

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

FRANCIELLY RIOS MENEZES

**TOXICIDADE AGUDA E SUBCRÔNICA DE EXTRATOS DE *Pinus sp.* EM
ZEBRAFISH**

Uruguiana

2023

FRANCIELLY RIOS MENEZES

**TOXICIDADE AGUDA E SUBCRÔNICA DE EXTRATOS DE *Pinus sp.* EM
ZEBRAFISH**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Tecnologia em Aquicultura da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Tecnólogo em Aquicultura.

Orientador: Cátia Aline Veiverberg

Uruguiana

2023

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

M541t Menezes, Francielly Rios
TOXICIDADE AGUDA E SUBCRÔNICA DE EXTRATOS DE Pinus sp. EM ZEBRAFISH / Francielly Rios Menezes.

51 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade Federal do Pampa, ENGENHARIA DE AQUICULTURA, 2023.

"Orientação: Cátia Aline Veiverberg".

1. fitoterápicos. 2. estresse oxidativo. 3. Danio rerio. 4. extrato aquoso. 5. exposição crônica. I. Título.

FRANCIELLY RIOS MENEZES

**TOXICIDADE AGUDA E SUBCRÔNICA DE EXTRATOS DE *PINUS SP.* EM
ZEBRAFISH**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Tecnologia em Aquicultura da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Tecnólogo em Aquicultura.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 14 de dezembro de 2023.

Banca examinadora:

Prof. Dra. Cátia Aline Veiverberg
Orientador
(UNIPAMPA)

Prof. Dra. Alessandra S.K. Tamajusuku Neis
(UNIPAMPA)

Prof. Dr. Carlos Frederico Ceccon Lanes
(UNIPAMPA)

Dedico este trabalho a todos que estiveram ao meu lado durante a minha trajetória e que sempre me apoiaram mesmo nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente aos meus guias por estarem sempre presentes durante a minha trajetória ao longo da graduação, protegendo e abrindo os meus caminhos. Axé!

À minha família: minha mãe: Rosa, meu padrasto: Luciano e meu pai: Aurélio (*in memoriam*), por sempre acreditarem no meu potencial e me incentivarem a buscar conhecimento e correr atrás dos meus sonhos. Graças a esse incentivo, tive a oportunidade de ingressar na graduação e ter uma boa formação profissional. Também a minha tia Celene, por sempre ter me dado suporte nos momentos difíceis e por ter me incentivado a concluir minha graduação.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Cátia Aline Veiverberg por ter aceitado me orientar. Muito obrigada pelos ensinamentos, paciência e auxílio durante este trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Viviani Correia pela gentileza, ensinamentos e suporte durante a escrita do trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Cristiane Denardin e à equipe do Laboratório de Bioquímica e Toxicologia de Compostos Bioativos (GBToxBio), pela disponibilização dos equipamentos e pelo auxílio nas análises de estresse oxidativo.

Ao amigo Luiz Felipe pela disponibilidade, suporte e paciência pelas incontáveis horas que dedicamos no laboratório para as realizar análises. Também aos demais amigos e colegas: Emilly, Maria Eduarda, Gabriela, Mikaela, Priscila, Sérgio e Evander pelo companheirismo e parceria, ajudando a tornar os momentos difíceis mais leves.

Ao Felipe Fonseca por ter me apoiado e incentivado a continuar nos momentos em que eu queria desistir, estando sempre disposto a me ouvir e encorajar a vencer meus obstáculos, apesar das nossas diferenças.

Ao meu gato de estimação Solano, por tornar os momentos de estudo e escrita mais leves e divertidos com sua companhia e suas travessuras.

Por fim, a todos os colegas e professores que estiveram presentes diretamente ou indiretamente na execução deste trabalho, muito obrigada.

RESUMO

A presença de parasitoses nos sistemas de cultivo é um obstáculo para a ampliação da cadeia produtiva na aquicultura, causando prejuízos e apresentando dificuldades no tratamento, devido à ausência de produtos comprovadamente eficientes. Dentre essas parasitoses, a mais comumente encontrada é a *Lernaea cyprinacea*. Como possível alternativa é apresentado o uso de produtos de origem natural, como os extratos vegetais. Entre eles, o uso de extratos de *Pinus* sp. foi avaliado *in vitro* pelo seu potencial antiparasitário, antioxidante e anti-inflamatório, apresentando resultados promissores. Entretanto, ainda é necessário analisar seu potencial toxicológico em peixes. Logo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do extrato aquoso de acícula de *Pinus* sp. em zebrafish (*Danio rerio*). Inicialmente, 120 exemplares de zebrafish foram expostos às concentrações de 0 (controle), 50 mg/L e 100 mg/L de extrato aquoso de *Pinus* sp. (4 repetições por tratamento; 10 peixes por unidade experimental) durante 96 horas. Após, foi realizado o experimento de exposição prolongada, com duração de 28 dias e exposição a concentrações de 0 (controle), 1, 3,2, 10, 32 e 100 mg/L de extrato aquoso, utilizando 240 peixes (4 repetições por tratamento; 10 peixes por unidade experimental). Em ambos os ensaios foi observada a mortalidade, ocorrência de anomalias físicas e comportamentais. Ao final do experimento de exposição prolongada, os peixes foram eutanasiados para coleta de amostras de fígado, músculo, brânquias e peixe inteiro para quantificação da atividade do superóxido dismutase (SOD), atividade da Catalase (CAT), concentração de proteína carbonil (PC) e TBARS. Durante ambos os experimentos, não ocorreu mortalidade e não foram observadas anomalias externas ou comportamentais. No ensaio de exposição prolongada, foi observada peroxidação lipídica dose dependente no fígado e nas brânquias, além de inibição dose dependente das enzimas SOD e CAT, indicando que o extrato de *Pinus* pode causar dano celular quando utilizado em doses a partir de 3,2 mg/L.

Palavras-Chave: fitoterápicos, estresse oxidativo, *Danio rerio*, extrato aquoso, exposição crônica

ABSTRACT

The presence of parasites in aquaculture systems is an obstacle to expanding the aquaculture production chain, causing losses and resulting in difficulties in treatment, due to the lack of proven efficient products. Among these parasites, the most commonly found is *Lernea* (*Lernaea cyprinacea*). As a possible alternative, the use of products of natural origin, such as plant extracts, is presented. Among them, the use of extracts from *Pinus* sp. was evaluated *in vitro* for its antiparasitic, antioxidant and anti-inflammatory potential, showing promising results. However, it is still necessary to quantify the toxicological effects in fish. Therefore, the objective of this work was to evaluate the toxicity of the aqueous extract of *Pinus* sp. in zebrafish (*Danio rerio*). Initially, 120 zebrafish specimens were exposed to concentrations of 0 (control), 50 mg/L and 100 mg/L of aqueous extract of *Pinus* sp. (4 replications per treatment; 10 fish per experimental unit) for 96 hours. Afterwards, a prolonged exposure experiment was carried out, lasting 28 days with exposure to concentrations of 0 (control), 1.0, 3.2, 10, 32 and 100 mg/L of aqueous extract, using 240 fish (4 repetitions per treatment; 10 fish per experimental unit). In both trials, mortality and the occurrence of physical and behavioral anomalies were observed. At the end of the prolonged exposure experiment, the fish were euthanized to collect samples of liver, muscle, gills and whole fish to quantify superoxide dismutase (SOD) activity, catalase (CAT) activity, protein carbonyl (PC) concentration and TBARS. During both experiments, no mortality occurred and no external or behavioral anomalies were observed. In the prolonged exposure test, dose-dependent lipid peroxidation was observed in the liver and gills, in addition to dose-dependent inhibition of SOD and CAT enzymes, indicating that the aqueous extract of *Pinus* sp. can cause cellular damage when used in doses above 3.2 mg/L.

Keywords: herbal medicines, oxidative stress, *Danio rerio*, aqueous extract, chronic exposure

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de <i>Danio rerio</i>	14
Figura 2. Foto de um exemplar de <i>Pinus</i> sp.....	15
Figura 3. Ilustração das Acículas de <i>Pinus</i> sp.....	16
Figura 4. Foto da extração aquosa de acículas de <i>Pinus</i> sp.....	23
Figura 5. Sistema utilizado durante o experimento	24
Figura 6. Atividade de catalase nos tecidos de zebrafish expostos a concentrações do extrato aquoso de acículas verdes de <i>Pinus</i> sp.	34
Figura 7. Atividade de superóxido dismutase nos tecidos de zebrafish expostos a concentrações do extrato aquoso de acículas verdes de <i>Pinus</i> sp.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de biomassa e tamanho durante o tratamento piloto de zebrafish ao extrato de acículas verdes de <i>Pinus</i> sp.....	28
Tabela 2. Parâmetros de qualidade de água durante o experimento piloto de exposição de zebrafish ao extrato de acículas verdes de <i>Pinus</i> sp.	30
Tabela 3. Peso (g) dos zebrafish durante a exposição prolongada ao extrato aquoso de acículas verdes de <i>Pinus</i> sp.....	31
Tabela 4. Parâmetros de qualidade de água durante o experimento de exposição prolongada dos zebrafish ao extrato de acículas verdes de <i>Pinus</i> sp.....	33
Tabela 5. Valores de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em brânquias, fígado e músculo de zebrafish em exposição prolongada ao extrato aquoso de acículas verdes de <i>Pinus</i> sp.....	38
Tabela 6. Valores de proteínas carboniladas de peixes inteiros submetidos a exposição prolongada ao extrato aquoso de acículas verdes de <i>Pinus</i> sp.	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.2 <i>Danio rerio</i> (Zebrafish)	13
2.3 <i>Pinus</i> sp.	15
2.4 Avaliação da Toxicidade em Peixes	17
2.5 Avaliação do Estresse Oxidativo	18
3 OBJETIVO	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4 METODOLOGIA	22
4.1 Preparo dos Extratos	22
4.2 Animais e Instalações Experimentais	23
4.3 Experimento Piloto	25
4.4 Experimento Crônico	26
4.5 Análises de Estresse Oxidativo	26
4.6 Análises Estatísticas	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Experimento Piloto	28
5.2 Experimento Crônico	31
5.2.1 Análises de Estresse Oxidativo	34
5.2.1.1 TBARS	37
5.2.1.2 Proteínas Carboniladas	39
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a aquicultura tem se expandido de forma significativa devido ao desenvolvimento de novas tecnologias, aumento da produção e aumento do consumo de pescado. Em 2021, a piscicultura brasileira teve um aumento da produção de 4,7%, alcançando 841.005 toneladas, sendo a tilápia (*Oreochromis niloticus*) líder do mercado de cultivo, representando 63,5% da produção no país (PEIXE BR, 2022).

