

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE ANIMAL

Aline Teixeira Marins

**EFEITO DE DIETA SUPLEMENTADA COM SELÊNIO EM CARPAS
(*Cyprinus carpio*) EXPOSTAS A ATRAZINA**

Santa Maria, RS
2016

Aline Teixeira Marins

**EFEITO DE DIETA SUPLEMENTADA COM SELÊNIO EM CARPAS (*Cyprinus
carpio*) EXPOSTAS A ATRAZINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Área de Concentração em Bioecologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Biodiversidade Animal**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vania Lucia Loro
Co-orientadora: Charlene Cavalheiro de Menezes

Santa Maria, RS, Brasil
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Teixeira Marins, Aline
Efeito de dieta suplementada com selênio em carpas
(CYPRINUS CARPIO) expostas a atrazina / Aline Teixeira
Marins.-2016.
43 p. ; 30cm

Orientadora: Vania Lucia Loro
Coorientadora: Charlene Cavalheiro de Menezes
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, RS, 2016

1. Peixes 2. Disseleneto de difenila 3. Herbicida 4.
Estresse oxidativo I. Lucia Loro, Vania II. Cavalheiro
de Menezes, Charlene III. Título.

Aline Teixeira Marins

EFEITO DE DIETA SUPLEMENTADA COM SELÊNIO EM CARPAS (*Cyprinus carpio*) EXPOSTAS A ATRAZINA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Área de Concentração em Bioecologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Biodiversidade Animal**.


Aprovado em 09 de março de 2016:



Vania Lucia Loro, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Charlene Cavalcanti de Menezes, Dr^a. (UFSM)
(Coordenadora)



Denis Broock Rosemberg, Dr. (UFSM)



Guendalina Turcato Oliveira, Dr^a. (PUCRS)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi possível devido à colaboração de diversas pessoas, as quais gostaria de agradecer:

- a minha orientadora Vania Lucia Loro por oportunizar e direcionar meus passos durante o mestrado, possibilitando meu crescimento profissional e pessoal, guiando-me no encantador mundo da pesquisa, muito obrigada pela orientação;
- a minha co-orientadora Charlene Cavalheiro de Menezes pelos ensinamentos e confiança, concedendo-me segurança e motivação para aperfeiçoar-me constantemente, muito obrigada;
- a Cíntia Côrte Real Rodrigues, colega guerreira que esteve ao meu lado nos bons e maus momentos, que mesmo em um sábado as 10h da noite não perdeu o bom humor, agradeço imensamente;
- aos meus pais, Ana e Manoel, pelo alicerce construído que moldou a pessoa que sou, que mesmo sem compreender o que estudo, incentivaram-me e torceram pela minha vitória;
- a minha família, principalmente Renata, Arthur e Ruan, que mesmo querendo uma visita mais demorada compreenderam que “a tia Nine tem que ir pro colégio”;
- ao meu anjo Pedro Henrique Leão, pela amizade, compreensão, amor, carinho, tornando meus dias mais felizes e calmos, dando-me mais de 8.000 motivos para seguir em frente, te amo;
- aos colegas do Labtaq, especialmente Mauro Eugênio Nunes e Talise Ellwanger Müller, pelo apoio técnico especializado nas quartas-feiras a noite, sendo indispensáveis à animação laboratorial;
- aos amigos, que mesmo distantes direcionaram palavras e pensamentos otimistas desejando meu sucesso, meu sincero afeto;
- aos professores da Universidade Luterana do Brasil de Cachoeira do Sul, que mostraram-me quão bela a Biologia é;
- a professora Leila Piccoli da Silva e a Suziane Ghedini Martinelli pelo auxílio na confecção das dietas das carpas, grata pela disposição;

- ao Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas, especialmente ao professor Renato Zanella, por ceder a atrazina e analisar os resíduos na água e nas carpas, muito obrigada;
- aos professores, ao secretário Sidnei da Cruz e aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, por compartilharem seus conhecimentos, buscando o desenvolvimento deste curso;
- a CAPES pelo apoio financeiro;
- a Universidade Federal de Santa Maria, cedendo oportunidades e infraestrutura, permitindo meu crescimento pessoal bem como o desenvolvimento desta dissertação.

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste sonho. Quero compartilhar com todos a felicidade deste momento, simbolizando não um fim, mas o início de uma nova jornada. Muito obrigada!

RESUMO

EFEITO DE DIETA SUPLEMENTADA COM SELÊNIO EM CARPAS (*Cyprinus carpio*) EXPOSTAS A ATRAZINA

AUTORA: Aline Teixeira Marins
ORIENTADORA: Vania Lucia Loro

A poluição aquática, oriunda de diversas atividades humanas, acarreta em efeitos nocivos aos ecossistemas envolvidos. Com o intuito de verificar o potencial tóxico de xenobióticos, é usual a utilização de carpas (*Cyprinus carpio*) como modelo de exposição. Dentre os poluentes passíveis de causar danos à biota aquática, acredita-se que os herbicidas seletivos, como a atrazina (ATZ), possuam baixo efeito tóxico à fauna. No entanto, existem relatos de efeitos diretos em desenvolvimento, crescimento, reprodução e comportamento de peixes expostos a ATZ. Considerando-se que o selênio é um elemento traço essencial para o adequado funcionamento celular e que está presente em importantes enzimas antioxidantes, é de suma importância seu fornecimento alimentar adequado aos peixes. Logo, a suplementação de dietas com compostos de selênio tende a melhorar o perfil antioxidante de diversos organismos modelo, protegendo-os de efeitos adversos de poluentes ambientais. Considerando-se os efeitos nocivos causados por exposição a ATZ, esta pesquisa objetivou investigar efeitos benéficos de dieta suplementada com disseleneto de difenila [(PhSe)₂], um composto orgânico de selênio, em carpas expostas a ATZ. As carpas foram alimentadas durante 60 dias com dieta controle e dieta suplementada com 3mg/kg de (PhSe)₂. Posteriormente, foram expostas a ATZ (concentrações de 0, 2 e 10 µg/L) durante 96h. Ao final do experimento, as carpas foram submetidas a eutanásia e os tecidos (brânquias, fígado e músculo) foram dissecados e congelados para posteriores ensaios bioquímicos. Constatou-se acúmulo de ATZ em músculo das carpas, sendo dependente da concentração de exposição. Verificou-se que ambas concentrações de ATZ geraram dano oxidativo, representado pela peroxidação lipídica, medida através dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A oxidação de proteínas, aferida através do conteúdo de proteína carbonilada, demonstrou aumento em relação aos resultados controle. A suplementação da dieta com (PhSe)₂ preveniu o dano oxidativo, mantendo os níveis de TBARS e de proteína carbonilada próximos aos valores do controle. Identificou-se inibição na atividade das enzimas glutathione S-transferase (GST) e glutathione peroxidase (GPx) pela exposição a ATZ, no entanto esta inibição foi relativamente prevenida em carpas alimentadas com (PhSe)₂. Portanto, exposição aguda a ATZ causou alterações bioquímicas em carpas, e algumas destas alterações foram prevenidas pela suplementação da dieta com (PhSe)₂.

Palavras-chave: Peixes. Disseleneto de difenila. Herbicida. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

SELENIUM SUPPLEMENTED DIET EFFECTS IN CARPS (*Cyprinus carpio*) EXPOSED TO ATRAZINE

AUTHOR: Aline Teixeira Marins
ADVISOR: Vania Lucia Loro

The water pollution, derived from several human activities, results in harmful effects to the ecosystems involved. In order to verify the potential toxicity of xenobiotics, it is usual to use carps (*Cyprinus carpio*) as exposure model. Among the pollutants that could cause damage to aquatic biota, it is believed that selective herbicides, such as atrazine (ATZ), have low toxic effect on wildlife. However, there are reports of direct effects on development, growth, reproduction and behavior of fish exposed to ATZ. Considering that selenium is an essential trace element for the adequate cell function and is present in important antioxidant enzymes, is very important its appropriate food supply for fish. Therefore, supplementation of diets with selenium compounds increases the antioxidant profile of several model organisms, protecting them from adverse effects of environmental pollutants. Considering the harmful effects from exposure to ATZ, this study aimed to investigate the beneficial effects of diet supplemented with diphenyl diselenide [(PhSe)₂], an organic compound of selenium, in carps exposed to ATZ. Thus, carp were fed for 60 days with diet control and diet supplemented with 3 mg/kg of (PhSe)₂. Subsequently, they were exposed to ATZ (concentrations of 0, 2, and 10 µg/L) for 96h. At the end of the experiment, the carps were euthanized and tissues (gills, liver and muscle) were dissected and frozen for further biochemical assays. ATZ accumulated in muscle of carp directly related to the concentration of exposure. It was observed that both ATZ concentrations generated oxidative damage, represented by lipid peroxidation, measured as thiobarbituric reactive species (TBARS) levels. The protein oxidation, measured as the protein carbonyl content, showed an increase compared to the control results. Dietary supplementation with (PhSe)₂ prevented oxidative damage, maintaining the levels of TBARS and protein carbonyl content similar to control. Exposure to ATZ inhibited the activity of the enzymes glutathione S-transferase (GST) and glutathione peroxidase (GPx), however this inhibition was relatively prevented in carp fed with (PhSe)₂. Thus, acute exposure to ATZ caused biochemical changes in carp, and some of these alterations were prevented by dietary supplementation with (PhSe)₂.

