



Universidade Federal do Oeste do Pará
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica
Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas
Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos Continentais Amazônicos

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TOXICOLÓGICO DE ATRAZINA
NA RETINA DE ALEVINOS DE *Colossoma macropomum*
(CUVIER, 1818)**

ALESSANDRA DE SOUSA SILVA

Santarém, Pará
Maiο, 2018

ALESSANDRA DE SOUSA SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TOXICOLÓGICO DE ATRAZINA
NA RETINA DE ALEVINOS DE *Colossoma macropomum*
(CUVIER, 1818)**

ORIENTADOR: Profº Dr. RUY BESSA LOPES

**CO-ORIENTADORA: Profª Dra. SORAIA VALÉRIA DE OLIVEIRA COELHO
LAMEIRÃO**

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de mestre em Recursos Aquáticos
Continentalis Amazônicos**

**Santarém, Pará
Maio, 2018**



Universidade Federal do Oeste do Pará
 Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica
 Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas
 Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos Continentais Amazônicos

AVALIAÇÃO DO EFEITO TOXICOLÓGICO DE ATRAZINA NA
 RETINA DE ALEVINOS DE *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818)

ALESSANDRA DE SOUSA SILVA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos Continentais Amazônicos – PPG-RACAM como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Aquáticos Continentais Amazônicos, cuja banca examinadora foi constituída pelos seguintes professores listados abaixo.

Orientador:

Prof. Dr. Ruy Bessa Lopes (ICTA-UFOPA)

Coorientadora:

Prof. Dra. Soraia Valéria de Oliveira Coelho Lameirão

Banca examinadora:

Prof. Dr. Maxwell Barbosa de Santana – PPGBIOC/UFOPA

Prof. Dr. Ricardo Bezerra de Oliveira – PPGRNA/UFOPA

Prof. Dr. Lucnewton Silva de Moura – PPGRACAM/UFOPA

Santarém, Pará
 Maio, 2018

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

S586a Silva, Alessandra de Sousa
Avaliação do efeito toxicológico de Atrazina na retina de Alevinos de *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818). / Alessandra de Sousa Silva. – Santarém, 2018.
69 p. : il.
Inclui bibliografias.

Orientador: Ruy Bessa Lopes
Coorientadora: Soraia Valéria de Oliveira Coelho Lameirão
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos Continentais Amazônicos.

1. Ecotoxicologia. 2. Agrotóxico. 3. Tambaqui. I. Lopes, Ruy Bessa, *orient.* II. Lameirão, Soraia Valéria de Oliveira Coelho, *coorient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 632.954

Bibliotecária - Documentalista: Renata Ferreira – CRB/2 1440

Sinopse:

Estudou-se a toxicidade aguda e crônica do herbicida atrazina em peixes, da espécie *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818). Aspectos morfológicos das camadas celulares da retina dos indivíduos foram avaliados.

Palavras-chave: Ecotoxicologia, agrotóxico, tabaqui, retina.

Dedico este trabalho a todas as criaturas criadas por Deus que foram sacrificadas em nome da ciência para que outras possam ser salvas (meus peixinhos).

Agradecimentos

Tão difícil foi concluir essa etapa acadêmica, talvez fosse impossível sem a contribuição de todos que participaram dessa árdua caminhada junto comigo, e gostaria de agradecer:

- Primeiramente a Deus, o dom da vida e sua infinita bondade me presenteando com todas as oportunidades que eu agarrei com unhas e dentes, e também por ter me dado forças em todos os momentos que eu fraquejei e pensei em desistir diante de tantas dificuldades enfrentadas;

- À minha família, sempre com seu apoio incondicional, mesmo sem compreender o real motivo das incontáveis horas dedicadas ao trabalho durante finais de semana, feriados, noites sem dormir, etc., os quais não aproveitei momentos com vocês porque estava envolvida com o trabalho. Obrigada também por todos os cuidados, preocupações e paciência durante minhas crises de estresse e ansiedade.

- Aos professores que eu já tive o prazer de ter absorvido algum conhecimento em toda minha trajetória de vida, sem vocês eu nunca teria chegado até aqui;

- À minha orientadora/mãe acadêmica, Soraia Lameirão, por ter sido a única que me incentivou a fazer o processo seletivo do Programa (em segredo); por me ensinar o quanto eu consegui amadurecer sozinha; por me apresentar o maravilhoso mundo da pesquisa e me convencer que esse é meu perfil profissional; por anos de paciência durante minhas crises de ansiedade, por todas as contribuições em tantos trabalhos construídos juntos; pela parceria, risadas e choros. Tudo isso que foi construído ao longo desses anos de orientação me ajudou a ser quem sou hoje, e eu estou orgulhosa disso;

- Ao meu orientador, Ruy Bessa, que mesmo sem conhecer meu potencial, acreditou e concordou em me ajudar nessa proposta, contribuindo e acompanhando cada etapa da sua construção com dedicação; por ter me mostrado o quão incrível é mundo da Ecotoxicologia Aquática; pela confiança depositada em mim para fazer os experimentos e cuidar de todos os venenos tão temidos em nosso laboratório; pela responsabilidade que eu adquiri durante o tão pouco tempo de mestrado; pelos livros emprestados e pela preocupação e interesse em sempre me ajudar;

- Aos meus colegas da turma de 2016 do PPG RACAM, por toda paciência e colaboração durante nossas aulas em que eu ficava com o olhar meio perdido diante tanta informação ao mesmo tempo, pelas risadas e aprendizagens durante nossas aulas de campo, pela melhor troca de experiências que eu obtive de cada um e por ouvir meus desabafos em momentos de agonia;

- Ao Professor Frank Ribeiro, pela submissão de proposta de bolsa de auxílio financeiro aos projetos da FAPESPA, pela paciência em nos repassar os pagamentos de todos os meses, mesmo com dificuldades impostas;

- Ao Professor Diego Zacardi, por ter ajudado a salvar minha qualificação, durante o período que o Campus da Universidade foi ocupado e eu não tive acesso ao meu banco de dados, nunca vou esquecer o que fez por mim aquele dia;

- Ao Professor Maxwell Santana, por ter contribuído no processo de aclimação dos peixes, por todas as sugestões e contribuições do projeto ao longo do curso, pelo empréstimo de

materiais e equipamentos que eu não tinha acesso, e por me incluir nas atividades de seu grupo de pesquisa;

- A professora Lenise Silva, por me receber em seu laboratório, permitir que eu utilizasse seus materiais e equipamentos, por me “emprestar” seus mestrados e PIBICs para me ajudar com o processo histológico das amostras, pelas contribuições durante a aula de qualificação e pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei;

- Aos companheiros do Laboratório de Química, Jandira, Mila, Soraia e João, por todo o esforço no auxílio da realização dos experimentos, pelos “cafés com dicromato” durante nossas conversas em momentos de descontração nos intervalos de observação dos peixes, pela paciência nas horas de estresse e quando tudo dava errado, por algumas vezes se deixar intoxicar pelos venenos junto comigo, pela companhia, pela preocupação, pelo interesse em sempre tentar ajudar de alguma forma, pelo apoio e pela confiança nesse projeto. Eu não teria conseguido sem vocês;

- Aos companheiros de laboratório durante os processos histológicos Elen Monique, Jonas, Simone, Raiany, Sandy, pela paciência por repassarem seus conhecimentos, por me acudir nos momentos de agonia em cada etapa realizada;

- Ao colega Joseph Simões pela ajuda com a indicação de referências, com os cálculos de CL_{50} , curva logística e edição de figuras que contribuíram imensamente com o trabalho;

- Aos meus queridos amigos (que não tenho como citar todos) em especial Ana, Adrison, Edson, Tatiane, José Neto, Francisco Galúcio (Chico), Alan, Thiago Caetano (in memoriam), pelas incontáveis conversas para me apoiar, pela ajuda psicológica, por compreender quando eu abri mão de estar com vocês para estudar, principalmente nos fins de semana não aproveitados e as datas que não pudemos comemorar. Obrigada por compreenderem tudo o que eu tive que fazer por essa dissertação, e mesmo assim não desistiram de mim, vocês moram no meu coração.

- Ao amigo José Augusto Freitas, por anos de amizade cheios de incentivo, além do apoio, cuidado e carinho na temporada que passei em Belém durante as análises das amostras;

- Aos amigos Raísa Fonseca, Rodrigo Malcher Nayr Laura, Xenya Lopes e Igor Leal, pela amizade, apoio psicológico e por me ajudarem durante a temporada que estive em Belém para fazer parte das análises e no acompanhamento dessa difícil trajetória. Vocês são incríveis;

- Aos amigos do Time Enactus UFOPA, por me mostrar o quanto a minha interdisciplinaridade podia contribuir com comunidades tão necessitadas atendidas pelos projetos do time, pelo tempo em que nos dedicamos às atividades do time nas comunidades, construindo nossos laços de amizade, e mesmo com dificuldade aprendemos a amadurecer durante nossas trocas de experiências;

- Aos membros do Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos Continentais Amazônicos que contribuíram direta e indiretamente para que eu chegasse nessa etapa acadêmica;

- À Universidade Federal do Oeste do Pará pela estrutura cedida na realização do projeto e auxílios financeiros para participações em eventos;

- À Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas do Pará (FAPESPA) pela concessão da bolsa e auxílio financeiro para compras de materiais de consumo para o projeto;
- Aos professores que aceitaram corrigir o trabalho como membros da banca de avaliação;
- Ao Polino pela fiel companhia em todas as madrugadas de estudo;
- À todas as pessoas não mencionadas que também contribuíram nessa conquista;
- E por último, mas não menos importante, a todas as pessoas que não acreditaram que eu conseguiria chegar até aqui. Isso me motivou ainda mais na concretização desse sonho para mostrar a todos que eu sou capaz.

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano”

(Isaac Newton)

RESUMO

A atrazina é um herbicida possui características físico-químicas que aumentam a probabilidade de atingir as águas subterrâneas. Entre os ingredientes ativos mais comercializados no Brasil a atrazina se destacou na 3ª posição no ranking em 2013, sendo considerada muito tóxica para organismos aquáticos. O objetivo da pesquisa foi avaliar o efeito toxicológico de atrazina na retina de alevinos de *Colossoma macropomum*. Para isso foram realizados testes de toxicidade aguda (5, 15, 30, 45 e 60 mg/L), a partir do método de Trimmed Spearman-Kärber. Já nos testes crônicos, os alevinos foram expostos às seguintes concentrações 0,85, 4,2, 8,3 e 16,5 mg/L, e posteriormente, as amostras de retina foram encaminhadas para análise histológica e coradas pelo método de coloração com Hematoxilina e Eosina. A Concentração letal média em 96 horas de exposição de atrazina para alevinos de tambaqui foi de 27,78 mg/L, com limites inferior e superior de 22,49 e 34,22 mg/L respectivamente, sendo que a maior concentração que não causou mortalidade foi de 5 mg/L e a maior concentração que causou mortalidade foi de 15 mg/L. No teste crônico foram avaliados os parâmetros morfológicos das camadas celulares da retina dos alevinos, os quais não sofreram nenhuma alteração entre os tratamentos. Por outro lado, as literaturas apontam para as consequências neurotóxicas da exposição de espécies de peixes sob concentrações agudas e/ou subagudas referentes à atrazina. Podemos embasar tal afirmação nos achados de toxicidade relatados que, trazem menções de alterações comportamentais por parte de seus autores, verificados frente à diferentes concentrações deste composto, como por exemplo, desvios de comportamentos padrões descritos como: natação irregular, letargia, batimento opercular acelerado e respiração aquática na superfície, que também foram observados durante o presente trabalho. Além disso, os resultados de amostras de água analisadas não demonstraram alterações bruscas de valores entre os tratamentos, tanto do teste agudo quanto crônico

ABSTRACT

Atrazine is a herbicide that has physical-chemical characteristics that increase the chance of reaching groundwater. Among the most commercially available active ingredients in Brazil, atrazine ranked 3rd in the ranking in 2013 and is considered very toxic to aquatic organisms. Aims of this research was to evaluate the toxicological effect of atrazine on the retina of *Colossoma macropomum* fingerlings. Acute toxicity tests (5, 15, 30, 45 and 60 mg/L) were performed using the Trimmed Spearman-Kärber method. In the chronic tests, the fingerlings were exposed to the following concentrations: 0.85, 4.2, 8.3 and 16.5 mg/L, and the retinal samples were then submitted to histological analysis and stained by the HE method. The LC_{50}^{96h} of atrazine for tambaqui fingerlings was 27.78 mg/L, with a lower limit of 22.49 mg/L and an upper limit of 34.22 mg/L, and the CENO concentration was 5 mg/L and the CEO was the concentration of 15 mg/L. In the chronic test, the morphological parameters of the cellular layers of the retina of the fingerlings were evaluated, which did not suffer any alterations between treatments. On the other hand, the literature points to the neurotoxic consequences of the exposure of fish species to acute and / or subacute concentrations of atrazine. We can base this assertion on the reported toxicity findings that bear references of behavioral changes by its authors, verified against the different concentrations of this compound, such as deviations from standard behaviors described as: irregular swimming, lethargy, accelerated water surface respiration, which were also observed during the present study. In addition, the results of water samples analyzed did not show sharp changes in values between treatments, both acute and chronic.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Pesticidas e os Ambientes Aquáticos.....	3
2.2 Vantagens da utilização do monitoramento ecotoxicológico	4
2.3 Toxicidade e avaliação de risco ambiental	6
2.4 O Herbicida atrazina e seu modo de ação no ambiente	7
2.5 Toxicidade do herbicida atrazina em organismos aquáticos	9
2.6 Toxicidade da atrazina em peixes de água doce	10
2.7 Marcadores de exposição e efeito	12
2.8 Biomarcadores morfológicos	13
2.9 Aspectos da morfologia do olho de teleósteos de água doce.....	15
2.9.1 Retina	16
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Bioensaios de Toxicidade	20
4.2 Organismos teste - <i>Colossoma macropomum</i> (Cuvier, 1818) – Tambaqui.....	20
4.3 Aclimação	21
4.4 Teste Com Substância Referência – Dicromato De Potássio	21
4.5 Atrazina.....	22
4.6 Teste preliminar de toxicidade.....	22
4.7 Monitoramento dos parâmetros físico-químicos da água	23
4.8 Teste de toxicidade aguda.....	23
4.9 Determinação da CL ₅₀ 96h.....	24
4.10 Teste de toxicidade crônica.....	24
4.11 Avaliação histológica do efeito da atrazina nas retinas dos alevinos	25
4.11.1 Procedimento histológico	25
4.12 COMITÊ DE ÉTICA	26
4.13 ANÁLISE DOS RESULTADOS	26
5. RESULTADOS.....	27
5.1 Teste de toxicidade aguda.....	27
5.2 Teste de toxicidade Crônica.....	30
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÕES.....	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físico-química do ingrediente ativo atrazina.....	22
Tabela 2: Valores médios e respectivos desvios-padrão dos pesos (g) dos indivíduos da espécie <i>C. macropomum</i> submetidos ao teste de toxicidade aguda com atrazina para obtenção da CL ₅₀	27
Tabela 3: Valores médios e respectivos desvios-padrão dos comprimentos (cm) dos indivíduos da espécie <i>C. macropomum</i> submetidos ao teste de toxicidade aguda com atrazina para obtenção da CL ₅₀	27
Tabela 4: Valores médios e desvio padrão das variáveis físico-químicas de análise de água do teste de toxicidade aguda.....	28
Tabela 5: Valores obtidos para mortalidade de <i>Colossoma macropomum</i> (tambaqui) durante o período de exposição aguda (96 horas) em diferentes concentrações de atrazina.....	29
Tabela 6: Valores médios e respectivos desvios-padrão dos pesos (g) dos indivíduos da espécie <i>C. macropomum</i> submetidos ao teste de toxicidade crônica com atrazina para obtenção da CL ₅₀	30
Tabela 7: Valores médios e respectivos desvios-padrão dos comprimentos (cm) dos indivíduos da espécie <i>C. macropomum</i> submetidos ao teste de toxicidade crônica com atrazina para obtenção da CL ₅₀	30
Tabela 8: Valores médios e desvio padrão das variáveis físico-químicas de análise de água do teste de toxicidade crônica.....	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comercialização de atrazina no Brasil entre 2010 e 2014.....	8
Figura 2: Campos de visão de peixes teleósteos.....	15
Figura 3: Representação das estruturas do olho de peixes teleósteos.....	16
Figura 4: Corte histológico demonstrando a organização celular laminar da retina de tambaqui.....	17
Figura 5: Espécie <i>Colossoma macropomum</i> – Tambaqui.....	20
Figura 6: Fórmula estrutural do ingrediente Ativo atrazina.....	22
Figura 7: Curva logística da reação entre a porcentagem da mortalidade e suas respectivas concentrações no teste agudo de atrazina com tambaqui.....	29
Figura 8: Corte histológico demonstrando a organização celular laminar da retina de uma amostra da unidade controle.....	32
Figura 9: Corte histológico demonstrando a organização celular laminar da retina de uma amostra da Concentração 1 (A); Concentração 2 (B); Concentração 3 (C); Concentração 4 (D).....	33

LISTA DE SIGLAS

ABRASCO: Associação Brasileira de Saúde Coletiva

ADAPAR: Agência de Defesa Agropecuária do Pará

CCG: Camada de Células Ganglionares

CENO: maior concentração que não causa efeito

CEO: menor concentração que causa efeito

CF: Camada de Fotorreceptores

CFN: Camada de Fibras Nervosas

CL₅₀: Concentração Letal Média

CNE: Camada Nuclear Externa

CNI: Camada Nuclear Interna

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

CPE: Camada Plexiforme Externa

CPI: Camada Plexiforme Interna

CSEF: Camada de Segmentos Externos dos Fotorreceptores

CSIF: Camada de Segmentos Internos dos Fotorreceptores

IA: Ingrediente Ativo.