Embora o momento seja favorável, a aquicultura ainda enfrenta obstáculos, sendo a ocorrência de patógenos um dos principais problemas que circundam a produção. Estes organismos se manifestam quando não há manejo produtivo, alimentar e sanitário eficientes, vindo a causar danos e prejuízos na produção (TAVECHIO et al., 2009; MACIEL et al., 2014)

Um dos principais tipos de patógenos são as parasitoses, que se alojam nos animais causando ferimentos que, posteriormente, servirão de porta de entrada a outros organismos patogênicos, como vírus, bactérias e fungos, diminuindo o potencial produtivo dos animais e podendo levá-los à morte. A *Lernaea cyprinacea* é considerada a mais comum das parasitoses e a mais conhecida na região Sul do Brasil, fixando-se nas brânquias, superfície corporal, nadadeiras, boca, olhos e órgãos internos (CARRIEL, 2014).

O tratamento de *Lernaea* torna-se um grande desafio devido aos tratamentos comumente utilizados serem quimioterápicos, geralmente apresentando eficiência relativa, não possuindo comprovação de eficácia, além de serem potencialmente prejudiciais ao meio ambiente e à saúde do consumidor (BOEGER, 1999). Como alternativa, tem sido estudado, ao longo dos anos, a utilização de fitoterápicos para o seu tratamento, destacando-se a utilização de extrato de *Pinus sp.* pelo seu potencial antiparasitário, antioxidante e anti-inflamatório (LEANDRO et al., 2014; FURTADO et al., 2021).

Embora os resultados sejam otimistas em análises realizadas *in vitro*, ainda é preciso advir de uma análise mais profunda para determinar se os extratos de *Pinus sp.* possuem efeito prejudicial e/ou letal aos peixes.

No presente trabalho foi escolhida a espécie *Danio rerio* como organismo modelo, já que o mesmo é muito utilizado para análises de toxicologia, genética e biomédicas (MEYERS, 2018; RIBEIRO et al., 2022). Isso ocorre por se tratar de um

organismo de baixo custo, manutenção fácil, crescimento acelerado e, principalmente, genoma sequenciado. Desta forma, o conhecimento de seu genoma permite maior aprofundamento e precisão sobre os efeitos tóxicos e deletérios de uma determinada substância ou extrato, permitindo que os resultados obtidos nos estudos com essa espécie ornamental possam ter utilidade para espécies de corte, tendo maior abrangência (MEYERS, 2018; RIBEIRO et al., 2022).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.2 *Danio rerio* (Zebrafish)

O Zebrafish (*Danio rerio*) é um pequeno peixe tropical de água doce nativo da região sul da Ásia, como Nepal, Índia, Paquistão e Bangladesh, onde há a ocorrência de períodos distintos de chuva e seca ao longo do ano. Essas variações sazonais resultam em alterações na qualidade de água, disponibilidade de alimento e tipos de habitats, concedendo ao zebrafish maior tolerância às variações ambientais. Seu hábito alimentar inclui insetos, zooplâncton, algas, detritos e demais materiais orgânicos (MARTINS et al., 2020). Essa espécie passa pelos estágios de larva, juvenil e adulto, apresentando tamanho médio inicial de 2 a 3 cm, podendo alcançar de 4 a 5 cm ao longo de sua vida. Possui hábito diurno, apresentando maior atividade principalmente nas primeiras horas da manhã. Também há uma tendência em formar cardumes de sexos misturados de 5 a 20 indivíduos (DAMMSKI et al., 2011).

A espécie é popularmente conhecida no Brasil como peixe-zebra ou paulistinha, caracterizando-se pelo seu corpo esguio e alongado, com cabeça curta, boca inclinada e voltada para cima, narina protuberante e pela presença de um padrão de listras pretas e brancas ao longo do corpo e das nadadeiras anal e caudal (Figura 1), sendo comumente utilizada nas atividades de aquarismo pela sua aparência e seu baixo custo (DAMMSKI et al., 2011; SANTOS, 2022).

Figura 1. Exemplar de *Danio rerio*



Fonte: MARTINS et al. (2020). Acesso em: 1 jun. 2022.

Além de ser uma espécie com expressiva participação no mercado de peixes ornamentais, o zebrafish também é utilizado como organismo modelo em diversas áreas de investigação como na genética, ecotoxicologia, toxicologia, biologia do desenvolvimento, teratologia, biomedicina, etologia e carcinogênese, por apresentar semelhança genética com o ser humano (70% dos genes), possuir genoma sequenciado, rápido desenvolvimento embrionário, fácil manutenção, peixe adulto com tamanho reduzido e fácil reprodução (SANTOS et al., 2020 ; RIBEIRO et al., 2022).

Apesar disso, a espécie também pode apresentar problemas com patógenos, entre eles: *Pseudoloma neurophilia* e *Pseudocapillaria tomentosa*, causando malefícios e afetando seu desempenho no setor aquarista (KENT et al., 2020). Além de que esses parasitos também podem interferir negativamente em experimentos científicos utilizando a espécie, como o observado por Spagnoli et al. (2016), em que a infecção por *Pseudoloma neurophilia* pode ter influenciado nos resultados de experimentos comportamentais utilizando a espécie, uma vez que, por ser um parasita neural, o mesmo acarreta em mudanças comportamentais e nas formações de cardume.

Devido a sua importância e grande utilização, foram elaborados diretrizes e protocolos pela Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) e

pela Organização Internacional de Padronização (ISO) para a realização de testes de avaliação de toxicidade aguda dos compostos químicos, toxicidade aguda de águas residuais em ovos de peixe-zebra, toxicidade de nanomateriais em embriões de peixe-zebra, entre outros (RIBEIRO et al., 2022).

2.3 *Pinus* sp.

O *Pinus* sp. (Figura 2), é uma árvore exótica e de rápido crescimento, que foi introduzida no Brasil para a utilização na produção de celulose para a geração de energia e para o fornecimento de madeira na indústria de papel (BALLONI, 2009; VIEIRA et al. 2014). O gênero *Pinus* apresenta variações de suas características vegetais importantes, mas ainda sim com características em comum, como: acículas em formato de agulha, agrupadas em fascículos, tronco reto e cilíndrico e raízes bem ramificadas possibilitando maior penetração no solo (FARJON, 2017) (Figura 3).

Esta espécie tem apresentado destaque pela sua capacidade de combater bactérias que afetam os humanos e que já possuem resistência a antibióticos, em função da sua composição diversa, abrangendo principalmente terpenóides, terpenos, constituintes alifáticos e compostos aromáticos, incluindo compostos com atividades antiparasitárias, antioxidantes, anti-inflamatórias, antitumorais e antimutagênicas (LEANDRO et al., 2014).

Figura 2. Foto de um exemplar de *Pinus* sp.



Fonte: <<https://www.sitiodamata.com.br/especies->

de-plantas/pinus-pinus-spp.html>. Acesso em: 10 jun. 2022.

Figura 3. Ilustração das Acículas de *Pinus* sp.



Fonte:

<https://www.flickr.com/photos/vintage_illustration/47225716791>. Acesso em: 10 jun. 2022.

De acordo com relatos empíricos, o uso do extrato aquoso de *Pinus* no tratamento da lerneia tem se mostrado eficaz nos casos de lerneose em produções aquícolas, na região Oeste de Santa Catarina (CASACA et al., 2005).

Já cientificamente, o seu potencial para a utilização na aquicultura foi avaliado por outros autores previamente, em diferentes tipos de extratos. FURTADO et al., (2021) analisaram a capacidade do óleo nanoemulsificado de acículas de *Pinus* sp. para inibir náuplios e copepoditos de *Lernaea cyprinacea in vitro*, no qual os óleos inibiram com sucesso o desenvolvimento de náuplios na concentração de 10 mg/l em 24 h, também mostrando tolerância dos alevinos de *Rhamdia quelen* ao composto. TORO et al. (2003) avaliaram a resina de *Pinus elliotti* no tratamento contra a *Lernaea cyprinacea in vitro*, o qual determinou que a resina foi efetiva na concentração de 0,5 mg/L, apresentando 100% de mortalidade dos parasitas após 18 horas de tratamento.

Recentemente, DIAS (2022) avaliou métodos de obtenção do extrato de *Pinus* e testou sua toxicidade em *Artemia franciscana*, um crustáceo de água marinha. Foram utilizados dois tipos de solvente, etanol e água destilada, para a extração das acículas secas e verdes, e analisado a concentração de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante (DPPH e FRAP), assim como a determinação da concentração letal (CL50 - 24 horas) dos extratos de *Pinus* contra *Artemia franciscana*. Neste trabalho, o extrato aquoso e etanólico de acículas verdes e o extrato etanólico de acículas secas ocasionaram efeito tóxico sobre as artêmias nas concentrações de 3,27 mg/L e 2,12 mg/L, respectivamente.

Os resultados prévios indicam que o extrato aquoso de acículas verdes pode ser uma alternativa para o controle de parasitoses em peixes. No entanto, há o risco deste extrato ser prejudicial ou, até mesmo, letal aos peixes, sendo necessária a realização de avaliações sobre a sua toxicidade nestes animais. CARVALHO (2016) observou o potencial tóxico e as margens de segurança do extrato bruto aquoso de acículas de *Pinus elliottii* em juvenis de *Rhamdia quelen*, no qual observou que a toxicidade é dependente da concentração, sendo prejudicial e letal a partir da CL50 de 963 mg/L, 48 vezes maior que a dose recomendada (20 mg/L).

2.4 Avaliação da Toxicidade em Peixes

De forma geral, os peixes são considerados bons bioindicadores do estado ecológico da água devido à sua importância ecológica, constante exposição aos compostos tóxicos presentes na água, sedimentos e alimentos, e pela sua elevada sensibilidade nas fases iniciais de vida, bem como fonte alimentar vital para o ser humano. Portanto, a ictiofauna é um elemento fundamental na biomonitorização, permitindo uma percepção mais realista do que acontece aos indivíduos e às populações nos ecossistemas onde vivem (RIBEIRO et al., 2022).

Por exemplo, SIQUEIRA et al. (2019), avaliaram a toxicidade da exposição aguda de extrato metanólico de corticeira (*Erythrina cristagalli*) em exemplares de Kinguio (*Carassius auratus*) por meio de avaliação dos parâmetros fisiológicos sanguíneos, no qual não foi constatada mortalidade, porém ocorrendo alterações indesejáveis nos parâmetros fisiológicos sanguíneos nas concentrações acima de 100 mg/L, como aumento do bicarbonato plasmático e elevação da glicose plasmática.

Além do mais, XAVIER et al. (2020) analisaram a toxicidade do extrato

etanólico de folhas de *Enydra fluctuans* em zebrafish, nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100, 200 e 400 mg/L, no qual, o extrato apresentou toxicidade a partir da concentração de 200 mg/L. Também foram observadas alterações histopatológicas severas nas brânquias, fígado, cérebro e intestino, como: ruptura da estrutura das vilosidades, desprendimento da membrana epitelial basal e vacuolização severa.