Keywords: Fish. Diphenyl diselenide. Herbicide. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Exemplar de carpa, <i>Cyprinus carpio</i>	12
Figura 2 – Vias de degradação e dissipação de herbicidas para ambientes aquáticos.....	14
Figura 3 – Estrutura química da atrazina.....	15
Figura 4 – Estrutura química de disseleneto de difenila, (PhSe) ₂	18

MANUSCRITO

Figure 1 – TBARS levels in liver (A), gills (C) and muscle (E), and protein carbonyl in liver (B), gills (D) and muscle (F) of carps fed with diet supplemented with (PhSe) ₂ , exposed to atrazine. Data are reported as mean ± S.E.M. (n = 6). Different letters indicate differences between groups (p < 0.05).....	38
Figure 2 – GST activity in liver (A), gills (C) and muscle (E), and GPx activity in liver (B), gills (D) and muscle (F) of carps fed with diet supplemented with (PhSe) ₂ , exposed to atrazine. Data are reported as mean ± S.E.M. (n = 6). Different letters indicate differences between groups (p < 0.05).....	39

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

- Table 1 – NPSH and AsA levels in liver, gills and muscle of carps fed with diet supplemented with $(\text{PhSe})_2$, exposed to atrazine..... 37
- Table 2 – CAT and SOD activities in liver of carps fed with diet supplemented with $(\text{PhSe})_2$, exposed to atrazine..... 37
- Table 3 – Accumulation and BCF of atrazine in muscle of carps fed with diet supplemented with $(\text{PhSe})_2$ 37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

INTRODUÇÃO

AChE	Acetilcolinesterase
CAT	Catalase
CYP	Citocromo P450
(PhSe) ₂	Disseleneto de difenila
GPx	Glutathiona peroxidase
GST	Glutathiona S-transferase
MT	Metalotioneina
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
Trx	Tiorredoxina redutase

MANUSCRITO

APx	Ascorbate peroxidase
AsA	Ascorbic acid
ATZ	Atrazine
BCF	Minimized bioconcentration factor
CAT	Catalase
CYP	Cytochrome P450
DHAR	Dehydroascorbate reductase
(PhSe) ₂	Diphenyl diselenide
EROD	Ethoxyresorufin-O-deethylase
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduced
GST	Glutathione S-transferase
MDHAR	Monodehydroascorbate reductase
NPSH	Non-protein thiols
PROD	Pentoxeresorufin-O-deethylase
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxide dismutase
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	ORGANISMO TESTE.....	12
1.2	ATRAZINA.....	13
1.3	SELÊNIO.....	16
1.4	DISSELENETO DE DIFENILA.....	18
1.5	BIOMARCADORES.....	19
1.6	OBJETIVOS.....	21
1.6.1	Objetivo Geral	21
1.6.2	Objetivos Específicos	21
2	MANUSCRITO - DIPHENYL DISELENIDE DIET EFFECTS IN CARPS EXPOSED TO ENVIRONMENTAL CONCENTRATIONS OF ATRAZINE	21
3	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 ORGANISMO TESTE

Cyprinus carpio (Linnaeus, 1758), popularmente conhecida como carpa comum, é um peixe teleósteo da ordem Cypriniformes, família Cyprinidae (FREYHOF, KOTTELAT, 2008). É um animal de corpo alongado e comprimido, apresentando lábios grossos ornamentados com dois pequenos pares de barbilhões (Figura 1). Possuindo alimentação onívora, essa espécie prefere habitar ambientes de água doce rasos, com vegetação densa, como pequenos córregos, áreas inundadas e lagos, forrageando no fundo bem como na camada média e próximo à superfície (FAO, 2016).



Figura 1 – Exemplo de carpa, *Cyprinus carpio*

Fonte: arquivo pessoal.

A carpa comum provavelmente originou-se no rio Danúbio (centro-leste europeu), dispersando-se pelo leste europeu e oeste asiático. Com a ascensão do Império Romano aumentou a utilização de carpas como fonte alimentar devido à necessidade de saciar cerca de 100.000 romanos, dentre estes 20.000 legionários. Desta forma desenvolveu-se a domesticação da espécie, sendo confinada em criadouros, as *piscinae* (BALON, 1995). O advento da piscicultura possibilitou a criação e comercialização de carpas em diversas regiões do mundo, como Europa,

Ásia e Américas (ZAMBRANO et al., 2006). Sua produção tem aumentado rapidamente, atingindo o valor de 4.080.045 toneladas no ano de 2013 (FAO, 2016).

Devido à alta capacidade de adaptação, inclusive uma característica que a torna uma espécie potencialmente invasora (ZAMBRANO et al., 2006), as carpas são amplamente utilizadas em programas de avaliação toxicológica de diversos compostos. Um exemplo desta habilidade foi verificado em um estudo de campo para avaliar a viabilidade de produção conjunta de peixes e arroz irrigado. Embora não tenha ocorrido alterações nos parâmetros de crescimento, a variação no perfil bioquímico desta espécie confirmou sua aplicabilidade como bioindicador de efeito tóxico do inseticida fipronil (CLASEN et al., 2012). São exemplos também da utilização de carpas como modelo animal em estudos de toxicidade ao biopesticida azadiractina (MURUSSI et al., 2016), simazina (OROPESA, GARCÍA-CAMBERO, SOLER, 2009), atrazina e clorpirifós (XING et al., 2014). Estes estudos são importantes para validar biomarcadores de intoxicação por diferentes pesticidas, elucidando alguns mecanismos compensatórios de eliminação destes compostos. Estes estudos também permitem a identificação de concentrações potencialmente danosas para os ecossistemas aquáticos.

1.2 ATRAZINA

Diversas atividades humanas podem gerar contaminantes ambientais, como mineração, indústrias, refinarias, descarte incorreto de efluentes urbanos, bem como pelos defensivos empregados nas atividades agrícolas. Esses poluentes apresentam variada biodisponibilidade, possuindo o potencial de causar danos nos organismos não-alvo de forma diferenciada (BEASLEY, LEVENGOOD, 2012).

Tratando-se de defensivos agrícolas, os herbicidas são produzidos para agirem especificamente em plantas, fato que os torna menos tóxicos para animais. Quando esses pesticidas são seletivos, como a atrazina que inibe o fotossistema II das plantas, são considerados relativamente seguros à biota. No entanto, determinadas concentrações desses agrotóxicos são capazes de induzir danos nos animais expostos, dependendo do agente químico, concentração e via de contato (SOLOMON et al., 2014).

Após a aplicação, os diferentes herbicidas podem ser degradados devido à fotólise, biodegradação via microrganismos ou animais edáficos, bem como deve-se considerar a possível dispersão em diferentes ambientes. A contaminação aquática (Figura 2) pode ocorrer por via direta, quando herbicidas são utilizados para controle de plantas aquáticas. Outra forma de dissipação se dá através de adsorção e lixiviação dos compostos pelo solo, e erosão com escoamento, atingindo desta forma águas superficiais (SOLOMON et al., 2014).

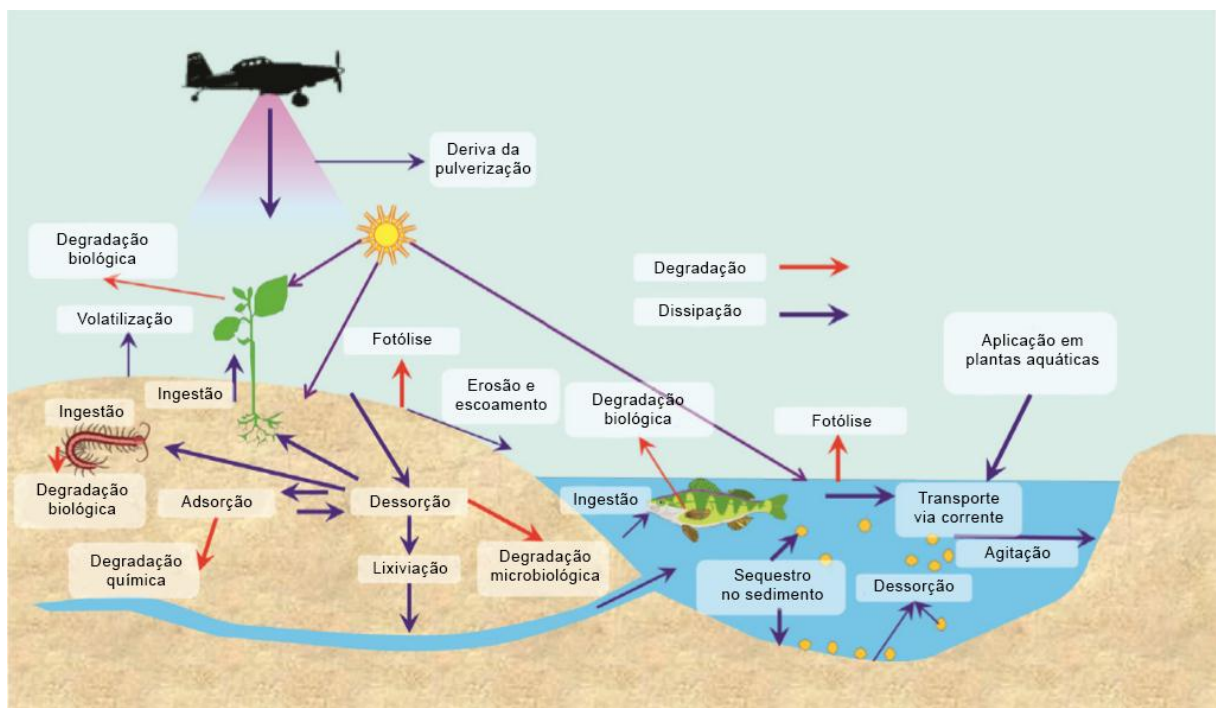


Figura 2 – Vias de degradação e dissipação de herbicidas para ambientes aquáticos
Fonte: adaptado de SOLOMON et al., 2014, p.373.

A atrazina (Figura 3) é um herbicida utilizado em cultivos de cana-de-açúcar, milho, sorgo, abacaxi e nozes, entre outros. Possui relativa persistência em águas com pH alcalino. Quando está presente em ambiente com esta característica aumenta o risco de contato com os organismos visto que aumenta o tempo de possível exposição (SOLOMON et al., 2008). Em trabalhos recentes no Brasil foram registrados a ocorrência de atrazina com concentração entre 0,09 até 5,4 $\mu\text{g/L}$ em águas superficiais, e concentrações entre 0,32 até 0,69 $\mu\text{g/kg}$ em sedimentos (LORO et al., 2015; VIEIRA et al., 2016). Segundo a Resolução nº 357, de 17 de

março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente, o valor máximo aceitável de atrazina em água de Classe II (água doce, que também pode ser destinada a aquicultura e a pesca) é de 2 µg/L (CONAMA, 2005). Como mencionado anteriormente, é possível encontrar no ambiente concentrações acima do preconizado por lei.

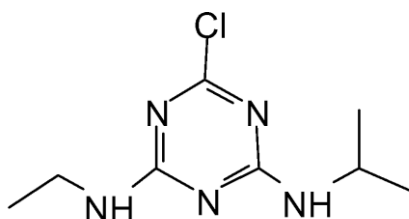


Figura 3 – Estrutura química da atrazina

Fonte: adaptado de SOLOMON et al., 2008, p. 724.

