

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**EDUARDA ROBERTA BORDIN**

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE CONCENTRAÇÕES AMBIENTAIS DE  
ATRAZINA E GLIFOSATO, ISOLADOS E EM MISTURA, EM DIFERENTES  
ORGANISMOS-TESTE**

**CURITIBA  
2021**

**EDUARDA ROBERTA BORDIN**

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE CONCENTRAÇÕES AMBIENTAIS DE  
ATRAZINA E GLIFOSATO, ISOLADOS E EM MISTURA, EM DIFERENTES  
ORGANISMOS-TESTE**

**ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF ENVIRONMENTAL  
CONCENTRATIONS OF ATRAZINE AND GLYPHOSATE, ISOLATED AND IN  
MIXTURE, IN DIFFERENT TEST ORGANISMS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Wanessa Algarte Ramsdorf Nagata

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriane Martins de Freitas

**CURITIBA  
2021**



Esta licença permite que outros distribuam, remixem, adaptem e criem a partir do seu trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que lhe atribuam o devido crédito pela criação original.

[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)



EDUARDA ROBERTA BORDIN

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE CONCENTRAÇÕES AMBIENTAIS DE ATRAZINA E GLIFOSATO,  
ISOLADOS E EM MISTURA, EM DIFERENTES ORGANISMOS-TESTE**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Ciência E Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologias E Processos Ambientais.

Data de aprovação: 25 de Fevereiro de 2021

Prof.a Wanessa Algarte Ramsdorf Nagata, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Claudia Bueno Dos Reis Martinez, Doutorado - Universidade Estadual de Londrina (Uel)

Prof.a Izonete Cristina Guiloski, Doutorado - Universidade Federal do Paraná (Ufpr)

Prof.a Marta Margarete Cestari, Doutorado - Universidade Federal do Paraná (Ufpr)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 26/02/2021.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a minha família por todo amor, suporte, dedicação e compreensão. Vocês são meu exemplo de vida, incentivam, acreditam e tranquilizam. Mãe, pai, irmã, vovós, vovô, tias, tios, primas e primos. Todos os momentos que passamos juntos, e todo o carinho enquanto estivemos longe, foi essencial para esta jornada acontecer da melhor forma possível. Todas as conquistas ficam mais importantes por saber que posso dividir e comemorar com vocês.

Ao meu namorado e companheiro de desafios, muito obrigada por sempre incentivar e acreditar junto comigo, que os obstáculos podem ser superados e que com determinação podemos alcançar nossos objetivos.

Tati e Vivi, agradeço por poder compartilhar e dividir com vocês, não só o apartamento, mas as histórias de vida e os momentos de alegria e tristeza durante o período do mestrado.

Ao grupo do laboratório de Ecotoxicologia, Monike, Vini, Eli, Yo, Paloma, Renan, Fer, Oliver, Matheus, Eberton e Júlia, obrigada por poder aprender com vocês, foi um desafio incrível conhecer e poder realizar tantos experimentos na ecotox.

Minha orientadora Prof<sup>a</sup> Wanessa, coorientadora Prof<sup>a</sup> Adriane e a Prof<sup>a</sup> Flávia, obrigada por todo conhecimento repassado de forma gentil e espontânea e pelo apoio durante o mestrado. Foi muito bom adquirir tanta experiência no convívio com vocês.

Agradeço aos velhos e novos amigos pelos momentos de descontração e acolhimento.

A UTFPR, PPGCTA, CAPES, demais professores e funcionários, agradeço pela estrutura e financiamento para o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço a banca avaliadora da qualificação, Prof<sup>a</sup> Lucia Regina Rocha Martins e Dr<sup>a</sup> Taynah Vicari, e da defesa, Prof<sup>a</sup> Claudia Bueno Dos Reis Martinez, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marta Margarete Cestari e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Izonete Cristina Guiloski, pela disponibilidade de ler e contribuir para a melhoria do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento desta pesquisa – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

BORDIN, E. R. **AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE CONCENTRAÇÕES AMBIENTAIS DE ATRAZINA E GLIFOSATO, ISOLADOS E EM MISTURA, EM DIFERENTES ORGANISMOS-TESTE**. 2021. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2021.

O setor agrícola brasileiro contribui para um consumo elevado de agrotóxicos, sendo maiores quantidades e misturas de herbicidas utilizadas nas culturas com o intuito de aumentar a produtividade. Muitos estudos abordam a fitotoxicidade obtida através da associação de uma série de herbicidas para algumas plantas daninhas, no entanto, ainda existe uma lacuna relacionada aos aspectos ecotoxicológicos destas misturas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ecotoxicidade dos princípios ativos e dos produtos comerciais dos herbicidas atrazina (2 e 25  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e glifosato (65 e 160  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), isolados e quando em mistura (2+65 e 25+160  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), em concentrações de relevância ambiental. A exposição de *A. aegypti* aos herbicidas não resultou em imobilidade dos organismos-teste após exposição aguda (24 h). A exposição crônica (21 dias) de três gerações de *D. magna* aos herbicidas, resultou em efeitos sobre a sobrevivência, a primípara e a reprodução dos organismos, além de efeitos sobre os biomarcadores bioquímicos catalase e glutathione S-transferase. *A. cepa* foi um bom modelo biológico para avaliação das concentrações testadas, pois após 96 h de exposição aos herbicidas, foram verificados efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos, sendo brotos e aderências cromossômicas as anormalidades observadas com maior frequência, demonstrando o potencial aneugênico dos herbicidas. No ensaio com embriões de *R. quelen* foi possível observar efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) referentes as deformidades causadas pelos herbicidas ao longo da exposição de 96 horas, onde danos axiais e nas nadadeiras foram os mais frequentes, ainda, foram verificados efeitos sobre os biomarcadores bioquímicos superóxido dismutase, catalase, glutathione S-transferase e acetilcolinesterase. Este trabalho possibilitou a observação de sensibilidades distintas para cada modelo biológico, destacando-se a mistura dos herbicidas, responsável por mais respostas significativas ( $p < 0,05$ ) em todos os organismos não-alvo avaliados. Além disso, foi possível verificar diferenças entre as concentrações testadas, e sobretudo, comparar os efeitos causados pelos ingredientes ativos e formulações comerciais. Considerando que estes compostos podem atuar indiretamente nos seres vivos, é necessário compreender os efeitos e antecipar a reparação dos possíveis danos causados as espécies não-alvo.

**Palavras-chave:** pesticidas; ecotoxicidade de misturas; biomarcadores bioquímicos; anormalidades cromossômicas; deformidades morfológicas.

## ABSTRACT

BORDIN, E. R. **ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF ENVIRONMENTAL CONCENTRATIONS OF ATRAZINE AND GLYPHOSATE, ISOLATED AND IN MIXTURE, IN DIFFERENT TEST ORGANISMS**. 2021. Master's thesis - Graduate Program in Environmental Science and Technology. Federal Technological University of Paraná. Curitiba, 2021.

The Brazilian agricultural sector contributes to a high consumption of pesticides, with greater amounts and mixtures of herbicides used in crops in order to increase productivity. Many studies address the phytotoxicity obtained through the association of a series of herbicides for some weeds, however, there is still a gap related to the ecotoxicological aspects of these mixtures. The present work aimed to evaluate the ecotoxicity of the active ingredients and commercial products of the herbicides atrazine (2 and 25  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) and glyphosate (65 and 160  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), isolated and when mixed (2+ 65 and 25 + 160  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), in concentrations of environmental relevance. The exposure of *A. aegypti* to herbicides did not result in immobility of the test organisms after acute exposure (24 h). The chronic exposure (21 days) of three generations of *D. magna* to herbicides, resulted in effects on the survival, sexual maturation and reproduction of the organisms, in addition to effects on the biochemical biomarkers catalase and glutathione S-transferase. *A. cepa* was a good biological model for evaluating the tested concentrations, since after 96 h of exposure to herbicides, cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects were verified, with chromosomal buds and adhesions being the abnormalities most frequently observed, demonstrating the aneugenic potential of the herbicides. In the test with *R. quelen* embryos it was possible to observe significant effects ( $p < 0.05$ ) referring to the deformities caused by herbicides throughout the 96-hour exposure, where axial and fin damage were the most frequent, and effects were verified on the biochemical biomarkers superoxide dismutase, catalase, glutathione S-transferase and acetylcholinesterase. This work made it possible to observe different sensitivities for each biological model, highlighting the mixture of herbicides, responsible for more significant responses ( $p < 0.05$ ) in all evaluated non-target organisms. In addition, it was possible to verify differences between the tested concentrations, and above all, to compare the effects caused by the active ingredients and commercial formulations. Considering that these compounds can act indirectly on living beings, it is necessary to understand the effects and anticipate the repair of possible damage caused to non-target species.

