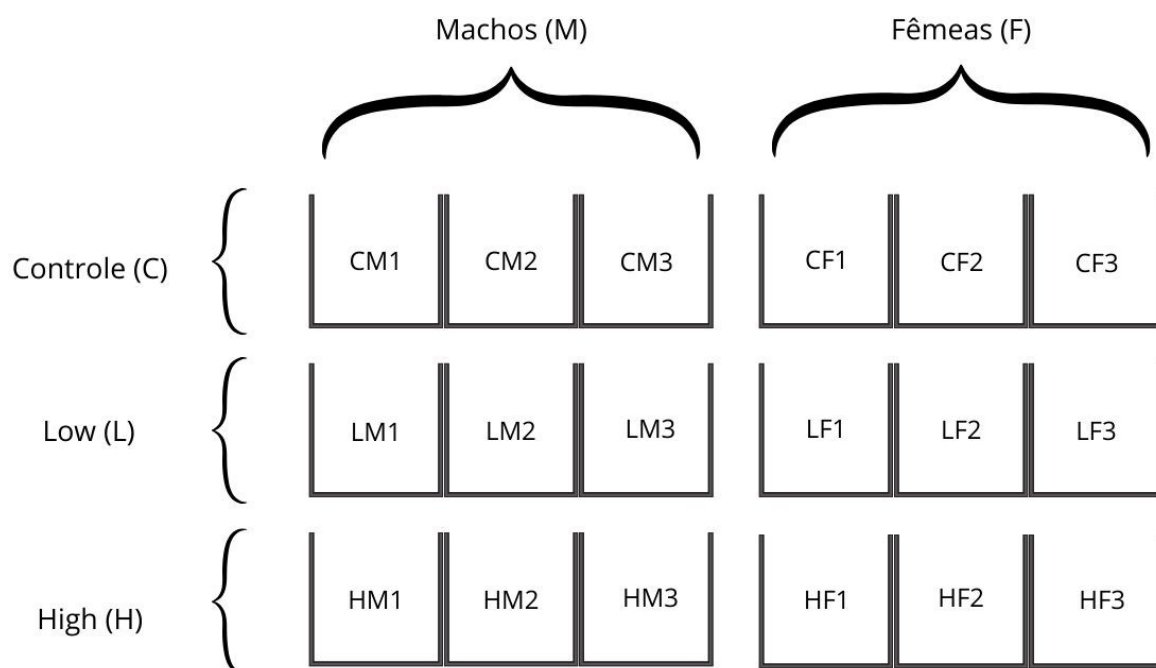


Figura 8. Representação esquemática da distribuição dos peixes por sexo e tratamento experimental: Controle = água dechlorada; Low = 0,4 ug de atrazina/L e High = 2,0 ug de atrazina/L. Cada tanque foi povoado com 6 animais, independente do sexo e tratamento, em 6,0 L de solução controle ou teste.

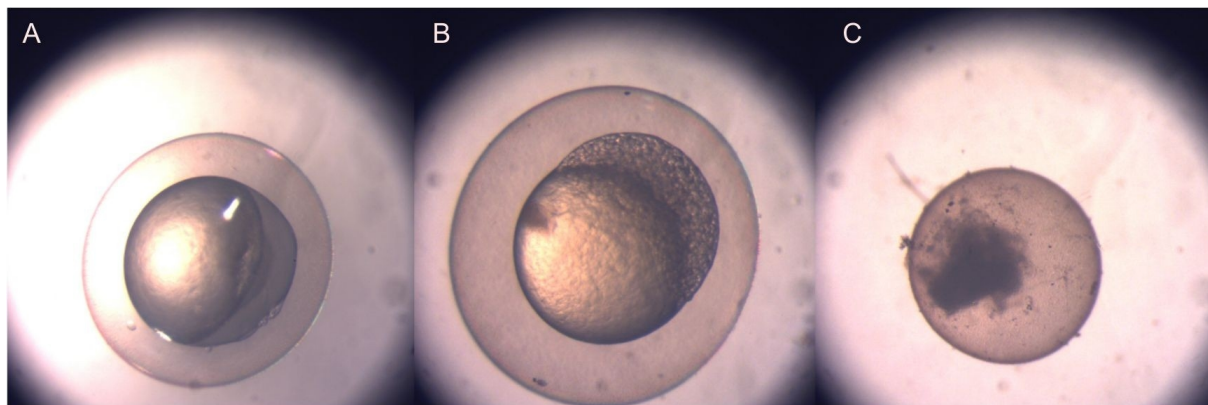


Figura 9. Morfologia de ovos e embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*) em diferentes condições de fertilização e desenvolvimento. A) ovo não fertilizado, não apresenta nenhuma clivagem, apesar de ter morfologia conservada; B) embrião fertilizado com aproximadamente 3 hpf (horas pós-fertilização) com padrão de clivagem e morfologia normais; e C) embrião coagulado, apresentando degeneração completa.

Os animais foram expostos nestas condições por 5 semanas, ao final deste período, os animais foram eutanasiados com óleo de cravo na concentração de 1,5 mL/L. Três peixes inteiros de cada tratamento foram colocados individualmente em tubos graduados de 15 mL contendo formalina tamponada 4% para análises histopatológicas. Os demais peixes foram, de forma individual, acomodados em papel absorvente para remoção do excesso de água e, então, foi procedida pesagem em balança analítica (ATX 224, Shimadzu, Japão) para obtenção do peso úmido. Em seguida, os peixes foram dissecados para remoção de testículos, ovários e fígados. Os órgãos foram também pesados e devidamente armazenados em microtubos de plástico de 1,5 mL, contendo reagentes específicos para a realização das análises posteriores.

4.4.3. Acompanhamento do desenvolvimento dos embriões

Após cada reprodução, 50 embriões viáveis/repetição/tratamento foram acomodados em placas de 96 poços, contendo 300 uL de meio embrionário E3, e tiveram seu desenvolvimento acompanhado durante 4 dias. Nesta janela de tempo, qualquer

desvio do desenvolvimento normal e/ou malformações foram contabilizadas para posterior comparação.

4.4.4. Cálculo do peso úmido relativo dos órgãos reprodutivos

O peso úmido relativo (%) dos órgãos reprodutivos ($n = 15/\text{sexo}/\text{tratamento}$) foi determinado a partir da razão entre o peso úmido de cada órgão e o peso corporal total do peixe, de acordo com a seguinte fórmula: $\text{peso úmido do órgão (g)} / \text{peso corporal total (g)} \times 100$.

4.5. Biomarcadores enzimáticos

Após a eutanásia e dissecação dos animais, os tecidos reprodutivos de 3 peixes machos e 3 fêmeas de cada tratamento foram armazenados de forma individual por peixe/tratamento/repetição em microtubos de 1,5 mL, contendo quantidade de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, suficiente para cobrir as amostras para posteriores análises enzimáticas. Os órgãos foram armazenados congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises.

Os órgãos reprodutivos de machos e fêmeas de todos os tratamentos foram descongelados em banho de gelo e, em seguida, macerados com o auxílio de um pistilo de polipropileno para microtubos. Os homogenatos foram centrifugados a $2.500\text{--}3.000 \times g$, por 10 min., à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, e os sobrenadantes resultantes foram utilizados para dosagem do teor de proteínas solúveis e da atividade de enzimas biomarcadoras de toxicidade. Foram mensuradas as atividades das enzimas CAT, GPx, GST e LDH.

A quantificação das proteínas solúveis do sobrenadante foi determinada através do método fotolorimétrico desenvolvido por Bradford (1976). Inicialmente, uma curva padrão com albumina sérica bovina foi construída e a absorbância das amostras foi lida em um comprimento de onda de 595 nm, utilizando a leitora de microplacas Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific Oy, Finlândia). As leituras foram feitas em quadruplicata.

