



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
CENTRO DE FORMAÇÃO INTERDISCIPLINAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SOCIEDADE, AMBIENTE E QUALIDADE DE VIDA

JOÃO DAVID BATISTA LISBÔA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DA ASSOCIAÇÃO DOS
HERBICIDAS 2,4-D E PICLORAM EM PEIXES DA ESPÉCIE *Colossoma*
macropomum (CUVIER, 1818)**

SANTARÉM-PA
2020

JOÃO DAVID BATISTA LISBÔA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DA ASSOCIAÇÃO DOS
HERBICIDAS 2,4-D E PICLORAM EM PEIXES DA ESPÉCIE *Colossoma*
macropomum (CUVIER, 1818)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Sociedade, Ambiente e Qualidade de Vida da Universidade Federal do Oeste do Pará para obtenção do título de mestre.

Linha de Pesquisa: Biodiversidade, Saúde e Sustentabilidade

Área de Concentração: Ecotoxicologia

Orientador: Prof. Dr. Maxwell Barbosa de Santana.

Co-orientador: Prof. Dr. Ruy Bessa Lopes

**SANTARÉM-PA
2020**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA**

L769a Lisbôa, João David Batista

Avaliação dos efeitos toxicológicos da associação dos herbicidas 2,4-D e Picloram em peixes da espécie *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818). / João David Batista Lisbôa. – Santarém, 2020.

92 p. : il.

Inclui bibliografias.

Orientador: Maxwell Barbosa de Santana

Coorientador: Ruy Bessa Lopes

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Sociedade, Ambiente e Qualidade de Vida.

1. Ecotoxicologia. 2. Toxicidade aguda. 3. Comportamento animal. 4. Histopatologia.
I. Santana, Maxwell Barbosa de, *orient.* II Lopes, Ruy Bessa, *coorient.* III. Título.

CDD: 23ed. 571.95

Bibliotecária – Documentalista: Mary Caroline Santos Ribeiro – CRB/2 566



Universidade Federal do Oeste do Pará
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SOCIEDADE, AMBIENTE E
QUALIDADE DE VIDA**

ATA Nº 36

No décimo segundo dia do mês de dezembro do ano de dois mil e dezenove, às dezenove horas, na sala trezentos e dezenove do Bloco Modular Tapajós, desta universidade, instalou-se a banca examinadora de dissertação de mestrado do discente João David Batista Lisboa. A banca examinadora foi composta pelos professores: Dr^a. Flávia Garcez da Silva, Ufopa, examinadora externa, Dr^a. Helionora da Silva Alves, Ufopa, examinadora interna, e Dr. Maxwell Barbosa de Santana, orientador. Deu-se início a abertura dos trabalhos, por parte do professor Maxwell Barbosa de Santana, presidente da banca, que, após apresentar os membros da banca examinadora e esclarecer a tramitação da defesa, solicitou ao discente que iniciasse a apresentação da dissertação, intitulada "Avaliação dos Efeitos Toxicológicos da Associação dos Herbicidas 2,4-D e Picloram em Peixes da Espécie Colossoma Macropomum (Cuvier, 1818)", marcando um tempo de quarenta minutos para a apresentação. Concluída a exposição, o professor Maxwell Barbosa de Santana, passou a palavra aos examinadores para arguir o discente. Terminadas as arguições, o presidente da banca solicitou aos presentes que se retirassem da sala para a realização do julgamento do trabalho, concluindo a Banca Examinadora por sua APROVAÇÃO, conforme as normas vigentes na Universidade Federal do Oeste do Pará. A versão final da dissertação deverá ser entregue ao programa, no prazo máximo de sessenta dias, contendo as modificações sugeridas pela banca examinadora e constante na folha de correção anexa. Conforme o Artigo 57 do Regimento Interno do Programa, o discente não terá o título se não cumprir as exigências acima.


Dra. FLAVIA GARCEZ DA SILVA, UFOPA

Examinadora Externa ao Programa


Dra. HELIONORA DA SILVA ALVES, UFOPA

Examinadora Interna


Dr. MAXWELL BARBOSA DE SANTANA, UFOPA

Presidente


JOÃO DAVID BATISTA LISBOA

Mestrando

AGRADECIMENTOS

Não foi fácil chegar até o final desse ciclo chamado “mestrado”. Foi uma caminhada longa e cheia de obstáculos. Contudo, com a ajuda das pessoas certas, foi possível concluir esse percurso. Agora eu só tenho muito a agradecer a todos que estiveram ao meu lado nessa jornada.

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me proporcionado chegar até aqui com saúde e força de vontade para nunca desistir.

Aos meus pais, Noélia Batista (Mãe) por sempre acreditar nas minhas decisões e me encorajar a tomá-las, independente do resultado. E João Clóvis (Pai), por ter sido meu o suporte para que eu conseguisse continuar meus estudos sem tantas preocupações.

Aos meus amigos da AIESEC, que me apresentaram ao edital do mestrado e me incentivaram a seguir esse caminho mesmo que isso me custasse uma viagem a São Paulo.

Às minhas professoras da graduação, Flávia Garcez e Juliana Valentini, que me iniciaram na pesquisa científica e me apresentaram a área da Toxicologia.

Ao meu orientador, Maxwell Santana, que aceitou me guiar, entre centenas de candidatos, nessa jornada do mestrado, e ter oferecido o suporte necessário para que as pesquisas fossem desenvolvidas.

Aos professores, Sâmia Rubielle e Ruy Bessa, que auxiliaram no desenvolvimento de algumas etapas da minha pesquisa.

Aos meus amigos do PPGSAQ, que enfrentaram essa batalha de dois anos ao meu lado.

Às amigas e, agora mestres, Soraia e Alessandra, que me antecederam nas pesquisas na área da ecotoxicologia, compartilhando seus conhecimentos. Muito sobre o que sei desse assunto é graças a elas.

Às companheiras de Laboratório, Mila, Jandira e Graziela, que sempre estiveram ao meu lado dia a dia nos momentos de experimentos e descontração.

Às amigas que fiz através do Grupo de Pesquisa Neurociências e Amazônia, Mayara, Osleias, Nataniely, Joisiane, Alice, Ludyanne, Wanessa e Daniela.

Às alunas de PIBIC, Nataniely, Joisiane e Alice, que me auxiliaram em vários momentos na parte experimental desde os cuidados no biotérios até nos experimentos que iam até a madrugada no Laboratório.

Aos alunos vinculados ao Programa de Ação Interdisciplinar (PAI), que proporcionaram meu primeiro contato com a docência e me tiraram da minha zona de conforto. Foi uma experiência muito boa.

A UFOPA e secretaria do PPGSAQ, pelo apoio institucional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

RESUMO

Os agrotóxicos são ingredientes ativos com elevado grau de toxicidade comprovada, podendo causar alterações morfofisiológicas até mortalidade de organismos. Há estudos que evidencia prejuízos causados por esses produtos em água, solo, insetos, crustáceos, anfíbios e peixes, devido à exposição direta, no momento da aplicação dos tóxicos, ou indireta, pelos resíduos que permanecem no meio ambiente. Os herbicidas são os principais agrotóxicos detectados em águas superficiais e subterrâneas, como por exemplo o Picloram e 2,4-D que podem permanecer por anos no meio ambiente, e além disso, a formulação comercial destes, é de fácil acesso e baixo custo, podendo ser adquirida individualmente ou de forma associada. Apesar de muitos estudos sobre esses ingredientes ativos, ainda não foi possível esclarecer seus mecanismos de ação nos organismos, exceto em plantas. Dessa forma, não se sabe a proporção dos riscos ambientais e no ser humano. Sendo assim, este estudo divide-se em três capítulos: o primeiro aborda uma revisão descritiva da literatura sobre ecotoxicologia, agrotóxicos e biomarcadores e uma análise cienciométrica da utilização do *Colossoma macropomum* em estudos toxicológicos; O segundo artigo avalia a toxicidade aguda da associação dos herbicidas 2,4-D e Picloram em *Colossoma macropomum*. E o terceiro avalia as alterações comportamentais e histológicas em peixes da espécie *Colossoma macropomum* expostos a associação dos herbicidas 2,4-D e Picloram. Todos os experimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Ceua/Ufopa, sob o número de protocolo nº. 0120190053, e seguiram diretrizes internacionais para avaliação de sensibilidade e toxicidade aguda da Usepa nº 850.1075/2006 e OECD nº 203/1992. Os peixes da espécie *Colossoma macropomum* demonstraram ser organismos-teste emergentes em estudos toxicológicos principalmente no Brasil, como observado através da análise cienciométrica. Através dos ensaios de sensibilidade, a espécie confirmou sua usabilidade para teste de toxicidade e biomonitoramento ambiental. Dessa forma, avaliou-se o *Colossoma macropomum* em cinco concentrações distintas (3,5; 5 ;6; 7; 8 mg/L) da formulação comercial do 2,4-D e Picloram, em um sistema estático, estimando a CL_{50-96h} em 5,54 mg/L através método de Trimmed Spearman-Kärber. Em paralelo a exposição aguda, foi avaliado os parâmetros comportamentais, através de registros em vídeo nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a exposição. A análise histológicas foi realizada nas brânquias e fígados dos peixes

coradas em hematoxilina e eosina. As alterações comportamentais avaliadas foram nado excitatório, permanência na zona superior, respiração na superfície, perda de equilíbrio, nado errático, espasmo e paralisia. As alterações histológicas nas brânquias foram hiperplasia e degeneração das lamelas, e no fígado, a vacuolização intercelular. Portanto, os resultados demonstraram que no *Collossoma macropomum* é um organismo em potencial para estudos toxicológicos de biomonitoramento. A sua exposição aos herbicidas Picloram e 2,4-D demonstraram várias alterações comportamentais e histológicas, comprovando seus riscos ao meio ambiente, inclusive aos humanos que residem próximo às plantações que fazem uso desse agrotóxico.

Palavras Chaves: Ecotoxicologia. Toxicidade Aguda. Comportamento Animal. Histopatologia.

ABSTRACT

Pesticides are active ingredients, with a high degree of proven toxicity, can cause morphophysiological changes and even mortality of organisms. There are studies showing their damage to water, soil, insects, crustaceans, amphibians and fish due to direct exposure, at the time of application, or indirect, by residues that remain in the environment. Herbicides are the main pesticides detected in surface and ground water. Picloram and 2,4-D are examples of these herbicides that can remain in the environment for years. Due to its commercial formulation is accessible and affordable, the population can easily purchase individually or in combination. Despite there are many studies with these active ingredients, it has not been possible to clarify their mechanisms of action in organisms, except in plants. Thus, the proportion of environmental and human hazards is unknown. This study contains 3 chapters: the first deals with a descriptive review of the literature on ecotoxicology, pesticides and biomarkers and a scientometric analysis of the use of *Colossoma macropomum* in toxicological studies. The second article evaluates the acute toxicity of the association of the 2,4-D and Picloram herbicides in *Colossoma macropomum*. And the third evaluates the behavioral and histological changes in fish of the species *Colossoma macropomum* exposed by association of the herbicides 2,4-D and Picloram. The experiments performed in this study were approved by CEUA/UFOPA, under protocol No. 0120190053, and followed international guidelines for the assessment of acute sensitivity and toxicity of USEPA No. 850.1075/2006 and OECD No. 203/1992. The fish of the species *Colossoma macropomum* have been shown to be emerging test organisms in toxicological studies mainly in Brazil, as observed through the scientometric analysis. Through sensitivity tests, the species confirmed their usability for toxicity testing and environmental biomonitoring. Thus, *Colossoma macropomum* was evaluated at five different concentrations (3.5, 5, 6, 7, 8 mg / L) of the commercial formulation of 2,4-D and Picloram in a static system, estimating the LC_{50-96h} at 5.54 mg/L by Trimmed Spearman-Kärber method. The behavioral parameters were evaluated by video recording at 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 and 96 hours after exposure. Histological analysis was performed on the gills and liver of fish stained with hematoxylin and eosin. The behavioral changes evaluated were excitatory swimming, stay in the upper zone, surface breathing, loss of balance, erratic swimming, spasm and paralysis. The histological changes in the gills were hyperplasia and lamella

degeneration, and in the liver, intercellular vacuolization. Therefore, the results demonstrated that *Colossoma macropomum* is a potential organism for biomonitoring toxicological studies. Its exposure to the herbicides Picloram and 2,4-D showed several behavioral and histological changes, proving their risks to the environment, including humans who live near the plantations that use this pesticide.

Keywords: Ecotoxicology. Acute Toxicity. Animal Behavior. Histopathology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema de Ecotoxicologia e Toxicologia Ambiental	30
Figura 2 – Esquema dos bioindicadores de exposição, de efeito e suscetibilidade do momento da exposição a doença.	32
Figura 3 – Imagem do <i>Colossoma macropomum</i> (CUVIER, 1818) em fase adulta...35	
Figura 4 – Esquema de seleção de trabalhos científicos para análise cienciométrica.	36
Figura 5 – Publicações no período de 2004 a junho de 2019*.	37
Figura 6 – Publicações por instituição no período de 2004 a 2019.	38
Figura 7 – Publicação por áreas de pesquisa dos artigos no período de 2004 a 2019.	38
Figura 8 – Revistas que publicaram as pesquisas no período de 2004 a 2019.	39
Figura 9 – Peixe da espécie <i>Colossoma macropomum</i> na fase juvenil	51
Figura 10 – Esquema da organização dos aquários em triplicatas para os testes de toxicidade aguda.....	51
Figura 11 – Estrutura Física dos Aquários montados para os testes de sensibilidade e toxicidade aguda.....	52
Figura 12 – Esquema de avaliação biométrica dos organismos-testes.	52
Figura 13 – Mortalidade de peixes em função da concentração.	56
Figura 14 – Valores da concentração letal média (CL ₅₀) de peixes expostos ao Dicromato de Potássio (K ₂ Cr ₂ O ₇).....	57
Figura 15 – Mortalidade de peixes em função da concentração.	59
Figura 16 – Valores da concentração letal média (CL ₅₀) de peixes expostos ao Picloram.	60
Figura 17 – Estrutura montada para registro do padrão e alteração de comportamento dos tambaquis (<i>Colossoma macropomum</i>) exposto aos herbicidas associados Picloram e 2,4-D.	71
Figura 18 – Esquema da divisão dos aquários em zonas para avaliar a alteração comportamental dos peixes em relação ao posição.....	78
Figura 19 – Fotomicrografia da brânquia de <i>Colossoma macropomum</i> exposto agudamente aos herbicidas associados Picloram e 2,4-D.....	83
Figura 20 – Fotomicrografia do fígado de <i>Colossoma macropomum</i> exposto agudamente aos herbicidas associados Picloram e 2,4-D.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sinônimos, classificação e composição dos agrotóxicos.....	20
Tabela 2 – Informações gerais sobre o herbicida Picloram.....	24
Tabela 3 – Sinais e Sintomas Clínicos da Exposição Aguda ao Pesticida Picloram.	25
Tabela 4 – Informações gerais sobre o herbicida 2,4-D.	26
Tabela 5 – Sinais e Sintomas Clínicos da Exposição Aguda ao Pesticida 2,4-D	27
Tabela 6 – Normas validadas para testes ecotoxicológicos em peixes de água doce.	30
Tabela 7 – Etapas para identificação de alterações histológicas.	33
Tabela 8 – Mortalidade dos juvenis de <i>C. macropomum</i> no teste de sensibilidade com Dicromato de Potássio ($K_2Cr_2O_7$) durante 96 horas de exposição.....	55
Tabela 9 – Média dos valores dos parâmetros físico-químicos da água durante o ensaio de toxicidade aguda com Tordon® (96h).....	58
Tabela 10 – Mortalidade dos juvenis no teste de toxicidade aguda com Tordon® durante 96 horas.....	59
Tabela 11 – Tabela do nível de toxicidade aquática segundo Zucker (1983).	61
Tabela 12 – Etograma dos principais comportamentos observados em <i>Colossoma macropomum</i> sob exposição aguda dos herbicidas associados Picloram e 2,4-D....	73
Tabela 13 – Etograma dos principais comportamentos agonitas observados em <i>Colossoma macropomum</i> sob exposição aguda dos herbicidas associados Picloram e 2,4-D.....	74
Tabela 14 – Manifestação dos efeitos comportamentais em 8h de exposição aguda aos herbicidas associados Picloram e 2,4-D.	75
Tabela 15 – Manifestação dos efeitos comportamentais das 12 às 96h de exposição aguda aos herbicidas associados Picloram e 2,4-D.	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

pH	Potencial hidrogeniônico
ABNT	Associação brasileira de normas técnicas
AIA	Auxina
ALAT	Enzima alanina aminotransferase
Anvisa	Agência nacional de vigilância sanitária
AST	Enzima aspartato transaminase
Ceno	Concentração de efeito não observado
Ceo	Concentração de efeito observado
Cetesb	Companhia ambiental do estado de São Paulo
Ceua	Comitê de uso e ética animal
CL ₅₀	Concentração letal média
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DL ₅₀	Dose letal média
HE	Hematoxilina e eosina
EPA	Agência de proteção ambiental
FAO	Organização das nações unidas para alimentação e agricultura
FFDCA	Lei federal de alimentos, medicamentos e cosméticos
FIFRA	Lei federal de inseticidas, fungicidas e rodenticidas
GHS	Sistema globalmente harmonizado de classificação e rotulagem de produtos químicos
Ibama	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
MAPA	MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA e ABASTECIMENTO
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PND	Plano Nacional de Desenvolvimento
PNDA	Plano Nacional de Defensivos Agrícolas
PPP	Produtos de proteção para plantas
SNC	Sistema nervoso central
T3	Hormônio triiodotironina
T4	Hormônio tiroxina
Ufopa	Universidade Federal do Oeste do Pará

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
1 AGROTÓXICOS	19
1.1 BREVE HISTÓRICO	20
1.2 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA.....	21
1.3 LEGISLAÇÃO INTERNACIONAL.....	22
1.4 CLASSIFICAÇÃO.....	23
2 TOXICOLOGIA	28
2.1 ECOTOXICOLOGIA.....	29
2.2 CONCENTRAÇÃO LETAL (CL ₅₀) E DOSE LETAL (DL ₅₀)	29
2.3 CEO E CENO.....	30
3 BIOMARCADORES	31
3.1 PARÂMETRO COMPORTAMENTAL.....	32
3.2 PARÂMETRO HISTOLÓGICO.....	33
4 <i>Colossoma macropomum</i> (CUVIER, 1818) COMO MODELO ANIMAL PARA TESTES TOXICOLÓGICOS: UMA ANÁLISE CIENCIOMÉTRICA	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
CAPÍTULO II – TOXICIDADE AGUDA DA ASSOCIAÇÃO DOS HERBICIDAS 2,4-D E PICLORAM PARA PEIXES DA ESPÉCIE <i>Colossoma macropomum</i>	46
RESUMO	46
ABSTRACT	47
1 INTRODUÇÃO	48
2 MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	50
2.2 TÓXICO UTILIZADO	50

2.3 ORGANISMO-TESTE	50
2.4 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS	50
2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	51
2.5.1 Teste de sensibilidade	53
2.5.2 Teste de toxicidade aguda.....	53
2.5.3 Análise estatística	54
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
3.1 TESTE DE SENSIBILIDADE.....	54
3.2 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA	57
3.3 CLASSIFICAÇÃO DOS HERBICIDAS PICLORAM E 2,4-D ASSOCIADOS QUANTO À TOXICIDADE AGUDA E AO RISCO AMBIENTAL.....	61
3.4 CEO E CENO.....	62
4 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
CAPITULO III – AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAL E HISTOLÓGICA EM PEIXES DA ESPÉCIE <i>Colossoma macropomum</i> EXPOSTO A ASSOCIAÇÃO DOS HERBICIDAS 2,4-D E PICLORAM	67
RESUMO.....	67
ABSTRACT	68
1 INTRODUÇÃO.....	69
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	70
2.1 TÓXICO UTILIZADO	70
2.2 ORGANISMO TESTE.....	70
2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	71
2.3.1 Análise Comportamental	71
2.3.2 Análise Histopatológica.....	72
2.5 ASPECTOS ÉTICOS.....	72
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73

3.1 EFEITOS COMPORTAMENTAIS SOB EXPOSIÇÃO A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM E 2,4-D.....	73
3.2 ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICOS	81
3.2.1 Brânquias.....	81
3.2.2 Fígado.....	84
4 CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL (CEUA).....	92
ANEXO B – APRESENTAÇÃO EM EVENTOS.....	93

INTRODUÇÃO

Os estudos ecotoxicológicos surgiram para compreensão dos problemas de contaminação de corpos de água por substâncias tóxicas provenientes de metais pesados ou resíduos do uso de agrotóxicos, resultado da atividade antropogênica sobre o meio ambiente (ARIAS, 2007). O Brasil, por possuir uma economia voltada para o agronegócio, lidera no consumo e produção de agrotóxicos. Em detrimento desse uso desenfreado, expõe o meio ambiente, principalmente o ecossistema aquático, e a população aos efeitos nocivos dessas substâncias (INCA, 2015).

Os principais órgãos internacionais que discutem sobre autorização e o uso de agrotóxicos são: Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), Organização Mundial da Saúde (OMS). No entanto, cada país tem autonomia para adotar as recomendações desses órgãos (ERBACH, 2012).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), instituição que visa promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e consumo de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária (BRASIL, 1999), determina que agrotóxicos são ingredientes ativos com elevado grau de toxicidade aguda comprovada e que causam problemas neurológicos, reprodutivos, de desregulação hormonal e até câncer (BRASIL, 2011).

Os casos de exposição podem ser: agudo, que aparecem durante ou após o contato da pessoa com o produto e apresentam características bem marcantes. Ou crônico, que podem aparecer semanas, meses, anos, ou até mesmo gerações após o período de uso e contato com o produto (PERES; MOREIRA, 2003).

Além dos danos à saúde humana, os agrotóxicos são um risco para o meio ambiente. Lopes e Albuquerque (2018) evidenciaram o prejuízo causado sobre os insetos, água, solo e peixes pelo uso dessas substâncias, muitas vezes, por alterações causadas em seu habitat natural. Além disso, identificou-se que nos indivíduos afetados podem ocorrer alterações em células epiteliais, aneurismas, alterações capilares e velocidade da natação em peixes, assim como, acúmulos de agrotóxicos no organismo. Os agrotóxicos frequentemente detectados em águas superficiais e subterrâneas são os herbicidas (KNISS, 2017; TANG et al., 2018).

Segundo o estudo epidemiológico realizado por Pignati et al. (2017), os princípios ativos mais frequentemente utilizados nos anos entre 2012 a 2016 foram Glifosato (Herbicida), Clorpirifós (Inseticida), 2,4-D (Herbicida), Picloram (Herbicida),

Atrazina (Herbicida), Óleo mineral (Adjuvante), Mancozebe (Fungicida), Metoxifenoza (Inseticida), Acefato (Inseticida), Haloxifop-P-Metilico (Herbicida), Lactofem (Herbicida), Metomil (Inseticida), Diquate (Herbicida), Picoxistrobina (Fungicida), Flumetsulam (Herbicida), Teflubenzurom (Inseticida), Imidacloprido (Inseticida), Lambda cialotrina (inseticida), Imazetapir (Herbicida), Azoxistrobina (Fungicida) e Flutriafol (Fungicida).

Atualmente o uso associado de agrotóxicos vem ganhando destaque, pois amplia seu espectro de ação e reduz o seu valor comercial, tornando-se uma vantagem para os agricultores de pequeno, médio e grande porte. No entanto, essa associação também aumenta os riscos de exposição à população e ao meio ambiente. O caso mais comum é 2,4 D e Picloram, que possuem suas formulações comercializadas individualmente e de forma associada, a exemplo o Tordon®, recomendado para o controle de dicotiledôneas indesejáveis de porte arbóreo, arbustivo e subarbustivo em pastagens e para a erradicação de eucalipto na reforma de áreas florestais. Com a facilidade de ter um pesticida “multiuso” a baixo custo, aumenta-se o consumo do mesmo, dessa forma, sendo necessário os estudos dos efeitos de sua exposição (TORDON, 2017).