**Keywords:** pesticides; ecotoxicity of mixtures; biochemical biomarkers; chromosomal abnormalities; morphological deformities.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Total de vendas, em toneladas, de agrotóxicos e afins nas regiões brasileiras tendo como base o ano de 2017.....	16
<b>Figura 2:</b> Concentrações do herbicida atrazina obtidas através de análises de amostras ambientais. Linha tracejada indica o limite máximo de pesticidas na água para consumo humano, permitido pela União Europeia (UE), linha contínua indica o limite máximo do herbicida atrazina em águas que podem ser utilizadas para consumo humano após tratamento simplificado, permitido pela legislação brasileira (CONAMA nº 357 de 2005), e linha composta por traço seguido de ponto indica o limite máximo do herbicida atrazina em águas utilizadas para consumo humano, permitido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA).....	20
<b>Figura 3:</b> Concentrações do herbicida glifosato obtidas através de análises de amostras ambientais. Linha tracejada indica o limite máximo de pesticidas na água para consumo humano, permitido pela União Europeia (UE), linha contínua indica o limite máximo do herbicida atrazina em águas que podem ser utilizadas para consumo humano após tratamento simplificado, permitido pela legislação brasileira (CONAMA nº 357 de 2005), e linha composta por traço seguido de ponto indica o limite máximo do herbicida atrazina em águas utilizadas para consumo humano, permitido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA).....	23
<b>Figura 4:</b> Representação do ciclo de vida de organismos <i>Aedes aegypti</i> , compreendendo os estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e mosquito adulto. ....	27
<b>Figura 5:</b> Organismos-teste utilizados nos ensaios ecotoxicológicos e os respectivos parâmetros avaliados. ....	33
<b>Figura 6:</b> Fases da divisão celular observadas em uma lâmina contendo amostra do meristema apical de <i>Allium cepa</i> , com aumento de 400x. ....	37
<b>Figura 7:</b> Ilustração do desenho experimental utilizado para o ensaio crônico multigeracional com <i>Daphnia magna</i> . ....	42
<b>Figura 8:</b> Índice mitótico obtido para amostras do meristema radicular de <i>Allium cepa</i> expostas ao controle negativo (água processada com sistema de osmose reversa), controle positivo (MMS 10 mg.L <sup>-1</sup> ) e aos padrões analíticos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura. ....	51
<b>Figura 9:</b> Índice de alterações cromossômicas obtido para amostras do meristema radicular de <i>Allium cepa</i> expostas ao controle negativo (água processada com sistema de osmose reversa), controle positivo (MMS 10 mg.L <sup>-1</sup> ) e aos padrões analíticos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura. ....	53
<b>Figura 10:</b> Exemplos de alterações do ciclo celular verificados em células do meristema radicular de <i>Allium cepa</i> , após exposição aos padrões analíticos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura, obtidos em microscópio ótico com aumento de 400x.....	55

<b>Figura 11:</b> Índice mutagênico obtido para amostras do meristema radicular de <i>Allium cepa</i> expostas ao controle negativo (água processada com sistema de osmose reversa), controle positivo (MMS 10 mg.L <sup>-1</sup> ) e aos padrões analíticos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura. ....	56
<b>Figura 12:</b> Tempo médio (média ± DP) para o início da produção de filhotes por fêmea (primípara), para a primeira (F0), segunda (F1) e terceira (F2) geração de <i>D. magna</i> avaliadas após exposição crônica, onde * indica a diferença estatística em relação ao controle (p<0,05). ....	61
<b>Figura 13:</b> Filhotes produzidos por fêmea viva (média ± DP), após o período de exposição de 21 dias, para a primeira (F0), segunda (F1) e terceira (F2) geração de <i>D. magna</i> avaliadas após exposição crônica, onde * indica a diferença estatística em relação ao controle (p<0,05) e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (p<0,05). ....	61
<b>Figura 14:</b> Atividades enzimáticas de glutathione S-transferases (média ± DP) obtidas após (a) 48 e (b) 96 horas de exposição de <i>Daphnia magna</i> , onde * indica a diferença estatística (p<0,05) em relação ao controle. ....	64
<b>Figura 15:</b> Atividades enzimáticas de catalases (média ± DP) para a primeira (F0), segunda (F1) e terceira (F2) geração de <i>D. magna</i> avaliadas após exposição crônica, onde * indica a diferença estatística em relação ao controle (p<0,05). ....	67
<b>Figura 16:</b> Atividades enzimáticas de glutathione S-transferases (média ± DP) para a primeira (F0), segunda (F1) e terceira (F2) geração de <i>D. magna</i> avaliadas após exposição crônica, onde * indica a diferença estatística em relação ao controle (p<0,05), e letras diferentes indicam a diferença estatística (p<0,05) entre os controles da segunda e terceira geração. ....	67
<b>Figura 17:</b> Percentual de letalidade dos organismos-teste <i>Rhamdia quelen</i> , obtido após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição ao controle negativo e aos padrões analíticos (a) e produtos comerciais (b) dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura. ....	71
<b>Figura 18:</b> Percentual de sobrevivência dos organismos-teste <i>Rhamdia quelen</i> , obtido após 96 horas de exposição ao controle negativo e aos padrões analíticos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura. ....	72
<b>Figura 19:</b> Índice de deformidades totais (a) e frequência de deformidades totais (b) obtidos para as amostras relacionadas ao controle negativo e aos padrões analíticos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura. .	73
<b>Figura 20:</b> Atividades enzimáticas de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e acetilcolinesterase (AChE), obtidas para os grupos controle negativo, padrões analíticos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura. ....	80

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Características físico-químicas do herbicida atrazina. ....	19
<b>Quadro 2:</b> Características físico-químicas do herbicida glifosato.....	22
<b>Quadro 3:</b> Grupos avaliados no ensaio de toxicidade aguda empregando larvas de <i>Aedes aegypti</i> e suas respectivas concentrações.....	35

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Escores associados às categorias e respectivas deformidades observadas em embriões de <i>Rhamdia quelen</i> . .....	47
<b>Tabela 2:</b> Frequência de anormalidades observadas em células do meristema radicular de <i>Allim cepa</i> relativas ao número total de células analisadas nos tratamentos compostos pelos princípios ativos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura. ....	54
<b>Tabela 3:</b> Percentual de sobrevivência dos organismos-teste <i>Daphnia magna</i> , obtido para os grupos avaliados no ensaio de exposição crônica multigeracional. ....	59
<b>Tabela 4:</b> Condições utilizadas para otimizar a realização dos ensaios bioquímicos após 48 e 96 horas de exposição. ....	64
<b>Tabela 5:</b> Frequência de embriões de <i>Rhamdia quelen</i> apresentando cada tipo de deformidade (cefálica, nadadeiras, axial e tórax/abdômen) após 96 horas de exposição aos padrões analíticos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura. ....	74
<b>Tabela 6:</b> Deformidades observadas em embriões de <i>Rhamdia quelen</i> após a exposição aos padrões analíticos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura. ....	75

## LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AChE	Acetilcolinesterase
ATZ	Atrazina
ATZCOM	Atrazina produto comercial
ATZPA	Atrazina padrão analítico
CAT	Catalase
COM	Produto comercial
GF	Glifosato
GFCOM	Glifosato produto comercial
GFPA	Glifosato padrão analítico
GST	Glutathione S-transferase
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
MIX	Mistura
MMS	metil metanosulfonato
PA	Padrão analítico
SOD	Superóxido dismutase

