

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

ANA CLARA CANESIN DE ALMEIDA

Efeitos da exposição ao herbicida Atrazina degradado por fotocatalise e dos seus metabólitos: análise por biomarcadores em *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae)

Maringá  
2018

ANA CLARA CANESIN DE ALMEIDA

Efeitos da exposição ao herbicida Atrazina degradado por fotocatalise e dos seus metabólitos: análise por biomarcadores em *Astyanax altiparanae*  
(Characiformes, Characidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas.

Área de concentração: Biologia comparada

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Veronica Elisa Pimenta Vicentini

Maringá  
2018

"Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)"  
(Biblioteca Setorial - UEM. Nupélia, Maringá, PR, Brasil)

- A447e Almeida, Ana Clara Canesin de, 1992-  
Efeitos da exposição ao herbicida Atrazina degradado por fotocatalise e dos seus metabólitos : análise por biomarcadores em *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae) / Ana Clara Canesin de Almeida.-- Maringá, 2018.  
63 f. : il. (algumas color.).
- Dissertação (mestrado em Biologia Comparada)--Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, 2018.  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Veronica Elisa Pimenta Vicentini.
1. Ecotoxicologia aquática - Poluição - Herbicida (Atrazina). 2. *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae) "lambari" - Metabólitos - Bioindicadores. 3. Genotoxicidade. 4. Histopatologia. 5. Testes de toxicidade. I. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada.

CDD 23. ed. -577.279  
NBR/CIP - 12899AACR/2

ANA CLARA CANESIN DE ALMEIDA

Efeitos da exposição ao herbicida Atrazina degradado por fotocatalise e dos seus metabólitos: análise por biomarcadores em *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Veronica Elisa Pimenta Vicentini

Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Bruno Renaly Souza Figueiredo

Universidade Estadual de Maringá

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudia Bueno dos Reis Martinez

Universidade Estadual de Londrina

Local de defesa: sala 5, Bloco H67, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

Aos meus pais, Neusa e Valdecir, e minha irmã, Paula, pelo apoio constante e por estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis. Amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus. Por me sustentar e capacitar para chegar até aqui. Sem Ele nada sou.

A minha família, por sempre acreditar em mim, por estarem ao meu lado em todos os momentos, me dando força e compreendendo os momentos que me ausentei. Agradeço também por muitas vezes terem ido montar experimentos comigo no T10, sempre foi divertida e prazerosa a companhia nesses dias de tensão. Deixo aqui o meu mais profundo agradecimento, pois sem vocês eu não sou nada.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Veronica Elisa Pimenta Vicentini. Passaram 7 anos, desde que entrei no laboratório para estagiar no primeiro ano da graduação, e sempre foi muito prazeroso. Agradeço a sua ajuda, empenho e os ensinamentos de todo esse tempo, pois me moldaram como profissional e como pessoa, e também por ter dado a oportunidade de realizar esse projeto em seu laboratório. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Bruno Renaly Souza Figueiredo e a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudia Bueno dos Reis Martinez, por aceitarem o convite de fazer parte da banca examinadora. As contribuições de vocês com certeza serão muito bem-vindas.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, pela oportunidade concedida.

A Estela, secretária do programa de Pós-Graduação, que sempre esteve pronta para nos ajudar e aconselhar.

A Capes, pela bolsa concedida.

A todos os colegas do laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental, pela indispensável ajuda em todos os experimentos e trabalhos de redação. Por todos os momentos descontraídos que passamos juntos, e também pelas broncas que ganhamos em conjunto. Nesse tempo todo só tenho a agradecer a todos, pois foi nesse laboratório que aprendi o pouco que sei hoje.

À querida Rosinete, nossa técnica de laboratório. Meu profundo agradecimento por tudo que fez por mim, pela ajuda nos experimentos, e principalmente por poder dar boas risadas com você.

Ao senhor José Trentini, carinhosamente chamado de “seu Zé”. Agradeço o senhor por sempre nos apoiar nos experimentos, por cuidar dos nossos animais e pela torcida para que tudo ocorresse com sucesso. Muito obrigada.

Aos meus amigos, em especial Mariana Y, Michele H, Vinicius S. Os dias no laboratório sem vocês seriam mais difíceis, confesso. Muito obrigada por todo apoio, por acreditarem no meu trabalho e por me aguentarem nos dias de loucura também. Vocês estão e sempre serão lembrados com muito amor e carinho por mim.

As minhas amigas maravilhosas, Andressa Guizelini, Maiara Andressa, Julianna Cristina, Danubia Petrocelli, Carolina Pinheiro, Carolina Mendes Muniz, Rafaela Granzotti, Gabriela Nardi, Letícia Crepaldi, Isabela Previante, Rachel Kalil. Independente de serem amigas de longa data ou não, cada uma de vocês tem um lugar especial no meu coração, e contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui, com força e coragem. Vocês são mulheres de exemplo para mim, e quero tê-las por perto por muitos e muitos anos. Amo todas vocês.

Ao laboratório de Catálise da Universidade Estadual de Maringá e ao Laboratório Fenn da Universidade Federal do Paraná, pois sem essas parcerias não seria possível realizar esse trabalho. Agradeço especialmente a Gabriela Nascimento e ao Marcos Ribeiro pelo apoio nas análises.

E a todas as pessoas que de alguma forma colaboraram com esse trabalho, muito obrigada.

Efeitos da exposição ao herbicida Atrazina degradado por fotocatalise e dos seus metabólitos: análise por biomarcadores em *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae).

## RESUMO

A Atrazina (ATZ) e os seus metabólitos têm sido detectados em águas superficiais e subterrâneas em diversas regiões do mundo. Investigou-se o potencial genotóxico pelo Teste do Micronúcleo (MN) e histopatológico em brânquias de *Astyanax altiparanae*, do herbicida Atrazina e de alguns dos seus metabólitos, provenientes da degradação da Fotocatalise Heterogênea: Hidroxiatrazina (HA), Deisopropil hidroxiatrazina (DIA-OH), Desetil terbutilazina (DET), Terbutilazina-2-hidroxi (HT), Desetilatrazina mercapturico (DEAM-3), Desalquil atrazina mercapturico (DAA-MER), Desetil hidroxi atrazina (DEHA), em exposição aguda (24 e 96 horas). No teste do MN, os grupos: ATZ, foto – ZnO, TiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub>/ZnO+Fe foram estatisticamente diferentes do controle, no tempo de 96 horas, onde a anormalidade eritrocítica nuclear (AEN) de maior índice foi a do tipo vacúolo. Em relação a histopatologia de brânquias, as alterações do tipo hipertrofia, hiperplasia e redução das microdigitações nas células pavimentosas, foram as mais frequentemente observadas nos tratamentos em relação ao grupo controle. Apesar da degradação da ATZ pelo processo fotocatalítico ter sido eficiente, principalmente no grupo TiO<sub>2</sub>/ZnO+Fe, onde nos primeiros 5 minutos de reação degradou-se 60% do herbicida, não ocorreu no final da reação, uma completa mineralização do poluente, e formaram-se metabólitos. Esses compostos podem estar conferindo toxicidade assim como a sua molécula precursora, pois induziram genotoxicidade em eritrócitos e alterações nas brânquias de *A. altiparanae*. Desta forma, comprova-se a importância de estudos que avaliem a toxicidade destes metabólitos, pois estão sendo constantemente detectados em águas superficiais, subterrâneas e também de abastecimento humano, além de analisar a eficácia de futuras tecnologias que venham a ser utilizadas na degradação de poluentes e no tratamento de águas para abastecimento, como a Fotocatalise Heterogênea.

Palavras-chave: Toxicidade. Teste do Micronúcleo. Metabólitos da Atrazina. Processos oxidativos avançados. Biomonitoramento. Ecotoxicologia.

Effects of exposure to herbicide Atrazine degraded by photocatalysis and of its metabolites: analysis by biomarkers in *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae)

### ***ABSTRACT***

Atrazine (ATZ) and its metabolites have been detected in superficial waters and groundwater all over the world. The present study investigated the genotoxic potential, through micronucleus (MN) and histopathological tests in the gills of *Astyanax altiparanae*, of the herbicide Atrazine and some of its metabolites, which were resultant from Heterogeneous Photocatalysis: Hidroxiatrazina (HA), Deisopropil hidroxiatrazina (DIA-OH), Desetil terbutilazina (DET), Terbutilazina-2-hidroxi (HT), Desetilatrazina mercapturico (DEAM-3), Desalquil atrazina mercapturico (DAA-MER), Desetil hidroxi atrazina (DEHA), in acute exposure (at 24 and 96 hours). In the MN test, the treatment groups ATZ, photo-ZnO, TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>/ZnO+Fe were statistically different from the control groups, at time 96 hours, when the most frequent nuclear erythrocytic abnormality was the vacuole type. Regarding gill histopathology, alterations of types hypertrophy, hyperplasia and reduction of pavement cells were the most frequently observed in treatment groups compared to the control group. Despite the efficiency of ATZ degradation through the photocatalytic process, (especially in the TiO<sub>2</sub>/ZnO+Fe group where in the first five minutes of the reaction, 60% of herbicide was degraded), a complete mineralization of this pollutant did not occur at the end of the reaction, thus forming metabolites. These compounds could be granting toxicity, as well as its precursor molecule, because they induced genotoxicity in erythrocytes and alterations in *A. altiparanae* gills. Therefore, the present study shows the importance of research that evaluates the toxicity of these metabolites, since they have been constantly detected in superficial waters, groundwater and water for human consumption, besides analyzing the efficiency of technology that could be used in the future to degrade pollutants and to treat water for human supply, such as the Heterogeneous Photocatalysis.

**Keywords:** Toxicity. Micronucleus test. Atrazine metabolites. Advanced oxidative processes. Biomonitoring. Ecotoxicology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Brasil – consumo de agrotóxicos e afins

Figura 2: Fórmula estrutural da Atrazina

Figura 3: Via principal de degradação da Atrazina

Figura 4: *Astyanax altiparanae*

Figura 5: Modelo esquemático do reator batelada

Figura 6: Estruturas químicas dos metabólitos

Figura 7: Anormalidades Eritrocíticas Nucleares

Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *A. altiparanae* expostos a água desclorada (controle) e a ATZ por 24 horas

Figura 9: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *A. altiparanae* expostos a foto - ZnO e a foto – TiO<sub>2</sub> por 24 horas

Figura 10: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *A. altiparanae* expostos a foto - ZnO/TiO<sub>2</sub>+Fe por 24 horas

Figura 11: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *A. altiparanae* expostos a água desclorada (controle) e a ATZ por 96 horas

Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *A. altiparanae* expostos a foto – ZnO e foto – TiO<sub>2</sub> por 96 horas

Figura 13: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *A. altiparanae* expostos a foto - ZnO/TiO<sub>2</sub>+Fe por 96 horas

## SUMÁRIO

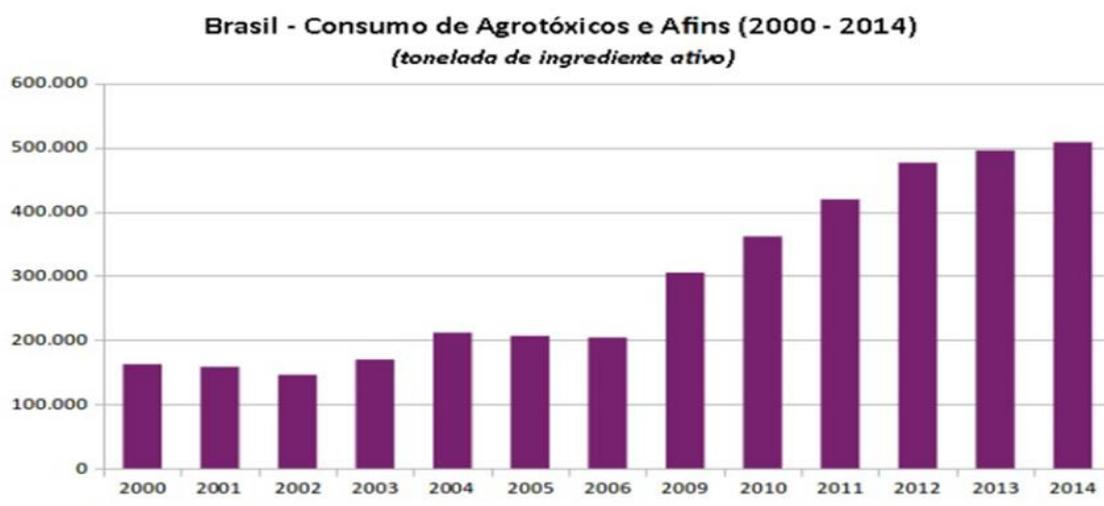
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
2.1	AGROTÓXICOS .....	12
2.1.1	Atrazina .....	13
2.2	PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS .....	15
2.2.1	Fotocatálise heterogênea.....	16
2.3	BIOMARCADORES.....	19
2.3.1	Brânquias .....	20
2.3.2	Teste do micronúcleo .....	21
2.4	<i>Astyanax altiparanae</i> COMO BIOINDICADOR.....	21
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	23
<b>4</b>	<b>DEGRADAÇÃO FOTOCATALÍTICA DO HERBICIDA ATRAZINA: EFEITOS GENOTÓXICOS E HISTOPATOLÓGICOS EM <i>Astyanax altiparanae</i> (CHARACIFORMES: CHARACIDAE)</b> .....	31
4.1	INTRODUÇÃO.....	35
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.2.1	Fotocatálise heterogênea.....	34
4.2.1.1	Solução estoque de Atrazina - Efluente sintético e preparo dos catalisadores....	34
4.2.1.2	Teste reacional.....	35
4.2.2	Espectrometria de massa.....	36
4.2.2.1	Materiais e reagentes químicos.....	36
4.3	ENSAIO DE TOXICIDADE.....	37
4.3.2	Amostragem.....	38
4.3.3	Teste do Micronúcleo (mn) e Alterações Eritrocíticas Nucleares(AENS).....	38
4.3.4	Histopatologia em brânquias.....	39
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4.5	RESULTADOS.....	39
4.5.1	Degradação do herbicida atrazina por três catalisadores diferentes.....	39
4.5.2	Análise por espectrometria de massa ESI-MS.....	40

4.5.3	Teste do Micronúcleo (MN) e Alterações Eritrocíticas Nucleares (AENS).....	44
4.5.4	Histopatologia em brânquias.....	46
4.6	DISCUSSÃO.....	55
4.7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>59</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O setor agropecuário é um dos setores mais importantes na economia mundial, e no Brasil é apontado como um dos pilares mais fortes da economia nacional. No entanto, junto com o avanço da agricultura, o uso de agrotóxicos tornou-se uma prática cada vez mais comum, visando principalmente o controle de pragas para maximizar a produtividade no campo. Desde 2008 o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos no mundo, chegando em 2009 a uma marca de 1 bilhão de litros de produtos químicos aplicados, equivalente a um consumo médio de 5,2 Kg de agrotóxico por habitante (Londres, 2011). Contudo, o uso em larga escala e sem fiscalização por meio de órgãos governamentais tornou o uso desses produtos químicos um grande problema ambiental e de saúde pública.

Estes produtos químicos são utilizados em larga escala no Brasil, devido, principalmente ao avanço das culturas e pela produção voltada para a conversão destas em *commodities* ou em agroenergia. Por este fato, o Brasil consome cerca de 20% de todo agrotóxico comercializado no mundo, e nos últimos anos este consumo vem aumentando de forma expressiva (Bombardi, 2017; Pelaez et al., 2015). O consumo total de agrotóxicos no Brasil saltou de 170.000 toneladas no ano de 2000 para 500.000 toneladas em 2014, o que contabiliza um aumento de 135% (fig. 1). Este aumento significativo na comercialização dos agrotóxicos no Brasil está diretamente ligado a três monoculturas: soja, milho e cana de açúcar. Somente a soja é responsável por 52% da venda de agrotóxicos no país, seguida do milho e cana, empatados com 10% (Sindiveg, 2015).



Fonte: Bombardi, 2017.

Grande parte dos agrotóxicos utilizados nas plantações não atingem os alvos específicos, deixando grande parte do volume utilizado livre para atingir os diferentes

ambientes, como o solo, águas subterrâneas e superficiais (Belluck et al., 1991). Uma vez aplicados, esses produtos podem ser dissipados ou degradados. A dissipação é o movimento dessas substâncias de um lugar a outro, podendo ocorrer por lixiviação, escoamento superficial, volatilização, adsorção de sedimentos e solos, ou ainda, por absorção do ingrediente ativo por organismos. A degradação refere-se a conversão do agrotóxico de uma forma molecular para outra, por mecanismos químicos como a hidrólise e oxidação, processos físicos (fotólise), ou ainda por processos biológicos, que podem ocorrer em plantas, animais e na microbiota (Solomon et al., 2014).

É crescente a preocupação com a contaminação dos ecossistemas aquáticos por agrotóxicos, pois tornaram-se ambientes sujeitos a contaminação de diversas origens. Vários estudos, em diferentes regiões no mundo tem mostrado que a porcentagem de agrotóxicos que atingem os ambientes é geralmente baixa (Solomon, 1996). No entanto, devido a mobilidade de alguns produtos, poder de bioamplificação nos organismos, além da sua transformação química no ambiente, é de grande importância a avaliação destas substâncias químicas nos organismos, pois pode refletir futuros impactos em um ecossistema todo.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 AGROTÓXICOS**

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), o produto denominado agrotóxico pode ser definido da seguinte maneira: Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas, bem como de ambientes urbanos, hídricos e industriais.

Os agrotóxicos podem ser classificados de várias maneiras, e entre elas estão os efeitos que causam a saúde humana (toxicologia), a forma de ação no organismo alvo e em relação a sua estrutura química (Savoy, 2011).

Em relação a classificação toxicológica, o agrotóxico pode ser de: classe I, aqueles tidos como extremamente tóxicos com faixa indicativa de cor vermelha na embalagem do produto; classe II, agrotóxicos muito tóxicos e identificados pela cor amarela; classe III, que são os moderadamente tóxicos e indicados pela cor de azul intenso na embalagem; classe IV agrotóxicos pouco tóxicos e indicados pela cor verde intenso. A toxicidade é expressa em termos do valor da dose média letal ( $DL_{50}$ ), por via oral, representada por miligramas do

produto tóxico por quilo de peso vivo, necessários para matar 50% de ratos e outros animais teste (Embrapa, 2003).

Quanto ao modo de ação do agrotóxico no organismo alvo ou a natureza da “praga” alvo, esses podem ser classificados como inseticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas ou raticidas, acaricidas, nematocidas, fumigantes e moluscicidas (Andrei, 2005).

O herbicida geralmente atua inibindo a atividade de uma enzima/proteína na célula, desencadeando uma sequência de eventos que levam a morte ou inibem o desenvolvimento da célula e do organismo. Os herbicidas que possuem o mesmo modo de ação apresentam modelos semelhantes de translocação na planta e produzem sintomas de injúria similares, podem ser classificados em uma família (Vidal, 1997).

Grande parte das famílias dos herbicidas atua direta ou indiretamente em reações fotoquímicas inibindo o fluxo de elétrons no fotossistema II (FII), a enzima glutamina sintase na via de assimilação de nitrogênio, a protoporfirogênio oxidase durante a biossíntese de clorofila, assim como inibem a biossíntese de pigmentos e capturam de elétrons do fotossistema I (Hess, 2000).