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

ICSU: Committee of the International Council of Scientific Unions (Comitê do Conselho Internacional de Uniões Científicas)

INCA: Instituto Nacional do Câncer

1. INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial afeta conseqüentemente a produção agrícola, responsável pela principal fonte de obtenção de alimentos. Essa produção cresce, ao longo dos anos, especialmente em decorrência do uso demasiado de produtos químicos, os quais podem se mostrar extremamente danosos tanto ao meio ambiente físico quanto aos organismos diretamente afetados.

O processo da produção agrícola tradicional passou por mudanças drásticas durante a Revolução Verde, tendo em vista a produção extensiva de *commodities* agrícolas, novas tecnologias foram inseridas, envolvendo quase em sua maioria, o uso demasiado de substâncias químicas com a finalidade de controlar doenças e aumentar ainda mais a produtividade (Brasil, 2016).

Ao longo dos anos, surgiram inúmeras denominações do grupo de substâncias químicas, utilizadas no controle de pragas (animais e vegetais) e doenças de plantas, entre elas as mais comuns são defensivos agrícolas, agrotóxicos ou pesticidas. Por muitos anos, o Brasil se destacou como campeão do ranking entre os oito maiores consumidores de pesticidas no mundo. Por outro viés Cassal *et al.*, (2014), afirma que o uso dessas substâncias tem se difundido na agricultura, como uma das atividades base e movimentando a economia no país nos últimos 30 anos.

Em 2009, o Brasil era considerado o maior consumidor mundial de pesticidas. Essa marca supera um milhão de toneladas, isso equivale a um consumo médio de 5,2 kg de pesticida por habitante. Não obstante, esse título traz um modelo superintensivista de cultivo. Tal modelo, provoca muitos danos, como por exemplo, a poluição ambiental e intoxicação de trabalhadores e da população residente em áreas vizinhas a áreas de lavoura. Em geral, tais passivos ocorrem tanto de forma aguda, com a exposição ocupacional, quanto crônica, através da presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos e no ambiente, geralmente em doses baixas (INCA, 2015).

Paralelo a isso, o Dossiê da ABRASCO (Carneiro *et al.*, 2015) apresenta dados comprovando por meio de análises em 26 estados do Brasil que um terço dos alimentos consumidos cotidianamente está contaminado por pesticidas, gerando assim uma preocupação alarmante para a saúde pública do país.

Portanto, a avaliação do potencial risco ao meio ambiente ocasionado pelo uso de venenos agrícolas é uma importante etapa no processo de registro de agrotóxicos em vários

países, considerando que os pesticidas são produtos estáveis e sintetizados para gerar danos aos organismos vivos considerados alvos (pragas e causadores de doenças). Estas substâncias são lançadas amplamente no meio ambiente (Rebelo e Caldas, 2014). Essa prática pode causar riscos ecológicos graves em diferentes instâncias.

O comportamento de um pesticida após a aplicação no meio ambiente é determinado por vários processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos, já o destino dessas substâncias no ambiente é conduzido por processos de retenção, transformação, transporte, além das interações desses processos (Spadotto *et al.*, 2010).

Diante disso, surgiu a preocupação em avaliar os diferentes impactos causados pelos pesticidas, principalmente no meio ambiente. No Brasil, as análises de toxicidade já são exigidas por leis ambientais, que só se tornaram vigentes após décadas de propagação demasiada de pesticidas no meio ambiente (Costa *et al.*, 2008).

Dessa forma, a ecotoxicologia surgiu como uma ferramenta que busca avaliar o impacto desses produtos no ambiente e aos organismos ali inseridos, tanto pelas suas mudanças de comportamento, quanto por meio dos efeitos gerados a partir da influência desses compostos tóxicos aos seus órgãos vitais, que são avaliados através de técnicas específicas usando marcadores ou biomarcadores que apresentam melhores resultados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pesticidas e os Ambientes Aquáticos

Internacionalmente os produtos são intitulados como pesticidas, são mantidos principalmente pela indústria química e reforçando o caráter positivo do termo como um produto que mata somente as pestes das lavouras (Peres *et al.*, 2003), essa nomenclatura também é popularmente mais usada.

No Brasil, é a lei nº 7.802, de 1989 que define agrotóxicos e afins, que são compostos por ingredientes ativos (IA), são agentes químicos, físicos ou biológicos que conferem eficácia aos agrotóxicos e afins (Brasil, 1989). As substâncias químicas tóxicas interferem diretamente na atividade biológica dos seres vivos alvos de controle, dessa forma, o uso desses produtos se torna diverso devido apresentar múltiplos modos de ação contra plantas (herbicidas), insetos (inseticidas), fungos (fungicidas), entre outros (IBAMA, 2010).

Entre as diferentes classes de pesticidas, os herbicidas são compostos por substâncias responsáveis pelo controle químico das plantas consideradas daninhas às lavouras. Estes compostos foram eleitos líderes de comercialização no Brasil, durante o período de 2009 a 2012 (IBAMA, 2010). Esse fato se estendeu até o ano de 2014, quando o país comercializou aproximadamente 295.000 toneladas de IA nas Unidades Federativas, entre elas o Pará com 4.303,34 toneladas de IA de herbicidas vendidos (IBAMA, 2016).

No Brasil, a comercialização de pesticidas variou de US\$ 2 bilhões para mais de US\$7 bilhões no período de 2001 e 2008, obtendo o recorde de US\$ 8,5 bilhões em 2011 (INCA, 2015), esses valores expressivos de investimento podem ser explicados principalmente em razão da expansão da fronteira agrícola.

Por outro lado, surgem consequências negativas do montante desse investimento. Moura (2009) alega que as ações antropogênicas de interferência no meio ambiente aumentam as possibilidades de poluição e contaminação, também são as principais causas de prejuízos aos organismos que não são alvos, mas também podem ser atingidos, inclusive humanos.

Alves Filho (2002) afirma que aproximadamente de 90% dos agrotóxicos pulverizados no ambiente atingem populações de organismos não-alvo. Já os ecossistemas aquáticos são os principais corpos receptores de contaminantes, sejam eles lançados diretamente, através das descargas de efluentes, emitidos no ar ou depositados nos solos (Costa *et al.*, 2008).

Observando isto, Spadotto *et al.*, (2010) explicam que após a aplicação de um pesticida vários processos físico, químicos, físico-químico e biológicos definem seu comportamento, já o destino dos pesticidas na natureza é regido por processos de retenção (sorção), transformação (fotólise, hidrólise, oxidação-redução e degradação biológica), transporte (deriva, volatilização, lixiviação, carreamento superficial), além das interações desses processos.

A atuação desses processos na natureza pode ser levada em consideração para explicar fenômenos de contaminação, que podem atingir importantes bacias hidrográficas com proximidade aos locais de despejo de efluentes tóxicos. Conforme foi constatado no trabalho de Rodrigues *et al.*, (2009), que afirmam que as Bacias hidrográficas dos rios Tarumã, São Raimundo e Educandos e seus afluentes estão sendo impactados, devido as influências antrópicas.

Após Rodrigues *et al.*, (2009) realizarem a avaliação da toxicidade das águas destes ecossistemas, os resultados obtidos no referido trabalho demonstraram diferentes níveis de toxicidades aguda nas amostras, além de variações nos parâmetros físico-químicos de qualidade de água. Os trabalhos de Gomes (2007) e Neto (2009) apresentam resultados semelhantes de toxicidade em ambientes aquáticos, estimados através de avaliações toxicológicas em microbacias hidrográficas.

Esses resultados, instigam um alerta para a realização de análises em outras Bacias Hidrográficas que podem estar contaminadas por diferentes substâncias químicas, em consequência disso, todos os organismos que habitam esses locais também podem ser potencialmente afetados de alguma forma, assim como a qualidade da água e a saúde humana.

2.2 Vantagens da utilização do monitoramento ecotoxicológico

O termo Ecotoxicologia surgiu 1969, durante uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions* (ICSU), em Estocolmo, pelo toxicologista francês René Truhaut, que definiu essa ciência como a responsável por estudar os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades atuantes na biosfera, assim como as interações das substâncias com o ambiente natural dos organismos (Magalhães e Ferrão Filho, 2008).

Nesse contexto, a ecotoxicologia aquática avalia os efeitos de substâncias químicas tóxicas sobre organismos representativos do ecossistema aquático, envolvendo o transporte, a distribuição, a transformação e o destino final dos contaminantes no ambiente aquático (Costa *et al.*, 2008).

A ecotoxicologia compreende uma sequência de eventos, a qual é conhecida como cadeia da causalidade, gerando as informações essenciais para determinar os níveis de contaminantes no ambiente e seus destinos; estimar o grau de periculosidade dos contaminantes e seus metabólitos para os organismos vivos; indicar níveis máximos permitidos de contaminantes, ou seja, os padrões a serem mantidos; diagnosticar e prognosticar a influência dos contaminantes ambientalmente e o efeito das medidas tomadas; controlar a emissão de efluentes e avaliar os riscos ecológicos (Kruijf, 1988; Costa *et al.*, 2008).

A ecotoxicologia faz parte das áreas especializadas do campo da toxicologia ambiental, sendo uma temática de ciência ambiental em rápido desenvolvimento, este campo é uma extensão natural da toxicologia (Kendall *et al.*, 2001). A toxicologia ambiental avalia as influências na saúde e no meio ambiente de substâncias tóxicas, que são agentes físico-químicos liberados para o ambiente geral que podem causar efeitos adversos na saúde de organismos vivos, isso inclui humanos, animais e plantas (Yu, 2005).

Já a toxicologia é a ciência responsável por indagar através de experimentos a ocorrência, a natureza, a incidência, o mecanismo e os fatores de risco para os efeitos adversos de substâncias tóxicas, e tem como principais objetivos identificar os riscos adjuntos a uma determinada substância e determinar em quais condições de exposição esses riscos são induzidos (James, 2000).

Premissas ecotoxicológicas são consideradas na Resolução 430 de 2011 do CONAMA (Brasil, 2011) se referindo às condições e padrões de lançamento de efluentes, estabelecendo que o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor e que os critérios de toxicidade devem se basear em resultados de bioensaios ecotoxicológicos padronizados utilizando organismos aquáticos.

Por outro lado, os bioensaios são provenientes da toxicologia clássica, que foi ajustada para ser aplicada ao diagnóstico ambiental, por serem considerados um complemento da caracterização físico-química convencional, e dessa forma podem contribuir para avaliações mais precisas, pois somente através da análise clássica, não é possível obter efeitos observáveis. Os testes de toxicidade também são boas ferramentas para a prever níveis de concentração de compostos tóxicos, estendendo essas avaliações à área de populações, comunidades ou ecossistemas para a identificação de elementos biológicos em risco (Ronco *et al.*, 2004).

O estudo avançado da toxicologia ambiental leva ao desenvolvimento de novas técnicas de monitoramento, atendendo a sociedade de muitas maneiras, vantajosas não só para proteger os seres humanos e o meio ambiente dos efeitos deletérios dos tóxicos, mas também para facilitar o incremento de novos tóxicos mais seletivos, como fármacos anticancerígenos e outras

drogas clínicas e pesticidas (Hodgson, 2004).

2.3 Toxicidade e avaliação de risco ambiental

Toxicidade é a capacidade inerente e potencial do agente tóxico de provocar efeitos deletérios em organismos vivos, nesse caso, quanto maior a concentração do agente tóxico ao nível do sítio de ação, maior é o efeito nocivo (tecido alvo). Atrelado a esta premissa, está o conceito de risco tóxico, sendo este, definido como a probabilidade existente para que uma substância produza um efeito adverso previsível, em determinadas condições específicas de uso (Ruppenthal, 2013).

Spadotto (2006) alega que quanto maior a exposição de organismos (ou de nichos ecológicos) e o perigo intrínseco dos efeitos de cada agrotóxico, maior é a possibilidade de um dano ocorrer. O Dossiê da ABRASCO (Carneiro *et al.*, 2015) aponta que o modelo de produção dependente químico de agrotóxicos adotado pelo Brasil cria territórios com situações de vulnerabilidades ambientais e sociais. Dentre os impactos associados à produção do agronegócio se destacam as poluições e/ou contaminações de solo e recursos hídricos, e as intoxicações agudas e crônicas relacionadas a aplicação de agrotóxicos.

Os testes ou bioensaios de toxicidade são ferramentas da área da Ecotoxicologia fundamentais para os estudos de avaliação ambiental, principalmente no que diz respeito a poluição e contaminação, utilizados integrando dados biológicos, químicos e físico-químicos do ambiente. Essa ferramenta constitui grande importância, pois os estudos já existentes são limitados tomando como base evidências puramente químicas, das quais destacam-se: a elevada variedade de substâncias presentes em efluentes líquidos; baixa capacidade de detecção analítica; as interferências pelos fenômenos químicos de antagonismo e sinergismo, que dificultam sobretudo no processo de interpretação de resultados (Rodrigues *et al.*, 2009).

Brentano (2006) afirma que os testes toxicológicos são considerados bons instrumentos para auxiliar nas decisões que visam a preservação da biota aquática, permitindo uma avaliação bastante segura do potencial tóxico de substâncias em meios contaminados e os riscos causados por estas no meio ambiente. Já os bioensaios diferem principalmente quanto ao tempo de exposição do organismo-teste ao agente ou substância a ser testado, dessa forma podem ser agudos ou crônicos (Mariani, 2014).

Os testes de toxicidade aguda são experimentos de curta duração que permitem respostas rápidas na estimativa dos efeitos tóxicos letais de substâncias sobre organismos testados, seu objetivo é estimar a dose ou Concentração Letal média (CL₅₀) (Lombardi, 2016),

que é definida quando um agente tóxico é capaz de causar a mortalidade de metade dos organismos-teste ou população, em um período de tempo relativamente curto de exposição (Ferreira, 2003).

Em contrapartida, os testes crônicos são realizados por um período que pode abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo-teste, permitindo avaliar os possíveis efeitos sob condições de exposições prolongadas a concentrações que possibilitam a sobrevivência dos organismos, mas que afetam suas funções biológicas (Costa *et al.*, 2008).

No entanto, vale ressaltar a dificuldade de controlar todos os parâmetros que podem influenciar um ambiente aquático, devido sua complexidade ecológica e diversos agentes influentes no ambiente. Nesse caso, os testes de toxicidade referentes a ambientes aquáticos são realizados de forma mais criteriosa em laboratório, onde é possível conhecer as interações sinérgicas ou antagônicas das substâncias, sem a influência de agentes exógenos que podem ser facilmente encontrados no meio ambiente natural (Ferreira, 2003).

Esses experimentos permitem reproduzir como as interações e efeitos ocorrem em um ambiente natural, de forma mais segura e controlada. Para isso deve-se cercar de todas as informações importantes entre os envolvidos, observando, por exemplo, a fisiologia e comportamento dos organismos teste e o modo de ação da substância utilizada, no decorrer de todo o bioensaio.

2.4 O Herbicida atrazina e seu modo de ação no ambiente

A atrazina (6-chloro-N2-ethyl-N4-isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine) é um herbicida seletivo, do grupo químico das triazinas, pode ser usado em pré e pós-emergência, no controle de plantas daninhas que infestam principalmente a cultura de milho, mas também pode ser utilizada em culturas de cana de açúcar e soja (ADAPAR, 2016).

O ingrediente ativo atrazina é absorvido pelas plantas através das raízes (após a germinação) e se desloca, via xilema, até as folhas, onde provoca a inibição da fotossíntese, cujos sintomas se manifestam através da clorose, necrose e morte das plantas infestantes. Em caso de necessidade de aplicação do produto, a substância é absorvida pelas folhas, onde penetra rapidamente, neste caso, atua por contato e praticamente não sofre nenhuma movimentação (Extrapratica, 2007; Oliveira Jr, 2011).