Para auxiliar nas pesquisas do ramo científico, algumas organizações elaboraram diretrizes e protocolos que visam padronizar métodos de análise de toxicidade em organismos vivos com o propósito de obter resultados mais precisos. Entre elas está a Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), a qual dispõe das diretrizes OECD No. 203 e OECD No. 215, focadas especificamente na utilização de peixes como organismos modelos para testes de toxicidade. Resumidamente, a diretriz OECD No. 203 estabelece um método para testar a toxicidade aguda de produtos químicos e substâncias, avaliando seus efeitos após uma única exposição aguda. Já a diretriz OECD No. 215 busca avaliar os efeitos da exposição prolongada a produtos químicos no crescimento de peixes.

2.5 Avaliação do Estresse Oxidativo

O estresse é uma resposta comportamental geral na qual há reações motoras e neurovegetativas mediadas pelo sistema neuroendócrino, com a mobilização de energia para o organismo escapar ou combater um agente estressor. Desta forma, o estresse pode causar distúrbios fisiológicos, bioquímicos ou morfológicos. Dentre as alterações bioquímicas temos a geração de radicais livres (JAKUBCZYK et al., 2020).

Nas células aeróbicas, uma pequena quantidade de oxigênio consumido é reduzida por vias específicas, fornecendo uma variedade de substâncias químicas altamente reativas chamadas de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), como: óxido nítrico, o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila. Pequenas quantidades de EROs produzidas são neutralizadas pelos sistemas de defesa celular, no entanto, quando os níveis estão moderados, ocorre o estresse oxidativo, onde as células respondem a estas condições adversas modulando seus níveis de antioxidantes (JAKUBCZYK et al., 2020).

Assim torna-se necessária a atuação de sistemas enzimáticos e não enzimáticos de proteção, conhecidos como defesas antioxidantes, atuando na prevenção da formação das espécies reativas de oxigênio, na sua inativação por meio

da combinação com enzimas e no reparo de danos celulares, entre elas estão: superóxido dismutase - SOD, glutathione peroxidase - GPx, catalase - CAT, glutathione S-transferase - GST e glutathione - GSH. Desta forma, o desequilíbrio entre a quantidade de EROs produzidas e a capacidade de detoxificação do organismo pelas enzimas antioxidantes é considerado estresse oxidativo (SILVA, 2012).

Devido esta importância, muitos autores analisam os parâmetros de estresse oxidativo para avaliar o potencial toxicológico de diversas substâncias. Por exemplo, SANTO et al. (2018), avaliaram o potencial antioxidante e antígeno-tóxico do extrato etanólico de *Uncaria tomentosa* em exposição aguda ao glifosato em zebrafish em concentrações de 1, 40, 50, 60, 70 e 80 mg/L de extrato etanólico e posteriormente a 5,0 mg/L de glifosato. No qual, os autores verificaram que a concentração de extrato etanólico a partir de 1,0 mg/mL impediu a diminuição dos tióis totais do cérebro e a exposição ao glifosato em 5,0 mg/L levou ao aumento da peroxidação lipídica no cérebro e no fígado e à diminuição da atividade da GPx hepática.

MATOS et al. (2018) verificaram redução da atividade de catalase e aumento da GST no fígado e aumento da catalase e redução da GST nas brânquias de *Astyanax bimaculatus* expostos ao triclorfon, concluindo que o composto interfere significativamente nos processos bioquímicos e fisiológicos da espécie. ARAÚJO (2019) avaliou os efeitos oxidativos da carbamazepina (CBZ) e do pesticida neonicotinóide acetamiprida (ACT), em sistemas unitários e em misturas, no cérebro e fígado de *Danio rerio*. O autor verificou que houve aumento significativo de todos os parâmetros em relação ao tratamento controle, exceto para CAT, enquanto nas exposições mistas, os valores foram acima do controle para o cérebro (GSH e MT) e o fígado (CAT, GSH).

Atualmente existem diversos estudos sobre o uso de *Pinus* como possível tratamento para lerneose, por exemplo: FURTADO et al. (2021) avaliaram o uso de óleo nanoemulsionado de *Pinus* em jundiás parasitados pela lerneia, onde determinaram a CL-50 (96h) de 16,74 mg/L. Similarmente, TORO et al. (2003) avaliaram os efeitos da resina de *Pinus* em *Leporinus* com lerneose, em que a toxicidade aguda (CL-50) da resina bruta estabelecida em 200 mg/L. Porém, ainda há poucos estudos que avaliaram o potencial toxicológico do *Pinus* sp. em peixes, sendo os trabalhos existentes limitados a determinar a concentração letal dos compostos.

Desta forma, mostra-se necessária a avaliação dos possíveis efeitos

toxicológicos do extrato de *Pinus* sp., especialmente no que se refere à exposição prolongada.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade do extrato aquoso de acícula de *Pinus* sp. em zebrafish.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a CL50-96 horas do extrato aquoso de acícula de *Pinus* sp. em zebrafish;
- Avaliar o efeito de doses subcrônicas do extrato aquoso de acícula de *Pinus* sp. no crescimento, comportamento e mortalidade de zebrafish;
- Avaliar o efeito de doses subcrônicas do extrato aquoso de acícula de *Pinus* sp. nos parâmetros de estresse oxidativo em zebrafish.

4 METODOLOGIA

O trabalho foi realizado na Universidade Federal do Pampa – campus Uruguaiana, em duas etapas:

- um experimento piloto, de acordo com o Test Guideline nº 203 da OECD (2019);
- um experimento crônico, de acordo com o Test Guideline No. 215 (OECD, 2000).

O objetivo do teste agudo, baseado no Test Guideline nº 203 da OECD (2019), é determinar a concentração letal média (CL50) de uma substância química em peixes, através da exposição a várias concentrações da substância química a ser testada, em condições laboratoriais padronizadas com parâmetros de qualidade de água controlados e monitoração regular para verificação de anormalidades físicas e comportamentais causadas pelo composto químico. De acordo com essa diretriz, um piloto pode ser realizado por 96 horas a 100 mg/L ou na concentração limite, o que for menor, a fim de demonstrar que a CL50 é maior que esta concentração. Caso não ocorra mortalidade ou que a mesma seja $\leq 10\%$, considera-se que o composto analisado não apresenta toxicidade a curto prazo, logo, não havendo necessidade de realizar o experimento de exposição aguda.

Ambos os experimentos foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIPAMPA, registrado sob o protocolo número 015/2022.

4.1 Preparo dos Extratos

As acículas de *Pinus* sp. foram coletadas na Universidade Federal do Pampa – Campus Uruguaiana, nas proximidades do Hospital Universitário Veterinário (HUVet). No momento da coleta, os ramos foram pesados com o auxílio de uma balança de gancho portátil, totalizando 1 kg de material. Levadas ao laboratório, as acículas foram separadas dos galhos e, posteriormente, divididas em duas porções de 375 g.

Para a preparação do extrato, as acículas foram picadas em pedaços de aproximadamente 5 cm, sendo adicionado 500 mL de água destilada (CASACA et al., 2005). Após serem colocadas nos beakers, as acículas foram compactadas e maceradas manualmente por 24 horas (Figura 4), mantidas em frascos cobertos e abrigados da luz.

Figura 4. Foto da extração aquosa de acículas de *Pinus* sp.



Fonte: Autoria Própria

Após este período, o extrato aquoso foi filtrado com papel filtro qualitativo 80g. Duas alíquotas de 50 ml foram armazenadas em tubos Falcon envoltos com papel alumínio, para uso nos experimentos. O restante do extrato foi armazenado em recipiente fechado e escuro, para estoque. Todas as amostras do extrato aquoso foram identificadas e armazenadas a 4°C até o momento do uso.

4.2 Animais e Instalações Experimentais

Os exemplares de zebrafish foram adquiridos de um produtor do estado de São Paulo, enviados via transportadora para Uruguaiana. Ao chegar no Centro de Tecnologia em Pesca e Aquicultura (CTPA), foi feita a soltura e aclimação em um tanque com temperatura controlada ($26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e aeração constante. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, com ração comercial floclada Poytara® contendo 40% de proteína bruta. O período de aclimação teve duração de sete dias. Para os experimentos, foi utilizado um sistema semiestático com tanques de quatro litros de volume útil e troca total da água diariamente. A lotação durante os períodos experimentais foi de 10 peixes por tanque, equivalente a densidade de estocagem de 0,8 g de peixe por litro de água, recomendada pela OECD (2019) (Figura 5).

Figura 5. Sistema utilizado durante o experimento.



Fonte: Autoria Própria.

A temperatura ambiente foi controlada com ar condicionado e todos os tanques possuíam sistema de aeração contínua. Diariamente foi feita manualmente a troca total de água de cada unidade experimental, no qual a água era totalmente removida e renovada pela água proveniente de um grande tanque de abastecimento, presente dentro da sala do experimento. A temperatura da água e o oxigênio dissolvido foram medidos diariamente, antes da troca de água, utilizando o oxímetro digital. Já os parâmetros de pH, amônia, alcalinidade e dureza foram medidos semanalmente, coletando de amostras de água de cada uma das caixas, antes da troca. O pH foi determinado utilizando o pHmetro digital (Servylab Mpa210). A alcalinidade foi determinada pelo método descrito por BOYD e TUCKER (1992), com a transferência de 50 ml de amostra de água em um erlenmeyer de 250 ml e adição 4 gotas de solução indicadora de Verde de Bromocresol + Vermelho de Metila, o qual foi titulado com H_2SO_4 0,05N até a mudança da cor azul esverdeada para salmão. Para a dureza, utilizou-se o método descrito por ADAD (1982), no qual foram transferidos 50 ml de amostra de água em um erlenmeyer de 250 ml, com adição de 25 ml de H_2O destilada, 1 ml de solução Buffer, 1 ml de solução inibidora Na_2S e 2 gotas de indicador Negro de Eriocromo. Após, essa solução foi titulada com EDTA, em agitação constante, até a cor vermelha desaparecer, tornando-se azul.