### 2.1.1 Atrazina

O herbicida Atrazina (ATZ) de forma molecular  $C_8H_{14}ClN_5$  (1-cloro-3-etilamino-5-isopropilamino-2,4,6-triazina) (fig. 2), pertence a família das triazinas e é muito utilizado nas culturas de milho, sorgo, abacaxi, algodão, cana-de-açúcar e soja, para controlar espécies de ervas daninhas, como *Cyperus sesquiflorus* (tiririca), *Sida cordifolia* (Malva-branca), *Cenchrus echinatus* (Capim-carrapicho), *Bidens pilosa* (Picão-preto). Esta família de herbicidas atua na transferência fotossintética de elétrons no Fotossistema II. Deste modo, enquanto a transferência de elétrons no FII é cessada, a clorofila continua capitando energia solar, entretanto, essa energia não é armazenada como energia química, mas como radicais livres. Assim, as plantas morrem devido a peroxidação de lipídeos nas membranas (Embrapa, 2008).

A atrazina é classificada como um herbicida seletivo, de ação sistêmica, de pré e pós-emergência precoce do grupo químico Triazina. Este herbicida foi proibido na União Europeia, porém ainda é encontrada no solo e na água potável, devido ao seu uso em grande escala nestes países, e também por ser um produto químico de alta persistência, e por possuir um alto potencial de lixiviação. (Mohamed, 2015; Santacruz-Chávez et al., 2015). Estima-se que a meia-vida da Atrazina em água doce seja de 244 dias à 25°C e pH 4, no entanto, as

diferenças na temperatura, fonte de luz, tipo de sedimento e concentração podem ser fatores determinantes nas estimativas de meia-vida deste herbicida (Solomon et al., 2008).

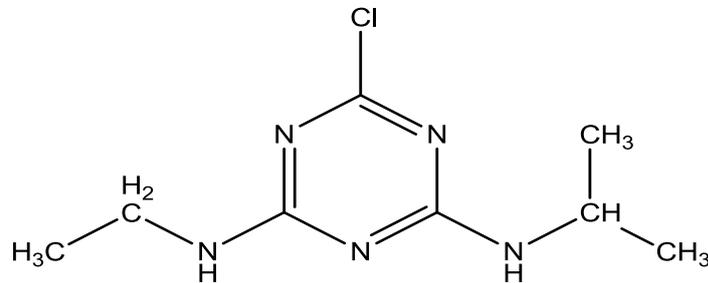


Figura 2: Fórmula estrutural da Atrazina.

Vários estudos têm demonstrado a contaminação por atrazina em águas superficiais e lóaticas (rios e córregos) e em sistemas aquáticos lênticos (lagos, lagoas), este último apresenta concentrações maiores em pelo menos 2-10 vezes (Rohr e Mccoy, 2010; Kolpin, 1997). A atrazina na água pode variar de concentrações altas, como acima de  $1000\mu\text{g.L}^{-1}$ , em águas adjacentes a lavouras tratadas, até  $20\mu\text{g.L}^{-1}$ , concentração que pode ser encontrada em águas superficiais. Porém, baixas concentrações também são relatadas, como  $445\text{ng.L}^{-1}$  em amostras de chuva coletadas em Ontário (Canadá). A presença deste poluente em precipitações é decorrente da volatilização durante o processo de aplicação no campo (Nwani, 2010; Solomon, 2008; Graymore et al., 2001; Schottler et al., 1994 ;Hall, 1993; Readman et al., 1993).

Relata-se a ação da atrazina em diferentes organismos, como algas, plantas, moluscos, crustáceos, peixes, anfíbios e mamíferos. Assim como no trabalho de Santos et al. (2015), onde foram determinadas as concentrações do herbicida atrazina em córregos na região norte do estado de São Paulo e avaliados os impactos toxicológicos em *Piaractus mesopotamicus* (Pacu). Em outro trabalho, desenvolvido por Botelho et al. (2015), *Danio rerio* (zebra fish) foram expostos a diferentes concentrações dos herbicidas Atrazina e Ametrina, provenientes do rio Piracicaba – São Paulo. Foram observadas formações de micronúcleos induzidos por ambos herbicidas, indicando que as concentrações encontradas no rio Piracicaba são perigosas para a biota aquática.

Em outro estudo, Liu et al. (2016) detectaram que a atrazina e seus metabólitos têm efeito sobre o batimento cardíaco, eclodibilidade e anormalidades morfológicas na fase de desenvolvimento de *D. rerio*. Santos e Martinez (2014) analisaram os efeitos genotóxicos e bioquímicos dos herbicidas atrazina e *Roundup* em *Corbicula fluminea*. A genotoxicidade foi observada somente quando os herbicidas foram misturados, porém, a atrazina sozinha interferiu na redução da atividade enzimática neste molusco. O mesmo efeito genotóxico foi encontrado por Golçalves et al., (2017), em *Dendropsophus minutus* (perereca de ampulheta), onde a sensibilidade ao herbicida variou em diferentes estágios larvais.

Além dos trabalhos citados acima, outros estudos também mostram o potencial tóxico deste herbicida, enfatizando assim, a importância do monitoramento deste poluente no ecossistema, apontando as concentrações que causam maior impacto, e sugerindo desta forma leis ambientais que protejam a fauna, flora e a saúde humana. Além do monitoramento, estes trabalhos viabilizam possíveis alternativas para tratamentos em águas de abastecimento, no Brasil e em grande parte dos países no mundo, não há tratamento para uma gama de contaminantes presentes na água, a qual é consumida por milhões de habitantes.

## 2.2 PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS

Os processos oxidativos avançados (POAs) são reconhecidos como uma das alternativas mais eficazes para a degradação de substratos de importância ambiental. Os POAs são definidos como processos de oxidação, os quais envolvem a formação de radicais hidroxila  $\bullet\text{OH}$  em quantidade suficiente para realizar a purificação da água. Essas metodologias foram desenvolvidas na década de 1980, inicialmente para o tratamento de água potável (Deng e Zhao, 2015; Glaze, 1987; Glaze et al., 1987). O radical  $\bullet\text{OH}$  possui a capacidade de oxidar compostos orgânicos e inorgânicos por três mecanismos diferentes, baseados em transferência de elétrons ou adição eletrofílica. Alguns processos de produção do radical hidroxila têm sido estudados, entre eles: os que utilizam ozônio, peróxido de hidrogênio, sonólise, eletroquímica, radiação ultravioleta (UV), fotólise, fotocátalise, fenton, etc (Kalinke e Betiolo, 2011).

Os POAs podem ser divididos em dois sistemas: os heterogêneos e os homogêneos. Nos heterogêneos os catalisadores geralmente estão na forma sólida, formando duas ou mais fases com os demais componentes presentes no sistema. Nos homogêneos, os componentes do sistema encontram-se em uma única fase. Nestes dois sistemas os radicais  $\bullet\text{OH}$  podem ser gerados com ou sem a irradiação UV (Teixeira e Jardim, 2004).

Entre os sistemas que podem ser aplicados para o tratamento e desinfecção de águas residuárias e efluentes está a fotocatalise heterogênea, que tem sido empregada nas últimas décadas. A fotocatalise utiliza materiais semicondutores como fotocatalisadores, possui elevado potencial de mineralização de poluentes orgânicos recalcitrantes em condições de temperatura e pressão ambiente (Wols e Hofman-Caris, 2012). Esse processo vem sendo muito utilizado para a degradação da atrazina, em particular, mostrando resultados expressivos na sua degradação parcial ou mineralização total deste contaminante.

### 2.2.1 Fotocatálise heterogênea

A Atrazina é um herbicida amplamente utilizado, de alto poder de lixiviação e de caráter tóxico em diversos organismos como demonstrado na literatura. É de suma importância o desenvolvimento de tratamentos físico-químicos que possam remover este poluente de águas superficiais e subterrâneas, uma vez que estas são habitats para inúmeras espécies e servem para o consumo humano. Nesse sentido, o processo de Fotocatálise é uma possível alternativa para o tratamento e purificação de água poluída. Este processo é uma combinação de luz UV a um catalisador com capacidade de degradar poluentes químicos por vias oxidativas e redutoras (McMurray et al., 2006).

Há algumas definições para o termo conceitual de fotocatalise. Entre elas a de Ohtani (2008) contempla bem a maioria das demais definições. Ele descreve reação fotocatalítica como uma reação química induzida pela absorção de fótons por um material sólido que permanece imutável durante todo o processo, agindo assim como catalisador, também chamado de fotocatalisador.

O processo fotocatalítico baseia-se na excitação de um semicondutor pela luz UV ou luz visível. Sob a ação de fótons, os semicondutores ou catalisadores produzem radicais livres altamente oxidantes que permitem a destruição de compostos adsorvidos na sua superfície. Os semicondutores têm a capacidade de converter energia de fótons em energia química por reação de oxido-redução. Desta forma, o processo de degradação consiste na sucessão de oxidações radicais iniciadas por oxidantes fortes, como o radical hidroxila (OH) (Linsebigler et al., 1995; Yasmina et al., 2014).

Diversos trabalhos associando o processo fotocatalítico à degradação da atrazina têm sido desenvolvidos com sucesso (Mkhalid, 2016; Mohamed, 2015; Sacco et al., 2015; Santacruz-Chávez, 2015; McMurray et al., 2006), como o uso do catalisador dióxido de Titânio (TiO<sub>2</sub>) e aplicação de Boro (Wang et al., 2016). Todos esses trabalhos têm demonstrado que o processo fotocatalítico, o qual se enquadra entre os processos oxidativos

avançados passam por grandes avanços e otimizações, sendo que é necessário o conhecimento da natureza química do poluente em estudo, do seu monitoramento analítico, além da eficiência do tratamento depender do contaminante, do volume a ser tratado, das condições reacionais, do custo e de outros fatores (Oliveira e Silveira, 2011).

Apesar da grande eficiência que a fotocatalise vem demonstrando para a degradação da atrazina, é importante salientar que a via de degradação deste herbicida, que pode se desencadear naturalmente no ambiente, pode gerar produtos de degradação ou metabólitos com toxicidade semelhante ou superior a molécula precursora. Os métodos fotocatalíticos englobam as reações de hidrólise, de oxirredução, de substituição, de eliminação, de desalogenação, entre outros. Estes processos podem resultar em uma completa mineralização do contaminante ou na formação de metabólitos (Balesteros, 2009). Estudos evidenciam que os produtos formados durante a degradação da atrazina estão diretamente associados ao processo utilizado, sendo que determinados sistemas favorecem a formação de alguns produtos de degradação e desfavorecem a formação de outros (Li et al., 2012). A principal rota de degradação da ATZ e de seus subprodutos é mostrada na Figura 3 (Klementova e Keltnerova, 2015; Scribner et al., 2000).

Entre os principais produtos de degradação estão desethylatrazine (DEA) e desisopropyl-atrazine (DIA), que pela presença de grupos cloro na composição destas moléculas confere toxicidade semelhante em relação a sua molécula precursora (ATZ) (Beltrán et al., 1996). A agência americana de proteção ambiental (US-EPA) comprovou que três herbicidas da família das triazinas: Atrazina, Simazina e Propazina, e seus respectivos metabólitos, DEA, DIA e desethyl-desisopropyl-atrazine (DEDIA), possuem mecanismo semelhante quanto a disrupção endócrina em determinados organismos (Jiang e Adams, 2006).

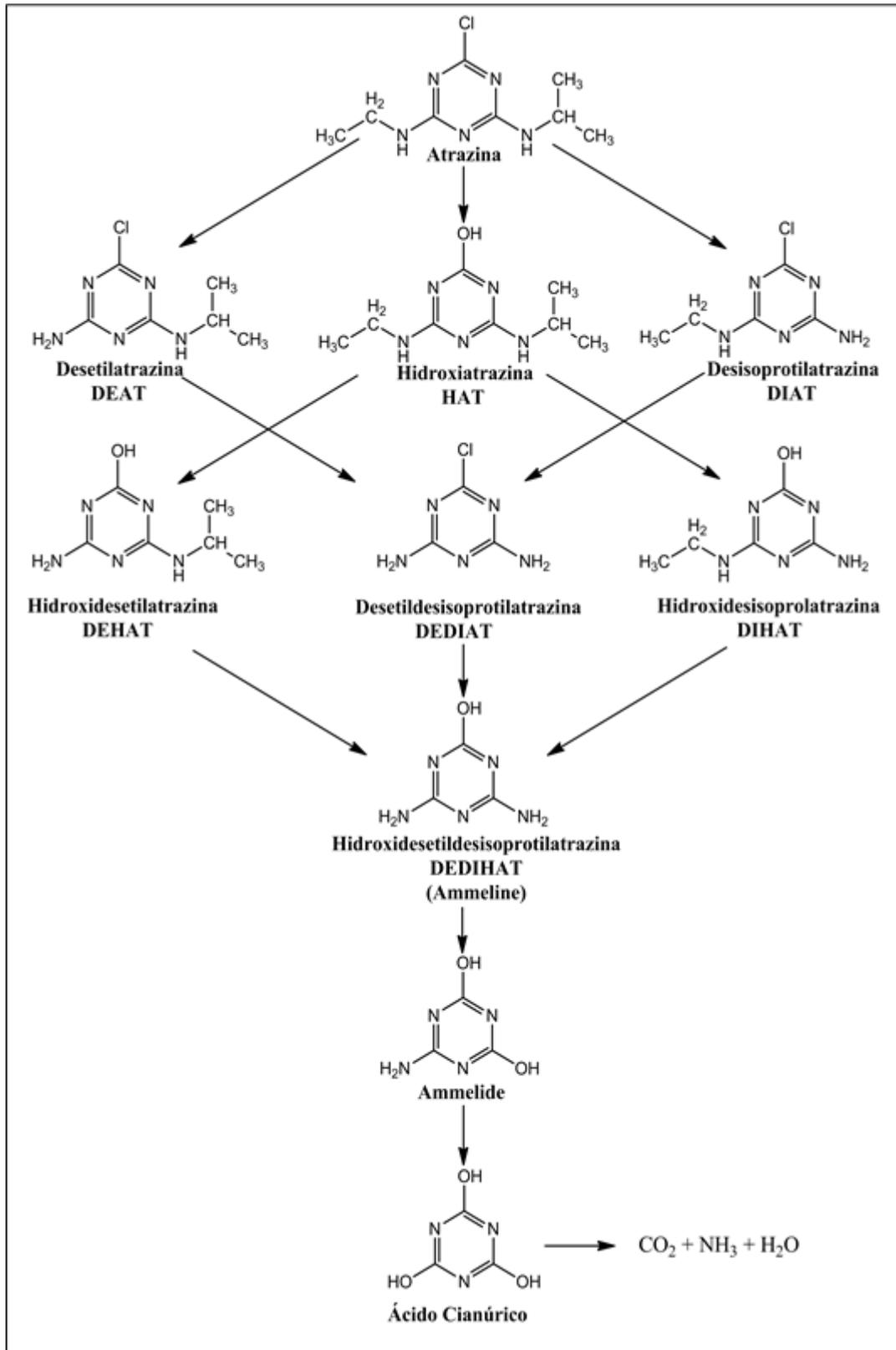


Figura 3: Possível Rota Cinética de degradação da Atrazina.

Fonte: Adaptado de Scribner, Thurman e Zimmerman et al. (2000) e Klementova e Keltnerova (2015).

Liu et al. (2017) demonstraram que a atrazina e seus clorometabólitos diaminochlorotriazine (DACT), deisopropylatrazine (DIP), e deethylatrazine (DE) afetaram em vários parâmetros o desenvolvimento de larvas de Zebra fish, além de serem disruptores neuroendócrinos afetando a expressão de genes relacionados a neurotoxicidade, como Ache, Gap43, Gfap, Ngn1, em estágios iniciais no desenvolvimento do peixe zebra. Estudos em camundongos comprovaram que a exposição aguda a atrazina e DACT induziu estresse oxidativo, perturbação endócrina, perda de peso do corpo e do fígado, e também evidenciou que o metabólito DACT mostrou ser mais tóxico que a ATZ (Jin et al., 2014).

Assim, o monitoramento ambiental por meio de biomarcadores da ATZ assim como dos seus metabólitos é de grande importância, uma vez que alguns estudos vem demonstrando que além da toxicidade conhecida da atrazina, seus produtos de degradação, principalmente os iniciais, podem induzir toxicidade até superior ao próprio herbicida.

### 2.3 BIOMARCADORES

Biomarcador é um traço mensurável em um organismo que responde a um agente tóxico. As características para classificar um bom biomarcador são: é facilmente medido; as medições são rápidas e baratas; a medição é específica para um tipo de tóxico; a resposta mostra uma relação de dose-resposta (concentração-resposta). Vale ressaltar também que as propriedades dos biomarcadores podem ser influenciadas não apenas pelo tóxico ou produto químico que deve ser monitorado, mas também pelas interações com outros produtos químicos presentes no ambiente, que pode influenciar marcadamente as respostas dos biomarcadores (Nikinmma, 2014).

Segundo Adams et al. (1990), os contaminantes presentes no ambiente aquático podem acarretar disfunções em diversos níveis de organização biológica, que incluem: alterações fisiológicas em órgãos e tecidos, mudanças comportamentais, prejuízo no crescimento e na reprodução destes animais. O estresse provocado por poluentes é uma ferramenta para identificar sinais iniciais de danos aos peixes, além de indicar relações existentes entre a exposição aos poluentes e os efeitos que podem ser observados nos organismos (Martinez e Cólus, 2002). Assim, os biomarcadores são ótimas ferramentas para investigar e monitorar a saúde do ecossistema aquático (Adams et al., 1990).

Para avaliar os efeitos dos poluentes na biota aquática, nos últimos anos têm se utilizado diversos testes de toxicidade com organismos de águas continentais, estuarinas e marinhas. Os testes são realizados tanto em condições laboratoriais e de campo, entretanto, os ensaios que ocorrem em laboratório estão voltados para a investigação das implicações do

tempo de exposição e da concentração dos poluentes, como por exemplo, diferentes concentrações de um xenobiótico e variações no tempo de exposição do grupo de peixes a esta substância (Martinez e Cólus, 2002; Jobling, 1995).

### 2.3.1 Brânquias

Os peixes estão em constante contato com o ambiente aquático por meio das brânquias. A maioria dos poluentes afetam a estrutura branquial, e direta ou indiretamente, o balanço hidromineral, o qual resulta nas principais causas de vulnerabilidade destes animais em águas poluídas (Wendelaar, 1997). As brânquias e a pele são os primeiros tecidos a serem afetados nos peixes pelos poluentes aquáticos. Isso deve-se principalmente, por exibirem uma ampla superfície de contato direto e permanente com os agentes tóxicos diluídos na água, sendo as brânquias o órgão principal atingido por contaminações hídricas (Bernet et al., 1999).

As brânquias nos peixes Teleósteos são constituídas por quatro arcos branquiais em cada lado da faringe, sendo cada arco constituído por duas fileiras de filamentos branquiais (lamelas primárias). De cada filamento branquial projetam-se as lamelas, formando assim o epitélio respiratório (Melletti, 2003). Os filamentos primários são constituídos por células pavimentosas apoiadas em uma membrana basal, as quais são sustentadas por células pilares que separam os capilares lamelares. As lamelas secundárias possuem um suporte cartilaginoso, um sistema vascular e um epitélio multiestratificado (Mallatt, 1985; Takashima e Hibiya, 1995).

As brânquias desempenham funções vitais, como osmorregulação, trocas gasosas, excreção de resíduos nitrogenados, além de serem consideradas importantes vias de absorção, bioconcentração e excreção de substâncias tóxicas, sendo o primeiro órgão exposto a contaminantes. Essa vulnerabilidade aos contaminantes deve-se ao fato das brânquias possuírem uma superfície extensa, que se encontra permanentemente em contato com o ambiente externo, acarretando em alterações morfológicas e histológicas (Ameur, 2015; Bernet et al, 1999; Luzivoto, 1994).