O procedimento para determinação das atividades da LDH e GST é muito bem descrito por Domingues et al., (2010). A atividade de GPx foi medida de acordo com Martins et al. (2024) e catalase foi medida de acordo com Claiborne (1985). Todas as metodologias se baseiam em quantificação fotolorimétrica de produtos oriundos

formados por reações específicas catalisadas por cada uma das enzimas testadas. Os testes foram feitos em quadruplicatas para cada teste.

4.6. Quantificação de malondialdeído (MDA)

Após a eutanásia e dissecação dos animais, tecidos reprodutivos de 6 peixes machos e 3 fêmeas de cada tratamento foram armazenados de forma individual por peixe/tratamento/repetição em microtubos de 1,5 mL, contendo 200 µl de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4. Os órgãos foram armazenados congelados a -20 °C até o momento das análises.

Os tecidos destinados à quantificação de MDA foram descongelados em banho de gelo e, então, pesados individualmente. Em seguida, os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de um pistilo e centrifugados a 12.000 rpm, por 15 min. Após este processo, o sobrenadante foi retirado, armazenado e congelado à - 20 °C até o momento das análises.

Para quantificação de MDA nos testículos o sobrenadante foi diluído 2 vezes, enquanto para os ovários foi diluído 4 vezes. O malondialdeído (MDA) foi quantificado por meio da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um complexo MDA-TBA de coloração rosada, cuja absorbância foi medida em espectrofotômetro a 532 nm, conforme metodologia descrita por Draper et al. (1990).

4.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o uso de scripts Python (versão 3.11) com as bibliotecas Numpy (1.24.0), Scipy (1.13.0), Pandas (1.5.2) e Matplotlib (3.8.2). As análises de viabilidade e da frequência de endpoints de toxicidade foram feitas por teste chi-quadrado de independência. Os dados de atividade enzimática e peroxidação lipídica foram analisados pelo teste de Shapiro-wilk para medir sua normalidade, dados que seguiram distribuição normal foram analisados por ANOVA unidirecional e, posteriormente, por teste post-hoc de Tukey. Dados que não seguiram distribuição normal foram analisados por teste de Kruskal-wallis, seguido por teste post-hoc de Dunn. Todos os testes realizados usaram $p < 0.05$.

5. Resultados

5.1. Reprodução, viabilidade e desenvolvimento dos embriões

O sucesso da reprodução foi verificado a partir da frequência semanal de desovas (%) (Figura 10) e da viabilidade dos embriões (%) (Figura 11), que foram obtidos a partir de dados coletados ao longo das cinco semanas da exposição crônica às diferentes concentrações de atrazina. Foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na frequência de desovas entre os grupos apenas nas semanas 3 e 4, com os peixes do tratamento High mostrando uma maior sensibilidade. Isto fica claro quando se nota que os animais do referido tratamento pararam de reproduzir na 4ª semana, o que significa uma semana antes daqueles dos demais tratamentos. O tratamento Controle apresentou as maiores taxas de viabilidade em todas as semanas (variou de 44 a 78%), sendo seguido pelo Low (30 a 58%) e High (0 a 36%).

Apesar das diferenças significativas entre o controle e os testes ($p < 0,05$), os diferentes tratamentos seguiram uma tendência similar de aumento da viabilidade no decorrer das três semanas iniciais, seguida de uma queda a partir da 4ª semana. O grupo High (2 µg/L) foi o mais afetado, apresentando não apenas a menor frequência de desovas, mas também a menor viabilidade embrionária ao longo de todas as semanas.

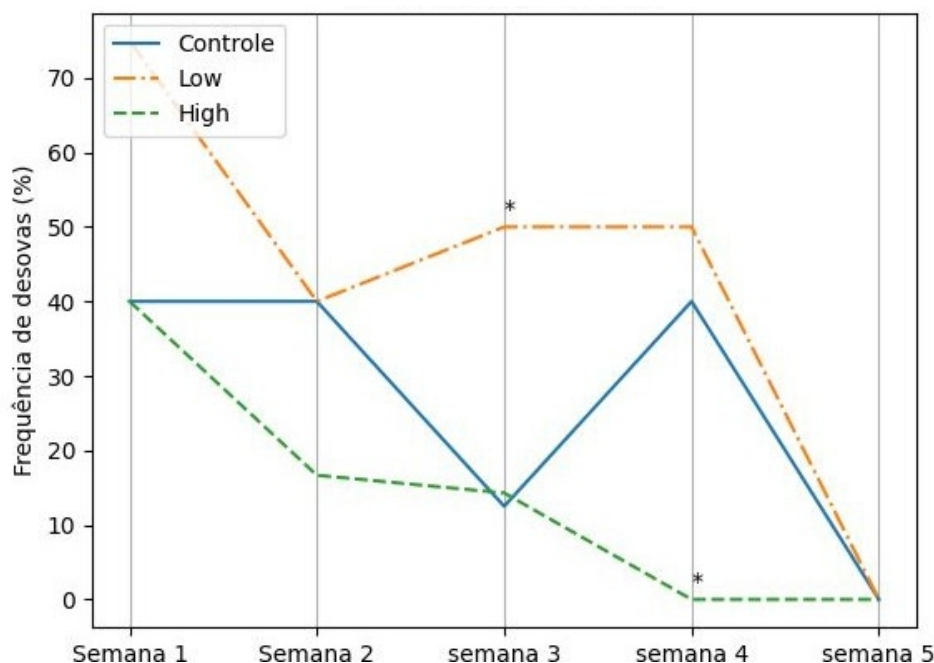


Figura 10. Variação da frequência de desovas (%) ao longo das semanas de exposição à diferentes concentrações de atrazina em comparação ao grupo controle. Controle: peixes

machos e fêmeas mantidos somente em água dechlorada; Low: peixes mantidos em água dechlorada contendo 0,4 µg/L; High: peixes mantidos em água dechlorada contendo 2,0 µg/L. Dados analisados por teste Chi-quadrado de independência e com asterisco significando diferença significativa em comparação ao controle (*: $p < 0,05$).