A amônia total foi mensurada através do kit para aquários "Labcon® Test -

Amônia Tóxica: Água Doce”, transferindo, aproximadamente, 5 ml de amostra para a proveta presente no kit e adicionando 8 gotas da solução reagente 1 e, após, mais 8 gotas da solução reagente 2. Feito isso, a proveta foi fechada e agitada, sendo necessário aguardar 3 minutos para comparar a cor do líquido na proveta com a presente na tabela do kit, referente aos níveis de amônia. A concentração de amônia tóxica foi calculada a parti dos dados de amônia total, do pH e da temperatura da água, de acordo com a equação (USEPA, 1999):

$$f_{NH3} = \frac{1}{1 + 10^{pK-pH}}$$

Onde:

$$pK = 0,09018 + \frac{2729,92}{273,2 + T}$$

T= Temperatura (°C)

fNH₃= fração de amônia não ionizada

4.3 Experimento Piloto

O experimento piloto foi realizado de acordo com o protocolo OECD Test Guideline No. 203 (2019), onde foram selecionados 120 peixes de tamanho uniforme com peso médio de 0,26 ± 0,01 g, distribuídos em 12 tanques experimentais, sem o fornecimento de alimentação. Foram avaliados três tratamentos, com quatro repetições cada: Controle (sem extrato); 50 e 100 mg/L, segundo a OECD Nº 203 (2019). Antes do início do protocolo, os animais passaram por adaptação aos tanques e ao manejo por uma semana.

O experimento teve duração de 96 horas, os parâmetros analisados foram: a mortalidade e a presença de anormalidades visíveis, como problemas no equilíbrio (perda de equilíbrio, peixe posicionado no fundo ou flutuando na superfície, cabeça voltada para cima ou para baixo), natação (convulsões, hiper ou hipoatividade, imobilidade), aparência (exoftalmia, pigmentação fraca ou escura) e comportamento ventilatório (hiper ou hipoventilação, ventilação irregular). Durante este período, os animais não receberam alimentação.

No primeiro dia do estudo, os animais foram observados às 0, 3, 6, 24, 48, 72 e 96 horas após a exposição, de acordo com o protocolo da OECD (2019). Ao final, os peixes foram anestesiados com 100 mg/L de eugenol e foram aferidos o

comprimento total e comprimento padrão (em cm) de cada um dos peixes e a biomassa (peso total da caixa) de cada tratamento, para cálculo do peso médio.

4.4 Experimento Crônico

O experimento foi realizado de acordo com o protocolo OECD Test Guideline No. 215 (2000), no qual os peixes foram expostos a doses do extrato aquoso pelo período de 28 dias, com a avaliação de cinco concentrações de extrato, com quatro repetições: Controle (sem extrato), 1, 3,2, 10, 32 e 100 mg/L. As doses foram definidas considerando que não foi constatada mortalidade durante o teste piloto, e as orientações constantes na diretriz da OECD (2000). Antes do início do protocolo, os animais passaram por adaptação ao ambiente por uma semana.

Durante o experimento, os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial Poytara® para peixes tropicais, floculada, com 37% PB, fornecida duas vezes ao dia (as 10 e as 15 hrs), com a quantidade correspondente a 3% do peso corporal. Os mesmos foram observados diariamente para a análise de parâmetros como: mortalidade, mudanças comportamentais e anomalias externas.

Nos dias 0, 14 e 28, foi realizada a pesagem dos peixes, para acompanhamento do crescimento e ajuste da oferta de alimento. Aos 28 dias, quatro peixes de cada caixa, foram eutanasiados para a coleta de amostras do fígado, músculo e brânquias, posteriormente congelados a -4°C. Os demais animais foram pesados e congelados para análise no peixe inteiro. A coleta foi realizada após eutanásia dos peixes por overdose de eugenol em 500 mg/L.

4.5 Análises de Estresse Oxidativo

Para análise dos parâmetros de estresse oxidativo, os tecidos e os animais foram homogeneizados em tampão TFK 0,05 M pH 7,0, centrifugados a 3000 g por 10 minutos e guardados os sobrenadantes a -20°C. Para a realização dos ensaios bioquímicos, os tecidos foram diluídos 10x (fígado) e 40x (brânquias, músculo e peixe inteiro) em água destilada.

A atividade da Catalase (CAT), foi medida conforme Aebi (1984), adaptado para microplaca de 96 poços. Brevemente, foram pipetadas 10 µl de amostras diluídas em duplicatas, 190 µl de tampão TFK (0,05 M, pH 7,0) e 10 µl de peróxido de hidrogênio 0,5 M. A leitura foi realizada de 15 em 15 segundos, após o início da reação, durante

5 minutos em temperatura de 37°C, com a absorbância medida em 240 nm (SCHMIDT, 2015; GULARTE, 2017).

A atividade do superóxido dismutase (SOD) foi analisada com base no descrito por Misra e Fridovich (1972), com adaptações, através da inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina. Rapidamente, em uma microplaca de 96 poços, foram pipetados 5 µl de catalase em cada poço, após foram pipetados 10, 15 e 20 µl de cada amostra em sequência e em duplicatas, com a adição de 175, 170 e 165 µl de tampão Glicina (50 mM, pH 10,2) somando o volume final de 190 µl em cada poço, finalizando com a adição de 10 µL de Adrenalina para iniciar a reação. A leitura foi realizada de 15 em 15 segundos, após o início da reação, durante 105 minutos em temperatura de 32°C, com a absorbância medida em 480 nm (SCHMIDT, 2015; GULARTE, 2017).

A quantidade de proteína de cada amostra foi mensurada pelo método de Peterson (1977), uma modificação do método de Lowry (1951), adaptado para microplaca. As amostras foram pipetadas, em duplicatas, em volume crescente (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 µL) e completadas com água destilada até o volume de 100 µL. Sequencialmente, foram adicionados 100 µl de reagente Lowry e, a pós incubar por 10 minutos, adicionado 50 µL de reagente de Folin Ciocalteu 0,1 N. Ao final da pipetagem, as placas foram incubadas por 30 minutos e posteriormente lidas em espectrofotômetro com absorbância medida em 620 nm (PETERSON, 1977; PETERSON, 1983).

Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi determinada pelo método descrito por Buege (1978), com adaptações para microplaca. No qual, foram colocados 400 µL de amostra e 800 µL de TCA 10% em eppendorfs e agitados em centrífuga por 10 minutos em 10000 g a 4°C. Após, foram retirados 500 µL de cada amostra e colocados em eppendorfs, em duplicatas, com a adição de 500 µL de TBA 0,8%, posteriormente levados ao banho-maria a 100°C por 1 hora e transferidos para microplacas (250 µL em cada poço, em duplicata) e lidos em espectrofotômetro em absorbância de 532 nm.

A proteína carbonil (PC) foi estimada pelo método de Levine et al. (1990), com adaptações para microplaca. Primeiramente foram 24 eppendorfs para as amostras, contendo, em cada, 200 µL de amostra e 800 µL de DNPH 10mM e outros 24 eppendorfs para controle, contendo 200 µL de amostra e 800 µL de HCl, os quais foram agitados em vórtex e colocados em repouso, no escuro, por 1 hora. Após foram

adicionados 1000 µL de TCA 20% e agitados na centrífuga a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. A seguir, os sobrenadantes foram descartados e os pellets ressuspensos em 1000 µL de TCA 10%, sendo novamente centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Novamente, os sobrenadantes foram descartados e os pellets ressuspensos em 1000 µL de etanol:acetato de etila (1:1), ao qual foram centrifugados em 10000 rpm por 10 minutos a 4°C, processo repetido três vezes, tanto para as amostras, quanto para o controle. Após a última lavagem, o pellet foi ressuspendido em 500 µL de tampão SDS 2%, agitado em vórtex e colocado na estufa a 37°C por 10 minutos, em seguida, centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 20°C. Seguidamente, foram transferidos 220 µL dos sobrenadantes para as placas em duplicatas e lidos em espectrofotômetro a 370 nm.

4.6 Análises Estatísticas

Os resultados do protocolo de exposição prolongada foram analisados utilizando o pacote estatístico SAS® Studio v. 3.8 (Enterprise Edition). Os dados foram testados para distribuição normal usando o teste de Shapiro-Wilk e análise de variância (ANOVA) de uma via. Posteriormente, foi aplicado o teste de Tukey para avaliar a significância estatística das diferenças entre os grupos de teste com diferentes concentrações e o grupo controle.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimento Piloto

Durante o experimento piloto não foram observadas diferenças para o peso e o comprimento dos peixes (Tabela 1). Esse resultado foi obtido em decorrência do curto tempo de experimento, visando mostrar apenas a uniformidade dos animais selecionados.

Tabela 1. Valores de biomassa e tamanho durante o tratamento piloto de zebrafish ao extrato de acículas verdes de *Pinus* sp.

Concentração (mg/L)	Peso (g)	Comprimento Total (cm)	Comprimento padrão (cm)
0	0,26±0,01	3,07±0,04	2,56±0,03
50	0,24±0,01	3,04±0,04	2,53±0,04

100	0,27±0,008	3,10±0,03	2,54±0,02
P-valor	0,3382	0,5807	0,8598

Valores expressos como média ± erro padrão da média.

Com relação aos parâmetros de qualidade de água (Tabela 2), as diferenças observadas não foram suficientes para afetar negativamente o conforto dos animais, uma vez que a maioria dos parâmetros avaliados apresentaram valores dentro ou próximos aos limites recomendados para a espécie (DAMMSKI et al., 2011; MARTINS et al., 2020).

Os parâmetros de oxigênio dissolvido e temperatura mantiveram-se estáveis durante os quatro dias de experimento. O oxigênio dissolvido ficou dentro dos valores recomendados para a espécie (mínimo de 4,0 mg/L conforme DAMMSKI et al., 2011; MARTINS et al., 2020) e pelo protocolo (mínimo de 60% do valor de saturação do ar, de acordo com OECD, 2019), enquanto a temperatura esteve um pouco abaixo da recomendada para a espécie (24-28°C, conforme DAMMSKI et al., 2011; MARTINS et al., 2020), porém dentro da faixa recomendada pelo protocolo (21-25°C, de acordo com OECD, 2019).

O pH manteve-se levemente acima do nível recomendado para a espécie (6,8 – 8,5) em todos os grupos experimentais (MARTINS et al., 2020). Não foram observadas alterações no desempenho nem anomalias comportamentais como as descritas por Zahangir (2015), indicando que a espécie é tolerante a condições básicas subletais. Os valores de alcalinidade foram acima do recomendado para a espécie (50 -150 mg/L) em todas as concentrações (DAMMSKI et al., 2011).

Os valores de pH e alcalinidade acima do recomendado podem ser explicados pela fonte da água utilizada durante o experimento, proveniente de poço artesiano do campus Uruguaiana, que é rica em carbonatos e bicarbonatos devido ao solo da região (TREIN, 2018). Igualmente é importante citar que os valores elevados de amônia total observados não ofereceram risco de toxicidade aos peixes pois Baldisserotto (2018) constatou que a toxicidade da amônia pode aumentar de duas a cinco vezes quando o oxigênio dissolvido está em baixa saturação. Portanto, os valores de amônia total encontrados neste trabalho não ofereceram risco aos peixes devido a maior quantidade de oxigênio presente e pelos baixos níveis de amônia não ionizada (<0,02 mg/L; AVDESH et al., 2012).