Além da perda de funções vitais, em contato com contaminantes, as brânquias podem apresentar diversas alterações que são consideradas respostas de defesa. Uma dessas respostas leva a um aumento da distância entre o meio externo e interno, diminuindo a superfície de contato com o contaminante. Entretanto, a dificuldade de difusão do poluente para o meio interno ao mesmo tempo reduz a difusão dos gases respiratórios, provocando um estado de hipóxia no peixe (Fernandes e Mazon, 2003; Mallatt, 1985).

### 2.3.2 Teste do Micronúcleo (MN) e Alterações Eritrocíticas Nucleares (AENS)

O teste do micronúcleo (MN) e Alterações Eritrocíticas Nucleares é uma técnica de baixo custo e de triagem rápida, capaz de identificar substâncias clastogênicas ou aneugênicas, e muito indicado para avaliar a exposição de peixes marinhos e de água doce a poluentes químicos e orgânicos (Landolt e Kocan, 1983).

Os micronúcleos (MN) são massas de material genético com aparência de um pequeno núcleo, os quais são resultado de quebra cromossômica, quando em contato com substâncias clastogênicas ou como resultado da disfunção do fuso mitótico causado por substâncias aneugênicas (Schmid, 1976). Embora o MN possa se originar espontaneamente, a sua indução é utilizada para avaliar danos genotóxicos causados por agentes mutagênicos (Heddle et al., 1983). O teste do MN foi inicialmente proposto por Heddle (1973) e Schmid (1975), como técnica alternativa às avaliações citogenéticas clássicas para detectar danos cromossômicos *in vivo* em populações de células em divisão, como as da medula óssea (Fenech, 2000).

O teste do micronúcleo em eritrócitos de peixes tem sido utilizado como uma importante ferramenta para detectar substâncias com potencial genotóxico no ambiente aquático. Diferentes trabalhos têm demonstrado que em eritrócitos de peixes o índice de micronúcleos e outras alterações morfológicas nucleares, aumentam quando os organismos são expostos a diversos poluentes, tanto em bioensaios (Ghisi et al., 2010; Ramsdorf et al., 2009; Ventura et al., 2008; Grisolia e Cordeiro, 2000) como em trabalhos de campo (Katsumiti et al., 2009; Ergene et al., 2007; De Flora et al., 1993), apesar do teste do Micronúcleo em peixes perder muito em sensibilidade, uma vez que o tecido utilizado como alvo é o sangue, que apresenta baixa quantidade de células em divisão. Assim, foram incorporadas ao teste a avaliação das Alterações Eritrocíticas Nucleares (AENS). Essas AENS são utilizadas como indicadores de efeitos genotóxicos de poluentes presentes na água, sendo classificadas como *vacuolated*, *lobed*, *notched*, *blebbed* (Carrasco et al., 1990).

### 2.4 *Astyanax altiparanae* COMO BIOINDICADOR

Espécies bioindicadoras são espécies encontradas no ambiente natural que são usadas em biomonitoramento, ou seja, são espécies usadas para indicar efeitos adversos de contaminação. No entanto, as espécies bioindicadoras geralmente são diferentes das espécies modelo utilizadas para a pesquisa toxicológica, uma vez que as espécies modelo não são encontradas nos ambientes naturais monitorados (Nikinmma, 2014).

O uso dos peixes como bioindicadores não se limita apenas a avaliações do número e da riqueza de espécies no ambiente, mas também a uma observação e análise minuciosa da saúde destes organismos por meio de biomarcadores, como os citados anteriormente (Paulino, 2011). Estes animais fornecem respostas rápidas sobre problemas ambientais, permitindo assim, que se identifiquem causas e efeitos entre contaminantes e respostas biológicas.

O gênero *Astyanax*, popularmente conhecido como lambari, abrange mais de 100 espécies e distribuem-se por quase toda a região Neotropical. São indivíduos de pequeno porte, dulcícolas, não migradores e de fecundação externa (Vazzoller e Menezes, 1992).

*Astyanax altiparanae* (Garutti e Britski, 2000) (fig. 4), possuem um comprimento total máximo de 129,2 mm, tem uma faixa prateada longitudinal sobre a linha lateral, com mancha umeral até os raios caudais medianos, mais larga sobre o pedúnculo caudal, formando uma mancha alongada horizontalmente e nadadeiras amareladas. *A. altiparanae* servem de alimento para peixes carnívoros maiores, além de apresentar grande flexibilidade alimentar, uma vez que se alimentam principalmente de larvas de insetos, sementes e algas (Hahn et al., 2004). São animais que não apresentam cuidado parental e realizam pequenas migrações, encontrando-se assim em rios e principalmente lagoas e canais. *A. altiparanae* distribui-se pela bacia do alto rio Paraná e na bacia do rio Iguaçu. (Graça e Pavanelli. 2007).



Figura 4: *Astyanax altiparanae*  
Fonte: Gonçalves, 2005. Fish base

Esta espécie pode ser encontrada na superfície ou na coluna de água em busca de comida (Orsi et al., 2004), assim está sujeita a diferentes tipos de contaminação. O gênero *Astyanax* foi utilizado em estudos de biomonitoramento quanto à exposição a óleo diesel (Dal Pont, 2012), a rios que sofrem ação antropogênica (Trujillo-Jiménez et al., 2011) e a exposição à áreas agrícolas, onde foram detectados diferentes contaminantes, e entre eles a atrazina (Vieira et al., 2017).

Os testes de toxicidade de produtos químicos geralmente são realizados com invertebrados ou peixes de clima temperado, como a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) ou em espécies exóticas como a tilápia (*Oreochromis niloticus*), sendo poucos trabalhos registrados na literatura sobre os efeitos de contaminantes em espécies endêmicas brasileiras, que são bastante cultivadas e valorizadas no mercado (Martinez e Cólus, 2002; Grisolia et al., 1995; Lemos et al., 1994). Desta forma, é de grande importância o uso de espécies nativas para estudos de toxicidade de compostos químicos em peixes, uma vez que, além de serem espécies de interesse ecológico e econômico, também são fontes de alimentação para o homem.

### 3 OBJETIVOS

#### Objetivo geral

Avaliar e identificar os efeitos do herbicida Atrazina e dos seus compostos de degradação provenientes do processo de Fotocatálise Heterogênea, com três catalisadores diferentes (ZnO, TiO<sub>2</sub>, ZnO/ TiO<sub>2</sub>+Fe), em *Astyanax altiparanae*.

#### Objetivos específicos:

- Avaliar a genotoxicidade, pelo Teste do Micronúcleo Písceo, do herbicida Atrazina e dos seus compostos de degradação provenientes do processo de Fotocatálise Heterogênea, em eritrócitos de *A. altiparanae*.
- Analisar alterações histopatológicas em brânquias de *A. altiparanae* expostas ao herbicida Atrazina e dos seus compostos de degradação provenientes do processo de Fotocatálise Heterogênea.
- Identificar por espectrometria de massa, os compostos presentes nos aquários após a exposição aos animais no tempo de 24 horas e 96 horas.

### REFERÊNCIAS

- Adams, N.H., Levi, P.E., Hodgson, E., 1990. In vitro studies of the metabolism of atrazine, simazine, and terbutryn in several vertebrate species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, (6), 1411-1417.
- Ameur, W. B., Y, El Megdiche., J. Lapuente., B, Barhoumi., S, Trabelsi., S, Ennaceur., L, Camps., J, Serret., D, Ramos-López., J, Gonzalez-Linare., M. H, Driss., M, Borràs., 2015. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia. *Chemosphere* 135, 67-74.

Andrei, E., 2005. Compêndio de defensivos agrícolas. São Paulo: 7 edição.

Balesteros, M. R., 2009. Desenvolvimento e otimização de metodologia para análise de atrazina e seus produtos de degradação por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora.

Belluck, D.A., Benjamin, S.L., Dawson, T., 1991. Groundwater contamination by atrazine and its metabolites: risk assesment, policy and legal implications. In: Somasundaram, L., Coast, J.R. (eds). Pesticides transformation products: fate and significance in the environment. Washington, Americal Chemical Society, p.254-273.

Beltrán, F.J., González, M., Rivas, F.J., Alvez, P., 1996. Aqueous UV radiation and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation of atrazine first degradation products: deethylatrazine and deisopropylatrazine. Environmental toxicology and chemistry, 15, (6), 868-872.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. Journal of Fish Diseases 22, 25-34.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. Journal of Fish Diseases 22, 25-34.

Bombardi, L.M., 2017. Geografia do uso de agrotóxicos do Brasil e conexões com a União Européia. São Paulo – USP, 30-50

Botelho, R.G., Monteiro, S.H., Christofolletti, C.A., Moura-Andrade, G.C.R., Tornisielo, V.L., 2015. Environmentally relevant concentrations of atrazine and ametrine induce micronuclei formation and nuclear abnormalities in erythrocytes of fish. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 69, (4), 577-585.

Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S., 1990. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological Indicator of Chemical Contaminant Effects. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 47, (11), 2123-2136.

Dal, Pont., 2012. Toxicidade do Óleo Diesel para o peixe *Astyanax altiparanae*. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Curitiba: UFPR.

De Flora, S., Viganò, L., D'agostini, F., Camoirano, A., Bagnasco, M., Bennicelli, C., Melodia, F., Arrilo, A., 1993. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. Mutation research, 319, (3), 167-177.

Deng, Y., Zhao, R., 2015. Advanced Oxidation Processes (AOPs) in Wastewater Treatment. Current Pollution Reports 1, 167-176.

Embrapa. Sistema de produção de banana para o estado o Pará. Disponível em <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1002115/1/SistemaProducaoBanana.pdf>. Acesso em: 15/06/2017.

Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. Mutation research 455, (1-2), 81-95.

Garutti, V., Britski, H.A., 2000. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia PUCRS. Série Zoologia, Porto Alegre, 13, 65-88.

- Ghisi, N.D.C., Ramsdorf, W.A., Ferraro, M.V.M., Almeida, M.I., Ribeiro, C.A., Cestari, M.M., 2010. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. *Environmental monitoring and assessment* 180, (1-4), 589-599.
- Glaze, W. H., 1987. Drinking-water treatment with ozone. *Environmental Science & Technology*, 21, (3), 224-230.
- Glaze, WH., Kang, J-W., Chapin, DH., 1987. The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation. *Ozone Science and Engineering* 9, (4), 335-352.
- Gonçalves, M.V., Marins de Campos, C.B., Batista, V.G., Cruz, A.D., Junior, P.M., Bastos, R.P., Melo e Silva, D., 2017. Genotoxic and mutagenic effects of Atrazine Atanor 50 SC on *Dendropsophus minutus* Peters, 1872 (Anura: Hylidae) developmental larval stages. *Chemosphere* 182, 730-737.
- Graça. W.J., Pavanelli, C.S., 2007. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. Maringá: EDUEM, 2007.
- Graymore, M., Stagnitti, F., Allison, G., 2001. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environment International* 26, 483-495.
- Grisolia, C.K., Cordeiro, C.M.T., 2000. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genetics and Molecular Biology* 23, (1), 235-239.
- Grisolia, C.K.; Faria, A.B.A. & Costa, O.C. 1995. Biomonitorização de substâncias genotóxicas no lago Paranoá, em Brasília, através da pesquisa de micronúcleos em eritrócitos de peixes. *Revista Brasileira Genética* 18, 369.
- Hahn, N.S., Fugli, R., Andrian, I.F. Trophic ecology of the fish assemblages. In: Thomaz, S.M., Agostinho, A.A., Hahn, N.S. (Ed.), 2004. *The Upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation*. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, 247-269.
- Hall, J.C., Van Deynse, T.D., Struger, J., Chan, C.H., 1993. Enzyme immunoassay based survey of precipitation and surface water for the presence of atrazine, metolachlor and 2,4D. *Journal of Environmental Science and Health* 28, 577-598.
- Heddle, J.A., 1973. A rapid *in vivo* test for chromosome damage. *Mutation research* 18, (2), 187-192.
- Heddle, J.A., Hite, M., Irkhart, B., Mavournin, K., Macgregor, J.T., Newell, G.W.; Salamone, M.F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. *Mutation Research*, v. 123, n. 1, p.61-118, 1983
- Hess, F.D., 2000. Light-dependent herbicides: an overview. *Wedd science*, 48, (2), 160-170.
- Jiang, H., Adams, C., 2006. Treatability of chloro-s-triazines by conventional drinking water treatment technologies. *Water Research*, 40, (8), 1657-1667.
- Jin, Y., Wang, L., Chen, G., Lin, X., Miao, W., Fu, Z., 2014. Exposure of mice to atrazine and its metabolite diamino chloro triazine elicits oxidative stress and endocrine disruption. *Environmental toxicology and pharmacology* 37, (2), 782-790.

- Jobling, M. 1995. Human impacts on aquatic environments. In: Environmental biology of fishes. Chapman & Hall, London. pp.415-434.
- Kalinke, C., Betiolo, D.M., 2011. degradação de atrazina proveniente de laboratório de análises cromatográficas utilizando os processos fenton e foto-fenton. Trabalho de Conclusão de Curso – Departamento de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- Katsumiti, A., Domingos, F.X.V., Azevedo, M., Silva, M.D., Damian, R.C., Almeida, M.I., Assis, H.C., Cestari, M.M., Randi, M.A., Ribeiro, C.A., Freire, C.A., 2009. An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuña oil spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. Environmental monitoring and assessment 152, (1-4), 209-222.
- Klementova, S., Keltnerova, L., 2015. Chapter 4: Triazine Herbicides in the Environment. In: Price, A., Kelton, J., Sarunaite, L. Herbicides, Physiology of Action, and Safety. [S.l.]: InTech, 73-96. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/herbicides-physiology-of-action-and-safety/triazine-herbicides-in-the-environment>>. Acesso em: 17/11/2017.
- Kolpin, D.W., Sneek-Fahrer, D., Hallberg, G.R., Libra, R.D., 1997. Temporal Trends of Selected Agricultural Chemicals in Iowa's Groundwater, 1982–1995: Are Things Getting Better? Journal of Environmental Quality Abstract 26, (4), 1007-1017.
- Landolt, M.L., Kocan, R.M., 1983. Fish cell cytogenetics: a measurement of the genotoxic effects of environmental pollutants. Aquatic Toxicology, 335-353.
- Lemos, C.T., Vargas, V.M.F., Henriques, J.A.P., Mattevi, M.S. 1994. Genotoxicity of river water under the influence of petrochemical industrial complexes. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 52, 848-855.
- Li, J., Hu, J., Xu, W., Ling, M., Yao, J., 2014. Hydrolysis Reaction Mechanism in Atrazine Metabolism and Prediction of Its Metabolites' Toxicities. Agricultural and Food Chemistry 62, (21), 4852-4863.
- Linsebigler, A. L., Lu, G., Yates, J. T., 1995. Photocatalysis on TiO<sub>2</sub> surfaces: Principles, Mechanisms, and Selected Results. Chemical Reviews 95, (3), 735-758.
- Liu, Z., Fu, Z., Jin, Y., 2017. Immunotoxic effects of atrazine and its main metabolites at environmental relevant concentrations on larval zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere 166, 212-220.
- Liu, Z., Wang, Y., Zhu, Z., Yang, E., Feng, X., Fu, Z., Jin, Y., 2016. Atrazine and its main metabolites alter the locomotor activity of larval zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere 148, 163-170.
- Londres, F., 2011. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa.
- Luvizotto, M. F. Efeito de diferentes salinidades sobre as células de cloreto e as células secretoras do epitélio branquial do peixe antártico *Nototheniops nudifons* (Lonnberg, 1905). Curitiba, 1994. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná.
- Mallatt, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants : a statistical review. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences Sci. 42, (4), 630-648.

- Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2002. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: Moacyr E. Medri; Edmilson Bianchini; Oscar A. Shibatta; José A. Pimenta. (Org.). A bacia do rio Tibagi. Londrina: MC Gráfica, p. 551-577.
- Ergene, S., Cavaş, T., Celik, A., Köleli, N., Aymak, C., 2007. Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. *Environmental and molecular mutagenesis* 48, (6), 421-429.
- McMurray, T.A., Dunlop, P.S.M., Byrne, J.A., 2006. The photocatalytic degradation of atrazine on nanoparticulate TiO<sub>2</sub> films. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 182, 43-51.
- Meletti, P.C., 2003. Avaliação da degradação ambiental por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises patológicas em peixes. Tese – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental. São Carlos: USP.
- Mkhalid, I. A., 2016 Photocatalytic remediation of atrazine under visible light radiation using Pd-Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanospheres. *Journal of Alloys and Compounds* 682, 766-772.
- Mohamed, R.M., 2015. Synthesis and characterization of AgCl<sup>@</sup> graphitic carbon nitride hybrid materials for the photocatalytic degradation of atrazine. *Ceramics international*, 41, 1197-1204.
- Nwani, C.D., Lakra, W.S., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaka, B., Srivastava, S.K., 2010. Toxicity of herbicide atrazine: effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa Punctatus* (Bloch). *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7, 3298-3312.
- Ohtani, B., 2008. Preparing articles on photocatalysis-beyond the illusions, misconceptions, and speculation. *Chemistry letters* 37, (3), 216-229.
- Oliveira, J. S. S.; Silveira, L. G., 2011. Utilização de dióxido de titânio em processos fotocatalíticos para degradação de halofenóis. *Vivências: revista eletrônica de extensão da URI* 7, (12), 91-104.
- Orsi, M.L., Carvalho, E.D., Foresti, F., 2004. Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski (Teleostei, Characidae) do médio rio Paranapanema, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 21, (2), 207-218.
- Paulino, M.G., 2011. Efeitos da exposição da atrazina nas brânquias de curimatá, *Prochilodus lineatus* (Teleosteo, Prochilontidae). Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. São Carlos: UFSCar/UNESP.
- Pelaez, V., Silva, L.R., Guimarães, T.A., Dal Ri, F., Teodorovicz, T.A., 2015 (des)coordenação de políticas para a indústria de agrotóxicos no Brasil. *Revista Brasileira de Inovação* 14, 153-178.
- Ramsdorf, W.A., Guimarães, F.D.S.F., Ferraro, M.V.M., 2009. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. *Mutation research* 673, (1), 78-81.

- Readman, J.W., Albanis, T.A., Barcelo, D., Galassi, S., Tronczynski, J., Gobrielides, G.P., 1993. Herbicide contamination of mediterranean estaurine Waters: results from a MED POL pilot survey. *Marine Pollution Bulletin* 26, 613-619.
- Rohr, J.R., Mccoy, K.A., 2010. A qualitative Meta-analisis reveals consistent effects of atrazine on Freshwater fish and amphibians. *Enviromental health perspct* 118, 20-32.
- Sacco, O., Vaiano, V., Hana, C., Sannino, D., Dionysiou, D., 2015. Photocatalytic removal of atrazine usinf N-doped TiO<sub>2</sub> supported on phosphors. *Applied Catalysis B: Environmental*, 164, 462-474.
- Santacruz-Chávez, J.A., Oros-Ruiz, S., Prado, B., Zanella, R., 2015. Photocatalytic degradation of atrazine using TiO<sub>2</sub> superficially modified with metallic nanoparticles. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3, 3055-3061.
- Santos, T.B., Martinez, C.B.R., 2012. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. *Chemosphere* 89, (9), 1118-1125.
- Savoy, V.L.T., 2011. Classificação dos agrotóxicos. *Biológico*, 73, (1), 91-92. Disponível em: <http://livrozilla.com/doc/929072/classifica%C3%A7%C3%A3o-dos-agrot%C3%B3xicos>. Acesso em: 10/09/2017.
- Shmid, W., 1976. The micronucleus test. *Mutation Research*, 31, (1), 9-15.
- Schottler, S.P., Eisenreich, S.J., Capel, P.D., 1994. Atrazine, alahlor and cyazine in a large river system. *Enviromental Science Tecnology* 28, 1079-1089.
- Scribner, E.A.; Thurman, E.M.; Zimmerman, L.R., 2000. Analysis of selected herbicide metabolites in surface and ground water of the United States. *Science of the Total Environment*, 248, 157-167.
- Solomon, K.R., Dalhoff, C., Volz, D., Van Der Kraak, G., 2014. Effects of herbicides on fish. *Organic Chemical Toxicology of Fishes*. Elsevier – London, 370-409.
- Solomon, K.R., Carr, J.A., Du Preez, L.H., Giesy, J.P., Smith, E.E., Kendall, R.J., Van Der Kraak, G.J. 2008. Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: A critical review. *Critical Reviews in Toxicology* 38, (9), 721-772.
- Solomon, K.R., Baker, B.D., Richards, P.R., Dixon, K.R., Klaine, S.J., La Point, T.W., Kendall, R.J., Weisskopf, C.P., Giddings, J.M., Giesy, J.P., Hall, L.W., Williams, W.M., 1996. Ecological risk assessment of atrazine in north american surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, (1), 31-76.
- Takashima, F., Hibiya, T., 1995 (eds). *An atlas of fish Histology – normal and pathological features*. Kodansha Ltd: Tóquio, 195.
- Teixeira, C.P., Jardim, W.F., 2004. *Caderno temático - Processos Oxidativos Avançados*. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 3.
- Trujillo-Jiménez, P., Sedeño-Díaz, J.E., Camargo, J.A., López-López, E., 2011. Assessing environmentalconditions of the Río Champotón (México) using diverse indices and biomarkers in the fish *Astyanax aeneus* (Günther, 1860). *Ecological Indicators* 11, 1636-1646.