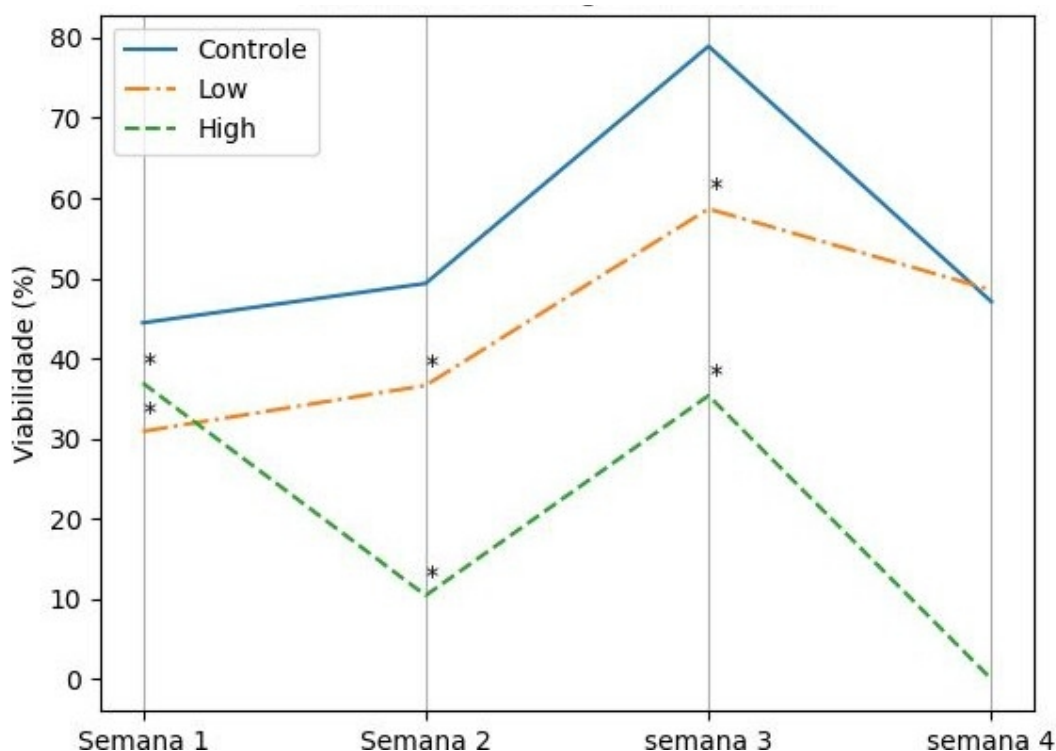


Figura 11. Variação da viabilidade (%) dos embriões ao longo das quatro primeiras semanas de exposição à diferentes concentrações de atrazina em comparação ao grupo controle. Controle: peixes machos e fêmeas mantidos somente em água dechlorada; Low: peixes mantidos em água dechlorada contendo 0,4 µg/L; High: peixes mantidos em água dechlorada contendo 2,0 µg/L. Dados analisados por teste Chi-quadrado de independência e com asterisco significando diferença significativa do controle (*: $p < 0,05$).

5.2. Acompanhamento do desenvolvimento

A prole dos animais expostos não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) no efeito adverso coagulação quando comparado ao Controle, exceto pela 2ª (Controle: 11,36% de coagulação e Low: 23,00%) e 4ª (Controle: 8,00% e Low: 20,88%) semanas, mas ainda assim dentro do esperado da taxa de mortalidade espontânea para embriões de peixe-zebra. O efeito atraso de eclosão foi significativamente ($p < 0,05$) mais alto no

tratamento Low, com exceção da 4ª semana, onde o Controle apresentou aumento e o Low mostrou diminuição desta taxa (Controle: 42,00% de atraso na eclosão e Low: 14,29%). O efeito falta de pigmentação no segundo dia de desenvolvimento não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, a não ser por momentos pontuais como o grupo Low na 3ª semana e o grupo High na 1ª semana.

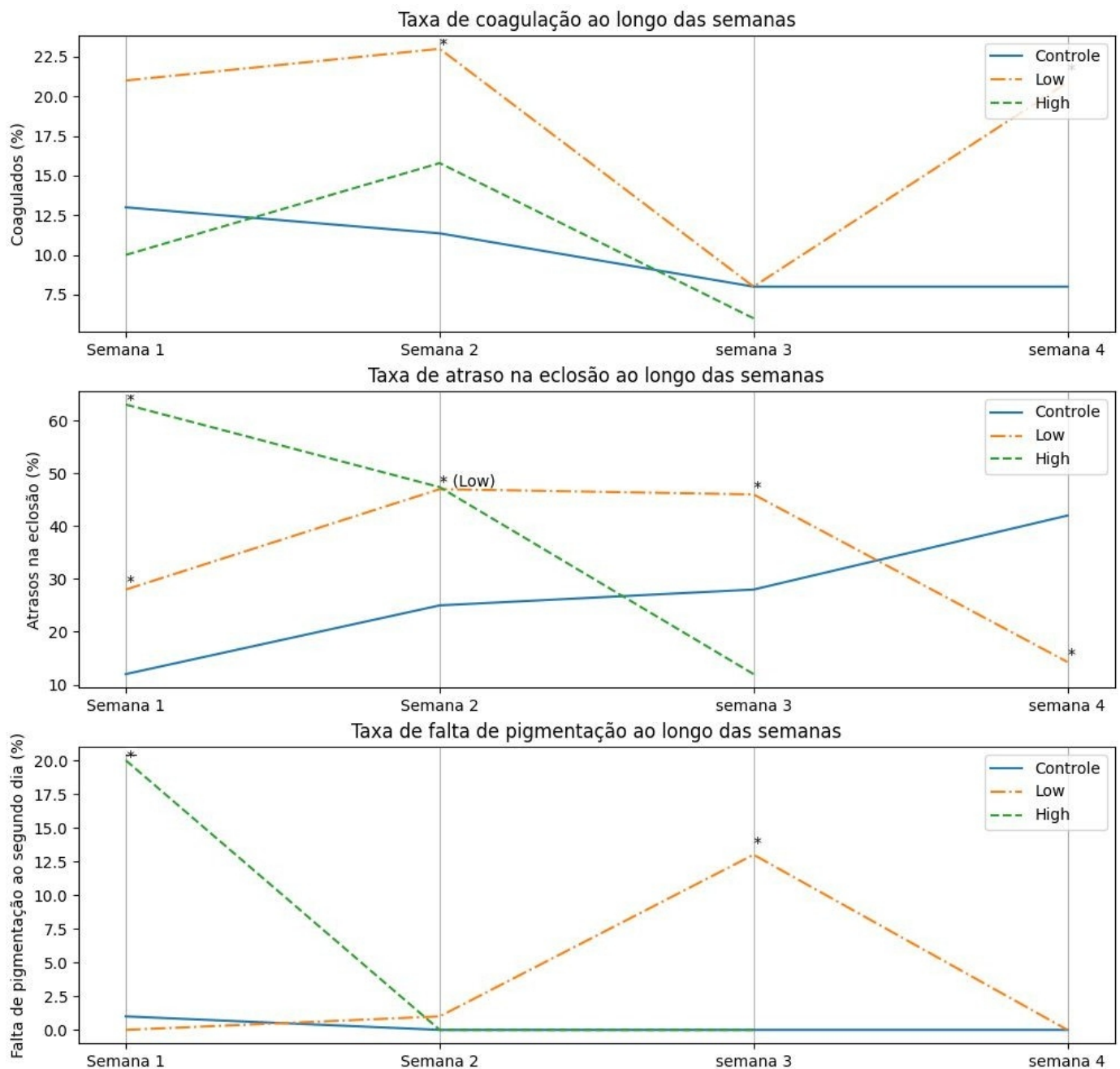


Figura 12. Frequência (%) de efeitos adversos observados em embriões de peixe-zebra

obtidos durante a exposição crônica a diferentes concentrações de atrazina em comparação ao tratamento controle. A frequência foi calculada como uma porcentagem do total de embriões analisados. Controle: peixes machos e fêmeas mantidos somente em água decolorada; Low: peixes mantidos em água decolorada contendo 0,4 µg/L; High: peixes mantidos em água decolorada contendo 2,0 µg/L. Dados foram analisados por teste Chi-quadrado de independência e com asterisco significando diferença significativa do controle (*:p<0.05).

5.3. Peso úmido relativo (%) dos órgãos reprodutivos

A atrazina não demonstrou efeito significativo no peso úmido relativo (%) dos órgãos reprodutivos, em nenhuma das concentrações utilizadas (0.4 e 2 µg/L), quando comparadas ao Controle (p > 0.05) (Tabela 1).

Tratamento	Peso úmido relativo (%) dos órgãos reprodutivos	
	Machos	Fêmeas
Controle	1.66 ± 0.98	10.58 ± 4.08
Low	1.17 ± 0.70	11.37 ± 6.89
High	1.00 ± 0.67	12.06 ± 5.77

Tabela 1. Peso úmido relativo (%) dos órgãos reprodutivos de peixes machos e fêmeas expostos de forma crônica (35 dias) à atrazina em diferentes concentrações. Controle: peixes machos e fêmeas mantidos somente em água decolorada; Low: peixes mantidos em água decolorada contendo 0,4 µg/L; High: peixes mantidos em água decolorada contendo 2,0 µg/L. Dados estão apresentados como média ± desvio padrão. Não foram verificadas diferenças significativas (p > 0,05) nos grupos teste quando comparados ao controle por ANOVA.