A contaminação aquática pela atrazina pode ter diversos impactos aos ecossistemas. Primeiramente, sua presença pode ocasionar a diminuição de organismos autotróficos, afetando a disponibilidade de alimentos para herbívoros. Além de interferir na disposição de teia trófica, a morte de grande quantidade de organismos diminui a qualidade da água devido à decomposição dos mesmos (GRAYMORE, STAGNITTI, ALLISON, 2001). Acredita-se que por ação direta a atrazina tenha baixa sensibilidade em organismos não-alvo, como peixes, visto que este herbicida possui ação em funções bioquímicas específicas de plantas. No entanto, existem pesquisas relatando efeitos diretos em desenvolvimento, crescimento, reprodução e comportamento de peixes (SOLOMON et al., 2014).

Embora a legislação determine a concentração segura de atrazina para a água de consumo e piscicultura, Mela et al. (2013) demonstraram mudanças histopatológicas, bioquímicas e fisiológicas em *Rhamdia quelen* (jundiá) expostos a concentrações ambientais de atrazina. Do mesmo modo, Santos e Martinez (2012) identificaram que atrazina foi tóxica para *Prochilodus lineatus* (curimatã) na concentração de 2 µg/L, causando alterações nos parâmetros bioquímicos e genéticos.

Com o intuito de compreender-se o mecanismo de desintoxicação de atrazina em peixes alguns pesquisadores analisaram a atividade de enzimas dos sistemas de detoxificação. Xing et al. (2014) verificaram aumento da atividade de enzimas de fase I, citocromo P450 (CYP), em carpas, no entanto apurou-se bioacumulação do herbicida e de seus metabólitos em fígado. Com relação à enzima de fase II, glutathione-S-transferase (GST), constatou-se diminuição de sua atividade em carpas expostas a altas concentrações de atrazina, clorpirifós e sua mistura. Embora as isoformas de GST's estivessem presentes em todos os órgãos coletados nesta pesquisa, o comportamento da transcrição das mesmas foi distinta para cada tecido analisado, bem como para as concentrações de pesticidas utilizados. Este achado indicou diferentes especificidades de atuação das classes de GST's, demonstrando que cada tecido possui uma classe predominante para a detoxificação de xenobióticos (XING et al. 2012).

1.3 SELÊNIO

Selênio (Se) é encontrado em baixas concentrações no ambiente. Este elemento pode ser medido no ar (valores entre 0,1 – 10 ng/m³), rochas e solo (concentrações entre 0,1 – 10 µg/g), bem como em água (variando entre 0,06 – 0,12 µg/L no mar, e entre 0,06 – 400 µg/L em águas superficiais e subterrâneas). Devido à variação ambiental na distribuição do selênio, culturas produzidas em diferentes regiões podem diferir nas quantidades acumuladas (ALEXANDER, 2015). Desta forma, cuidados devem ser tomados no planejamento de dietas de peixes afim de se produzir rações com concentrações adequadas de selênio, visto que a presença deste elemento pode variar na matéria-prima utilizada.

Devido sua presença em selenoproteínas, o selênio é um elemento traço essencial para o funcionamento celular em muitos organismos. Está presente em importantes enzimas antioxidantes, como glutathione peroxidase (GPx) e tioredoxina redutase (Trx), sendo incorporado através do aminoácido selenocisteína (ALEXANDER, 2015). Além de estar presente na estrutura protéica, Ibrahim et al. (2015) observaram atividade mimética à GPx de dois compostos orgânicos de selênio, composto A, um amino disseleneto, e disseleneto de difenila [(PhSe)₂].

Neste trabalho relatou-se proteção de tecido cerebral de ratos contra peroxidação lipídica induzida por Fe(II) e nitroprussiato de sódio, em ensaios *in vitro*.

Pesquisas realizadas com carpas demonstraram que dieta com quantidades adequadas de selênio é responsável por diminuir a morbidade e mortalidade, bem como possibilita a adequada expressão da enzima GPx. Por outro lado, a deficiência deste micronutriente em carpas é responsável por distúrbios no crescimento e na resposta do sistema antioxidante, assim como por causar mudanças histopatológicas em coração, pâncreas, baço, e principalmente, músculo e fígado (ELIA et al., 2011; WANG et al., 2013).

Dado que selênio é um elemento essencial à dieta de peixes e que possui papel intrínseco em selenoenzimas, pesquisadores examinaram a capacidade de diferentes compostos de selênio em promover o sistema antioxidante. Carpas suplementadas com nano partículas de selênio demonstraram maior desempenho no crescimento, aumento na atividade de enzimas antioxidantes (GPx, superóxido dismutase – SOD –, catalase – CAT) e diminuição nos níveis de peroxidação lipídica, em relação aos animais alimentados com dieta controle (ASHOURI et al., 2015). Em outro estudo, *Carassius auratus* (douradinho) e *Danio rerio* (peixe-zebra) foram expostos a metil mercúrio via injeção intraperitoneal e dieta, respectivamente. Douradinhos foram alimentados com dietas suplementadas com selenito, selenocistina, seleno-metionina ou selenato. Peixe-zebra recebeu dieta suplementada com selenito. Ambas espécies demonstraram maior eliminação de metilmercúrio após suplementação da dieta com compostos de selênio, diferindo na velocidade e tecido analisado. No entanto, em douradinho, selenato não diferiu dos resultados controles (BJERREGAARD et al., 2011).

Em um trabalho utilizando ratos como modelo animal, averiguou-se o potencial de selenito de sódio em prevenir danos causados por exposição à atrazina. Neste experimento os animais foram expostos via gavagem à solução de selenito de sódio e/ou atrazina durante dezesseis dias. Verificou-se que a atrazina causou alterações bioquímicas em fígado e órgãos do aparelho reprodutivo de ratos machos. Selenito de sódio foi capaz de combater os efeitos tóxicos causados pela atrazina em fígado, porém não em testículo e epidídimo (ADESIYAN et al., 2011). Em geral, o selênio presente na dieta é absorvido no intestino e direcionado para o fígado, sendo posteriormente distribuído aos outros tecidos. Como o transporte do selênio é realizado por diferentes tipos de selenoproteínas, a concentração em cada

órgão pode diferir (ALEXANDER, 2015). Desta forma, as respostas nos organismos tendem a ser tecido-específico.

1.4 DISSELENETO DE DIFENILA

Estresse oxidativo é uma condição caracterizada pelo aumento de substâncias pró-oxidantes e/ou depleção de moléculas e enzimas antioxidantes, causando um desequilíbrio celular. Exposição a xenobióticos é um dos diversos fatores capazes de gerar esta alteração no estado redox das células, podendo acarretar diversas patologias no organismo (NOGUEIRA, ROCHA, 2011). Visto que a exposição ambiental a poluentes é frequentemente inevitável, pesquisas buscam identificar substâncias antioxidantes que previnam danos gerados pelo estresse oxidativo.

Disseleneto de difenila [(PhSe)₂], um composto orgânico de selênio sintetizado (Figura 4), é considerado um “composto Janus”, ou seja, possui o potencial de causar toxicidade quando empregado em doses elevadas, bem como possui ação antioxidante em concentrações baixas (NOGUEIRA, ROCHA, 2010).

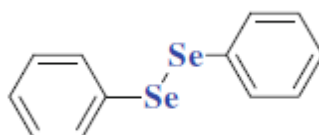


Figura 4 – Estrutura química de disseleneto de difenila, (PhSe)₂

Fonte: adaptado de NOGUEIRA, ROCHA, 2011, p.1314.

Desta forma, com o intuito de avaliar o potencial protetor do (PhSe)₂ em carpas, Menezes et al. (2014) verificaram efeito benéfico no enriquecimento da dieta com 3 miligramas de (PhSe)₂ por quilo de ração (3 mg/kg). Nesta concentração, evidenciou-se maior crescimento dos animais e aumento das defesas antioxidantes. Por outro lado, a concentração de 5 mg/kg mostrou-se tóxica às carpas. Igualmente, jundiás demonstraram sensibilidade à concentração de 5 mg/kg em dieta. No entanto, dieta suplementada com 1,5 e 3 mg/kg de (PhSe)₂ aumentaram o ganho de

peso e ambas concentrações melhoraram o perfil antioxidante de jundiás (MENEZES et al., 2016).

Quando testada a capacidade de prevenir danos oxidativos causados por pesticidas, $(\text{PhSe})_2$ mostrou-se eficaz em diversas espécies animais, como *Drosophila melanogaster* (ADEDARA et al., 2015), jundiás (MENEZES et al., 2013) e carpas (MENEZES et al., 2012). Este composto demonstrou também aumentar a excreção de cloreto de mercúrio em camundongos (FIUZA et al., 2015). Considerando-se a utilização em concentrações adequadas, $(\text{PhSe})_2$ é um composto com grande possibilidade de enriquecimento de dietas de peixes visando melhorar a saúde e crescimento, visto a segurança de uso evidenciada em diversos modelos animais.

1.5 BIOMARCADORES

A exposição de organismos aquáticos a contaminantes ambientais produz efeitos que, a longo prazo, serão observados na população, comunidade e ecossistema. No entanto, para que essas mudanças sejam visíveis é necessário que ocorram, a nível de organismo, mudanças bioquímicas, moleculares, celulares, morfológicas e fisiológicas. Estas alterações são mensuradas através de parâmetros específicos, denominados biomarcadores (LÓPEZ-DOVAL, BARATA, DÍEZ, 2015).

Os biomarcadores podem ser classificados como marcadores de defesa e de dano. São exemplos de marcadores de defesa a atividade de enzimas de detoxificação (CYP e metalotioneína – MT), biotransformação (GST), e defesa antioxidante (SOD, CAT, e GPx). Como biomarcadores de dano são exemplos a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), formação de micronúcleo e adutos no DNA, marcadores de estresse oxidativo, e histocitopatologias (AMIARD-TRIQUET, BERTHET, 2015). Como marcadores de estresse oxidativo são utilizados análises dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), indicativo de peroxidação lipídica, bem como a dosagem do conteúdo de proteína carbonilada (MENEZES et al., 2016).