- Vazzoler, A.E.A.M., Menezes, N.A. 1992. Síntese dos conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). *Revista Brasileira de Biologia* 52, (4), 627-640.
- Ventura, B.C., De Angelis, D.F., Marin-Morales, M.A., 2008. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pesticide, Biochemistry & Physiology* 90, 42-51.
- Vidal, R.A., 1997. *Herbicidas: mecanismos de ação e resistência das plantas*. Porto Alegre.
- Wang, W.K., Chen, J.J., Gao, M., Huang, Y.X., Zhang, X., Yu, H.Q., 2016. Photocatalytic degradation of atrazine by boron-doped TiO<sub>2</sub> with tunable rutile/anatase ratio. *Applied Catalysis B: Environmental* 195, 69-76.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77, 591 - 625.
- Wols, B., Hofman-Caris, C., 2012. Review of photochemical reaction constants of organic micropollutants required for UV advanced oxidation processes in water. *Water Research*, 46, 9, 2815-2827.
- Yasmina, M., Mohammede, S.H., Khaoula, CHAOUCHE., 2014,. Treatment heterogeneous photocatalysis; Factors influencing the photocatalytic degradation by TiO<sub>2</sub>. *Energy procedia*, 50, 559-566.

#### **4 DEGRADAÇÃO FOTOCATALÍTICA DO HERBICIDA ATRAZINA: EFEITOS GENOTÓXICOS E HISTOPATOLÓGICOS EM *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae)**

##### **RESUMO**

A Atrazina (ATZ) e os seus metabólitos têm sido detectados em águas superficiais e subterrâneas em diversas regiões do mundo. No presente estudo foi investigado o potencial genotóxico pelo Teste do Micronúcleo (MN) e histopatológico em brânquias de *Astyanax altiparanae*, do herbicida Atrazina e de alguns dos seus metabólitos, provenientes da degradação da Fotocatálise Heterogênea: Hidroxiatrazina (HA), Deisopropil hidroxiatrazina (DIA-OH), Desetil terbutilazina (DET), Terbutilazina-2-hidroxi (HT), Desetilatrazina mercapturico (DEAM-3), Desalquil atrazina mercapturico (DAA-MER), Desetil hidroxi atrazina (DEHA), em exposição aguda (24 e 96 horas). No teste do MN, os grupos: ATZ, foto – ZnO, TiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub>/ZnO+Fe foram estatisticamente diferentes do controle, no tempo de 96 horas, onde a anormalidade eritrocítica nuclear (AEN) de maior índice foi a do tipo vacúolo. Em relação a histopatologia de brânquias, as alterações do tipo hipertrofia, hiperplasia e redução das microdigitações nas células pavimentosas, foram as mais frequentemente observadas nos tratamentos em relação ao grupo controle. Apesar da degradação da ATZ pelo processo fotocatalítico ter sido eficiente, principalmente no grupo TiO<sub>2</sub>/ZnO+Fe, onde nos primeiros 5 minutos de reação degradou-se 60% do herbicida, não ocorreu no final da reação, uma completa mineralização do poluente, e formaram-se metabólitos. Esses compostos podem estar conferindo toxicidade assim como a sua molécula precursora, pois induziram genotoxicidade em eritrócitos e alterações nas brânquias de *A. altiparanae*. Desta forma, comprova-se a importância de estudos que avaliem a toxicidade destes metabólitos, pois estão sendo constantemente detectados em águas superficiais, subterrâneas e também de abastecimento humano, além de analisar a eficácia de futuras tecnologias que venham a ser utilizadas na degradação de poluentes e no tratamento de águas para abastecimento, como a Fotocatálise Heterogênea.

Palavras-chave: Toxicidade, Teste do Micronúcleo, metabólitos da Atrazina, Processos oxidativos avançados, Biomonitoramento, Ecotoxicologia.

PHOTOCATALYTIC DEGRADATION OF THE HERBICIDE ATRAZINE: GENOTOXIC AND HISTOPATHOLOGICAL EFFECTS IN *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae)

**ABSTRACT**

Atrazine (ATZ) and its metabolites have been detected in superficial waters and groundwater all over the world. The present study investigated the genotoxic potential, through micronucleus (MN) and histopathological tests in the gills of *Astyanax altiparanae*, of the herbicide Atrazine and some of its metabolites, which were resultant from Heterogeneous Photocatalysis: Hydroxyatrazine (HA), Deisopropyl hydroxyatrazine (DIA-OH), Desethyl terbuthylazine (DET), Terbuthylazine-2-hidroxy (HT), Desethylatrazine mercapturate (DEAM-3), Desalkyl atrazine mercapturate (DAA-MER), Desethyl hidroxyatrazine (DEHA), in acute exposure (at 24 and 96 hours). In the MN test, the treatment groups ATZ, photo-ZnO, TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>/ZnO+Fe were statistically different from the control groups, at time 96 hours, when the most frequent nuclear erythrocytic abnormality was the vacuole type. Regarding gill histopathology, alterations of types hypertrophy, hyperplasia and reduction of pavement cells were the most frequently observed in treatment groups compared to the control group. Despite the efficiency of ATZ degradation through the photocatalytic process, (especially in the TiO<sub>2</sub>/ZnO+Fe group where in the first five minutes of the reaction, 60% of herbicide was degraded), a complete mineralization of this pollutant did not occur at the end of the reaction, thus forming metabolites. These compounds could be granting toxicity, as well as its precursor molecule, because they induced genotoxicity in erythrocytes and alterations in *A. altiparanae* gills. Therefore, the present study shows the importance of research that evaluates the toxicity of these metabolites, since they have been constantly detected in superficial waters, groundwater and water for human consumption, besides analyzing the efficiency of technology that could be used in the future to degrade pollutants and to treat water for human supply, such as the Heterogeneous Photocatalysis.

Keywords: Toxicity, Micronucleus test, Atrazine metabolites, Advanced oxidative processes, Biomonitoring, Ecotoxicology.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

A ampliação de cultivos voltados para a transformação em *commodities* ou agrocombustíveis demandou intensa utilização de agrotóxicos. Especificamente no Brasil, entre os anos de 2000 e 2010 houve um aumento de 200% no consumo destes poluentes, contribuindo de forma expressiva para o aumento da poluição ambiental, especialmente em ecossistemas aquáticos (Bombardi, 2017; Pelaez et al., 2017). Entre os pesticidas mais comercializados no mundo, destaca-se o herbicida atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina), utilizado no controle de ervas daninhas, principalmente nas culturas de milho, sorgo, cana-de-açúcar, abacaxi e soja. Ao ser empregado em pré e pós-emergência nas plantas invasoras, atua principalmente bloqueando a transferência de elétrons no fotossistema II, levando-as a morte (Svorc et al., 2013; Gammon et al., 2005).

Além do uso indiscriminado na agricultura, o derramamento acidental e a descarga de efluentes contendo este herbicida, resultam na contaminação do solo, águas superficiais e subterrâneas. Diante disso, diversos estudos vêm monitorando a presença deste herbicida, além dos metabólitos provenientes da sua degradação em águas superficiais (Masia et al., 2015; Proia et al., 2013), subterrâneas (Korosa et al., 2016; Dujakovic et al., 2010) e residuais (Rozas et al., 2016; Do amaral et al., 2014).

Além dos estudos de detecção da atrazina e dos seus metabólitos, testes apontando a toxicidade em organismos aquáticos também são relatados, incluindo efeitos na locomoção e imunotóxicos em *Danio rerio* (Liu et al., 2017 e 2016), genotoxicidade em *Channa punctata* (Nwani et al., 2011), *Prochilodus lineatus* (Santos e Martinez, 2012), *Oreochromis niloticus* (Ventura et al., 2008), *Dendropsophus minutus* (Gonçalves et al., 2017), alterações morfológicas em brânquias de *P. lineatus* (Paulino et al., 2012), feminilização em *Xenopus laevis* (Hayes et al., 2011) e a toxicidade em diferentes espécies peixes, anfíbios e répteis (Solomon, 2014).

Apesar da toxicidade da atrazina para espécies aquáticas e saúde humana, bem como, pela sua característica recalcitrante no meio ambiente, sua aplicação ainda é permitida em muitos países. Destacam-se os países da América do Sul, onde não há limites estabelecidos de concentração para todos os pesticidas, e conseqüentemente, para a presença dos seus metabólitos nas águas superficiais e subterrâneas (Komtchou et al., 2016; Vonberg et al., 2014).

Sendo assim, pesquisas que visam degradar este herbicida e, conseqüentemente, os seus metabólitos no ambiente aquático, têm sido desenvolvidas de forma eficiente. Dentre

eles, os Processos Oxidativos Avançados (POA's), que são tecnologias que utilizam radicais hidroxil (OH) como base para a degradação de poluentes orgânicos persistentes e desinfecção de poluentes (Moreira et al., 2017; Komtchou et al., 2016). Entre os tipos de POA's empregados para a degradação da atrazina destaca-se a Fotocatálise. Esta técnica utiliza uma combinação de luz UV ou solar e um catalisador semiconductor para degradar poluentes por meio de reações de oxido-redução (McMurray et al., 2006).

Esta tecnologia torna-se uma alternativa eficiente para a remoção deste herbicida, quando comparada a processos convencionais de tratamento, tais como o da adsorção (Cao e Harris, 2010) e membranas de nanofiltração (Ahmad et al., 2008). No entanto, formam-se metabólitos ou compostos intermediários após esses processos de degradação, que além da toxicidade comprovada (Jin et al., 2014; Li et al., 2014; Fogacs et al., 2013), ainda não estão claros os mecanismos de ação e os possíveis efeitos sinérgicos, uma vez que na natureza estes metabólitos atuam de forma conjunta nos organismos.

O peixe do gênero *Astyanax* utilizado neste estudo, possui sensibilidade relatada para detectar poluentes em diferentes ambientes (Yamamoto et al., 2016; Prado et al., 2014; Lemos et al., 2008) pois pode ser encontrado tanto na superfície como na coluna d'água em busca de alimento, expondo-se assim a diferentes níveis de contaminação (Orsi et al., 2004). Desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar, em teste agudo em *Astyanax altiparanae*, o potencial genotóxico em eritrócitos e a histopatologia em brânquias de peixes, expostos ao herbicida Atrazina e aos seus compostos degradados por fotocatalise heterogênea (ZnO, TiO<sub>2</sub>, ZnO/TiO<sub>2</sub>+Fe), além de identificar, por espectrometria de massa, os compostos presentes no meio após a exposição aos animais no tempo de 24 horas e 96 horas.

## 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.2.1 Fotocatálise heterogênea

#### 4.2.1.1 Solução estoque de Atrazina - efluente sintético e preparo dos catalisadores

A solução estoque foi preparada com a diluição da atrazina (Sigma Aldrich) em metanol grau HPLC (J.T Baker). A concentração resultante desta diluição para a atrazina foi de aproximadamente 1000 mg/L. A partir da solução estoque de atrazina foi preparada uma solução sintética de 5 mg/L em água ultrapura para os testes reacionais, denominada de efluente sintético.

Para a síntese dos catalisadores foram utilizados ZnO, TiO<sub>2</sub> e Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>•9H<sub>2</sub>O, (Dinâmica, Synth Sigma Aldrich, respectivamente). Na preparação dos catalisadores foram

utilizados estes componentes nas proporções mássicas de 15% de zinco, 80% de TiO<sub>2</sub> dopados com 5% de Ferro. Os catalisadores foram preparados pelo método da impregnação com excesso de solvente. Basicamente a metodologia consistiu na mistura física dos 3 componentes (ZnO, TiO<sub>2</sub> e Fe) previamente dissolvidos em água ultrapura. Após, essa mistura foi deixada em agitação por 16 horas.

Depois deste processo, foi feita a secagem previa em rota- evaporador seguida pela secagem em estufa a 80°C por 24 horas. Após a síntese e as etapas de secagem todos os catalisadores foram calcinados a 400°C conduzido por uma rampa de aquecimento à uma taxa de 8°C/min (da temperatura ambiente até 100°C) e de 3°C/min (de 100°C até 400°C), totalizando 4 horas de tratamento térmico. Por fim, os óxidos comerciais puros calcinados TiO<sub>2</sub> (Synth, com 91,0% de grau de pureza) e Óxido de zinco (Dinâmica, 99,9% de pureza) foram avaliados quanto à sua atividade na fotodegradação da atrazina.

#### 4.2.1.2 Teste Reacional

No reator batelada (fig. 5) usando radiação UV, adicionou-se 1L da solução de Atrazina, com 10mg de catalisador (TiO<sub>2</sub> puro, ZnO puro e 15% ZnO/TiO<sub>2</sub> dopado com 5% Fe), a qual foi mantida a 25°C, sob agitação magnética constante por 1 hora, no pH natural, na pressão ambiente, utilizando uma lâmpada de vapor de mercúrio de 250W (tabela 1).

Tabela 1: Condições experimentais para a degradação da Atrazina por Fotocatálise Heterogênea.

<b>Parâmetros da reação</b>	<b>Condições experimentais</b>
<b>Temperatura</b>	24°C
<b>Pressão</b>	Atmosférica
<b>Tempo total de reação</b>	1 hora
<b>Concentração inicial de Atrazina</b>	5 mg/L
<b>Concentração de catalisador</b>	37,5µg
<b>Volume reator</b>	1 L
<b>Volume efluente da reação</b>	750 mL

Durante a reação, alíquotas de 3 mL da suspensão foram coletadas em intervalos regulares (0, 2, 5, 10, 15, 30, 60 minutos), sendo filtradas com membrana Millipore 0,22 µm para retirada dos catalisadores. As leituras foram realizadas por meio de cromatografia líquida

de alta eficiência (HPLC) para avaliar a degradação da atrazina da concentração ao longo da reação.

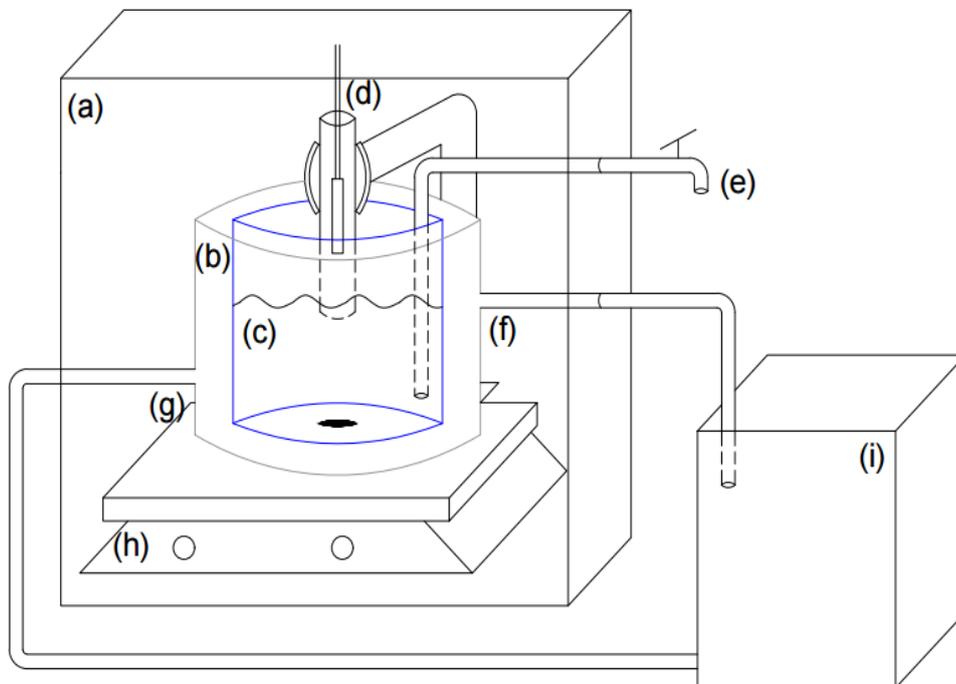


Figura 5: Modelo esquemático do reator batelada.

Legenda: (a) caixa de aço para proteção, (b) revestimento de aço, (c) solução de atrazina, (d) lâmpada envolvida por tubo de quartzo, (e) coleta de amostras, (g) mangueira de entrada e saída, (f) água para resfriamento, (h) agitador magnético, (i) banho termostático. Fonte: Silva, 2017.

As reações de Fotocatálise Heterogênea foram realizadas no Laboratório de Catálise – Departamento de Engenharia Química (DEQ) – Universidade Estadual de Maringá.

#### 4.2.2 Espectrometria de massa

##### 4.2.2.1 Materiais e reagentes químicos

O padrão analítico de Atrazina foi obtido por Sigma Aldrich. Os solventes utilizados foram: metanol (grau HPLC, 99 % pureza, Merck), água ultra-pura obtida por sistema Milli-Q (Millipore, Bedford USA). O ácido fórmico grau analítico (85%) utilizado foi obtido pela Synth.

#### 4.2.2.2 Preparo de amostras e análise em espectrometria de massa

De cada aquário foram coletados 2 mL nos dois tempo amostrais (24 e 96 horas) e reservados em *eppendorfs* em *freezer* -80. De cada amostra foi coletado um volume fixo de 100 µL. Todas as amostras analisadas foram diluídas em metanol para um volume final de 1 mL e adicionado 10 µL de ácido fórmico. As soluções acidificadas, totalizando 34 amostras, foram injetadas diretamente no espectrômetro de massas.

As análises de espectrometria de massas de S-1-34 foram realizados em PREMIER/XE® Quattro Micro™ API com ionização por *electrospray* (ESI-MS). Os espectros de massas foram registrados em modo positivo utilizando ácido fórmico como modificador orgânico. Os parâmetros utilizados foram: temperatura da fonte 110 °C, temperatura de solvatação 350 °C, taxa de fluxo do gás de dessolvatação 500 L h<sup>-1</sup>, fluxo do gás do cone 0 L h<sup>-1</sup>. O gás nitrogênio foi utilizado com gás secante e nebulização. Os ajustes do cone, capilar e valores do *m/z* dos íons precursores e seus íons produtos (íons de transmissão e/ou confirmação) utilizados nas análises de monitoramento de reações múltiplas (MRM), foram coletados por dados publicados na literatura para a identificação e quantificação de todas as moléculas analisadas (Rodríguez-González et al., 2016; Meng et al., 2015; Draher et al., 2014; Xu et al., 2014; Kuklenyik et al., 2012; Braekevelt et al., 2011; Fenoll et al., 2011; Panuwet et al., 2010; Chen et al., 2009; Dagnac et al., 2005; Chan and Chu, 2005).