A atrazina, possui baixa pressão de vapor ($3,9 \times 10^{-5}$) e solubilidade em água de 33 mg/L (Dores e De-Lamonica-Freire, 2001), considerando somente os valores tabelados, esse herbicida possuem grande potencial de lixiviação caracterizando a sua capacidade de

contaminação das águas subterrâneas e superficiais. Seu fator de bioacumulação em peixes é relativamente baixo (0,3 e 2), além de possuir persistência ambiental, justificando assim a preocupação quanto a sua toxicidade crônica e bioacumulação no ambiente (Carmo *et al.*, 2013).

A atrazina, possui características que aumentam a probabilidade de atingir as águas subterrâneas, pois apresentam elevada solubilidade em água, baixa adsorção à matéria orgânica do solo, meia-vida no solo relativamente alta (Dores e De-Lamonica-Freire, 2001).

O índice pluviométrico, a temperatura e as características do solo, devem ser também consideradas como fatores importantes para as condições de aplicação, contribuindo em conjunto com as propriedades físicas e químicas para aumentar o potencial inerente da atrazina, causando a contaminação das águas subterrâneas ou superficiais (Canuto *et al.*, 2010).

Entre os IA's mais comercializados no Brasil a atrazina se destacou na 7ª posição no ranking, com 10.133,80 toneladas comercializadas em 2009 (IBAMA, 2013), saltando para 3ª posição (Figura 1) com 28.394,91 toneladas consumidas em 2013 (IBAMA, 2014). Entre as Unidades Federativas, o Pará adquiriu 60,16 toneladas desse IA que foram comercializados no Estado em 2014 (IBAMA, 2016).

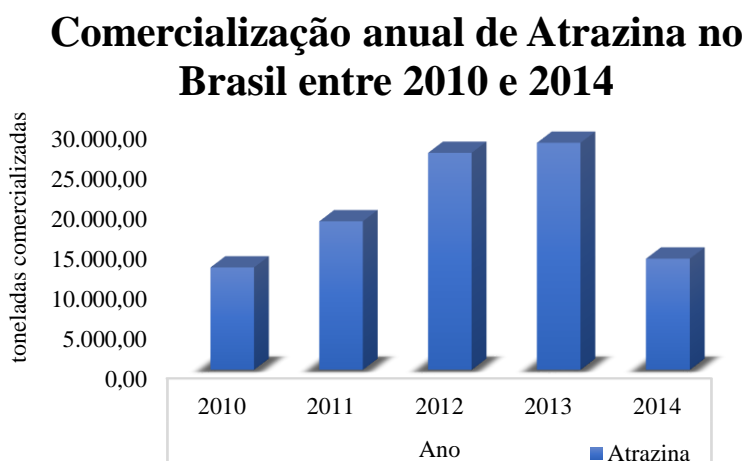


Figura 1 - Comercialização de Atrazina no Brasil entre 2010 e 2014. Fonte: IBAMA, 2014.

Essas estimativas permitem observar que a quantidade de atrazina comercializada no país quase triplicou em quatro anos. Em consequência, aumentou também a preocupação das entidades de proteção ambiental devido seu potencial de periculosidade aos organismos e seus respectivos ambientes de interação.

Esse ingrediente ativo, é um composto polar e sua solubilidade em água é praticamente independente do pH da solução (Javaroni *et al.*, 1998). Na avaliação de Potencial de Periculosidade Ambiental os produtos à base de atrazina se enquadram na Classe III, é

considerada altamente persistente, altamente tóxica para aves e abelhas e muito tóxica para organismos aquáticos (IBAMA, 2010).

Os herbicidas como a atrazina, podem sofrer modificações de natureza química, física e biológica no solo, se tratando de sistema bastante divergente (Javaroni *et al.*, 1998). A atrazina é um frequente agente contaminante de águas subterrâneas, geralmente devido sua aplicação em larga escala, mutabilidade e resistência (Hunter e Shaner, 2010). No trabalho de Barriuso *et al.*, (1996) os autores afirmam que aproximadamente 20% das quantidades dos agrotóxicos usados para o controle químico de plantas daninhas, podem alcançar as águas superficiais.

Esse episódio, pode ser corroborado usando, como exemplo, o trabalho de Bertoluzzi *et al.*, (2006), que identificou a contaminação por atrazina em todas as amostras de águas superficiais, coletadas ao longo da microbacia hidrográfica estudada em diferentes períodos do ano. Os autores afirmam que a transferência de moléculas de agrotóxicos dos ecossistemas terrestres para os aquáticos é constante, pois é comum o desenvolvimento de atividades agrícolas na região, juntamente com o incremento significativo do herbicida.

A USEPA (2017) analisa também a atrazina como possível substância carcinogênica, considerando que tem atividade endócrina, entretanto, a associação segura entre a exposição por atrazina e certos tipos de câncer é de difícil alcance (Carmo *et al.*, 2013).

De forma geral, ao analisar o modo de ação da atrazina, se mostra uma substância química muito perigosa em diferentes instâncias tanto para a saúde do ambiente, quanto para a saúde humana. No entanto, mesmo com seu alto índice de periculosidade, ainda são poucos os estudos com bioensaios realizados utilizando esse composto e diferentes organismos aquáticos, que são os principais atingidos.

2.5 Toxicidade do herbicida atrazina em organismos aquáticos

A partir do momento em que um solo estiver contaminado por qualquer IA, a chuva pode transportá-lo através das suas águas essa contaminação para rios, açudes e lagos, ampliando o risco não só para populações locais, como também aos indivíduos que necessitam dessa água para sua sobrevivência, como os animais e o próprio homem (Chaim e Valarini, 2006).

Alguns trabalhos apresentam resultados que comprovam os efeitos deletérios de atrazina aos organismos que habitam os ambientes aquáticos contaminados pelo pesticida, através de experimentos de toxicidade. Entre eles podemos observar o trabalho de Zupan e Kalafatic

(2003) que buscou estudar os efeitos de baixas concentrações de atrazina em mexilhões Zebra (*Dreissena polymorpha*), e avaliou os efeitos do pesticida sobre o hepatopâncreas da espécie.

O estudo de Quaranta *et al.*, (2009) comparou as taxas de absorção de atrazina e outros pesticidas através da pele, entre os anfíbios e os mamíferos, durante um período de exposição, buscando evidências de sensibilidade a ameaças ambientais de contaminação desse agrotóxico. Além disso, Hayes *et al.*, (2011) afirmaram em seu estudo que a atrazina é um contaminante disruptor endócrino em peixes teleósteos, anfíbios e répteis.

He *et al.*, (2012) avaliaram a toxicidade aguda de atrazina e butaclor para a alga verde de água doce *Scenedesmus obliquus* e cladóceros *Daphnia carinata*. O trabalho de Moreira *et al.*, (2013) também afirma que a espécie de cladóceros *Moina minuta* apresenta bastante sensibilidade em teste de toxicidade com atrazina.

O estudo de Rutkoski *et al.*, (2016), avaliou a toxicidade aguda e crônica do herbicida atrazina, na fase embrionária e larval de *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) procurando identificar a CL₅₀ no teste agudo e para verificar o potencial teratogênico e neurotóxico do herbicida no teste crônico.

Analisando de modo geral, por meio desses trabalhos é possível constatar que a atrazina pode ser um potencial contaminante para diversos grupos de organismo aquáticos, atingindo órgãos e sistemas diferenciados, portanto, pode induzir a mortalidade e perda de funções importantes desses animais, alterando assim toda estrutura e função de um ecossistema atingido pela contaminação.

2.6 Toxicidade da atrazina em peixes de água doce

Visualizando os ambientes aquáticos como principais receptores de contaminantes da agricultura, pode-se considerar a hipótese de que os peixes, como grandes grupos, são os principais atingidos pela toxicidade de contaminantes. Na última década foi possível ter acesso a alguns trabalhos com testes de toxicidade realizados com organismos aquáticos, principalmente peixes, e atrazina.

Em um desses trabalhos, Moron *et al.*, (2006) buscaram analisar alterações nas frequências de micronúcleos e distúrbios na regulação iônica relacionados ao efeito direto do tecido branquial de pacu (*Piaractus Mesopotamicus*) exposto ao herbicida atrazina.

Além desse, o trabalho de Chapadense *et al.*, (2009) teve como objetivo investigar a toxicidade da atrazina com a espécie tambaqui (*Colossoma macropomum*), os autores também observaram número de micronúcleo e eritrócitos durante a exposição dos peixes. Os autores

avaliaram os efeitos do pesticida atrazina em peixes neotropicais, com grande valor ecológico e econômico na região amazônica, considerando que são espécies bastante consumidas no mercado, seus resultados tornam-se relevantes.

Dong *et al.*, (2009) também realizou bioensaios de exposição de atrazina em zebrafish (*Danio rerio*). Tillit *et al.*, (2010) observaram efeitos neuroendócrinos em peixes (*Pimephales promelas*) provocados pela atrazina. A pesquisa de Xing *et al.*, (2012), observou os efeitos de atrazina sobre as células de Purkinje em carpas (*Cyprinus carpio*). Os resultados desses trabalhos confirmam a atrazina como um forte disruptor endócrino nas espécies avaliadas, dessa forma, torna-se importante avaliar esses efeitos também em peixes neotropicais

Paulino *et al.*, (2012) apresentaram em seus resultados a avaliação do estresse oxidativo nas brânquias da espécie *Prochloodus lineatus* através da exposição primária da atrazina. Ainda nesse contexto, a toxicidade da atrazina também pode exercer influências peculiares em peixes ornamentais, como foi demonstrado no estudo de Shenoy (2012), que avaliou a exposição em Guppies machos (*Pæcilia reticulata*) observando o pesticida como poluente e alterações de comportamentos sexuais da espécie.

Considerando que a exposição à atrazina pode causar esse tipo de comportamento em outras espécies de peixes, isso se tornar um fator problemático ecologicamente, pois desse modo, pode afetar a reprodução de outras espécies atingidas pelo pesticida.

Já Castro *et al.*, (2013) teve como objetivo testar a toxicidade da atrazina e seus respectivos efeitos (sanguíneos e teciduais) para a espécie lambari (*Astyanax sp*), comparando sua resistência à toxicidade do pesticida entre a tilápia (*Tilapia mossambicus*) e o tambaqui.

Nos estudos realizados, exemplares da espécie tambaqui têm se mostrado bons modelos de organismos-teste e bastante utilizados em testes de toxicidade. Menezes (2005), Moura (2009) e Souza (2014) realizaram testes de toxicidade com tambaqui, e afirmam que a espécie demonstra ser um bom modelo de organismo experimental, pois apresentam boas respostas aos testes de toxicidade e pode ser usado como um bioindicador de contaminação ambiental por substâncias xenobióticas.

Sanchez e Galan *et al.*, (1999) determinaram os critérios para utilização de tambaqui em testes de genotoxicidade e afirmam que a espécie possui as características ideais: tem ampla distribuição geográfica, a resposta a diversos tipos de estressantes é conhecida, demonstra ter sensibilidade a uma vasta gama de xenobiontes, apresenta fácil manuseio, manutenção em laboratório e aquisição de alevinos.

No entanto, o conhecimento que se tem sobre o comportamento de atrazina como agente contaminante em ecossistemas aquáticos tropicais e seus efeitos na biota neotropicais, não é ainda bem conhecido, o que sugere a investigação deste composto e sobre sua exposição e.

O surgimento de estudos com biomarcadores associados aos testes de toxicidade auxiliam em análises mais consistentes, sobre a atuação de algum estressor químico que possa gerar consequentes danos em processos fisiológicos comuns dos organismos, como por exemplo, a neurotransmissão, desintoxicação, respiração ou a resposta anti-oxidante (Oliveira, 2014). Essa ferramenta experimental, pode ser um ótimo complemento para resultados ecotóxicológicos.

2.7 Marcadores de exposição e efeito

A biota aquática sofre constante exposição de contaminantes tóxicos lançados no ambiente. Deste modo, a interação gerada com os organismos vivos causa alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais nas espécies, e podem afetar não só as populações, como todo um ecossistema através das consequências adquiridas, dependendo do período dessa exposição e do seu grau de contaminação (Jesus e Carvalho, 2008).

Silva (2012) afirma em seu trabalho que no monitoramento ambiental de pesticidas é possível utilizar diversas técnicas associadas aos organismos aquáticos como bioindicadores. Em ambientes aquáticos, as plantas, algas, crustáceos, moluscos, mamíferos, peixes, insetos, aves, etc., são considerados bioindicadores.

Os organismos topo de cadeia são mais utilizados como referência, pois estão diretamente relacionados aos níveis inferiores e dessa forma podem indicar respostas de efeitos crônicos, acumulativos, persistentes, além de efeitos diretos no indivíduo, portanto são mais utilizados em estudos de avaliação de risco (Lins *et al.*, 2010).

A definição de biomarcadores foi primeiramente discutida por Livingstone (1993), posteriormente atualizada por Decaprio (1997), e Kendall *et al.*, (2001) afirma que a Academia Nacional de Ciências conceitua como um biomarcador a alteração induzida xenobioticamente em componentes ou processos, estruturas ou funções celulares ou bioquímicas que são mensuráveis em um sistema ou amostra biológica.

De acordo com Nordberg (2010), os biomarcadores podem ser classificados em três categorias: biomarcadores de exposição, de efeitos e de susceptibilidade. Além disso, nas literaturas encontram-se outras propostas de classificações que incluem os biomarcadores de

neurotoxicidade (Peakall, 1992), de stress oxidativo (Livingstone, 2001), de genotoxicidade, endócrinos, histológicos, entre outros (Martins, 2013).

Os biomarcadores de exposição são mais sensíveis e precisos para compostos tóxicos, pois através deles é possível verificar as alterações que podem ser medidas e apresentam evidências da exposição de um organismo a um poluente, como por exemplo, os parâmetros bioquímicos testados em peixes, visando obter respostas às substâncias tóxicas. Já os biomarcadores de efeito não são tão específicos quando relacionados aos estressores, porém caracterizam a ocorrência de uma alteração que pode ser reversível logo que o estressor pare de atuar no organismo (Jesus e Carvalho, 2008).

A inibição da colinesterase do cérebro por inseticidas organofosforados ou carbamatos, indução de ácido delta aminolevulinico sintetase e inibição da desidratase de ácido aminolevulinico por chumbo e outros metais, são exemplos de marcadores de efeitos citados por Kendall *et al.*, (2001). Esses biomarcadores podem ser mensurados através da histologia, que é considerada por Lins *et al.*, (2010) uma ferramenta sensível para diagnósticos de efeitos tóxicos diretos e indiretos que atingem os organismos.

2.8 Biomarcadores morfológicos

As técnicas de análises de biomarcadores em peixes são utilizadas em programas de monitoramento ambiental para estimativas de deterioração dos ecossistemas aquáticos (Ventura *et al.*, 2015). Em alguns trabalhos é possível encontrar dados que comprovam a eficiência do uso de diferentes marcadores associados a bioensaios de toxicidade de pesticidas e peixes.

A literatura internacional é bastante farta quanto ao uso de biomarcadores frente a exposição de peixes e demais organismos aquáticos a pesticidas. De acordo com o banco de dados do *Pesticide info* (2018), existem registros dessas pesquisas desde meados da década 60.

No Brasil, Langiano (2006), avaliou as possíveis alterações provocadas pela exposição aguda ao herbicida Roundup em parâmetros bioquímicos, fisiológicos e histológicos da espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus* (curimba). Faria (2009), realizou testes de toxicidade com o mesmo herbicida para verificar as alterações provocadas em células mucosas branquiais e hepáticas do peixe *Poecilia vivípara* (barrigudinho). Albinati *et al.*, (2009), também usou esse herbicida para avaliar brânquias, fígado e rins como biomarcadores histológicos em ensaio de toxicidade crônica em *Leporinus macrocephalus* (piaçu).

Os trabalhos desses autores levam a crer que a histologia é uma boa ferramenta para avaliar esses bioindicadores, através dos resultados obtidos, essa técnica se apresenta de forma bastante satisfatória para biomarcadores morfológicos, como por exemplo, as células.

O estudo de Tagliaferro (2009) usou a histologia para avaliar a toxicidade aguda do inseticida endossulfan a partir de amostras de fígado, brânquias e rim de alevinos de (*Piaractus mesopotamicus*). Santos (2010), analisou biomarcadores bioquímicos e genéticos para detectar os efeitos da exposição de atrazina para *Prochilodus lineatus* (curimbatá).

Um outro estudo, observou o efeito do herbicida ametrina, através de testes de toxicidade aguda e crônica em *Oreochromis niloticus* (tilápias) e moluscos bivalves de água doce (*Anodontites trapesialis*), usou-se como marcadores biológicos e de estresse oxidativo descritores bioquímicos, hematológicos e histopatológicos para avaliar o impacto de uma possível contaminação de agrotóxico sobre peixes e moluscos (Iseki *et al.*, 2012).