5.4. Biomarcadores enzimáticos e peroxidação lipídica

As gônadas dos peixes machos e fêmeas expostos à atrazina em diferentes concentrações ou mantidos somente em água foram devidamente processadas e analisadas quanto à atividade de biomarcadores enzimáticos de estresse oxidativo (CAT, GST e GPX) e metabólico (LDH).

De forma geral, as atividades de CAT, GST e LDH mostraram uma dependência em relação à concentração de atrazina da exposição, bem como em relação ao sexo. A quantificação da atividade da CAT demonstrou uma queda significativa na sua atividade nos grupos de machos expostos à atrazina quando comparados ao controle (Controle: $4,9 \pm 3,5$; Low: $2,2 \pm 0,8$ e High: $2,2 \pm 1,5$ mMol/min/mg; $p < 0,05$) (Figura 13D). Por sua vez, o ensaio de GST demonstrou aumento significativo da atividade enzimática nas fêmeas de todos os grupos expostos à atrazina quando comparados ao controle (Controle: $19,6 \pm 4,6$; Low: $24,2 \pm 4,6$ e High: $26,2 \pm 1,8$ μ Mol/min/mg; $p < 0,05$) (Figura 13B). A quantificação da LDH demonstrou aumento significativo da atividade enzimática nos peixes machos expostos à concentração High ($230,0 \pm 98,2$ μ Mol/min/mg; $p < 0,05$) e nas fêmeas expostas à concentração Low ($17,3 \pm 8,7$ μ Mol/min/mg), quando comparados ao controle (machos: $139,3 \pm 69,5$ e fêmeas: $10,7 \pm 4,6$; $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 13A). No caso da atividade da GPX, não foi verificada nenhuma diferença entre os tratamentos teste e controle (Machos - Controle: $1,8 \pm 0,6$; Low: $1,45 \pm 1,1$ e High: $2,6 \pm 1,7$. Fêmeas - Controle: $0,4 \pm 0,1$; Low: $0,3 \pm 0,1$ e High: $0,4 \pm 0,1$ nMol/min/mg; $p < 0,05$) (Figura 13C).

Da mesma forma feita para as enzimas, as gônadas dos peixes machos e fêmeas, expostos às diferentes concentrações de atrazina ou mantidos somente em água, foram analisadas quanto ao acúmulo de MDA, um indicador de peroxidação lipídica (Figura 14). A atrazina não demonstrou efeito significativo ($p > 0,05$) no acúmulo de MDA nos tecidos reprodutivos em nenhuma das concentrações testadas (0,4 e 2,0 μ g/L), quando comparadas com o controle (Machos - Controle: $131,2 \pm 62,2$; Low: $129,0 \pm 33,6$ e High: $130,5 \pm 10,9$. Fêmeas - Controle: $46,5 \pm 5,5$; Low: $44,2 \pm 16,5$ e High: $52,8 \pm 4,9$ μ Mol/mg; $p < 0,05$).

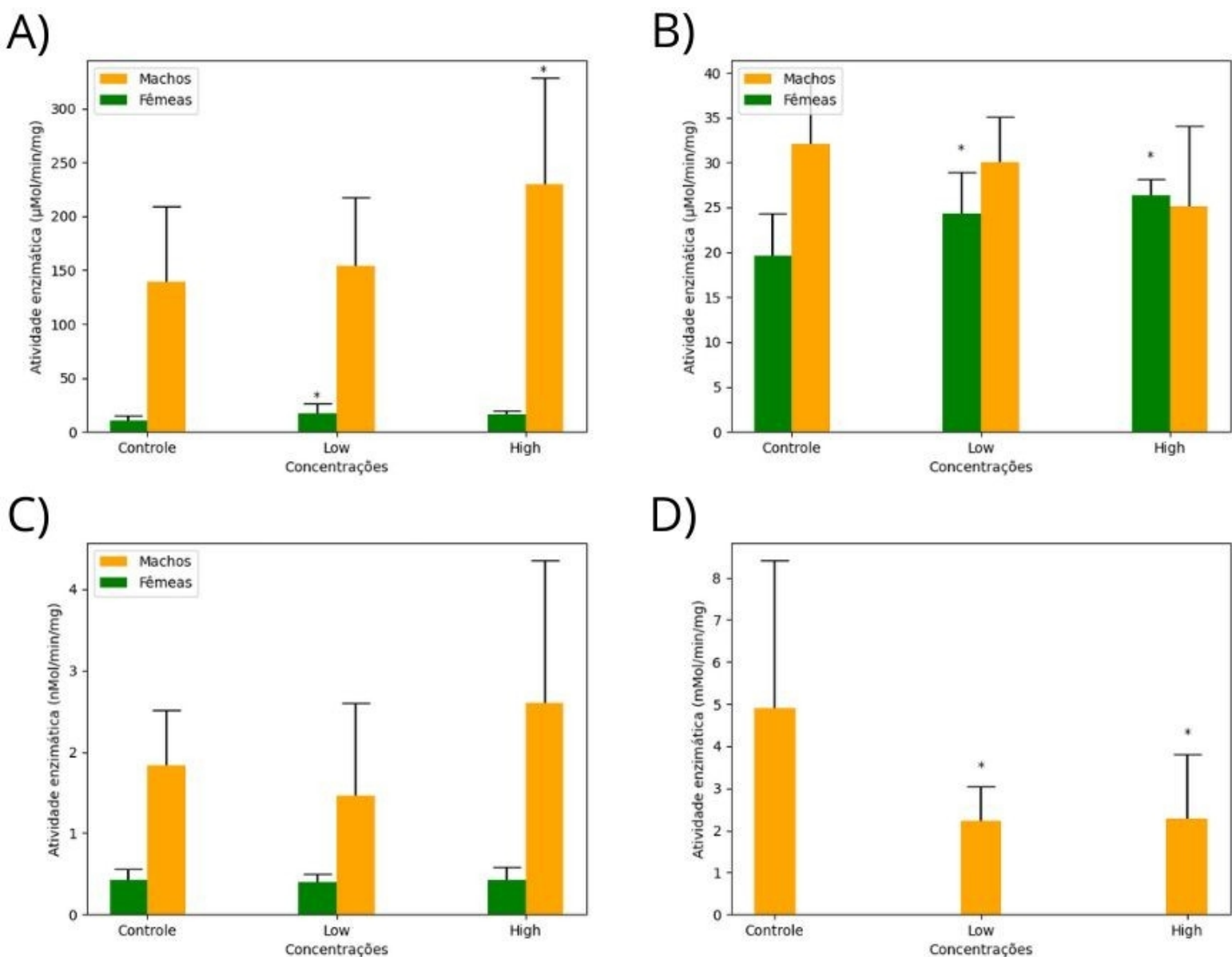


Figura 13. Biomarcadores enzimáticos em gônadas de peixes machos e fêmeas expostos à atrazina em diferentes concentrações ou mantidos somente em água dechlorada. A) Lactato desidrogenase (LDH); B) Glutathiona-S-transferase (GST); C) Glutathiona peroxidase (GPx) e D) Catalase (CAT). O cálculo de atividade de catalase não foi possível para as fêmeas devido a alta variabilidade dos dados. Controle: peixes machos e fêmeas mantidos somente em água dechlorada; Low: peixes mantidos em água dechlorada contendo 0,4 μg/L; High: peixes mantidos em água dechlorada contendo 2,0 μg/L. Dados estão dispostos como média ± desvio padrão e foram analisados por ANOVA seguido de teste pós-hoc de Tukey (para dados normais) ou teste de Kruskal-Wallis seguindo por teste pós-hoc de Dunn e com asterisco significando diferença significativa do controle (*:p<0.05).