O uso dessa substância associada, é perigoso ao meio ambiente, pois é classificado “altamente persistente” no meio e “altamente móvel”, podendo atingir principalmente, águas subterrâneas. Esse direcionamento do pesticida para água dos rios inicia o processo de poluição do ecossistema aquático. Algas e peixes são os primeiros a serem expostos, sendo notório a alteração comportamental, fisiológica ou, até mesmo, aumentando a mortalidade. Algumas substâncias podem ficar acumuladas e ser passadas entre os níveis tróficos (RUBBO, 2015; TORDON, 2017).

Este estudo divide-se em três capítulos com objetivos distintos. O primeiro aborda uma revisão descritiva da literatura sobre ecotoxicologia, agrotóxicos, biomarcadores e uma análise cienciométrica da utilização do *Colossoma macropomum* em estudos toxicológicos. O segundo artigo avalia a toxicidade aguda da associação dos herbicidas 2,4-D e Picloram em *Colossoma macropomum*. E o terceiro avalia as alterações comportamentais e histológicas em peixes da espécie *Colossoma macropomum* expostos a associação dos herbicidas 2,4-D e Picloram.

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 AGROTÓXICOS

A utilização de compostos químicos no controle de insetos e plantas daninhas tem sido uma prática comum por milhares de anos. Há registros de que 400 a.c. os romanos usavam produtos residuais (cinzas, sais, lodo de fornalhas) tóxicos para a maioria das plantas. No século XVII, o uso de herbicidas orgânicos foi intensificado na agricultura, visto que o cultivo de monoculturas deu início ao aparecimento de pragas (SOLOMON et al., 2010). Em 1931, com a produção sintética do inseticida DDT (diclorodifeniltricloroetano) foi reconhecida a eficiência do controle químico marcando o início da era química na produção vegetal (TAVELLA et al., 2011). O que ocasionou a revolução verde na década de 1950, que objetivava aumentar a produção agropecuária.

O alto consumo dos agrotóxicos no Brasil ocorreu durante o regime militar através: da formação de complexos agroindustriais e do Plano Nacional de Defensivos Agrícola (PND) que substituíram a política de importação de venenos agrícolas (SAMPAIO; NETO, 2018). O uso de agrotóxicos e fertilizantes nas lavouras tem crescido a cada ano, sendo que, em 2008, o Brasil se destacou como o maior consumidor mundial de agrotóxicos e mantém, desde então, posição de destaque no mercado mundial desses produtos (BRASIL, 2017).

Os agrotóxicos com maiores importâncias em níveis de intoxicação – devido, principalmente, ao mecanismo de ação tóxico e efeitos clínicos provocados – podem ser quimicamente divididos em organofosforados, carbamatos, organoclorados, glifosato, piretrinas e piretroides, dipiridilos, clorfenoxiacéticos, ditiocarbamatos, compostos de cobre, triazóis, fosfeto de alumínio, fosfeto de zinco, fluoroacetato de sódio e estricnina (OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2014).

Tabela 1 – Sinônimos, classificação e composição dos agrotóxicos.

Sinônimos	Classe	Composição Química
Agrotóxico;	Herbicidas	Organofosforados/ Carbamatos;
Pesticida;	Inseticidas	Organoclorados;
Defensivo agrícola;	Fungicidas	Glifosato;
Praguicida;	Bactericidas	Piretrinas e Piretroides;
Biocida;		Dipiridilos;
Agroquímico;		Clorofenoxiacéticos;
Remédio de planta;		Ditiocarbamatos;
Veneno;		Compostos de cobre;
		Triazóis;
		Fosfeto de Alumínio;
		Fosfeto de Zinco;
		Fluoroacetato de Sódio;
		Estricnina;

Fonte: Autor (2019)

1.1 BREVE HISTÓRICO

Embora não haja registros dos primeiros agrotóxicos criados no mundo, sabe-se que foram elaborados no período da segunda guerra mundial. Seu principal objetivo era manipulação de substâncias químicas letais voltado para “soluções” de alguns conflitos militares. Após a guerra, a utilização das substâncias se tornou inviável. Na década de 1950, o cenário de pós-guerra aumentou o crescimento populacional e econômico que por sua vez aumentou a demanda de alimentos e matéria prima, fazendo-se necessário a utilização de novas tecnologias na agricultura. Dessa forma, foram reaproveitados as estruturas laboratoriais e os princípios ativos – antes de cunho bélico – para combater insetos causadores de quebra na produção agrícola (MORANGAS; SCHNEIDER, 2003).

A introdução dos agrotóxicos no Brasil ocorreu nos anos 1940 concomitantemente a Revolução Verde. Novas tecnologias baseadas no uso agentes químicos foram disponibilizadas aos agricultores aumentando a produtividade através do controle de doenças e proteção contra pragas (BORSOI et al., 2014; COSTA; PIRES, 2016).

As primeiras produções de agrotóxicos no Brasil ocorreram em 1946. Mas os incentivos para o consumo foram mais intensos a partir de 1965, através da criação do Sistema Nacional de Crédito Rural (SNCR), que liberava crédito a compra de insumos agrícolas. Em 1975, foi criado o Plano Nacional de Defensivos Agrícolas (PNDA) que incentivava a criação de empresas nacionais ou atração de empresas

internacionais no ramo de insumos agrícolas, efetivando a instalação das primeiras indústrias de agrotóxicos no Brasil (COSTA; PIRES, 2016).

1.2 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

A legislação brasileira iniciou a legalização dos agrotóxicos no ano de 1934 com a criação do Decreto 24.114, aprovando o Regulamento de Defesa Sanitária Vegetal do Ministério da Agricultura. Apesar de vago e não específico, controlava as vendas dos ingredientes ativos sem registros. Somente a partir de 1988, através da Constituição Brasileira, que foram abordadas as preocupações na qualidade de vida e do meio ambiente (COSTA; PIRES, 2016).

Atualmente os agrotóxicos são regidos pela lei 7.802/1989 (BRASIL, 1989) e o decreto 4.074/2002 que o regulamenta (BRASIL, 2002), caracterizando o processo desde o momento de criação até o destino final do agrotóxico:

Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências (...) aos produtos e aos componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados aos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento.

Recentemente, discute-se sobre a revisão da legislação dos agrotóxicos através do Plano de Lei 6.299/2002, que altera os artigos 3º e 9º da Lei nº 7.802/1989. Esse plano ficou conhecido como 'Pacote de Veneno', corroborando os interesses econômicos do agronegócio no lugar da defesa da saúde e do meio ambiente, a começar pela substituição do conceito de agrotóxico (definida de acordo com Constituição Federal de 1988) por "produtos fitossanitários" e "defensivos agrícola" (PORTO, 2018).

Os agrotóxicos, nomeado segundo a Lei nº 7.802/1989 como "*compostos de substâncias químicas destinadas ao controle, destruição ou prevenção, direta ou indiretamente, de agentes patogênicos para plantas e animais úteis e às pessoas*", também são chamados, popularmente, de pesticida, praguicida, defensivo agrícola,

biocida, agroquímico, remédio de planta e veneno. Sua maior utilização é na agricultura, contudo, também utilizados na saúde pública (controle de vetores), no tratamento de madeira, no armazenamento de grãos e sementes, na produção de flores, no combate a piolhos e outros parasitas no homem e na pecuária (BRASIL, 2002; PERES, 2003).

Além da alteração de nomenclatura, o Plano de Lei nº 6.299/2002 visa a retirada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) em diversas atribuições no processo de licenciamento, ampliando os poderes regulatórios do Ministério da Agricultura (PORTO, 2018).

O parecer aprovado, com 18 votos a favor e nove contrários ao texto do Plano de Lei nº 6299/200, deve seguir para o Plenário da Câmara dos Deputados, onde requer a presença de, no mínimo, 257 deputados. Se aprovado, segue para sanção do Presidente da República. Se rejeitado, será arquivado, e só será novamente apreciado se houver novo projeto em outra sessão legislativa, ou mediante proposta da maioria absoluta dos membros de qualquer das Casas do Congresso Nacional, caso em que poderá ocorrer na mesma sessão legislativa. (MACHADO, 2018; NASCIMENTO, 2018)

1.3 LEGISLAÇÃO INTERNACIONAL

Na legislação internacional, os agrotóxicos são categorizados em produtos de proteção para plantas (PPP) e substâncias ativas. Os PPPs são compostos químicos usados para proteção da colheita através da morte ou controle de pragas ou ervas. As substâncias ativas tem a mesma função dos PPPs, porém podem ser de origem química ou biológica com a mesma finalidade (ERBACH, 2012).

Na União Europeia, a legislação foi intensificada, em 2009, através do *pesticide package*. 72% da população estava preocupada com o uso de agrotóxicos. Dessa forma, foi elaborado os processos para autorização, estruturação para o uso sustentável, abordagem estatística e novas regras de aplicação dos agrotóxicos que deveriam ser aderidos por vários países membros. (ERBACH, 2012).

Nos Estados Unidos, os agrotóxicos são regulados pela Lei Federal de Inseticidas, Fungicidas e Rodenticidas (Fifra) e a Lei Federal de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos (FFDCA). Em todos os casos, a Lei exige a supervisão

da Agência de Proteção Ambiental (EPA) em estudos e revisão de cada agrotóxicos (EPA, 2019).

Na Ásia, devido a cultura do agrícola, é muito forte a utilização de agrotóxicos nas plantações. Embora diversos países não possuam um controle mais rígidos dos produtos tóxicos, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) relata sobre a grande preocupação da utilização dessas substancias. Diante disso, foi criado o Código de Conduta Internacional sobre Distribuição e Uso de Pesticidas que proporciona uma troca de informações e alertas sobre o uso de cada substâncias baseados na OECD e outros encontros que ocorrem para discutir sobre os agrotóxicos (FAO, 2012)

1.4 CLASSIFICAÇÃO

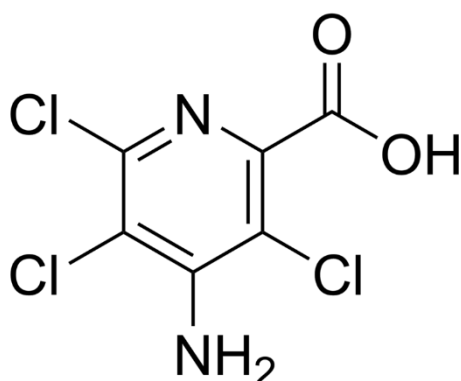
1.4.1 Ácido Piridinocarboxílico (Picloram)

O Picloram (ácido 3,5,6-tricloro-4-amino-2-piridinocarboxílico) é um herbicida da classe dos ácidos piridinocarboxílicos – composto heteroaromáticos que possuem três isômeros: ácido picolínico, ácido nicotínico e ácido isonicotínico (Tabela 1). Ele tem amplo espectro, altamente solúvel em água, empregado para matar plantas de folhas largas indesejadas em pastagens, florestas e jardins. No Brasil, é um dos herbicidas de maior uso em pastagens. Seu uso no controle de ervas daninhas tem sido fundamental no cultivo de grandes áreas agrícolas (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011; SILVA et al., 2012; FRANCESCHI et al., 2019).

O Picloram possui uma acidez fraca ($pK_a = 2,3$) e solubilidade de 560 mg/L, com baixa absorção pelo solo, o que demonstra possuir persistência no ambiente acima de um ano (PEREIRA et al., 1994; SANTOS et al., 2006), sendo seu principal meio de dispersão a lixiviação, escoamento superficial, ou descarga de água subterrânea (TANG et al., 2018). Dessa forma, tornou-se uma substância preocupante para as espécies sucessíveis, principalmente aquática (FRANCESCHI et al., 2019).

A Dose Letal Média (DL_{50}) do Picloram puro em ratos é de aproximadamente 8200 mg/kg. No entanto, seus sais são mais tóxicos. Por exemplo, a DL_{50} de sal de potássio é de 954 e 686 mg/kg para ratos machos e fêmeas, respectivamente (SALLA et al., 2019).

Tabela 2 – Informações gerais sobre o herbicida Picloram.



Nome IUPAC	4-amino-3,5,6-trichloropyridine-2-carboxylic acid
Nome comum	Picloram
Formula Molecular	C ₆ H ₃ Cl ₃ N ₂ O ₂
Massa Molar	241,46 g mol ⁻¹
Grupo Químico	Ácido piridinocarboxílico
Classe	Herbicida
Classificação Toxicológica	I - Altamente Tóxico

Fonte: BRASIL adaptado (2007).

Em teste com animais, o Picloram foi rapidamente absorvido do trato gastrointestinal (meia vida de 0,5 horas) e rapidamente excretado não modificado pela urina; mais que 76% do produto aplicado oralmente foram excretados na urina durante as primeiras seis horas e mais que 87% foi excretado na urina em 72 horas. Por comparação, Picloram foi levemente absorvido através da pele (meia-vida de 12 horas) e, baseando-se na quantidade de Picloram excretado na urina, somente uma pequena fração (0,18%) do Picloram aplicado à pele foi absorvida. Em resumo, estes dados demonstram que Picloram é rapidamente excretado tendo um baixo potencial para acumular no homem durante exposições agudas (PICLORAM, 2014).

Através de testes realizados com roedores em laboratório pode-se definir alguns sinais e sintomas, observados clinicamente, que caracterizam a exposição ao Picloram (Tabela 2):

Tabela 3 – Sinais e Sintomas Clínicos da Exposição Aguda ao Pesticida Picloram.

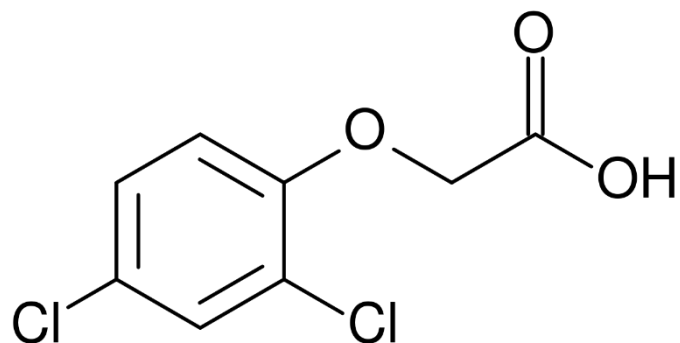
Exposição aguda	Dados de exposição de humanos a doses elevadas são limitados. Pode ocorrer náusea após exposição a grande quantidade. A sua baixa pressão de vapor torna a toxicidade por via inalatória improvável. O picloram não é descrito como sendo um sensibilizante. O seu pó pode ser irritante aos olhos, pele, nariz, garganta e trato respiratório. É improvável que ocorra dano à córnea.
Respiratório	O pó do picloram é irritante para o trato respiratório
Neurológico	Embora não tenham sido relatados ataques epiléticos em humanos, eles ocorreram em animais expostos a doses fatais.
Gaстрintestinal	Pode ocorrer náusea após ingestão de grande quantidade de picloram. O picloram é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal.
Hematológico	Pode ocorrer náusea após ingestão de grande quantidade de picloram. O picloram é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal.
Dermatológico	Moderadamente irritante e lentamente absorvido através da pele.

Fonte: Picloram adaptado (2014).

1.4.2 Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)

Pertencente ao grupo químico dos ácidos ariloxialcanóico (Figura 2), o Pesticida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) é um herbicida seletivo para aplicação no controle de plantas infestantes nas culturas de trigo, milho, soja, arroz (irrigado e de sequeiro), aveia, sorgo, cana-de-açúcar, café e pastagens de Braquiária. O 2,4-D foi um dos primeiros herbicidas de auxina sintética desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial (1940), conhecido como agente laranja, sendo responsável pela morte de milhares de soldados e civis, pela contaminação dos rios e mares e seres vivos presentes nos ambientes em que foi jogado. O baixo custo e com sua nova formulação a partir de sal de colina, que garante menos toxicidade, atualmente, torna o herbicida mais utilizado no mundo (PETERSON, 1967; LUCCHESI, 2005; SONG, 2014; QUEIROZ, 2018).

Tabela 4 – Informações gerais sobre o herbicida 2,4-D.



Nome IUPAC	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
Nome comum	2,4-D
Formula Molecular	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃
Massa Molar	221,02 g mol ⁻¹
Grupo Químico	Ácido ariloxialcanóico
Classe	Herbicida
Classificação Toxicológica	I - Altamente Tóxico

Fonte: BRASIL (2016)

Estudos realizados em animais de laboratório mostraram que o 2,4-D é excretado principalmente através da urina (84 a 94% do 2,4-D administrado, a excreção é facilitada e acelerada quando a urina está alcalina) e a eliminação fecal como via secundária de excreção (2 a 11%). Apenas uma pequena fração de 2,4-D foi encontrado nos tecidos e carcaça (0,4 a 3,0%) após 48 horas. Os mecanismos de toxicidade em humanos não são conhecidos (NORTON 2,4-D, 2017).

Através de testes realizados com roedores em laboratório pode-se definir alguns sinais e sintomas, observados clinicamente, que caracterizam a exposição ao 2,4-D (Tabela 5):

Tabela 5 – Sinais e Sintomas Clínicos da Exposição Aguda ao Pesticida 2,4-D

Exposição aguda	A maior parte dos casos fatais envolvem falência renal, acidose metabólica, desequilíbrio hidroeletrólítico, resultando em uma falência múltipla de órgãos. Pode ocorrer irritação nos olhos, nariz e boca após contato direto.
Ingestão	Podem ocorrer miose, coma, febre, hipotensão, vômito, taquicardia, bradicardia, anormalidades no eletrocardiograma, rigidez muscular, insuficiência respiratória, edema pulmonar e rabdomiólise.
Patofisiologia	Esses agentes são primariamente irritantes, mas foi relatado um caso de alterações degenerativas das células cerebrais e toxicidade do sistema nervoso central.
Cardiovascular	Na overdose, relatou-se taquicardia, bradicardia, anormalidades no eletrocardiograma, assistolia, outras disritmias e hipotensão.
Respiratório	Ingestão de grande quantidade pode causar bradipnéia, insuficiência respiratória, hiperventilação ou edema pulmonar. Um odor peculiar é sentido no ar expelido pelo paciente.
Neurológico	A) Exposição a baixas doses: podem ocorrer, dependendo do composto envolvido, vertigem, dor de cabeça, mal estar e parestesias. B) Exposição a doses elevadas: podem ocorrer, dependendo do composto envolvido, contrações musculares, espasmos, fraqueza profunda, polineurite e perda de consciência. C) Reações idiossincráticas: neuropatias periféricas.
Gastrointestinal	Foram relatadas náuseas, vômito, diarreia e necrose da mucosa gastrointestinal.
Hepático	Foram relatadas elevações nas enzimas lactato desidrogenase, ASAT e ALAT
Genitourinário	Podem ocorrer albuminúria e porfíria; falência renal devido à rabdomiólise também é possível.
Hidro-eletrólítico	A ingestão de 2,4-D pode levar à hipocalcemia, hipercalemia e hipofosfatemia
Hematológico	A trombocitopenia é o efeito hematológico primário. A leucopenia também já foi relatada
Dermatológico	O contato direto pode causar irritação na pele.
Musculoesquelético	Podem ocorrer espasmos musculares, rigidez muscular, elevação da creatina quinase e rabdomiólise
Endócrino	Foi relatada hipoglicemia em caso de intoxicação aguda por 2,4-D. Estudos com animais mostraram decréscimo nos níveis de T3 e T4, mas esse efeito não foi relatado em humanos.

Fonte: 2,4-D NORTON adaptado (2017).

1.4.3 Associação Picloram e 2,4-D

A associação de Picloram e 2,4-D é recomendada devido ao seu baixo custo e fácil acesso. Sua utilização tem o objetivo de controlar as dicotiledôneas indesejáveis e a erradicar o eucalipto na reforma de áreas florestais. Não afeta as monocotiledôneas, pois funciona como um análogo estrutural de um hormônio vegetal, o ácido indolil-3-acético (AIA, auxina), que induz o crescimento celular, o alongamento e a divisão. Sua formulação comercial chama-se Tordon® registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Mapa sob nº 0358709 (BHAT et al., 2015; TORDON, 2017).

O aumento do consumo da combinação dos herbicidas 2,4-D e Picloram ocorreu devido ao desregistro do herbicida, 2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético), um dos três ingredientes que deram origem ao agente laranja, com alto potencial mutagênico (MERU, 1990).

Os efeitos tóxicos agudos do fenoxiacéticos em mamíferos podem provocar lesões degenerativas hepáticas e renais, lesões no Sistema Nervoso Central (SNC), neurite periférica retardada. Dentre os principais sintomas de intoxicação aguda e sintomas primários destacam-se: perda de apetite, irritação da pele exposta, enjôo e irritação do trato gastrintestinal, vômitos, fasciculação muscular, perda da visão, memória e concentração, dermatite severa, tóxico para os rins e fígado e causa morte por fibrilação ventricular. Como sintomas secundários: esgotamento, vômitos, dores torácicas e abdominais, fraqueza muscular, fasciculação muscular, confusão mental, convulsões e coma; e como sintomas da intoxicação crônica: acúmulo no tecido adiposo, inibição da função imunológica do timo, efeitos mutagênicos em microrganismo, células humanas e animais, considerado como alterador do sistema endócrino e reprodutor, diminui o número de esperma e sua mobilidade (OPAS, 1997; GOMES, 2017).

2 TOXICOLOGIA

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo, sob condições específicas de exposição. Além disso, é a ciência que investiga experimentalmente a ocorrência, a natureza, a incidência, os mecanismos e os fatores de risco dos efeitos deletérios dos agentes químicos. A toxicologia abrange uma vasta área do conhecimento, onde atuam profissionais de diversas formações: Química Toxicológica, Toxicologia

Farmacológica, Clínica, Forense, Ocupacional, Veterinária, Ambiental, Aplicada a Alimentos, Genética, Analítica, Experimental e outras áreas (OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2014).

2.1 ECOTOXICOLOGIA

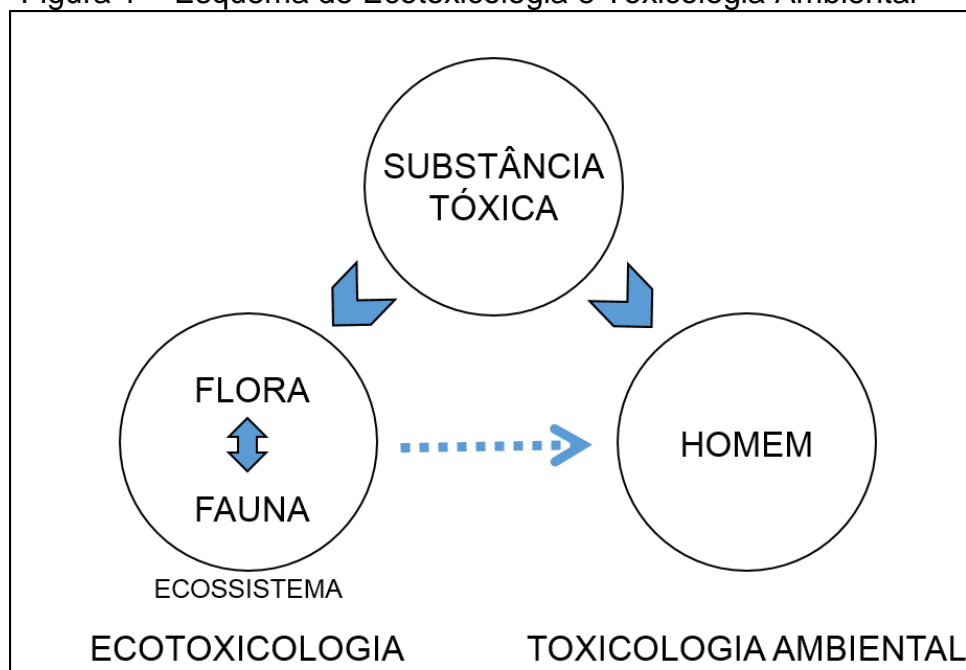
A Ecotoxicologia foi definida por Truhaut (1977) como “o ramo da Toxicologia que estuda os efeitos tóxicos das substâncias naturais e artificiais, sobre os organismos vivos que constituem a biosfera”. De acordo com Rubinger (2009), a Ecotoxicologia compreende as áreas de estudo: das emissões e entradas de poluentes no ambiente abiótico, distribuição e destino nos diversos compartimentos; da entrada e destino dos poluentes nas cadeias biológicas e suas formas de transferência como alimento via cadeia trófica; e avaliação qualitativa e quantitativa dos efeitos toxicológicos dos poluentes ao ecossistema com consequências ao homem. A ecotoxicologia é uma ciência multidisciplinar que engloba várias áreas de estudo, tais como biologia, química (orgânica, analítica e bioquímica), anatomia, genética, fisiologia, microbiologia, ecologia, ciências dos solos, das águas e atmosféricas, epidemiologia, estatística e direito.