O metabolismo dos peixes produz espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, seja como um subproduto dos ciclos de energia como para sinalização celular. No entanto, essas substâncias possuem a capacidade de causar danos em

macromoléculas, como lipídeos, proteínas e bases nitrogenadas. Para evitar esses danos, o organismo utiliza-se de defesas antioxidantes endógenas, caracterizadas pelas enzimas antioxidantes, e exógenas, como a vitamina C adquirida pela dieta. Quando expostos a xenobióticos a produção de espécies reativas pode ultrapassar a capacidade de defesa do organismo, caracterizando-se uma situação de estresse oxidativo (PISOSCHI, POP, 2015). Embora pesticidas possam causar dano oxidativo em peixes, quando alimentados com dieta enriquecida com antioxidantes estes animais tornam-se mais resistentes ao agente estressor (MENEZES et al., 2012). Desta forma fica evidente a necessidade de fornecimento alimentar adequado aos animais, prevenindo-se efeitos nocivos de possíveis poluentes ambientais aos quais os peixes podem ser expostos no ambiente natural.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo Geral

Investigar os possíveis efeitos benéficos de dieta suplementada com $(\text{PhSe})_2$ em carpas expostas a atrazina.

1.6.2 Objetivos Específicos

- Avaliar danos oxidativos em carpas causados pela exposição à atrazina.
- Determinar o perfil de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos.
- Investigar a ocorrência de bioacumulação do herbicida nos filés.
- Averiguar a capacidade da suplementação da dieta com $(\text{PhSe})_2$ em reverter danos causados por atrazina em carpas.

2 MANUSCRITO:

DIPHENYL DISELENIDE DIET EFFECTS IN CARPS EXPOSED TO ENVIRONMENTAL CONCENTRATIONS OF ATRAZINE

Aline Marins^a, Cíntia Rodrigues^b, Charlene de Menezes^a, Jeane Gomes^a, Maiara Costa^b, Mauro Nunes^b, Renato Zanella^c, Leila da Silva^d, Vania Loro^{a*}

^a Programa de Pós - Graduação em Biodiversidade Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^b Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^c Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^d Programa de Pós - Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

* Corresponding author at:

Prof^a Dr^a Vania Lucia Loro, PhD, Pesquisador 1D-CNPq

Laboratório de Toxicologia Aquática

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Universidade Federal de Santa Maria

97105.900, Santa Maria, RS, Brazil

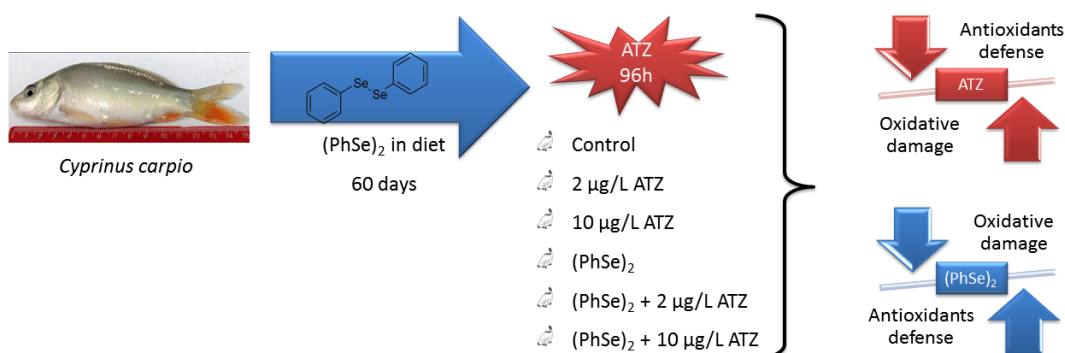
Telephone: +55 55 3220-9456

Email: vania.loro@gmail.com

PERIÓDICO: PESTICIDE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY

ABSTRACT:

Atrazine (ATZ) is a worldwide used herbicide, that can cause oxidative damage in non-target organisms. However, diet supplementations of fish with antioxidants compounds improve the ability of them to resist to pesticides exposure. The goal of this study was to investigate the capacity of $(\text{PhSe})_2$ diet supplementation to improve the antioxidant defense of *Cyprinus carpio* (carps) exposed to ATZ. Thus, carps were fed for eight weeks with or without $(\text{PhSe})_2$ supplemented diet, exposed to environmentally relevant concentrations of ATZ for 96h, euthanized and liver, gills and muscle tissues were removed for biochemical assays. There was an increase in levels of oxidative damage biomarkers and decrease in activity of antioxidants enzymes in carps exposed to ATZ, in comparison to control group. In conclusion, diet supplementation with $(\text{PhSe})_2$ protected carps from the oxidative damage caused by ATZ exposure.

GRAPHICAL ABSTRACT:**HIGHLIGHTS:**

- Environmentally concentration of ATZ is able to cause oxidative damage in carps.
- $(\text{PhSe})_2$ could be used as antioxidant diet supplement in carps exposed to ATZ.
- ATZ can accumulate in carps.

KEYWORDS:

Antioxidant. Oxidative stress. *Cyprinus carpio*. Herbicide. Selenium.

1 INTRODUCTION:

Atrazine (ATZ; CAS number 1912-24-9) is a selective herbicide, inhibitor of photosynthesis, used worldwide in sugarcane crops, corn, sorghum and less in fruits and nuts. It has relative persistence in surface waters, possible found in groundwater, increasing the risk to aquatic environment [1,2]. Recently in Brazil concentrations of 0.09 up to 5.4 µg/L of this herbicide were registered in surface freshwaters [3,4]. This pollutant possibly affect the abundance and diversity in aquatic ecosystems promoting an imbalance in the food web by affecting the autotrophic organisms and consequently consumers [5]. Potential teratogenic, genotoxic and oxidative stress were reported in zebrafish embryos (*Danio rerio*) exposed to arsenic and ATZ mixture [6]. In common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to atrazine, chlorpyrifos and their combined mixture alterations in activity and transcription of glutathione S-transferase (GST), increase in ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and pentoxyresorufin-O-deethylase (PROD) activity, rise in cytochrome P450 (CYP) content and accumulation of both agrochemicals in liver were observed [7,8]. Common carp embryos exposed to environmental concentrations of atrazine (0.3 µg/L) showed alterations in antioxidant enzymes, indicating toxic effects even at low concentrations [9].

It is essential the presence of the micronutrient selenium in the diet for normal fish growth and health. In common carp selenium intake improved antioxidant system, protecting against chemical stressors when supplemented. Carps fed deficient diet showed pathologies, like hepatocytes degeneration and necrosis, lordosis, muscle atrophy and oxidative stress [10–12]. In this species diet supplemented for sixty days with 3mg/kg of diphenyl diselenide [(PhSe)₂], an organic compound of selenium, protected against oxidative damage induced by exposure to quinclorac for 192h [13]. Similarly, silver catfish (*Rhamdia sp.*) fed with (PhSe)₂ diet increased antioxidant defenses, protecting from clomazone exposure [14]. In a different experimental model, diet supplementation with (PhSe)₂ in mice protect against the toxic effects induced by mercury chloride subcutaneous injection, increasing antioxidant profile [15]. Similarly, *Drosophila melanogaster* fed with (PhSe)₂ supplemented diet showed protection against oxidative stress and mortality induced by chlorpyrifos [16].

Fish are used frequently as bioindicator of environmental health. Carps have been effectively used in laboratory and field studies to assessed toxic effects of exposition to several types of pesticides [17–20]. This animal-model is used also in investigations of potential diet antioxidants [13,14,21]. In addition, future researches aimed found nutrients or supplements to increase the antioxidant capacity and control the oxidative damage caused by pesticide exposures.

Considering the harmful effects of atrazine and the antioxidant potential of $(\text{PhSe})_2$, recorded to fish species, the aim of this study was to prove the protective role of diet supplementation with $(\text{PhSe})_2$ by ameliorating the antioxidant system against concentrations environmentally relevant of atrazine in *Cyprinus carpio*.

2 MATERIAL AND METHODS:

2.1. CHEMICALS

Atrazine (ATZ) 99.4% was obtained from Dr. Ehrenstorfer (Germany). Diphenyl diselenide [$(\text{PhSe})_2$], 98%, and all other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (USA).

2.2. ANIMALS

Juvenile carps of both sexes (mean weight 13.72 ± 0.37 g, body length 9.21 ± 0.09 cm) were obtained from a fish farm (Rio Grande do Sul, Brazil). The animals were acclimated for ten days to laboratory conditions, with natural photoperiod (12h light/12h dark). They were maintained in static system in 250L boxes of fiber glass, with continuously aerated tap water and physical and biological filters. Water quality parameters were verified daily (temperature $24.14 \pm 0.96^\circ\text{C}$, pH 7.13 ± 0.18 , dissolved oxygen 7.98 ± 0.76 mg/L, non-ionized ammonia 0.18 ± 0.05 $\mu\text{g/mL}$, nitrite 1.09 ± 0.76 mg/mL). The fish were fed twice a day with commercial feed to satiety during the acclimation period. This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (under number 89/2014).

2.3. EXPERIMENTAL DESIGN

The two diets (control diet and selenium supplemented diet) were prepared in accordance with Menezes et al. [21]. For the supplemented diet, selenium compound

- (PhSe)₂ – was added to the other ingredients at the concentration of 3 mg/kg. Diets were stored at 4°C until use.

After acclimation, the carps were divided in two diet groups, a control group and a (PhSe)₂ supplemented group (n = 18 each group). The animals were fed twice a day with 3% biomass per day of the diets with or without (PhSe)₂, in a period of eight weeks, according what has been described by Menezes et al. [21]. After this period, the fish were divided in six treatments with six animals each treatment, as follows: control diet + 0µg/L ATZ, control diet + 2µg/L ATZ, control diet + 10µg/L ATZ, (PhSe)₂ diet + 0µg/L ATZ, (PhSe)₂ diet + 2µg/L ATZ, and (PhSe)₂ diet + 10µg/L ATZ. The fishes were exposed to atrazine for 96 h [22]. The water quality parameters were like in acclimation period. The concentrations of atrazine in water were measured in the beginning and in the end of exposure time by gas chromatography-mass spectrometry according to Sabin et al. [23].

After experimental period, the animals were anesthetized using clove oil solution (concentration of 50 µL/L) [24] and then euthanized by spinal cord section. After dissection, liver, gills and muscle were removed and stored at -80°C for later analysis.

2.4. BIOMARKERS OF OXIDATIVE DAMAGE

The lipid peroxidation was determined according to the technique described by Buege and Aust [25], through measure of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), expressed as nmol MDA/mg protein. The content of protein carbonyl was measured in accordance with Yan, Traber and Packer [26], expressed as nmol carbonyl/mg protein. Both parameters were determined in liver, gills and muscle.

2.5. DETERMINATION OF NON-ENZYMATIC ANTIOXIDANTS

The levels of non-protein thiols (NPSH) and ascorbic acid (AsA) were determined in liver, gills and muscle, and expressed as µmol NPSH/g of tissue and µg ascorbic acid/g of tissue, respectively. Both technical procedures were adapted by Menezes et al. [13].