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
2 OBJETIVOS .....	14
2.1 OBJETIVO GERAL .....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1 PESTICIDAS NO BRASIL.....	15
3.1.1 Atrazina .....	18
3.1.2 Glifosato .....	21
3.2 ECOTOXICOLOGIA.....	24
3.2.1 Testes de Sensibilidade .....	25
3.2.2 Ecotoxicidade Aguda.....	25
3.2.3 Ecotoxicidade Crônica.....	25
3.2.4 <i>Aedes aegypti</i> .....	26
3.2.5 <i>Allium cepa</i> .....	27
3.2.6 <i>Daphnia magna</i> .....	28
3.2.7 <i>Rhamdia quelen</i> .....	29
3.3 BIOMARCADORES .....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 SOLUÇÕES TESTE.....	33
4.2 TESTE DE ECOTOXICIDADE AGUDA UTILIZANDO LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> .....	34
4.3 TESTE DE CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE EMPREGANDO SEMENTES DE <i>Allium cepa</i> COMO ORGANISMOS-TESTE.....	35
4.4 CULTIVO DO MICROCRUSTÁCEO <i>Daphnia magna</i> .....	38
4.5 TESTE DE SENSIBILIDADE PARA O MICROCRUSTÁCEO <i>Daphnia magna</i> ..	39
4.6 TESTE PRELIMINAR DE ECOTOXICIDADE AGUDA COM <i>Daphnia magna</i> ...	39
4.7 TESTE DE ECOTOXICIDADE CRÔNICA MULTIGERACIONAL COM <i>Daphnia magna</i> .....	40
4.8 AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM <i>Daphnia magna</i> .....	42
4.8.1 Concentração de Proteínas.....	43
4.8.2 Acetilcolinesterases.....	44
4.8.3 Catalases .....	44
4.8.4 Glutathiona S-transferases.....	45
4.8.5 Superóxido dismutases .....	45

4.9 ECOTOXICIDADE EMPREGANDO EMBRIÕES DE <i>Rhamdia quelen</i> COMO ORGANISMOS-TESTE.....	46
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
5.1 TESTE DE ECOTOXICIDADE AGUDA UTILIZANDO LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> .....	49
5.2 TESTE DE CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE EMPREGANDO <i>Allium cepa</i> COMO ORGANISMOS-TESTE .....	51
5.3 TESTE PRELIMINAR DE ECOTOXICIDADE AGUDA COM <i>Daphnia magna</i> ...	58
5.4 TESTE DE ECOTOXICIDADE CRÔNICA MULTIGERACIONAL COM <i>Daphnia magna</i> .....	58
5.5 AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM <i>Daphnia magna</i> .....	63
5.5.1 Avaliação de biomarcadores bioquímicos após exposição aguda .....	63
5.5.2 Avaliação de biomarcadores bioquímicos após exposição crônica.....	65
5.6 ECOTOXICIDADE EMPREGANDO EMBRIÕES DE <i>Rhamdia quelen</i> COMO ORGANISMOS-TESTE.....	70
5.6.1 Sobrevivência de embriões de <i>Rhamdia quelen</i> .....	70
5.6.2 Índice e frequência de deformidades em embriões de <i>Rhamdia quelen</i> .....	73
5.6.3 Biomarcadores bioquímicos em embriões de <i>Rhamdia quelen</i> .....	78
6. CONCLUSÃO .....	83
REFERÊNCIAS.....	84
APÊNDICE A - Carta Controle de sensibilidade de <i>Daphnia magna</i> ao sulfato de zinco elaborada no período de 2019 e 2020. ....	104
APÊNDICE B - Parecer emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UTFPR) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná .....	105
ANEXO A - Composição do meio de cultivo M4 para <i>Daphnia magna</i> . ....	107
ANEXO B - Composição do meio básico utilizado para a diluição das amostras. .	108
ANEXO C - Composição da água reconstituída utilizada no ensaio de toxicidade aguda com <i>Rhamdia quelen</i> .....	109

## 1 INTRODUÇÃO

Visando intensificar o aumento da produtividade agrícola e limitar ou evitar perdas associadas às pragas presentes nas culturas, se faz necessário realizar um controle através de diferentes técnicas de manejo, dentre as quais está a utilização de agrotóxicos (AGOSTINETO et al., 2016; BORDIN et al., 2018; GUSTAVSSON et al., 2017). Entre eles, os herbicidas químicos administrados para o controle de plantas daninhas são a classe de pesticidas mais utilizada mundialmente, uma vez que correspondem a 47,5% do total de produtos utilizados para o controle de agentes infestantes em plantações (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; INTERGOVERNMENTAL TECHNICAL PANEL ON SOILS, 2015).

A utilização de herbicidas sintéticos de forma incessante ou contínua e até mesmo suas aplicações sequenciais, contribuem para que as plantas se tornem resistentes, e quantidades ainda maiores precisem ser administradas (ZAGONEL; FERNANDES, 2007). De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA (2017), o Brasil passa atualmente por um segundo momento relacionado à resistência de plantas daninhas a herbicidas, sendo que o caso atual se refere ao herbicida glifosato, cujo uso intensivo culminou na seleção de plantas daninhas resistentes. Dessa forma, os custos envolvidos para a produção de algumas culturas são aumentados em virtude dos gastos relacionados ao uso de herbicidas e das perdas de produtividade.

Na tentativa de solucionar este problema, associações de herbicidas convencionais são empregadas visando obter outros mecanismos de ação nas plantas daninhas (AGOSTINETO et al., 2016; EMBRAPA, 2006; GUSTAVSSON et al., 2017). Além disso, por meio da utilização de vários produtos associados, são evitadas as diversas entradas nas plantações, bem como são reduzidos os resíduos oriundos das pulverizações, obtidos efeitos de sinergismo potencializando os resultados esperados e reduzindo a fitotoxicidade às culturas agrícolas, e ainda evitada a presença de plantas daninhas por períodos maiores (BARROSO et al., 2008; TREZZI et al., 2005; SANTOS et al., 2016).

Muitos estudos trazem informações sobre a fitotoxicidade gerada por meio da associação de herbicidas e estes indicam como a mistura de diversos produtos influencia nos resultados relacionados ao controle das plantas infestantes em culturas

agrícolas (AGOSTINETO et al., 2016; BARROSO et al., 2008; NONEMACHER et al., 2017; SANTOS et al., 2016). Entretanto, através destes estudos não se tem conhecimento da ecotoxicidade destas associações para os organismos não alvo, ou seja, não se pode afirmar como a aplicação destas associações de herbicidas reagem no ecossistema, e se estes seriam responsáveis por causar maiores danos comparados com suas aplicações individuais. Tendo em vista a crescente utilização de herbicidas nos cultivos agrícolas e seus variados riscos de contaminação ambiental, torna-se necessário conhecer os aspectos ecotoxicológicos relacionados a estes produtos (CORDEAU et al., 2016). Estudos devem ser desenvolvidos buscando sanar estas questões, com o intuito de viabilizar ou indicar se esta forma de manejo é viável ambiental e economicamente.

Empregando estudos ecotoxicológicos e diferentes bioindicadores pode-se conhecer o comportamento e as transformações relacionadas a compostos químicos no ambiente, bem como, identificar seus efeitos sobre organismos vivos (CESAR; SILVA; SANTOS, 1997).

O presente estudo buscou avaliar a ecotoxicidade dos padrões analíticos e dos produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, amplamente utilizados em culturas agrícolas no Brasil, empregando os organismos-teste *Aedes aegypti*, *Allium cepa*, *Daphnia magna* e embriões de *Rhamdia quelen*. Além de contribuir com referências acerca dos padrões ecotoxicológicos de herbicidas, a avaliação de concentrações ambientalmente relevantes também pretende auxiliar na compreensão de seus efeitos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ecotoxicidade de concentrações ambientalmente relevantes de princípios ativos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura, em diferentes organismos-teste.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar os efeitos da exposição aguda (24 h) ao organismo-teste *Aedes aegypti*;
- Avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dos herbicidas utilizando raízes de *Allium cepa*;
- Verificar os efeitos da exposição aguda (48 h) de *Daphnia magna* às concentrações ambientalmente relevantes dos herbicidas;
- Verificar os efeitos da exposição crônica (21 dias) multigeracional de *Daphnia magna* e analisar biomarcadores bioquímicos (AChE, CAT, GST e SOD);
- Verificar os efeitos da exposição aguda (96 h) de embriões de *Rhamdia quelen* e analisar biomarcadores bioquímicos (AChE, CAT, GST e SOD).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 PESTICIDAS NO BRASIL

Em um contexto mundial, o Brasil apresenta-se como o maior consumidor de agrotóxicos, sendo a região sul correspondente a uma parcela de uso de aproximadamente 30% do total (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018). No entanto, o país não conta com um procedimento de atualização de seus registros, o que implica na não reavaliação toxicológica dos mesmos em períodos determinados (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA – ABRASCO, 2015). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2018), a totalidade de agrotóxicos adquiridos no Brasil está classificada de acordo com os respectivos níveis de toxicidade para o ambiente, sendo I - extremamente tóxico, II - altamente tóxico, III - moderadamente tóxico e IV - pouco tóxico.