Dessa forma, compreende-se o conceito da ecotoxicologia como o sentido mais amplo de toxicologia, pois estuda os efeitos toxicológicos no ecossistema (meio abiótico e biótico), como solo, ar, água, flora e fauna, incluindo o homem. Contudo, é importante diferenciar ambos os conceitos, pois a Toxicologia Ambiental está apenas estudando os impactos das substâncias químicas no homem, enquanto que a Ecotoxicologia avalia o todo, incluindo os efeitos que podem atingir ou não os seres humanos (Figura 1).

2.2 CONCENTRAÇÃO LETAL (CL₅₀) E DOSE LETAL (DL₅₀)

Concentração Letal e Dose Letal podem ser estabelecidas de acordo com protocolos validados por órgãos de normalização técnica nacional ou internacional: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (Cetesb), Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) e Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) (Tabela 5).

Figura 1 – Esquema de Ecotoxicologia e Toxicologia Ambiental



Fonte: Autor (2019).

Tabela 6 – Normas validadas para testes ecotoxicológicos em peixes de água doce.

	Normas	Identificação
CETESB	L5.019	Teste de toxicidade aguda com peixes. Sistema Estático, Semi-estático e de fluxo contínuo.
ABNT	NBR 15088	Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae)
OECD	203/1992	Fish, Acute Toxicity Test
EPA	850.1075	Fish Acute Toxicity Test, Freshwater and Marine

Fonte: Autor (2019).

A Concentração Letal Média é a concentração de um agente num meio que causa mortalidade em cinquenta por cento (50%) da população exposta, durante um determinado período de tempo, por via respiratória. A Dose Letal Média é a dose calculada de um agente num meio que causa mortalidade em cinquenta por cento (50%) da população animal em condições bem definidas, por qualquer via de administração, exceto por inalação (SOUZA, CUNEGONDES, MENDONÇA, 2012; CETESB, 2019).

2.3 CEO E CENO

Concentração de Efeito não Observado: maior concentração de agente tóxico que não causa efeito deletério significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste (COSTA et al., 2008; USEPA, 2002).

Concentração de Efeito Observado: menor concentração de agente tóxico que causa efeito deletério significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste (COSTA et al., 2008; USEPA, 2002).

3 BIOMARCADORES

Os biomarcadores são utilizados para compreensão de substâncias ou seus produtos de biotransformação, com a intenção de avaliar a intensidade da exposição e o risco à saúde ou estimar o impacto de contaminantes emergentes em organismos aquáticos, podendo ser classificados em três tipos: de exposição, de efeito e de suscetibilidade (Figura 2), os quais são instrumentos que possibilitam identificar a substância tóxica ou uma condição adversa antes que sejam evidenciados danos à saúde (AMORIM, 2003; PERUSSOLO, 2018).

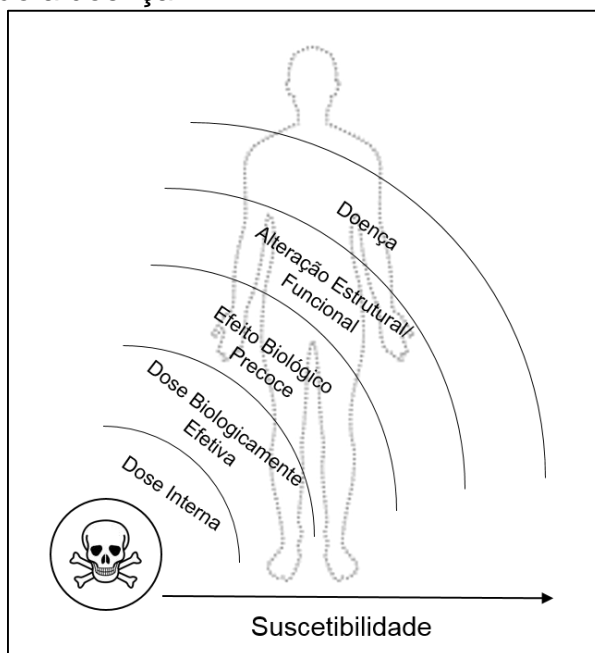
Os Biomarcadores de Exposição podem ser usados para confirmar e avaliar a exposição individual ou de um grupo, para uma substância em particular, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna. Para determinação, utiliza-se fluídos biológicos como sangue, urina, ar exalado. E sua quantificação ocorre por meio de uma análise iniciada pelo total absorvido de substância química até o sítio alvo. Como somente uma fração da dose alcança o sítio alvo, os biomarcadores de exposição também são conhecidos como de dose interna (AMORIM, 2003).

Os Biomarcadores de Efeito podem ser usados para documentar as alterações pré-clínicas ou efeitos adversos à saúde decorrentes da exposição e absorção da substância química. Dessa forma, a ligação dos biomarcadores entre exposição e efeitos contribui para a definição da relação dose-resposta. O ideal para utilização de um biomarcador de efeito é medir uma alteração biológica ainda em estágio reversível, quando não ocorre agravo à saúde. Os biomarcadores de efeito dividem-se em: biomarcadores de nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, genotoxicidade e neurotoxicidade (subdivido em em três enfoques: neurofisiológico, neurocomportamental e neuroquímico) (AMORIM, 2003).

Os Biomarcadores de Suscetibilidade permitem elucidar o grau de resposta da exposição provocada nos indivíduos. Através desse tipo de biomarcador

compreende-se porque alguns indivíduos adoecem e outros não nas mesmas condições ambientais. A predisposição genética, além de fatores externos, tais como idade, dieta, estilo de vida, podem influenciar/afetar a suscetibilidade de indivíduos expostos a substâncias químicas (AMORIM, 2003).

Figura 2 – Esquema dos bioindicadores de exposição, de efeito e suscetibilidade do momento da exposição a doença.



Fonte: Autor (2019).

3.1 PARÂMETRO COMPORTAMENTAL

Dentro das áreas da toxicologia, existe a Toxicologia Comportamental que é a mudança de comportamento, induzida pelo estresse, que excede o limite normal de variabilidade, podendo ser uma resposta toxicológica. A escolha de habitat, captura de presas e fuga de predadores são classes de comportamento que afetam as variáveis demográficas fundamentais como nascimento e morte e, conseqüentemente, os padrões da dinâmica de populações e a estrutura das comunidades. Dessa forma, através da Toxicologia Comportamental é possível avaliar parâmetros comportamentais que indicarão a exposição a substâncias químicas, principalmente, nocivas (ANHOLT, 1997; MAGALHÃES; FERRAO-FILHO, 2008).

Para estudar alterações no comportamento devido à exposição a contaminantes na água surgiu a Ecotoxicologia Comportamental Aquática que é uma ciência que estuda como o comportamento é modificado com contaminantes ambientais. As alterações comportamentais podem representar respostas

compensatórias reversíveis para imitar efeitos esperados ou efeitos irreversíveis de um agente tóxico em um mecanismo ou expressão comportamental após o início de processos toxicocinéticos e toxicodinâmico, como o caso da inibição da enzima acetilcolinesterase para os organofosforados e carbamato (GERHARDT, 2007).

3.2 PARÂMETRO HISTOLÓGICO

A investigação da histopatológica em peixes pode avaliar a saúde da população e de todo o ecossistema aquático. Estudos no fígado e em brânquias, órgão considerados mais sensíveis, demonstram alterações decorrentes de poluição aquática (DEVI, MISHRA, 2013).

O parâmetro histológico é considerado um dos indicadores da exposição de suma importância para identificação e quantificação de alterações teciduais de órgãos internos causados por efeitos tóxicos, pois permite uma rápida avaliação da saúde desses organismos (SCHWAIGER et al., 1997; SILVA, 2004).

Para avaliação dessas alterações são realizadas três fases: na primeira, avalia-se o animal em estudo, em seguida, é avaliado e contabilizado as lesões observadas, e por fim, calcula-se o Índice de Alteração Histopatológica (IAH) para comparação da severidade das lesões nos órgãos avaliados (Tabela 6).

Tabela 7 – Etapas para identificação de alterações histológicas.

Etapa 1 - Cálculo do Valor Médio de Alteração (VMA) (SCHWAIGER et al., 1997).	
Grau 1	Ausência de alteração histopatológica;
Grau 2	Ocorrência de lesões pontualmente localizadas;
Grau 3	Lesões amplamente distribuídas pelo órgão.
Etapa 2 - Estágio das lesões observadas nos animais expostos (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994)	
Estágio I (E1)	As alterações não são consideradas muito severas, não afetando o funcionamento do órgão;
Estágio II (E2)	As alterações são moderadas comprometendo o funcionamento do órgão, as alterações são lesões reversíveis, mas se mantidas em exposição crônica podem levar a alterações graves;
Estágio III (E3)	As alterações são severas comprometendo o funcionamento do órgão sendo, irreversíveis.
Etapa 3 - Cálculo do Índice de Alteração Histopatológica (IAH) (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994)	
$IAH = 10^0 \sum E1 + 10^1 \sum E2 + 10^2 \sum E3$	
00-10 = funcionamento normal do tecido;	
11-20 = danificação leve para moderada do tecido;	
21-50 = modificação moderada para severa do tecido;	
51-100 = modificação severa do tecido;	
> 100 = danificação irreparável do tecido.	

Fonte: Autor (2019)

4 *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) COMO MODELO ANIMAL PARA TESTES TOXICOLÓGICOS: UMA ANÁLISE CIENCIOMÉTRICA

Os modelos animais são ideais para estudo científico em diversas áreas de pesquisas. Através dele, pode-se ter uma melhor compreensão e direcionamento para evolução das pesquisas com humanos. Infelizmente, mesmo com o avanço das pesquisas *in vitro* e *in silico*, ainda é necessário a utilização das pesquisas *in vivo* devido a maior proximidade com os resultados da fisiologia humana e animal. As espécies mais comuns como modelo são camundongos, ratos, coelhos e macacos. Com a Lei Arouca (nº 11.794/08), os animais precisam ser definidos durante o planejamento dos projetos e deve seguir às normas para a sua utilização (FERREIRA, HOCHMAN, BARBOSA, 2005; AMORIM, 2014; MENDES, SOUZA, 2017).

Para selecionar uma nova espécie para testes toxicológicos, é necessário que o animal possua algumas características determinantes. Primeiramente, deve ser *sensível*, ou seja, essa espécie deve demonstrar sensibilidade a uma diversidade de agentes químicos. Dessa forma, será possível garantir resultados precisos durante a repetibilidade e reprodutibilidade dos testes. Além disso, são necessários conhecimentos prévios da biologia da espécie, como reprodução, hábitos alimentares, fisiologia e comportamento, tanto para o cultivo quanto para a realização dos testes (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006; RASMSDORF, 2011).

Os peixes vêm sendo amplamente utilizados como modelo para diversos estudos. Suas características fisiológicas e histológicas, respostas a substâncias e facilidade de criação e manutenção os tornam uma boa escolha para experimento. O *Danio rerio* é um peixe comumente utilizado em estudos genéticos, de desenvolvimento, farmacológicos, e de comportamentos sociais (BLASER; VIRA 2014).

Até o momento, poucos são os estudos conduzidos com peixes de água doce da América do Sul para avaliação de toxicidade e muito menos ainda se conhece a respeito das respostas biológicas das espécies de peixes endêmicas brasileiras (RASMSDORF, 2011).

Um peixe da região amazônica com potencial para modelo animal é o *Colossoma macropomum*, com vários estudos na área da toxicologia e comportamental (BLASER; VIRA 2014; AMORIM, 2014)

O *Colossoma macropomum*, pertencente a subfamília Serrasalminae (Teleostei, Characiformes, Characidae), conhecido popularmente como Tambaqui, é

um peixe de água doce, nativo da América do Sul, nas bacias dos rios da Amazônia e de Orinoco, podendo alcançar um metro de comprimento e 30 kg de peso em sua fase adulta (Figura 3). Resistente a pH entre 5 a 7,8 e temperatura de 22°C a 28°C. Sua alimentação muda nas suas fases de vida, em geral, consomem frutas, grãos, zooplâncton, insetos, caracóis e plantas em decomposição (GOULDING; CARVALHO, 1982; PINHEIRO-SOUSA et al., 2018).

Figura 3 – Imagem do *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) em fase adulta.

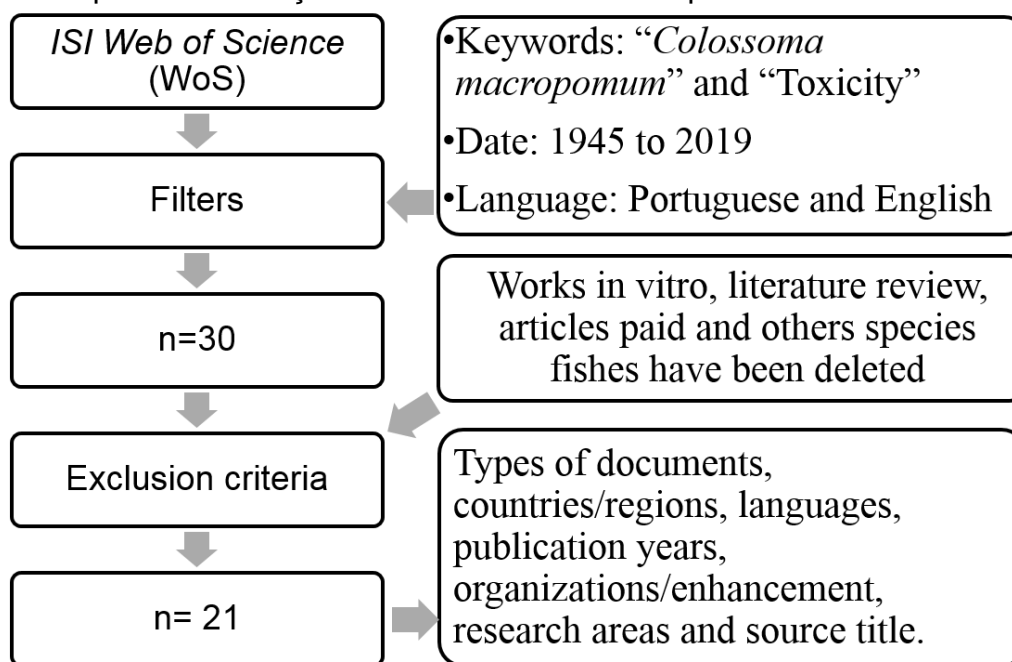


Fonte: klimanaturali.org. Acesso em: 09 nov. 2019.

Atualmente, *Colossoma macropomum*, devido à facilidade de cultivar e a demanda por informações sobre seu estado de saúde no ambiente, é visto como um potencial “animal modelo” para o monitoramento ambiental na região amazônica (CASANOVA, 2008; ARANHA, 2013)

Foram realizadas as buscas na base de dados ISI Web of Science (WoS) da Clarivate Analytics (Figura 4). As palavras-chave utilizadas foram “*Colossoma macropomum*” e “toxicity”, procuradas em títulos, palavras-chaves e resumo no período de 1945 a junho de 2019. A busca gerou 30 referências que passaram por refinamento de acordo com o tema, selecionando apenas 21. Foram incluídos apenas os documentos que utilizaram a espécie *in vivo* do *Colossoma macropomum* em testes de toxicidade. Os instrumentos utilizados foram “tipos de documentos”, “países/regiões”, “idiomas”, “anos de publicação”, “organizações/aprimoramento”, “áreas de pesquisas” e “título da fonte”. Utilizou-se as ferramentas da própria plataforma WoS “Analyze Results” para análises de dados.

Figura 4 – Esquema de seleção de trabalhos científicos para análise cienciométrica.



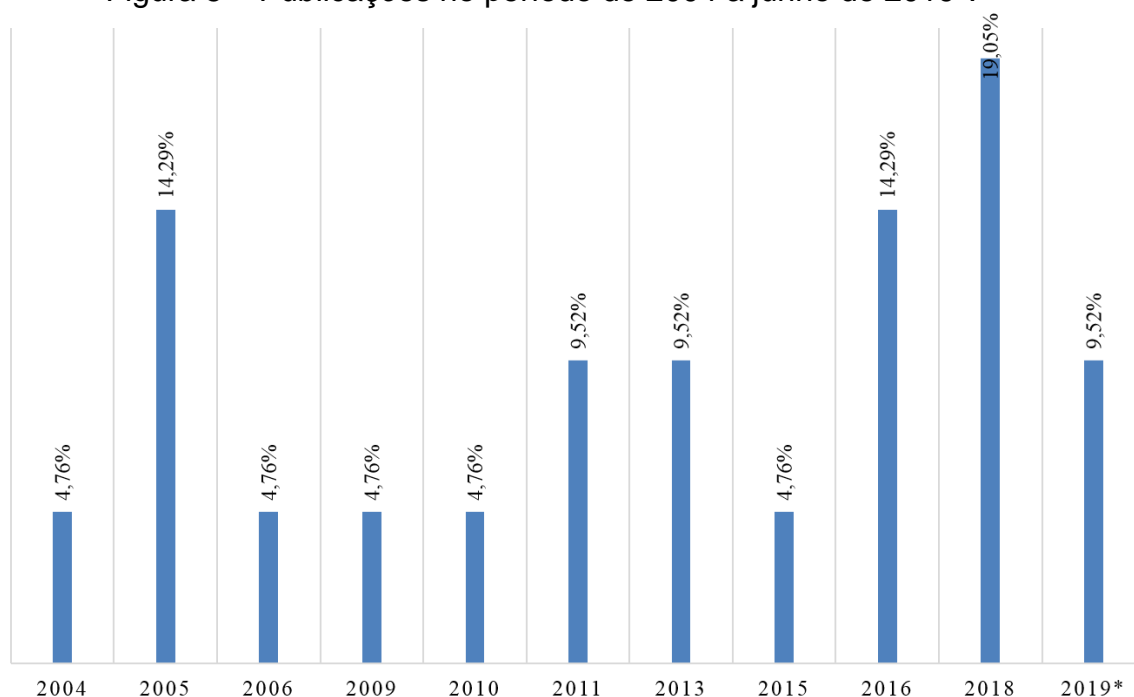
Fonte: Autor (2019)

Na busca por tipos de documentos foram encontrados 21 artigos (100%), sendo que os países com maior incidência de publicação foi o Brasil, com o total de 20 artigos (90,48%) e o idioma predominante foi em inglês, sendo 19 (95,24%).

As publicações contidas no banco de dados, embora realizadas no período mais longo de 1945, iniciaram no ano de 2004 (1; 4,76%). O primeiro artigo foi escrito por Costa et al. (2004) que abordava sensibilidade do *Colossoma macropomum* exposto agudamente ao nitrito.

O ano com maior número de publicações ocorreu em 2018 com quatro publicações (19,05%) (Figura 5).

Figura 5 – Publicações no período de 2004 a junho de 2019*.

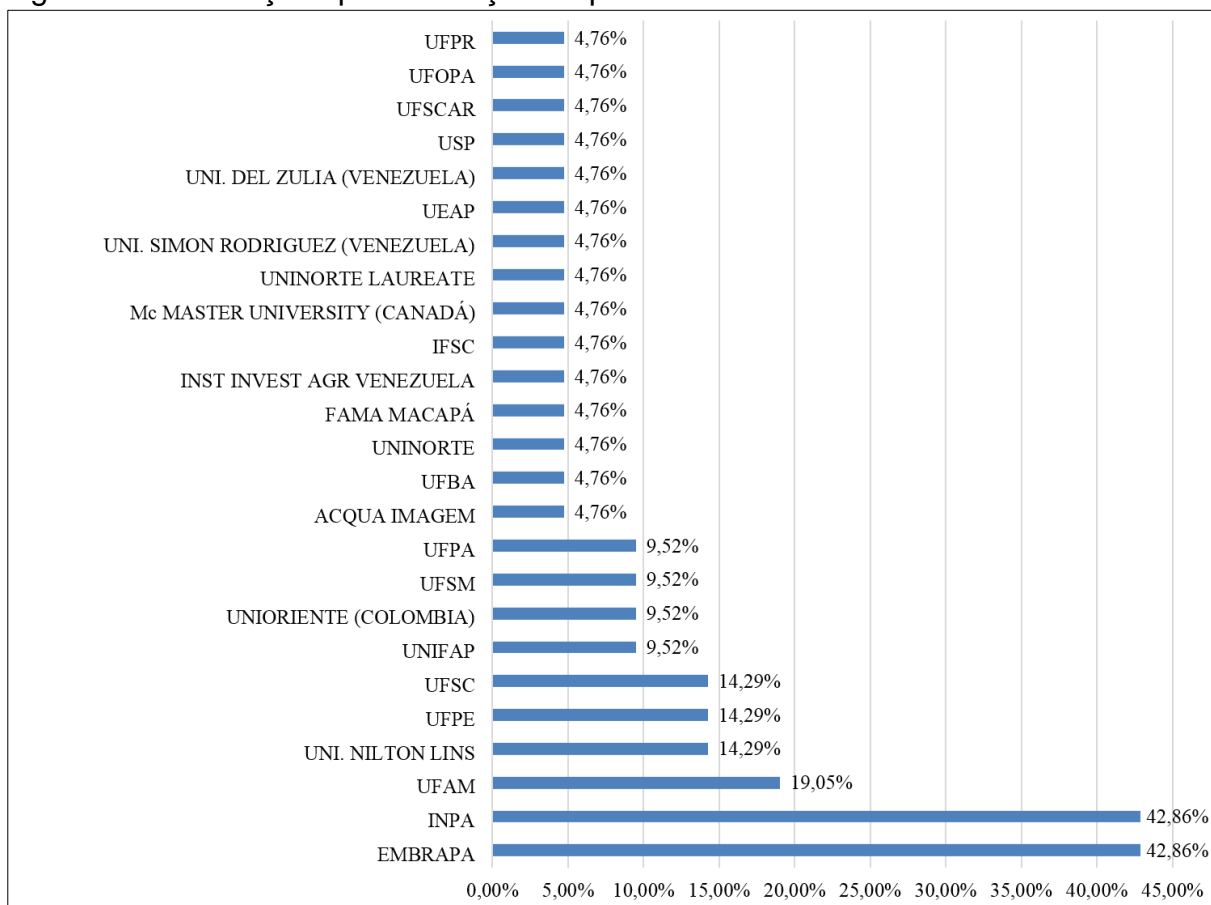


Fonte: Autor (2019).

As instituições responsáveis pelo maior número de publicações foram a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (09; 42,86%) e a Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) (09; 42,86%). As universidades que mais publicaram estão localizadas no norte do Brasil: Universidade Federal do Amazonas com 4 artigos (19,05%) e Universidade de Nilton Lins com 3 (14,29%) (Figura 6).

Algumas instituições estrangeiras também realizam pesquisas utilizando a espécie *Colossoma macropomum*. Ao total foram quatro pesquisas, sendo três (14,29%) na Venezuela, e um (9,52%) na Colômbia.