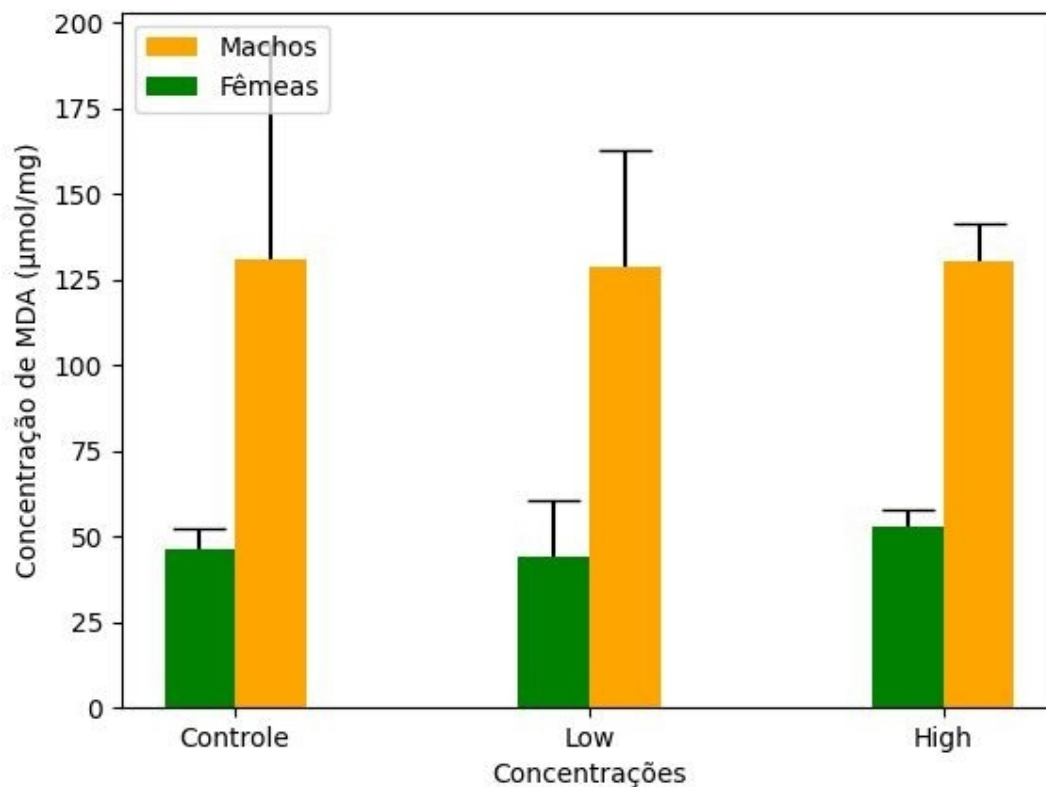


Figura 14. Determinação de peroxidação lipídica a partir da quantificação de malondialdeído (MDA) em gônadas de peixes machos e fêmeas expostos à atrazina em diferentes concentrações ou mantidos somente em água dechlorada. Controle: peixes machos e fêmeas mantidos somente em água dechlorada; Low: peixes mantidos em água dechlorada contendo 0,4 $\mu\text{g/L}$; High: peixes mantidos em água dechlorada contendo 2,0 $\mu\text{g/L}$. Dados estão dispostos como média $\pm$ desvio padrão e foram analisados por ANOVA seguido de teste pós-hoc de Tukey (para dados normais) ou teste de Kruskal-Wallis seguindo por teste pós-hoc de Dunn e com asterisco significando diferença significativa do controle (*: $p < 0.05$). Análise da concentração de malondialdeído (MDA). Dados estão dispostos como média $\pm$ desvio padrão. Não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nos grupos teste quando comparados ao controle por Kruskal-Wallis.

6. Discussão

6.1 Reprodução e viabilidade

Este trabalho realizou uma exposição de 35 dias de adultos de peixe-zebra, de ambos sexos, expostos a concentrações distintas do herbicida atrazina: uma concentração já reportada no ambiente (0,4 µg/L) e outra que é o limite legal de atrazina em água potável (2,0 µg/L). Com base nos dados obtidos no controle (i.e. peixes mantidos somente em água declorada), foi possível avaliar parâmetros reprodutivos dos peixes, viabilidade e desenvolvimento de embriões, bem como análises de biomarcadores de toxicidade nas gônadas de machos e fêmeas.

No que diz respeito à frequência de desovas, o tratamento Controle mostrou aumento contínuo do número de reproduções até a terceira semana, apresentando uma queda brusca a partir da quarta semana. Apesar de ter um número menor de reproduções, o tratamento Low mostrou a mesma tendência. Evidenciando ser um resultado dependente da concentração, o tratamento High apresentou a menor frequência de desovas, parando de reproduzir na quarta semana, ou seja, uma semana antes dos demais grupos.

A taxa de viabilidade dos embriões mostrou uma tendência similar àquela da frequência de reprodução, mostrando que a exposição à atrazina reduz a viabilidade embrionária de forma concentração dependente. Bautista et al. (2018) mostraram que a atrazina é capaz de reduzir a qualidade dos espermatozóides de peixes-zebra expostos por apenas 11 dias. Até mesmo a concentração mais baixa testada (2 µg/L), causou diminuição na motilidade, na funcionalidade mitocondrial e integridade membranar dos espermatozóides. É possível que a redução da viabilidade dos ovos dos grupos expostos à atrazina no presente trabalho tenha sido, pelo menos em parte, causada pela diminuição da qualidade dos espermatozóides. No entanto, a inviabilidade dos embriões não se deveu apenas a ovos não fertilizados, mas também a ovos fertilizados que apresentaram deformações. Tendo ainda como referência o trabalho de Bautista et al. (2018), esses desvios no desenvolvimento poderiam ser melhor explicados pela redução da qualidade dos ovos liberados pelas fêmeas, já que a integridade do DNA dos espermatozoides não foi afetada pela atrazina, segundo esses autores.

Wirbisky et al. (2016) mostraram que fêmeas adultas de peixe-zebra expostas a atrazina na fase embrionária (30 ppb) tiveram maior incidência de atresia folicular, o que

indica efeitos danosos da atrazina na reprodução feminina. Ainda de acordo com os mesmos autores, os descendentes (geração F1) também apresentaram alterações morfológicas como diminuição da cabeça em relação ao corpo, indicando dano genético e transgeracional. É importante ressaltar que no trabalho de Wirbisky et al. (2016) os animais foram expostos na fase embrionária, reconhecidamente mais sensível a poluentes, e, portanto, não se sabe se esses efeitos prejudiciais se estendem para animais adultos como neste trabalho. De acordo com nossas pesquisas, não há trabalhos publicados demonstrando diminuição na qualidade dos ovos em peixes adultos expostos à atrazina.

Apesar da diferença significativa na viabilidade, o controle também demonstrou uma diminuição na frequência de reproduções e na viabilidade dos embriões nas últimas semanas do experimento. Esta diminuição foi, provavelmente, causada por exaustão reprodutiva dos animais devido às tentativas constantes de reprodução que levaram os peixes a produzirem e/ou liberarem menos gametas.

6.2 Desenvolvimento dos embriões

Embriões viáveis, das reproduções de todos os tratamentos, foram acompanhados durante 4 dias (1 a 96 hpf) quanto à presença de mortes e malformações. Durante todo o período, foram verificados apenas três efeitos tóxicos: coagulação, falta de pigmentação no segundo dia e atraso de eclosão. A coagulação dos embriões não apresentou diferença significativa quando os tratamentos teste foram comparados ao controle ao longo do tempo, exceto por uma diferença pontual no tratamento Low na segunda semana da exposição. Ainda assim, o percentual de embriões coagulados foi próximo a 20%, o que está dentro da faixa de normalidade para mortalidade espontânea (5 a 25%) de algumas linhagens de peixe-zebra (Fraysse et al., 2006). Já foi reportado por Maia et al. (2024) uma alta taxa de coagulação em embriões de peixe-zebra expostos a atrazina, mas fazendo uso de concentrações em várias ordens de magnitude superiores àquelas usadas no presente estudo. Isso deixa clara a importância da realização de exposições de contaminantes em concentrações ambientalmente relevantes a fim de se inferir sobre seus riscos de forma mais realística.