Tabela 2. Parâmetros de qualidade de água durante o experimento piloto de exposição de zebrafish ao extrato de acículas verdes de *Pinus* sp.

Concentração (mg/L)	Oxigênio dissolvido (mg/L)	Temperatura (°C)	pH	Amônia total (mg/L)	Amônia NH ₃ (mg/L)	Alcalinidade (mg/L)
0	6,35±0,26b	23,42±0,21	8,62±0,05b	0,0623±0,0001a	0,0108±0,0026b	300,62±4,27b
50	7,75±0,15a	23,73±0,18	8,71±0,01ab	0,0611±0,0005b	0,0126±0,0005ab	302,50±5,34ab
100	7,51±0,18a	23,74±0,23	8,73±0,01a	0,0619±0,0001ab	0,0131±0,0004a	321,87±6,93a
P-valor	<0,0001	0,4846	0,0415	0,0482	0,0440	0,0259

Valores expressos como média ± erro padrão da média.

Do início ao final do experimento piloto não foi observada mortalidade nem alterações físicas ou comportamentais nos animais em nenhuma das concentrações testadas. Assim, conforme as orientações da OECD (2019), o composto é considerado não tóxico e a etapa do experimento de exposição aguda não foi realizada, avaliando-se diretamente o efeito da exposição prolongada (experimento crônico).

5.2 Experimento Crônico

Durante o período de exposição prolongada ao extrato aquoso de acículas de *Pinus* sp., não foram observadas diferenças entre o peso dos animais nos diferentes grupos experimentais (Tabela 3). Portanto, é possível considerar que a exposição ao extrato não interferiu no crescimento dos animais.

Tabela 3. Peso (g) dos zebrafish durante a exposição prolongada ao extrato aquoso de acículas verdes de *Pinus* sp.

Concentração (mg/L)	Dia 0	Dia 14	Dia 28
0 (controle)	0,27±0,02	0,30±0,02	0,31±0,01
1	0,27±0,003	0,30±0,01	0,30±0,006
3,2	0,26±0,005	0,30±0,007	0,29±0,009
10	0,30±0,01	0,34±0,01	0,33±0,009
32	0,27±0,01	0,31±0,02	0,32±0,01
100	0,28±0,01	0,33±0,01	0,33±0,01
P-valor ¹	0,3103	0,5452	0,2084

Valores expressos como média ± erro padrão da média.

¹ P-valor: NS = não significativo (P>0,05).

Em relação à qualidade da água, foi observada diferença significativa para amônia total e amônia não ionizada (Tabela 4), com maiores valores nas concentrações de 32 e 10 mg/L. Estes resultados indicam a necessidade de maior investigação a respeito do efeito de extratos vegetais sobre a excreção de amônia, a fim de identificar se a alteração na excreção é um indicativo de dano hepático ou aumento do catabolismo de proteínas. A concentração de amônia total acima de 0,04 mg/L pode ter ocorrido devido a utilização do sistema semiestático com trocas diárias

de água, resultando em acúmulo de amônia durante as 24 horas desde a última renovação. Entretanto, os valores de amônia não ionizada ficaram abaixo de 0,02 mg/L (limite recomendado para a espécie, conforme AVDESH et al., 2012).

Em todas as concentrações avaliadas, o oxigênio dissolvido ficou dentro dos valores recomendados para a espécie (DAMMSKI, 2011; MARTINS et al., 2020) e dentro do exigido pelo protocolo (OECD, 2019) (Tabela 4).

Os valores de pH mantiveram-se levemente acima do nível recomendado para a espécie (6,8 – 8,5) em todos os grupos experimentais (MARTINS et al., 2020). A alcalinidade também esteve acima do recomendado para a espécie (50 -150 mg/l) em todas as concentrações, enquanto a dureza ficou abaixo do recomendado para a espécie (75-200 mg/L) em todos os tratamentos (DAMMSKI et al., 2011) (Tabela 4). Os valores encontrados nos parâmetros acima são explicados pelo uso de água proveniente de poço artesiano, que é rica em carbonatos e bicarbonatos devido ao solo da região, como foi citado anteriormente (TREIN, 2018). Também não foram observadas alterações no comportamento, crescimento ou consumo de alimento dos animais durante o experimento, indicando que esses parâmetros mais elevados não comprometeram os resultados do experimento e o desenvolvimento dos animais.

Tabela 4. Parâmetros de qualidade de água durante o experimento de exposição prolongada dos zebrafish ao extrato de acículas verdes de *Pinus* sp.

Concentração (mg/L)	Oxigênio dissolvido (mg/L)	Temperatura (°C)	pH	Amônia total (mg/L)	Amônia NH ₃ (mg/L)	Alcalinidade (mg/L)	Dureza (mg/L)
0	6,60±0,17	23,96±0,04	8,51±0,11	0,06±0,008ab	0,009±0,002ab	311,57±11,44	61,00±2,00
1	6,70±0,15	23,95±0,05	8,57±0,04	0,04±0,001b	0,007±0,0007b	315,32±14,41	59,37±0,12
3,2	6,64±0,16	23,97±0,04	8,62±0,03	0,06±0,00ab	0,011±0,001ab	312,82±14,92	64,12±3,12
10	6,70±0,12	24,07±0,06	8,56±0,06	0,04±0,006b	0,007±0,001b	301,57±10,43	77,50±4,00
32	6,74±0,18	23,96±0,04	8,64±0,02	0,07±0,00a	0,014±0,0007a	308,45±7,27	61,66±1,66
100	6,68±0,10	24,06±0,05	8,63±0,02	0,07±0,008a	0,013±0,001ab	315,32±10,72	66,66±10,66
P-valor	0,9888	0,3736	0,6136	0,0016	0,0122	0,9604	0,2486

Valores expressos como média ± erro padrão da média.

Durante este experimento, foi observado apenas um animal do grupo 3,2 mg/L apresentando anomalias comportamentais, caracterizada por perda de controle de fluutuabilidade, perda de equilíbrio e hemorragia próximo a nadadeira caudal, vindo acarretar na morte do mesmo, sete dias após o início do experimento. Foi verificado que esta mortalidade foi causada possivelmente por lesões provocadas por tentativa de fuga do aquário experimental, logo concluímos que esta mortalidade não possuiu relação com o composto avaliado.

5.2.1 Análises de Estresse Oxidativo

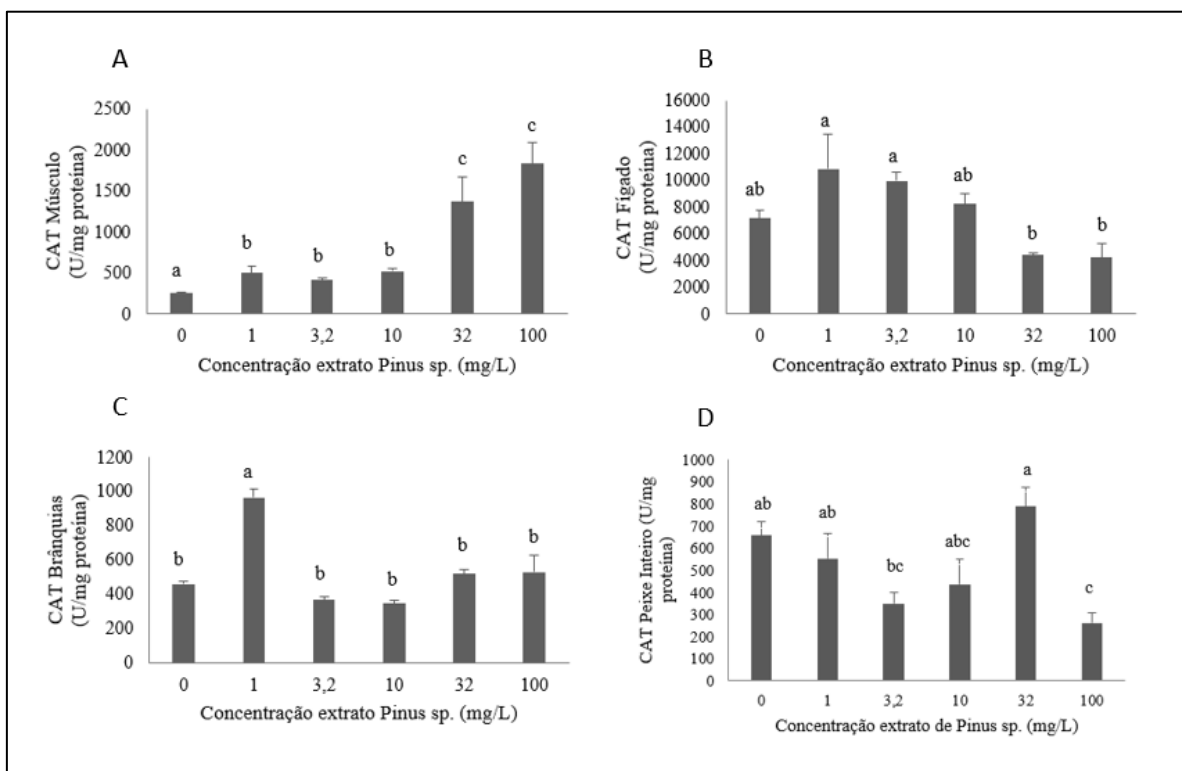
A atividade de catalase foi superior no fígado em comparação com os demais tecidos (Figura 6), possivelmente devido à grande atividade de peróxido de hidrogênio, como subproduto do metabolismo de ácido graxos neste tecido (OLIVEIRA et al., 2013).

Foi observada uma relação dose-dependente entre a atividade da enzima catalase (CAT) no músculo e a concentração de extrato de acícula de *Pinus* sp., sendo a maior atividade observada nas concentrações de 32 e 100 mg/L (Figura 6A). No fígado (Figura 6B) foi observada a relação oposta, ou seja, menor atividade de catalase nas concentrações mais altas (32 e 100 mg/L) em comparação com as doses mais baixas (1 e 3,2 mg/L).

Nas brânquias (Figura 6C) foi encontrada diferença apenas na concentração de 1 mg/L, em relação ao controle e as demais doses. Já nas análises de peixe inteiro (Figura 6D), a maior atividade observada foi na concentração 32 mg/L em comparação com as concentrações de 3,2 e 100 mg/L, no entanto, com diferenças estatísticas entre a concentração de 100 mg/L e o controle.

Figura 6. Atividade de catalase nos tecidos de zebrafish expostos a concentrações do

extrato aquoso de acículas verdes de *Pinus* sp.



Valores expressos como média \pm erro padrão da média.