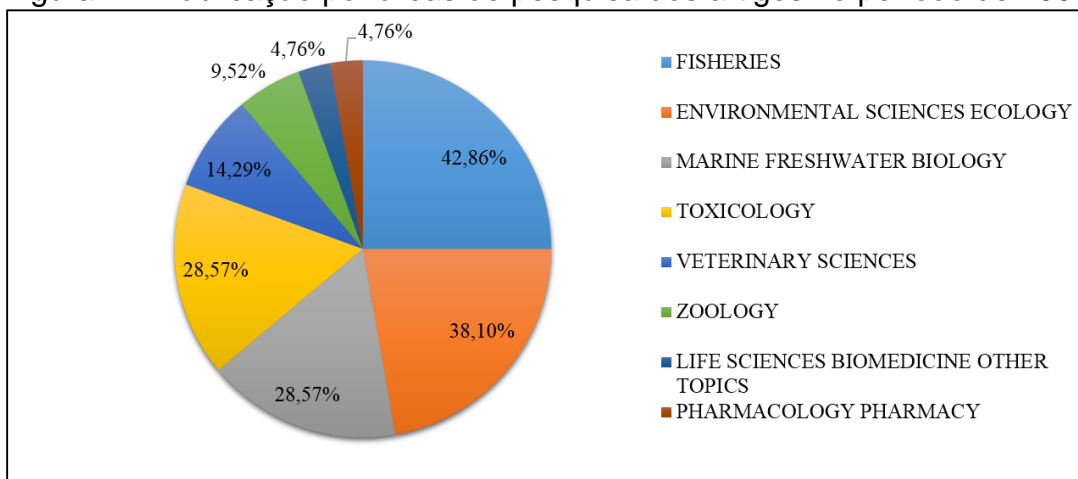
Figura 6 – Publicações por instituição no período de 2004 a 2019.



Fonte: Autor (2019).

Fisheries (42,86%), Environmental Sciences Ecology (38,10%), Marine Freshwater Biology (28,57%), Toxicology (28,57%), Veterinary Sciences (14,29%), Zoology (9,52%), Life Sciences Biomedicine Other Topics (4,76%) e Pharmacology Pharmacy (4,76%) foram as áreas de publicação dos artigos (Figura 7).

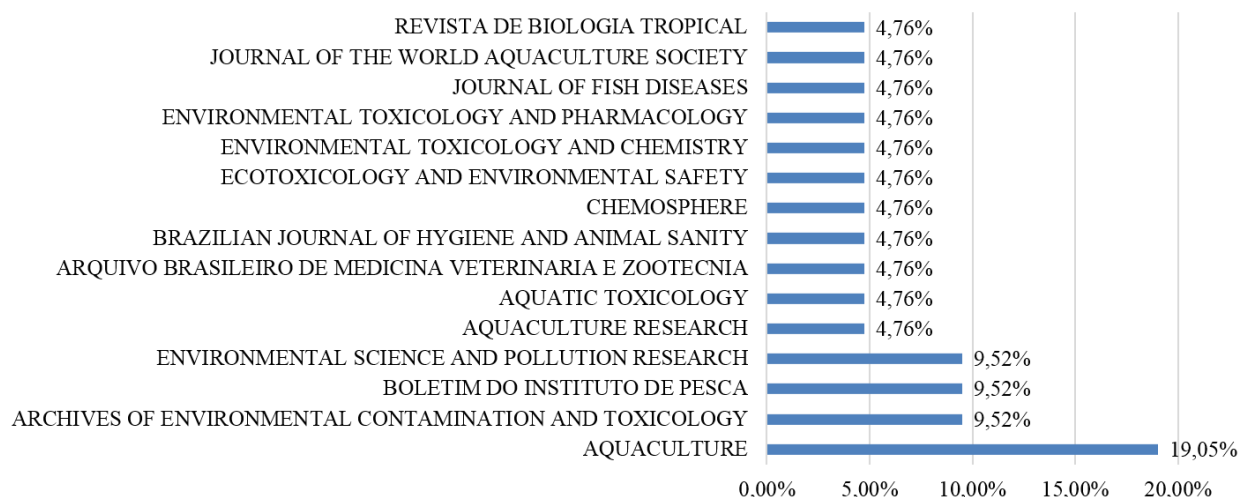
Figura 7 – Publicação por áreas de pesquisa dos artigos no período de 2004 a 2019.



Fonte: Autor (2019).

A revista que mais publicou, de acordo com tema, foi a Aquaculture (19,05%), seguido de Archives of Environmental Contamination and Toxicology (9,52%), Boletim do Instituto de Pesca (9,52%), Environmental Science and Pollution Research (9,52%) (Figura 8).

Figura 8 – Revistas que publicaram as pesquisas no período de 2004 a 2019.



Fonte: Autor (2019).

Os resultados apresentados fornecem informações úteis sobre a utilização *in vivo* do *Colossoma macropomum* em modelos toxicológicos. Suas principais pesquisas são realizadas em instituições brasileiras publicados principalmente nas áreas da pesca, do meio ambiente e da toxicologia. Esses dados demonstram a tendência do *Colossoma macropomum* se tornar um modelo animal alternativo nos próximos anos devido a facilidade na reprodução ou aquisição do mesmo e sua sensibilidade a substâncias químicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA). **Methods For Measuring The Acute Toxicity Of Effluents And Receiving Waters To Freshwater And Marine Organism**. 5 ed. 2002.

Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA). **Pesticide Registration**. 2019. Disponível em: < <https://www.epa.gov/pesticide-registration/about-pesticide-registration>>. Acesso em: 12 nov. 2019.

AMORIM, J.A.S. Avaliação do espectro de reação de um sistema de diagnóstico por vídeo rastreio de peixes zebra (*Danio rerio*) expostos a cinco tóxicos distintos. Dissertação (Toxicologia e Contaminação Ambientais). Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Porto, 2014.

AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, p. 158-170, 2003.

ANHOLT, B.R. How should we test for the role of behaviour in population dynamics? **Evolutionary Ecology**, v. 11, n. 6, p. 633-640, 1997.

ARANHA, R.C. **Potencial de toxicidade dos herbicidas glifosato e imazetapir em *Colossoma macropomum* (Pisces)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia. Santarém, Pará. 2013.

ARIAS, A.R.L et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, p. 61-72, 2007.

BHAT, S.V. et al. *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae 3841 adapts to 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid with “auxin-like” morphological changes, cell envelope remodeling and upregulation of central metabolic pathways. **PLoS One**, v. 10, n. 4, 2015.

BLASER, R. E.; VIRA, D. G. Experiments on learning in zebrafish (*Danio rerio*): a promising model of neurocognitive function. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 42, p. 224-231, 2014.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização, de agrotóxicos, seus componentes, e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 abr. 1989. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm>. Acesso em: 23 set. 2018.

BRASIL. Lei nº 9782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 jan. 1999. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9782.htm>. Acesso em: 02 out. 2018.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 jan. 2002. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm>. Acesso em: 23 set. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância em Saúde (DIVISA). Agrotóxico, 2011. Disponível em <<http://portalms.saude.gov.br/vigilancia-em-saude/vigilancia-ambiental/vigipeq/contaminantes-quimicos/agrotoxicos>>. Acesso em 23 set. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância em Saúde. Agrotóxico, 2017. Disponível em <<http://portalms.saude.gov.br/artigos/40075-agrotoxicos>>. Acesso em 23 set. 2018.

BORSOI, A. et al. Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente. **Acta Iguazu**, v.3, n.1, p.86-100, 2014.

CASANOVA, F.M. **Caracterização *in silico* de biossensores em *Colossoma macropomum*: diagnostico molecular e monitoramento de ambientes impactados**. 2008. 121 f. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva). Instituto de Pesquisas da Amazônia, 2008.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) 1980. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 1ª edição, 2006.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). INFORMAÇÕES ECOTOXICOLÓGICAS. 2019. Disponível em: <https://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ECO_HELP.htm>. Acesso em: 12 nov. 2019.

COSTA, L.F; PIRES, G.L.P. Análise histórica sobre a agricultura e o advento do uso de agrotóxicos no Brasil. **ETIC-ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA-ISSN 21-76-8498**, v. 12, n. 12, 2016.

COSTA, C.R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

DEVI, Y.; MISHRA, A. Histopathological Alterations in Gill and Liver Anatomy of Fresh Water, Air Breathing Fish *Channa Punctatus* after Pesticide Hilban® (Chlorpyrifos) Treatment. **Advances in Bioresearch**, v. 4, n. 2, 2013.

ERBACH, G. Pesticides legislation in the EU. **Library Briefing**. 2012. Disponível em:

<http://www.europarl.europa.eu/RegData/bibliotheque/briefing/2012/120291/LDM_BRI%282012%29120291_REV1_EN.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2019

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M.V. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cirurgica Brasileira**, 2005.

FRANCESCHI, M. et al. Liming on picloram leaching in dystrophic Red Yellow Latosol. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 23, n. 2, p. 103-108, 2019.

GERHARDT, A. Aquatic behavioral ecotoxicology—prospects and limitations. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 13, n. 3, p. 481-491, 2007.

GOMES, D.S.F. **Os efeitos do ácido 2, 4-diclorofenoxiacético e do tordon® no desenvolvimento embrionário e no metabolismo energético do peixe-zebra (*Danio rerio*)**. Dissertação (Mestrado em Produtos Bioativos e Biociências). Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), 2017.

GOULDING, M; CARVALHO, M.L. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 1, n. 2, p. 107-133, 1982.

Instituto Nacional de Câncer (INCA). Ministério da Saúde. Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva acerca dos agrotóxicos. Rio de Janeiro: Inca, 2015. Disponível em:<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf>. Acesso em 09 de novembro de 2018.

KNISS, A.R. Long-term trends in the intensity and relative toxicity of herbicide use. **Nature communications**, v. 8, p. 2017.

LOPES, C.V.A; ALBUQUERQUE, G.S.C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, p. 518-534, 2018.

LUCCHESI, G. Agrotóxicos-construção da legislação. Biblioteca Digital da Câmara dos Deputados, 2005. Disponível em: <http://bd.camara.gov.br/bd/bitstream/handle/bdcamara/2227/agrotoxicos_construcao_lucchese.pdf?sequence=1>. Acesso em: 12. Out. 2018.

MACHADO, R. Comissão aprova mudança na lei dos agrotóxicos, que deverão ser chamados de pesticidas pela nova legislação. Câmara dos Deputados, 2018. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/camaranoticias/radio/materias/RADIOAGENCIA/559570-COMISSAO-APROVA-MUDANCA-NA-LEI-DOS-AGROTOXICOS,-QUE-DEVERAO-SER-CHAMADOS-DE-PESTICIDAS-PELA-NOVA-LEGISLACAO.html>>. Acesso em: 11 nov. 2018.

MAGALHÃES, D.P.; FERRAO-FILHO, A. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 3, 2008.

MENDES, M.M.P.G; SOUZA, C.S.A.J. Aplicação de modelos animais na pesquisa biomédica experimental. **Revista de Saúde da Faciplac**, v. 4, n. 2, 2017.

MERU, S. et al. Persistence and lateral movement of 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid and picloram on power line rights-of-way. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 19, n. 4, p. 572-577, 1990.

MORAGAS, W.M.; SCHNEIDER, M.O. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. **Caminhos de Geografia**, v. 3, n. 10, p. 26-40, 2003.

NASCIMENTO, N. Veja os próximos passos na luta contra a aprovação do Pacote do Veneno. **MST – Movimento dos Trabalhadores Rurais Sem Teto**, 2018. Disponível em: < <http://www.mst.org.br/2018/07/13/veja-os-proximos-passos-na-luta-contra-a-aprovacao-do-pacote-do-veneno.html>>. Acesso em: 12 nov. 2018.

NORTON: 2,4-D. São Paulo: Dow AgroSciences Industrial Ltda, [2017]. Bula do Pesticida. Disponível: < <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Herbicidas/NORTON.pdf>>. Acesso em: 01 out. 2019.

OGA, S. CAMARGO, M.M.A. BATISTUZZO, J.A. **Fundamentos de Toxicologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2014.

Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO). Guidance For Harmonizing Pesticide Regulatory Management In Southeast Asia. 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i2806e.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2019.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília: Ministério da Saúde, Organização Pan-americana da Saúde/OMS, 1997. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livro2.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2018.

PEREIRA, L.F; CAMPELLO, A.P.; SILVEIRA, O. Effect of tordon 2, 4-D 64/240 triethanolamine BR on the energy metabolism of rat liver mitochondria. **Journal of Applied Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 21-26, 1994.

PERES, F.; MOREIRA, J.C. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2003.

PERUSSOLO, M.C. **Efeitos tóxicos de concentrações ambientalmente relevantes de paracetamol em peixes *Rhamdia quelen* (Jundiá)**, 2018.

PETERSON, G.E. The discovery and development of 2, 4-D. **Agricultural history**, v. 41, n. 3, p. 243-254, 1967.

PICLORAM: Picloram. São Paulo: Dow AgroSciences Industrial Ltda, [2014]. Bula do Pesticida. Disponível: < https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/picloram-nortox-240-si_10631.html>. Acesso em: 15 out. 2018.

PIGNATI, W.A. et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p. 3281-3293, Out. 2017.

PORTO, M.F.S. O trágico Pacote do Veneno: lições para a sociedade e a Saúde Coletiva. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, p. e00110118, 2018.

QUEIROZ, M.F.P. **Espectro de gotas e características físicas de caldas com adjuvantes tensoativos e os herbicidas glyphosate e 2, 4-D, isolados e em mistura**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrônomicas. UNESP. Botucatu, 2018

RUBBO, J.P. **Remoção do herbicida 2, 4-D por adsorção em carvão ativado em pó**. Dissertação (Trabalho de Conclusão de Curso). Departamento de Engenharia química. UFRGS. Porto Alegre, 2015.

RAMSDORF, W. **Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes**. Tese (Doutorado em Genética). Programa de Pós Graduação em Genética. Universidade Federal do Paraná (UFPR). Curitiba, Paraná. 2011.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 6.ed. Londrina: Independente, 2011. 697p.

RUBINGER, C.F. Seleção de métodos biológicos para a avaliação toxicológica de efluentes industriais. **Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte**, Brazil, 2009.

SAMPAIO, R.M.O.; NETO, J.C.G. O paradigma da intensa utilização de agrotóxicos no brasil sob o contexto da mundialização da agricultura. **Revista de Direito Agrário e Agroambiental**, v. 4, n. 1, p. 111-129, 2018.

SALLA, G.B.F. et al. Kinetics of the metabolic effects, distribution spaces and lipid-bilayer affinities of the organo-chlorinated herbicides 2, 4-D and picloram in the liver. **Toxicology Letters**, 2019.

SANTOS, M. V. et al. Eficácia e persistência no solo de herbicidas utilizados em pastagem. **Planta Daninha**, v. 24, n. 2, p. 391-398, 2006.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **J. Aquat. Ecosyst Stress Recov**, v. 6, n. 1, p. 75-86, 1997.

Silva A. G. **Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Área de Concentração Zoologia). Universidade Estadual de Londrina, Paraná. 2004.

SILVA, L. O. C. et al. Ação de *Eleusine coracana* na remediação de solos contaminados com picloram. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 30, n. 3, p. 627-632, 2012.

SOLOMON, K.R.; STEPHENSON, G.R.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Praguicidas e o Meio Ambiente. International Life Sciences Institute do Brasil (ILSI Brasil). São Paulo, 2010.

SONG, Y. Insight into the mode of action of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) as an herbicide. **Journal of integrative plant biology**, v. 56, n. 2, p. 106-113, 2014.

SOUZA, T. J. S. M.; CUNEGONDES, A. ; MENDONCA, F. P. . Determinação da Concentração Letal Média (CL50) do petróleo em *Copella nattereri* (Characiformes: Lebiasinidade) na região do Médio Solimões. In: **XXIX Congresso Brasileiro de Zoologia**, 2012, Salvador-BA. Anais do XXIX Congresso Brasileiro de Zoologia, 2012.

TANG, G. et al. Developing ionic liquid forms of picloram with reduced negative effects on the aquatic environment. **Science of the Total Environment**, v. 616, p. 128-134, 2018.

TAVELLA, L. B.; SILVA, I.N; FONTES, L. O; DIAS, J. R. M. SILVA, M. I. L. Uso de Agrotóxicos na Agricultura e Suas Consequências Toxicológicas e Ambientais. **Agropecuária Científica no Semi-Árido (ACSA)**, 7(2): 2011.

TORDON: Picloram e 2,4-D. São Paulo: Dow AgroSciences Industrial Ltda, [2017]. Bula do Pesticida. Disponível: <<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Herbicidas/tordon260218.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2018.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 1, n. 2, p. 151-173, 1977.

CAPÍTULO II – TOXICIDADE AGUDA DA ASSOCIAÇÃO DOS HERBICIDAS 2,4-D E PICLORAM PARA PEIXES DA ESPÉCIE *Colossoma macropomum*

RESUMO

A associação entre um ou mais agrotóxicos tem se tornado uma preocupação devido à falta de pesquisas e seus riscos desconhecidos à saúde humana e ao meio ambiente. O presente estudo teve como objetivo determinar a concentração letal média (CL₅₀) em 96 horas dos herbicidas associados Picloram e 2,4-D em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) através de protocolos internacionais de intoxicação aguda. As concentrações testadas foram 3,5, 5, 6, 7 e 8 mg/L. Para o cálculo da CL₅₀, utilizou-se método de Trimmed Spearman-Kärber. A CL₅₀ encontrada foi de 5,54 mg/L, próxima dos valores determinadas por outros autores. Contudo, ainda há necessidade mais pesquisas para avaliar os riscos e danos que podem ser ocasionados por esse herbicida.

Palavras Chaves: ecotoxicologia; agrotóxico; concentração letal.

**ACUTE TOXICITY OF THE ASSOCIATION OF 2,4-D AND PICLORAM HERBICIDES
FOR FISH OF THE SPECIES *Colossoma macropomum***

ABSTRACT

The association between one or more pesticides has become a concern due to lack of research and its unknown risks to human health and to environment. This study aimed to determine the lethal concentration 50% (LC₅₀) in 96 hours of the associated herbicides Picloram and 2,4-D in tambaqui (*Colossoma macropomum*) fingerlings through acute intoxication in international protocols. The concentrations tested were 3.5, 5, 6, 7 and 8 mg/L. The LC_{50-96h} was calculate through the Trimmed Spearman-Kärber method. The LC₅₀ found was 5.54 mg/L, close to the values determined by other authors. However, further research is still needed to assess the risks and damage that can be caused by this herbicide.

Keywords: ecotoxicology. pesticide; lethal concentration.

1 INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são considerados, segundo a constituição brasileira, substâncias químicas destinadas ao controle, destruição ou prevenção de agentes patogênicos para plantas, animais e pessoas (BRASIL, 1989). Embora eles sejam utilizados na agricultura, para fins de proteção de plantações, e na saúde pública, para controlar doenças infecciosas transmitidas por vetores, a aplicação inadequada em excesso ou descontrolada é um fator a mais que induz a contaminação do meio ambiente a curto e a longo prazo, pois seus resíduos podem persistir por anos no local de aplicação, acarretando uma série de efeitos nocivos à saúde humana e ao próprio meio ambiente (DAMALAS; KOUTROUBAS, 2016; PEREIRA et al., 2018; LINDOVA et al., 2019).

Nos últimos anos, o consumo de agrotóxicos tem aumentado consideravelmente, dentre eles, o grupo químico dos ácidos piridinocarboxílicos (SILVA, 2013; PEREIRA et al., 2018). Esse aumento se deu após o cancelamento do registro do herbicida 2,4,5-T (2,4,5-triclorofenoxi), principal composto do agente laranja, e também por sua melhor eficiência comparado ao glifosato (MERU et al., 1990; BARROS et al., 2014). Atualmente, sua principal formulação comercial, o Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridina-2-carboxílico) é vendida em associação ao 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), outro agrotóxico da classe dos herbicidas. No período de 2013 a 2015, o 2,4-D foi o terceiro herbicida mais importado para a Argentina e atualmente é um dos mais utilizados no mundo (SINGH; SINGH, 2016; LOZANO et al., 2019).

Os herbicidas à base de Picloram e 2,4-D têm eficácia comprovada no controle de plantas daninhas eudicotiledôneas (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011). O Picloram é um herbicida que regula o crescimento das plantas. Geralmente, ele é usado para controlar ervas daninhas de folha larga indesejadas, ervas herbáceas profundamente enraizadas e plantas lenhosas em cereais como cevada, trigo, cana e aveia (MARCO-BROWN et al., 2019). Enquanto que o 2,4 D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) é outro herbicida que induz o crescimento excessivo do câmbio vascular em dicotiledôneas, levando à morte dessas plantas (SONG, 2014; LOZANO et al., 2019).

Estudos demonstram que tanto o Picloram quanto o 2,4-D possuem uma baixa mobilidade no solo, ou seja, tem dificuldade de atravessar as camadas do solo e chegar nas águas subterrâneas. Estudos indicam que essa permanência no solo

(ou até mesmo em vegetais e frutas) podem persistir em mais de 360 dias no ambiente, enquanto os seus resíduos podem permanecer no ambiente por aproximadamente cinco anos. A maior preocupação dessas substâncias no meio ambiente é seu potencial de contaminação, podendo ser lixiviados para águas superficiais de consumo humano e também comprometendo os animais do meio aquático (SILVA et al., 2012; BORSOI et al., 2014; PEREIRA et al., 2018).

As intoxicações por agrotóxicos diferem entre aguda, ocorrido em um único incidente de exposição e em curto prazo. A subcrônica ocorre em incidentes repetidos e com duração semanas a meses, ou seja, exposição intermediária. E, por fim, a crônica que ocorre em incidentes repetidos, de meses a anos, às vezes durando a vida inteira do organismo exposto (DAMALAS; KOUTROUBAS, 2016).

Ainda não foi elucidado o mecanismo de ação do Picloram e 2,4-D nos animais, embora haja relatos de intoxicação em animais mamíferos e aves. Os poucos estudos apontam sua alta toxicidade, ocasionando várias ações deletérias como teratogenia, neurotoxicidade, imunossupressão, citotoxicidade e hepatotoxicidade (PEREIRA, CAMPELO, SILVEIRA, 1994; HU et al., 2015; SALLA et al., 2019).

Para decifrar os impactos que as substâncias tóxicas podem causar no ecossistema, muitos estudos no ramo da ecotoxicologia são realizados. Contudo, somente os sistemas biológicos podem detectar os danos após contaminação e até mesmo impactos futuros (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008; SILVA; POMPÊO; PAIVA, 2015).

Os organismos-teste para estudos ecotoxicológicos devem ser abundantes e de grande disponibilidade, de significativa representação ecológica dentro das biocenoses e se ter conhecimento prévio de sua biologia, fisiologia e hábitos alimentares, sensibilidade constante e apurada, importância comercial, serem de fácil cultivo e se possível serem nativos das regiões impactadas (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008; CRUZ et al., 2008; SILVA; POMPÊO; PAIVA, 2015).

O *Colossoma macropomum*, espécie originária da bacia amazônica, está se desenvolvendo através da piscicultura em muitas regiões do Brasil. Porém, ainda não existem dados disponíveis sobre a toxicidade dos herbicidas associados Picloram e 2,4-D nessas espécies. O que seria uma ferramenta útil para definir os padrões de qualidade ambiental, exposição e contaminação de ambiente em que se encontram essas espécies, muitas das vezes próximas de lavouras que fazem uso de substâncias tóxicas (COSTA et al., 2004).

Diante disso, esse estudo tem como objetivo estabelecer a Concentração Média Letal (CL50-96h), a Concentração de Efeito não Observado (CENO) e a Concentração de Efeito Observado (CEO) dos herbicidas associado 2,4-D e Picloram de formulação comercial em alevino de *Colossoma macropomum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os experimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Uso e Ética Animal (CEUA) da Universidade Federal do Oeste do Pará (Ufopa), sob o número de protocolo nº. 0120190053 (Anexo A).