2.6. ENZYMES ACTIVITY ASSAY

The activity of glutathione S-transferase (GST) was determined in accordance with Habig et al. [27] and was expressed as µmol GS-DNB/min/mg protein. The

activity of glutathione peroxidase (GPx) was assessed in accordance with Paglia and Valentine [28], and was expressed as $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein. Either enzymes activity was assessed in liver, gills and muscle.

Catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities were determined in liver. CAT was expressed as $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein, according to Nelson and Kiesow [29]. The activity of SOD was measured in accordance with Misra and Fridovich [30] and was expressed as U/mg protein.

2.7. PROTEIN DOSAGE

It was determined according to Bradford [31], bovine serum albumin was used as standard.

2.8. QUANTIFICATION OF ATZ IN FISH TISSUES

The concentration of atrazine in muscle was determined in accordance with Munaretto et al. [32]. To minimize differences between concentrations of ATZ ($2\mu\text{g}/\text{L}$ and $10\mu\text{g}/\text{L}$), the minimized bioconcentration factor (BCF) was adapted from OECD Guidelines for the Testing of Chemicals [33], using the following equation:

$$BCF = C_f / C_w \quad [\text{Equation 1}]$$

Where C_f = concentration of atrazine in muscle of carps at end of exposure (mg/kg wet weight); and C_w = concentration of atrazine in water at end of exposure (mg/L).

2.9. STATISTICAL ANALYSIS

The results are presented as means \pm standard error of mean (S.E.M.). The data were homogeneous, proven by the test Shapiro-Wilk. Comparisons between groups were by two-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparisons test. The significant level considered was $P < 0.05$. Analyzes were performed with the software GraphPad Prism version 6.01.

3 RESULTS:

Liver and muscle of carps exposed to 2 µg/L ATZ presented higher TBARS levels compared to control group, but in those exposed to 2 µg/L ATZ and fed with (PhSe)₂ there was no difference compared to the control values (Fig. 1A and 1E). In gills of carps any changes were observed in TBARS levels for all exposed groups (Fig. 1C).

In liver, the protein carbonyl content increased in both groups exposed to ATZ as compared with the control group. The supplementation with (PhSe)₂ prevented the carbonyl content increase caused by ATZ, maintaining the values similar to controls (Fig. 1B). In gills, the exposure to 2 µg/L ATZ increased the protein carbonyl content and did not change at 10 µg/L ATZ compared to control group. However, in gills, the diet (PhSe)₂ supplemented did not prevented the increase in protein carbonyl content at 2 µg/L ATZ (Fig. 1D). The ATZ exposure at both concentrations increased the protein carbonyl content in muscle of carps when compared to control group. In addition, at 10 µg/L ATZ the (PhSe)₂ contributed to reach the control values in the protein carbonyl content in muscle (Fig. 1F).

The supplementation with (PhSe)₂ and the exposure to both ATZ concentrations increased the NPSH levels in liver in comparison with control group. However, the diet supplemented with (PhSe)₂ did not change the rise at both concentrations of ATZ (Table 1). In gills, the NPSH levels of carps fed with supplemented diet and exposed to 10µg/L ATZ increased in comparison to control group (Table 1). In muscle, the NPSH levels decreased in carps exposed to 2 µg/L ATZ as compared to control group. The supplementation with (PhSe)₂ did not alter the NPSH levels in muscle of carps exposed to 2 µg/L ATZ (Table 1).

AsA levels, in liver, increased in carps exposed to 2 µg/L ATZ and decreased at 10µg/L ATZ. Nevertheless, (PhSe)₂ diet prevented the decline induced by 10µg/L ATZ in liver (Table 1). In gills and muscle of carps exposed to 10µg/L ATZ was observed an increase in AsA levels in comparison with control group. However, in muscle, the diet supplemented with (PhSe)₂ contributed to reach the control values, while in gills the AsA levels remained elevated (Table 1).

The exposure to atrazine in liver and gills of carps decreased GST activity at 10µg/L and did not change at 2 µg/L ATZ compared to control group (Fig. 2A and 2C). In liver, the GST activity was maintained in control values in fish exposed to 10

$\mu\text{g/L}$ and fed with $(\text{PhSe})_2$, while in gills $(\text{PhSe})_2$ supplemented diet did not prevent the decrease in GST activity of carps exposed to $10 \mu\text{g/L}$ ATZ (Fig. 2A). The GST activity increased in gills and muscle of carps fed with $(\text{PhSe})_2$ supplemented diet *per se*, in comparison to control group (Fig. 2C and 2E).

In comparison to control, GPx activity decreased at both ATZ concentrations in all tissues examined (Fig. 2B, 2D and 2F). However, the diet supplementation allowed the return to control values only in muscle, at $2 \mu\text{g/L}$ ATZ (Fig. 2F).

The CAT activity did not alter in liver of carps in the groups analyzed (Table 2). On the other hand, the SOD activity increased in liver of carps fed with $(\text{PhSe})_2$ supplemented diet *per se*, compared to control group (Table 2).

The atrazine measured in water was reduced as follow: control diet groups 23.35% at $2 \mu\text{g/L}$ and 22.73% at $10 \mu\text{g/L}$ ATZ. In $(\text{PhSe})_2$ diet groups, the loss percentage of atrazine in water were 19.16% at $2 \mu\text{g/L}$ ATZ and 13.75% at $10 \mu\text{g/L}$ ATZ exposure. In muscle, a higher atrazine accumulation was observed at $10 \mu\text{g/L}$ in comparison with $2 \mu\text{g/L}$ ATZ. However, the minimized BCF demonstrated more concentration of ATZ in carps fed with control diet and exposed to $2 \mu\text{g/L}$ ATZ than other groups (Table 3).

4 DISCUSSION:

Several studies dealing with water toxicology have used high concentrations of xenobiotic, which are unrealistic regarding environmental exposure. In the present study, were assessed biochemical alterations in carps induced by ATZ herbicide exposure at environmental relevant concentrations. In addition, we investigate the protective effect of $(\text{PhSe})_2$ supplemented diet in carps, to prevent oxidative damage atrazine-induced.

In this study was observed accumulation of ATZ in muscle for both concentrations tested. When increase the concentration of herbicide in water, increased the accumulation of ATZ in fish tissues, a result similar with related in the literature [7,34,35]. However, just accumulation data does not permit the comparison of fish capacity to eliminate xenobiotics, whereas they were exposed to two different concentrations of ATZ. When minimized bioconcentration factor was obtained, was found that concentration of $2 \mu\text{g/L}$ showed higher retention in muscle tissue than 10

$\mu\text{g/L}$ ATZ exposure. This is in agreement with observations reported for El-Amrani et al. [35], where zebrafish eleutheroembryos (*Danio rerio*) showed more BCF log indices in the lower concentration of ATZ. This herbicide is conjugated with one type of NPSH, glutathione (GSH), through enzyme activity of GST, becoming more solubility, which enables their excretion [36]. We found depletion in NPSH levels in muscle of carps exposed to $2 \mu\text{g/L}$ ATZ, indeed justified by the needed of the organism on remove xenobiotic. However, the GST activity in this tissue, at concentration of $2 \mu\text{g/L}$ ATZ, remains constant to the control group values. Residues of ATZ in tissue are hazardous to health of fish, allowing damages herbicide-induced, due to the exposure time increases, even when the stressor is no more accessible on the water [7,8].

The increase in NPSH levels in liver of carps exposed to ATZ was an protective response to fish against stress induced by herbicide exposure [37]. GSH is the copious NPSH in the cells, and the intracellular content is a ratio of use and synthesis. When the levels of GSH decrease besides higher demand of use by antioxidants enzymes, the synthesis is upregulated, consequently increasing the tissue levels [38]. The NPSH levels in liver of all groups fed with $(\text{PhSe})_2$ supplemented diet, and in gills of carps fed with supplemented diet and exposed to $10 \mu\text{g/L}$ ATZ also increased, as an antioxidant response induced by $(\text{PhSe})_2$. In muscle of carps exposed to $2 \mu\text{g/L}$ ATZ, in both diet groups, the NPSH levels decreased, as compensatory mechanism, explain above.

AsA is an antioxidant non-enzymatic, consumed by ascorbate peroxidase (APx) to scavenge H_2O_2 , needed the activity of enzymes dehydroascorbate reductase (DHAR) and monodehydroascorbate reductase (MDHAR) to recycle [39]. This work showed increase in AsA levels at $2 \mu\text{g/L}$ ATZ and decrease at $10 \mu\text{g/L}$ ATZ in liver; and was found an increase at $10 \mu\text{g/L}$ ATZ in gills and muscle. Is possible that changes in AsA leves was an adaptive response of ascorbate cycle to prevent the oxidative damage caused by ROS (reactive oxygen species) [40]. In liver and muscle, the diet supplementation with $(\text{PhSe})_2$ returned the alterations observed in AsA levels of carps exposed to $10 \mu\text{g/L}$ ATZ, to proving the antioxidant capacity of $(\text{PhSe})_2$, as reported in the literature [41].

We found that exposure to ATZ was able to cause oxidative damage from reactive species production in all tissues of carps, as observed by increase in TBARS levels and carbonyl content, indicators of lipid peroxidation and oxidation of proteins,

respectively [14,42]. The supplementation of diet with (PhSe)₂ promotes the return to control values of TBARS levels and carbonil content in liver and muscle. This is in agreement what reported to behavior of diet supplementation with (PhSe)₂ in fishes exposed to pesticides, that confirm the antioxidant role of this organoselenium compound [13,14,43].

ATZ exposure changed the antioxidant defense status in carps. The activity of GST and GPx was inhibited. In liver and gills both enzymes were affected, and in muscle only GPx activity decreased. The inhibition of enzymes activity is possible by directly action of xenobiotic and their metabolites in the structure of enzymes, promoting protein oxidation [8]. In the context of the present study is possible that lipid peroxides and protein oxidation could be linked to enzyme inhibition. Other possibility is by downregulation of gene expression, hypothesis asserted by Mela et al. [22]. The supplementation of diet with (PhSe)₂ promotes the increase in GST activity in gills and muscle *per se*, and return to control values of carps exposed to 10 µg/L ATZ in liver. In muscle of carps exposed to 2 µg/L ATZ, the (PhSe)₂ supplemented diet restored to control measurements of GPx activity. Supplementation of diet with (PhSe)₂ is recognized to improve the antioxidants enzymes, increasing the protection of organism against oxidative damage [13,14,21,44]. The GPx activity also increased by the higher presence of selenium, increasing the organism capacity to synthetize this selenoenzyme [45]. In additions, exposure of carps to both concentrations of ATZ did not change the activity of CAT and SOD. However, (PhSe)₂ diet supplementation increase *per se* the SOD activity, showing the antioxidant improvement of diet enrichment as reported in the literature [13,14]. The increase of SOD and CAT activity is a common response against herbicide toxicity when the organism exposed is able to control oxidative damage generated by toxicant. However, each fish group exhibited responses according to time exposure, experimental model or toxic concentration. In the present study only group exposed to selenium in diet improve SOD activity.