As análises em espectrometria de massa foram realizadas no Laboratório Fenn, na Universidade Federal do Paraná – Campus Jandaia do Sul.

### 4.3 ENSAIO DE TOXICIDADE

#### 4.3.1 Aclimação e delineamento experimental

Juvenis de *A. altiparanae* ( $4.62 \pm 0,68$  g,  $5.5 \pm 0,37$  cm, N = 200) foram adquiridos de fonte comercial (Piscicultura Piracema, Maringá - PR). Os animais foram aclimatados durante 15 dias em um tanque de 1000 litros, contendo água desclorada sob aeração constante e fotoperíodo 12h:12h. Durante o período de aclimação os animais foram alimentados uma vez ao dia com dieta comercial (Acqua line), e durante os testes de toxicidade (24 e 96 horas) os animais não foram alimentados. Os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados ao longo do período de aclimação e dos testes de toxicidade (pH:  $7,45 \pm 0,52$ ;

Temperatura:  $23,2 \pm 0,19$  °C; Condutividade:  $215,66 \pm 10,5 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ ; oxigênio dissolvido:  $7,82 \pm 0,72$  mg.L).

Após o período de aclimação, os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos (n=9 por grupo, n=3 por aquário) em aquários de vidro de 25 L, onde foram submetidos a testes de toxicidade aguda estática por 24 e 96 horas. Um grupo foi mantido sob condições de controle (somente água desclorada), e os outros 4 grupos foram expostos aos seguintes tratamentos:  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  de Atrazina (ATZ); Fotocatálise com óxido de Zinco (foto - ZnO); Fotocatálise com dióxido de Titânio (foto -  $\text{TiO}_2$ ); Fotocatálise com óxido de Zinco impregnado com dióxido de Titânio, dopado com Ferro (foto -  $\text{ZnO}/\text{TiO}_2+\text{Fe}$ ).

A concentração de  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  de ATZ corresponde a 80% da concentração da atrazina utilizada no controle de ervas daninhas (Ventura et al. 2008). Os grupos que foram expostos a Atrazina degradada por fotocatalise, receberam 0,23L do processo fotocatalítico referente a 1% do volume final de água do aquário (23 L).

Este trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Estadual de Maringá, com o protocolo: 8236290816.

#### 4.3.2 Amostragem

Após o período de exposição (24 e 96 horas), os animais foram anestesiados com benzocaína ( $0,1 \text{g L}^{-1}$ ), medidos ( $5,49 \pm 0,11$ cm), pesados ( $4,63 \pm 0,07$ g) e as amostras de sangue foram coletadas por punção da veia caudal, sendo posteriormente sacrificados por secção medular. As brânquias foram coletadas, limpas com solução salina e colocadas em fixador *Bouin* para serem utilizadas e analisadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

#### 4.3.3 Teste do Micronúcleo (MN) e Alterações Eritrocíticas Nucleares (AENS)

O teste do Micronúcleo foi realizado com os eritrócitos dos peixes de acordo com Heddle (1973) e Schmid (1975), além da análise de alterações eritrocíticas nucleares (AENS) de acordo com Carrasco et al. (1990). Para o mesmo, foram montadas lâminas de esfregaço sanguíneo com o sangue obtido de *A. altiparanae* ( $5 \mu\text{L}$ ).

As lâminas foram deixadas durante 24 horas em temperatura ambiente para a secagem e posteriormente fixadas em metanol por 10 minutos, coradas com *acridina orange* (0,03%) e analisadas 2.000 células por animal em microscopia de fluorescência (aumento de 1000x). O índice de MN e ANES de cada grupo experimental foi calculada e expressa 1000 células. Foram analisados micronúcleos e Alterações eritrocíticas nucleares (AENS), divididas em:

núcleos vacuolados (*vacuolated*), núcleo em forma de rim (*notched*), núcleo lobulado (*lobed*), núcleo segmentado (*blebbed*), células binucleadas.

#### 4.3.4 Histopatologia em brânquias

As brânquias dos peixes (n= 4) foram fixadas em Bouin aquoso (Ácido pícrico, formaldeído e ácido acético em água destilada) por 24 horas, e desidratadas em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 100%). Posteriormente, as amostras foram submetidas ao ponto crítico Leica CPD 030, recobertos por pó de ouro no metalizador Shimadzu IC-50 e analisadas no microscópio eletrônico de varredura QUANTA 250 FEI no Centro de Microscopia do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá/Paraná/Brasil.

Foram realizadas análises qualitativas das alterações branquiais de acordo com Schwaiger et al. (1997) com modificações. As lesões foram classificadas em leves (+), moderadas (++) e severas (+++), conforme extensão do tecido que foi comprometido após o tratamento. A classe (+) corresponde a lesões presentes em até 25% da área analisada, a classe (++) a lesões presentes em 25-50% da área; e a classe (+++) quando a lesão compromete mais de 50% da área analisada.

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados do Teste do Micronúcleo foram testados quanto a normalidade e homogeneidade usando o teste de Shapiro Wilks e Levene, respectivamente. Quando necessário, foi realizada a transformação logarítmica para a normalização dos dados e para reduzir a heterogeneidade da variância. Posteriormente os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA *one way*) seguido do pós-teste de comparações *Tukey*, para avaliar as diferenças significativas entre as médias dos grupos experimentais. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software STATISTICA 7.0. O nível de significância considerado foi de 5% ( $P < 0,05$ ).

#### 4.5 RESULTADOS

##### 4.5.1 Degradação do herbicida atrazina por três catalisadores diferentes

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos com os testes de adsorção antes de acionar a lâmpada (-30 min), bem como a evolução da degradação da atrazina em função de

diferentes tempos de exposição à luz UV na presença dos catalisadores TiO<sub>2</sub>, ZnO e ZnO/TiO<sub>2</sub> dopado com 5% de ferro calcinados a 400°C, com uma concentração de catalisador de 50 mg/L em meio a uma solução de 5mg/L de atrazina. As demais condições foram mantidas de acordo com o apresentado na Tabela 1. Em condições escuras (adsorção) ocorreu uma diminuição da concentração de atrazina de aproximadamente 10% durante os 30 minutos do ensaio, comprovando que apenas o uso do catalisador na solução não torna possível a redução significativa do contaminante.

Tabela 2: Concentração de atrazina degradada pelo processo de fotocatalise heterogênea em três catalisadores diferentes: foto – ZnO, foto – TiO<sub>2</sub> e foto – ZnO/TiO<sub>2</sub>+Fe.

Tempo de reação (min)	Concentração (mg/L)		
	TiO <sub>2</sub>	ZnO	ZnO/TiO <sub>2</sub> +Fe
-30 <sup>#</sup>	4,14773	4,12517	4,32095
0	3,31076	3,04439	4,24671
5	2,0524	2,04657	1,76128
10	0,6361	0,45342	0,90757
20	0,19869	0,11354	0,03785
30	0,09389	0,10408	0,03057
60	0,11499	0,06914	0,00728*

\*: representa a maior porcentagem de degradação entre os três catalisadores após 60 minutos de reação fotocatalítica. #: o tempo -30 minutos refere-se ao tempo de reação em que não estava ligada a lâmpada de vapor de mercúrio.

No que se refere aos resultados obtidos com as reações fotocatalíticas é perceptível que o uso do catalisador de ZnO/TiO<sub>2</sub>+Fe ocasionou uma melhora na porcentagem de degradação quando comparado aos catalisadores comerciais puros TiO<sub>2</sub> e ZnO. O valor de concentração da atrazina passou de 5mg/L para 0,00728 mg/L após 60 minutos de reação. Além disso, o mesmo catalisador (ZnO/TiO<sub>2</sub>+Fe) foi o único que obteve uma degradação da atrazina superior a 60% nos primeiros 5 min de tratamento.

#### 4.5.2 Análise por espectrometria de massa ESI-MS

Neste estudo foram analisados simultaneamente 112 produtos provenientes de processos de degradação da atrazina empregando principalmente processos oxidativos avançados, como: sistemas de ozonização, radiação UV e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lâmpadas de mercúrio, degradação fotoquímica utilizando persulfato e/ou peroximonosulfato, e também processo fotocatalítico catalisado por nanopartículas de TiO<sub>2</sub> por MRM (Komtchou et al., 2016; Wang et al., 2016; Khan et al., 2014; Xu et al., 2014; Chen et al., 2009; McMurray et al., 2006; Ta et

al., 2006; Dagnac et al. 2005). Foram identificados 10 compostos (Atrazina - ATZ, Hidroxiatrazina – HA, Deisopropil hidroxiatrazina – DIA-OH, Desetil terbutilazina – DET, Terbutilazina-2-hidroxi – HT, Desetilatrazina mercapturico – DEAM-3, Desalquil atrazina mercapturico – DAA-MER, Desetil Hidroxi atrazina - DEHA, no efluente sintético sem adição aos aquários, denominado tempo 0 hora (tabela 4) e os tempos de exposição de 24 e 96 horas (tabela 3). As estruturas químicas dos metabólitos estão apresentadas na figura 6.

Tabela 3: Atrazina e seus respectivos compostos de degradação detectados por ESI-MS nos grupos experimentais ATZ e foto ZnO, TiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub>/ZnO+Fe, após 24 e 96 horas de exposição à *A. altiparanae*.

Tempo de exposição	24 horas					96 horas				
	Grupos					Grupos				
Metabólitos	Co	ATZ	foto ZnO	foto TiO <sub>2</sub>	foto TiO <sub>2</sub> /ZnO+Fe	Co	ATZ	foto ZnO	foto TiO <sub>2</sub>	foto TiO <sub>2</sub> /ZnO+Fe
1 Atrazina	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
2 Hidroxiatrazina	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
3 Deisopropil Hidroxiatrazina	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
4 Desetil Terbutilazina	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5 Terbutilazina-2- Hidroxi	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
6 Desetil Atrazina mercapturico	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
7 Desalquil Atrazina mercapturico	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
8 Desetil Hidroxi Atrazina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

O sinal positivo representa (+) = presença do composto; sinal negativo (-) = ausência do composto.

1 Atrazina (ATZ); 2 Hidroxiatrazina (HA); 3 Deisopropil Hidroxiatrazina (DIA-OH); 4 Desetil Terbutilazina (DET); 5 Terbutilazina-2-Hidroxi (HT); 6 Desetil Atrazina mercapturico (DEAM-3); 7 Desalquil Atrazina mercapturico (DAA-MER); 8 Desetil Hidroxi atrazina (DEHA).

Tabela 4: Compostos detectados por ESI-MS em efluente sintético após degradação por fotocatalise heterogênea por três catalisadores diferentes : foto ZnO, TiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>/ZnO+Fe.

Efluente Sintético	Tempo 0 hora		
	Grupos		
Metabólitos	foto ZnO	foto TiO <sub>2</sub>	foto TiO <sub>2</sub> /ZnO+Fe
1 Hidroxiatrazina	+	+	+
2 Deisopropil hidroxiatrazina	+	+	+
3 Terbutilazina-2-Hidroxi	+	+	+
4 Desetil hidroxiatrazina	+	+	+

O sinal positivo representa (+) = presença do metabólito.

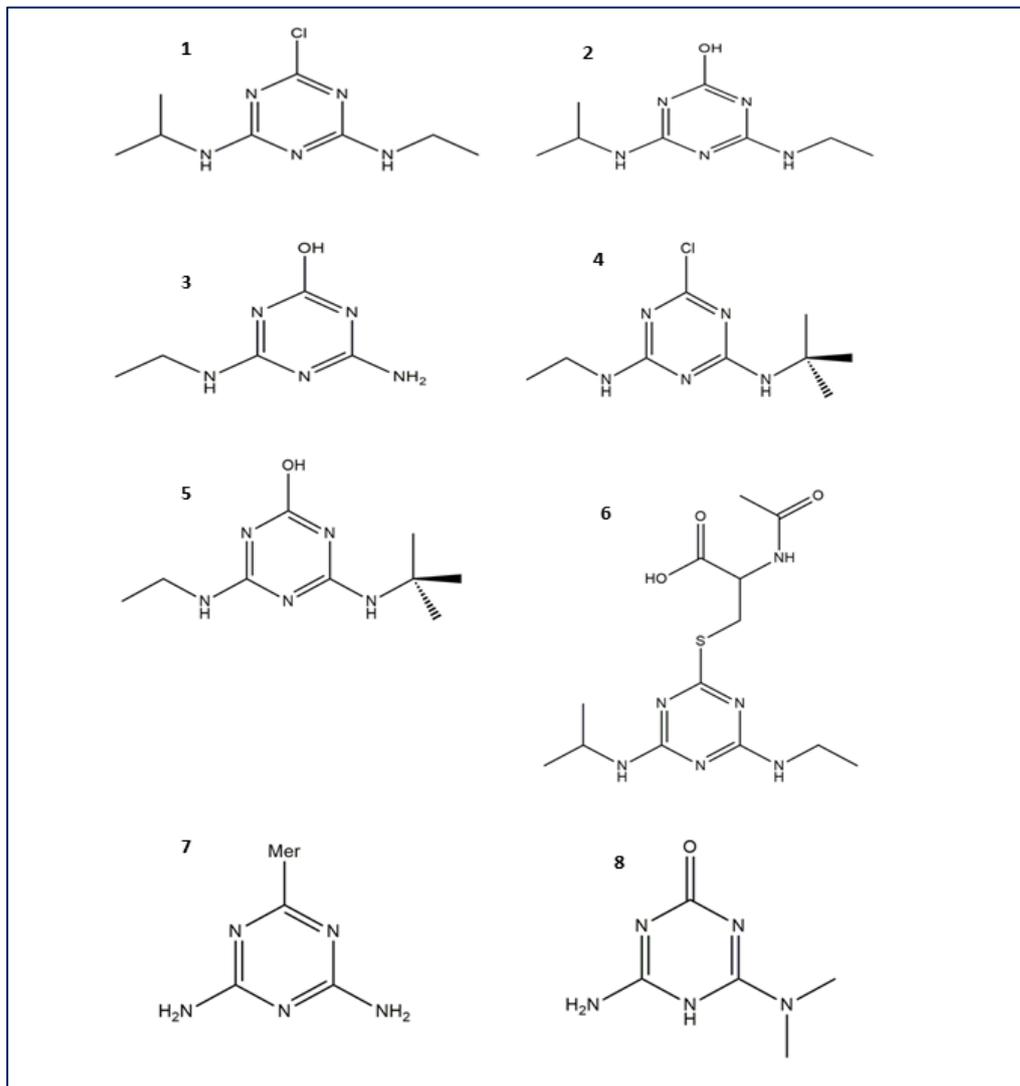


Figura 6: Estrutura química dos compostos identificados por ESI-MS nos grupos ATZ, foto – ZnO, foto – TiO<sub>2</sub> e foto – ZnO/TiO<sub>2</sub>+Fe após 24 e 96 horas de exposição à *A. altiparanae*.

#### 4.5.3 Teste do Micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares (AENS)

O índice de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocíticas em *A. altiparanae* são mostradas na Tabela 5. Em ambos os tempos de 24 e 96 horas de exposição à ATZ e ao herbicida degradado por fotocatalise (ZnO, TiO<sub>2</sub>, ZnO/TiO<sub>2</sub>+Fe) não foram observados micronúcleos, assim como a frequência de anormalidades nucleares não foram diferentes em comparação ao controle e entre os tratamentos no tempo de 24 horas. Entretanto, em 96 horas, todos os grupos de tratamento diferiram estatisticamente do grupo controle, contudo, entre os grupos tratamento não foram observadas diferenças significativas. Nota-se que a anormalidade nuclear predominante foi do tipo vacúolo, onde o grupo exposto somente à atrazina apresentou a maior média desta alteração ( $36,63 \pm 21,68$ ), seguida dos grupos tratados por foto - ZnO ( $32,40 \pm 21,15$ ), foto - ZnO/TiO<sub>2</sub>+Fe ( $31,06 \pm 28,39$ ) e foto - TiO<sub>2</sub> ( $24,55 \pm 22,06$ ). As principais AENS encontradas podem ser visualizadas na figura 7.

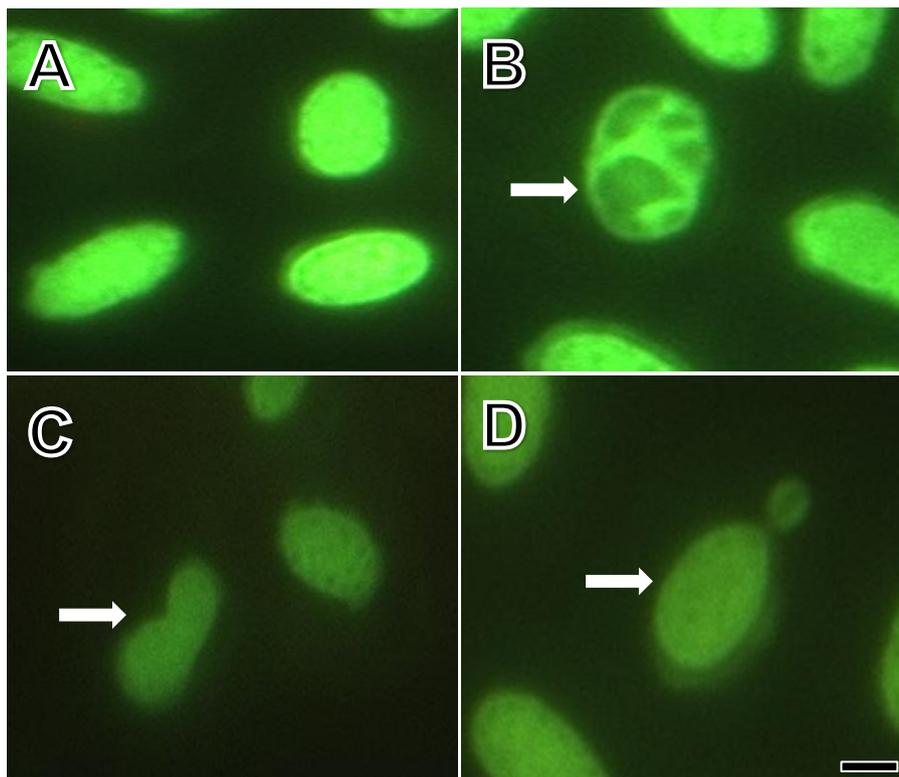


Figura 7: Anormalidades eritrocíticas nucleares (AENS) observadas em *A. altiparanae* expostos a ATZ e foto - ZnO, TiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub>/ZnO+Fe. A - eritrócitos normais. B - núcleo com vacúolo (seta). C - núcleo com constrição em forma de rim (seta). D - núcleo segmentado (seta), escala: 100µm.

Tabela 5: Índice de micronúcleos (MN) e anormalidades nucleares (AENS) em eritrócitos de *Astyanax altiparanae* expostos ao herbicida atrazina (ATZ) e aos metabólitos provenientes da fotocatalise por três catalisadores diferentes: foto - ZnO, foto - TiO<sub>2</sub> e foto TiO<sub>2</sub>/ZnO+Fe, por 24 e 96 horas. Os resultados são expressos em média ± desvio padrão, n= 90.