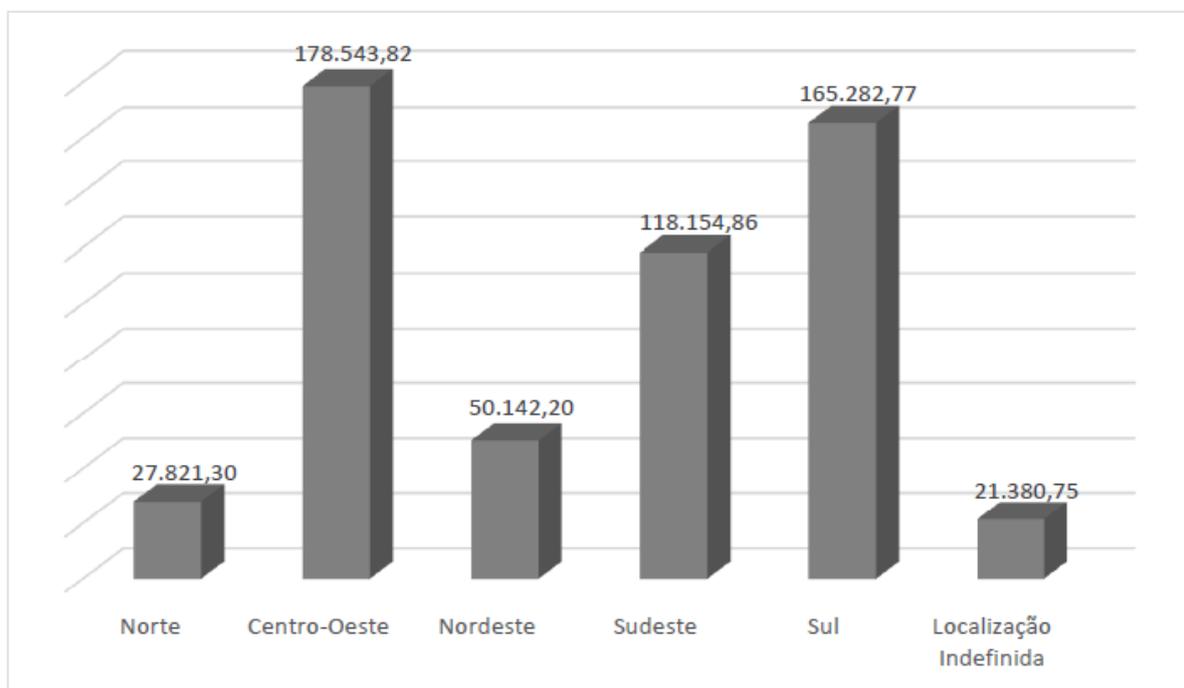
Além disso, existe uma grande divergência de valores relacionados aos limites aceitáveis de pesticidas em recursos hídricos, quando comparamos o Brasil a outros países (BOMBARDI, 2019). A legislação europeia, por exemplo, admite que a concentração máxima de pesticidas na água para consumo humano deve ser de  $0,10 \mu\text{g.L}^{-1}$ , sem exceder, quando na soma total dos pesticidas individuais detectados e quantificados, o valor de  $0,50 \mu\text{g.L}^{-1}$  (EUROPEAN COMMISSION, 1998). Da mesma forma, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) impõe níveis máximos de contaminação de  $3,0 \mu\text{g.L}^{-1}$  para a atrazina e  $700 \mu\text{g.L}^{-1}$  para o glifosato (USEPA, 2009). No Brasil, a Portaria de Consolidação do Ministério da Saúde nº 5 de 2017, estabelece limites máximos permitidos para o padrão de potabilidade da água de  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  e  $500 \mu\text{g.L}^{-1}$  para os herbicidas atrazina e glifosato, respectivamente (BRASIL, 2017), enquanto a Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) nº 357 de 2005, estabelece o limite máximo permitido em águas utilizadas para o abastecimento público após tratamento simplificado - Classe 1, de  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  e  $65 \mu\text{g.L}^{-1}$  para os herbicidas atrazina e glifosato, respectivamente (BRASIL, 2005).

Tendo em vista a presença constante de agrotóxicos no ambiente, muitos órgãos regulamentadores impõem limites máximos para a presença de herbicidas em corpos hídricos. Entretanto, as particularidades de cada pesticida definem como será o seu comportamento no ambiente. A partir de características físico-químicas como

tempo de meia-vida, solubilidade, pressão de vapor, coeficiente de partição octanol/água ( $K_{ow}$ ) e constante de dissociação do ácido ( $pK_a$ ), é possível determinar sua distribuição e predominância nos diferentes compartimentos ambientais (BONFLEUR, 2010; MANSANO, 2016; GABARDO, 2018).

O mercado de agrotóxicos brasileiro está concentrado em algumas categorias, onde os herbicidas representam 45% do total comercializado (ABRASCO, 2015), sendo que, de acordo com o IBAMA (2018), dentre os dez ingredientes ativos mais vendidos no Brasil no ano de 2017, em toneladas, estão o glifosato e seus sais (173.150,75) e a atrazina (24.730,90), ambos pertencentes à classe de herbicidas. A Figura 1 apresenta o total de agrotóxicos e afins vendidos, em toneladas, por regiões brasileiras, tendo como base o ano de 2017.

**Figura 1:** Total de vendas, em toneladas, de agrotóxicos e afins nas regiões brasileiras tendo como base o ano de 2017.



Fonte: A autora, adaptado de IBAMA, 2018.

A classe de pesticidas correspondente aos herbicidas químicos é empregada no manejo de plantas daninhas ou plantas infestantes, as quais são reconhecidas por crescerem dentre as culturas, implicando na redução da eficiência da colheita e conseqüentemente na produtividade agrícola (GAZZIERO et al., 2012; YORK; BEAM; CULPEPPER, 2005). A competitividade entre as plantas daninhas e as respectivas culturas por luz, água e recursos disponíveis no solo, faz com que se torne necessária

a administração de dosagens maiores, além de diversas repetições de aplicação dos herbicidas sintéticos, com o intuito de evitar a interferência negativa na produção (BURGER et al., 2015).

Além disso, o uso contínuo e excessivo dos herbicidas químicos ocasiona casos de resistência ao princípio ativo destes produtos. Dessa forma, misturas de múltiplos herbicidas são administradas, porém, o acúmulo de características de tolerância é apenas retardado, adiando o reaparecimento de plantas daninhas, e resultando posteriormente no desenvolvimento de resistência a uma diversidade de herbicidas, sendo relatadas plantas com resistência cruzada a até cinco herbicidas (GREEN et al., 2014; NATURE, 2014; MAHLER et al., 2017).

Dessa forma, muitas associações de herbicidas estão sendo estudadas para que se possa identificar os efeitos fitotóxicos de sua possível aplicação, tendo em vista os relatos de resistência de plantas daninhas a uma variedade de herbicidas (OLIVEIRA NETO et al., 2011; NONEMACHER et al., 2017; KRENCHINSKI, 2018). Dentre estas misturas, destaca-se no cenário brasileiro, a associação entre os herbicidas glifosato e atrazina, para cultivares de milho transgênico. De acordo com Bonfleur et al. (2015), esta mistura propicia, durante todo o ciclo desta cultura, o melhor custo/benefício no controle das plantas daninhas.

Pignati et al. (2017), realizaram um estudo abordando os princípios ativos mais utilizados em culturas agrícolas brasileiras. Os autores relatam que em culturas de milho, os princípios ativos, em L.ha<sup>-1</sup>, mais empregados foram os herbicidas atrazina (3,55) e glifosato (0,4), seguidos de clorpirifós (0,25), metomil (0,2), tebutiuram (0,2), dentre outros. Além disso, em culturas de soja, o herbicida glifosato destaca-se como o mais utilizado (5,5), seguido por 2,4-D (1), metolaclopr (0,7), tebutiuram (0,6), dentre outros. Um estudo dos agrotóxicos mais empregados na cultura do café na Zona da Mata de Minas Gerais também destacou a atrazina como um dos herbicidas de maior consumo anual e de maior potencial de contaminação de águas superficiais (SOARES et al., 2012).

Ambos os herbicidas, atrazina e glifosato, já foram detectados em amostras ambientais de um mesmo local (ALONSO et al., 2018; MONTIEL-LEÓN et al., 2019). Nesse sentido, os riscos de contaminação ambiental são aumentados, principalmente na proximidade de ecossistemas agrícolas e ambientes aquáticos (MOREIRA, 2017), tendo em vista que nos processos de pulverização, algumas névoas atingem o solo, outras evaporam ou são levadas pelo vento ou pela chuva para locais não-alvo. A

magnitude destes efeitos é influenciada por uma série de variáveis, podendo ser desde características do produto e condições climáticas até o manuseio do aplicador (MACIEL, 2016). Não há um valor real sobre as perdas obtidas na aplicação de pesticidas, entretanto, de acordo com a ABRASCO (2015), mesmo quando utilizados equipamentos de pulverização com calibração e na presença de temperatura e ventos ideais, estima-se que apenas aproximadamente 32% dos agrotóxicos ficam retidos nas plantas alvo, sendo 19% espalhados pelo ar em áreas circunvizinhas, e 49% perdidos no solo, o que implica na evaporação e lixiviação dos mesmos com o passar do tempo (ALONSO et al., 2018).