5 CONCLUSION:

The present study showed that exposure to ATZ, although in concentration permitted in water by Brazilian law (2µg/L ATZ), induce oxidative damage in carps after acute exposure. We found that (PhSe)₂ supplemented diet was able to prevent

the damage in liver and muscle of carps exposed to ATZ. Some antioxidant enzymes are improved to control oxidative damage. However, more investigations are needed to understand the protective mechanism of (PhSe)₂ supplemented diet to fish exposed to ATZ.

ACKNOWLEDGEMENTS:

The authors would thank the Universidade Federal de Santa Maria for support and the facilities; CNPq research fellowship; and Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) for the scholarship and the undergraduate student grant.

REFERENCES:

- [1] K.R. Solomon, J. a. Carr, L.H. Du Preez, J.P. Giesy, R.J. Kendall, E.E. Smith, et al., Effects of Atrazine on Fish, Amphibians, and Aquatic Reptiles: A Critical Review, *Crit. Rev. Toxicol.* 38 (2008) 721–772. doi:10.1080/10408440802116496.
- [2] U.S.E.P. Agency, Atrazine - Chemical Summary, 2007. doi:10.1111/dsu.12149.
- [3] V.L. Loro, C. Murussi, C. Menezes, J. Leitemperger, E. Severo, L. Guerra, et al., Spatial and temporal biomarkers responses of *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894)(Characiformes: Characidae) from the middle rio Uruguai, Brazil, *Neotrop. Ichthyol.* 13 (2015) 569–578. doi:10.1590/1982-0224-20140146.
- [4] C.E.D. Vieira, P.G. Costa, B. Lunardelli, L.F. de Oliveira, L. da Costa Cabrera, W.E. Risso, et al., Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil, *Sci. Total Environ.* 542, Part (2016) 44–56. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.071.
- [5] M. Graymore, F. Stagnitti, G. Allinson, Impacts of atrazine in aquatic ecosystems, *Environ. Int.* 26 (2001) 483–495. doi:10.1016/S0160-4120(01)00031-9.
- [6] J.A. Adeyemi, A. da Cunha Martins-Junior, F. Barbosa, Teratogenicity, genotoxicity and oxidative stress in zebrafish embryos (*Danio rerio*) co-exposed to arsenic and atrazine, *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 172-173 (2015) 7–12. doi:10.1016/j.cbpc.2015.04.001.

- [7] H. Xing, Z. Zhang, H. Yao, T. Liu, L. Wang, S. Xu, et al., Effects of atrazine and chlorpyrifos on cytochrome P450 in common carp liver, *Chemosphere*. 104 (2014) 244–250. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.01.002.
- [8] H. Xing, X. Wang, G. Sun, X. Gao, S. Xu, X. Wang, Effects of atrazine and chlorpyrifos on activity and transcription of glutathione S-transferase in common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33 (2012) 233–244. doi:10.1016/j.etap.2011.12.014.
- [9] Z.S. Lucie Chromcová, Jana Blahová, Lucie Píhalová, Dana Živná, Stanislava Štěpánová, Eva Prášková, Miroslav Prokeš, Lenka Zelníčková, Miša Škorič, The effects of atrazine exposure on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*), *Neuroendocrinol. Lett.* 34 (2013) 95 – 101.
- [10] K.Y. Wang, C.Z. Peng, J.L. Huang, Y.D. Huang, M.C. Jin, Y. Geng, The pathology of selenium deficiency in *Cyprinus carpio* L, *J. Fish Dis.* 36 (2013) 609–615. doi:10.1111/jfd.12030.
- [11] S. Ashouri, S. Keyvanshokoh, A.P. Salati, S.A. Johari, H. Pasha-Zanoosi, Effects of different levels of dietary selenium nanoparticles on growth performance, muscle composition, blood biochemical profiles and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio*), *Aquaculture*. 446 (2015) 25–29. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.04.021.
- [12] A.C. Elia, M. Prearo, N. Pacini, A.J.M. Dörr, M.C. Abete, Effects of selenium diets on growth, accumulation and antioxidant response in juvenile carp, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74 (2011) 166–173. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.04.006.
- [13] C.C. de Menezes, J. Leitemperger, A. Santi, T. Lópes, C. Aline Veiverberg, S. Peixoto, et al., The effects of diphenyl diselenide on oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to herbicide quinclorac (Facet®), *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 81 (2012) 91–97. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.04.022.
- [14] C. Menezes, J. Leitemperger, C. Toni, A. Santi, T. Lópes, N.B.V. Barbosa, et al., Comparative study on effects of dietary with diphenyl diselenide on oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*) and silver catfish (*Rhamdia* sp.) exposed to herbicide clomazone, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36 (2013) 706–714. doi:10.1016/j.etap.2013.07.002.
- [15] T.D.L. Fiuza, C.S. Oliveira, M. da Costa, V.A. Oliveira, G. Zeni, M.E. Pereira, Effectiveness of (PhSe)₂ in protect against the HgCl₂ toxicity, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 29 (2015) 255–262. doi:10.1016/j.jtemb.2014.05.008.
- [16] I.A. Adedara, C. V. Klimaczewski, N.B.V. Barbosa, E.O. Farombi, D.O. Souza, J.B.T. Rocha, Influence of diphenyl diselenide on chlorpyrifos-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 32 (2015) 52–59. doi:10.1016/j.jtemb.2015.05.003.

- [17] B. Clasen, J. Leitemperger, C. Murussi, A. Pretto, C. Menezes, F. Dalabona, et al., Carbofuran promotes biochemical changes in carp exposed to rice field and laboratory conditions, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 101 (2014) 77–82. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.12.012.
- [18] C. Menezes, J. Leitemperger, C. Murussi, C. Toni, M.D.C.S. Araújo, I.L. Farias, et al., Herbicide clomazone effects on δ -aminolevulinic acid activity and metabolic parameters in *Cyprinus carpio*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 92 (2014) 393–8. doi:10.1007/s00128-014-1229-2.
- [19] C.R. Murussi, M.D. Costa, J.W. Leitemperger, F. Flores-lopess, C.C. Menezes, L. Loebens, et al., Acute exposure to the biopesticide azadirachtin affects parameters in the gills of common carp (*Cyprinus carpio*), *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 180 (2015) 49–55. doi:10.1016/j.cbpc.2015.12.003.
- [20] L.-S. Wang, L. Wang, L. Wang, G. Wang, Z.-H. Li, J.-J. Wang, Effect of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate on the wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings., *Environ. Toxicol.* 24 (2009) 296–303. doi:10.1002/tox.
- [21] C. Menezes, J. Leitemperger, A. Santi, G. Dias, F.A. Pedron, J.R. Neto, et al., Evaluation of the effects induced by dietary diphenyl diselenide on common carp *Cyprinus carpio*, *Fish Physiol. Biochem.* 40 (2014) 141–149. doi:10.1007/s10695-013-9831-5.
- [22] M. Mela, I.C. Guiloski, H.B. Doria, M.A.F. Randi, C.A. de Oliveira Ribeiro, L. Pereira, et al., Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*)., *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 93 (2013) 13–21. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.03.026.
- [23] G.P. Sabin, O.D. Prestes, M.B. Adaime, R. Zanella, Multiresidue Determination of Pesticides in Drinking Water by Gas Chromatography-Mass Spectrometry after Solid-Phase Extraction, *J. Brazilian Chem. Society.* 20 (2009) 918–925. doi:10.1590/S0103-50532009000500017.
- [24] M.A. da Cunha, C.C. Zeppenfeld, L. de O. Garcia, V.L. Loro, M.B. da Fonseca, T. Emanuelli, et al., Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet, *Ciência Rural.* 40 (2010).
- [25] J.A. Buege, S.D. Aust, [30] Microsomal lipid peroxidation, in: *Methods Enzymol.*, 1978: pp. 302–310. doi:10.1016/S0076-6879(78)52032-6.
- [26] L.J. Yan, M.G. Traber, L. Packer, Spectrophotometric Method for Determination of Carbonyls in Oxidatively Modified Apolipoprotein B of Human Low-Density Lipoproteins, *Anal. Biochem.* 228 (1995) 349–351. doi:10.1006/abio.1995.1362.
- [27] W.B. Habig, William H.; Pabst, Michael J.; Jakoby, Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 7130–7139.