Já o objetivo do trabalho de Silva (2012) foi fazer a caracterização físico-química e cinética da acetilcolinesterase cerebral de indivíduos da espécie tucunaré (*Cichla ocellaris*), a partir dos efeitos de exposição dos organismos aos pesticidas organofosforados e carbamatos, para fornecer subsídios do uso dessa enzima como bioindicadora de contaminação ambiental.

Além desses, o objetivo do estudo de Armiliato (2014) foi avaliar o efeito do glifosato sobre a organização estrutural e ultraestrutural, bem como sobre os parâmetros bioquímicos de toxicidade nos ovários do peixe *Danio rerio*. Em outro trabalho mais recente, Soares *et al.*, (2016) avaliaram os efeitos tóxicos agudos e crônicos do pesticida de benzoilureia (lufenurão) em brânquias e comportamento de *C. macropomum* (tambaqui).

Ao longo dos anos, observando todos esses trabalhos, é possível concluir que, os bioindicadores usados respondem de forma específica em sistemas importantes das espécies estudadas, confirmando a relevância da condução desses estudos.

Vale ressaltar, entretanto, a necessidade de buscar novos parâmetros a serem investigados para esgotar as indagações e contribuir para o monitoramento ambiental dos ecossistemas aquáticos de forma eficiente. Embora a comunidade científica internacional seja pioneira em produção de resultados, no Brasil as pesquisas estão em fase de ascensão nos últimos anos.

2.9 Aspectos da morfologia do olho de teleósteos de água doce

Os olhos dos peixes são constituídos por importantes características e estruturas que formam o sistema visual. A captura de informação visual permite que possam fugir de predadores, buscar alimentos, migrar e se reproduzir, e assim contribuem no desenvolvimento das espécies.

Entre essas características, está o campo visual, Ramel (2018) afirma que um peixe pode ver um movimento no máximo em 50 metros, em ambientes turvos, essa distância pode diminuir para centímetros. Apesar disso, no que diz respeito ao campo de visão monocular (Figura 2), dos peixes são maiores (165°) que os humanos (154°), entretanto, sua visão binocular é relativamente menor (12°).

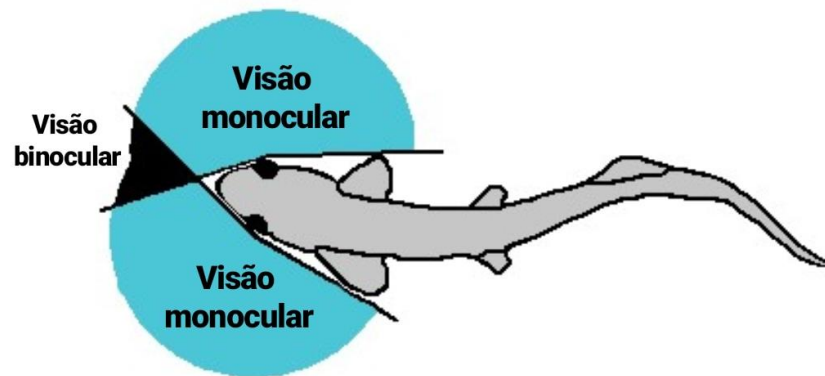


Figura 2: Campos de visão de peixes teleósteos. Fonte: Ramel (2018) (adaptado).

O olho (Figura 3) é o órgão responsável pela captação da informação luminosa/visual e transformá-la em impulsos a serem decodificados no córtex visual (Ramos, 2006). Basicamente, a estrutura do olho de peixes teleósteos é formada por: esclera, coróide, *Tapetum Lucidum*, íris, córnea, humor aquoso, lente, ligamento, humor vítreo, processo falciforme, músculo, camada de pigmento, retina e nervo ótico (Ramel, 2018).

Representação diagramática do olho de um peixe Teleósteo

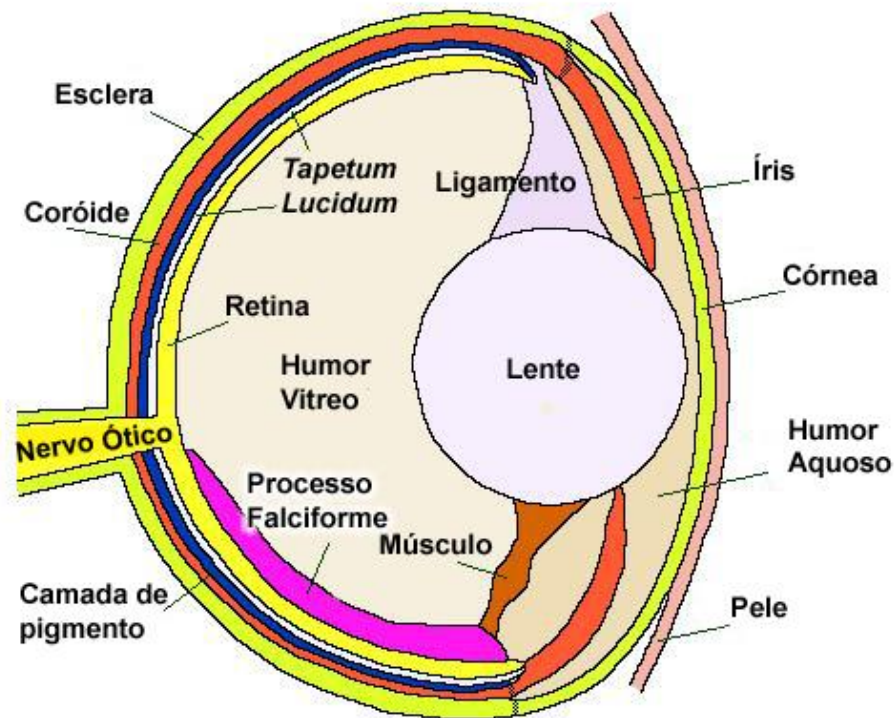


Figura 3: Representação das estruturas do olho de peixes teleósteos. Fonte: Ramel, (2018) (adaptado).

Várias dessas estruturas que constituem os olhos dos teleósteos são comuns aos vertebrados, com isso, pode-se inferir que o sistema visual dos peixes são bons modelos de estudos toxicológicos e oftalmológicos comparativos.

Ravneet *et al.*, (2009) afirmam que apesar da existência de literaturas que comprovam as evidências de toxicidade por pesticidas envolvendo múltiplos tecidos, o sistema visual dos peixes nunca foi investigado particularmente da perspectiva toxicológica. Portanto, esse fator justificou, o objetivo da pesquisa desses autores, que estudaram o efeito do pesticida organofosforado Monocrotofós na lente de peixes (*Cyprinus carpio*) de piscicultura.

Vale ressaltar a importância desse tipo de análise, também em outras partes do sistema visual dos peixes, que estão diretamente expostos a contaminantes no ambiente aquático, e assim conseguir aperfeiçoar modelos de estudo comparativos a outros animais, e até mesmo humanos, contribuindo também para o monitoramento ambiental.

2.9.1 Retina

Dentre as estruturas do olho, a retina é a camada sensível à luz do olho, (Ramel, 2018), estrutura mais interna composta de fotorreceptores e células nervosas, uma expansão periférica

do sistema nervoso central que recobre 2/3 da porção interna do globo ocular (Nishida, 2012). A retina é responsável pela visão de campo (Faria e Sousa, 1997). Essa membrana preenche a parede interna em volta do olho, a luz focalizada pelo cristalino é recebida por dois tipos de receptores, os bastonetes (+ ou -120 milhões) e cones (+ ou - 7 milhões), que se localizados em torno da fóvea (Ramos, 2006).

As células da retina estão organizadas em camadas (Figura 4), e são designadas com relação ao epitélio pigmentar. Desse modo, a mais interna é a camada dos segmentos externos dos fotorreceptores contendo os elementos sensíveis à luz, os fotorreceptores. A camada posterior é chamada de camada nuclear externa contendo os corpos celulares dos fotorreceptores. Em seguida encontra-se a camada plexiforme externa, onde os fotorreceptores estabelecem contatos sinápticos com as células bipolares e horizontais. Logo após, está a camada nuclear interna, contendo os corpos celulares das células bipolares, horizontais e amácrinas. A seguir está a camada plexiforme interna, a qual é estabelecido os contatos sinápticos entre as células bipolares, amácrinas e ganglionares, e por último a camada de células ganglionares (Bear *et al.*, 2002).

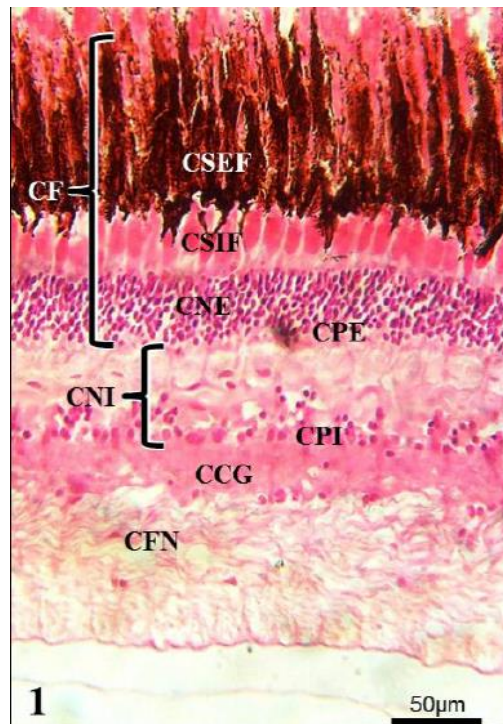


Figura 4: Corte histológico demonstrando a organização celular laminar da retina de tambaqui: Camada de Fotorreceptores (CF), Camada de Segmentos Externos dos Fotorreceptores (CSEF), Camada de Segmentos Internos dos Fotorreceptores (CSIF), Camada Nuclear Externa (CNE), Camada Plexiforme Externa (CPE), Camada Nuclear Interna (CNI), Camada Plexiforme Interna (CPI), Camada de Células Ganglionares (CCG) e Camada de Fibras Nervosas (CFN). Escala: 50 micrômetros. Fonte: Sousa (2014).

Ramos (2006) explica que a luz atravessa os meios transparentes do olho e chega à

retina, esta então é convertida em impulsos elétricos e através dos nervos óticos são levados ao córtex occipital, onde os impulsos são decodificados em formato de uma impressão visual. Cada olho oferece imagem de um ângulo diferente, o cérebro recebe duas imagens discretamente díspares que geram um efeito tridimensional quando se une na impressão visual única. O autor afirma ainda em seu estudo, que esse fenômeno só é possível em virtude da mistura de informações das duas retinas, promovidas pelo cruzamento das fibras dos nervos óticos.

Nesse contexto, a visão é um sentido de grande importância para os peixes e o sistema óptico é um fator determinante na sua capacidade visual. Além disso, Raymond (1995) alega que a retina de peixes, especificamente de teleósteos, demonstra bom modelo padrão para estudos do sistema visual, devido seu crescimento durante toda a vida, e uma série de especializações comuns a todos os vertebrados.

Baseado nisso, pode-se considerar que a retina é um importante biomarcador em estudos realizados com experimentos de toxicidade, considerando que o olho é um órgão de contato direto com o ambiente aquático contaminado, e pode assim apresentar bons resultados.

A relevância de estudos desse aspecto é fundamental para a compreensão avançada dos processos que ocorrem na visão associados ao sistema nervoso central. Cuenca (2015) afirma que a retina é um modelo bem apropriado para analisar o funcionamento do cérebro, pois está associado a este órgão e faz parte do sistema nervoso central.

No entanto, vale ressaltar que dada a sofisticação desses sistemas, os trabalhos relacionados a esse campo da fisiologia, principalmente de peixes, são pouco explorados devido a alta diversidade de espécies, isto implica na consequente complexidade ecológica, o que por sua vez, pode dificultar a compreensão funcional e padronizada da visão dos teleósteos.

Considerando o potencial risco de contaminação dos ambientes aquáticos, torna-se fundamental realizar avaliações para determinar os efeitos de influência de substâncias químicas. Tais substâncias podem afetar sistemas importantes dos organismos, como a visão e consequentemente o sistema nervoso central

Desse modo, a realização de testes de toxicidade com pesticidas associados a boas técnicas de análise de biomarcadores, como a retina, pode ser uma boa ferramenta para avaliações de contaminação nesses ambientes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito toxicológico de Atrazina na retina de alevinos de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818).

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a toxicidade aguda de atrazina para alevinos de *Colossoma Macropomum*;
- Definir a menor concentração de atrazina que causa mortalidade dos alevinos (CEO);
- Verificar a maior concentração de atrazina que não causa mortalidade dos alevinos (CENO);
- Verificar o efeito da atrazina sobre a morfologia das camadas da retina dos alevinos sob exposição crônica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Bioensaios de Toxicidade

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Química Aplicada a Toxicologia, Saneamento Ambiental e Recursos Hídricos, vinculado ao Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas, situado no Campus de Santarém da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA.

4.2 Organismos teste - *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) – Tambaqui

O tambaqui (Figura 5) foi registrado taxonomicamente como *Colossoma macropomum*, pelo paleontólogo e anatomista comparativo Barão George Von Cuvier, em 1818 (Carvalho, 2007), a espécie pertence à família Characidae e subfamília Serrasalminae (Lima e Goulding, 1998), é utilizado para criação em larga escala e distribuído amplamente na Bacia Amazônica (Tavares-Dias *et al.*, 1999), onde é considerado o segundo maior peixe (após *Arapaima gigas*, Osteoglossidae), podendo medir um metro de comprimento total e 30 kg de peso (Goulding e Carvalho, 1982).



Figura 5: Espécie *Colossoma macropomum* – Tambaqui

A espécie é um teleósteo migrador de água doce (Araújo-Lima e Gomes, 2010) que se aproveita do período de florestas alagadas para se alimentar principalmente de frutos e sementes

(Claro-Jr *et al.*, 2004). Souza e Barrella (2009) alegam que peixes como o tambaqui, com cabeça grande, boca larga e olhos laterais possuem características de espécies predadoras.

Essa posição na cadeia trófica pode ser associada às condições visuais, tornando os peixes mais preparados para sobreviver em seus habitats devido a capacidade visual, que favorece o desenvolvimento de larvas tanto na obtenção de alimentos quanto na fuga de outros predadores (Mckellep, 2009; Sousa, 2014).

4.3 Aclimação

Para execução dos testes foram adquiridos lotes homogêneos de alevinos da espécie *Colossoma macropomum* (tambaqui), procedidos de pisciculturas locais, e aclimatados em tanques de polipropileno de 0,5m³ e volume útil de 0,3m³ por um período de três dias.

Os tanques de aclimação foram previamente lavados e desinfetados com detergente neutro para então receberem água, dotados de sistema de aeração com um soprador de ar, a fim de garantir níveis de oxigênio >5mg/L.

A água utilizada tanto para aclimação quanto para os testes era de fonte subterrânea e seus parâmetros físico químicos (alcalinidade e dureza total, condutividade elétrica, pH, oxigênio dissolvido e temperatura), foram ajustados para melhor desempenho dos testes.

Os lotes de peixes foram submetidos a tratamento higiênico-sanitário, e alimentados, de acordo com 3% da biomassa estocada, com ração peletizada e extrusada com 36% de teor proteico durante todo o período de aclimação. A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia, em uma porção correspondente a 3% da biomassa estocada. Os tanques foram sifonados para retirada de dejetos e resíduos alimentares não aproveitados diariamente. Estes procedimentos objetivam um ótimo desempenho fisiológico dos animais a serem submetidos aos testes de sensibilidade e toxicidade aguda (CL₅₀ 96h).

4.4 Teste Com Substância Referência – Dicromato De Potássio

O teste com substância referência foi realizado com a finalidade de verificar a sensibilidade dos organismos-teste que participaram dos experimentos. Os organismos teste ficaram em exposição às concentrações de 100, 125, 150, 175 e 225mg/L da substância Dicromato de Potássio, por um período de 96 horas em sistema estático (Cruz *et al.*, 2008).

4.5 Atrazina

O composto avaliado neste estudo é um herbicida composto pelo ingrediente ativo atrazina (Figura 6), suas propriedades físico-químicas estão apresentadas na Tabela 1 a seguir. O pesticida é registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, indicado para as lavouras de soja, milho e arroz.

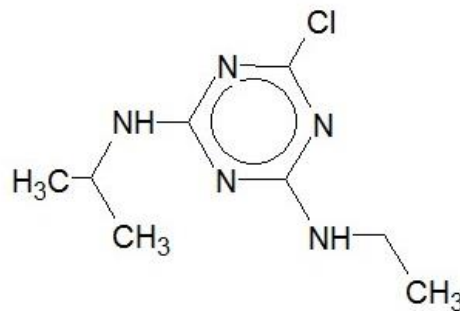


Figura 6: Fórmula estrutural do ingrediente Ativo atrazina. Fonte: SRC Environmental Health Analysis.

Tabela 1: Propriedades físico-química do ingrediente ativo atrazina.