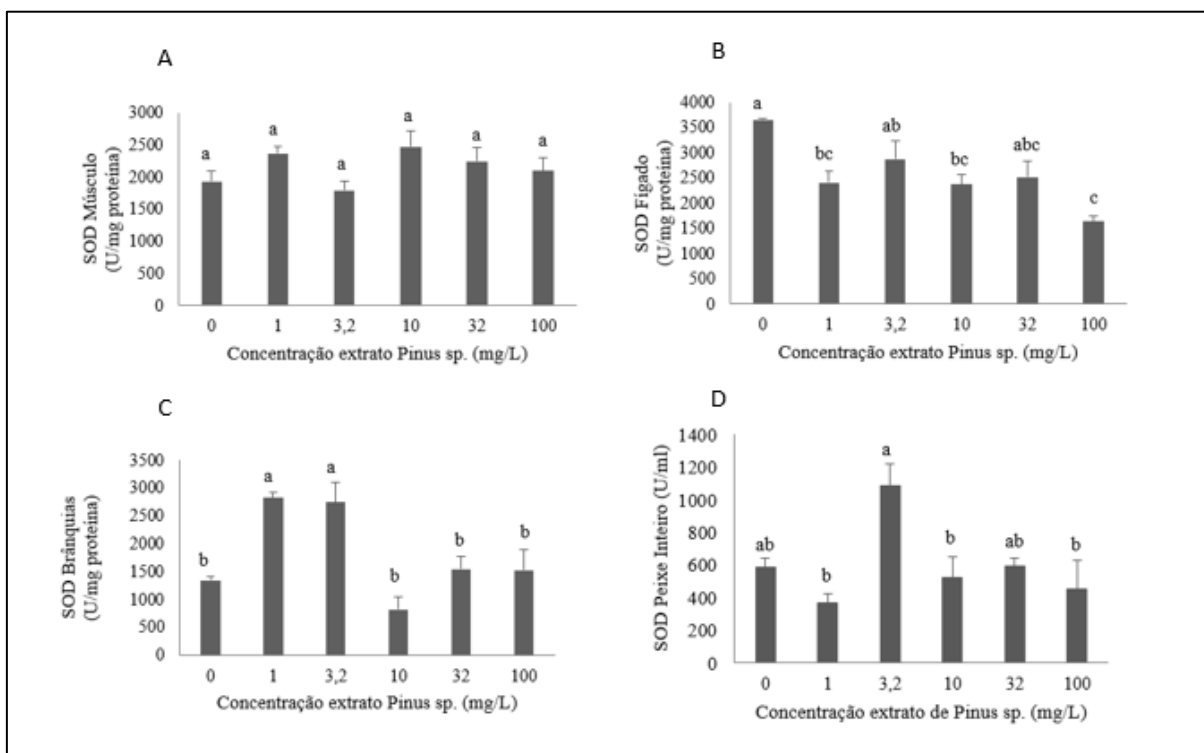
Médias seguidas de letras diferentes no mesmo gráfico diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

Já nas análises de SOD (Figura 7), no músculo não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 7A). No fígado (Figura 7B), foi observada uma redução gradativa da atividade da SOD, ou seja, a menor atividade na concentração mais alta de extrato (100 mg/L) em comparação ao tratamento controle (sem adição de extrato).

Nas brânquias (Figura 7C), a maior atividade foi observada nos tratamentos 1 e 3,2 mg/L, no entanto, não houve diferença estatística entre estes dois tratamentos. No peixe inteiro (Figura 7D), a maior atividade foi observada no tratamento 3,2 mg/L, não diferindo estatisticamente dos tratamentos controle e 32 mg/L.

Figura 7. Atividade de superóxido dismutase nos tecidos de zebrafish expostos a

concentrações do extrato aquoso de acículas verdes de *Pinus* sp.



Valores expressos como média \pm erro padrão da média.

Médias seguidas de letras diferentes no mesmo gráfico diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A menor atividade das enzimas antioxidantes em concentrações mais altas de extrato pode indicar uma possível inibição das enzimas pelo extrato, como o observado por Xia et al. (2017), em que houve redução da atividade da catalase dose-dependente em embriões de zebrafish expostos a uma faixa de concentração de extrato aquoso de cártamo por 96 horas após a fertilização. Esses efeitos podem ser induzidos pelos terpenóides, que são compostos encontrados em uma variedade de plantas, incluindo as do gênero *Pinus*, e que possuem efeito antioxidante, antibacteriana e antifúngico, porém podem apresentar efeitos tóxicos em altas doses. Du et al. (2021) observaram diminuição dose dependente de superóxido dismutase em embriões de zebrafish após exposição subletal à canfora, demonstrando que esse terpenóide causou aumento do estresse oxidativo e inibição da capacidade antioxidante da enzima.

Da mesma forma, Fandohan et al. (2008) avaliaram em ratos a toxicidade aguda e subaguda do óleo essencial de Capim-limão (*Cymbopogon citratus*), rico em monoterpenos, onde foram observadas alterações histopatológicas dose-dependentes no fígado, sugerindo que sua utilização em doses elevadas pode causar

danos funcionais a órgãos críticos em animais. Pim-kaew et al. (2013) avaliaram a hepatotoxicidade do sesquiterpeno Zederona de *Curcuma elata* em camundongos, em que após 24 horas da dose única (200 mg/kg) foi observado necrose de hepatócitos, acompanhada de hemorragia e diminuição da atividade de superóxido dismutase, indicando que a Zederona induziu lesões hepáticas.

No peixe inteiro, os resultados de atividade das enzimas antioxidantes foram inconsistentes em relação aos resultados dos tecidos analisados individualmente, provavelmente em consequência da mistura de diferentes órgãos e tecidos no homogeneizado, o que pode ter dificultado a obtenção de uma amostra homogênea e mascarado os efeitos do extrato sobre o organismo animal. Outros autores tem utilizado amostras de peixe inteiro para avaliar a atividade das enzimas antioxidantes frente à exposição a compostos tóxicos, indicando resultados divergentes. Em guppies (*Poecilia vivipara*), Leitemperger et al. (2019) verificaram aumento da atividade da SOD após exposição ao zinco, mas a atividade de CAT não sofreu alteração. Já Blahová et al. (2013) examinaram as respostas do estresse oxidativo no zebrafish após a exposição sincrônica à atrazina, em que a atividade de CAT foi significativamente menor em todos os grupos experimentais em comparação ao controle e sem diferenças significativas entre o controle e os grupos experimentais na SOD.

De acordo com os resultados do presente estudo, a utilização do peixe inteiro para analisar o panorama geral do estresse oxidativo em um organismo não parece ser uma alternativa viável à análise nos órgãos individualmente. A grande concentração de diversos tecidos e enzimas na amostra, além da pequena quantidade de amostra utilizada para as técnicas, em conjunto com a diluição necessária para as análises podem justificar as inconsistências aqui observadas.

5.2.1.1 TBARS

Com relação ao TBARS (Tabela 5), nas brânquias foi observada peroxidação lipídica dependente da dose, com maiores valores nas concentrações de 32 e 100 mg/L. No fígado, também foi observada maior oxidação lipídica na concentração de 100 mg/L. Resultados semelhantes a este trabalho foram observados por Xia et al. (2017), que verificaram aumento dose-dependente da peroxidação lipídica após a exposição de embriões de zebrafish ao extrato aquoso de cártamo, em relação ao

grupo controle. No músculo os maiores valores de TBARS foram observados nas concentrações de 3,2 e 10 mg/L. Já os valores do peixe inteiro não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos, o que também pode ter ocorrido pela presença de diferentes tecidos na amostra, conforme citado anteriormente.

Tabela 5. Valores de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em brânquias, fígado e músculo de zebrafish em exposição prolongada ao extrato aquoso de acículas verdes de *Pinus* sp.

Concentração (mg/L)	Brânquias ¹ (nmol/mg ptn)	Fígado ² (nmol/mg ptn)	Músculo (nmol/mg ptn)	Peixe inteiro (nmol/mg ptn)
0	0,02±0,0007 ^c	0,008±0,01 ^c	0,006±0,0008 ^b	0,0003±0,0001 ^a
1	0,02±0,0002 ^b	0,03±0,002 ^b	0,003±0,0003 ^c	0,0005±0,0001 ^a
3,2	0,02±0,0002 ^b	0,01±0,006 ^c	0,008±0,0001 ^a	0,0006±0,0003 ^a
10	0,02±0,001 ^b	0,006±0,0004 ^c	0,009±0,0002 ^a	0,0009±0,0003 ^a
32	0,03±0,0001 ^a	0,004±0,0008 ^c	0,003±0,0005 ^{dc}	0,0005±0,0001 ^a
100	0,03±0,002 ^a	0,07±0,002 ^a	0,001±0,002 ^d	0,0008±0,0002 ^a
P-valor	<0,0001	<0,0001	<0,0001	NS ³

Valores expressos como média ± erro padrão da média.

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

³ NS = não significativo (P>0,05).

A peroxidação lipídica é iniciada através da reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado e, após essa reação, pode ocorrer a reação com outra molécula de ácido graxo, formando o hidroperóxido de ácido graxo, esses são instáveis e podem se decompor formando o malondialdeído (MDA), que causa danos nas membranas celulares, podendo levar a morte celular (BARREIROS et al. 2006; SIMON, 2020). Assim como nas enzimas antioxidantes, esses efeitos podem ser induzidos pelos terpenóides. Du et al. (2021) avaliaram o estresse oxidativo e a cardiotoxicidade causada pela exposição subletal do terpenoide canfora em embriões de zebrafish, e observaram aumento da formação de MDA com aumento das doses do composto, bem como o surgimento de malformações morfológicas e cardiotoxicidade, levando ao estresse oxidativo em doses elevadas e posteriormente à apoptose das células.

Similarmente, Ama et al. (2015) analisaram a toxicidade aguda e os efeitos do

estresse oxidativo em juvenis de bagre africano expostos ao extrato aquoso de *Albizia chevalieri*, no qual foi observado aumento significativo de MDA em doses mais altas de extrato, indicando dano celular em doses elevadas pois o nível de antioxidantes na célula não foi suficiente para combater os radicais livres, ocorrendo a peroxidação lipídica.

5.2.1.2 Proteínas Carboniladas

No peixe inteiro, não foram observadas diferenças significativas para a concentração de proteínas carboniladas entre as concentrações de extrato de *Pinus* sp. e o grupo controle (Tabela 6).

Tabela 6. Valores de proteínas carboniladas de peixes inteiros submetidos a exposição prolongada ao extrato aquoso de acículas verdes de *Pinus* sp.

Concentração (mg/L)	Proteínas carboniladas (nmol/mg ptn)
0	0,00006±0,00001 ^a
1	0,00007±0,00002 ^a
3,2	0,00005±0,00002 ^a
10	0,00004±7,69x10 ⁻⁶ ^a
32	0,00008±0,00004 ^a
100	0,00009±0,00003 ^a
P-valor	0,8987

A carbonilação proteica ocorre devido a oxidação de proteína decorrente da ação dos radicais livres, no qual há adição de um átomo de carbono a um átomo de aminoácido da proteína, modificando sua estrutura. Essa modificação, denominada de proteína carbonilada, possui um papel prejudicial, influenciando no ciclo celular, perturbando o equilíbrio redox e aumentando a suscetibilidade celular à apoptose (SINHORIN et al., 2014 ; MARTÍNEZ-ORGADO et al., 2023).