Foram verificadas taxas significativas de atraso na eclosão dos embriões dos tratamentos da atrazina em comparação ao tratamento controle, mas não de forma contínua ao longo das semanas de exposição. Além disso, o tratamento controle também

apresentou uma tendência crescente da presença desse efeito, mostrando taxa de coagulação superior ao tratamento Low ao final da exposição. Dessa forma, é difícil estabelecer qualquer correlação entre o atraso da eclosão e a exposição à atrazina. É normal que uma mesma ninhada de peixes-zebra ecloda em momentos esporádicos ao longo de todo o terceiro dia de desenvolvimento, ocasionalmente até depois desse período. Além disso, embriões que eclodiram não estão mais desenvolvidos que os que ainda estão dentro do coriön em um mesmo período de tempo (Kimmel et al., 1995). Outro aspecto a ser considerado, é que possa ter ocorrido variações das condições microambientais dos embriões, tais como oxigenação, que podem ter alterado seu tempo de eclosão.

Também foi observado durante o desenvolvimento dos embriões a falta de pigmentação apenas no segundo dia de vida nos tratamentos com atrazina, mas de forma transiente.

6.3 Biomarcadores enzimáticos e peroxidação lipídica

As gônadas de peixes machos e fêmeas dos tratamentos com atrazina e daqueles mantidos apenas em água dechlorada foram analisadas quanto a atividade de enzimas biomarcadoras de toxicidade, além da quantificação do marcador de peroxidação lipídica MDA. Assim como a diminuição na atividade de CAT observada no presente trabalho, Blahová et al. (2013) também encontraram redução significativa na atividade dessa enzima. Isto demonstra a consistência deste marcador e o impacto da atrazina no metabolismo de ROS. CAT é uma das enzimas mais abundantes do metabolismo de ROS, o que pode ser facilmente inferido pela sua atividade na ordem de mmol, enquanto outras enzimas estão na ordem de nmol ou μ mol. Esta redução consistente da CAT ao longo da literatura evidencia um prejuízo na capacidade de lidar com estresse oxidativo nos animais expostos a esse herbicida. Entretanto, o presente trabalho não encontrou diferenças significativas na atividade de GPx, diferente de Blahová et al. Neste mesmo trabalho, os autores encontraram um acúmulo significativo de MDA nas concentrações mais altas testadas de 30 e 90 μ g/L, enquanto nas concentrações próximas às do presente trabalho também não reportaram este acúmulo. Portanto, é possível inferir que MDA não seja um marcador tão sensível, apenas sendo alterado em concentrações mais altas.

Poucos estudos analisaram LDH como um marcador para exposição de atrazina em peixe-zebra. Maia et al. (2024) encontraram uma diminuição na atividade de larvas expostas a atrazina. No entanto, essa diminuição foi observada em larvas em exposição aguda a altas concentrações. Muniz et al. (2021) e Abarikwu et al. (2012)²⁵ também encontraram um aumento da atividade de LDH em exposição a substâncias distintas (moxidectina e atrazina, respectivamente). A LDH é responsável pela transformação de piruvato em lactato em condições anaeróbicas, neste processo, NADH é oxidado para que a transformação de gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato possa acontecer. Neste contexto, um aumento na sua atividade demonstra um aumento no metabolismo anaeróbico da célula, podendo ser causado por um dano a cadeia fosforilativa, o que acarretaria na maior liberação de ROS e maior dano tecidual. De fato, Song et al. (2014) demonstraram também uma diminuição na atividade de SDH, enzima importante na etapa da fosforilação oxidativa, em ratos expostos à atrazina, indicando dano ao metabolismo aeróbico. Portanto, o aumento na atividade de LDH demonstrado no presente trabalho pode indicar uma tentativa de compensação metabólica pelas células. O aumento consistente desta enzima na literatura mostra a robustez deste marcador para dano oxidativo/tecidual e seu aumento mostra a interferência da atrazina no metabolismo aeróbico e seu potencial de causar dano tecidual mesmo em pequenas concentrações. Isto pode explicar os atrasos na eclosão por meio do dano ao metabolismo.

É digno de nota também, que LDH apresentou uma atividade muito maior em machos do que em fêmeas expostos à atrazina. Isso pode ser explicado pela transcrição diferencial das isoenzimas da LDH nos testículos e nos ovários. Segundo a base de dados NCBI, o gene para a isoenzima *ldhc*, também conhecida como *Ldh3*, apresenta um TPM ("Tags per million", transcritos por milhão) de 1.111,09 nos testículos de *Mus musculus*, que é extremamente maior que o TPM de 0,067 nos ovários. Essa diferença também acontece com as outras isoenzimas da LDH, apesar de não serem tão extremas. A isoenzima *ldha* apresenta TPM de 353,6 em testículos e 141,8 em ovários, já *ldhb* é mais abundante em ovários, com um TPM de 130 contra 50,5 em machos. Somando as 3 isoenzimas, é possível concluir que a LDH é muito mais abundante em machos do que fêmeas. Isso provavelmente se dá pela preferência por piruvato e lactato em detrimento da glicose durante a espermatogênese. A importância da LDH para o metabolismo dos espermatozoides é evidenciada também pela inibição da isoenzima *ldhc* que ocasiona infertilidade (Odet et al. 2009).

GST é responsável por ligar GSH a moléculas tóxicas e facilitar sua eliminação. O presente estudo reporta um aumento na atividade de GST, uma resposta fisiológica à intoxicação. Wiegand et al. (2000) também reportaram um aumento na atividade de GST em embriões de peixe-zebra expostos à atrazina por 2 dias. Ao confrontarmos esse resultado com aquele deste trabalho, fica evidente que, mesmo em baixas concentrações e em animais adultos, a atrazina é capaz de perturbar o metabolismo desses animais ao longo do tempo. Zhu et al. (2010) também mostraram um aumento consistente da atividade de GST ao longo do tempo e com concentrações mais próximas daquelas ambientalmente relevantes em peixes-zebra expostos à atrazina.

Num contexto de contaminação ambiental com atrazina, Wiegand et al. (2000) argumentaram que, mesmo sobrevivendo, os animais precisarão despender muita energia para metabolizar e eliminar esse toxicante, o que pode ser observado na maior atividade da GST. Dessa maneira, esses animais sofrerão prejuízos em competição intraespecífica e no seu desenvolvimento de forma geral.

GST também tem função importante na neutralização de ROS e eliminação de produtos de peroxidação lipídica. Dessa forma, o aumento da sua atividade corrobora o importante papel do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica no dano reprodutivo causado pela atrazina como propõe Vieira et al. (2024). Provavelmente, os produtos de peroxidação lipídica gerados pela intoxicação por atrazina não foram suficientes para sobrecarregar a GST e foram eliminados, isso explicaria o motivo do experimento não ter detectado um acúmulo significativo de MDA nos animais expostos.

Atividade de neutralização de produtos de peroxidação lipídica também são observados na GPx. Yoo et al. (2010) reportam aumento da quantidade de MDA em células embrionárias de fibroblasto de camundongos com *Knockdown* da isoenzima Gpx4. Esta mesma isoenzima possui uma grande diferença de expressão entre os sexos, com testículos de *M. musculus* possuindo uma expressão 5 vezes maior dessa enzima quando comparado aos ovários, segundo dados do NCBI. Estes dados ajudam a explicar a ausência de acúmulo de MDA nas concentrações testadas. Concentrações ambientalmente relevantes não foram suficientes para sobrecarregar o metabolismo de peroxidação lipídica na janela de tempo testada. Além disso, os dados de expressão gênica dessa enzima também embasam a diferença de atividade detectada entre os sexos.