Peso Molecular	215,69
Solubilidade em água	34,7 mg/L (26°C)
Log P (K _{ow})	2,61
Pressão de vapor	0,000000289 mm Hg
Constante de Henry	0.00000000236 atm-m ³ /mol

Fonte: SRC Environmental Health Analysis.

Os volumes necessários para a composição das concentrações finais do composto foram pipetados da solução estoque, anteriormente preparada, e adicionados aos aquários, sem a presença dos organismos-teste, procedendo-se em seguida a agitação mecânica da mistura para uma completa homogeneização do meio.

4.6 Teste preliminar de toxicidade

Os testes preliminares tiveram como objetivo identificar as concentrações ideais para a condução do teste definitivo, dessa maneira, foram realizados a fim de determinar com segurança o intervalo das concentrações que se aproxima da CL₅₀. O teste toxicológico para o

pesticida eleito neste estudo foi estático (sem renovação da água), conduzido em recipientes de 3 litros, os peixes estocados respeitaram proximidade a relação biomassa/volume de 1:1 e todos os organismos testes eram alevinos.

Durante os bioensaios os organismos foram induzidos à cinco concentrações diferentes, sem repetições, mais um controle negativo por um período de 96 horas, até que foi possível determinar a menor concentração que causou 100% de mortalidade e a maior dentre as quais não ocasionou mortalidade alguma, todos os recipientes foram cobertos com plástico filme, receberão aeração forçada, em temperatura ambiente e fotoperíodo de 12 horas de luz.

4.7 Monitoramento dos parâmetros físico-químicos da água

No teste definitivo, foram determinados os parâmetros físico-químicos (alcalinidade e dureza total, pH, oxigênio dissolvido e temperatura) de uma amostra de água antes da aplicação da substância e do povoamento das unidades teste. A frequência de coletas de amostras de água para análise consistiu em intervalos de 24 horas.

Os parâmetros de qualidade de água foram monitorados individualmente para cada unidade teste e suas respectivas repetições. As análises de pH foram realizadas por meio de um potenciômetro, o oxigênio dissolvido e a temperatura foram determinados por meio de oxímetro. As análises de dureza total foram determinadas por meio de titulometria com o Kit Teste Hanna Instruments HI 3812, as análises de dureza através do Kit Teste Hanna Instruments HI 3811 e a amônia foi mensurada através do Kit teste Hanna Instruments HI 3824. A concentração de amônia total, dureza e alcalinidade total foram mensuradas e avaliadas somente no início e ao final do teste.

Ao final dos testes, a água contendo substâncias potencialmente perigosas ao meio aquático foram descartadas no solo, a atrazina possui um tempo médio de 26 dias aproximadamente na dissipação para um solo arenoso (Javaroni *et al.*, 1998) por se tratar de compostos solúveis consequentemente sua evaporação causará menos danos ao ambiente, levando em consideração que não há tratamento de água contaminada nos locais de realização dos testes.

4.8 Teste de toxicidade aguda

Os bioensaios de toxicidade aguda foram baseados em adaptações da ABNT 15088 (2011), as concentrações do teste definitivo estabelecidas e validadas nos testes preliminares.

O experimento foi constituído por cinco concentrações diferentes (5mg/L, 15 mg/L, 30 mg/L, 45 mg/L e 60 mg/L), com três repetições por concentração, mais três unidades controle, totalizando 18 unidades teste (aquários) (n=90), durante um período de 96 horas.

4.9 Determinação da CL₅₀ 96h

O intervalo preconizado para as avaliações de comportamento (permanência no fundo do aquário, agitação, batimento opercular acelerado, presença na superfície, movimentos descoordenados) e para as leituras de mortalidade foi arbitrado em 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 horas, e os valores de CL₅₀ baseados na mortalidade cumulativa observada ao final da exposição. Os organismos eram considerados mortos quando não apresentaram qualquer mobilidade natural e não responderam a estímulos mecânicos, efetuados com bastão de vidro combinado a nenhum movimento opercular (Sprague, 1990).

Os animais mortos foram imediatamente recolhidos com auxílio de puçás, pesados em balança semianalítica e mensurados. Ao fim do teste, os animais vivos de todas as concentrações e do grupo controle foram anestesiados com Eugenol (0,1%), sacrificados por secção medular, pesados, medidos e identificados. Os testes somente foram aceitos porque a mortalidade na unidade controle não excedeu à 10%.

4.10 Teste de toxicidade crônica

Os alevinos de tambaqui, obtidos das pisciculturas locais, foram encaminhados para análises histológicas, imediatamente após passarem pelos testes de toxicidade crônica, que são baseados em adaptações das normas da ABNT 15499 (2016). As concentrações do teste definitivo foram estabelecidas e validadas nos testes preliminares. O experimento foi constituído por quatro concentrações sub-letais diferentes, 0,85 (C1), 4,2 (C2), 8,3 (C3) e 16,5 mg/L (C4), cada uma com três repetições por concentração, mais três unidades controle, totalizando 15 unidades teste (aquários) (n=75), durante um período de 120 horas. No laboratório os parâmetros de qualidade de água para o experimento foram mensurados e ajustados sob condições semelhantes ao teste agudo.

Na ocasião, os organismos que sobreviveram aos testes foram anestesiados com Eugenol (0,1%), e eutanasiados através de ruptura da coluna cervical, para então ser feita a extração dos olhos com o desprendimento do tecido de sustentação e secção do nervo óptico, com auxílio de uma tesoura de ponta romba, e retirada a calota anterior do olho extraído que

posteriormente foi fixado em solução de Bouin para serem analisados no procedimento histológico.

4.11 Avaliação histológica do efeito da atrazina na retina dos alevinos

O processamento histológico das amostras foi realizado no laboratório de Química Multiusuário da UFOPA – Universidade Federal do Oeste do Pará, campus de Santarém-Pará. Os procedimentos foram adaptados de protocolos de Sousa (2014).

4.11.1 Procedimento histológico

Primeiramente, o material biológico foi desidratado a partir de uma sequência de banhos com 30 minutos de duração cada um, em álcool 75%, 80%, 90%, 95% finalizando com um banho triplo com álcool etílico 100I, 100II e 100III. Após essa etapa, as amostras foram diafanizadas com xilol duas vezes para que o material se tornasse translúcido, em seguida, realizados mais dois banhos, com intervalo de uma hora, de parafina líquida em estufa a 60°C.

Cada amostra foi emblocada em parafina para que fosse possível a realização das sequências de cortes histológicos perpendiculares em plano coronal com auxílio de micrótomo no laboratório, para observar as camadas da retina.

Na etapa de preparação de lâminas, as seções de parafina contendo o tecido das amostras ficaram estendidas em placa quente a 40°C, contendo gelatina diluída para fixação dos cortes sobre as lâminas. Por medida de segurança do material, o procedimento de coloração só foi efetuado após dois dias, para evitar que os cortes descolassem.

Para a desparafinização dos tecidos, o material passou pelos tratamentos de imersão, na respectiva ordem, xilol (duas vezes, por cinco minutos cada), quatro concentrações decrescentes diferentes de álcool etílico (três minutos cada) e água destilada (três minutos). Em seguida, as lâminas foram coradas a partir da imersão em hematoxilina durante 50 segundos e eosina durante 15 segundos.

Posteriormente, realizou-se a desidratação das lâminas pelos tratamentos por imersão com concentrações crescentes de álcool etílico e xilol para então iniciar o processo de montagem das lâminas, o qual foi aplicado o gotejamento (três gotas) de verniz vitral Acrilex sobre a lâmina, recobrando o material com lamínula e encaminhado para secagem em temperatura ambiente por cerca de 24 horas antes de iniciar as análises.

Para a identificação das camadas da retina e análise das amostras histológicas, foram adotados os seguintes parâmetros: padrão morfológico celular, padrão de organização estrutural de grupos celulares, padrão de coloração e posicionamento de camadas.

4.12 COMITÊ DE ÉTICA

Este projeto de dissertação faz parte de um projeto maior intitulado “*Determinação para peixes amazônicos da ecotoxicidade e risco de pesticidas utilizados em lavouras de soja*” que foi submetido ao comitê de ética de uso de animais da Universidade Federal do Oeste do Pará, protocolado sob o número nº 06004-2016, e obteve parecer APROVADO, pois o mesmo está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal avaliados pela comissão.

4.13 ANÁLISE DOS RESULTADOS

A CL50 foi determinada através do método de Trimmed Spearman-Kärber, com intervalos de confiança de 95% (Hamilton *et al.*, 1977). Os valores percentuais médios de mortalidade foram utilizados para as construções de curvas de mortalidades em cada intervalo de exposição ao toxicante, e os dados biométricos analisados por meio da estatística descritiva (média \pm desvio padrão).

5. RESULTADOS

5.1 Teste de toxicidade aguda

O teste realizado com a substância referência, Dicromato de Potássio, atestou boa resposta de sensibilidade do lote de alevinos da espécie tambaqui (Tabela 2 e 3) para uso nos experimentos, a CL_{50} do teste foi de 106,57 mg/L, com limite inferior de 92,78mg/L e limite superior de 112,41mg/L, compatível com o trabalho de Cruz *et al.*, (2008).

Tabela 2: Valores médios e respectivos desvios-padrão dos pesos (g) dos indivíduos da espécie *C. macropomum* submetidos ao teste de toxicidade aguda com atrazina para obtenção da CL_{50}

REPETIÇÕES	CONCENTRAÇÕES (mg/ L)					
	Controle	5	15	30	45	60
1	0,70±0,10	0,83±0,20	0,76±0,15	0,68±0,18	0,87±0,17	1,02±0,07
2	0,55±0,09	0,81±0,11	0,85±0,22	0,85±0,18	0,69±0,15	0,85±0,21
3	0,77±0,19	0,93±0,15	0,75±0,13	0,66±0,15	0,99±0,21	0,91±0,26

Tabela 3: Valores médios e respectivos desvios-padrão dos comprimentos (cm) dos indivíduos da espécie *C. macropomum* submetidos ao teste de toxicidade aguda com atrazina para obtenção da CL_{50}

REPETIÇÕES	CONCENTRAÇÕES (mg/ L)					
	Controle	5	15	30	45	60
1	3,44±0,16	3,18±0,47	3,58±0,21	3,48±0,30	3,56±0,22	3,80±0,11
2	3,1±0,22	3,56±0,24	3,58±0,28	3,60±0,26	3,24±0,34	3,42±0,13
3	3,46±0,33	3,8±0,30	3,56±0,30	3,42±0,23	3,72±0,25	3,60±0,26

Durante o teste de toxicidade aguda, os peixes apresentaram comportamentos atípicos, como por exemplo, batimento opercular acelerado, natação errática, espasmos e convulsão, principalmente nos tratamentos da concentração maior.

Os indivíduos foram mantidos em água com uma temperatura com média de 29,1°C, oxigênio dissolvido em torno de 6,6 mg/L (5,5-7,8 mg/L), faixa de pH classificada como ideal para organismos aquáticos (média 7,3), alcalinidade de 77,4±3,29 mg/L, e dureza moderada de 31,2±6,22 mg/L (tabela 4), já as análises de amônia em todos os tratamentos foram saturadas, equivalendo a 25 mg/L, a faixa máxima capaz de ser mensurada no teste utilizado.

Tabela 4: Valores médios e desvio padrão das variáveis físico-químicas de análise de água do teste de toxicidade aguda

VARIÁVEIS	CONCENTRAÇÕES (mg/L)						Média±DP
	Controle	5	15	30	45	60	
Oxigênio dissolvido (mg/L)	7,8	6,8	6,6	6,5	6,6	5,8	6,4±0,38
Temperatura (°C)	29,1	29	29,1	29,3	29,3	29,2	29,1±0,13
pH	8	7,7	7,4	7,2	7	6,9	7,4±0,32
Dureza (mg/L)	21	30	42	30	27	27	31,2±6,22
Alcalinidade (mg/L)	75	75	81	81	75	75	77,4±3,29

Os parâmetros ambientais (pH, oxigênio dissolvido e temperatura) não apresentaram grandes diferenças entre as unidades teste e a concentração de oxigênio dissolvido no meio do ensaio foi superior a 60% do valor de saturação de ar.

Os alevinos da espécie tambaqui, quando expostos ao teste de toxicidade aguda com atrazina apresentaram 100% de mortalidade na concentração 60mg/L nas primeiras 48h de experimento; 93,3% de mortalidade na concentração de 45mg/L entre 24 e 72h de experimento; 33,3% de mortalidade na concentração de 30mg/L no intervalo de 24 e 72h do teste; 13,3% de mortalidade na concentração de 15mg/L somente a partir de 72h do bioensaio e 0% na concentração de 5mg/L, também não houve mortalidade em nenhuma unidade controle (Tabela 5).

Cumprindo um dos objetivos da pesquisa, verificou-se que a maior concentração do agente tóxico que não causou efeito deletério (CENO) estatisticamente significativo na sobrevivência dos organismos testados foi de 5 mg/L, e a menor concentração que causou efeito (CEO) de mortalidade nos alevinos expostos ao pesticida foi de 15 mg/L. Esses resultados podem ser observados na tabela 5 a seguir.

Tabela 5: Valores obtidos para mortalidade de *Colossoma macropomum* (tambaqui) durante o período de exposição aguda (96 horas) em diferentes concentrações de atrazina

CONCENTRAÇÃO (mg/L)	REPETIÇÃO	PERÍODO DE EXPOSIÇÃO (96HORAS)								
		2H	4H	8H	12H	24H	48H	72H	96H	
0	1									
	2									
	3									
5	1									
	2									
	3									
15	1									
	2									2
	3									
30	1									
	2						1	2	1	
	3								1	
45	1						2	2		
	2						2	3		
	3						1	3	1	
60	1						4	1		
	2						2	3		
	3						4	1		

Com base nesses dados, em relação ao teste de toxicidade aguda, a CL_{50} de atrazina como produto comercial determinada através do método de Trimmed Spearman-Kärber, para alevinos de tambaqui em 96 horas de exposição foi de 27,78 mg/L, com limite inferior de 22,49 mg/L e limite superior 34,22 mg/L. Esses dados podem ser observados por meio da curva logística (Figura 7).

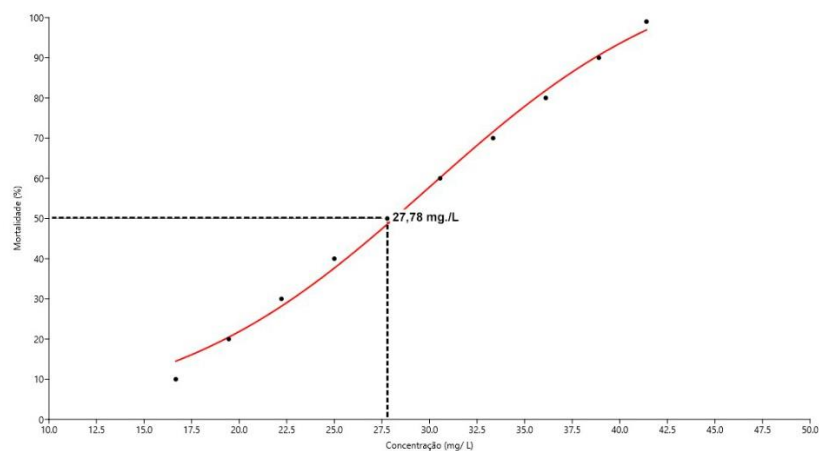


Figura 7: Curva logística da reação entre a porcentagem da mortalidade e suas respectivas concentrações no teste agudo de atrazina com tambaqui.

5.2 Teste de toxicidade Crônica

O lote de alevinos utilizados nesse experimento foi o mesmo testado para avaliar a CL_{50} no teste agudo. As Tabelas 6 e 7 abaixo contém os dados relacionados a biometria dos organismos testados com seus respectivos valores médios e desvio padrão de peso e comprimento, confirmando que não houve variação significativa nas medidas dos animais de cada tratamento nas concentrações testadas. Durante o teste de toxicidade crônica não foi constatada morte de nenhum organismo durante todo período do experimento.