As informações toxicológicas de agrotóxicos são necessárias quando na elaboração de rótulos e bulas dos respectivos produtos. Dentre as referências, devem ser apresentados subsídios baseados na toxicocinética, que caracteriza o estudo do movimento de uma determinada substância química, abrangendo as fases de absorção, distribuição, armazenamento, biotransformação e eliminação do agente tóxico, e na toxicodinâmica, caracterizada como o estudo das interações biológicas através das quais o toxicante exerce seu efeito tóxico ao organismo (ANVISA, 2018). Ainda relacionado aos agrotóxicos, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, apresenta um manual referente a avaliação ecotoxicológica dos produtos registrados no Brasil, com o intuito de estabelecer recomendações para prevenir e dimensionar os perigos ao meio ambiente (IBAMA, 2009).

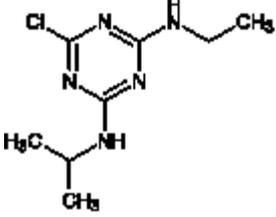
### 3.1.1 Atrazina

O herbicida atrazina, que faz parte do grupo químico das triazinas, é um dos pesticidas mais utilizados no mundo, sendo as principais culturas que recebem sua aplicação o milho, a cana-de-açúcar e o trigo. Em função da sua eficácia no controle seletivo de plantas daninhas sem trazer prejuízos para as plantações (BRODEUR et al., 2013; SINGH et al., 2017), a aplicação deste herbicida ocorre em plantas daninhas de folhas largas, podendo ser realizada tanto em pré quanto em pós-emergência, e atuando de forma a bloquear a atividade do transporte de elétrons no sistema fotossintético II, acarretando na morte da planta alvo (GRAYMORE; STAGNITTI; ALLINSON, 2001; ANDRADE et al., 2019).

Preferencialmente, a atrazina é aplicada em solos úmidos, em períodos pós-chuvosos para intensificar sua atuação. Dessa forma, sua lixiviação para águas subterrâneas e/ou seu escoamento superficial são favorecidos, principalmente se após a sua aplicação também houver ocorrência de pluviosidade (GRAYMORE; STAGNITTI; ALLINSON, 2001). O Quadro 1 apresenta características físico-químicas do herbicida atrazina.

Considerando sua ampla utilização, surge a preocupação relacionada à alta persistência e mobilidade desta substância em variados compartimentos ambientais, uma vez que esta possui alto potencial para a contaminação do solo e de águas superficiais e subterrâneas (ANDRADE et al., 2019).

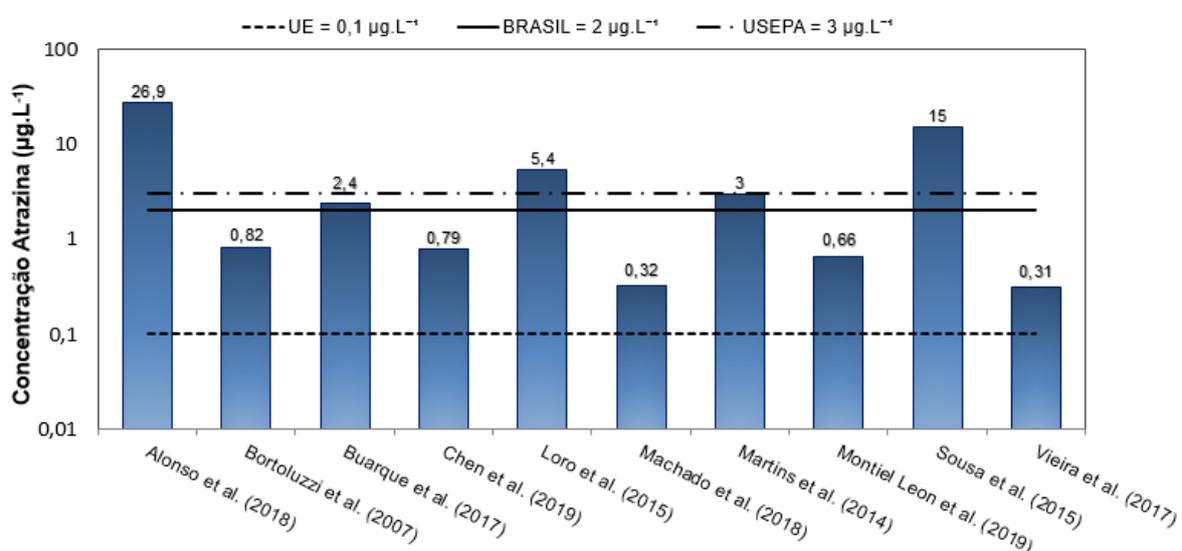
**Quadro 1:** Características físico-químicas do herbicida atrazina.

<b>Atrazina</b>	
<b>Nome IUPAC</b>	6-chloro-4-N-ethyl-2-Nisopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine
<b>CAS número</b>	1912-24-9
<b>Estrutura química</b>	 <chem>CC(C)NC1=NC(Cl)=NC(=N1)NCC</chem> $C_8H_{14}ClN_5$
<b>Peso molecular</b>	215,68 g.mol <sup>-1</sup>
<b>Classe química</b>	Clorotriazinas
<b>Solubilidade em água (25 °C)</b>	33 mg.L <sup>-1</sup>
<b>Constante de dissociação (pKa)</b>	1,60
<b>Pressão de vapor (25 °C)</b>	2,89x10 <sup>-7</sup> mmHg
<b>Coeficiente de partição octanol-água (log Kow)</b>	2,61

Fonte: NCBI, 2020.

Devido à sua solubilidade e a meia-vida aquática, que varia de seis meses a alguns anos, este herbicida é detectado frequentemente em recursos hídricos em concentrações muito variadas, porém, geralmente inferiores a  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  (BRAIN, 2018; STARA; KOUBA; VELISEK, 2018). A Figura 2 apresenta uma série de concentrações de relevância ambiental obtidas através de diversos estudos realizados para detecção do herbicida atrazina em amostras ambientais de diferentes locais. As concentrações apresentadas por Bortoluzzi et al. (2007), Buarque et al. (2017), Hamada (2008), Loro et al. (2015), Machado et al. (2018), Martins et al. (2014), Sousa et al. (2015), Vieira et al. (2017), referem-se a amostras detectadas no Brasil, enquanto as concentrações relatadas por Alonso et al. (2018), Chen et al. (2019) e Montiel Leon et al. (2019) referem-se a amostras detectadas na Argentina, na França e no Canadá, respectivamente.

**Figura 2:** Concentrações do herbicida atrazina obtidas através de análises de amostras ambientais. Linha tracejada indica o limite máximo de pesticidas na água para consumo humano, permitido pela União Europeia (UE), linha contínua indica o limite máximo do herbicida atrazina em águas que podem ser utilizadas para consumo humano após tratamento simplificado, permitido pela legislação brasileira (CONAMA n° 357 de 2005), e linha composta por traço seguido de ponto indica o limite máximo do herbicida atrazina em águas utilizadas para consumo humano, permitido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA).



Fonte: A autora.

Sendo assim, pode-se perceber que os relatos da presença do herbicida atrazina vem sendo recorrente, e que devido ao seu tempo de meia-vida, o resultado é um acúmulo desta substância e um aporte contínuo deste princípio ativo no

ecossistema aquático, repercutindo em efeitos aos organismos que estão constantemente em contato com este produto.

Durante o desenvolvimento inicial de espécies prioritariamente aquáticas, a exposição a concentrações subletais de atrazina é considerada um risco, devido às suas características de desregulador endócrino, atingindo órgãos primários reprodutivos tanto feminino quanto masculino, como os ovários e os testículos, bem como o hipotálamo (GARCÍA-ESPIÑEIRA; TEJEDA-BENITEZ; OLIVERO-VERBEL, 2018; CLEARY, 2019). Dessa forma, torna-se importante avaliar os efeitos que este composto pode causar em organismos não alvo, tendo em vista os muitos relatos da presença deste herbicida no meio ambiente, sendo sua principal ocorrência no meio aquático, tanto em águas superficiais quanto em águas subterrâneas (GRAYMORE; STAGNITTI; ALLINSON, 2001).