No geral, acredita-se que machos sofrem mais estresse oxidativo do que fêmeas. Isto já foi observado em diversos modelos, desde humanos até moscas, e em diversos

tecidos, como evidenciado pela revisão de Toda et al. (2023). Estes autores evidenciaram um aumento de inúmeros marcadores de estresse oxidativo nos machos quando comparados com fêmeas. Devido a isso, é de se esperar que muitos dos marcadores apresentados neste trabalho tenham apresentado maior atividade/quantidade em machos, mesmo quando a diferença estatística entre os grupos não foi detectada. Esta diferença entre os sexos é possivelmente causada pela diferença na taxa metabólica basal entre machos e fêmeas, visto que a maior fonte de ROS do corpo é a respiração celular nas mitocôndrias, um metabolismo mais rápido naturalmente causaria um maior estresse oxidativo, como sugere Ide et al. (2002).

7. Conclusão

Os resultados reportados no presente trabalho mostraram dano reprodutivo causado por concentrações ambientalmente relevantes de atrazina a partir da diminuição da viabilidade dos embriões nos grupos expostos e consistente atraso na eclosão. Estes efeitos, na natureza, podem levar a uma diminuição populacional dos animais e sérios desequilíbrios ambientais. Além disso, o mecanismo de estresse oxidativo se mostra importante na toxicidade da atrazina, visto que desregulou 3 enzimas importantes: LDH, GST e CAT. A disrupção conjunta destes marcadores mostra dano ao sistema de defesa contra dano oxidativo e ao metabolismo aeróbico dos tecidos, colaborando, pelo menos em parte, para um dano reprodutivo.

Com isso, esperamos uma tomada de ações pelos órgãos governamentais competentes à luz de novas evidências que demonstram claramente que o limite máximo permitido na legislação vigente não é seguro e oferece perigos à saúde ambiental e, possivelmente, humana. Nossa metodologia foi eficiente em identificar biomarcadores alterados pela exposição à atrazina e elucidar, ao menos parcialmente, seu mecanismo de ação. Todavia, esta metodologia apresentou problemas quanto à reprodução dos animais, visto que até mesmo o grupo controle apresentou baixa na frequência de desovas e na viabilidade dos embriões nas últimas semanas, um possível sinal de exaustão dos animais frente a constantes estímulos à reprodução. Trabalhos futuros podem adotar metodologias menos exaustivas para os animais a fim de evitar esta interferência indesejada.

Referências

ABARIKWU, S. O.; PANT, A. B.; FAROMBI, E. O. Quercetin decreases steroidogenic enzyme activity, NF- κ B expression, and oxidative stress in cultured Leydig cells exposed to atrazine. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 373, n. 1-2, p. 19–28, 16 out. 2012.

Atrazina 500 SC. Bula. Nortox; 08 de agosto 2022. Disponível em: https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2023-01/atrazinanortox500sc.pdf

BLAHOVÁ, J. et al. Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 61, p. 82–85, nov. 2013.

BRADBERRY, S. M.; PROUDFOOT, A. T.; VALE, J. A. Glyphosate Poisoning. **Toxicological Reviews**, v. 23, n. 3, p. 159–167, 2004.

BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BRAUNBECK, T.; LAMMER, E. **Detailed review paper "fish embryo toxicity assays**. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/304791642_Detailed_review_paper_fish_embryo_o_toxicity_assays.

BROVINI, E. M. et al. Three-bestseller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. **Science of The Total Environment**, v. 771, p. 144754, jun. 2021.

CANEVAROLI, M. R. et al. Remoção de herbicida atrazina por meio de filtros de carvão ativado granular associados com microrganismos no tratamento de água para abastecimento. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 26, p. 263–272, 10 maio 2021.

CLAIRBORNE A (1985) Catalase activity. In: Greenwald R (Ed.), *CRC Handbook of Methods in Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, pp. 283–284.

CONAMA. **RESOLUÇÃO N^o 357**. Disponível em: <https://conama.mma.gov.br/?option=com_sisconama&task=arquivo.download&id=450>.

CORVI, M. M. et al. Investigating the Impact of Chronic Atrazine Exposure on Sexual Development in Zebrafish. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 95, n. 4, p. 276–288, 11 maio 2012.

CRAGIN, L. A. et al. Menstrual cycle characteristics and reproductive hormone levels in women exposed to atrazine in drinking water. **Environmental Research**, v. 111, n. 8, p. 1293–1301, 1 nov. 2011.

DE ARAÚJO, E. P.; CALDAS, E. D.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Pesticides in surface freshwater: a critical review. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 194, n. 6, 24 maio 2022.

DELRUE, N. et al. The Adverse Outcome Pathway Concept: A Basis for Developing Regulatory Decision-making Tools. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 44, n. 5, p. 417–429, out. 2016.

DOMINGUES I, Oliveira R, Lourenço J, Grisolia CK, Mendo S, Soares AM (2010) Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 152:338-345.<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.05.010>

DRAPER, H.H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186, 421–431

ESTEBAN, F. et al. The herbicide atrazine affects sperm quality and the expression of antioxidant and spermatogenesis genes in zebrafish testes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology**, v. 206-207, p. 17–22, 20 fev. 2018.

FAN, X. et al. Responses of photosynthesis-related parameters and chloroplast ultrastructure to atrazine in alfalfa (*Medicago sativa* L.) inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 166, p. 102–108, 30 dez. 2018.

FANI, M.; ABBAS MOHAMMADIPOUR; ALIREZA EBRAHIMZADEH-BIDESKAN. The effect of crocin on testicular tissue and sperm parameters of mice offspring from mothers exposed to atrazine during pregnancy and lactation periods: An experimental study. **International Journal of Reproductive Biomedicine**, v. 16, n. 8, p. 519, ago. 2018.

FAOSTAT. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>>.

FRAYSSE, B.; MONS, R.; GARRIC, J. Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 63, n. 2, p. 253–267, fev. 2006.

GONÇALVES, Í. F. S. et al. Toxicity testing of pesticides in zebrafish-a systematic review on chemicals and associated toxicological endpoints. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 27, n. 10, p. 10185–10204, 1 abr. 2020.

Gpx4 Gene Expression

- **Gene** - **NCBI**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/625249/?report=expression>>. Acesso em: 23 ago. 2025.

GUIMARÃES-ERVILHA, L. O. et al. Exploring the endocrine-disrupting potential of atrazine for male reproduction: A systematic review and meta-analysis. **Reproductive Biology**, v. 25, n. 1, p. 100989, mar. 2025.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society transactions**, v. 35, n. Pt 5, p. 1147–50, 2007.

HARDING, R.; KENT ED PINKERTON; PLOPPER, C. G. **The lung : development, aging and the environment**. London, Uk ; San Diego, Calif.: Elsevier Academic Press, 2004. p. 177–185

HARPER, Alesia P.; FINGER, Bethany J.; GREEN, Mark P. Chronic atrazine exposure beginning prenatally impacts liver function and sperm concentration with multi-generational consequences in mice. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 580124, 2020.

HO, E. et al. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p. 483–491, 2013.

HOO, J. Y. et al. Zebrafish: A Versatile Animal Model for Fertility Research. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–20, 2016.

IDE, T. et al. Greater oxidative stress in healthy young men compared with premenopausal women. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, n. 3, p. 438–442, 1 mar. 2002.

Insetos-praga - Portal Embrapa. Disponível em: <https://www.embrapa.br/hortalicas/batata-doce/insetos-praga>.