Tabela 6: Valores médios e respectivos desvios-padrão dos pesos (g) dos indivíduos da espécie *C. macropomum* submetidos ao teste de toxicidade crônica com atrazina para obtenção da CL_{50}

CONCENTRAÇÕES (mg/ L)					
REPETIÇÕES	Controle	0,85	4,2	8,3	16,5
1	0,81±0,31	0,88±0,11	0,97±0,21	1,32±0,22	0,98±0,09
2	1,22±0,24	1,14±0,24	1,31±0,29	1,11±0,15	1,11±0,24
3	1,10±0,18	1,08±0,31	0,98±0,24	1,05±0,06	0,75±0,39

Tabela 7: Valores médios e respectivos desvios-padrão dos comprimentos (cm) dos indivíduos da espécie *C. macropomum* submetidos ao teste de toxicidade crônica com atrazina para obtenção da CL_{50}

CONCENTRAÇÕES (mg/ L)					
REPETIÇÕES	Controle	0,85	4,2	8,3	16,5
1	3,74±0,29	3,74±0,20	3,92±0,30	4,26±0,14	3,94±0,10
2	4,28±0,07	4,06±0,22	4,34±0,20	4,06±0,14	3,82±0,44
3	4,26±0,21	4,3±0,32	3,86±0,33	3,96±0,14	3,76±0,40

No teste de toxicidade crônica, os peixes não apresentaram os comportamentos atípicos observados no teste agudo, provavelmente devido os valores usados nas concentrações do experimento. Os alevinos foram mantidos em água com temperatura média de 29,1°C, oxigênio dissolvido em torno de 6,7 mg/L (5,5-8 mg/L), faixa de com média 7,07, alcalinidade de 98,4±6,29 mg/L, e dureza moderada de 23,6±2,16 mg/L (tabela 8), já as análises de amônia em todos os tratamentos foram saturadas, equivalendo a 25 mg/L, a faixa máxima capaz de ser mensurada no teste utilizado.

Tabela 8: Valores médios e desvio padrão das variáveis físico-químicas de análise de água do teste de toxicidade crônica

Variáveis	Concentrações (mg/ L)					
	Controle	0,85	4,2	8,3	16,5	Média±DP
Oxigênio dissolvido (mg/L)	8	7,4	6,8	8,2	5,5	6,7±0,98
Temperatura (°C)	29	29,2	29,1	29,2	29,3	29,1±0,11
pH	7	7,1	7,2	7	7,1	7,08±0,08
Dureza (mg/L)	22	26	25	24	21	23,6±2,16
Alcalinidade (mg/L)	87	95	100	110	100	98,4±6,29

Para o processamento histológico, foram selecionadas ao acaso (sorteio) e retiradas amostras de retina do olho direito de cada dois peixes em todos os tratamentos testados, gerando N=30, esse valor corresponde à 40% dos organismos expostos ao pesticida atrazina no teste crônico do presente estudo (N=75). As retinas dos olhos esquerdos foram devidamente identificadas e armazenadas, para caso sejam necessárias análises futuras. Para cada amostra de retina foram preparadas cinco lâminas histológicas, com a finalidade de comparar em diferentes cortes se haveria algum efeito da substância utilizada nos indivíduos.

Parte da etapa de análise em microscopia foi realizada no laboratório de Neurobiologia e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, e outra parte foi realizado no Laboratório de Química Multiusuário da Universidade Federal do Oeste do Pará, utilizando o microscópio Zeiss ERC 5S com câmera digital acoplada para captura de imagens, com aumento de 100 vezes foi possível observar as camadas celulares que formam a retina do *Colossoma macropomum* com suas respectivas células.

A Figura 8 apresenta uma amostra de retina de tambaqui de um indivíduo da unidade controle. Dessa forma nota-se que as nove camadas celulares estão presentes e representadas a seguir:

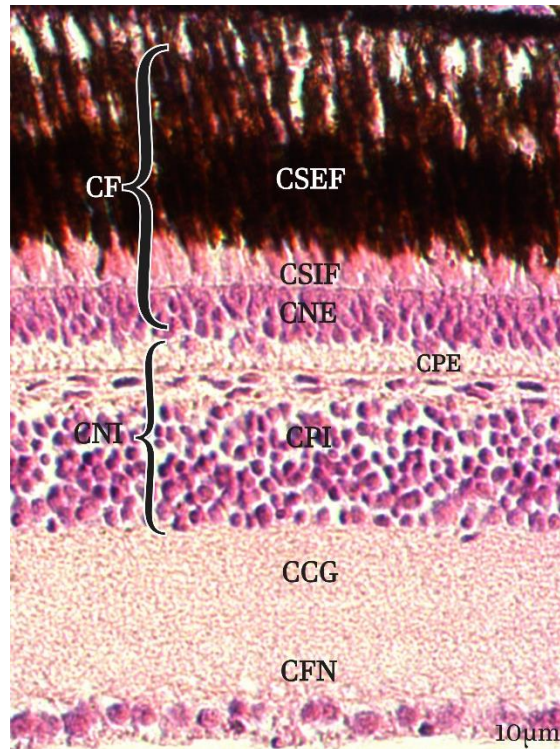


Figura 8: Corte histológico demonstrando a organização celular laminar da retina de uma amostra da unidade controle: Camada de Fotorreceptores (CF), Camada de Segmentos Externos dos Fotorreceptores (CSEF), Camada de Segmentos Internos dos Fotorreceptores (CSIF), Camada Nuclear Externa (CNE), Camada Plexiforme Externa (CPE), Camada Nuclear Interna (CNI), Camada Plexiforme Interna (CPI), Camada de Células Ganglionares (CCG) e Camada de Fibras Nervosas (CFN). Escala: 10 micrômetros.

Ao comparar as lâminas amostrais de retina dos organismos da unidade controle, com os dados da literatura de Bear *et al.*, (2002), podemos observar que todas as camadas das amostras de retina testadas permaneceram sem nenhuma alteração morfológica, não houve perda de tecido ou células, assim como suas camadas celulares também se mantiveram organizadas na mesma ordem comparado às literaturas.

Na Figura 9, podemos observar a Camada dos Fotorreceptores (CF), logo abaixo a Camada dos Seguintos Externos dos Fotorreceptores (CSEF), e as respectivas Camadas dos Seguintos Internos dos Fotorreceptores (CSIF), Camada Nuclear Externa (CNE), em seguida encontra-se a Camada Plexiforme externa (CPE), com as células bipolares e horizontais, logo após está a Camada Nuclear Interna (CNI), com as células bipolares, horizontais e amácrinas, a seguir está a Camada Plexiforme Interna (CPI), a camada de células ganglionares (CCG) e por último a Camada de Fibras Nervosas (CFN).

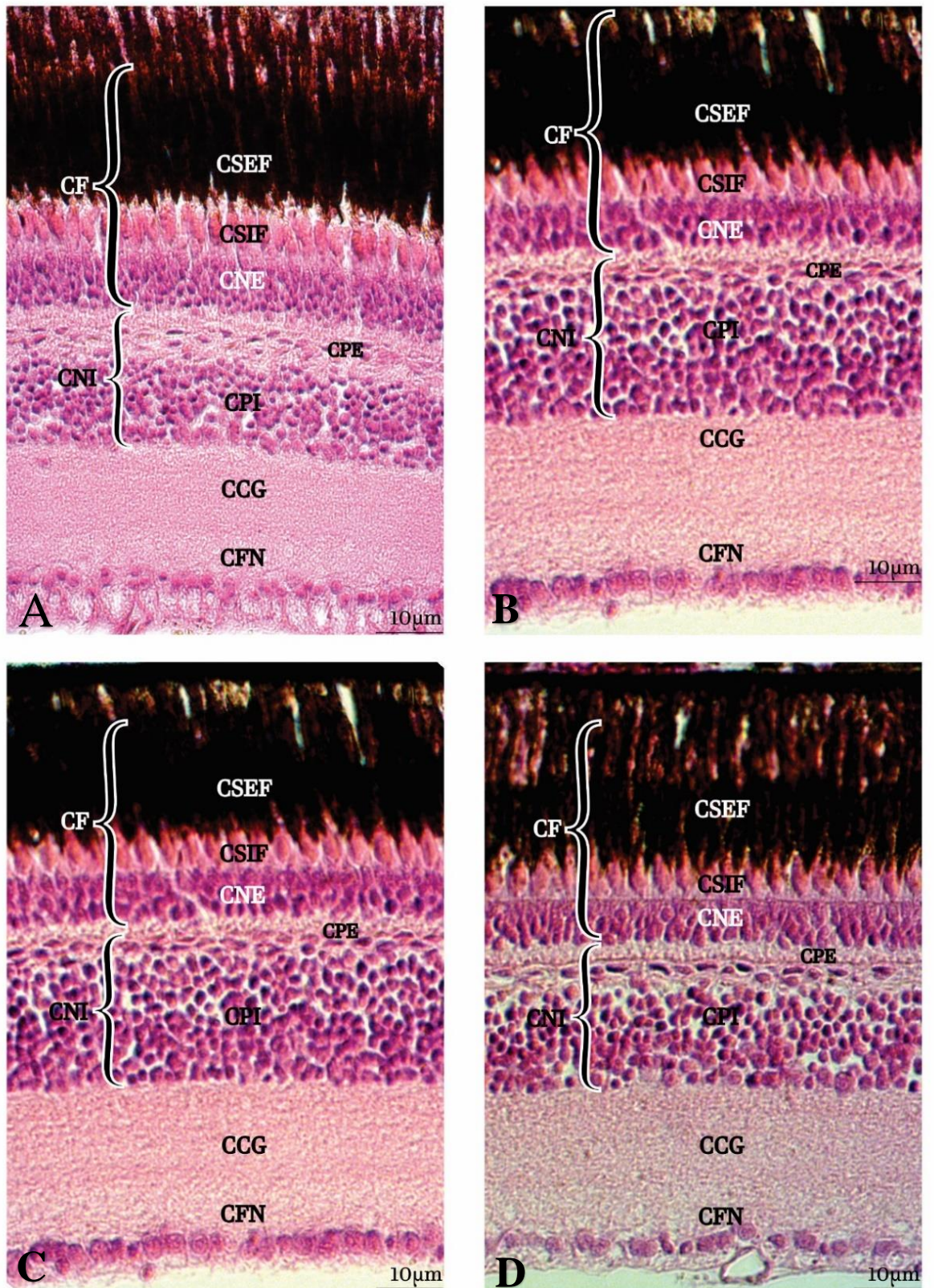


Figura 9: Corte histológico demonstrando a organização celular laminar da retina de uma amostra da Concentração 1 (A); Concentração 2 (B); Concentração 3 (C); Concentração 4 (D). Escala: 10 µm.

Após análise das amostras do teste crônico foi possível observar que não houve perda de camadas celulares em nenhuma das retinas das quatro concentrações e da unidade controle, observadas durante experimento. No entanto, não podemos inferir que essas células eram funcionais, pois o método de HE utilizado na pesquisa permite somente observar as estruturas morfológicas dos tecidos,

Dessa forma, o método apenas buscava averiguar se haveria perda de camadas celulares, testando concentrações subletais em curto período de teste. O fato dos resultados apresentados sugere inclusive a busca de métodos mais específicos, como por exemplo, técnicas imunocitoquímicas, para avaliar os efeitos de toxicantes de forma mais minuciosa e detalhada.

6. DISCUSSÃO

O valor determinado de CL_{50} da substância avaliada no presente estudo é considerado ligeiramente tóxico, de acordo com as classes de toxicidade aguda para organismos aquáticos de Zucker (1985). Apesar do baixo nível da capacidade intoxicar os animais, isso não representa total segurança da presença do composto em ambientes naturais, outros estudos já comprovaram sua periculosidade em concentrações mais baixas, não só para peixes, mas também para outros organismos do meio aquático, como foi o caso do trabalho de Moreira *et al.*, (2014).

Os trabalhos que relacionam a toxicidade da atrazina com os organismos aquáticos apresentam dados bastante variáveis, o que leva a crer que os fatores que determinam a CL_{50} e o efeito desse composto nos indivíduos podem influenciar diretamente nos resultados, como por exemplo, o tempo de exposição, as concentrações utilizadas e o tipo de biomarcador avaliado.

Esses resultados de CL_{50} podem ser facilmente apresentados através de gráficos, como por exemplo a curva logística, usada para demonstrar que as porcentagens de organismos que exibem respostas adversas estão diretamente relacionadas com as concentrações utilizadas nos experimentos. Dessa forma, Buratini e Bertoletti (2014) afirmam que normalmente essa curva se mostra em forma de “S”.

Esse fato ocorreu no presente estudo, pois a porcentagem do efeito (mortalidade) observado nos organismos teste se deu em função das concentrações de exposição. Buratini e Bertoletti (2014) argumentam ainda que essa curva sigmoide é obtida por meio de transformação de dados, possibilitando o traçado de retas entre os pontos, e conseqüentemente obtendo a concentração que corresponde a 50% do efeito observado, apresentando assim a melhor correlação de dados a ser estimada com precisão.

No que diz respeito aos trabalhos que relacionam a toxicidade do herbicida atrazina em organismos aquáticos, He *et al.*, (2012) avaliaram a toxicidade de atrazina para a alga verde de água doce *Scenedesmus obliquus* (EC_{50} -96h) e cladoceran *Daphnia carinata* (CL_{50} -48h), os autores detectaram que a atrazina é altamente tóxico para *S. obliquus* e ligeiramente tóxica para *D. carinata*, já o herbicida butaclor apresentou moderada toxicidade para ambos, sendo que tanto a EC_{50} -96h quanto a CL_{50} -48h encontrada são valores menores do que a CL_{50} -96h da atual pesquisa.

O trabalho de Moreira *et al.*, (2013), também afirma que a atrazina pode ser considerada moderadamente tóxico para o cladóceros *Moina minuta* durante a exposição de 48 horas, já que a CE₅₀ – 48h média registrada foi de 9,39 mg L⁻¹, enquadrando-se na faixa entre 1 e 10 mg L⁻¹. Isso mostra que a atrazina pode gerar diferentes níveis de toxicidade dependendo do organismo a qual está exposto.

A pesquisa de Rutkoski *et al.*, (2016) com atrazina apresentou uma CL₅₀-96h de 229,43 mg/L em larvas de *Physalaemus gracilis* (anfíbios). Os autores afirmam que houve baixa toxicidade, além das concentrações usadas e o tempo de experimento que não influenciaram na mortalidade dos embriões, porém, essas concentrações e seus respectivos intervalos foram muito maiores, conseqüentemente aumentou o valor da CL₅₀. No teste crônico, as baixas concentrações não afetaram o desenvolvimento dos organismos, mas o tempo de exposição influenciou diretamente na mortalidade (até 168h), além de exibirem efeitos neurotóxicos, como contrações espasmódicas e natação anormal, também houve alterações na morfologia da boca, edemas, problemas na morfologia do intestino e coluna.

Com os resultados obtidos nesses trabalhos, permite-se inferir que a atrazina não gera efeitos semelhantes em todos os organismos aquáticos, essa instabilidade pode ocasionar diferentes sequelas no ecossistema, reforçando ainda mais a importância do monitoramento ambiental dessa substância para avaliar seu risco ecológico.

Em se tratando de toxicidade da atrazina em peixes de água doce, o trabalho de Chapadense *et al.*, (2009) foi desenvolvido de forma bastante semelhante ao atual, tendo como objetivo investigar a toxicidade da atrazina com juvenis da espécie tambaqui (*Colossoma macropomum*). Os autores afirmam que foi possível observar hemorragias por todo o corpo dos animais, assim como o aumento significativo do número de micronúcleo e eritrócitos durante a exposição dos peixes, o valor da CL₅₀-96h obtido foi aproximado ao do presente estudo (22 mg/L).

Entretanto, apesar da semelhança na condução dos experimentos e os valores de CL₅₀ serem aproximados, não foi possível observar as hemorragias nos animais mencionadas no trabalho anterior. Esse episódio corrobora a necessidade de aprofundar as investigações, através de testes de toxicidade em peixes, sobre quais os efeitos das concentrações crônicas do pesticida, com a finalidade de descobrir seus fatores de bioacumulação nos organismos.

Em relação aos efeitos da atrazina sobre parâmetros hematológicos de peixes, Castro *et al.*, (2013) constataram em sua pesquisa que a CL₅₀-96h de atrazina para lambari (*Astyanax sp*) também foi menor que a concentração obtida para tambaqui (18,60 mg/L), e nenhuma diferença estatística foi comprovada nos parâmetros sanguíneos e teciduais avaliados para os organismos

testados, apesar da espécie ter demonstrado ser mais resistente à toxicidade do que a tilápia (*Tilapia mossambicus*) e o tambaqui, que são espécies mais sensíveis para bioensaios de toxicidade.

Avaliando tais trabalhos de maneira geral, é possível atestar que a atrazina é um pesticida perigoso para os organismos agregados em níveis distintos da cadeia trófica aquática, podendo prejudicar o ambiente como um todo e representando assim um grave risco ecológico. Estudos avançados de outros marcadores de efeito ou exposição podem apontar a influência do pesticida em outros organismos, inclusive na espécie testada, sobretudo se for realizado desde suas primeiras fases de desenvolvimento, usando altas concentrações e durante um maior período de tempo.

Entre os trabalhos que mostram os resultados que comprovam os efeitos deletérios de atrazina aos organismos que habitam os ambientes aquáticos contaminados pelo pesticida, podemos destacar o trabalho de Zupan e Kalafatic (2003), os autores constataram que o pesticida exerce efeitos sobre o hepatopâncreas em mexilhões Zebra (*Dreissena polymorpha*) em experimento de 21 dias usando concentrações mais baixas que o presente estudo (0,003, 0,05, 0,5 e 5 mg/L), podendo ser a possível causa da mortalidade de alguns desses organismos, dependendo do tempo de exposição.