2.2 TÓXICO UTILIZADO

O agrotóxico utilizado foi o Tordon®, formulação comercial da associação dos herbicidas 2,4-D (240 g/L) e Picloram (64 g/L), registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA sob nº 0358709.

2.3 ORGANISMO-TESTE

Foram adquiridos um milheiro de alevinos da espécie *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818), via compra, na Fazenda de Piscicultura Brasil, situado na Rodovia Everaldo Martins, S/N, Santarém - PA. Para realização dos experimentos, foram utilizados um total 630 juvenis com comprimento de 3 a 5 centímetros.

2.4 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais ficaram armazenados no biotério do Laboratório de Química Aplicada a Toxicologia da Ufopa, Campus Tapajós.

O lote de animais foi aclimatado em tanques de 500L, em ambiente aberto, garantindo o fotoperíodo natural, previamente desinfetados, equipados com bombas de recirculação e sistema de aeração conectadas a pedras porosas.

A sifonagem ocorreu diariamente para a retirada de dejetos e resíduos alimentares não aproveitados pelos animais. Nesse processo, cerca de 20% do volume da água era substituído por água previamente tratada com Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3), na temperatura a 26 ± 1 °C e $\text{pH} = 7 \pm 0,5$.

Os animais foram alimentados diariamente até 24 horas antes do início dos experimentos para que os rejeitos não interferissem no pH e concentração de amônia na água.

Figura 9 – Peixe da espécie *Colossoma macropomum* na fase juvenil



Fonte: Autor (2019)

2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A parte experimental foi realizada no Laboratório de Química Aplicada a Toxicologia da Ufopa no Campus Tapajós, onde foram utilizados 18 aquários de vidro com tampa, medindo 35cm x 25cm x 20cm, com capacidade útil para 15 litros, equipados com sistema de aeração conectadas a pedras porosas.

Figura 10 – Esquema da organização dos aquários em triplicatas para os testes de toxicidade aguda.

BRANCO/R1	BRANCO/R2	BRANCO/R3	C1/R1
C1/R2	C1/R3	C2/R1	C2/R2
C2/R3	C3/R1	C3/R2	C3/R3
C4/R1	C4/R2	C4/R3	C5/R1
C5/R2	C5/R3		

Fonte: Autor (2019)

Figura 11 – Estrutura Física dos Aquários montados para os testes de sensibilidade e toxicidade aguda.

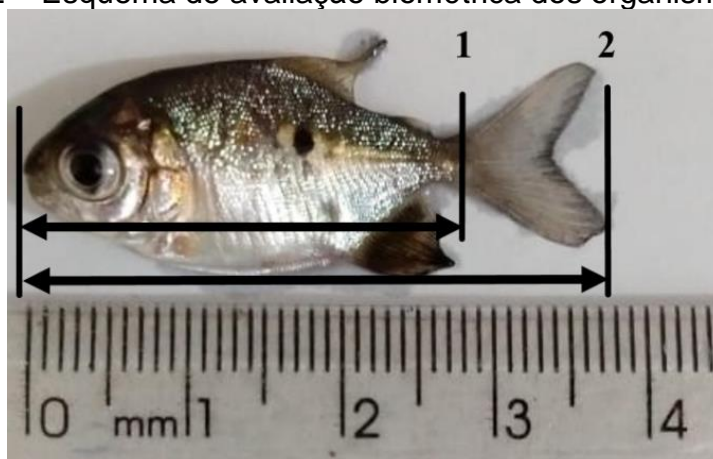


Fonte: Autor (2019)

Os animais que não demonstravam atividade opercular ou reflexo ao tocar na nadadeira caudal foram considerados mortos e retirados imediatamente dos aquários. Os demais animais que se mantiveram vivos após as 96 horas foram eutanasiados, via banho, com solução de eugenol por 15 minutos.

Foi realizado a avaliação biométrica (peso, comprimento parcial e total) em todos os animais utilizados no experimento.

Figura 12 – Esquema de avaliação biométrica dos organismos-testes.



1 – Comprimento Padrão. 2 – Comprimento Total. Fonte: Autor (2019)

2.5.1 Teste de sensibilidade

Para realizar o teste de toxicidade aguda foi necessário avaliar a sensibilidade da espécie utilizada como organismo-teste, de acordo com o protocolo EPA nº 850.1075/1996 e nº 821.R02.012/2002.

A realização de testes de sensibilidade é recomendada como método de avaliação da qualidade dos lotes de organismos cultivados. Nesses testes são utilizados tóxicos de referência como cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cádmio (CdCl₂), sulfato de cobre (CuSO₄), dodecil sulfato de sódio (SDS) e dicromato de potássio (KCr₂O₇) (USEPA, 2002; ABNT, 2016). Nesse trabalho, foi utilizado a substância Dicromato de Potássio (K₂Cr₂O₇).

Primeiramente, no experimento preliminar, foram testadas cinco concentrações para grupos-teste de n=7 animais/aquário mais um grupo-branco, totalizando 42 animais. As concentrações escolhidas se basearam em estudos realizados por Santos (2019). Os testes foram repetidos até encontrar as concentrações ideais de acordo com o protocolo da USEPA (1996). Em seguida, foi realizado o teste definitivo. Foram utilizadas as cinco concentrações em triplicatas, mais um grupo-branco, contendo n=7 animais/aquário, totalizando 112 animais.

As mortalidades foram observadas nos intervalos de 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas.

2.5.2 Teste de toxicidade aguda

Para realização do teste de toxicidade aguda, foi utilizado o Tordon®, de acordo com o protocolo da OECD nº. 203/1992.

Primeiramente, realizou um teste preliminar em que foram testadas cinco concentrações para grupos-teste de n=7 animais/aquário mais um grupo-branco, totalizando 42 animais. Os testes foram repetidos até encontrar as concentrações ideais de acordo com o protocolo. Em seguida, foram utilizadas cinco concentrações mais um grupo-branco em triplicatas, cada grupo contendo n=7 animais/aquário, totalizando 126 (cento e vinte e seis) animais.

As mortalidades foram observadas nos intervalos de 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas.

2.5.3 Análise estatística

A taxa de mortalidade, no teste de sensibilidade e no teste de toxicidade aguda, foi estimada por meio de regressão (log-logística), estabelecendo também a concentração letal do produto a 50% dos indivíduos, por meio do método de Trimmed Spearman Karber (HAMILTON et al., 1977; USEPA, 2002), e construção dos gráficos através do programa software IBM SPSS®. Os dados biométricos foram analisados por meio da estatística descritiva (média ± erro padrão da média) calculados no Microsoft Excel®.

O valor de CEO (concentração de efeito observado) e o CENO (concentração de efeito não observado) foram determinados através da Anova, pelo teste de Dunnett's.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 TESTE DE SENSIBILIDADE

O teste de sensibilidade foi uma replicação dos mesmos valores testados por Santos (2019). Utilizou-se as concentrações branco, 50, 100, 125, 150 e 215 mg/L. Nas concentrações branco e 50 mg/L não ocorreram mortalidade dos organismos. Nas concentrações de 100, 125, 150 e 215 mg/L, foram observadas mortalidade de 4,76%, 38,95%, 80,95%, 95,2%, 100%, respectivamente (Tabela 7). Dessa forma, obteve-se a Concentração Letal Média (CL₅₀) igual 97,51 mg/L, tendo como limite inferior 86,50 mg/L e limite superior 109,92 mg/L (Figura 13), conforme o gráfico descrito pela equação: $f(x) = 99,809 / (1 + 2512,9 * \exp(-0,073784x))$.

Apenas dois estudos descreveram a sensibilidade de *Colossoma macropomum* ao dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇). Santos (2019) obteve a CL_{50-96h} de 109,26 mg/L (limite superior de 123 mg/L e inferior de 93,75mg/L) de K₂Cr₂O₇ para o *Colossoma macropomum*. Para Silva (2018), a CL_{50-96h} foi determinada em 106,57 mg/L, com limite inferior de 92,78mg/L e limite superior de 112,41mg/L.

Outros estudos testes demonstram as sensibilidades dos peixes ao K₂Cr₂O₇. Zagatto e Bertoletti (2006) divulgaram dados da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 1980) sobre as CL_{50-96h}, das espécies *Cheirodon notomelas*, *Colossoma mitrei*, *Danio rerio*, *Geophagus brasiliensis*, *Hemigrammus marginatus* e *Poecilia reticulata*, 96, 156, 90, 220, 81 e 175 mg/L, respectivamente.

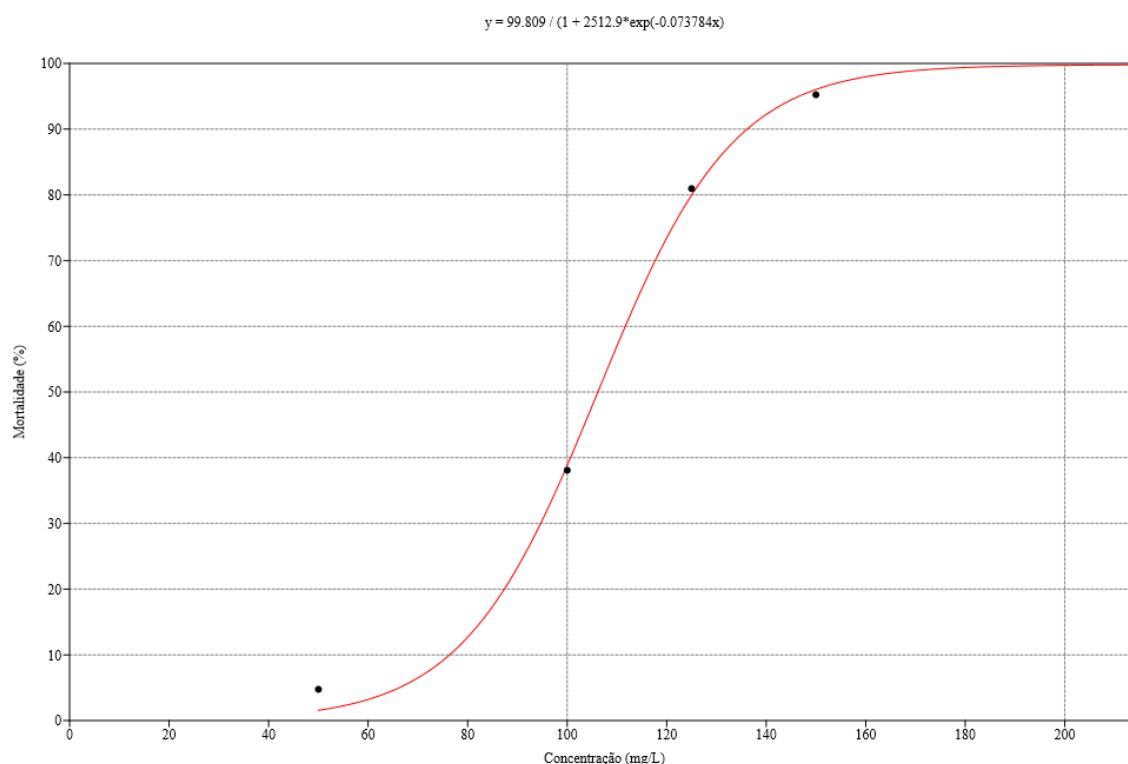
Tabela 8 – Mortalidade dos juvenis de *C. macropomum* no teste de sensibilidade com Dicromato de Potássio ($K_2Cr_2O_7$) durante 96 horas de exposição.

Concentração (mg/L)	Replicata	Período de Exposição (Horas)										Total	Total Grupo	% Mortos	
		0h	2h	4h	6h	8h	12h	24h	48h	72h	96h				
BRANCO	1											0	0	0,0%	
50	1											0	1	4,76%	
	2										0				
	3									1	1				
100	1											2	8	38,95%	
	2								1	1	2				
	3								1	1	2	4			
125	1									1	4	17	80,95%		
	2									1	4			5	
	3								1	2	4			7	
150	1										3	4	7	20	95,2%
	2					1					3	3	7		
	3										2	4	6		
215	1			1		1				2	2	1	7	21	100,0%
	2					1				2	4		7		
	3					3				2	2		7		

Fonte: Autor (2019)

Cruz et al. (2008) em um estudo de sensibilidade, utilizando o $K_2Cr_2O_7$ como tóxico padrão, com três espécies de peixes neotropicais, *Piractus mesopotamicus* (Pacu), *Hyphessobrycon eques* (mato-grosso) e *Phallocerus caudimaculatus* (guaru), obtiveram os respectivos valores para CL_{50-96h} , $144,50 \pm 19,67$, $130,79 \pm 10,02$ e $154,39 \pm 6,72$.

Figura 13 – Mortalidade de peixes em função da concentração.



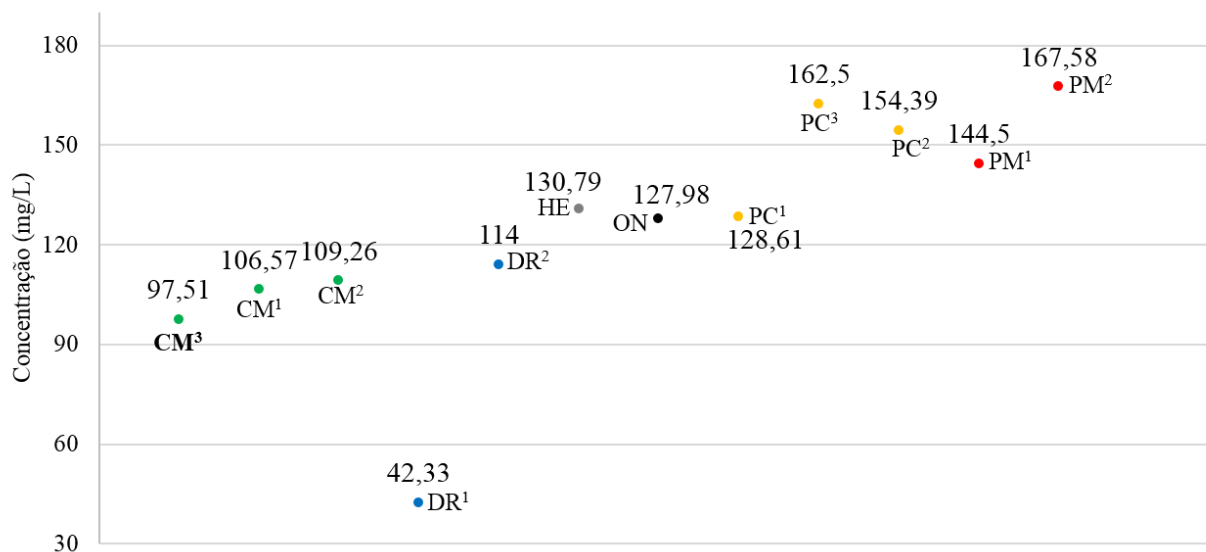
Porcentagem de mortalidade (eixo Y) de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após 96 horas da aplicação de concentrações crescentes (eixo X) do $K_2Cr_2O_7$ ($R^2=0,99$ e $p<0,05$). Fonte: Autor (2019).

Cannavan (2009), em um estudo semelhante com a *Poecilia reticulata*, descreveu um CL_{50-24h} de 50 mg/L, inferior ao apresentado pela Cetesb (1980). Rosa et al., (2013) definiram a CL_{50-96h} , para o *Phallogeros caudimaculatus*, em 162,5 mg/L.

Embora os testes de sensibilidade do *Colossoma macropomum* ao $K_2Cr_2O_7$ tenham demonstrado valores inferiores, comparado as demais espécies, não apresentaram variação significativas entre a mesma espécie (Figura 14).

De acordo com Zagatto e Bertoletti (2006) e Ramsdorf (2011), o principal critério para seleção de uma espécie como organismo-teste é garantir que os ensaios possam ser replicados com o mesmo organismos e tenham resultados precisos. Para isso, a espécie deve apresentar uma sensibilidade (ou resistência) a substâncias tóxicas padronizadas.

Figura 14 – Valores da concentração letal média (CL₅₀) de peixes expostos ao Dicromato de Potássio (K₂Cr₂O₇).



Danio rerio (DR), *Piaractus mesopotamicus* (PM), *Hyphessobrycon eques* (HE), *Phallocerus caudimaculatus* (PC), *Oreochromis niloticus* (ON), *Colossoma macropomum* (CM). Fonte: Autor (2019).

3.2 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

Os testes preliminares foram importante para identificar as concentrações que seriam utilizadas no teste definitivo, além de garantir as exigências de validação pela OECD 203/1992.

Inicialmente foram utilizadas as concentrações proposta por Botelho (2010), que determinou a concentração letal media (CL₅₀₋₉₆) em *Ctenopharyngodon idella* (*Carpa capim*) para o Picloram (um dos ingredientes ativos em maior proporção no Tordon®), utilizando as seguintes concentrações: 1, 2, 3, 4, 5 e 6 mg/L.

Após 12 ensaios preliminares, definiu-se as concentrações para o teste definitivo nas seguintes concentrações: 0 (grupo-branco), 3,5, 5, 6, 7 e 8 mg/L.

A taxa de mortalidade do grupo-branco foi inferior a 10%, as condições físico-químicas (temperatura, oxigênio e pH) foram constantes, o oxigênio dissolvido foi superior a 60%, e, devido ao ambiente do teste ser estático, as concentrações iniciais do tóxico foram mantidas (Tabela 8). Dessa forma, o teste proporcionou as condições padrões para confirmação do teste.

Tabela 9 – Média dos valores dos parâmetros físico-químicos da água durante o ensaio de toxicidade aguda com Tordon® (96h)

Parâmetros	Tordon®
	Média ± Desvio Padrão
Temperatura (°C)	26,66 ± 0,47
pH	8,03 ± 0,24
Oxigênio Dissolvido (%)	93 ± 7

Fonte: Autor (2019)

Os animais utilizados nos testes possuíam o peso de 0,80 ($\pm 0,1$) g, comprimento total de 3,62 ($\pm 0,2$) cm e comprimento padrão de 2,87 cm ($\pm 0,1$).

A mortalidade dos juvenis iniciaram nos aquários com concentração acima de 3,5 mg/L. Nas concentrações de 5 mg/L, houve morte de 19% (4) dos organismos. A primeira morte ocorreu após 8 horas de exposição e as demais após 72 horas de exposição (Tabela 9).

Na concentração de 6 mg/L, teve-se morte de 66,7% (14) dos juvenis. Na concentração de 7 mg/L, foram 95,2% (20) alevinos mortos. Em ambas as concentrações as mortes prevaleceram no período 6 a 24 horas de exposição. Na concentração de 8 mg/L todos os peixes foram considerados mortos após 6 horas de exposição.

A partir dos dados de mortalidade, pode-se determinar o valor da concentração letal média (CL_{50-96h}) em 5,54 mg/L, com limite superior em 5,22 mg/L e limite inferior em 5,88 mg/L, através da equação $f(x)=100,75/(1+1,9962E05*\exp(-2,1468x))$, como observado na Figura 15.

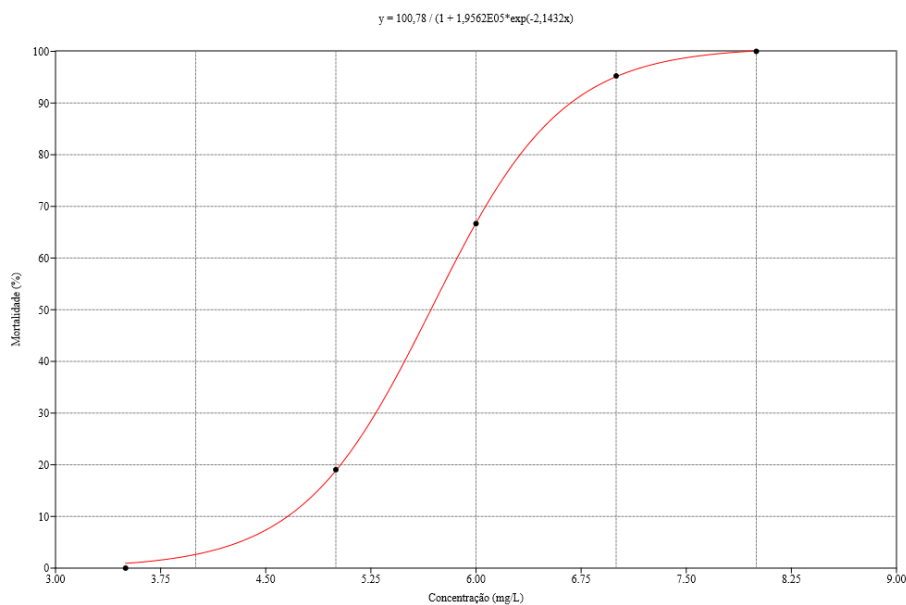
Há apenas um estudos de toxicidade aguda da associação do Picloram e 2,4-D em peixes realizada por Gomes (2017). Esse estudo determina a concentração letal média (CL_{50-96h}) na faixa de 5 mg/L a 10 mg/L para embriões da espécie *Danio rerio*.

Tabela 10 – Mortalidade dos juvenis no teste de toxicidade aguda com Tordon® durante 96 horas.

Concentração (mg/L)	Replicata	Período de Exposição (Horas)										Total	Total Grupo	%Mortos
		0h	2h	4h	6h	8h	12h	24h	48h	72h	96h			
BRANCO	1											0		
	2											0	0	0,0%
	3											0		
3,5	1											0		
	2											0	0	0,0%
	3											0		
5,0	1											0		
	2								1	1		2	4	19,0%
	3					1				1		2		
6,0	1			1	2	1					1	5		
	2						1				1	2	14	66,7%
	3			3	1	2	1					7		
7,0	1				2	1	2				1	6		
	2			3	1	2					1	7	20	95,2%
	3			5	2							7		
8,0	1			7								7		
	2			7								7	21	100,0%
	3			7								7		

Fonte: Autor (2019)

Figura 15 – Mortalidade de peixes em função da concentração.



Porcentagem de mortalidade (eixo Y) de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após 96 horas da aplicação de concentrações crescentes (eixo X) do Tordon® ($R^2=0,99$ e $p<0,05$). Fonte: Autor (2019).

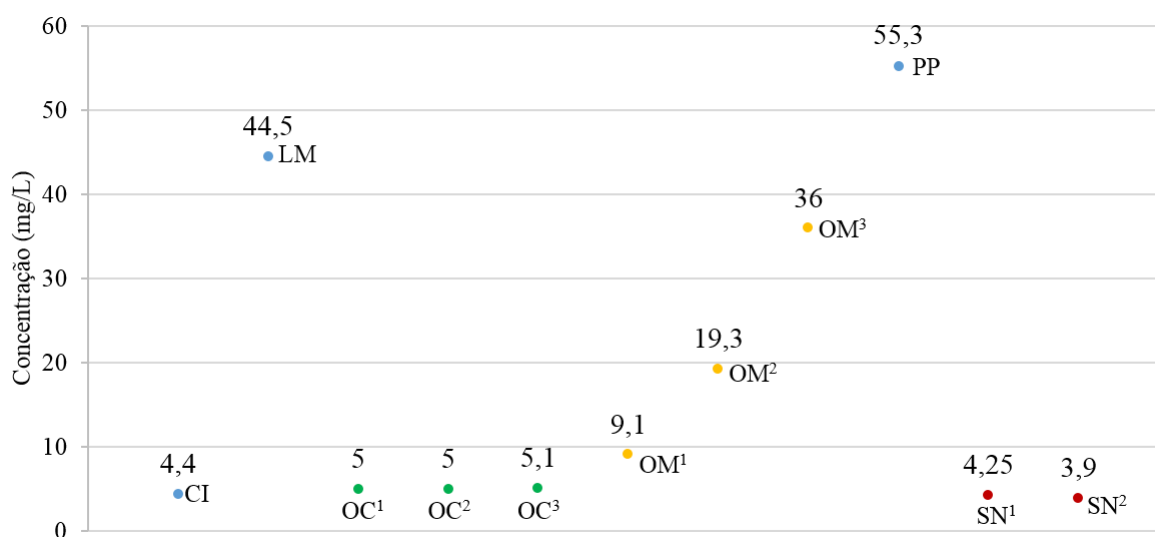
Embora não seja possível avaliar os herbicidas associados, há estudos com os mesmos ingredientes ativos separados. O Picloram, por exemplo, foi testado em *Oncorhynchus clarkii*, *Salvelinus namaycush* e *Oncorhynchus clarkii*, porém em condições ambientes diferentes, as CL_{50-96} ficaram estimadas em 5 mg/L, 4,25 mg/L e 5 mg/L, respectivamente (Figura 16) (WOODWARD, 1976, 1982).