Tempo de exposição	24 horas					96 horas				
	Grupos					Grupos				
	Co	ATZ	foto ZnO	foto TiO <sub>2</sub>	foto TiO <sub>2</sub> /ZnO+Fe	Co	ATZ	foto ZnO	foto TiO <sub>2</sub>	foto TiO <sub>2</sub> /ZnO+Fe
MN	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Vacúolo	0,92±1,40	1,81±2,77	2,33±2,42	1,02±1,53	0,74±0,93	1,08±1,50	36,63±21,68*	32,40±21,15*	24,55±22,06*	31,06±28,39*
Segmentada	0 ± 0	0 ± 0	0,006±0,01	0,006±0,01	0,01±0,03	0±0	0±0	0,02±0,07	0±0	0±0
Lobulada	0,05±0,05	2,16±3,95	0,03±0,05	0,02±0,04	0,17±0,34	0±0	0,02±0,05	0,02±0,07	0,01±0,05	0,01±0,02
Forma de rim	0,05±0,08	0,01±0,04	0,10±0,19	0,06±0,04	0,21±0,28	0,01±0,03	0,05±0,09	0,08±0,18	0,03±0,07	0±0
Binucleada	0 ± 0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
I.T. anormalidades	1,02±1,38	3,91±3,59	2,48±2,34	1,22±1,45	2,30±3,92	1,09±1,49	35,91±22,73*	32,53±21,25*	25,29±21,56*	34,30±27,27*

MN: Micronúcleo, I.T anormalidades: índice total de anormalidades. O asterisco (\*) indica diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5.4 Histopatologia em brânquias

As alterações observadas nas brânquias de *A. altiparanae* (figs. 8 a 13) expostos por 24 e 96 horas ao ATZ e ao herbicida degradado por foto - ZnO, foto - TiO<sub>2</sub> e foto - ZnO/TiO<sub>2</sub>+Fe, foram expressas como frequência relativa e estão indicadas na tabela 6. No tempo de 24 horas, a alteração do tipo hipertrofia foi observada com maior frequência em todos os tratamentos, em relação ao grupo controle ( $\leq 25\%$ ) (figs. 8a e b). A alteração do tipo hiperplasia, foi recorrente em mais de 50% dos tecidos branquiais analisados nos grupos expostos a ATZ (fig. 8f), foto - TiO<sub>2</sub> (fig. 9f) e foto - ZnO/TiO<sub>2</sub>+Fe (fig. 10d). Fusão lamelar da lamela primária e aneurismas foram observados em baixas frequências ( $\leq 25\%$ ) nos grupos ATZ (fig. 8c) e foto - TiO<sub>2</sub> (fig. 9d), respectivamente. Alterações nas células pavimentosas e deslocamento epitelial da lamela primária também foram observadas (figs. 9f, 10c-e).

Tabela 6: Frequência das alterações histopatológicas em brânquias de *A. altiparanae* expostas ao herbicida atrazina (ATZ) e aos compostos provenientes da fotocatalise por três catalisadores diferentes: foto - ZnO, foto - TiO<sub>2</sub> e foto TiO<sub>2</sub>/ZnO+Fe, por 24 e 96 horas.

Tempo de exposição	24 horas					96 horas				
	Grupos					Grupos				
Alterações	Co	ATZ	foto ZnO	foto TiO <sub>2</sub>	foto TiO <sub>2</sub> /ZnO+Fe	Co	ATZ	foto ZnO	foto TiO <sub>2</sub>	foto TiO <sub>2</sub> /ZnO+Fe
Hipertrofia	++	+++	+++	+++	+++	+	++	+	++	++
Hiperplasia	+	+++	+	+++	+++	-	-	+	+	++
Deslocamento epitelial Lamela 1°	-	-	-	++	++	-	-	-	++	++
Deslocamento epitelial Lamela 2°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alteração nas células pavimentosas	-	-	-	-	+++	-	+++	++	++	++
Fusão lamelar	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Aneurisma	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Os sinais positivos (+) representam a frequência das alterações observadas: (+) = leve; (++) = moderada; (+++) = severa.

Sinal negativo (-) = alteração não observada.

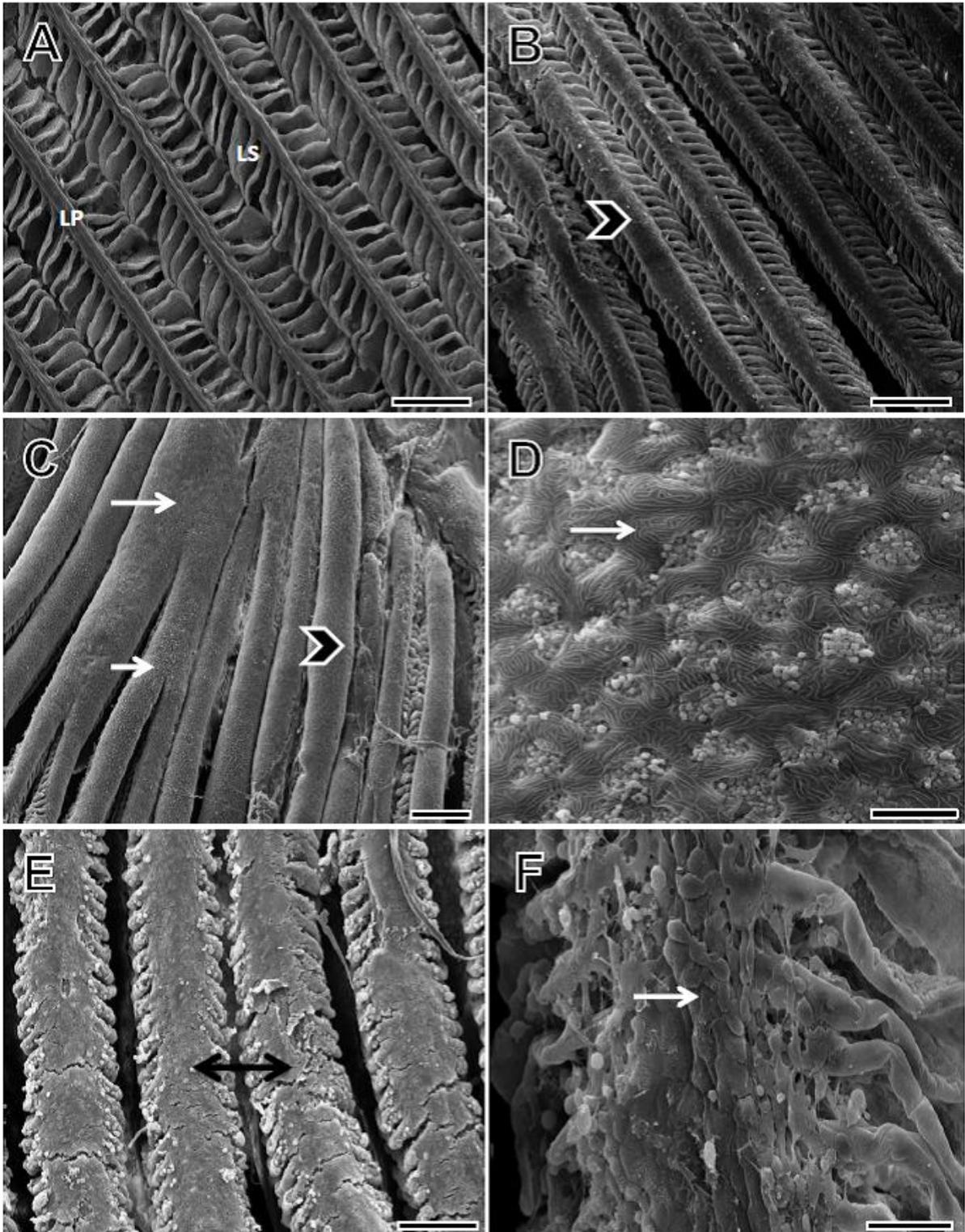


Figura 8 - Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *A. altiparanae* expostos a água desclorada (controle) (A – B) e a ATZ por 24 horas (C – F). A – padrão normal das lamelas primárias (LP) e secundárias (LS), escala: 150µm. B – lamela primária com hipertrofia (cabeça de seta), escala: 200µm. C – fusão total (seta maior) e parcial (seta menor) da lamela primária e intensa hipertrofia das lamelas primárias (cabeça de seta), escala: 250µm. D – células pavimentosas com padrão normal de microdigitações (seta), escala: 25µm. E – intensa hipertrofia e alteração do epitélio da lamela primária (seta), escala: 150µm. F – deslocamento epitelial e aumento do volume celular (seta), escala: 25µm.

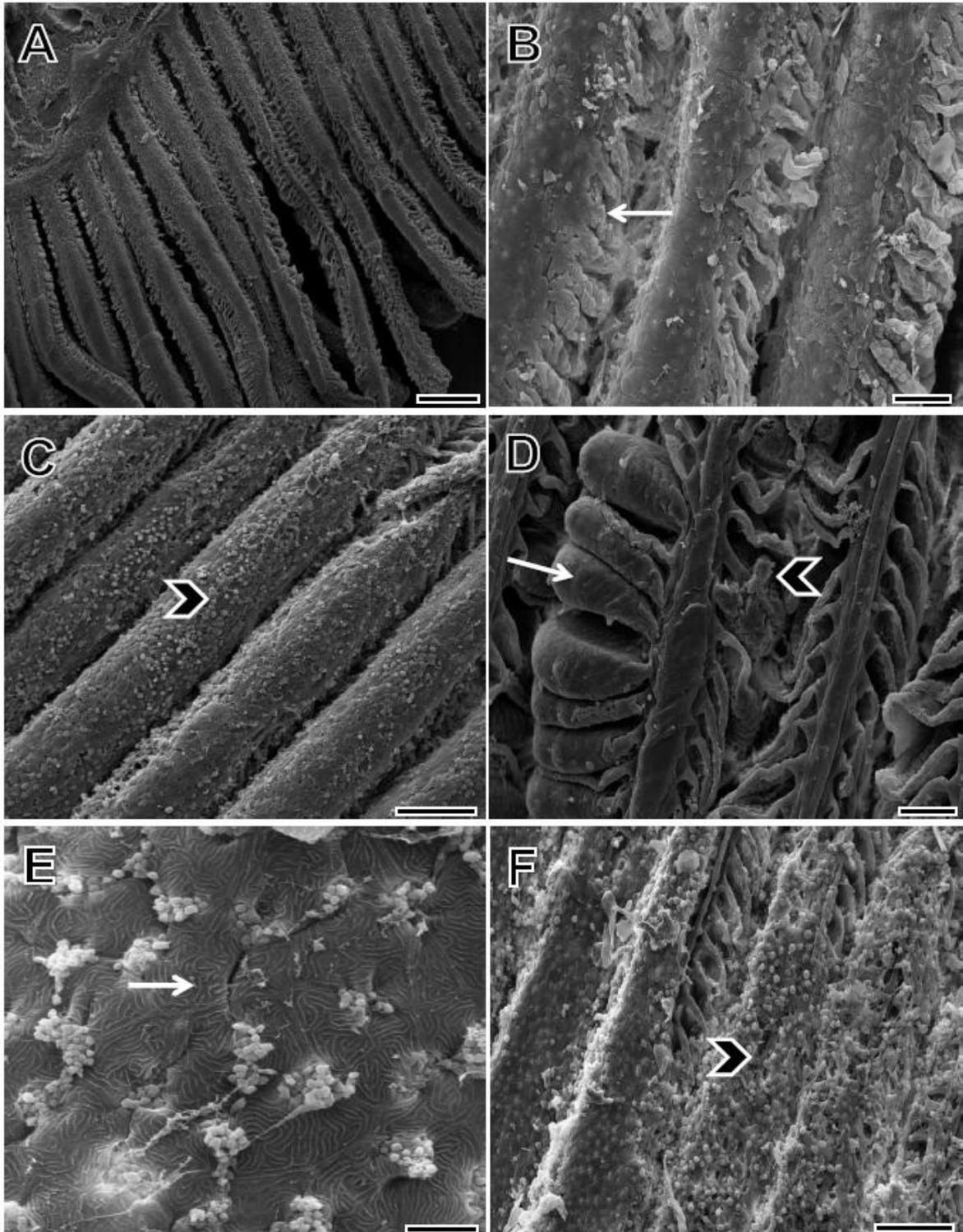


Figura 9 - Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *A. altiparanae* expostos a foto - ZnO (A - B) e a foto - TiO<sub>2</sub> (C - F) por 24 horas. A – aspecto geral das brânquias, escala: 250µm. B – deformação das lamelas secundárias (seta), com intensa hipertrofia, escala: 50µm. C e F – intensa hiperplasia, hipertrofia e deslocamento epitelial na lamela principal (cabeça de seta), escala C:150µm, escala f:100µm. D – aneurisma na lamela secundária (cabeça de seta), escala: 50µm. E – aspecto normal das células pavimentosas com microdigitações (seta), escala:15µm.

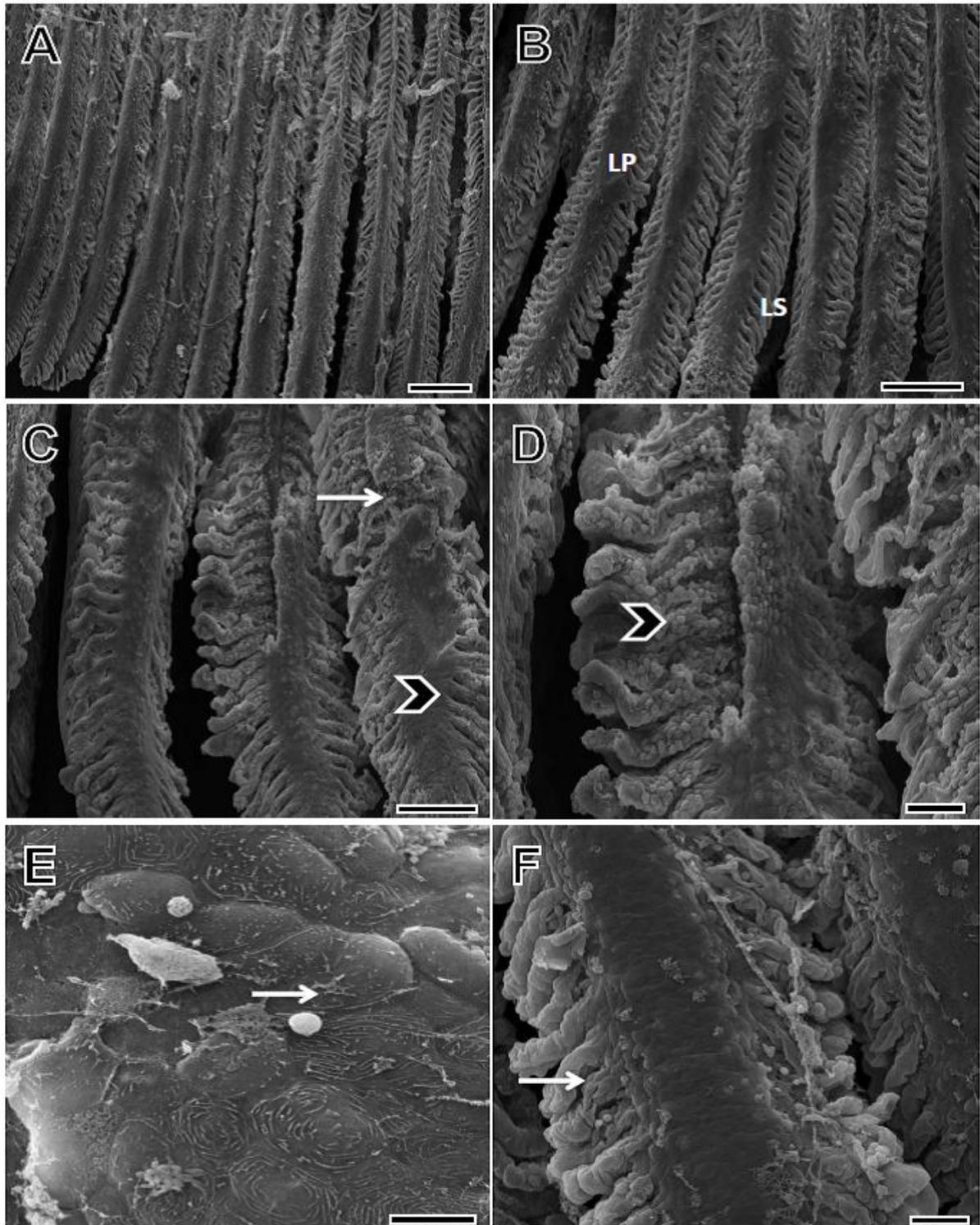


Figura 10 – Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *A. altiparanae* expostos a foto - ZnO/TiO<sub>2</sub>+Fe por 24 horas (A – F). A e B – aspecto alterado das lamelas primárias (LP) e secundárias (LS), escala A: 250µm, escala B: 200µm. C – deslocamento epitelial (seta) e hipertrofia da lamela primária (cabeça de seta), escala:150µm. D - intensa proliferação celular nas lamelas secundárias (cabeça de seta), escala: 50µm. E – células pavimentosas com redução das microdigitações, escala:15µm. F – hipertrofia da lamela secundária (seta), escala:50µm.

Nas figuras 11 – 13 são representadas brânquias expostas aos tratamentos por 96 horas. Pode-se observar que alterações no epitélio da lamela primária, em particular, a perda ou redução de microdigitações das células pavimentosas foi mais frequente ( $\geq 50\%$ ), quando comparado ao controle (figs. 11f, 12f e 13d). Alterações do tipo hipertrofia, foram observadas com menor frequência no grupo controle (figs. 11a-b) e no tratamento foto – ZnO (fig. 12b). A presença de hiperplasia e deslocamento epitelial da lamela primária foi observada somente nos animais expostos a foto – TiO<sub>2</sub> (fig. 12e) e foto - ZnO/TiO<sub>2</sub>+Fe (figs. 13b-c e 13f). A fusão lamelar ocorreu somente no grupo foto – TiO<sub>2</sub> ( $\leq 25\%$ ) (fig. 12c).