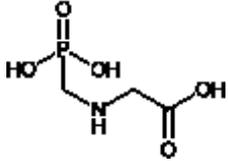
### 3.1.2 Glifosato

O herbicida glifosato, pertencente ao grupo químico das glicinas, é um dos pesticidas mais utilizados no mundo, uma vez que abrange um amplo espectro de ação, por não ser seletivo e atuar em plantas daninhas em culturas resistentes tanto em pré quanto em pós-emergência, sendo as principais culturas em que é utilizado a soja, o milho e o algodão, além de sua presença no ambiente também estar relacionada às múltiplas aplicações não agrícolas (BONFLEUR et al., 2015; BRIDI et al., 2017; PEITER, 2017; BERMAN et al., 2018).

Este herbicida atua na via do chiquimato, inibindo a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintetase, interferindo na biossíntese de aminoácidos aromáticos essenciais. Essa via biossintética não é encontrada em aves, insetos, mamíferos, peixes ou répteis, e por este motivo, acredita-se que este produto não resulte em riscos para esses organismos (BRILISAUER et al., 2019). No entanto, muitos estudos ainda buscam avaliar e responder quais são os efeitos que este herbicida causa em outros organismos (BRILISAUER et al., 2019; DORR, 2015).

O Quadro 2 apresenta as características físico-químicas deste herbicida.

**Quadro 2:** Características físico-químicas do herbicida glifosato.

<b>Glifosato</b>	
<b>Nome IUPAC</b>	<i>N</i> -(Phosphonomethyl)glycine
<b>CAS número</b>	1071-83-6
<b>Estrutura química</b>	 <chem>C3H8NO5P</chem>
<b>Peso molecular</b>	169,07 g.mol <sup>-1</sup>
<b>Classe química</b>	Organofosforados
<b>Solubilidade em água (25 °C)</b>	11,6 g.L <sup>-1</sup>
<b>Constante de dissociação (pKa)</b>	10,2
<b>Pressão de vapor (25 °C)</b>	9,8x10 <sup>-8</sup> mmHg
<b>Coefficiente de partição octanol-água (log Kow)</b>	-3,40

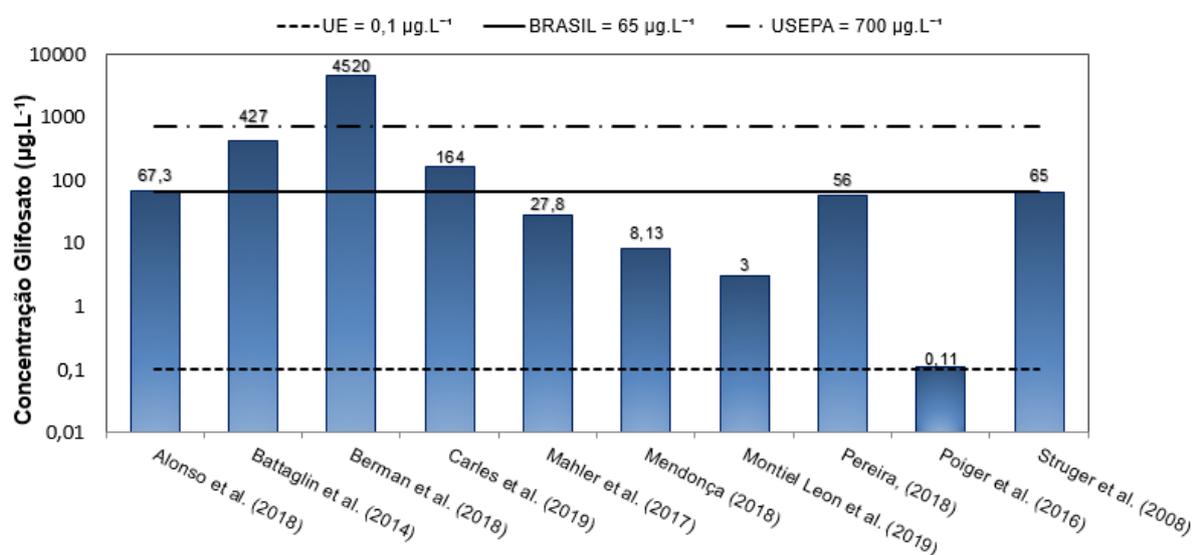
Fonte: NCBI, 2020.

Considerando sua alta solubilidade em água e afinidade de sorção em componentes do solo, como argila, seu transporte para águas superficiais é facilitado através de escoamento (MOTTIER et al., 2015; CARRETTA et al., 2019). A ocorrência deste herbicida e de seu principal produto de degradação (ácido aminometilfosfônico - AMPA) são relatadas tanto em solo, quanto em águas superficiais e subterrâneas, além de já ser verificada em diferentes níveis da cadeia alimentar (LESCANO et al., 2018; MILAN et al., 2018).

O herbicida glifosato apresenta uma taxa de degradação na água que varia de 45 a 60 dias, acarretando na sua presença e de seu principal metabólito constantemente em recursos hídricos (MOTTIER et al., 2015; BRIDI et al., 2017; CARRETTA et al., 2019). Nesse sentido, a Figura 3 apresenta uma relação de concentrações de relevância ambiental determinadas através de diversos estudos realizados para detecção do herbicida glifosato em amostras ambientais de diferentes locais. As concentrações relatadas por Mendonça (2018) e Pereira (2018), referem-se a amostras detectadas no Brasil. As concentrações relatadas por Alonso et al. (2018) e Berman et al. (2018), referem-se a amostras detectadas na Argentina. As

concentrações relatadas por Battaglin et al. (2014) e Mahler et al. (2017), referem-se a amostras detectadas nos Estados Unidos. As concentrações relatadas por Montiel Leon et al. (2019) e Struger et al. (2008), referem-se a amostras detectadas no Canadá, e as concentrações relatadas por Carles et al. (2019) e Poiger et al. (2016) referem-se a amostras detectadas na França e na Suíça, respectivamente.

**Figura 3:** Concentrações do herbicida glifosato obtidas através de análises de amostras ambientais. Linha tracejada indica o limite máximo de pesticidas na água para consumo humano, permitido pela União Europeia (UE), linha contínua indica o limite máximo do herbicida atrazina em águas que podem ser utilizadas para consumo humano após tratamento simplificado, permitido pela legislação brasileira (CONAMA n° 357 de 2005), e linha composta por traço seguido de ponto indica o limite máximo do herbicida atrazina em águas utilizadas para consumo humano, permitido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA).



Fonte: A autora.

Entretanto, a detecção deste herbicida, principalmente em baixas concentrações, é dificultada devido a sua característica polar, dessa forma, o método de derivatização é empregado com o intuito de reduzir seu caráter polar, permitindo uma melhor separação para determinação cromatográfica (CARRETTA et al., 2019). Além disso, as detecções e quantificações de pesticidas são influenciadas por fontes pontuais de poluição, e ainda pelos períodos de aplicações, nos quais as concentrações são muito variáveis (MOTTIER et al., 2015).

Cabe salientar que os valores apresentados para as concentrações ambientais dos herbicidas avaliados são valores de concentrações passíveis de realizar a detecção e quantificação. Valores abaixo dos limites de detecção e

quantificação dos equipamentos devem ser mais frequentes, porém, são imensuráveis diante dos equipamentos empregados.

### 3.2 ECOTOXICOLOGIA

A ecotoxicologia é a ciência que permite avaliar os efeitos de substâncias químicas ou naturais sobre organismos, populações ou comunidades nos ecossistemas aos quais estão inseridos, bem como, suas interações com o ambiente (ZAGATTO, 2015; OLIVEIRA et al., 2019). Esta ciência apresenta resultados que visam diagnosticar a qualidade ambiental e realizar previsões de impactos ao meio ambiente, para tanto, organismos representativos dos diferentes compartimentos ambientais podem ser utilizados em testes ecotoxicológicos, com o objetivo de identificar os efeitos de variadas substâncias sobre eles (CESAR; SILVA; SANTOS, 1997; OLIVEIRA et al., 2019).

Organismos sensíveis a uma variedade de compostos químicos são utilizados em ensaios ecotoxicológicos, sendo que, essa sensibilidade deve ser mantida relativamente constante, para obtenção de resultados precisos (SILVA; POMPÊO; PAIVA, 2015). Basicamente, os métodos de avaliação da ecotoxicidade são realizados a partir dos mesmos princípios, nos quais os organismos-teste são submetidos às amostras as quais deseja-se avaliar a ecotoxicidade, por um período determinado de tempo. Passado o período de exposição, os efeitos são observados e representados de acordo com a metodologia dos ensaios ecotoxicológicos empregados (BERTOLETTI, 2013).