Mayer e Dill (1984) determinaram a CL_{50-96} do Picloram para as seguintes espécies *Pimephales promelas* (55,5 mg/L), *Oncorhynchus mykiss* (19,3 mg/L) e *Lepomis macrochirus* (44,5 mg/L).

Mayer e Ellersieck (1986) em estudos com o Picloram também determinaram a CL_{50-96} para *Oncorhynchus mykiss*, *Salvelinus namaycush* e *Oncorhynchus clarkii* em, respectivamente, 9,1 mg/L, 3,9 mg/L e 5,1 mg/L.

Estudos mais recentes em peixes, Fairchild et al., (2008) determinaram a CL_{50-96} para alevinos e *Oncorhynchus mykiss* em 36 mg/L. E Botelho et al., (2012) determinaram a concentração letal média a (CL_{50-96h}) em 4,4 mg/L para espécie *Ctenopharyngodon idella*.

Figura 16 – Valores da concentração letal média (CL_{50}) de peixes expostos ao Picloram.



Ctenopharyngodon idella (CI), *Lepomis macrochirus* (LM), *Oncorhynchus clarkii* (OC), *Oncorhynchus mykiss* (OM), *Pimephales promelas* (PP), *Salvelinus namaycush* (SN).
Fonte: Autor (2019).

Assim como observado por Botelho (2010), a maior taxa de mortalidade ocorreu nas primeiras 24 horas, totalizando 26,2% de mortos nas concentrações mais elevadas e reduzindo nas observações seguintes.

Observou-se nos testes que as concentrações utilizadas nos testes são inferiores as recomendações presentes na embalagem e bula do herbicida, demonstrando seu potencial de risco ao meio ambiente se atingirem corpos de água próximos aos locais de aplicação (TORDON, 2017).

3.3 CLASSIFICAÇÃO DOS HERBICIDAS PICLORAM E 2,4-D ASSOCIADOS QUANTO À TOXICIDADE AGUDA E AO RISCO AMBIENTAL

Os agrotóxicos tem em sua composição ingredientes ativos que são substâncias tóxicas, utilizadas para proteção de plantações de grande ou médio porte contra diversos tipos de praga (plantas ou animais indesejáveis). Da mesma forma que essas essas substâncias são vista como “protetoras”, ou como a lei nomeia, defensivos agrícolas, também causam prejuízos desconhecidos ao meio ambiente.

Segundo Zucker (1985), os agrotóxicos podem ser classificados a partir de acordo com sua concentração letal (LC_{50}) (Tabela 10). Dessa forma, o tóxico em estudo se enquadra na categoria de “Toxicidade Moderada”, pois apresenta o valor médio de 5,54 mg/L. Para Kao (2018), a classificação toxicológica também se enquadra na Categoria III ($2 \text{ mg/L} < LC_{50} < 20 \text{ mg/L}$).

Tabela 11 – Tabela do nível de toxicidade aquática segundo Zucker (1983).

Categoria	LC_{50} ou EC_{50}
Toxicidade Muito Alta	Menor que 0,1 mg/L
Toxicidade Alta	Entre 0,1 a 1 mg/L
Toxicidade Moderada	Entre 1 a 10 mg/L
Toxicidade Baixa	Entre 10 a 100 mg/L
Toxicidade Muito Baixa (Não Tóxica)	Maior que 100 mg/L

Fonte: Autor (2019).

Segundo a classificação da Anvisa e a indicação no rótulo do fabricante, que seguem a lei 7.802/1989 (BRASIL, 1989), os herbicidas associados Picloram e 2,4-D se enquadram na Classe I de risco toxicológicos, considerados Extremamente Tóxico.

Contudo, no ano de 2019, Anvisa informou reclassificação toxicológica dos agrotóxicos que seguirá os parâmetros do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS). A partir desse marco regulatório, apenas produtos que levarem à morte se ingerido ou entrar em contato com pele e olhos serão, considerados Classe I (extremamente tóxico ou altamente tóxico). Os produtos que não se enquadrarem nesse quesito, levaram as demais

classificação: Classe II (moderadamente tóxico), Classe III (pouco tóxico ou improvável de causar danos) e Classe IV (não classificado).

Segundo a classificação do potencial de periculosidade ambiental indicado no rótulo do fabricante, que também seguem a lei 7.802/1989 (BRASIL, 1989), os herbicidas associados Picloram e 2,4-D se enquadram na Classe III, considerado um Produto Perigoso ao Meio Ambiente (TORDON, 2017).

3.4 CEO E CENO

Verificou-se que a maior concentração do agente tóxico que não causou efeito deletério (CENO) estatisticamente significativo na sobrevivência dos organismos testados foi de 3,5 mg/L, e a menor concentração que causou efeito (CEO) de mortalidade nos juvenis expostos ao pesticida foi de 5 mg/L.

4 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos, pode-se constatar que *Colossoma macropomum* é uma espécie com boa sensibilidade para testes toxicológicos, próximo a valores obtidos por outros autores. A CL_{50-96} obtida para a associação do 2,4-D e Picloram sobre *Colossoma macropomum* também é semelhante a trabalhos com diferentes espécies da fauna aquática. Seu risco toxicológico embora tenha demonstrado a Classe III, ou seja, Moderadamente Tóxico, demonstrou ter muitos efeitos ainda não estudados para o organismo testado, até mesmo quando utilizado nas doses recomendadas pelo fabricante. Portanto, são necessários mais estudos (bioquímicos, comportamentais e histológico) para investigar os seus efeitos causados por intoxicação aguda e crônica do herbicida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA). **Methods For Measuring The Acute Toxicity Of Effluents And Receiving Waters To Freshwater And Marine Organism**. 5 ed. 2002.

Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA). **Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.1075: Freshwater and Saltwater Fish Acute Toxicity Test**. 5 ed. Outubro, 1996.

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR 15088: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae), 2016.

BARROS, R. E. et al. Physiological response of eucalyptus species grown in soil treated with Auxin-Mimetic herbicides. **Planta Daninha**, v. 32, n. 3, p. 629-638, 2014.

BORSOI, A. et al. Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente. **Acta Iguazu**, v. 3, n. 1, p. 86-100, 2014.

BOTELHO, R. G. Toxicidade de herbicidas para *Escherichia coli* e alevinos de *Ctenopharyngodon idella*. Dissertação (Mestrado). Universidade Vale do Rio Doce. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas. Governador Valadares, RJ, 2010.

BOTELHO, R. G. et al. Effects of atrazine and picloram on grass carp: acute toxicity and histological assessment. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 94, n. 1, p. 121-127, 2012.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização, de agrotóxicos, seus componentes, e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 abr. 1989. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm>. Acesso em: 23 set. 2018.

CANNAVAN, M. C. Determinação da sensibilidade de *Poecilia reticulata* para o dicromato de potássio através de testes de toxicidade. **Revista Eletrônica de Biologia (REB)**. ISSN 1983-7682, v. 2, n. 4, p. 13-25, 2009.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) 1980. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 1ª edição, 2006.

COSTA, O. T. F. et al. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae), to short-term exposure to nitrite. **Aquaculture**, v. 232, n. 1-4, p. 627-636, 2004.

CRUZ, C. et al. Sensibilidade de peixes neotropicais ao dicromato de potássio. **J Braz Soc Ecotoxicol**, v. 3, p. 53-55, 2008.

DAMALAS, C., KOUTROUBAS, S. Farmers' exposure to pesticides: toxicity types and ways of prevention. **Toxics**, 2016.

FAIRCHILD, J. F. et al. Using accelerated life testing procedures to compare the relative sensitivity of rainbow trout and the federally listed threatened bull trout to three commonly used rangeland herbicides (Picloram, 2, 4-D, and clopyralid). **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 27, n. 3, p. 623-630, 2008.

GOMES, D.S.F. **Os efeitos do ácido 2, 4-diclorofenoxiacético e do tordon® no desenvolvimento embrionário e no metabolismo energético do peixe-zebra (*Danio rerio*)**. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Produtos Bioativos e Biociências. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), 2017.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, V. Trimed Spearman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol.**, v. 7, p. 714-719, 1977.

HU, R. et al. Long-and short-term health effects of pesticide exposure: a cohort study from China. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0128766, 2015.

LINDOVA, J. et al. Acute toxicity of two pyrethroid insecticides for five non-indigenous crayfish species in Europe. **Veterinárni medicína**, v. 64, n. 3, p. 125-133, 2019.

LOZANO, V. L. et al. Turbidity matters: differential effect of a 2, 4-D formulation on the structure of microbial communities from clear and turbid freshwater systems. **Heliyon**, v. 5, n. 8, p. e02221, 2019.

MAGALHÃES, D.P.; FERRAO-FILHO, A. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 3, 2008.

MARCO-BROWN, J.L. et al. Adsorption of picloram on clays nontronite, illite and kaolinite: equilibrium and herbicide-clays surface complexes. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 54, n. 4, p. 281-289, 2019.

MAYER, F. L., ELLERSIECK, M. R. **Manual of acute toxicity: interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals**. Washington, DC: US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, 1986.

MAYES, M.A.; DILL, D.C. The acute toxicity of picloram, picloram potassium salt, and picloram triisopropanolamine salt to aquatic organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 3, n. 2, p. 263-269, 1984.

MERU, S. et al. Persistence and lateral movement of 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid and picloram on power line rights-of-way. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 19, n. 4, p. 572-577, 1990.

PEREIRA, L. F.; CAMPELLO, A. P.; SILVEIRA, O. **Effect of tordon 2, 4-D 64/240 triethanolamine BR on the energy metabolism of rat liver mitochondria.** *Journal of applied toxicology*, v. 14, n. 1, p. 21-26, 1994.

PEREIRA, P.C.A et al. Uso de agrotóxicos em áreas antropizadas da Amazônia Ocidental pela agricultura familiar. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 9, n. 8, p. 39-45, 2018.

RAMSDORF, W. **Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes.** Tese (Doutorado em Genética). Programa de Pós Graduação em Genética. Universidade Federal do Paraná (UFPR). Curitiba, Paraná. 2011.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas.** 6.ed. Londrina: Independente, 2011. 697p.

ROSA, N. N. et al. Sensibilidade do peixe *Phalloceros caudimaculatus* para os sais dicromato de potássio, nitrato de cádmio, nitrato de chumbo e sulfato de zinco. **Natural Resources**, v. 3, n. 2, p. 31-31, 2013.

SALLA, G.B.F. et al. Kinetics of the metabolic effects, distribution spaces and lipid-bilayer affinities of the organo-chlorinated herbicides 2, 4-D and picloram in the liver. **Toxicology Letters**, 2019.

SANTOS, S. B. **Avaliação da toxicidade aguda do pesticida clorpirifós® para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1818).** Dissertação – Programa De Pós-Graduação em Biociências. Universidade Federal Do Oeste Do Pará (Ufopa), 2019.

SILVA, L.O.C. et al. Ação de *Eleusine coracana* na remediação de solos contaminados com picloram. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 30, n. 3, p. 627-632, 2012.

SILVA, J.M. da et al. **Avaliação da sensibilidade de *Colossoma macropomum* G. Cuvier, 1818 (Tambaqui) como espécie sentinela para o herbicida trifluralina.** Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação Rede Nordeste de Biotecnologia. Universidade Federal de Alagoas (UFAL), 2013.

SILVA, D.C.V.R; POMPÊO, M.; PAIVA, T.C.B. A ecotoxicologia no contexto atual no Brasil. **Ecologia de reservatórios e interfaces.** São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2015.

SILVA, A.S. **Avaliação do efeito toxicológico de atrazina na retina de alevinos de *Colossoma macropomum*.** Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos Continentais Amazônicos. Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), 2018.

SINGH, B; SINGH, K. **Microbial degradation of herbicides.** Critical reviews in microbiology, v. 42, n. 2, p. 245-261, 2016.

SONG, Y. Insight into the mode of action of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) as an herbicide. **Journal of integrative plant biology**, v. 56, n. 2, p. 106-113, 2014.

TORDON: Picloram e 2,4-D. São Paulo: Dow AgroSciences Industrial Ltda, [2017]. Bula do Pesticida. Disponível: <<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Herbicidas/tordon260218.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2018.

WOODWARD, D. F. Toxicity of the herbicides dinoseb and picloram to cutthroat (Salmo clarki) and lake trout (Salvelinus namaycush). **Journal of the Fisheries Board of Canada**, v. 33, n. 8, p. 1671-1676, 1976.

WOODWARD, D.F. Acute toxicity of mixtures of range management herbicides to cutthroat trout Salmo clarki. **Rangeland Ecology & Management/Journal of Range Management Archives**, v. 35, n. 4, p. 539-540, 1982.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia aquática. **Princípios e Aplicações**. Rima Editora, São Carlos. 478p, 2006.

ZUCKER, E. Hazard Evaluation Division - **Standard Evaluation Procedure Acute toxicity test for freshwater fish**. Washington. USEPA Publication 540/9-85-006 1985.

CAPITULO III – AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAL E HISTOLÓGICA EM PEIXES DA ESPÉCIE *Collossoma macropomum* EXPOSTO A ASSOCIAÇÃO DOS HERBICIDAS 2,4-D E PICLORAM

RESUMO

A associação do Picloram e 2,4-D tem demonstrado alto grau de toxicidade devido a sua persistência no meio ambiente, podendo resultar na contaminação dos ecossistemas aquáticos. Há estudos que a ingestão desses compostos podem causar danos irreversíveis em mamíferos. Dessa maneira, este estudo objetivou avaliar os efeitos tóxicos, por meio da análise comportamental e histopatológica, de brânquias e fígados, em *Collossoma macropomum*, expostos a diferentes diluições do Picloram e 2,4-D associados. Os experimentos ocorreram simultaneamente durante 96 horas de exposição. As observações comportamentais aconteceram nos intervalos de tempo de 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 horas. As brânquias e fígado foram coletadas após a confirmação da morte dos organismos e fixadas em formol 10% para o processamento histológico. As alterações comportamentais avaliadas foram nado excitatório, permanência na zona superior, respiração na superfície, perda de equilíbrio, nado errático, espasmo e paralisia. Os efeitos observados nas histologia das brânquias foram hiperplasia e degeneração das lamelas, e do fígado, a vacuolização. Apesar das alterações serem suficientes para alertar os riscos de contaminação, não são específicas para o agrotóxicos em estudo.

Palavras Chaves: Agrotóxico. Histopatologia. Comportamento Animal.

BEHAVIORAL AND HISTOPATHOLOGICAL CHANGES IN *Colossoma macropomum* EXPOSED BY HERBICIDES 2,4-D AND PICLORAM

ABSTRACT

Picloram and 2,4-D has shown a high degree of toxicity due to its persistence in the environment, which may result in contamination of aquatic ecosystems. Ingestion of these compounds has been shown to cause irreversible damage to mammals. Thus, this study aimed to evaluate the toxic effects through behavioral and histopathological analysis, of gills and livers, in *Colossoma macropomum*, exposed by different dilutions of Picloram and associated 2,4-D. The experiments occurred simultaneously during 96 hours of exposure. Behavioral observations occurred at time intervals of 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 hours. The gills and liver had collected after the death of the organisms to histological processing. The behavioral changes evaluated were excitatory swimming, stay in the upper zone, surface breathing, loss of balance, erratic swimming, spasm and paralysis. The histological effects observed, on gill, were hyperplasia and degeneration of the lamellae, and vacuolization, on liver. Although the changes are sufficient to alert the risks of contamination, they are not specific to the pesticides under study.

Keyword: *Colossoma macropomum*. Pesticide. Histopathology. Animal behavior.

1 INTRODUÇÃO

O Picloram (ácido 3,5,6-tricloro-4-amino-2-piridinocarboxílico) e o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) são substâncias comercializadas de forma associadas na proporção molar, mais frequente, de quatro partes de 2,4-D e uma parte de Picloram com principal objetivo de controlar uma variedade de ervas daninhas de folha larga perenes e enraizadas profundamente (SALLA, 2019).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) classificam toxicologicamente os agrotóxicos 2,4-D e Picloram como *extremamente perigoso* (Classe I), e seus potenciais de periculosidade ambiental como *perigoso ao meio ambiente* (Classe III) (BRASIL, 2019).

Ambos os compostos são descritos como tóxicos para mamíferos e humanos quando ingeridos em altas doses. Outros estudos também relatam alterações morfológicas e fisiológicas em diferentes organismos, ainda que em doses subletais, como pássaros, peixes, sapos, répteis e algas, podendo causar problemas reprodutivos, mudanças de comportamento ou morte em espécies não-alvo (CURI et al., 2019).

Os compostos organometálicos e organoclorados além de estarem entre os mais tóxicos e persistentes no meio ambiente, fatores que os levaram a ser proibido em muitos países, também são classificados como desreguladores do sistema endócrino, tornando-se um risco aos organismos expostos a essas substâncias (DAMALAS; KOUTROUBAS, 2016).

Devido à grande falta de monitoramento ambiental no Brasil, estudos utilizando espécies neotropicais da presença de xenobióticos no meio aquático demonstraram ser bons bioindicadores (CRUZ et al., 2016). A histologia é uma ferramenta sensível para avaliar os efeitos tóxicos que afetem tecidos animais (LINS, 2010). A histopatologia em peixes garante uma melhor avaliação e correlação dos danos decorrentes da poluição ambiental.

As brânquias e o fígado são os principais órgãos avaliados para buscar os efeitos causados por substâncias tóxicas. As brânquias são estruturas responsáveis por realizar hematoses, além de ser o primeiro local de excreção, exercendo um importante papel no balanceamento iônico (BALDISSEROTTO, 2002; LINS, 2010) Em estudos de impacto ambiental, as brânquias apresentam diversas alterações

patológicas indicativas por manterem um contato direto com o ambiente contaminado e absorverem os xenobióticos para dentro do organismo (LINS, 2010).

O fígado se caracteriza como órgão biomarcador da poluição ambiental devido a sua constituição ser de hepatócitos, células-alvo muitas substâncias tóxicas. Alterações morfológicas como vacuolização, inflamação, alteração no formato dos vasos sinusóides podem ser entendido como resposta a um evento de intoxicação (FERREIRA, 2010).

Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar as alterações comportamentais e histopatológicas, em brânquias e fígado, de peixes expostos, de forma aguda, aos herbicidas associados Picloram e 2,4, além de confirmar a usuabilidade do *Colossoma macropomum* no biomonitoramento de corpos hídricos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 TÓXICO UTILIZADO

O agrotóxico utilizado foi o Tordon®, formulação comercial da associação dos herbicidas 2,4-D (240 g/L) e Picloram (64 g/L), registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA sob nº 0358709 (TORDON, 2018).

2.2 ORGANISMO TESTE

O peixe utilizado foi o *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818), originário da região amazônica e muito presente na alimentação da região. É um peixe de fácil criação e de alta importância econômica. Tem se tornado um animal emergente como organismo teste em estudos toxicológicos e demonstrou ter uma boa sensibilidade a substâncias tóxicas (Capítulo II).

Foram utilizados o total de 132 animais, em estágio juvenil, sendo que 126 (sete por aquário) foram para avaliação dos efeitos comportamentais e histopatológicos em cinco concentrações distintas, em triplicatas: 0 mg/L (concentração branco), 3,5 mg/L, 5 mg/L, 6 mg/L, 7 mg/L e 8 mg/L. Os outros seis animais, foram utilizados para avaliar os efeitos comportamentais na concentração que demonstraram não causar mortalidade nos organismos, ou seja, na concentração subletal.

2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

2.3.1 Análise Comportamental

2.3.1.1 Exposição aguda em diferentes concentrações

Os peixes foram distribuídos em 18 aquários, com capacidade útil para 15 litros de água, nas proporções 35cm x 25cm x 20cm, expostos nas concentrações de 0 mg/L (grupo branco), 3,5 mg/L, 5 mg/L, 6 mg/L, 7 mg/L e 8 mg/L.

Os animais foram alimentados 24 horas anterior ao experimento para evitar o acúmulo de dejetos e alteração nas propriedades físicas da água.

As análises comportamentais foram realizadas através de registro em vídeo de 2 minutos nos seguintes intervalos de tempo, após a exposição ao agrotóxico: 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas, exceto nos aquários que os animais alcançavam o estágio de morte.

Figura 17 – Estrutura montada para registro do padrão e alteração de comportamento dos tambaquis (*Colossoma macropomum*) exposto aos herbicidas associados Picloram e 2,4-D.



Fonte: Autor (2019)

2.3.1.1 Exposição aguda em concentração subletal

Os peixes foram distribuídos individualmente seis aquários, com capacidade útil para 15 litros de água, nas proporções 35cm x 25cm x 20cm, expostos a concentração, que não demonstrou mortalidade dos animais, de 3,5 mg/L. Dessa

forma, seria possível avaliar as alterações comportamentais em uma concentração subletal.

Os animais foram alimentados 24 horas anterior ao experimento para evitar o acúmulo de dejetos e alteração nas propriedades físicas da água.

As análises comportamentais foram realizadas através de registro em vídeo de 10 minutos nos seguintes intervalos de tempo, após a exposição ao agrotóxico: 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 horas.

2.3.2 Análise Histopatológica

Os 126 peixes foram distribuídos igualmente (sete animais por aquários) para simular exposição aguda ao agrotóxico durante 96 horas. Os animais foram exposto a cinco concentrações distintas em triplicatas, sendo elas 0 mg/L (concentração branco), 3,5 mg/L, 5 mg/L, 6 mg/L, 7 mg/L e 8 mg/L, totalizando 18 aquários contendo 15 L de água. Apenas nas concentrações de 0 mg/L e 3,5 mg/L, esperava-se a sobrevivência total dos animais. Nas concentrações 5 mg/L, 6 mg/L, 7 mg/L, esperava-se a morte parcial dos animais. E na concentração de 8 mg/L, a morte total dos animais (Capítulo II).

Dessa forma, foi realizado uma seleção randomizada de dois organismos testes de cada concentração para realizar o processo de dissecação. Nas concentrações que os animais permaneceram vivos durante as 96 horas, foi necessário realizar o processo de eutanásia com solução alcoólica de Eugenol (óleo de cravo da Índia) a 100 mg/L, via banho. O processo de eutanásia foi realizado na proporção de 8 mL de Eugenol, diluído em 50 mL de Álcool 100%, em 100 mL de Água por 15 minutos.

Fígado e brânquias dos animais coletados foram fixados em Formol 10 % por 24 horas e encaminhado para o laboratório de apoio HistoNorte para preparação das lâminas histológicas coradas com Hematoxilina e Eosina (EO). As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico na lente de 40x.

2.5 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os experimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Uso e Ética Animal da Universidade Federal do Oeste do Pará, sob o número de protocolo nº. 0120190053 (Anexo A).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EFEITOS COMPORTAMENTAIS SOB EXPOSIÇÃO A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM E 2,4-D.

O comportamento tem se destacado em estudos da toxicidade de diferentes compostos pois é avaliada os efeitos ecológicos com maior sensibilidade quando comparada a parâmetros como morfologia e mortalidade. Atualmente muitos estudos toxicológicos são realizados comparando o comportamento de animais, principalmente os invertebrados aquáticos e nas fases embrionárias (MELLO, 2018; MACIEL, 2019).

Foi elaborado um etograma para avaliação dos comportamentos dos juvenis de *Colossoma macropomum* durante a exposição a diferentes concentrações do tóxico comercial, contendo Picloram e 2,4-D (Tabela 10).

Tabela 12 – Etograma dos principais comportamentos observados em *Colossoma macropomum* sob exposição aguda dos herbicidas associados Picloram e 2,4-D.