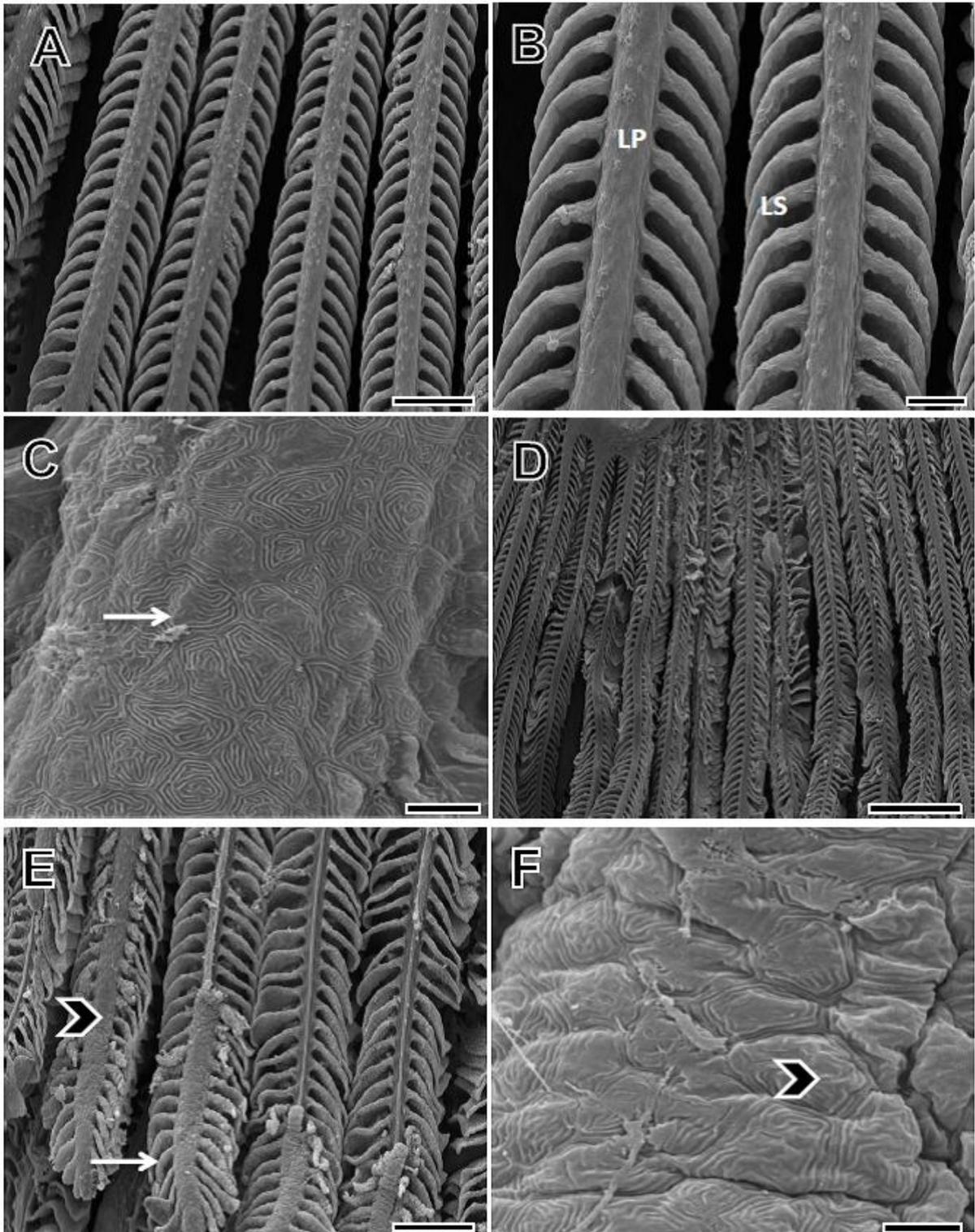


Figura 11 – Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *A. altiparanae* expostos a água desclorada (controle) (A - C) e a ATZ (D - F) por 96 horas. A e B - aspecto normal das lamelas primária (LP) e secundárias (LS), escala A: 150μm, escala B: 50μm. C – células pavimentosas com microdigitações (seta), escala: 15μm. D – aspecto alterado das lamelas secundárias. escala: 500μm E – hipertrofia da lamela primária (cabeça de seta) e secundária (seta), escala: 150μm. F – Células pavimentosas com redução das microdigitações (cabeça de seta), escala: 20μm.

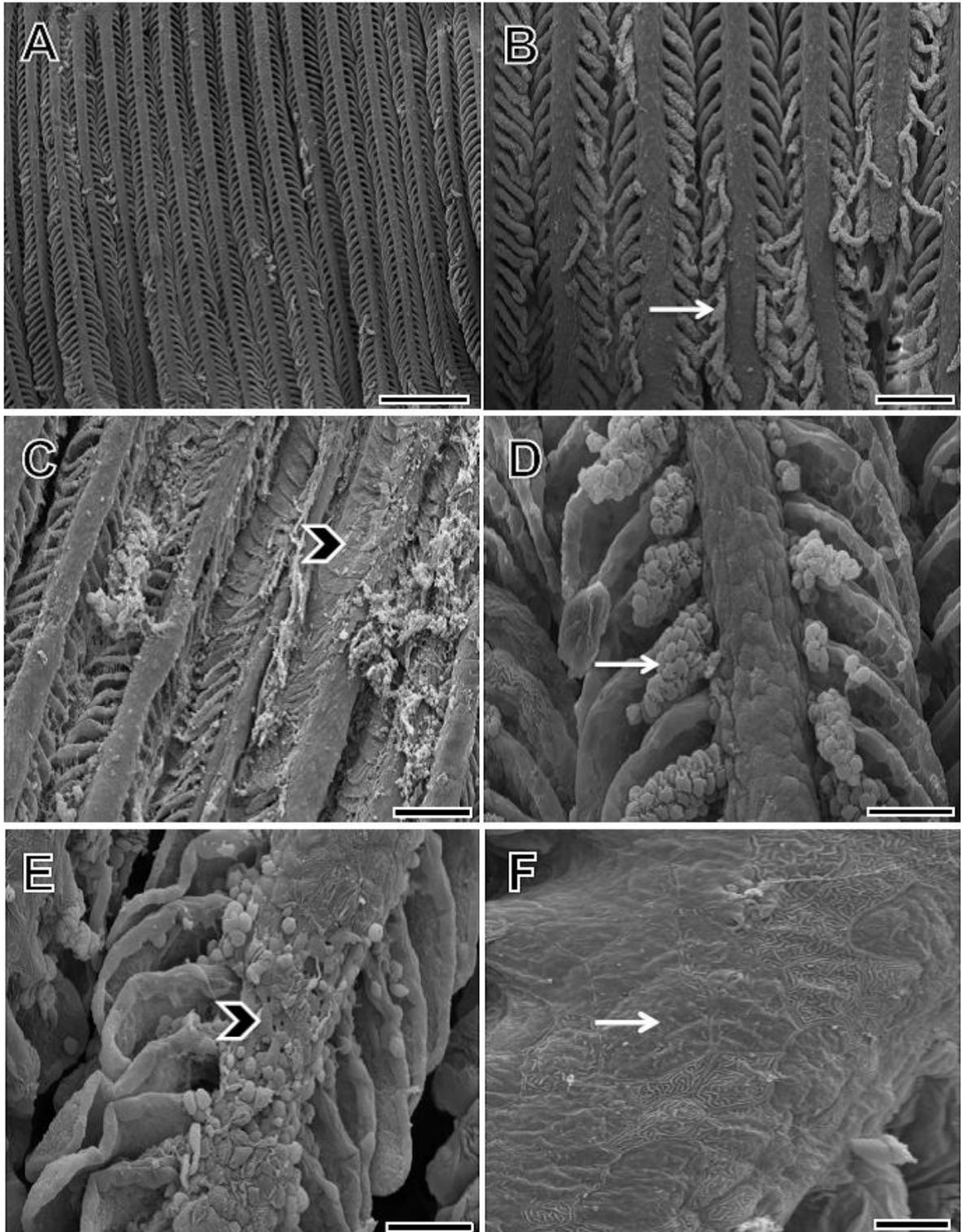


Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *A. altiparanae* expostos a foto – ZnO (A - B) e foto – TiO<sub>2</sub> (C - F) por 96 horas. A – aspecto geral das lamelas primárias e secundárias, escala: 500µm. B – hipertrofia da lamela secundária (seta), escala: 150µm. C – lamelas secundárias alteradas, com fusão lamelar (cabeça de seta), escala: 150µm. D – hipertrofia da lamela secundária (seta), escala: 25µm. E – descamação do epitélio da lamela primária (cabeça de seta), escala:25µm. F – redução das microdigitações das células pavimentosas (seta), escala: 20µm.

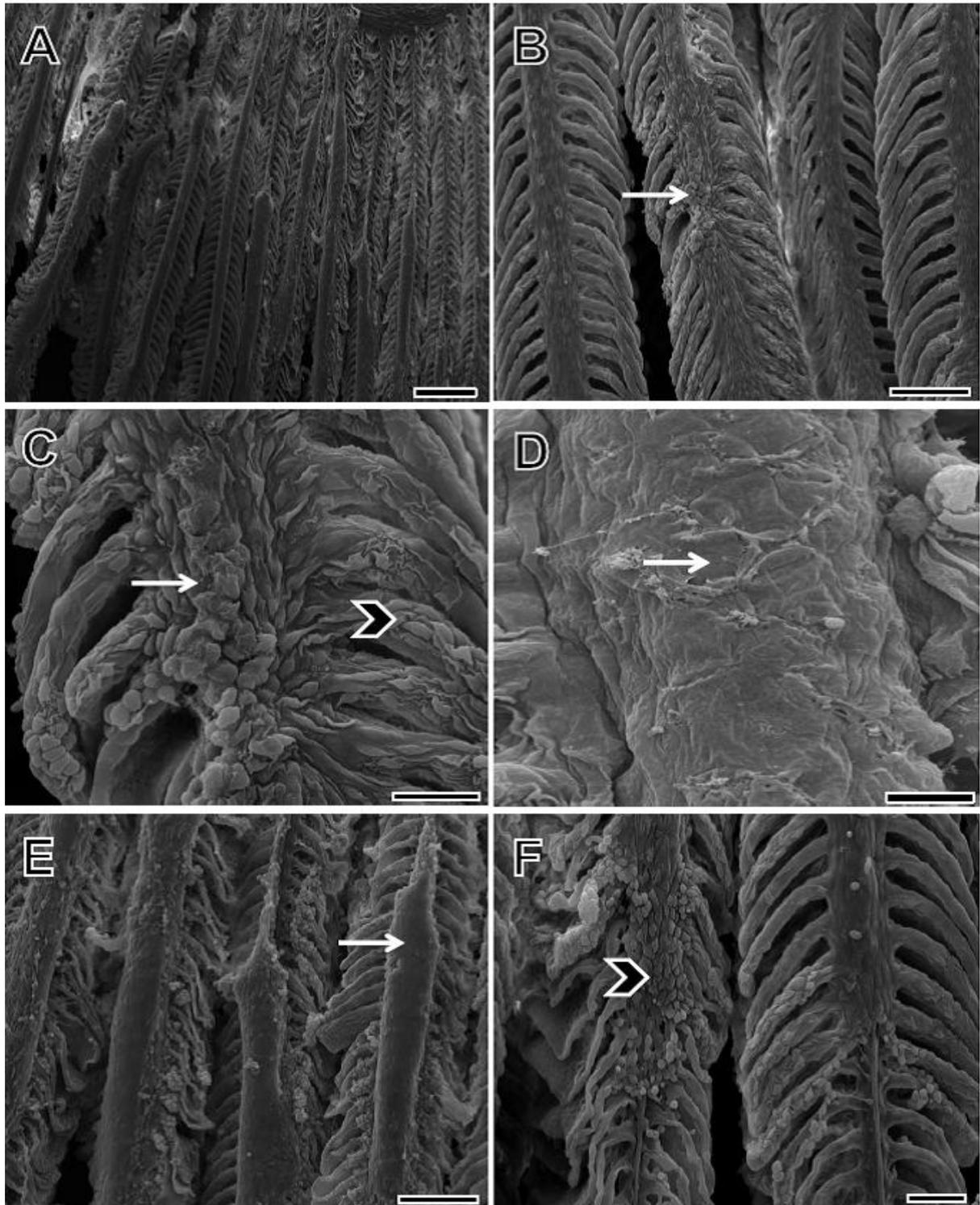


Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *A. altiparanae* expostos a foto - ZnO/TiO<sub>2</sub>+Fe por 96 horas (A – F). A – aspecto alterado das brânquias, escala: 250µm. B e C – intensa descamação da lamela primária (setas) e descamação da lamela secundária (cabeça de seta), escala B: 100µm, escala C: 25µm. D – células pavimentosas com perda total das microdigações (seta), escala: 25µm. E – hipertrofia da lamela primária (seta), escala: 150µm. F – descamação da lamela primária com proliferação celular (hiperplasia) (cabeça de seta), escala:50µm.

#### 4.6 DISCUSSÃO

Tecnologias como os POA'S estão sendo utilizadas para o tratamento de águas contaminadas para diferentes poluentes e seus metabólitos, como a atrazina, sendo uma futura alternativa para os tratamentos convencionais de água (Byrne et al., 2017; Deng e Zhao, 2015). Neste estudo, a fotocatalise heterogênea, com três catalisadores diferentes (foto – ZnO, foto – TiO<sub>2</sub>, foto - ZnO/TiO<sub>2</sub>+Fe) foi a metodologia de POA utilizada para degradação da atrazina, e por ESI-MS em modo positivo e monitoramento por reações múltiplas foi possível identificar os seguintes metabólitos formados durante a fotodegradação: Hidroxiatrazina (HA), Deisopropil hidroxiatrazina (DIA-OH), Desetil terbutilazina (DET), Terbutilazina-2-hidroxi (HT), Desetilatrazina mercapturico (DEAM-3), Desalquil atrazina mercapturico (DAA-MER), Desetil hidroxi atrazina (DEHA), que mostraram ser tóxicos como a sua molécula precursora, pelo teste do micronúcleo em eritrócitos e pela histopatologia de brânquias em *A. altiparanae*.

Conforme apresentado na tabela 3, nos grupos ATZ e foto - ZnO, TiO<sub>2</sub> e ZnO/TiO<sub>2</sub>+Fe foram identificados por ESI-MS metabólitos derivados do herbicida. Estes metabólitos ou compostos de degradação podem ser formados por processos biológicos, como os que ocorrem na natureza, e também por processos químicos, como a fotocatalise, que engloba reações de hidrólise, oxirredução, substituição, eliminação, desalogenação, entre outros. No entanto, tais processos como os POA'S, podem resultar na formação de metabólitos ou na sua completa mineralização, formando água e CO<sub>2</sub> de forma mais rápida do que ocorre na natureza (Balesteros, 2009). O grupo foto – ZnO/TiO<sub>2</sub>+Fe, por exemplo, foi o mais eficiente, pois os valores de concentração do herbicida passaram de 5 mg/L para 0,00728 mg/L após 60 minutos de reação, sendo este um valor inferior ao permitido pela Organização Mundial da Saúde (0,1 mg/L) e muito próximo ao que é exigido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (0,002 mg/L) (Who, 2007; Conama, 2005). Este resultado mostra a eficácia deste tratamento, e o aponta como possível alternativa tecnológica de degradação para ser utilizada em sistemas de abastecimento de água e em ambientes contaminados.

A atrazina após processos de degradação como a fotocatalise pode formar inúmeros metabólitos por diferentes vias. Entre os compostos identificados aqui: HA, DET e DEHA são formados por desalquilação. Este processo consiste na substituição de um radical alquila ligado ao nitrogênio localizado na extremidade da molécula por um íon H<sup>+</sup>, proveniente da oxidação da água adsorvida na superfície do catalisador (Silva, 2017). De acordo com Papadopoulos (2007) e McMurray et al. (2006), a via principal de degradação da atrazina na

presença de metais semicondutores como o  $\text{TiO}_2$ , é a desalquilação, que envolve a degradação das cadeias laterais da atrazina, e a hidroxilação, que forma DIA-OH e HT. Além da degradação por fotocatalise, que também pode ocorrer na natureza, a atrazina pode gerar os metabólitos DIA-OH e HA, por metabolização das enzimas do citocromo P450 presentes no fígado e DAA-MER e DEAM-3 pela conjugação da glutatona seguida de conversão aos derivados de ácido mercaptúrico. No entanto, estes metabólitos foram detectados até o momento somente em urina de mamíferos (Adams, 1990; Hanioka et al., 1999; Kuklenyik et al., 2012; Ross e Filipov, 2006).

Os compostos DAA-MER e DEAM-3 que são metabolizados por vias biológicas como a citada anteriormente, só foram detectados por ESI-MS na água coletada do aquário após entrarem em contato com os animais, uma vez que no efluente sintético degradado não foram detectados esses metabólitos (tabela 4). Demonstrando assim, a capacidade de metabolização dos peixes em degradar a atrazina, como observado no grupo ATZ e também nos grupos foto -  $\text{ZnO}$ ,  $\text{TiO}_2$  e  $\text{ZnO/TiO}_2+\text{Fe}$ . Nos peixes, assim como nos mamíferos, enzimas de biotransformação como as do citocromo P450 atuam na transformação de contaminantes em moléculas hidrossolúveis, pois são mais fáceis de serem excretadas (Martinez, 2006). Assim, os metabólitos DAA-MER e DEAM-3 podem ser de natureza menos tóxica do que suas moléculas precursoras, entretanto, necessitam de estudos que avaliem sua atividade tóxica de forma isolada, elucidando sua ação e ativação dos mecanismos enzimáticos para sua posterior excreção.

A detecção dos metabólitos da atrazina após o processo fotocatalítico é de grande importância, pois os efeitos destes compostos precisam ser melhores elucidados, principalmente em relação a toxicidade. Desta forma, resultados como o deste trabalho, sugerem que os compostos de degradação da atrazina podem ser tão tóxicos quanto sua molécula-mãe, visto que no teste do MN após 96 horas de exposição, além do grupo exposto a atrazina, os grupos foto -  $\text{ZnO}$ ,  $\text{TiO}_2$  e  $\text{ZnO/TiO}_2+\text{Fe}$  induziram alterações eritrocíticas nucleares (AENS) em *A. altiparanae*.

Vieira et al. (2017) em um estudo da exposição de *A. altiparanae* à áreas agrícolas, onde foram detectados diferentes contaminantes, e entre eles a atrazina, mostrou que em relação a formação de micronúcleos não houve diferença entre os grupos, corroborando o apresentado aqui. As anormalidade nucleares foram maiores em relação ao controle, sendo a formação de vacúolo a alteração predominante nos eritrócitos, assim como foi a anormalidade nuclear de maior frequência encontrada por Ventura et al. (2008), onde houve a exposição ao herbicida atrazina em *Oreochromis niloticus*.

Ainda há poucas explicações para a formação das AENS, e uma das mais aceitas, proposta por Shimizu et al. (2008), afirma que ao ser detectada uma região com dano é iniciado um processo de reparo e eliminação da cromatina. Esta região é removida para a periferia do núcleo e eliminada por exocitose, e antes mesmo da conclusão deste processo, a membrana nuclear apresenta alterações que caracterizam as AENS, principalmente do tipo vacúolo. Outras explicações plausíveis para a formação de anormalidades são o estresse oxidativo e os processos apoptóticos. O estresse oxidativo pode ser responsável pela formação de AENS, devido principalmente ao aumento da permeabilidade da membrana nuclear como resultado da lipoperoxidação, tornando o núcleo mais vulnerável a alterações de contaminantes (Seriani et al., 2011). Os Metabólitos HT, HA e DET foram relatados como possíveis substâncias que induzem o estresse oxidativo e também por aumentarem espécies reativas de oxigênio (ROS) em diferentes tecidos (Velisek et al., 2017; Stara et al., 2016), o que pode ter induzido às alterações encontradas em eritrócitos nos grupos foto - ZnO, TiO<sub>2</sub> e ZnO/TiO<sub>2</sub>+Fe, onde estes metabólitos foram detectados.

Além do estresse oxidativo, a apoptose pode ser induzida por uma variedade de compostos e condições. A ação de substâncias, como a atrazina e os seus metabólitos, podem causar quebras no material genético e induzir a apoptose (Peitsch et al., 1994). O processo apoptótico caracteriza-se em uma situação que uma célula em processo de morte perde a adesão com a matriz extracelular, além da fragmentação da cromatina, formando pequenas massas rodeadas pela membrana nuclear. Em alguns casos, a toxicidade do poluente pode ser tão severa comprometendo a formação de ATP ou os fagócitos não conseguem remover todas essas células mortas, não completando o processo apoptótico (Zakeri e Lockshin, 2002).

A exposição a contaminantes além de comprometer a estrutura nuclear também pode levar a danos teciduais em peixes, como nas brânquias que por estarem em contato direto com o meio externo, respondem a presença de xenobióticos ou a mudanças ambientais de forma a conservar as funções fisiológicas, porém, muitas vezes são alteradas após contato com contaminantes (Laurent e Perry, 1999). Neste estudo, as alterações observadas com maior frequência foram dos tipos hipertrofia, hiperplasia, deslocamento epitelial lamelar, alteração nas células pavimentosas, fusão lamelar e aneurisma, nos grupos ATZ, foto - ZnO, TiO<sub>2</sub> e ZnO/TiO<sub>2</sub>+Fe, em ambos os tempos de exposição (24 e 96 horas). Estes resultados corroboram com dados da literatura em relação a peixes expostos a diferentes pesticidas (Marcon et al., 2016; Paulino et al., 2012; Neskovic et al., 1993), e principalmente, aos efeitos dos metabólitos terbutilazina-2-hidroxi (HT), atrazina-2-hidroxi (HA) e desetil-terbutilazina

(DET) em brânquias e no pâncreas de *Crayfish* (lagostim) (Koutnik et al., 2017; Stara et al., 2016; Velisek et al., 2017).