A pesquisa de Quaranta *et al.*, 2009 mostrou que os sapos (*Rana esculenta*) possuem maior taxa de absorção de atrazina quando comparado a outros pesticidas (paraquat e glifosato), do que os mamíferos (porcos) durante um curto período de exposição (máximo 24h), comprovando que a facilidade dessa molécula na passagem cutânea (através da pele) dos sapos evidencia maior sensibilidade a ameaças ambientais de contaminação desse agrotóxico.

Para Hayes *et al.*, (2011), a atrazina é o contaminante de pesticidas mais comumente detectado de água subterrânea, água de superfície e precipitação. Os autores alegaram em seu trabalho que o pesticida é um contaminante disruptor endócrino que, altera os tecidos reprodutivos masculinos quando os animais são expostos durante o desenvolvimento, feminizando as gônadas masculinas que produzem lesões testiculares associadas a números reduzidos de células germinativas e induzindo a feminização parcial e/ou completa em peixes teleostícos, anfíbios e répteis.

Os fatores mencionados no trabalho anterior podem causar um sério problema ecológico, no que diz respeito a reprodução das espécies, influenciando inclusive na abundância relativa em um determinado habitat.

Sobre a toxicidade da atrazina em peixes neotropicais, a pesquisa de Moron *et al.*, (2006) constatou alterações nas frequências de micronúcleos e distúrbios na regulação iônica

relacionados ao efeito direto do tecido branquial de juvenis de pacus (*Piaractus Mesopotamicus*) exposto a uma baixa concentração do herbicida atrazina (96h), que apresentou características clastogênicas, podendo induzir a eventos mutagênicos nessa espécie. Os autores alegam ainda que, provavelmente esse distúrbio na regulação iônica pode estar relacionado com o efeito direto do atrazina no tecido branquial, e provavelmente com a permeabilidade das membranas celulares.

A exposição à atrazina também casou diferentes atividades de biotransformação entre os gêneros da espécie zebrafish (*Danio rerio*) expostos a baixas concentrações em 25 dias de experimento, além de induzir alterações hormonais nos indivíduos testados (Dong *et al.*, 2009).

Tillit *et al.*, (2010) observaram efeitos neuroendócrinos da espécie de peixe *Pimephales promelas* provocados pela atrazina durante até 30 dias de exposição, tais como anormalidades gonadais foram encontradas em peixes machos e fêmeas expostos ao herbicida. Os autores afirmam ainda que seus resultados sugerem que a atrazina reduz a produção de ovos por meio da alteração da maturação final dos oócitos. Esses fatores podem prejudicar a reprodução da espécie em casos de contaminação do pesticida em ambiente natural.

Além disso, Xing *et al.*, (2012), que observaram que a atrazina ocasionou alterações na estrutura renal e cerebral em carpas comuns durante exposição de 40 dias, acarretando degeneração das células de Purkinje. Já Paulino *et al.*, (2012) apresentaram em seus resultados que a exposição de até 14 dias à atrazina gerou estresse oxidativo nas brânquias da espécie curimbatá (*Prochloodus lineatus*).

Os resultados de ambas pesquisas levam a crer que o pesticida interfere em atividades fisiológicas importantes dos peixes, podendo causar mortalidade nos organismos, tanto pelos danos renais e cerebrais, quanto pela exposição primária do contaminante através da respiração.

A toxicidade da atrazina também pode exercer influências peculiares em peixes ornamentais, como foi demonstrado no estudo de Shenoy (2012), que avaliou a exposição em Guppies machos (*Paecilia reticulata*) e verificou que o pesticida como poluente alterou comportamentos sexuais da espécie, e ainda reduziu a agressividade em relação a outros machos da mesma espécie durante a competição pelas fêmeas. O autor explica que isso pode acontecer pelo fato da atrazina ser considerada um forte disruptor endócrino, atuando principalmente no funcionamento adequado dos hormônios, que contribuem inclusive para a reprodução da espécie.

Em resumo, todos os trabalhos citados fornecem dados panorâmicos sobre a relação da toxicidade da atrazina e seus efeitos neurotóxicos, comportamentais, disruptores endócrinos, entre outros. No entanto, até o presente momento, não há relatos de estudos que avaliem o efeito

da toxicidade dessa substância na retina de peixes, ou de que forma esse composto afeta a visão e conseqüentemente o sistema nervoso central, ao qual está associado.

Entre os poucos relatos de efeitos gerados por pesticidas na visão de peixes, podemos destacar o trabalho de Ravneet *et al.*, (2009), que teve por objetivo avaliar o efeito do organofosforado Monocrotofós em lentes de carpas, e constatou que peixes expostos ao pesticida desenvolveram catarata, de modo que seu efeito se tornou irreversível mesmo após o período de recuperação. Posteriormente, em outro trabalho, Uppal *et al.*, (2015) realizaram estudo toxicológico para avaliar o efeito do mesmo pesticida em córneas de carpas, e verificaram que os peixes expostos ao organofosforado desenvolveram necrose corneana irreparável.

Ambos trabalhos partiram do pressuposto que os peixes de piscicultura estão sendo atingidos por pesticidas drenados de campos agrícolas em corpos d'água, principalmente em estações chuvosas. Considerando o contexto da região amazônica, onde as bacias hidrográficas também estão vulneráveis a esse tipo de contaminação, é bastante provável que esse episódio se repita em peixes neotropicais constantemente expostos a esse tipo de substâncias.

No que diz respeito ao efeito de pesticidas em retina de peixes neotropicais, o trabalho de Soares *et al.*, (2016) investigaram efeitos do inseticida lufenuron em tambaqui e observaram perdas na capacidade de respostas a estímulos de células fotorreceptoras e bipolares. Além disso, os pesquisadores constataram hemorragias nos olhos, nadadeiras e no opérculo dos peixes.

Os trabalhos desenvolvidos ao longo dos anos buscaram avaliar diferentes tecidos em bioensaios de toxicidade. Apesar da importância da retina para a visão, associada ao sistema nervoso central dos peixes, e das evidências de contaminação pelos pesticidas em ambientes aquáticos, são poucos os registros de estudos toxicológicos utilizando essa estrutura como biomarcador de efeito.

Observando essa relevância, o presente estudo buscou avaliar esse possível efeito. A princípio o experimento crônico seguiu normalmente e a substância utilizada em concentrações subletais nos testes foi incapaz de gerar efeito adverso na morfologia das camadas celulares da retina dos organismos teste.

Por outro lado, as literaturas apontam para as conseqüências neurotóxicas da exposição de espécies de peixes sob concentrações agudas e/ou subagudas referentes à atrazina. Entretanto, de maneira menos abrangente, podemos embasar tal afirmação nos achados de toxicidade relatados a seguir, relatos estes que, além de danos severos, trazem menções de

alterações comportamentais por parte de seus autores, verificados frente à diferentes concentrações deste composto.

Em 2009, Chapadense *et al.*, desenvolveram um estudo expondo juvenis de tambaqui por 48 horas, em dosagens agudas de 20, 22 e 25 mg/L, e observaram desvios de comportamentos padrões descritos como: natação irregular, letargia, batimento opercular acelerado e respiração aquática na superfície. Segundo estes autores, as duas últimas alterações podem ser interpretadas como respostas relacionadas ao estresse respiratório em peixes, e essa consideração teve o apoio literário de dados prescritos para outros estudos antecedentes.

Essas mesmas sequelas também foram apresentadas para a espécie *Channa punctatus*, no estudo realizado por Nwani *et al.*, (2010), utilizando o referido tóxico em avaliações agudas por 96 horas, em concentrações aproximadas ao presente trabalho durante 15 dias. Por outro lado, nesta última pesquisa, os estudiosos não reportaram sob quais concentrações viram tais respostas.

Tomando por base as alterações comportamentais testificadas nas referências anteriores, e a partir de comparações com dados do presente estudo, pode-se dizer que, foram percebidas semelhanças referentes às mudanças de comportamento dos alevinos de tambaqui no decorrer dos ensaios. Uma vez que, os animais expostos às maiores concentrações de 30, 45 e 60 µg/L apresentaram, conseqüentemente, perda de equilíbrio, letargia, estresse respiratório quando nadaram continuamente na superfície, batimento opercular mais acelerado, e por vezes, aparentaram até convulsão.

O curto tempo de exposição, em que os organismos foram submetidos aos experimentos, deve ser levado em consideração na avaliação de resultados negativos, referentes ao biomarcador utilizado para avaliar o efeito pesticida eleito nessa pesquisa, no entanto, não podemos descartar a hipótese que períodos de exposição prolongada, em que compreende parte ou todo o ciclo de vida do animal, provavelmente tem mais chances de comprometer partes importantes do sistema nervoso central.

Mesmo que as células retinianas não tenham sido afetadas, não quer dizer que outros sistemas importantes do organismo também não tenham sido atingidos, já que houveram diversas observações de alterações em outros biomarcadores citados em referências literárias, e comportamentais visualizados no experimento agudo.

O conjunto de fatores mencionados em todos os trabalhos citados apontam a relevância do aprofundamento das investigações toxicológicas em peixes, sobretudo em espécies de valor ecológico, como é o caso do tambaqui. As evidências de danos neurotóxicos devem ser levadas em consideração, para que futuros trabalhos envolvendo o pesticida atrazina busque de forma

mais específica avaliar também outros tipos de biomarcadores de exposição e resposta de forma condizente o verdadeiro risco ecológico que essa substância representa ao meio ambiente, contribuindo assim para o monitoramento ambiental.

7. CONCLUSÕES

A partir desse trabalho foi possível determinar a CL_{50} da atrazina para alevinos da espécie *Colossoma macropomum* (tambaqui) em teste de toxicidade aguda, e concluímos que as análises das amostras em teste crônico não indicaram nenhuma alteração das camadas celulares nas retinas dos organismos, apesar de vários trabalhos já terem comprovado que a atrazina é um pesticida bastante tóxico para diferentes organismos aquáticos. No entanto, foi possível observar diversos distúrbios comportamentais ocasionados pelo pesticida nos organismos testados, inclusive a mortalidade. Esses resultados constituem suma importância para a contribuição de pesquisas futuras, a serem realizadas com investigação de forma mais aprofundada sobre os efeitos da ecotoxicidade de atrazina em espécies de peixes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência de defesa agropecuária do Paraná - ADAPAR. 2016. (<http://www.adapar.pr.gov.br>). Acesso em 18 de agosto de 2016.

Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos - USEPA. 2017. Ruptura endócrina. (<https://www.epa.gov/endocrine-disruption/>). Acesso em 29/01/2018.

Albinati, A.C.L.; Moreira, E.L.T.; Albinati, R.C.B.; Carvalho, J.V.; De Lira, A.D.; Santos, G.B.; Vidal, L.V.O. 2009. Histological biomarkers: chronic toxicity for roundup in piauçu (*Leporinus macrocephalus*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61(3): 621-627.

Alves Filho, P. J. 2002. *Uso de agrotóxicos no Brasil: Controle social e interesses corporativos*. São Paulo: Annablume; Fapesp.

Araújo-Lima, C. A. R. M.; Gomes, L. L. C. 2010. Tambaqui (*Colossoma macropomum*).. In: Baldisseroto. *Espécies Nativas Para Piscicultura no Brasil*. Vol. 2. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul. p. 175-193

Armiliato, N. 2014. *Toxicidade celular e bioquímica do glifosato sobre os ovários do peixe Danio rerio*. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento/Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina. 109 pp.

Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. 2011. NBR 15088: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes.

Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. 2016. NBR 15499: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes.

Barriuso, E. Calvet, R; Schiavon, M; Soulas, G. 1996. Pesticidas e poluentes orgânicos do solo: transformações e dissipações. *Estudo e Manejo do Solo*, 3(4): 279-296.

Bear, M. F.; Connors, B.W.; Paradiso, M. A. 2002. O olho. In: *Neurociências: Desvendando o sistema nervoso*. 2ª edição, Artmed, Porto Alegre. p. 280-312

Bortoluzzi, E. C.; Rheinheimer, D. dos S.; Gonçalves, C. S.; Pellegrini, J. B. R.; Zanella, R.; Copetti, A. C. C. 2006. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 10(4): 881-887.

Brasil. 1989. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 - Lei dos Agrotóxicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Poder Executivo, Brasília, DF.

Brasil. 2005. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Brasília, 8 pp.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente. 2016. Agrotóxicos. (<http://www.mma.gov.br>). Acesso: 22/09/16.

Brentano, D. M. 2006. *Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com Daphnia magna: avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário*. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental – PPGEA/ Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina. 145pp.

Buratini, S. V.; Bertolotti, E. 2014. Análise estatística. In: Zagatto, P. A.; Bertolotti, E. (Eds). *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. Vol 2. RiMa, São Carlos, São Paulo. p. 221-250.

Canuto, T. G.; Gama, A. F.; Barreto, F. M. de S.; Alencar Neto, M. da F. A. 2010. Estimativa do risco potencial de contaminação por pesticidas de águas superficiais e subterrâneas do município de Tianguá-CE, com aplicação do método de GOSS e índice de GUS, In: *XVI Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas; XVII Encontro Nacional de Perfuradores de Poços*, São Luis: ABAS, p. 1-20.

Carmo, D. A.; Carmo, A. P. B.; Pires, J. M. B.; Oliveira, J. L. M. 2013. Comportamento ambiental e toxicidade dos herbicidas atrazina e simazina. *Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 8(1) 1-11.

Carneiro, F. F.; Pignati, W. A.; Rigotto, R. M.; Augusto, L. G. S.; Pinheiro, A. R. O.; Faria, N. M. X.; Alexandre, V. P.; Friedrich, K.; Mello, M. S. C. 2015. Segurança alimentar e nutricional e saúde. *In: Carneiro, F. F.; Augusto, L. G. S.; Rigotto, R. M.; Friedrich, K.; Búrigo, A. C. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde*. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Rio de Janeiro; Expressão Popular, São Paulo, p. 89-191.

Carvalho, E. V. M. M. De. 2007. *Abordagens biotecnológicas do tambaqui (Colossoma macropomum)*. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação/Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco. 110 p.

Cassal, V. B.; Azevedo, L. F.; Ferreira, R. P.; Silva, D. G.; Simão, R. S. 2014. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*. 18(1): 437-445.

Castro, F. J.; Ferreira, B. B.; Oliveira, J. M. V. G.; Moron, S. E. 2013. Efeitos do pesticida atrazina sobre os parâmetros hematológicos do lambari, *Astyanax* sp. *9º Seminário de Iniciação Científica*. Universidade Federal do Tocantins, Palmas, Tocantins.

Chaim, A. Valarini, P. J. 2006. Eficiência de Deposição de Agrotóxicos em Culturas Rasteiras. *In: Valarini, P. J.; Luiz, A. J. B. (Ed.). Impacto ambiental da agricultura irrigada em Guaira – SP*. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, São Paulo. p. 91-114.

Chapadense, P. F. G.; Castro, F. J.; Almeida, J. A.; Moron, S. E. 2009. Toxicidade do herbicida atrazina em *Colossoma macropomum*. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. 10 (2): 398-405.

Claro-Jr, L.; Ferreira, E.; Zuano, J.; Araújo-Lima, C. 2004. O efeito da floresta alagada na alimentação de três espécies de peixes onívoros em lagos de várzea da Amazônia Central, Brasil. *Acta Amazônica*, 34 (1): 133-137.

Costa, C. R.; Olivi, P.; Botta, C. M.; Espindola, E. L. G. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação – *Química Nova*, 31 (7): 1820-1830.

Cruz, C.; Cubo, P.; Gomes, G. R.; Venturini, F. P.; Guilherme, P. E.; Pitelli, R. A. 2008. Sensibilidade de Peixes Neotropicais ao Dicromato de Potássio. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* 3 (1): 53-55.

Cuenca, N. 2015. Agência EFE: Primeiro Estudo Mundial sobre Parkinson com retina pode antecipar diagnóstico (<https://www.efe.com/efe/brasil/>). Acesso: 20/04/18.

Decaprio, A. P. 1997. Biomarkers: Coming of Age for Environmental Health and Risk Assessment. *Critical Review*, 31(7): 1837-1848.

Dong, X.; Zhu, L.; Wang, J.; Wang, J.; Xie, H.; Hou, X.; Jia, W. 2009. Effects of atrazine on cytochrome P450 enzymes of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 77(3): 404-412.

Dores, E. F.G.D. and Lamonica-Freire, E. M. 2001. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise preliminar. *Química Nova*, 24(1): 27–36.

Extrapratica. 2017. Catálogo de produtos: Modo de ação atrazina (https://www.extrapratica.com.br/BR_ProductCatalogPublic). Acesso: 08/02/2018.

Faria, J. C. N. M. 2009. *Avaliação histopatológica, histoquímica e morfométrica dos efeitos da toxicidade aguda do herbicida Roundup® nas brânquias e no fígado do peixe Poecília vivípara*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia/Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás. 56pp.