Cardume Agrupado	Peixe se agrupa com outros peixes em apenas uma região do aquário, demonstrando um interesse em permanecer em cardume.
Cardume Disperso	Peixe não se agrupa com outros peixes e ficam em diferentes regiões do aquário.
Espasmo	Peixe realiza movimentos involuntários, "tremores" durante o seu deslocamento ou em nado estacionário.
Irritabilidade	Peixe demonstram um comportamento de "alerta" para atacar outro peixe, podendo até persegui-lo.
Morte	Peixe em estado de imobilidade, sem movimento opercular e sem reflexo das nadadeiras.
Nado Circular	Peixe realiza uma trajetória circular ou espiral, na horizontal ou vertical.
Nado com Avanço Rápido	Peixe se encontra em nado estacionário ou em deslocamento, em seguida realiza um nado rápido na direção frontal, e retorna a sua velocidade inicial.
Nado com Recuo	Peixe desloca-se um pequeno trecho para trás.
Nado Estacionário	Peixe mantém sua posição de repouso.
Nado Excitatório	Peixe realiza movimentos rápidos se movimentando constantemente em diversas partes do aquário. O peixe apresenta movimento opercular acelerado e muitos movimentos nas nadadeiras.
Paralisia Parcial	Peixe apresenta "consciência", no entanto, não consegue realizar movimentos desejados. Pelo menos uma nadadeira demonstra rigidez.
Paralisia Total	Peixe não apresenta consciência, em completo, estado de Imobilidade.
Perda de Equilíbrio	Peixe não consegue permanecer em sua posição horizontal em seu estado estacionário.
Reconhecimento no Reflexo	Peixe reconhece seu reflexo nas paredes do aquário, aproxima-se para agrupar em cardume com sua imagem virtual.
Recuperação a Paralisia	Após o estado de paralisia, o peixe recupera os movimentos parciais ou totais, podendo apresentar perda de equilíbrio e nado errático.
Respiração na Superfície	Peixe migra para Zona Superior e tenta absorver oxigênio no meio externo.
Segregação	Ocorre quando um ou mais peixes se afastam do cardume agrupado.
Zona Central	Peixe localizado na região mediana do aquário.
Zona Inferior	Peixe localizado na região inferior do aquário.
Zona Superior	Peixe localizado na região superior do aquário.

Fonte: Autor (2019)

Devido ao experimento ter sido realizado em grupos com sete animais por aquário e não ter sido fornecido alimentos a partir das 24 horas anteriores ao experimento, foram observados alguns comportamentos agonistas entre os juvenis de *Colossoma macropomum*.

Tabela 13 – Etograma dos principais comportamentos agonistas observados em *Colossoma macropomum* sob exposição aguda dos herbicidas associados Picloram e 2,4-D.

Ataque	Peixe A realiza um ataque no peixe B.
Ataque e Contra-ataque	Peixe A realiza um ataque no peixe B e Peixe B contra-ataca.
Ataque e Fuga	Peixe A realiza um ataque no peixe B. Peixe B foge, avançando para frente ou realizando um movimento circular.
Ataque e Movimento de Alerta	Peixe A realiza um ataque no peixe B. Peixe B demonstra um comportamento de alerta para evitar o próximo ataque.
Ataque e Perseguição e Fuga	Peixe A realiza um ataque no peixe B. Peixe B foge. Peixe A persegue para atacar novamente o peixe B.
Confronto com Reflexo	Peixe confronta seu reflexo nas paredes do aquário, tentando atacar.
Fuga do Reflexo	Peixe confronta seu reflexo nas paredes do aquário e recua ou foge.
Movimento de Alerta	Peixe ao perceber que será atacado por outro peixe, inclina-se em direção ao peixe, preparando para uma posição de contra-ataque ou fuga.

Fonte: Autor (2019)

Na avaliação dos efeitos comportamentais em diferentes concentrações dos herbicidas associados Picloram e 2,4-D foi observado alterações nos padrões de comportamento dos organismos-testes, descrito na tabela 10 e 11 de acordo com os comportamentos avaliados por Santos (2019).

Para essa avaliação foi observado, nas primeiras oito horas de exposição dos peixes, os seguintes comportamentos: nado excitatório, permanência na zona superior do aquário por mais de 30 segundos, respiração na superfície do aquário, perda de equilíbrio, nado errático, espasmos e paralisia.

Tabela 14 – Manifestação dos efeitos comportamentais em 8h de exposição aguda aos herbicidas associados Picloram e 2,4-D.

Tempo	Concentração (mg/L)	Nado Excitatório	Zona Superior*	Respiração na Superfície	Perda de Equilíbrio	Nado Errático	Espasmos	Paralisa
0	0	+	-	-	-	-	-	-
	3,5	+	-	-	+	+	+	-
	5	++	-	-	+	+	+	-
	6	+++	-	-	++	++	+	-
	7	+++	-	-	+	+	-	-
	8	+++	-	+	-	-	-	-
2	0	+	-	-	-	-	-	-
	3,5	++	+	-	-	+	+	-
	5	++	+	+	+	+	-	+
	6	++	++	-	++	++	-	+
	7	++	+	+	+++	++	+	-
	8	+	-	-	++	++	-	+++
4	0	+	-	-	-	-	-	-
	3,5	+	+	-	+	+	-	-
	5	+++	+	+	+++	+++	-	+
	6	+	-	+	+++	++	-	+++
	7	-	+	-	+	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	+++
6	0	+	-	-	-	-	-	-
	3,5	+	++	-	+	+	-	-
	5	++	+	-	+++	++	-	+
	6	+	-	-	+	+	-	+++
	7	+	-	-	+	+	-	+
	8							
8	0	+	+	-	-	-	-	-
	3,5	++	++	+	-	-	-	-
	5	+	+	+	+++	+	+	++
	6	-	-	-	-	-	+	++
	7	-	-	-	-	-	-	+
	8							

Escala de pontuação dos efeitos em quantitativos de animais de cada concentração: - = Nulo (0 animais); + = Fraco (1-7 animais); ++ = Moderado (8-14 animais); +++ = Forte (15-21 animais). *Foram considerados apenas os animais que permaneceram mais de 30 segundos na região superior do aquário. Fonte: Autor (2019)

Tabela 15 – Manifestação dos efeitos comportamentais das 12 às 96h de exposição aguda aos herbicidas associados Picloram e 2,4-D.

Tempo	Concentração (mg/L)	Nado Excitatório	Zona Superior*	Respiração na Superfície	Perda de Equilíbrio	Nado Errático	Espasmos	Paralisa
12	0	+	-	-	+	+	-	-
	3,5	+	++	-	+	-	-	-
	5	+	+	-	+++	++	+	++
	6	-	-	-	+	+	+	++
	7	+	-	-	+	+	-	+
	8							
24	0	+	+	-	-	-	-	-
	3,5	+	+	-	+	-	-	-
	5	++	+	-	+++	++	-	+
	6	+	-	-	+	+	-	++
	7	+	-	-	+	+	-	+
	8							
48	0	+	-	-	+	+	-	-
	3,5	+	-	-	++	++	-	-
	5	+	-	-	+	+	+	+
	6	+	+	-	+	+	+	-
	7	+	-	-	+	+	+	+
	8							
72	0	-	+	-	-	-	-	-
	3,5	+++	-	+	+	+	-	-
	5	+	-	-	+	+	+	+
	6	+	-	-	+	+	+	+
	7	+	-	-	+	+	+	
	8							
96	0	+	+	-	++	-	+	-
	3,5	++	+	-	+	+	+	-
	5	+	+	-	+	-	-	-
	6	+	+	-	+	+	-	-
	7	+	-	-	+	+	+	+
	8							

Escala de pontuação dos efeitos em quantitativos de animais de cada concentração: - = Nulo (0 animais); + = Fraco (1-7 animais); ++ = Moderado (8-14 animais); +++ = Forte (15-21 animais). *Foram considerados apenas os animais que permaneceram mais de 30 segundos na região superior do aquário. Fonte: Autor (2019)

O Nado Excitatório é um comportamento resultante de um estresse. Nas primeiras horas após a aplicação do agrotóxico, os peixes demonstraram Nado Excitatório, agitação e agressividade. Esse comportamento pode ser descrito como movimento opercular acelerado, nadadeiras aceleradas e agitação corporal, como um estado de alerta para atacar ou se defender de um ataque.

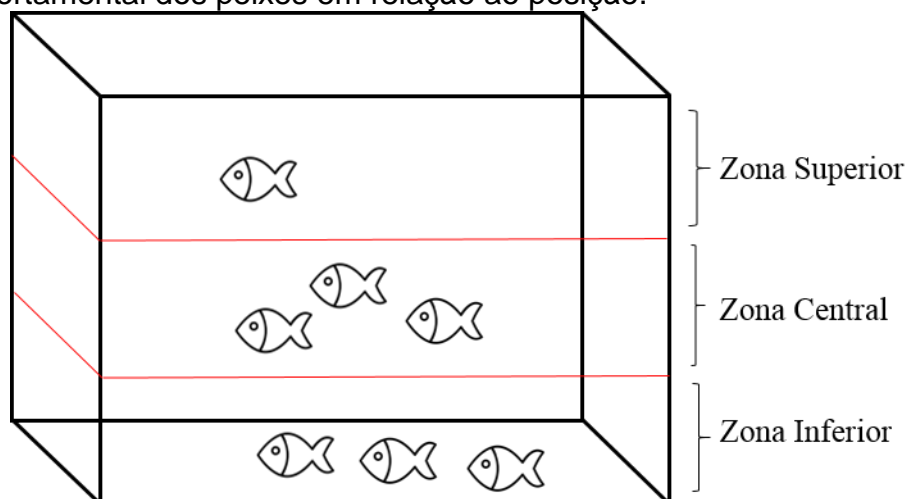
Embora os animais permanecessem no aquário sem exposição durante um dia antes do experimento, para se adaptarem ao ambiente. Os animais dos aquários que não possuía agrotóxicos (grupos branco) demonstraram Nado Excitatório fraco. Na concentração de 3,5 mg/L, o Nado Excitatório foi moderado nos tempos 2, 8 e 96 horas após a exposição, no tempo de 72 horas, o Nado Excitatório foi considerado alto. Na concentração de 5 mg/L, os peixes demonstraram o efeito moderado nos tempos 0, 2, 24 horas após a exposição, e no tempo de 3 horas, alto. Nos demais tempo foram fracos. Na concentração de 6 e 7 mg/L, inicialmente até as 2 horas após a exposição, foi observada uma redução dos efeitos forte para nulo, retornando a fraco após as 08 horas. No geral, os peixes demonstraram pouco excitado e mais letárgico, no período de 06 a 24 horas de exposição.

O aquário foi dividido em três regiões, no sentido vertical: Zona Inferior, Zona Central e Zona Superior (Figura 16). O objetivo era avaliar a região padrão dos peixes e suas alterações quando expostos a concentrações diferentes. Os peixes que estavam sendo o controle, ou seja, sem exposição ao agrotóxico demonstraram uma tendência predominante na Zona Inferior, em cardume e encarando seu próprio reflexo na parede de vidro do aquário. Para avaliar esse comportamento foi considerado o tempo de permanência do peixe em cada zona, principalmente por seu comportamento excitatório, o peixe não permanência muito tempo em cada zona. Os peixes expostos ao tóxico tiveram seu padrão alterado em relação as zonas, foi considerado um efeito fraco, apenas um ou dois animais, permaneciam segregados na Zona Superior do aquário.

Na concentração 3,5 mg/L, os peixes se movimentaram para Zona Superior mais intensamente que nas demais concentrações. Nos tempos 2, 4, 24 e 96 horas, poucos peixes permaneceram na Zona Superior. Nos tempos de 6, 8 e 12 após a exposição, a presença dos animais foi moderada. Na concentração 5 mg/L, no período de 2 a 24 horas e no após as 96h, houveram poucos peixes na Zona Superior. Nos demais períodos permaneceram nas demais zonas. Na concentração 6 mg/L, poucos peixes frequentaram a Zona Superior, apenas nos tempos 2, 48 e 96 horas. Na

concentração 7 mg/L, observou peixes na zona superior apenas no tempo de 2 horas. Na concentração 8 mg/L, os peixes estavam muito agitados não permanecendo na Zona Superior por mais de 30 segundos, porém se locomoviam entre todas as zonas até seu estágio de morte.

Figura 18 – Esquema da divisão dos aquários em zonas para avaliar a alteração comportamental dos peixes em relação ao posição.



Fonte: Autor (2019).

Um outro comportamento observado nos peixes foi a sua respiração na superfície do aquário. Embora os aquários estivessem equipados com aeração forçada contínua, o peixe migrava para Zona Superior e absorvia o oxigênio fora da água. Foi um comportamento pouco notório, considerado um efeito praticamente nulo durante o período de exposição.

Contudo, foi observado pelo menos um peixe em cada concentração realizando esse comportamento durante as 96 horas de exposição. Na concentração 3,5 mg/L, no tempo 8 e 72 horas. Na concentração de 5 mg/L, no tempo 2, 4 e 8 horas. Na concentração 6 mg/L, as 4 horas. Na concentração 7 mg/L, no tempo 2 horas. E na concentração 8 mg/L, no momento da exposição.

A Perda de Equilíbrio foi um comportamento bem evidenciado durante a exposição ao agrotóxico em todas as concentrações. Em um comportamento padrão, os peixes mantêm sua posição na horizontal ou uma leve inclinação antes de realizar um comportamento agonista de ataque. No entanto, quando foi adicionado o tóxico em estudo, percebeu-se uma alteração em sua inclinação padrão. Alguns animais não

conseguiram manter seu equilíbrio, mantendo-se inclinado, na vertical para baixo ou para cima.

Na concentração de 3,5 mg/L, os efeitos foram gradativos, manteve-se fraco em praticamente todo o período de exposição, elevando para moderado apenas na observação de 48h. Na concentração de 5 mg/L, os peixes demonstraram o efeito forte a partir de 2 horas a 48 horas de exposição. Nas horas seguintes, o efeito ainda foi evidente, no entanto, foi fraco. Nas concentrações de 6 e 7 mg/L, os efeitos foram fortes nas primeiras horas, reduzindo para fraco após ao tempo de 8 horas.

O Nado Errático é um comportamento importante de ser avaliado. O nado padrão dos peixes, normalmente, descreve uma trajetória direta até alcançar seu destino. Nessa alteração comportamental, o peixe descreve uma trajetória aleatória sem um destino final, sem rumo, como se buscasse uma saída. Normalmente está vinculado ao Nado Excitatório pois ocorre concomitantemente a um comportamento de agitação ou agressividade.

Em todas as exposições foram observados a presença de Nado Errático. Na concentração de 3,5 mg/L, os efeitos foram perceptíveis até a exposição de 6 horas, e nulo no período de 8 a 12 horas. Porém, a partir tempo de 24 horas, alcançou-se efeito moderado, reduzindo a fraco no restante do período de exposição. Na concentração de 5 mg/L, os efeitos foram moderado em quase todo período, exceto no tempo de 4 horas que alcançou efeito forte e nos tempos de 48 e 72 horas, o efeito fraco. Nas concentrações de 6 e 7 mg/L, os efeitos foram decrescente. Nas primeiras horas observou efeitos forte e moderado, mantendo-se fraco a partir das 12 horas.

Os espasmos são comportamentos inesperados, podendo ser causados pelo estresse a exposição de substâncias tóxicas. Eles são descritos como movimentos involuntários dos músculos que os peixes podem apresentar parado ou em movimento.

Na concentração de 3,5 mg/L, foram observados espasmos nas 2 horas após a exposição e a partir das 72 horas de exposição, considerados efeitos fracos. Nas concentrações de 5 e 6 mg/L, os efeitos foram alternados entre nulo e fraco, sendo que fraco foram nos tempos de 0, 8, 12, 48 e 72 após a exposição. Na concentração de 7 mg/L, os peixes manifestaram apenas efeito fraco no tempo de 2 horas e a partir das 48 horas até o final do tempo de exposição.

A paralisia também foi um efeito observado durante a exposição. Os peixes demonstravam imobilidade e um estágio de “quase morte”, não possuíam controle

sobre os movimentos. Alguns eram arrastados pela corrente provocada pelo sistema de aeração e outros permaneciam imóveis no fundo do aquário ou flutuando no aquário.

Assim como no grupo controle, os animais expostos a concentração de 3,5 mg/L do agente tóxico não demonstraram esse paralisia. Na concentração de 5 mg/L, a paralisia foi crescente nas primeiras horas, alcançando o ápice em 8 a 12 horas de exposição. A partir das 24 horas, os efeitos decresceram para moderado e fraco. Tornaram-se nulos em 96 horas. Na concentração de 6 mg/L, o efeito foi crescente nas primeiras 4 horas, quando foi mais intenso. Após as 6 horas de exposição, o efeito decresceu, iniciando o processo de recuperação a paralisia. Os efeitos se tornaram fracos e nulos a partir do 24 horas. Na concentração de 7 mg/L, os efeitos observados foram menores pois obteve uma grande mortalidade dos animais. No entanto, até as primeiras 4 horas de exposição, o efeito era nulo, elevando-se para fraco a partir das 6 horas. Na concentração de 8 mg/L, o comportamento de paralisia evolui muito rápido para o estágio de morte, os todos os animais demonstraram paralisia até as 4 horas de exposição, após isso foram considerados mortos.

Segundo Little et al. (1990), foram observados que o 2,4-D pode afetar, mesmo em baixas concentrações, a capacidade de natação da *Oncorhynchus mykiss* (truta arco íris).

Morgan et al., (1991) descreveram os seguintes comportamentos, expondo *Oncorhynchus mykiss* a três agrotóxicos diferentes: respiração irregular de natação errática, respiração laboral errática, respiração irregular de superfície de natação respiração rápida ofuscou opercular respiração respiratória laboral de natação errática.

Moura (2009) descreveu alguns comportamentos observados em *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo), *Cyprinus carpio* (carpa-comum) e *Colossoma macropomum* (tambaqui), são eles: natação errática e presença frequente na superfície do recipiente-teste, mudança na coloração, letargia, além da formação de muco, o que se sabe tornaria os peixes sobreviventes vulneráveis a doenças e predadores em seus habitats.

Sarikaya e Yilmaz (2003) descreveram comportamentos, com *Cyprinus carpio* exposto ao 2,4-D, semelhantes a esse estudo, sendo nas concentrações mais baixas saltos e nados agitados. Concentrações medianas, os peixes preferiam a superfície do aquário. E nas maiores, os peixes tendiam ir ao fundo antes de morrer.

Tramujas et al., 2006 descreveu os comportamentos anormais do *Danio rerio* (peixe zebra) exposto a deltametrina como hiperventilação, falta de coordenação de natação

Foi observado nas menores doses de diafuran a *Ctenopharyngodon idella* (Carpa capim) e *Aristichthys nobilis* (carpa cabeça grande) demonstraram comportamentos letárgicos (GOLOMBIESKI et al., 2005), assim como o *Danio rerio* exposto ao diuron e hexazinona (SILVA, RAVANELI, PASCHOALATO, 2010)

Tesolin et al., (2014) evidenciou distúrbios, permanecendo no fundo dos aquários, com períodos de natação errática e perda de equilíbrio, intercalados com períodos de paralisia, porém ainda reagindo a estímulos mecânicos no *Danio rerio* após a exposição a Ametrina.

Meyer e Barclay (1990 apud CETESB, 2019) determinaram alguns comportamentos associados a agrotóxicos organofosforados. Para o DDT, lindane e endosulfan são esperados: desordens no sistema nervoso central, aumento no ritmo de ventilação das brânquias, movimentos rápidos e abruptos do corpo e das nadadeiras, natação não coordenada, apresentando espasmos e convulsões, aumento da sensibilidade a estímulos externos, alta excitabilidade, perda de equilíbrio com períodos sucessivamente maiores de quietude até que cessam os movimentos respiratórios. No caso dos diazinon e terbufos são esperados: letargia, perda de equilíbrio, descoloração escura, freqüentemente avermelhada; hemorragia nos músculos e abaixo da nadadeira dorsal, hipersensibilidade dos peixes, que nadam rapidamente em círculos quando perturbados, nadadeiras peitorais e opérculos estendidos involuntariamente para a posição mais anterior possível e anormalidades na espinha.

3.2 ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS

3.2.1 Brânquias

As principais alterações observadas nas brânquias ocorreram na região lamelar, onde ocorre a passagem de água para processo de trocas gasosas. Essa região é constituída por lamelas primárias, revestida por epitélio estratificado, e secundárias, composta por duas camadas de células epiteliais pavimentosas, células pilares, células-cloreto e as células mucosas (MELETTI, 2003).

No tratamento com 3,5 mg/L, foi observado hiperplasia das células epiteliais e mucosas em todas as lamelas secundarias e uma congestão de eritrócitos

nas lamelas primárias. No tratamento com 5 mg/L, apresenta as lamelas primárias e secundárias difusas em processo de degeneração. No tratamento com 6 mg/L, a lamela primária está em processo de degeneração, acumulando alguns eritrócitos em apenas uma região, e a secundária está em fusão e degeneração. No tratamento com 7 mg/L, a lamela primária está difusa com poucos eritrócitos, as lamelas secundárias a direita estão com hiperplasia das células epiteliais e, ao lado esquerdo, há ausência de lamelas secundárias. No tratamento 8 mg/L, nota-se a lamela primária e secundária em estágio de degeneração (Figura 19).

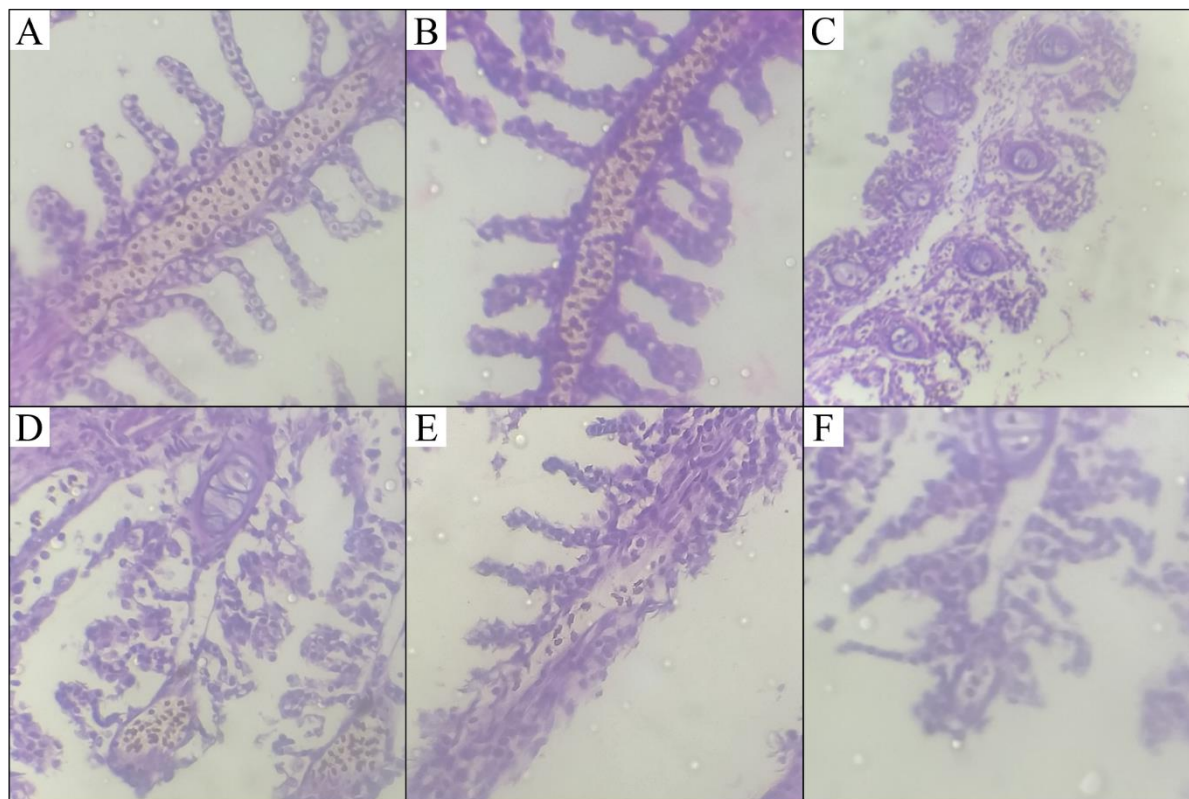
Não há estudos histopatológicos, em tambaquis, com a exposição dos herbicidas Picloram e 2,4-D associados. Porém, Marcato (2014) observou brânquias de Tilápias (*Oreochromis niloticus*) exposto ao 2,4-D, evidenciando o desprendimento epitelial lamelar, hipertrofia das células pavimentosas e o aumento das células clorídricas (MARCATO, 2014). E Botelho et al., 2012, em estudos com Picloram e Carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*), observaram elevação epitelial e proliferação celular parcial e fusão das lamelas secundárias.