- [28] D.E. Paglia, W.N. Valentine, Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *J. Lab. Clin. Med.* 70 (1967) 158–169. [http://www.translationalres.com/article/0022-2143\(67\)90076-5/abstract](http://www.translationalres.com/article/0022-2143(67)90076-5/abstract).
- [29] D.P. Nelson, L.A. Kiesow, Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV), *Anal. Biochem.* (1972) 474 – 478.
- [30] P. Misra, Hara, I. Fridovich, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 3170–3175. doi:4623845.
- [31] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [32] J.S. Munaretto, G. Ferronato, L.C. Ribeiro, M.L. Martins, M.B. Adaime, R. Zanella, Development of a multiresidue method for the determination of endocrine disruptors in fish fillet using gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry, *Talanta*. 116 (2013) 827–834. doi:10.1016/j.talanta.2013.07.047.
- [33] Oecd, Test No 305: Bioaccumulation in Fish : Aqueous and Dietary Exposure, OECD Guidel. Test. Chem. Section 3, (2012). doi:10.1787/2074577x.
- [34] H. Xing, Z. Wang, H. Wu, X. Zhao, T. Liu, S. Li, et al., Assessment of pesticide residues and gene expression in common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos: Health risk assessments, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113 (2015) 491–498. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.12.040.
- [35] S. El-Amrani, M. Pena-Abaurrea, J. Sanz-Landaluze, L. Ramos, J. Guinea, C. Cámara, Bioconcentration of pesticides in Zebrafish eleutheroembryos (*Danio rerio*), *Sci. Total Environ.* 425 (2012) 184–190. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.02.065.
- [36] C. Wiegand, E. Krause, C. Steinberg, S. Pflugmacher, Toxicokinetics of Atrazine in Embryos of the Zebrafish (*Danio rerio*), *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49 (2001) 199–205. doi:10.1006/eesa.2001.2073.
- [37] A.-L. Oropesa, J.P. García-Camero, F. Soler, Glutathione and malondialdehyde levels in common carp after exposure to simazine, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 27 (2009) 30–38. doi:10.1016/j.etap.2008.08.003.
- [38] D.A. Dickinson, H.J. Forman, Cellular Glutathione and Thiols Metabolism, *Biochem. Pharmacol.* 64 (2002) 1019–1026.
- [39] A.K. Sinha, H. AbdElgawad, T. Giblen, G. Zinta, M. De Rop, H. Asard, et al., Anti-oxidative defences are modulated differentially in three freshwater teleosts

- in response to ammonia-induced oxidative stress, PLoS One. 9 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0095319.
- [40] A.K. Sinha, G. Zinta, H. AbdElgawad, H. Asard, R. Blust, G. De Boeck, High environmental ammonia elicits differential oxidative stress and antioxidant responses in five different organs of a model estuarine teleost (*Dicentrarchus labrax*)., *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 174-175 (2015) 21–31. doi:10.1016/j.cbpc.2015.06.002.
- [41] C.W. Nogueira, G. Zeni, J.B.T. Rocha, Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology, *Chem. Rev.* 104 (2004) 6255–6285. doi:10.1021/cr0406559.
- [42] A.C. Adesiyan, T.O. Oyejola, S.O. Abarikwu, M.O. Oyeyemi, E.O. Farombi, Selenium provides protection to the liver but not the reproductive organs in an atrazine-model of experimental toxicity., *Exp. Toxicol. Pathol.* 63 (2011) 201–7. doi:10.1016/j.etp.2009.11.008.
- [43] C.W. Nogueira, J.B.T. da Rocha, Diphenyl Diselenide a Janus-Faced Molecule, *J. Brazillian Chem. Soc.* 21 (2010) 2055–2071. doi:10.1590/S0103-50532010001100006.
- [44] C. Menezes, A. Marins, C. Murussi, A. Pretto, J. Leitemperger, V.L. Loro, Effects of diphenyl diselenide on growth, oxidative damage, and antioxidant response in silver catfish, *Sci. Total Environ.* 542 (2016) 231–237. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.10.110.
- [45] C.W. Nogueira, J.B.T. Rocha, Toxicology and pharmacology of selenium: Emphasis on synthetic organoselenium compounds, *Arch. Toxicol.* 85 (2011) 1313–1359. doi:10.1007/s00204-011-0720-3.

TABLES

Table 1. NPSH and AsA levels in liver, gills and muscle of carps fed with diet supplemented with (PhSe)₂, exposed to atrazine.

	Control	2µg/L	10µg/L	(PhSe) ₂	2µg/L + (PhSe) ₂	10µg/L + (PhSe) ₂
NPSH						
Liver	0.48 ± 0.03 ^a	0.74 ± 0.03 ^{bc}	0.73 ± 0.01 ^{bc}	0.80 ± 0.04 ^c	0.70 ± 0.04 ^{bc}	0.63 ± 0.01 ^b
Gills	0.25 ± 0.01 ^a	0.26 ± 0.00 ^a	0.26 ± 0.00 ^a	0.25 ± 0.01 ^a	0.25 ± 0.02 ^a	0.39 ± 0.01 ^b
Muscle	0.22 ± 0.00 ^b	0.20 ± 0.00 ^a	0.22 ± 0.00 ^b	0.22 ± 0.00 ^b	0.20 ± 0.01 ^a	0.22 ± 0.00 ^b
AsA						
Liver	3.27 ± 0.08 ^b	3.64 ± 0.09 ^c	2.86 ± 0.05 ^a	3.25 ± 0.02 ^b	4.36 ± 0.06 ^d	3.47 ± 0.14 ^{bc}
Gills	2.95 ± 0.12 ^a	3.12 ± 0.09 ^a	3.99 ± 0.01 ^c	2.97 ± 0.04 ^a	2.91 ± 0.07 ^a	3.38 ± 0.07 ^b
Muscle	1.82 ± 0.15 ^a	1.73 ± 0.08 ^a	3.91 ± 0.46 ^b	2.02 ± 0.29 ^a	1.16 ± 0.14 ^a	1.85 ± 0.13 ^a

NPSH levels was expressed as µmol NPSH/g tissue, and AsA levels was expressed as µg ascorbic acid/g tissue. Data are reported as mean ± S.E.M (n = 6). Different letters indicate differences between groups ($p < 0.05$).

Table 2. CAT and SOD activities in liver of carps fed with diet supplemented with (PhSe)₂, exposed to atrazine.

	Control	2µg/L	10µg/L	(PhSe) ₂	2µg/L + (PhSe) ₂	10µg/L + (PhSe) ₂
CAT	1.50 ± 0.07 ^a	1.65 ± 0.11 ^a	1.89 ± 0.06 ^a	1.72 ± 0.15 ^a	1.94 ± 0.15 ^a	1.78 ± 0.18 ^a
SOD	5.20 ± 0.38 ^a	5.36 ± 0.34 ^a	5.44 ± 0.24 ^a	7.65 ± 0.39 ^b	4.69 ± 0.38 ^a	4.63 ± 0.22 ^a

CAT activity was expressed as µmol/min/mg protein, and SOD activity was expressed as U/mg protein. Data are reported as mean ± S.E.M (n = 6). Different letters indicate differences between groups ($p < 0.05$).

Table 3. Accumulation and minimized BCF of atrazine in muscle of carps fed with diet supplemented with (PhSe)₂.

	Nominal concentration of ATZ (µg/L)	Accumulation (mg/kg)	BCF
Control	0	0.000 ^a	0.000 ^a
2µg/L	2	0.008 ± 0.0005 ^b	6.156 ± 0.4085 ^c
10µg/L	10	0.037 ± 0.0015 ^c	5.035 ± 0.0566 ^b
(PhSe) ₂	0	0.000 ^a	0.000 ^a
2µg/L + (PhSe) ₂	2	0.007 ± 0.0007 ^b	5.170 ± 0.5134 ^b
10µg/L + (PhSe) ₂	10	0.035 ± 0.0020 ^c	4.277 ± 0.2429 ^b

Data are reported as mean ± S.E.M (n = 6). Different letters indicate differences between groups ($p < 0.05$).

FIGURES

Figure 1. TBARS levels in liver (A), gills (C) and muscle (E), and protein carbonyl in liver (B), gills (D) and muscle (F) of carps fed with diet supplemented with $(\text{PhSe})_2$, exposed to atrazine. Data are reported as mean \pm S.E.M. ($n = 6$). Different letters indicate differences between groups ($p < 0.05$).

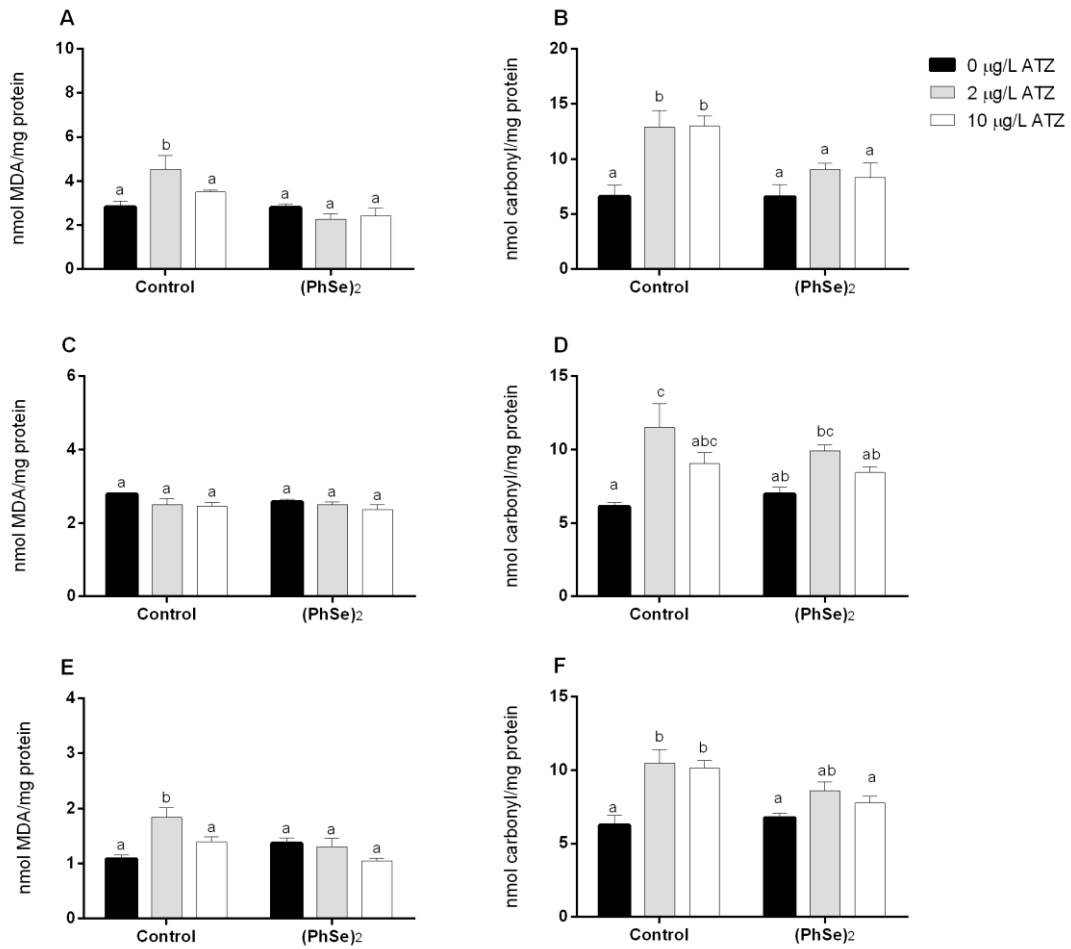
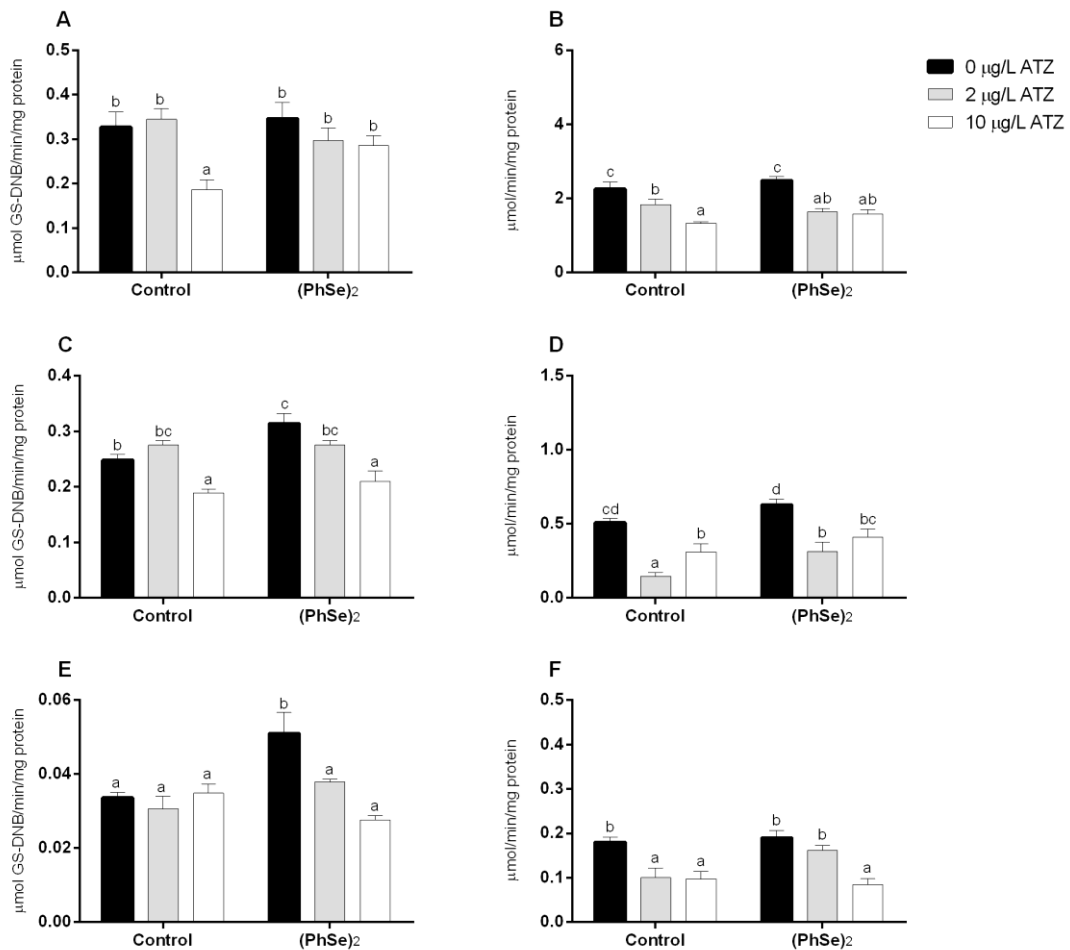