ISLAM, F. et al. Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. **Environment International**, v. 111, n. 0160-4120, p. 332–351, fev. 2018.

JONES, T. W.; WINCHELL, L. Uptake and Photosynthetic Inhibition by Atrazine and its Degradation Products on Four Species of Submerged Vascular Plants. **Journal of Environmental Quality**, v. 13, n. 2, p. 243–247, abr. 1984.

KAUSHAL, J.; KHATRI, M.; ARYA, S. K. A treatise on organophosphate pesticide pollution: Current strategies and advancements in their environmental degradation and elimination. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 207, p. 111483, 1 jan. 2021.

KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253–310, jul. 1995.

Ldha Gene Expression

- **Gene - NCBI.** Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16828/?report=expression>. Acesso em: 23 ago. 2025.

Ldhb Gene Expression

- **Gene - NCBI.** Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16832/?report=expression>. Acesso em: 23 ago. 2025.

Ldhc lactate dehydrogenase C [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16833#top>. Acesso em: 23 ago. 2025.

LIMA, H. E. **CLASSIFICAÇÃO QUÍMICA DOS AGROTÓXICOS: UMA REVISÃO SOBRE OS PRINCIPAIS GRUPOS.** Disponível em: <<https://editorapublicar.com.br/ojs/index.php/publicacoes/article/view/528>>. Acesso em: 23 ago. 2025.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. Agrochemicals and their impacts on human and environmental health: a systematic review. *Saúde Debate*, v. 42, n. 117, p. 518-534, Rio de Janeiro, 2018.

MAHARAJAN, K. et al. Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study. ***Aquatic Toxicology***, v. 196, p. 132–145, mar. 2018.

MAIA, M. E. et al. Effects of atrazine, diuron and glyphosate mixtures on zebrafish embryos: acute toxicity and oxidative stress responses. ***Ecotoxicology***, v. 34, n. 2, p. 304–316, 29 nov. 2024.

MARTÍNEZ, I. et al. Sex differences in markers of oxidation and inflammation. Implications for ageing. ***Mechanisms of Ageing and Development***, v. 211, p. 111797–111797, 1 mar. 2023.

MARTINS, R. X. et al. Biochemical Markers for Liver Injury in Zebrafish Larvae. ***Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)***, v. 2753, p. 469–482, 2024.

^o MINISTÉRIO DA SAÚDE. **PORTARIA GM/MS N 888.** , 4 maio 2021. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2021/prt0888_07_05_2021.html>. Acesso em: 23 ago. 2025

MOKWATSI, G. G.; SCHUTTE, A. E.; KRUGER, R. A biomarker of tissue damage, lactate dehydrogenase, is associated with fibulin-1 and oxidative stress in blacks: the SAfrEIC study. ***Biomarkers***, v. 21, n. 1, p. 48–55, 3 dez. 2015.

MUNIZ, M. S. et al. Moxidectin toxicity to zebrafish embryos: Bioaccumulation and biomarker responses. ***Environmental Pollution***, v. 283, p. 117096, ago. 2021.

NAEEM AKHTAR ABBASI et al. Introduction to environmental micropollutants. ***Elsevier eBooks***, p. 1–12, 1 jan. 2022.

ODET, F. et al. Expression of the Gene for Mouse Lactate Dehydrogenase C (Ldhc) Is Required for Male Fertility¹. **Biology of Reproduction**, v. 79, n. 1, p. 26–34, 1 jul. 2008.

OECD. **Revised Guidance Document on Developing and Assessing Adverse Outcome Pathways**. Disponível em: <<https://one.oecd.org/document/env/jm/mono/%282013%296/en/pdf>>. Acesso em: 23 ago. 2025.

PATHAK, R. K.; DIKSHIT, A. K. Atrazine and Human Health. **International Journal of Ecosystem**, v. 1, n. 1, p. 14–23, 31 ago. 2012.

PAVANI, N. **PESTICIDAS: UMA REVISÃO DOS ASPECTOS QUE ENVOLVEM ESSES COMPOSTOS** 1. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/441a0403-0b4b-416d-8be9-3f32a8417c83/content>>.

POGRMIC-MAJKIC, K. et al. Atrazine suppresses FSH-induced steroidogenesis and LH-dependent expression of ovulatory genes through PDE-cAMP signaling pathway in human cumulus granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 461, p. 79–88, fev. 2018.

POUR, L. M. et al. Activity Assay of Glutathione S-Transferase (GSTs) Enzyme as a Diagnostic Biomarker for Liver Hydatid Cyst in Vitro. **Iranian Journal of Public Health**, v. 43, n. 7, p. 994, jul. 2014.

PURDY, L. H. Sclerotinia sclerotiorum: History, Diseases and Symptomatology, Host Range, Geographic Distribution, and Impact. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 875, 1979.

Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Disponível em: <<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios>>.

RICCI, E. L. et al. Peripubertal exposure of atrazine cause decrease in exploratory activity, deficits in sociability and few alterations on brain monoaminergic systems of rats. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 483, p. 116819, fev. 2024.

SADEGHNIA, H. et al. Atrazine neural and reproductive toxicity. **Toxin Reviews**, p. 1–14, 20 ago. 2021.

SANTOS, M. & Reyes, Felix & Areas, Miguel. (2008). Piretróides - uma visão geral. *Alimentos e Nutrição*. 18.

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

SINGHAL, S. S. et al. Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 289, n. 3, p. 361–370, 1 dez. 2015.

SOLOMON, K. R. et al. Effects of Atrazine on Fish, Amphibians, and Aquatic Reptiles: A Critical Review. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 38, n. 9, p. 721–772, jan. 2008.

SONG, Y. et al. Toxic effects of atrazine on reproductive system of male rats. **Biomedical and environmental sciences: BES**, v. 27, n. 4, p. 281–288, 1 abr. 2014.

SOUZA, V. V. DE et al. Ecogenotoxicity of environmentally relevant atrazine concentrations: A threat to aquatic bioindicators. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 189, p. 105297, 1 jan. 2023.

VIEIRA, L. et al. Revealing an adverse outcome pathway network for reproductive toxicity induced by atrazine, via oxidative stress. **Computational Toxicology**, v. 30, p. 100317, jun. 2024.

VIEIRA, L. R.; SOUZA, T.; FARIAS, D. F. AOP Report: Glutathione Conjugation Leading to Reproductive Dysfunction via Oxidative Stress. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 42, n. 12, p. 2519–2528, dez. 2023.

VIEIRA, L.; FARIAS, D.; SOUZA, T. **AOP-Wiki**. Disponível em: <<https://aopwiki.org/aops/492>>. Acesso em: 23 ago. 2025.

WIEGAND, C. et al. Uptake, Toxicity, and Effects on Detoxication Enzymes of Atrazine and Trifluoroacetate in Embryos of Zebrafish. v. 45, n. 2, p. 122–131, 1 fev. 2000.

WIRBISKY, S. E. et al. An embryonic atrazine exposure results in reproductive dysfunction in adult zebrafish and morphological alterations in their offspring. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 21337, 19 fev. 2016.

YANG, H. et al. Herbicide atrazine exposure induce oxidative stress, immune dysfunction and WSSV proliferation in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. **Chemosphere**, v. 283, p. 131227–131227, 15 jun. 2021.

YOO, M.-H. et al. Delineating the role of glutathione peroxidase 4 in protecting cells against lipid hydroperoxide damage and in Alzheimer's disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 7, p. 819–827, 1 abr. 2010.

YUAN, B. et al. Toxic effects of atrazine on porcine oocytes and possible mechanisms of action. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0179861, 22 jun. 2017.

ZHU, L. et al. DNA damage and effects on glutathione-S-transferase activity induced by atrazine exposure in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology**, v. 26, n. 5, p. 480–488, 5 abr. 2010.