O desprendimento epitelial como a perda das microdigações e deslocamento epitelial lamelar foram observadas em todos os peixes que foram expostos a atrazina ou aos seus metabólitos provenientes da degradação fotocatalítica. Essas alterações são uma das primeiras mudanças a serem observadas quando o animal é submetido a algum fator estressante. Esse tipo de alteração diminui a área superficial da brânquia dificultando a troca gasosa e a osmorregulação (Winkaler et al., 2001).

Outras alterações observadas nas brânquias foram hiperplasia, hipertrofia e fusão lamelar, que quando ocorrem reduzem o espaço para passagem de água, impedindo a difusão do oxigênio no tecido branquial e comprometendo a sobrevivência do animal (Marcon et al., 2016). Além das alterações mencionadas, o aneurisma observado no grupo foto – TiO<sub>2</sub> no tempo de 24 horas, pode refletir distúrbios circulatórios, onde ocorre o deslocamento das células pilares levando a dilatação dos vasos sanguíneos nas lamelas secundárias, comprometendo o fluxo sanguíneo e formando trombos nas brânquias (Bernet et al., 1999; Pereira, 2015). Estes resultados apontam a importância do uso das alterações branquiais como um biomarcador, por ser um dos primeiros tecidos a entrarem em contato com substâncias tóxicas presentes na água. Ressalta-se também, a relevância da investigação da toxicidade dos metabólitos da atrazina, uma vez que para esse herbicida o limite para detecção em água é de 2 µg/L (Conama, 2011), entretanto, não há limites estabelecidos na legislação brasileira para os metabólitos serem descartados ou detectados nos sistemas aquáticos, e estes estão mostrando toxicidade, mesmo que de menor impacto, em diferentes organismos.

#### 4.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados foram de suma importância para a avaliação ecotoxicológica de efluentes sintéticos degradados por tecnologias como os processos oxidativos avançados, além da investigação toxicológica dos metabólitos gerados após estes processos. Os metabólitos detectados após o processo fotocatalítico que degradou a atrazina: DET, HA, DIA-OH, DAA-MER, DEAM-3, HT, DEHA apresentaram potencial genotóxico em eritrócitos e histopatológicos em brânquias de *Astyanax altiparanae*. Estes resultados são úteis para investigar os possíveis mecanismos de ação dos metabólitos da atrazina, uma vez que estes estão sendo detectados em águas superficiais, subterrâneas e de abastecimento em diversos países, e também para avaliar a eficácia de tecnologias que futuramente venham a ser

utilizadas no tratamento de água para abastecimento humano e na degradação de poluentes, como a fotocatalise heterogênea. Além da investigação da toxicidade, este estudo vem a colaborar com a proteção do meio ambiente e a saúde humana, uma vez que a legislação brasileira está flexibilizando cada vez mais a entrada e a fiscalização dos pesticidas no país, permitindo o uso de pesticidas que são comprovadamente cancerígenos, banidos há muitos anos em outros países.

## REFERÊNCIAS

- Adams, N.H., Levi, P.E., Hodgson, E., 1990. In vitro studies of the metabolism of atrazine, simazine, and terbutryn in several vertebrate species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, (6), 1411-1417.
- Ahmad, A.L., Tan, L.S., Shukor, S.R., 2008. Dimethoate and atrazine retention from aqueous solution by nanofiltration membranes. *Journal of Hazardous Materials* 151, (1), 71-77.
- Balesteros, M. R., 2009. Desenvolvimento e otimização de metodologia para análise de atrazina e seus produtos de degradação por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases* 22, 25-34.
- Bombardi, L.M., 2017. Geografia do uso de agrotóxicos do Brasil e conexões com a União Européia. São Paulo – USP, 30-50.
- Braekevelt, E., Lau, B.P.Y., Feng, S., Ménard, C., Tittlemier, S.A., 2011. Determination of melamine, ammeline, ammelide and cyanuric acid in infant formula purchased in Canada by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives e Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 28, (6), 698–704.
- Byrne, C., Subramanian, G., Pillai, S.C., 2017. Recent advances in photocatalysis for environmental applications. *Journal Environmental Chemical Engineering* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2017.07.080>.
- Cao, X., Harris, W., 2010. Properties of dairy-manure-derived biochar pertinent to its potential use in remediation. *Bioresource Technology* 101, (14), 5222-5228.
- Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S., 1990. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological Indicator of Chemical Contaminant Effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 47, (11), 2123-2136.
- Chan, K.H., Chu, W., 2005. Atrazine removal by catalytic oxidation processes with or without UV irradiation: Part II: An analysis of the reaction mechanisms using LC/ESI-tandem mass spectrometry. *Applied Catalysis B: Environmental* 58, 165–174.
- Chen, C., Yang, S., Guo, Y., Sun, C., Gu, C., Xu, B., 2009. Photolytic destruction of endocrine disruptor atrazine in aqueous solution under UV irradiation: Products and pathways. *Journal of Hazardous Materials* 172, (2-3), 675-684.

Conama. Conselho Nacional do Meio Ambiente - Resolução n° 357, de 17/03/2005. Brasília. 2011.

Dagnac, T., Bristeau, S., Jeannot, R., Mouvet, C., Baran, N., 2005. Determination of chloroacetanilides, triazines and phenylureas and some of their metabolites in soils by pressurised liquid extraction, GC-MS/MS, LC-MS and LC-MS/MS. *Journal of Chromatography A* 1067, (1-2), 225–233.

Deng, Y., Zhao, R., 2015. Advanced Oxidation Processes (AOPs) in Wastewater Treatment. *Current Pollution Reports* 1, 167-176.

Do Amaral, B., Araujo, J.A., Peralta-Zamora, P.G., Nagata, N., 2014. Simultaneous determination of atrazine and metabolites (DIA and DEA) in natural water by multivariate electronic spectroscopy. *Microchemical Journal* 117, 262-267.

Draher, J., Pound, V., Reddy, T.M., 2014. Validation of a rapid method of analysis using ultrahigh-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry for nitrogen-rich adulterants in nutritional food ingredients. *Journal of Chromatography A* 1373, 106–113.

Dujakovic, N., Grujic, S., Radisic, M., Vasiljevic, T., Lausevic, M., 2010. Determination of pesticides in surface and ground waters by liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 678, (1), 63-72.

Fenoll, J., Hellín, P., Martínez, C.M., Flores, P., Navarro, S., 2011. Determination of 48 pesticides and their main metabolites in water samples by employing sonication and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 85, (2), 975–982.

Forgacs, A.L., D'Souza, M.L., Huhtaniemi, L.T., Rahman, N.A., Zacharewski, T.R., 2013. *Toxicological Sciences* 134, (1), 155-167.

Gammon, D.W., Aldous, C.N., Carr Jr., W.C., Sanborn, J.R., Pfeifer, K.F., 2005. A risk assessment of atrazine use in California: human health and ecological aspects. *Pest Management Science* 61, (4), 331-355.

Garutti, V., Britski, H.A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia PUCRS. Série Zoologia*, Porto Alegre, 13, 65-88, 2000.

Gonçalves, M.V., Marins de Campos, C.B., Batista, V.G., Cruz, A.D., Junior, P.M., Bastos, R.P., Melo e Silva, D., 2017. Genotoxic and mutagenic effects of Atrazine Atanor 50 SC on *Dendropsophus minutus* Peters, 1872 (Anura: Hylidae) developmental larval stages. *Chemosphere* 182, 730-737.

Hanioka, N., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Nishimura, T., Ando, M., 1999. In vitro metabolism of simazine, atrazine, and propazine by hepatic cytochrome P450 enzymes of rat, mouse, and guinea pig, and oestrogenic activity of chlorotriazines and their main metabolites. *Xenobiotica* 29, 1213-1226.

Hayes, T.B., Anderson, L.L., Beasley, V.R., De Solla, S.R., Iguchi, T., Ingraham, H., Kestemont, P., Kniewald, J., Kniewald, Z., Langlois, V.S., Luque, E.H., McCoy, K.A., Munoz-de-Toro, M., Oka, T., Oliveira, C.A., Orton, F., Ruby, S., Suzawa, M., Tavera-Mendoza, L.E., Trudeau, V.L., Victor-Costa, A.B., Willingham, E., 2011. Demasculinization

and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 127, (1-2), 64-73.

Heddle, J. A., 1973. A rapid *in vivo* test for chromosome damage. *Mutation research* 18, 2, 187-192.

Jin, Y., Wang, L., Chen, G., Lin, X., Miao, W., Fu, Z., 2014. Exposure of mice to atrazine and its metabolite diamino chloro triazine elicits oxidative stress and endocrine disruption. *Environmental toxicology and pharmacology* 37, (2), 782-790.

Khan, J.A., He, X., Shah, N.S., Khan, H.M., Hapeshi, E., Fatta-Kassinos, D., Dionysiou, D.D., 2014. Kinetic and mechanism investigation on the photochemical degradation of atrazine with activated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, S<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>2-</sup> and HSO<sub>5</sub><sup>-</sup>. *Chemical Engineering Journal* 252, 293-403.

Komtchou, S., Dirany, A., Drogui, P., Delegan, N., Khakani, M.A.E., Robert, D., Lafrance, P., 2016. Degradation of atrazine in aqueous solution with electrophotocatalytic process using TiO<sub>2</sub>x photoanode. *Chemosphere* 157, 79-88.

Korosa, A., Auersperger, P., Mali, N., 2016. Determination of micro-organic contaminants in groundwater (Maribor, Slovenia). *Science of the Total Environment* 15, (571), 1419-1431.

Koutnik, D., Stara, A., Zuskova, E., Kouba, A., Velisek, J., 2017. The chronic effects of terbuthylazine-2-hydroxy on early life stages of marbled crayfish (*Procambarus fallax f. virginalis*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 136, 39-33.

Kuklennyik, Z., Panuwet, P., Jayatilaka, N.K., Pirkle, J.L., Calafat, A.M., 2012. Two-dimensional high performance liquid chromatography separation and tandem mass spectrometry detection of atrazine and its metabolic and hydrolysis products in urine. *Journal Chromatography B* 901, 1-8.

Laurent, P., Perry, S.F., 1991. Environmental Effects on Fish Gill Morphology. *Physiological Zoology* 64, (1), 4-25.

Lemos, C.T., Iranço, F.A., Oliveira, N.C.D., Souza, G.D., Fachel, J.M.G., 2008. Biomonitoring of genotoxicity using micronuclei assay in native population of *Astyanax jucuhiensis* (Characiformes: Characidae) at sites under petrochemical influence. *Science of total environmental* 406, 337-343.

Li, J., Hu, J., Xu, W., Ling, M., Yao, J., 2014. Hydrolysis Reaction Mechanism in Atrazine Metabolism and Prediction of Its Metabolites' Toxicities. *Agricultural and Food Chemistry* 62, (21), 4852-4863.

Liu, Z., Fu, Z., Jin, Y., 2017. Immunotoxic effects of atrazine and its main metabolites at environmental relevant concentrations on larval zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 166, 212-220.

Liu, Z., Wang, Y., Zhu, Z., Yang, E., Feng, X., Fu, Z., Jin, Y., 2016. Atrazine and its main metabolites alter the locomotor activity of larval zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 148, 163-170.

Marcon, L., Lopes, D.S., Munteer, A.H., Goulart, A.M.A., Leandro, M.V., Benjamin, L.A., 2016. Pathological and histometric analysis of the gills of female *Hyphessobrycon eques* (Teleostei:Characidae) exposed to different concentrations of the insecticide Dimilins. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 131, 135-142.

- Martinez, C.B.R., 2006. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: Ângela Teresa Silva-Souza. (Org.). Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil. Maringá: ABRAPOA, 43-62.
- Masiá, A., Campo, J., Navarro-Ortega, A., Barceló, D., Picó, Y., 2015. Pesticide monitoring in the basin of Llobregat River (Catalonia, Spain) and comparison with historical data. *Science of the Total Environment* 15, (503-504), 58-68.
- McMurray, T.A., Dunlop, P.S.M., Byrne, J.A., 2006. The photocatalytic degradation of atrazine on nanoparticulate TiO<sub>2</sub> films. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 182, 43-51.
- Meng, Z., Shi, Z., Liang, S., Dong, X., Lv, Y., Sun, H., 2015. Rapid screening and quantification of cyromazine, melamine, ammelide, ammeline, cyanuric acid, and dicyandiamide in infant formula by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and triple quadrupole ma. *Food Control* 55, 158–165.
- Moreira, A.J., Borges, A.C., Gouveia, L.F.C., Macleod, T.C.O., Freschi, G.P.G., 2017. The process of atrazine degradation, its mechanism, and the formation of metabolites using UV and UV/MW photolysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 347, 160-167.
- Neskovic, N.K., Elezovic, I., Karan, V., Poleksic, V., Budimir, M., 1993. Acute e Subacute Toxicity of Atrazine to carp, (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicology and Enviromental Safety* 25, 173-182.
- Nwani, C.D., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B., Kumar, P., Lakra, W.S., 2011. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-basedherbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. *Environmental toxicology and pharmacology* 31, (2), 314-322.
- Oh, Y.C., Jenks, W.S., 2004. Photocatalytic degradation of a cyanuric acid, a recalcitrant species. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 162, 323-328.
- Orsi, M.L., Carvalho, E.D., Foresti, F., 2004. Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski (Teleostei, Characidae) do médio rio Paranapanema, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 21, (2), 207-218.
- Papadonopulos, N., Gikas, E., Zalidis, G., Tsarbopoulos, A., 2007. Simultaneous Determination of Terbutylazine and Its Major Hydroxy and Dealkylated Metabolites in Wetland Water Samples Using Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, (18), 7270-7277.
- Panuwet, P., Restrepo, P.A., Magsumbol, M., Jung, K.Y., Montesano, M.A., Needham, L.L., Barr, D.B., 2010. An improved high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method to measure atrazine and its metabolites in human urine. *Journal of Chromatography B* 878, 957–962.
- Paulino, M.G., Sakuragui, M.M., Fernandes, M.N., 2012. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 86, (1), 1-7.

Peitsch, M.C.; Mannherz, H.G.; Tschopp, J., 1994. The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death? Cambridge, 4, 37-41.

Pelaez, V., Silva, L.R., Guimarães, T.A., Dal Ri, F., Teodorovicz, T.A., 2015 (des)coordenação de políticas para a indústria de agrotóxicos no Brasil. Revista Brasileira de Inovação 14, 153-178.

Pereira, M.V.M., Avaliação da qualidade da água em cinco reservatórios do rio Iguaçu através de biomarcadores em *astyanax bifasciatus* (characiformes, characidae). Curitiba: UFPR, 2015. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná.

Prado, P.S., Pinheiro, A.P.B., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2014. Reproductive biomarkers responses induced by xenoestrogens in the characid fish *Astyanax fasciatus* inhabiting a South American reservoir: An integrated field and laboratory approach. Environmental Research 131,

Proia, L., Osorio, V., Soley, S., Köck-Schulmeyer, M., Pérez, S., Barceló, D., Romaní, A.D., Sabater, S., 2013. Effects of pesticides and pharmaceuticals on biofilms in a highly impacted river. Environmental Pollution 178, 220-228.

Rodríguez-González, N., Beceiro-González, E., González-Castro, M.J., Alpendurada, M.F., 2016. On-line solid-phase extraction method for determination of triazine herbicides and degradation products in seawater by ultra-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1470, 33–41.

Ross, M.K., Filipov, N.M., 2006. Determination of atrazine and its metabolites in mouse urine and plasma by LC–MS analysis. Analytical Biochemistry 351, (2), 161-173.

Rozas, O., Vidal, C., Baeza, C., Jardim, W.F., Rossner, A., Mansilla, H.D., 2016. Organic micropollutants (OMPs) in natural waters: Oxidation by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment and toxicity assessment. Water Research 98, 109-118.

Santos, T.B., Martinez, C.B.R., 2012. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. Chemosphere 89, (9), 1118-1125.

Schmid, W., 1975. The micronucleus test. Mutation research 31, (1), 9-15.

Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., Tribskorn, R., 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery 6, 75-86.

Seriani, R., Ranzani-Paiva, M.J.T., Silva-Souza, A.T., Napoleão, S.R., 2011. Hematology, micronuclei and nuclear anomalies in fishes from São Francisco river, Minas Gerais, Brasil. Acta Scientiarum of Biological Sciences, 33, 107-112.

Silva, G.N. Estudo da fotodegradação da atrazina na presença de óxidos mistos aplicando diferentes formas de energia. Maringá: UEM, 2017. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá.

Solomon, K.R., Dalhoff, C., Volz, D., Van Der Kraak, G., 2014. Effects of herbicides on fish. Organic Chemical Toxicology of Fishes. Elsevier – London, 370-409.

Švorc, L., M, Rievaj., D, Bustin., 2013. Green electrochemical sensor for environmental monitoring of pesticides: determination of atrazine in river waters using a boron-doped diamond electrode, *Sensors Actuators B: Chemical* 181, 294–300.

Ta, N., Hong, J., Liu, T., Sun, C., 2006. Degradation of atrazine by microwave-assisted electrodeless discharge mercury lamp in aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials* 138, 187–194.

Velisek, J., Stara, A., Zuskova, E., Kouba, A., 2017. Effects of three triazine metabolites and their mixture at environmentally relevant concentrations on early life stages of marbled crayfish (*Procambarus fallax f. virginalis*). *Chemosphere* 175, 440-445.

Ventura, B.C., De Angelis, D.F., Marin-Morales, M.A., 2008. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pesticide, Biochemistry & Physiology* 90, 42-51.

Vieira, C.E.D., Costa, P.G., Cabrera, L.C., Primel, E.G., Fillmann, G., Bianchini, A., Martinez, C.B.R., 2017. A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: Implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. *Science of Total Environment* 586, 598-609.

Vonberg, D., Vanderborght, J., Cremer, N., Putz, T., Herbst, M., Vereecken, H., 2014. 20 years of long-term atrazine monitoring in a shallow aquifer in western Germany. *Water Research* 50, 294-306.

Yamamoto, F.Y., Pereira, M.V.V., Lottermann, E., Santos, G.S., Stremel, T.R.O., Doria, H.B., Gusso-Choueri, P., Campos, S.X., Ortolani-Machado, C.F., Cestari, M.M., Filipak Neto, F., Azevedo., J.C.R., Ribeiro, C.A.O., 2016. *Environmental Science and Pollution Research* 23, (18), 18111-18128.

Wang, W.K., Chen, J.J., Gao, M., Huang, Y.X., Zhang, X., Yu, H.Q., 2016. Photocatalytic degradation of atrazine by boron-doped TiO<sub>2</sub> with tunable rutile/anatase ratio. *Applied Catalysis B: Environmental* 195, 69-76.

Winkaler, E.U., Silva, A.G., Galindo, H.C., Martinez, C.B.R., 2001. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Sci. Biol. Sci.* 23, 507–514. Zagatto, P.A., Bertolotti, E., 2006. *Ecotoxicologia aquática – Princípios e aplicações*.

WHO. World Health Organization. Chemical safety of drinking water - assessing priorities for risk management, 2007. Disponível em: <[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/dwchem\\_safety/en/index..html](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/dwchem_safety/en/index..html)>. Acesso em: Dezembro de 2017.

Xu, L.J., Chu, W., Graham, N., 2014. Atrazine degradation using chemical-free process of USUV: Analysis of the micro-heterogeneous environments and the degradation mechanisms. *Journal of Hazardous Materials* 275, 166–174.

Zakeri, Z.; Lockshin, R.A. Cell death during development. *Journal of Immunological Methods*, 265, 3-20, 2002.