Faria e Sousa, S. J. 1997. Fisiologia e desenvolvimento da visão. *Simpósio: Oftalmologia para o clínico*. Medicina, Ribeirão Preto, 30: 16-19.

Ferreira, C. M. 2003. Testes de toxicidade aquática para monitoramento ambiental. *Biológico*, São Paulo. 65(1): 17-18.

Gomes, A. I. E. 2007. *Avaliação da Ecotoxicidade de Águas Superficiais Aplicação à Bacia Hidrográfica do Rio Leça*. Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Química/Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto. 184pp.

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

Hamilton, M. A.; Russo, R. C.; Thurston, R. V. 1997. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11: 714-719.

Hayes, T. B.; Anderson, L. L.; Beasley, V. R.; Solla, S. R. DE; Igushi, T.; Ingraham, H.; Kestemont, P.; Kniewaldh, J.; Kniewaldh, Z.; Langloisi, V. S.; Luquej, E. H.; McCoyk, K. A.; Muñoz-de-Toroj, M.; Okal, T.; Oliveiram, C. A.; Ortonn, F.; Rubyo, S.; Suzawaf, M.; Tavera-Mendozap, L. E.; Trudeauq, V. L.; Victor-Costam, A. B.; Willingham, E. 2011. Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 127: 64-73.

He, H.; Yu, J.; Chen, G.; Li, W.; He, J.; Li, H. 2012. Acute toxicity of butachlor and atrazine to freshwater green alga *Scenedesmus obliquus* and cladoceran *Daphnia carinata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 80: 91–96.

Hodgson, E. 2004. Introduction to Toxicology. In: Hodgson, E. (eds). *A Textbook of Modern Toxicology*. Vol. 3. Departamento de Toxicologia Ambiental e Bioquímica da Universidade Estadual da Carolina do Norte, John Wiley & Sons, New Jersey. p. 3-12.

Hunter, W. J.; Shaner, D. L. 2010. Biological Remediation of Groundwater Containing Both Nitrate and Atrazine. *Current Microbiology*, 60(1): 42-46.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA. 2010. *Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental*. Brasília. 84 pp.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA. 2013. *Boletim de Comercialização de Agrotóxicos e Afins: histórico de vendas 2000-2012*. Brasília, DF. 42 pp.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis- IBAMA. 2014. OS 10 ingredientes ativos mais vendidos em 2013. (www.ibama.gov.br). Acesso: 30/05/17.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis- IBAMA. 2016. Vendas de Ingredientes Ativos por Unidade da Federação em 2014. (www.ibama.gov.br/vendas_ingredientes_ativos_uf_2014.xls). Acesso: 12/12/17.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis- IBAMA. 2016. Vendas por classes de uso dos produtos formulados, por Unidade Federativa em 2014 (www.ibama.gov.br/os_dez_ias_vendidos_2014.xls). Acesso: 30/05/17.

Instituto Nacional de Câncer-INCA. Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer, José Alencar Gomes da Silva Acerca dos Agrotóxicos (www.inca.gov.br). Acesso: 22/11/17.

Iseki, K. K.; Salles, H. C.; Gouveia, G. R.; Martins, C. M.; Carrara, J. A. 2012. Estudo de biomarcadores do estresse oxidativo em peixes (*Oreochromis niloticus*) e moluscos (*Anodontites trapesialis*) submetidos a ensaios de toxicidade com herbicida ametrina. *Anuário da Produção Acadêmica Docente*, 6(16): 83-100.

James, R. C.; Roberts, S. M.; Williams, P. L. 2000. General Principles of Toxicology. *In*: Williams, P. L.; James, R. C.; Roberts, S. M. (Eds). *Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications*. Vol. 2. John Wiley & Sons, New York. p. 3-34.

Javaroni, R. C. A.; Landgraf, M. D.; Rezende, M. O. O. 1998. Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de cana-de-açúcar. *Química Nova*. 22(1): 58-64.

Jesus, T. B.; Carvalho, C. E. V. 2008. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecol. Bras.*, 12(4): 680-693.

Kendall, R. J.; Anderson, T. A.; Baker, R. J.; Bens, C. M.; Carr, J. A.; Chiodo, L. A.; Cob III, G. P.; Dickerson, R. L.; Dixon, K. R.; Frame, L. T.; Hooper, M. J.; Martin, C. F.; McMurry, S. T.; Patino, R.; Smith, E. E.; Theodorakis, C. W. 2001. Ecotoxicology. *In: Klaassen, C. D. (Eds). Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons*. Vol. 6. MacGraw-Hill, New York. p. 1013-1045.

Kruijf, H. A. M.; de Zwart, D.; Viswanathan, N.S.; Ray, P. K. 1989. *Manual on Aquatic Ecotoxicology*. Kluwer Academica Publishers: Dordrecht. 332pp.

Langiano, V. C. 2006. *Toxicidade do Roundup® e seus efeitos para o peixe neotropical Prochilodus lineatus*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná. 72pp.

Lima, C. A.; Goulging, M. 1998. Os frutos do tabaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. *Sociedade civil Mamirauá*, Brasília. p. 8-20.

Lins, J. A. P. N.; Kirschnik, P. G.; Queiroz, V. S.; Cirio, S. M. 2010. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, 8(4): 469-484.

Livingstone, D. R. 1993. Biotechnology and Pollution Monitoring: Use of Molecular Biomarkers in the Aquatic Environment. *J. Chem. Tech. Biotechnol*, 57: 195-211.

Livingstone, D. R. 2001. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42(8): 656-666.

Lombardi, J. V. 2016. Fundamentos de Toxicologia Aquática. (http://www.aquicultura.br/conceitos_fundamentais.htm). Acesso: 15/10/16.

Magalhães, D.P.; Ferrão Filho, A. S. 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*. 12 (3): 355-381.

Mariani, C. F. 2014. Ecotoxicologia. (www.ecologia.ib.usp.br). Acesso: 01/11/16.

Martins, L. P. S. 2013. *Efeitos tóxicos subletais de paracetamol em dois níveis de organização biológica: Lemna minor e Daphnia magna*. Dissertação de Mestrado, Universidade Fernando Pessoa, Porto. 82pp.

Mckllep, D. 2009. *The fish larva: a transitional life form, the foundation for aquaculture and fisheries. Report from a working group on research on early life stages of fish*. Large-scale Programmes. Aquaculture – An Industry in Growth. Conselho de pesquisa da Noruega. Noruega. 115 pp.

Menezes, A. C. L. 2005. *Toxicidade do cobre sobre tambaqui Colossoma macropomum (Cuvier, 1818) em pH 4 e pH 8*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Pós-graduação e Biologia Tropical de Recursos Naturais (INPA/UFAM). Manaus, Amazonas. 87 pp.

Moreira, R. A.; Mansano, A. S.; Rocha, O. 2013. O efeito da toxicidade aguda do herbicida atrazina para o cladóceros *Moina minuta* (Hansen, 1899). *Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista*, 9(11): 77-90.

Moreira, R. A.; Mansano, Silva, L. C.; A. S.; Rocha, O. A comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabelligera*. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 26(1): 1-8.

Moron, S. E.; Polez, V. L. P.; Artoni, R. F.; Ribas, J. L. C.; Takahashi, H. K. 2006. Estudo de Alterações na Concentração dos Íons Plasmáticos e da Indução de Micronúcleos em *Piaractus Mesopotamicus* Exposto Ao Herbicida Atrazina. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 1(1): 1- 4.

Moura, E. E. S. 2009. *Determinação da toxicidade aguda e caracterização de risco ambiental do herbicida Roundup (glifosato) sobre três espécies de peixes*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Pós-Graduação em Bioecologia Aquática. Natal, Rio Grande do Norte. 58 pp.

Neto, A. C. N. 2009. *Avaliação de toxicidade aguda e crônica em águas do Rio Jundiá e em afluentes e efluentes da ETE do Novo Horizonte, Jundiá, São Paulo*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/Universidade de São Paulo, São Paulo. 75pp.

Nishida, S. M. 2012. Sentido da Visão. *Apostila do curso de Fisiologia*. IB UNESP-Botucatu. p. 85-100.

Nordberg, G. F. 2010. Biomarkers of exposure, effects and susceptibility in humans and their application in studies of interactions among metals in China. *Toxicology Letters*, 192: 45-49.

Nwani, C. D.; Lakra, W. S.; Nagpure, N. S.; Kumar, R.; Kushwaha, B.; Srivastava, S. K. 2010. Toxicity of the Herbicide Atrazine: Effects on Lipid Peroxidation and Activities of Antioxidant Enzymes in the Freshwater Fish *Channa Punctatus* (Bloch). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7: 3298-3312.

Oliveira Jr, R. S. 2011. Mecanismos de ação de herbicidas. *In*: Oliveira Jr, R. S.; Constantin, J.; Inoue, M. H. (Eds). *Biologia e manejo de plantas daninhas*. Vol. 2. Omnipax Editora Ltda, Curitiba, Paraná. p. 151- 192.

Oliveira, L. L. D. 2014. *Biomarcadores enzimáticos e testes ecotoxicológicos na avaliação da toxicidade de fármacos em invertebrados aquáticos*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo. 279 pp.

Paulino, M. G.; Souza, N. E. S.; Fernandes, M. N. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathologica changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicological Environment Safety*, 80: 6-13.

Peakall, D. 1992. Biomarcadores do Sistema Nervoso. *In*: Peakall, D. (Eds). *Animal Biomarkers as Pollution Indicators*. London, Chapman & Hall, pp. 20 – 37.

Peres, F.; Moreira, J. C.; Dubois, G. S. 2003. Agrotóxicos, Saúde e Ambiente: Uma Introdução ao tema. *In*: Perez, F. (Eds). *É Veneno ou é Remédio?* Fiocruz, Rio de Janeiro. p. 21-41.

Pesticide info. 2018. Data base, Chemicals: Atrazina (http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical). Acesso: 20/04/18.

Quaranta, A.; Bellantuono, V.; Cassano, G.; Lippe, C. Why amphibians are more sensitive than mammals to xenobiotics. *Plos One*, 4(11): 1–4.

Ramel, G. 2018. Earthlife (<https://www.earthlife.net/fish/sight.html>). Acesso: 21/03/18.

Ramos, A. Fisiologia da Visão. 2006. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro - PUC-Rio de Janeiro. 17 pp.

Raymond, P. A. 1985. Cytodifferentiation of photoreceptors in larval goldfish: Delayed maturation of rods. *The Journal of Comparative Neurology*. 236: 90-105.

Ravneet, J.; Johal, M. S.; Sharma, M. L. 2009. Three-dimensional study on the effect of organophosphate pesticide ‘monocrotophos’ on lens of fish and its recovery. *Veterinary Ophthalmology*, 12(3): 152–157.

Rebello, R. M; Caldas, E. D. 2014. Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos. *Quim. Nova*, 37(7): 1199-1208.

Rodrigues, D. O.; Silva, S. L.; Silva, M. S. R. 2009. Avaliação ecotoxicológica preliminar das águas das bacias hidrográficas dos rios Tarumã, São Raimundo e Educandos. *Acta Amazônica*. Manaus. 39 (4): 935-942.

Ronco, A.; Báez, M. C. D.; Granados, Y. P. 2004. Conceptos Generales. Morales, G. C. In: *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones*. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo: Ottawa, Canadá, p. 17-22.

Ruppenthal, J. E. 2013. *Toxicologia*. Universidade Federal de Santa Maria, Colégio Técnico Industrial de Santa Maria - Rede e-Tec Brasil, Santa Maria, Rio Grande do Sul. 128 pp.

Rutkoski, C. F.; Kolcenti, C.; Vanzetto, G. V.; Macagnan, N.; Hartmann, M. T. 2016. Efeito teratogênico e neurotóxico do herbicida atrazina em embriões e larvas de *Physalaemus gracilis* (anura: Leptodactylidae). *VI Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica*, Universidade Federal da Fronteira do Sul, Chapecó. p. 1-4.

Sanchez-Galan, S.; Linde, A. R.; Garcia-Vazquez, E. 1999. Brown trout and European minnow as target species for genotoxicity tests: differential sensitivity to heavy metals. *Ecotoxicology Environmental Safety*, New York. 43: 301-304.

Santos, T; G. 2010. *Biomarcadores bioquímicos e genéticos para detecção dos efeitos do herbicida atrazina no peixe neotropical Prochilodus lineatus*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná. 72 pp.

Shenoy, K. 2012. A exposição ambientalmente realista ao herbicida atrazina altera alguns traços sexualmente selecionados em guppies masculinos. *PloS One*, 7(2): 1-10.

Silva, K. C. C. 2012. *Caracterização as Acetilcolinesterase cerebral de tucunaré, Cichla ocellaris, (BLOCH & SCHENEIDER, 1801): efeitos de íons e pesticidas organofosforados e carbamatos sobre sua atividade*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco. 80 pp.

Soares, P. R. L.; Andrade, A. L. C.; Santos, T. P.; Silva, S. C. B. L.; Silva, J. F.; Santos, A. R.; Souza, E. H. L. S.; Cunha, F. M.; Teixeira, V. W.; Cadena, M. R. S.; Sá, F. B.; Júnior, L. B. C.; Cadena, P. G. 2016. Acute and chronic toxicity of the benzoylurea pesticide, lufenuron, in the fish, *Colossoma macropomum*. *Chemosphere*, 161: 412-421.

Sousa, L. H. M. 2014. *Perfil morfológico do desenvolvimento da retina em larvas de Tambaqui (Colossoma macropomum), Pirapitinga (Piaractus brachypomus) e do híbrido Tambatinga (C. macropomum x P. brachypomus)*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos Continentais Amazônicos/Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Pará. 65pp.

Souza, C. E.; Barrella, W. 2009. Atributos ecomorfológicos de peixes do Sul do Estado de São Paulo. *Revista Eletrônica de Biologia*, São Paulo. 2:(1) 1-34.

Souza, T. C. 2014. *Toxicidade aguda de agrotóxicos e Curva de Sensibilidade de Espécies para peixes amazônicos*. Dissertação Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Do Ambiente e Sustentabilidade na Amazônia – PPG/CASA, Manaus, Amazonas. 65 pp.

Spadotto, C. A. 2006. *Avaliação de Riscos Ambientais de Agrotóxicos em Condições Brasileiras*. EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna, São Paulo. 22 pp.

Spadotto, C. A.; Junior, R. P. S.; Dores, E. F. G. C.; Gebler, L.; Moraes, D. A. C. 2010. Fundamentos e aplicações da modelagem ambiental de agrotóxicos. EMBRAPA Monitoramento Por Satélite, Campinas, São Paulo. 49 pp.

Sprague, J. B. 1990. Methods for fish biology. *Aquatic toxicology*. In: Schreeck, C. B., Moyle, P. B., (Eds.). American Fisheries Society, Bethesda. 15: 491-528.

SRC Environmental Health Analysis, Scientific Databases (<https://www.srcinc.com/>). Acesso: 18/04/18.

Tagliaferro, A. F. 2009. *Avaliação da toxicidade aguda do inseticida endossulfan em alevinos de pacu (Piaractus mesopotamicus), com o emprego de biomarcadores histológicos*. Dissertação de Mestrado, Instituto de biologia/Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. 147pp.

Taraves-Dias, M.; Sandrim, E, F. S.; Campos-Filho, E. 1999. Características hematológicas do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (Osteishthytes, Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. II. Leucócitos. *Revista Bras. De Zoologia*, 16(1): 175-184.

Tillit, D. E.; Papoulias, D. M.; Whyte, J. J.; Richter, C. A. 2010. Atrazine reduces reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*, 99(2): 149-159.

Uppal, R. K.; Jphal. M. S.; Sharma, M. L. 2015. Toxicological effects and recovery of the corneal epithelium in *Cyprinus carpio communis* Linn. exposed to monocrotophos: an scanning electron microscope study. *Veterinary Ophthalmology* 18(3): 214–220.

Ventura, A. S.; Corsini, F. E.; Gabriel, A. M. A. 2015. Hematologia como biomarcador de contaminação ambiental em peixes. *Nutritime*, 12(6): 4500-4507.

Xing, H.; Li, S.; Wang, Z.; Gao, X.; Xu, S.; Wang, X. 2012. Histopathological changes and antioxidant response in brain and kidney of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. *Chemosphere*, 88(4): 377-383.

Yu, M.-H. 2005. Introdução. In: Yu, M.-H. (Eds). *Environmental Toxicology: Biological and Health Effects of Pollutants*. Vol 2. CRC Press: Boca Raton, New York Washington. p. 1-11.

Zucker, E. 1985. Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure – Acute toxicity test for freshwater fish. USEPA Publication 540/9-85-006), Washington. p.1-17.

Zupan, I.; Kalafatic, M. 2003. Histological effects of low atrazine concentration on Zebra mussel (*Dreissena polymorpha pallas*). *Environmental Contamination Toxicology*, 70(4): 688-695.