Os resultados de estudos ecotoxicológicos podem fornecer subsídio para o desenvolvimento de políticas públicas que prezem a manutenção dos recursos naturais, além de possibilitarem a realização de análises de impactos ambientais acerca de novos produtos (SILVA; POMPÊO; PAIVA, 2015). Nesse sentido, as alterações ocorridas em ecossistemas são geralmente resultantes de uma exposição direta ao agente tóxico, gerando efeitos agudos, ou ainda podem decorrer de implicações subletais, resultando em efeitos crônicos. Além disso, testes de ecotoxicidade também são realizados com o intuito de identificar efeitos genotóxicos ao organismo exposto, possíveis alterações metabólicas, bem como, suas consequências em longo prazo (ARANHA, 2013).

### 3.2.1 Testes de Sensibilidade

Os testes de sensibilidade são ensaios realizados com o objetivo de estabelecer um acompanhamento quanto à sensibilidade dos organismos utilizados nos ensaios ecotoxicológicos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Além disso, são empregados para garantir que os organismos se encontrem em condições aceitáveis de sensibilidade, e considerados viáveis para a realização dos testes de ecotoxicidade (NBR 12.713) (ABNT, 2016). Através da realização destes testes de forma periódica, um controle da sensibilidade é elaborado, sendo a substância de referência utilizada escolhida com critério, considerando os potenciais riscos ao meio ambiente e à saúde humana (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

### 3.2.2 Ecotoxicidade Aguda

Em testes de ecotoxicidade aguda são verificados os efeitos após uma exposição de curto espaço de tempo ao agente tóxico. Nestes testes avalia-se a resposta rápida dos organismos aquáticos a um determinado estímulo, o qual geralmente se manifesta em um intervalo de 0 a 96 horas, sendo observado como efeitos a letalidade ou outra manifestação que a anteceda, como a imobilidade do organismo-teste. A resposta obtida em testes agudos pode ser expressa na concentração efetiva ( $CE_{50}$ ) que causa mortalidade ou imobilidade a 50% dos organismos-teste expostos no período de observação (BERTOLETTI, 2013; CESAR; SILVA; SANTOS, 1997).

### 3.2.3 Ecotoxicidade Crônica

Quando uma substância não apresenta efeitos sob exposição aguda não indica que esta não seja tóxica para o organismo-teste, pois os efeitos podem aparecer após um período maior de exposição (COSTA et al., 2008). Em testes de ecotoxicidade crônica são avaliados os efeitos de um estímulo que permanece por um longo período de tempo, podendo abranger parte do ciclo de vida ou a totalidade da vida do organismo-teste (HAMADA, 2008). Esses efeitos são, de maneira geral, subletais e observados em situações onde os organismos ficam expostos às concentrações do agente tóxico que permitem sua sobrevivência, porém, afetam suas

funções biológicas, interferindo em sua reprodução, crescimento e comportamentos gerais (CESAR; SILVA; SANTOS, 1997).

Os ensaios crônicos são métodos mais onerosos, devido ao maior tempo de exposição e a renovação contínua das soluções de teste, entretanto, são mais adequados para estimar a toxicidade, uma vez que os organismos existentes no ambiente estão sujeitos a presença constante de inúmeros compostos em faixas de concentrações variadas (COSTA et al., 2008; XIONG et al., 2018).

Para a realização de ensaios ecotoxicológicos é recomendada a utilização de mais de um organismo-teste, pertencentes a diferentes níveis tróficos, para identificar o método de avaliação mais sensível aos efeitos da amostra ambiental (SILVA; POMPÊO; PAIVA, 2015).

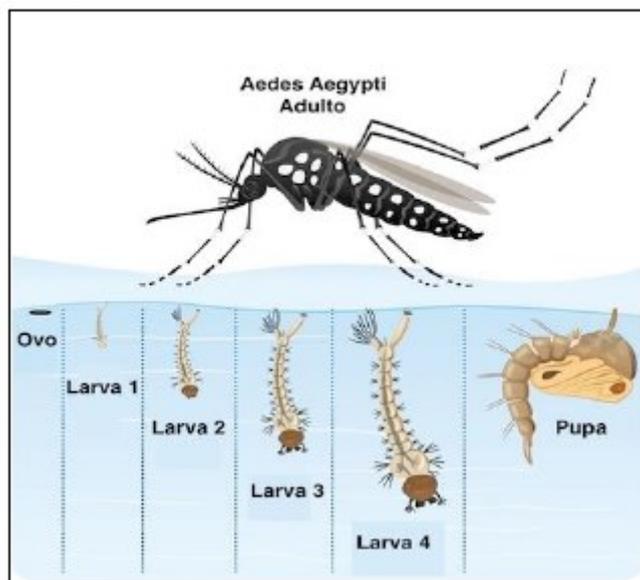
#### 3.2.4 *Aedes aegypti*

Os mosquitos são caracterizados por transmitirem uma série de patógenos, e dessa forma, inseticidas químicos são utilizados para o seu controle. No entanto, as interações entre os xenobióticos presentes no ambiente, e como estas interações podem aumentar a tolerância dos mosquitos a diferentes inseticidas ainda não são bem definidas (RIAZ et al., 2009; MORALES et al., 2011). Para avaliação destes efeitos ambientais, algumas espécies de mosquitos são utilizadas, por apresentarem elevada capacidade de dispersão e adaptação ao meio (SILVA et al., 2018).

O ciclo de vida de mosquitos da espécie *Aedes aegypti* abrange o período de alimentação e crescimento, onde após a eclosão dos ovos, as larvas apresentam quatro estágios evolutivos, até atingirem o estágio de pupa, seguido da fase do mosquito adulto, conforme representado na Figura 4, sendo que a duração destas fases depende de alguns fatores ambientais como a temperatura, a demanda de alimento e a quantidade de larvas no recipiente (INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2017).

Atualmente não se tem conhecimento suficiente sobre como a exposição a pesticidas agrícolas afeta o ciclo de vida dos mosquitos (BARA; MONTGOMERY; MUTURI, 2014). Dessa forma, para os ensaios ecotoxicológicos com *Aedes aegypti* são utilizados ovos sadios, cultivados em laboratório, e os organismos empregados devem estar entre as fases 3 e 4, antes do estágio de pupa (UTZIG, 2019).

**Figura 4:** Representação do ciclo de vida de organismos *Aedes aegypti*, compreendendo os estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e mosquito adulto.



Fonte: OUVENEY, 2017.

Embora estes mosquitos sejam suscetíveis à exposição a concentrações subletais de herbicidas durante o desenvolvimento imaturo, o impacto potencial destas moléculas na ecologia e no comportamento do mosquito ainda não é conhecido (BARA; MONTGOMERY; MUTURI, 2014).

Testes ecotoxicológicos empregando *Aedes aegypti* como bioindicador podem ser mais explorados, tendo em vista que seus estágios de desenvolvimento já são bem conhecidos, seu cultivo em laboratório é fácil e de baixo custo, além de seu ciclo de vida ser rápido e incluir uma fase de desenvolvimento aquática (PARK et al., 2010; MORALES et al., 2011; OUVENEY, 2017).

### 3.2.5 *Allium cepa*

O ensaio de ecotoxicidade empregando *Allium cepa* como bioindicador é muito utilizado por ser considerado confiável para o biomonitoramento de parâmetros como citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade envolvendo diferentes substâncias químicas (VENTURA, 2004; LIMA et al., 2019). A citotoxicidade relaciona-se ao índice mitótico, enquanto a genotoxicidade refere-se ao índice de alterações cromossômicas, e a mutagenicidade ao índice mutagênico, caracterizado pela formação de micronúcleos (FROTA et al., 2019).

A partir deste sistema teste realiza-se a avaliação de efeitos clastogênicos e aneugênicos sobre o material genético, sendo o efeito clastogênico relacionado a indução de quebras cromossômicas durante a divisão celular e o efeito aneugênico relacionado a separação cromossômica anormal (BRAGA; LOPES, 2015; JUNQUEIRA, 2006; RODRÍGUEZ et al., 2015).