Ferreira (2016) descreveu algumas alterações em brânquias de peixes amazônicos, sendo eles: *Carnegiella strigata* (borboleta pintada), *Hemigrammus rhodostomus* (rodóstomo), *Paracheirodon axelrodi* (tetra cardeal) e *Colossoma macropomum* (tambaqui), sob exposição a quatro agrotóxicos, Deltametrina, Imidacloprido, Glifosato e Diuron. As principais alterações foram a descamação do epitélio das lamelas secundárias, espaçamento entre as células epiteliais e pilares e hiperplasia das células epiteliais.

Braz-mota et al., (2015) e Vieira e Silva (2019) evidenciaram alterações histopatológicas em branquiais de *Colossoma macropomum*, expostos ao Glifosato, como hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar, descolamento epitelial, proliferação de células cloreto e edema.

As brânquias do *Piaractus brachypomus* (pacu), expostas ao Triclorfon, apresentaram alterações em células epiteliais das brânquias “recortada” e com acumulação de eritrócitos nas extremidades das lamelas secundárias. Algumas regiões também apresentaram hipertrofia das células epiteliais e desprendimento das lamelas (MÉNDEZ et al., 2014).

Figura 19 – Fotomicrografia da brânquia de *Colossoma macropomum* exposto agudamente aos herbicidas associados Picloram e 2,4-D.



A – Imagem controle. B – exposição a 3,5 mg/L apresenta hiperplasia da lamela secundária. C – exposição a 5,0 mg/L apresenta ausência da lamela secundária e ausência de hemácias na lamela primária. D – exposição a 6,0 mg/L apresenta deformação da lamela primária e secundária. E – exposição a 7,0 mg/L apresenta hiperplasia e degeneração da lamela secundária. F – exposição a 8,0 mg/L apresenta degeneração das lamelas. Fonte: Autor (2018)

Fajardo (2018) e Rondón-Barragan et al., (2012) avaliaram os efeitos da exposição do Glifosato nos peixes *Prochilodus magdalenae* (bocachico) e *Piaractus brachypomus* (pacu), respectivamente. Em ambos os peixes, foram observados os principais efeitos: a congestão de eritrócitos, edemas nos espaços extracelulares, hiperplasia do epitélio branquial, atrofiamento das lamelas e aneurisma.

Venturini (2014) observou que a exposição do agrotóxico Lambda-cialotrina em *Brycon amazonicus* (matrinxã) causava proliferação de células cloreto, hiperplasia do epitélio lamelar e hipertrofia do epitélio lamelar.

Segundo Mallatt (1985), o aumento das células mucosas provoca hipersecreção de muco que pode levar a proteção da estrutura tecidual em situações ambientais adversas e exposição à possíveis intoxicantes.

Segundo Mello (2018) as hiperplasias servem como uma proteção contra substâncias tóxicas, pois através da proliferação de células na região lamelar reduzem

a absorção de oxigênio, logo, redução de absorção de xenobióticos para o organismo. Porém, em um processo homeostático, os peixes tendem a aumentar o número de eritrócitos para facilitar a entrada oxigenação no organismo (IKEFUTI, 2012).

3.2.2 Fígado

Nas lâminas que continham o tecido hepatológico, além dos hepatócitos, foi observado células pancreáticas. Os hepatócitos apresentaram forma arredondada, citoplasma róseo, núcleo central com um ou dois nucléolos e organização cordonal das células (MELETTI, 2003).

No tratamento com 3,5 mg/L, foi possível observar o fenômeno de vacuolização em algumas regiões. Nos tratamentos com 6 e 7 mg/L, evidenciaram vacúolos e células hepáticas anucleadas, além do aumento do citoplasmas e migração do núcleo para áreas periféricas. Nas demais concentrações de 5 e 8 mg/L, não foi possível realizar a leitura histológica.

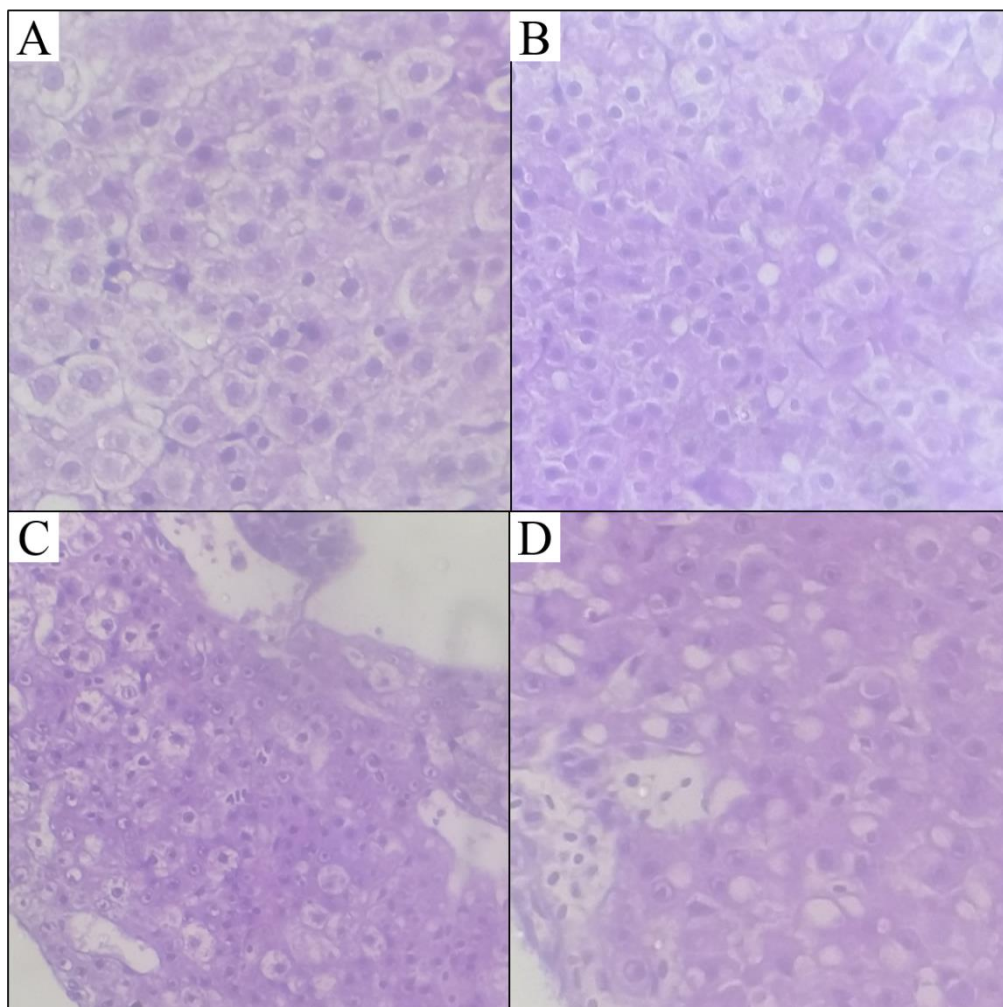
Embora não tenham sido encontrados estudo da histopatologia hepática para 2,4-D e Picloram associados, Botelho et al., (2012), utilizando apenas Picloram, expos agudamente o *Ctenopharyngodon idella* (carpa capim) e não obteve resultados significativos nas alterações do tecido do fígado (BOTELHO, 2010).

Estudos realizados para avaliar a exposição da Cipermetrina e Glifosado associado ao Benzopireno em células hepáticas do *Colossoma macropomum* (tambaqui) também identificaram a presença de vacúolos no citoplasma, congestão, dilatação sinusoidal, esteatose e picnose, além de hipertrofia e hiperplasia e necrose (SILVA, 2016; CUNHA et al., 2018).

Outra espécie de peixe amazônica *Piractus mesopotamicus* (pacu) exposto a Atrazina e Teflubenzuron demonstraram alterações semelhantes no fígado como hipertrofia, deslocamento do núcleo celular para a periferia, aumento do diâmetro do capilar sinusóide, vacuolização nuclear, vacuolização e necrose (PAIVA, 2010; IKEFUTI, 2012).

O *Brycon amazonicus* (matrinxã) também apresentação alterações hepáticas em ensaios com a Lambda-cialotrina, como vacuolização citoplasmática, hipertrofia celular, deslocamento nuclear, degeneração citoplasmática e deformação da membrana (VENTURINI, 2014).

Figura 20 – Fotomicrografia do fígado de *Colossoma macropomum* exposto agudamente aos herbicidas associados Picloram e 2,4-D.



A – Imagem controle. B – exposição a 3,5 mg/L apresenta vacúolos. C – exposição a 6 mg/L apresenta aumento do citoplasma e migração do núcleo para periferia. D – exposição a 7 mg/L apresenta vacuolização e células anucleadas. Fonte: Autor (2019)

Estudos com outras espécies de peixes e outros ingredientes ativos também demonstraram alterações semelhantes. A exposição do Glifosato sobre *Prochilodus magdalenae* (bocachico), *Piaractus brachypomus* (pacu) e *Leporinus macrocephalus* (piaçu) demonstraram expansão celular, migração do núcleo para periferia da célula, congestão eritrocitária nos vasos sanguíneos, degeneração gordurosa e degeneração celular (ALBINATI et al., 2007; RONDÓN-BARRAGAN et al., 2012; FAJARDO, 2018)

Nos tecidos hepáticos do *Pterophyllum scalare* (acará bandeira) contaminado com ivermectina evidenciaram alterações significativas como congestão hepática, degeneração gordurosa e degeneração hidrópica (CARDOSO, 2017).

A esteatose (presença de vacúolos citoplasmáticos arredondados, claros, aumentados e com núcleo deslocado para a periferia da célula) e necrose tecidual (regiões do tecido em que os núcleos exibiam picnose e/ou cariólise, com membranas celulares descontínuas) são causados em resposta a sensibilidade do fígado à intoxicação por substâncias químicas (PINHEIRO et al., 2017; MELLO, 2018).

O aumento do fluxo sanguíneo dos vasos sinusóides indica que o órgão está tentando eliminar aqueles resíduos resultante do metabolismo de substâncias tóxicas (VENTURINI, 2010).

Em geral, as principais alterações ocorrentes no fígado quando tem exposto aos agrotóxicos são: vacuolização, hipertrofia, hiperplasia, congestão, degeneração e necrose, não caracterizando alterações específicas para o Picloram e 2,4-D associados, porém suficientes para indicar contaminação ambiental, se realizado em uma avaliação de águas superficiais.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através da exposição aguda dos herbicidas associados Picloram e 2,4-D em juvenis de *Colossoma macropomum* demonstraram alterações significativas no comportamento e na histologia branquial e hepática. No entanto, as alterações relatadas não demonstraram especificidade aos tóxicos em estudos, pois descrevem efeitos semelhantes decorrente da exposição de outras substâncias químicas em peixes. Contudo, essas evidências são suficientes para alertar os riscos de contaminação a população da utilização desses agrotóxicos. Também foi possível constatar, através desse estudo, a viabilidade do uso da espécie *Colossoma macropomum* em testes de biomonitoramento para corpos hídricos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINATI, A.C.L et al. Toxicidade aguda do herbicida roundup® para piaçu (*Leporinus macrocephalus*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 3, 2007.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Ed. 2, Santa Maria: UFSM, 212 p. 2002.

BOTELHO, R. G. **Toxicidade de herbicidas para *Escherichia coli* e alevinos de *Ctenopharyngodon idella***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Vale do Rio Doce. 2010.

BOTELHO, R. G. et al. Effects of atrazine and picloram on grass carp: acute toxicity and histological assessment. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 94, n. 1, p. 121-127, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Anvisa aprova novo marco regulatório para agrotóxicos. **ASCOM/AVISA**, 23 jul. 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias?p_p_id=101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU&p_p_col_id=column-2&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_groupId=219201&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_urlTitle=anvisa-aprova-novo-marco-regulatorio-para-agrotoxicos&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_assetEntryId=5568958&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_type=content>. Acesso em: 01 dez. 2019.

BRAZ-MOTA, S. et al. Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. **Chemosphere**, v. 135, p. 53-60, 2015.

CARDOSO, L.M. Efeito da ivermectina e do triclorfone em banho terapêutico para acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*, LICHTENSTEIN, 1823) parasitados por *Clinostomum complanatum*. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Norte do Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciência e Tecnologias Agropecuárias. 2017.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (Cetesb). **Mortandade de Peixes**. 2019. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/mortandade-peixes/>>. Acesso em: 03/12/2019

CRUZ, C. et al. Sensitivity, ecotoxicity and histopathological effects on neotropical fish exposed to glyphosate alone and associated to surfactant. **Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 8, n. 3, p. 25-33, 2016.

CUNHA, F.S. et al. Toxidade aguda da Cipermetrina e seus efeitos histopatológicos no fígado de tambaqui *Colossoma macropomum*. In: **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

ECOTOXIDADE, 15., 2018, Aracaju. Anais... Aracaju: Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia, 2018.

CURI, L. M. et al. Acute Toxicity and Sublethal Effects Caused by a Commercial Herbicide Formulated with 2, 4-D on *Physalaemus albonotatus* Tadpoles. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 230, n. 1, p. 22, 2019.

DAMALAS, C., KOUTROUBAS, S. Farmers' exposure to pesticides: toxicity types and ways of prevention. **Toxics**, 2016.

FAJARDO, M.A.P. **Efectos del Roundup 747 sg ® en los embriones, larvas y juveniles del bocachico (*Prochilodus magdalenae* steindachner, 1879) en condiciones controladas de laboratorio**. TCC (trabalho de conclusão de curso) - Programa de Biologia, Universidad del Atlántico, 2018.

FERREIRA, D. **Parâmetros de estresse oxidativo e estudo de lesões histopatológicas em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a agroquímicos**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Santa Maria, 2010.

FERREIRA, L.S.V. **Efeitos histopatológicos dos agrotóxicos deltametrina, imidacloprido, glifosato e diuron nas brânquias de quatro espécies de peixes amazônicos**. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior). Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), 2016.

GOLOMBIESKI, J.I. et al., Qualidade da água no consórcio de peixes com arroz irrigado. **Ciênc. Rur.** 35(6):1263-1268. 2005.

IKEFUTI, C.V. **Hematologia e ecotoxicidade do teflubenzuron no controle de *Trichodina* sp. em peixes**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Centro de Aquicultura da Unesp – Campus Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista. 2012.

LINS, J.A.P.N et al. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 8, n. 4, p. 469-484, 2010.

LITTLE, E. E. et al. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 19, n. 3, p. 380-385, 1990.

MACIEL, C.F. **Exotoxicologia comportamental: uma revisão com enfoque na locomoção de invertebrados aquáticos**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Oceanografia, Universidade de São Paulo. 2019.

MALLATT, Jon. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 42, n. 4, p. 630-648, 1985.

MARCATO, A.C.C. **Investigação da toxicidade e da capacidade de recuperação do herbicida 2,4-d comercial (2,4-diclorofenoxiacético) empregando brânquias de tilápias, *Oreochromis niloticus*, como biomarcado**. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2014.

MELETTI, P.C. **Avaliação da degradação ambiental por meio de teste de toxicidade com sedimentos e de análises histopatológicas em peixes.** Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade São Paulo (USP), 2003.

MELLO, N.P. **Recuperação de peixes juvenis de *Oreochromis niloticus* após a intoxicação aguda com o inseticida malathion.** Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2018.

MÉNDEZ, G.A.M. et al. Toxicity of trichlorfon exposure using an experimentally induced model with Silver Pacu (*Piaractus brachypomus*). **CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 9, n. 2, p. 190-202, 2014.

MOURA, E.E.S. **Determinação da toxicidade aguda e caracterização de risco ambiental do herbicida Roundup (glifosato) sobre três espécies de peixes.** Dissertação (Mestre em Bioecologia Aquática). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2009.

MORGAN, J. D. et al. Acute avoidance reactions and behavioral responses of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to Garlon 4®, Garlon 3A® and Vision® herbicides. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 10, n. 1, p. 73-79, 1991.

PAIVA, P.P. et al. **Avaliação da intoxicação aguda induzida por atrazina em espécie da ictiofauna do pantanal mato-grossense, pacu (*Piaractus mesopotamicus*), com o emprego de biomarcadores morfológicos.** Dissertação (Mestre em Biologia Celular e Estrutural). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2010.

PINHEIRO, K.B.S. et al. Histopatologia do fígado de *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 proveniente de área sobre influência de mineração na Amazônia Oriental, Brasil. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 7, n. 3, p. 74-78, 2017.

SARIKAYA, R.; YILMAZ, M. Investigation of acute toxicity and the effect of 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae). **Chemosphere**, v. 52, n. 1, p. 195-201, 2003.

RONDÓN-BARRAGÁN, I. S. et al. El glifosato (Roundup®) y Cosmoflux® 411F inducen estrés oxidativo en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). **Orinoquia**, v. 16, n. 2, p. 162-176, 2012.

SALLA, G.B.F. et al. Kinetics of the metabolic effects, distribution spaces and lipid-bilayer affinities of the organo-chlorinated herbicides 2, 4-D and picloram in the liver. **Toxicology Letters**, 2019.

SANTOS, S. B. **Avaliação da toxicidade aguda do pesticida clorpirifós® para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1818).** Dissertação – Programa De Pós-Graduação em Biociências. Universidade Federal Do Oeste Do Pará (UFOPA), 2019.

SILVA, B.M.; RAVANELI, M.A.C; PASCHOALATO, C.F.P.R. Toxicidade aguda dos herbicidas diuron e hexazinona à *Danio rerio*. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 20, 2010.

SILVA, G.S. **Influência dos contaminantes ambientais Benzo[a]pireno e Roundup® sobre *Colossoma macropomum* submetida à hipóxia e mudanças climáticas: respostas genéticas, fisiológicas e histológicas**. Tese (Doutorado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva). Instituto Nacional de Pesquisa na Amazônia (INPA), 2016.

TESOLIN, G.A.S. et al. Avaliação da toxicidade de herbicidas usados em cana-de-açúcar para o Paulistinha (*Danio rerio*). **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2014.

TORDON: Picloram e 2,4-D. São Paulo: Dow AgroSciences Industrial Ltda, [2017]. Bula do Pesticida. Disponível: <<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Herbicidas/tordon260218.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2018.

TRAMUJAS, F. F. et al. Aspectos reprodutivos do peixe-zebra, *Danio rerio*, exposto a doses subletais de deltametrina. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, 2006.

VENTURINI, F.R **Toxicidade aguda e respostas metabólicas e hematológicas do pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) exposto a concentração subletal de triclorfon e recuperação**. Dissertação (Mestre em Genética e Evolução). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos. 2010.

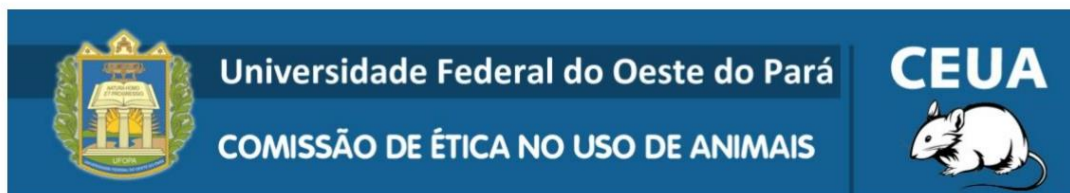
VENTURINI, F.R. **EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À LAMBDA-CIALOTRINA NO TELEÓSTEO *Brycon amazonicus*: METABOLISMO ANTIOXIDANTE, PARÂMETROS HISTOLÓGICOS E HEMATOLÓGICOS**. Tese (Doutorado em Ciências), do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), 2014.

VIEIRA, J.A.R.A; SILVA, G. S. Avaliação dos efeitos do Roundup® e da hipóxia sobre os parâmetros hematológicos e histologia branquial de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Scientia Amazonia**, v. 8, n.2, CAm16-CAm28, 2019

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstra a viabilidade do uso do *Colossoma macropomum*, uma espécie originária da Amazônia, como um organismo teste, em tendência para pesquisas toxicológicas. Seu perfil enquadra-se como um peixe abundante no meio ambiente, fácil criação em cativeiro e de alta importância econômica. Além disso, demonstra bons resultados nos testes de sensibilidade ao $K_2Cr_2O_7$, além de possuir uma sensibilidade também quando exposto a substâncias tóxicas, como os agrotóxicos.

O uso dos juvenis de *Colossoma macropomum*, sob exposição dos ingredientes ativos Picloram e 2,4-D, foi capaz de avaliar a toxicidade aguda através da Concentração Letal Média (CL_{50}), alterações comportamentos e histopatológicas, em brânquias e fígado, confirmando sua utilização para os testes toxicológicos e evidenciando os riscos que esses herbicidas podem causar ao meio ambiente.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL (CEUA)**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo Nº **0120190053**, intitulado **Avaliação Ecotoxicológica dos Efeitos da Associação dos Pesticida 2,4-D e Picloram em Peixes da Espécie Colossoma macropomum (Cuvier, 1818)**, sob a responsabilidade de **Maxwell Barbosa de Santana**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº **0120190053**, entitled "**Avaliação Ecotoxicológica dos Efeitos da Associação dos Pesticida 2,4-D e Picloram em Peixes da Espécie Colossoma macropomum (Cuvier, 1818)**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Commission for Ethics in the Use of Animals of Universidade Federal do Oeste do Pará.

Santarém-PA, 30/01/2019

Prof. Dr. Maxwell Barbosa de Santana
Presidente

Verificar a autenticidade do certificado em <http://ufopa.edu.br/ceua/validar-certificado>

ANEXO B – APRESENTAÇÃO EM EVENTOS

B.1 – I CONGRESSO INTERNACIONAL DE PESQUISA E CIÊNCIA DO IESPE (CIPEC)



B.2 – XV CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA (ECOTOX)



B.3 – XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA (CBTOX)



2019
CBTOX
XV TIAFT Latin-American
Regional Meeting

XXI Brazilian Congress of Toxicology

XV TIAFT LATIN-AMERICAN REGIONAL MEETING
28 - 31 October 2019 - Águas de Lindóia - Brazil

CERTIFICATE

Hereby, we certify that

João David Batista Lisboa, Osléias Ferreira Aguiar, Soraia Baia dos Santos, Nataniely Cristina Pinto Pimentel, Daniela Andressa Ferreira Viana, Maxwell Barbosa de Santana and Ruy Bessa Lopes,

has presented the **poster** titled

***Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) AS ANIMAL MODEL FOR TOXICOLOGICAL TESTS: A SCIENTOMETRIC ANALYSIS**

in the XXI Brazilian Congress of Toxicology and XV TIAFT Latin-American Regional Meeting, held in Águas de Lindóia-SP, Brazil, from 28th to 31st October, 2019.

ORGANIZATION



Brazilian Society
of Toxicology



TIAFT

SUPPORT



CAPES



FAPESP



Prof. Dr. Tiago Franco de Oliveira
Chair of XXI CBTOX



Prof. Dr. José Luiz da Costa
Chair of XV TIAFT Latin-American Regional
Meeting