Figure 2. GST activity in liver (A), gills (C) and muscle (E), and GPx activity in liver (B), gills (D) and muscle (F) of carps fed with diet supplemented with $(\text{PhSe})_2$, exposed to atrazine. Data are reported as mean \pm S.E.M. ($n = 6$). Different letters indicate differences between groups ($p < 0.05$).



3 CONCLUSÃO

No presente estudo evidenciou-se que:

- A concentração de ATZ permitida pela legislação para águas de classe II (2 µg/L) não é inócua para a fauna aquática, visto que em experimento de exposição aguda foi capaz de causar alterações bioquímicas em carpas. Porém, posteriores estudos são necessários para compreender-se a ação da ATZ na biota aquática, utilizando-se espécies de diversos táxons. Desta forma aumentar-se-ia a confiabilidade deste resultado.
- Verificou-se dano oxidativo em fígado, brânquias e músculo de carpas utilizados neste estudo. No entanto, a suplementação da dieta com (PhSe)₂ foi capaz de prevenir os danos causados em fígado e músculo.
- Ensaios acurados de atividade enzimática são necessários para compreender-se a ação inibitória da ATZ e de ativação enzimática causada pelo (PhSe)₂. Neste sentido, a medida de outras enzimas são importantes, como CYP, APx, entre outras, elucidaria ainda mais os resultados obtidos.
- O coeficiente de bioconcentração (BCF), que relaciona a concentração do herbicida na água ao final do experimento com a concentração acumulada no músculo, mostrou que na concentração de 2µg/L ATZ teve maior retenção do herbicida.
- Embora tenha ocorrido acúmulo de ATZ em músculo das carpas, mais estudos são necessários para verificar o risco de biomagnificação deste herbicida.

REFERÊNCIAS

- ADEDARA, I. A. et al. (2015) Influence of diphenyl diselenide on chlorpyrifos-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 32: 52-59.
- ADESIYAN, A. C. et al. (2011) Selenium provides protection to the liver but not the reproductive organs in an atrazine-model of experimental toxicity. *Experimental and Toxicology Pathology*. 63: 201-207.
- ALEXANDER, J. (2015) Chapter 52 – Selenium. In: NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A.; NORDBERG, M. *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, 4. ed., cap. 52, p. 1175-1208.
- AMIARD-TRIQUET, C.; BERTHET, B. (2015) Individual biomarkers. In: AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J.C. & MOUNEYRAC, C. *Aquatic ecotoxicology. Advancing tools for dealing with emerging risks*. Elsevier, cap. 7, p. 153-182.
- ASHOURI, S. et al. (2015) Effects of different levels of dietary selenium nanoparticles on growth performance, muscle composition, blood biochemical profiles and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*. 446: 25-29.
- BALON, E. K. (1995) Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: from Roman gourmets to the swimming flowers. *Aquaculture*, 129: 3-48.
- BEASLEY, V. R.; LEVENGOOD, J. M. (2012) Principles of ecotoxicology. In: GUPTA, R. C. *Veterinary Toxicology*. Elsevier. Cap. 66, pag.831-855.
- BJERREGAARD, P. et al. (2011) Dietary selenium reduces retention of methyl mercury in freshwater fish. *Environmental Science & Technology*. 45: 9793-9798.
- CLASEN, B. et al. (2012). Effects of the commercial formulation containing fipronil on the non-target organism *Cyprinus carpio*: Implications for rice-fish cultivation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 77: 45-51.
- CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (Brasil). Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. *Diário Oficial da União*, n. 053, 18 mar. 2005, p. 58-63.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). Disponível em <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cyprinus_carpio/en>, acessado em: 25/01/16.
- ELIA, A. C. et al. (2011) Effects of selenium diets on growth, accumulation and antioxidant response in juvenile carp. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74: 166-173.

FIUZA, T. L. et al. (2015) Effectiveness of (PhSe)₂ in protect against the HgCl₂ toxicity. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 29: 255-262.

FREYHOF, J.; KOTTELAT, M. 2008. *Cyprinus carpio*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T6181A12559362. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T6181A12559362.en>>, acesso em: 25/01/16.

GRAYMORE, M.; STAGNITTI, F.; ALLISON, G. (2001) Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environment International*. 26: 483-495.

IBRAHIM, M. et al. (2015) *In vitro* evaluation of glutathione peroxidase (GPx)-like activity and antioxidant properties of an organoselenium compound. *Toxicology in Vitro*. 29: 947-952.

LÓPEZ-DOVAL, J. C.; BARATA, C.; DÍEZ, S. (2015) El uso de organismos como indicadores de la contaminación y evaluación del riesgo sobre el ecosistema acuático en el embalse de Flix (Cataluña, NE de España). In: POMPÊO, M. et al. *Ecologia de reservatórios e interfaces*. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2015, cap. 1, p.1-32.

LORO, V. L. et al. (2015) Spatial and temporal biomarkers responses of *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894)(Characiformes: Characidae) from the middle rio Uruguai, Brazil. *Neotropical Ichthyology* 13, 569–578.

MELA, M. et al. (2013) Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 93: 13-21.

MENEZES, C. C. et al. (2012) The effects of diphenyl diselenide on oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to herbicide quinclorac (Facet[®]). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 81: 91-97.

MENEZES, C. et al. (2013) Comparative study on effects of dietary with diphenyl diselenide on oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*) and silver catfish (*Rhamdia* sp.) exposed to herbicide clomazone. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 36: 706-714.

MENEZES, C. et al. (2014) Evaluation of the effects induced by dietary diphenyl diselenide on common carp *Cyprinus carpio*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 40: 141-149.

MENEZES, C. et al. (2016) Effects of diphenyl diselenide on growth, oxidative damage, and antioxidant response in silver catfish. *Science of the Total Environment*. 542: 231-237.

MURUSSI, C. R. et al. (2016) Acute exposure to the biopesticide azadirachtin affects parameters in the gills of common carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 180: 49-55.

NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. (2010) Diphenyl Diselenide a Janus-Faced Molecule. *Journal of the Brazillian Chemical Society*. 21: 2055-2071.

NOGUEIRA, C.; ROCHA, J. (2011) Toxicology and pharmacology of selenium: Emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Archives of Toxicology*. 85: 1313-1359.

OROPESA, A.; GARCÍA-CAMBERO, J. P.; SOLER, F. (2009) Glutathione and malondialdehyde levels in common carp after exposure to simazine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 27: 30-38.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. (2015) The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 97: 55-74.

SANTOS, T. G.; MARTINEZ, C. B. R. (2012) Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. *Chemosphere*. 89: 1118-1125.

SOLOMON, K. R. et al. (2008) Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: A critical review. *Critical Reviews in Toxicology*, 38: 721-772.

SOLOMON, K. R.; et al. (2014) Effects of herbicides on Fish. In: TIERNEY, K. B.; FARREL, A. P.; BRAUNER, C. J. *Organic chemical toxicology of fishes*. Elsevier. Cap. 7, p.370-403.

VIEIRA, C. E. D. et al. (2016) Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Science of Total Environment*. 542, Part , 44–56.

WANG, K. Y. et al. (2013) The pathology of selenium deficiency in *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases*. 36: 609-615.

XING, H. et al. (2012) Effects of atrazine and chlorpyrifos on activity and transcription of glutathione S-transferase in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 33:233-244.

XING, H. et al. (2014) Effects of atrazine and chlorpyrifos on cytochrome *P450* in common carp liver. *Chemosphere*. 104: 244-250.

ZAMBRANO, L. et al. (2006) Invasive potential of common carp (*Cyprinus carpio*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in American freshwater systems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 63: 1903-1910.