A quantificação de proteínas carboniladas tem sido indicada como um bom biomarcador de dano oxidativo grave das proteínas. Por exemplo, Sinhorin et al. (2014), verificaram aumento de 56% na proteína carbonilada no fígado de surubins

expostos a dose de 4,5 mg/L de glifosato, em relação ao controle. Similarmente, Toni et al. (2010) avaliaram os biomarcadores de estresse oxidativo em carpas (*Cyprinus carpio*) expostas ao herbicida bispyribac-sodium por 72 dias, no qual foi constatado o aumento significativo da proteína carbonilada no fígado a partir de 21 dias de exposição, também indicando estresse oxidativo.

No presente estudo, a ausência de diferenças estatísticas na carbonilação proteica e a grande variação entre as amostras de um mesmo tratamento podem ser explicadas pela utilização da amostra de peixe inteiro, como foi citado anteriormente.

De forma geral, os resultados encontrados no presente estudo indicam que houve dano celular nas brânquias e no fígado dos exemplares de zebrafish nas concentrações mais altas de extrato de *Pinus*. Portanto, os níveis de exposição ao extrato devem essencialmente permanecer em níveis moderados para a obtenção de efeitos benéficos. Esta resposta, chamada de efeito hormético, é comum em diversos compostos bioativos, quando se verifica efeitos benéficos em níveis moderados, mas em níveis elevados verificam-se efeitos prejudiciais (CALABRESE et al. 2002; CALABRESE et al. 2012; MURAKAMI, 2014).

No presente estudo foi identificada toxicidade e alterações significativas nos zebrafish a partir da dose de 3,2 mg/L de extrato aquoso de acículas de *Pinus* sp. Esta dose é semelhante à dose letal (CL-50) determinada por Dias (2022) em artêmias (*Artemia franciscana*), em que a concentração letal média (CL-50) foi de 3,27 mg/L. Ambos os resultados apresentaram valores próximos e efeitos semelhantes, indicando que o uso do extrato é seguro em doses menores, tendo efeito prejudicial a partir de 3 mg/L. Com esse resultado, é possível confirmar a possibilidade do uso do extrato aquoso de *Pinus* como alternativa para o tratamento de parasitoses, uma vez que o uso, em doses seguras, não apresenta malefícios aos animais, propiciando efeito antioxidante e, possivelmente antiparasitário.

Executar a avaliação da exposição dos animais ao extrato por 28 dias foi de vital importância, pois permite viabilizar o seu uso para o controle de parasitoses sem que ocorram efeitos tóxicos a longo prazo, uma vez que para o tratamento de parasitos são realizados banhos prolongados utilizando o composto a fim de assegurar sua remoção completa.

Ademais, o potencial antiparasitário, antifúngico e antibacteriano apresentado pelo *Pinus* pode ser promissor para o setor aquarista, como uma alternativa para

combater e prevenir patógenos comumente encontrados em zebrafish, como: as parasitoses *Pseudoloma neurophilia* e *Pseudocapillaria tomentosa* e microbacterioses causadas por *Mycobacterium chelonae*, *M. marinum* e *M. haemophilum* (KENT et al., 2020).

Portanto, é necessário realizar novas pesquisas em peixes parasitados, com a finalidade de avaliar a eficiência do extrato na remoção dos parasitos do corpo do hospedeiro, verificar possíveis impactos no crescimento e garantir a viabilidade e segurança no uso do extrato. Também é necessário avaliar o efeito do extrato em outras espécies de peixes, a fim de verificar e garantir uma maior precisão nos resultados a respeito dos efeitos do extrato em peixes. Igualmente é preciso dispor de uma avaliação mais profunda a fim de determinar qual o composto bioativo presente no *Pinus* é responsável por causar dano celular ao organismo dos peixes.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que houve dano celular nas brânquias e no fígado dos exemplares de zebrafish a partir da concentração de 3,2 mg/L de extrato aquoso de *Pinus* sp.

REFERÊNCIAS

ADAD, Jesus Miguel Tajra. **Controle Químico de Qualidade**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, p. 23 - 25, 1982.

AEBI, Hugo et al. Catalase in vitro. **Methods In Enzymology**, p. 121-126, 1984. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0076687984050163>> Acesso em: 18 dez. 2023.

AMA, Ibiam Udu et al. GC-MS Analysis, Acute Toxicity and Oxidative Stress Potentials (Effects) of *Albizia chevalieri* Extract on Juvenile African Catfish (*Clarias gariepinus*). **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 23, n. 2, p. 192-199, 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/343084836_GC-MS_Analysis_Acute_Toxicity_and_Oxidative_Stress_Potentials_Effects_of_Albizia_chevalieri_Extract_on_Juvenile_African_Catfish_Clarias_gariepinus>. Acesso em: 20 nov. 2023.

ARAUJO, Gabriel de Farias. **Avaliação do Estresse Oxidativo de Exposições Unitárias e Combinadas de Carbamazepina, Acetamiprida e Cádmio em Peixes *Danio Rerio***. Dissertação de Mestrado (Ciências: Toxicologia Ambiental) - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/34960>>. Acesso em: 01 jan. 2023.

AVDESH A. et al. Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. **Journal of Visualized Experiments**, v. 18; n. 69, 2012. Disponível: <<https://www.jove.com/t/4196/regular-care-maintenance-zebrafish-danio-rerio-laboratory-an>>. Acesso em: 05 dez. 2023.

BALDISSEROTTO, Bernardo. **Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura**. Santa Maria, RS: Editora UFSM, 3º ed., 2018.

BALLONI, Carlos José Vespúcio. **Caracterização Física e Química da Madeira de *Pinus elliottii***. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Industrial Madeireira) –

Universidade Estadual Paulista, Engenharia Industrial Madeireira, Itapeva, 2009. Disponível em:<<https://bitlybr.com/BVABW>>. Acesso em: 20 abr. 2023.

BARREIROS, André L. B. S. et al. Estresse Oxidativo: Relação Entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006. Disponível em:<<https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>>. Acesso em: 12 nov. 2023.

BLAHOVÁ, Jana *et al.* Oxidative Stress Responses in Zebrafish *Danio rerio* After Subchronic Exposure to Atrazine. **Food And Chemical Toxicology**, v. 61, p. 82-85, 2013. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.041>>. Acesso em: 13 nov. 2023.

BOYD, C.E; TUCKER C.S. **Water Quality and Pond Soil Analysis for Aquaculture**. Alabama: Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, p. 183, 1992.

BUEGE, John A. et al. Microsomal lipid peroxidation. **Methods In Enzymology**, p. 302-310, 1978. Disponível em:<https://www.researchgate.net/publication/235331183_Microsomal_lipid_peroxidation>. Acesso em: 13 jan. 2023.

CALABRESE, Edward J. et al. Applications of hormesis in toxicology, risk assessment and chemotherapeutics. **Trends In Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 7, p. 331-337, 2002. Disponível em:<[https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(02\)02034-5](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(02)02034-5)>. Acesso em: 13 nov. 2023.

CALABRESE, Vittorio et al. Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 5, p. 753-783, 2012. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.11.002>>. Acesso em: 13 nov. 2023.

CARRIEL, Katiele Cardozo. **Levantamento da Presença de Lernaean Spp. (Lernaeoidea:Lernaecidae) em Pisciculturas da Associação de Produtores de**

Peixes de Laranjeiras do Sul-Pr (Peixelar). Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Aquicultura) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Engenharia de Aquicultura, Laranjeiras do Sul, 2014. Disponível em: <<https://rd.uffs.edu.br/handle/prefix/181>>. Acesso em: 10 out. 2022.

CARVALHO, Juliana Hösel. **Teste de Letalidade de Peixes da Espécie *Rhamdia quelen* Submetidos a Diferentes Concentrações de Extrato de Acículas de *Pinus elliottii*.** Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Aquicultura) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Engenharia de Aquicultura, Laranjeiras do Sul, 2016. Disponível em: <<https://rd.uffs.edu.br/handle/prefix/3794>>. Acesso em: 16 nov. 2022.

CASACA, J. M.; Tomazelli Junior, O.; Warken, J. A. **Policultivos de peixes integrados: o modelo do oeste de Santa Catarina.** Chapecó, SC: Mercur, 2005. Acesso em: 14 abr. 2023.

DAMMSKI, Ana Paula et al. **Zebrafish: Manual de Criação em Biotério.** Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná, 2011. Disponível em: <<https://gia.org.br/portal/wp-content/uploads/2013/06/ZEBRAFISH.pdf.pdf>>. Acesso em: 1 jun. 2022.

DIAS, Kimberly Costa. **Efeito da Ação Antiparasitária de Extratos de Acículas de *Pinus sp.* sobre o Modelo de *Artemia franciscana*.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia em Aquicultura) - Universidade Federal do Pampa, Uruguai, 2022. Disponível em: <<https://repositorio.unipampa.edu.br/jspui/handle/riu/7501>>. Acesso em: 17 nov. 2022.

DU, Zheng-Cai et al. Sub-lethal Camphor Exposure Triggers Oxidative Stress, Cardiotoxicity, and Cardiac Physiology Alterations in Zebrafish Embryos. **Cardiovascular Toxicology**, v. 21, n. 11, p. 901-913, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12012-021-09682-x>>. Acesso em: 18 nov. 2023.

FANDOHAN, P. et al. Toxicity and gastric tolerance of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Ocimum basilicum* in Wistar rats. **Food And Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2493-2497, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.04.006>>. Acesso em: 13 nov. 2023.

FARJON, Aljos. **A Handbook of the World's Conifers**. Editora Brill, v. 2, 2017

FURTADO, William Eduardo et al. Antiparasitic Potential of Alternative Treatments Against Larval Stages of *Lernaea cyprinacea*. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 45, p.1096 – 1105, 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12639-021-01400-2>>.

GULARTE, Claudia Alves Ortiz. **Efeito do Ácido Siríngico nas Alterações Comportamentais e Oxidativas Induzidas por Cloreto de Alumínio em *Drosophila melanogaster***. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2017. Disponível em: <<https://repositorio.unipampa.edu.br/jspui/handle/rii/7433>>. Acesso em: 18 mar. 2023.

JAKUBCZYK, Karolina et al. Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. **Poľ Merkur Lekarski**, v. 48, n. 284, p. 124-127, 2020. Disponível em:<[https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32352946/#:~:text=Reactive%20oxygen%20species%20\(ROS\)%20are,well%20as%20free%20nitrogen%20radicals.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32352946/#:~:text=Reactive%20oxygen%20species%20(ROS)%20are,well%20as%20free%20nitrogen%20radicals.)>. Acesso em: 10 abr. 2023.

KENT, M. L. et al. Review of diseases and health management in zebrafish *Danio rerio* (Hamilton 1822) in research facilities. **Journal of Fish Diseases**, v. 43, n. 6, p. 637-650, 2020. Disponível em:<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jfd.13165>>. Acesso em: 19 dez. 2023.

LEANDRO, Luís Fernando et al. Antibacterial Activity of *Pinus Elliottii* and Its Major Compound, Dehydroabiatic Acid, Against Multidrug-Resistant Strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, p. 1649-1653, 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/266252671_Antibacterial_activity_Pinus_e>

lliottii_and_its_major_compound_dehydroabiestic_acid_against_multidrug-resistant_strains>. Acesso em: 15 nov. 2022.

LEITEMPERGER, Jossiele et al. Behavioural and Biochemical Parameters in Guppy (*Poecilia vivipara*) Following Exposure to Waterborne Zinc in Salt or Hard Water. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 3, p. 3399-3409, 2019. Disponível em:<<https://doi.org/10.1007/s11033-019-04802-x>>. Acesso em: 13 nov. 2023.

LEVINE, Rodney L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants**, p. 464-478, 1990. Disponível em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/007668799086141H>>. Acesso em: 13 jan. 2023.

LOWRY, Oliverh. et al. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)52451-6/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)52451-6/pdf). Acesso em: 13 jan. 2023.

MACIEL, Patrícia Oliveira. **Manejo Sanitário na Piscicultura**. Capacitação Continuada de Técnicos da Cadeia Produtiva de Piscicultura – Módulo 6. Embrapa, 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1354377/2306862/Manejo+sanitario-Patricia+Maciel.pdf/9b6ae642-4d56-4f72-ade3-4a22908ef2e1>>. Acesso em: 15 out. 2022.

MARTÍNEZ-ORGADO, José et al. Protein Carbonylation as a Biomarker of Oxidative Stress and a Therapeutic Target in Neonatal Brain Damage. **Antioxidants**, v. 12, n. 10, p. 1839, 2023. Disponível em:<<https://doi.org/10.3390/antiox12101839>>. Acesso em: 27 nov. 2023.

MARTINS, Gabriel Bernardes et al. **Manutenção de Zebrafish em Laboratório**. Santos, SP: Altamar Sistemas Aquáticos, 1º edição, 2020. Disponível em: <<https://conteudos.altamar.com.br/zebrafish>>. Acesso em: 1 jun. 2022.

MATOS, Alaide Cristina de Bem et al. Avaliação do Estresse Oxidativo em Peixes Submetidos a Concentrações Subletais de Triclorfon. **XV Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**, 2018. Disponível em:<<https://shre.ink/1u0E>>. Acesso em: 30 dez. 2022.

MEYERS, JASON R. Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism. **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**, 2018. Disponível em:<<https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/cpet.19>>. Acesso em: 20 abr. 2023.

MISRA, H.P., FRIDOVICH, I. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 3170-3175, 1972. Disponível em:<[https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)45228-9/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)45228-9/pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2023.

MURAKAMI, Akira. Dose-Dependent Functionality and Toxicity of Green Tea Polyphenols in Experimental Rodents. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, n. 557, p. 3–10, 2014. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24814373/>>. Acesso em: 10 out. 2023.

OECD. Test Guideline No. 203: Fish, Acute Toxicity Testing. **Guidelines for the Testing of Chemicals**, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1787/20745761>>. Acesso em: 23 dez. 2022.

OECD. Test Guideline No. 215: Fish, Juvenile Growth Test. **Guidelines for the Testing of Chemicals**, 2000. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelinesfor-the-testing-of-chemicals-section-2-effects-on-biotic-systems_20745761>. Acesso em: 23 dez. 2022.

OLIVEIRA, Rhaul et al. Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 2, p. 903–912, 2013. Disponível em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668913001816>>. Acesso em: 20 jan. 2023.

PEIXE BR. **Anuário 2022 Peixe BR da Piscicultura**. Associação Brasileira da Piscicultura. 2022. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuario2022/>>. Acesso em: 10 nov. 2022.

PETERSON, Gary L. A simplification of the protein assay of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, 1977. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4)>. Acesso em: 21 mar. 2023.

PETERSON, Gary L. Determination of total protein. **Methods Enzymology**, 1983. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(83\)91014-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(83)91014-5)>. Acesso em: 21 mar. 2023.

PIMKAEW, Prapapan et al. Zederone, a Sesquiterpene from *Curcuma elata* Roxb, is Hepatotoxic in Mice. **International Journal of Toxicology**, v. 32, n. 6, p. 454-462, 30, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/1091581813504595>>. Acesso em: 13 nov. 2023.

RIBEIRO, Ondina et al. O peixe-zebra (*Danio rerio*) como Modelo Emergente na Ecotoxicologia, **Revista Ciência Elementar**, v. 10, n. 2, 2022. Disponível em: <<http://doi.org/10.24927/rce2022.021>>. Acesso em: 20 out. 2022.

SANTO, Glauca dal et al. Protective effect of *Uncaria tomentosa* extract against oxidative stress and genotoxicity induced by glyphosate-Roundup® using zebrafish (*Danio rerio*) as a model. **Environmental Science And Pollution Research**, v. 25, n. 12, p. 11703-11715, 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-018-1350-6>>. Acesso em: 05 abr. 2023.

SANTOS, Mayara Couto et al. ZEBRAFISH (*Danio rerio*): NOVO MODELO ANIMAL INTRODUZIDO COM ÊXITO NO CENÁRIO CIENTÍFICO. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 1, n. 1, p. 34, 2020. Disponível em: <<https://editoraime.com.br/revistas/index.php/rem/article/view/119>>. Acesso em:

20 dez. 2023.

SANTOS, Maayra Mayyan Porto Nunes. **A Utilização do Zebrafish como Modelo Animal In Vivo no Estudo do Coronavírus: Uma Revisão de Literatura**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Centro Universitário FG, Guanambi, 2022. Disponível em: <<https://repositorio.animaeducacao.com.br/handle/ANIMA/31516>>. Acesso em: 18 jan. 2023.

SCHMIDT, Patrícia Medeiros. **Efeitos da Exposição Aguda ao Cloreto de Alumínio (AlCl₃) sobre a Pressão Arterial, Reatividade Vascular e Estresse Oxidativo em Ratos**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2015. Disponível em: <<https://repositorio.unipampa.edu.br/jspui/handle/riu/515>>. Acesso em: 18 mar. 2023

SILVA, Elyara Maria Pereira et al. Atividade da catalase e da lactato desidrogenase em tilápias submetidas a estresse de confinamento: efeito da cor do ambiente. **Ciência Rural**, v. 42, n. 5, p. 894-899, 2012. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cr/a/9nw6H37VNrt8kML4RHZLPYt/?lang=pt>>. Acesso em: 22 jan. 2023.

SIMON, Karin Argenti. Toxicologia e o Estresse Oxidativo. In: SPINOSA, H. S. et al. (Eds). **Toxicologia Aplicada à Medicina Veterinária**: 2 ed. Barueri, SP: Manole, 2020. P. 37-45. Disponível em: <https://pergamum.unipampa.edu.br/acervo/5047091/>. Acesso em: 28 nov. 2023.

SINHORIN, Valéria Dornelles Gindri et al. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma sp*). **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 106, p. 181-187, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.040>>. Acesso em: 25 nov. 2023.

SPAGNOLI, S et al. The common neural parasite *Pseudoloma neurophilia* causes

altered shoaling behaviour in adult laboratory zebrafish (*Danio rerio*) and its implications for neurobehavioural research. **Journal of Fish Diseases**, v. 40, n. 3, p. 443-446, 2016. Disponível em:<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jfd.12512>>. Acesso em: 19 dez. 2023.

SIQUEIRA, Mayara Schuerof et al. Implicações de Extrato de *Erythrina Crista-Galli* como Ansiolítico para *Carassius Auratus*. **Ciência Animal Brasileira**, v.20, Goiânia, 2019. Disponível em:<<https://doi.org/10.1590/1089-6891v20e-50520>>. Acesso em: 24 abr. 2023.

TAVECHIO, Washington Luiz Gomes et al. Alternativas para a Prevenção e o Controle de Patógenos em Piscicultura. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 35, p. 335 - 341, 2009.

TONI, Cândida et al. Oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide bispyribac-sodium. **Journal Of Applied Toxicology**, v. 30, n. 6, p. 590-595, 2010. Disponível em:<<https://doi.org/10.1002/jat.1530>>. Acesso em: 25 nov. 2023.

TORO, Rosa M. et al. Atividade dos compostos da resina *Pinus elliottii* contra *Lernaea cyprinacea* in vitro. **Parasitologia Veterinária**, v. 118, p. 143-149, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.08.008>>. Acesso em: 19 abr. 2023.

TREIN, Camila da Silva. **Motilidade Espermática de Jundiá (*Rhamdia quelen*) em Diferentes Temperaturas e Fontes de Água**. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Aquicultura) – Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2018. Disponível em:<<https://repositorio.unipampa.edu.br/jspui/handle/rii/4095>>. Acesso em: 28 set. 2023.

USEPA, 1999 Update of Ambient Water Quality Criteria for Ammonia. **United States Environmental Protection Agency**, Office of Water, 1999. Disponível em:<<https://bitly.ws/34dtN>>. Acesso em: 4 abr. 2023.

VIEIRA, Michel Cardoso et al. Propriedades Químicas de Extratos Tânicos da Casca de *Pinus Oocarpa* e Avaliação de seu Emprego como Adesivo. *Cerne*, Lavras, v. 20, n. 1, p. 47-54, 2014. Disponível em:<<https://www.scielo.br/j/cerne/a/bqWnVy4GshkKSSQwLZkfMrm/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 20 abr. 2023.

XAVIER, J. et al. Acute Toxicity of Leaf Extracts of *Erydra fluctuans* Lour in Zebrafish (*Danio rerio* Hamilton). **Scientifica (Cairo)**, 2020. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32377442/>>. Acesso em: 15 nov. 2022.

XIA, Qing et al. Assay for the Developmental Toxicity of Safflower (*Carthamus Tinctorius L.*) to Zebrafish Embryos/Larvae. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, 2017. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.jtcms.2017.05.004>>. Acesso em: 12 nov. 2023.

ZAHANGIR, Md. Mahiuddin et al. Secondary stress responses of zebrafish to different pH: evaluation in a seasonal manner. **Aquaculture Reports**, v. 2, p. 91-96, 2015. Disponível em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352513415300107>>. Acesso em: 25 jan. 2023.