Dentre os parâmetros que podem ser observados na realização deste ensaio estão as mudanças observadas nas raízes, como a cor, a textura, a espessura e o comprimento (macroscópicos), e o aparecimento de anormalidades e irregularidades na estrutura dos cromossomos, como atrasos, aderências, pontes, fragmentações e perdas cromossômicas, e micronúcleos (microscópicos), os quais indicam distúrbios no processo de divisão celular resultando em mudanças no conteúdo celular (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007; MERCADO; CALEÑO, 2020; VENTURA, 2004).

A sensibilidade na avaliação de diversas concentrações em diferentes condições de teste são fatores que tornam este ensaio recomendado, devido a sua característica cinética de proliferação, uma vez que no desenvolvimento do meristema apical das raízes de *Allium cepa* a divisão mitótica ocorre de forma rápida, resultando no rápido crescimento das raízes, associada ao grande número de células em divisão (PORTIS et al., 2016).

### 3.2.6 *Daphnia magna*

Espécies do gênero *Daphnia* são frequentemente empregadas como fonte de alimento para peixes, além de serem muito utilizadas como indicadores em bioensaios ecotoxicológicos, e recomendadas para a avaliação relacionada a agroquímicos (NAKAGOME; NOLDIN; RESGALLA, 2006).

O microcrustáceo *Daphnia magna* Straus 1820 (Cladocera, Crustacea), é um organismo planctônico natural de água doce, com tamanho médio de 5 a 6 mm e seu ciclo de vida é de aproximadamente 60 dias, o qual pode variar de acordo com a temperatura, sendo sua maturidade sexual alcançada de 6 a 8 dias após o nascimento (BASTOS, 2013). Este microcrustáceo participa da cadeia alimentar aquática como consumidor primário, alimentando-se através da filtração de material orgânico particulado, prioritariamente algas unicelulares. Quando em condições

ambientais favoráveis, sua reprodução é partenogenética, na qual são originadas apenas fêmeas (KNIE; LOPES, 2004).

Tendo em vista as características relacionadas ao seu curto ciclo de vida, ao tamanho pequeno e aos procedimentos de manuseio simples, esse organismo destaca-se na realização de testes de ecotoxicidade de curto espaço de tempo e baixos custos (CRUZEIRO et al., 2017). Além disso, espécies de *Daphnia* são consideradas modelos para testes ecotoxicológicos por possuírem corpo transparente, facilitando a observação da sua anatomia interna, e por serem muito sensíveis a mudanças e estressores ambientais (LEE et al., 2019). A escolha deste organismo-teste também se fundamenta principalmente por seus descendentes serem geneticamente idênticos, assegurando certa uniformidade de respostas aos ensaios, implicando em uma maior confiabilidade quanto aos resultados obtidos (KNIE; LOPES, 2004; LIU; DING; NIE, 2019).

### 3.2.7 *Rhamdia quelen*

Dentre as vantagens do uso de peixes como organismos bioindicadores está sua capacidade de representar a qualidade de um ambiente aquático, pois manifestam tensões diretas e indiretas causadas neste ecossistema (PERSCH et al., 2017).

*Rhamdia quelen* é um peixe onívoro encontrado em rios da América do Sul e Central (MELA et al., 2013; AZEVEDO LINHARES et al., 2018). Devido a sua relevância econômica, uma vez que é amplamente consumido pela população humana, sua reprodução artificial é bem definida, permitindo que pesquisas ecotoxicológicas com embriões/larvas e peixes adultos sejam acessíveis (BARRERA, 2013; AZEVEDO LINHARES et al., 2018).

Considerado um peixe de grande potencial na aquicultura, representa um importante modelo para avaliação de efeitos de xenobióticos em uma espécie nativa, sendo utilizado para uma variedade de estudos sobre a sua biologia, seu desenvolvimento embrionário, sua fisiologia reprodutiva, além de larvicultura e resposta a multiestressores (BARRERA, 2013; ASSIS et al., 2018).

O uso deste organismo como bioindicador ainda se justifica pela quantidade de informações disponíveis e seu fácil cultivo, aliado ao fato de que em seu período de desenvolvimento embriolarval, considerado um período crítico devido a sua

vulnerabilidade, podem ser avaliados diversos parâmetros, como sobrevivência, deformações morfológicas e biomarcadores bioquímicos (AZEVEDO LINHARES et al., 2018).

### 3.3 BIOMARCADORES

Em termos ecotoxicológicos, os biomarcadores são definidos como indicadores sensíveis de respostas biológicas rápidas, que refletem efeitos tóxicos e perturbações devido a presença de compostos dispersos no ambiente (PEAKALL, 1994; XIONG et al., 2018). Dentre suas características de destaque, os biomarcadores permitem identificar interações entre contaminantes e organismos vivos, além de possibilitarem a mensuração dos efeitos subletais (XIONG et al., 2018).

Buscando compreender os efeitos biológicos, em virtude do crescente aporte de poluentes que alteram as funções ecossistêmicas, os biomarcadores apresentam-se como alternativas funcionais na avaliação da ecotoxicidade e no monitoramento de uma diversidade de compostos estressores ambientais (RODRIGUES et al., 2011; BRITO et al., 2012; SANTANA et al., 2018).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde – WHO (1993), os biomarcadores podem ser classificados em:

- Biomarcadores de exposição, os quais estimam a biodisponibilidade de uma substância exógena, seu metabólito ou o produto de uma interação entre um agente xenobiótico e alguma molécula ou célula alvo em um organismo exposto;
- Biomarcadores de efeito, os quais fornecem informações quanto a alterações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais, mensuráveis em um organismo exposto, ainda sendo caracterizados por serem reversíveis, quando o estressor cessar sua ação;
- Biomarcadores de suscetibilidade, os quais indicam a capacidade inerente ou adquirida de um organismo responder ao efeito da exposição a uma substância xenobiótica específica.

Outras classificações ainda podem estar relacionadas a biomarcadores de enzimas de biotransformação, de alteração de proteínas reguladoras, de disrupção endócrina e reprodutiva, de genotoxicidade, de metabolismo energético, de neurotoxicidade, de estresse oxidativo, histopatológicos e comportamentais (PEAKALL, 1992).

As enzimas de biotransformação destacam-se entre os biomarcadores mais sensíveis, uma vez que alterações nas suas atividades, como indução ou inibição, podem ser identificadas após a exposição dos organismos a compostos xenobióticos (BITENCOURT et al., 2011). Dessa forma, as reações catalisadas por enzimas responsáveis pela bioconversão de xenobióticos são normalmente segregadas em fase I e II, onde a fase I envolve reações de hidrólise, oxidação e redução dos compostos xenobióticos, e a fase II envolve a conjugação dos xenobióticos ou de seus metabólitos com açúcares, aminoácidos ou glutathione (BITENCOURT et al., 2011; VELÍK et al., 2004; OLIVEIRA, 2014).

Outro grupo que se destaca entre os biomarcadores avaliados em estudos ecotoxicológicos envolve parâmetros de estresse oxidativo, tendo em vista a grande diversidade de compostos tóxicos ou de seus metabólitos presentes no ambiente (XIONG et al., 2018). O estresse oxidativo ocorre devido ao desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (ERO) e os sistemas antioxidantes, sendo que, quando um sistema antioxidante se encontra debilitado podem ser verificados danos em biomoléculas como DNA, lipídeos e proteínas (BARATA et al., 2005; SANTANA et al., 2018; MAHAPATRA et al., 2019). Os sistemas antioxidantes de defesa incluem enzimas como catalase (CAT), glutathione S-transferases (GSTs) e superóxido-dismutase (SOD) (YANG et al., 2019).

Além disso, parâmetros neurotóxicos também assumem um papel importante na análise de biomarcadores. As colinesterases são as enzimas de maior relevância quando consideradas as funções neurais, sendo sua inibição amplamente estudada especificamente para pesticidas organofosforados e carbamatos (OSORIO et al., 2013; XIONG et al., 2018).

Em avaliações ecotoxicológicas, os biomarcadores mais empregados são acetilcolinesterase (AChE) (BARATA et al., 2001), catalase (CAT) (KIM et al., 2010), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST) (BARATA et al., 2005).

Em estudos ecotoxicológicos geralmente são avaliados um conjunto de biomarcadores, buscando inferir de forma abrangente e complementar os efeitos nos organismos-teste, além de reduzir interpretações errôneas quando em situações de poluição complexas (MOREIRA, 2017; OLIVEIRA, 2014; SANTANA et al., 2018). Dessa forma, a utilização de biomarcadores permite observar de forma antecipada a existência de contaminação por compostos tóxicos, bem como identificar a magnitude desta contaminação, prever seu grau de severidade com relação aos efeitos

causados e identificar espécies em risco de contaminação (BRANDÃO et al., 2011). Por meio da quantificação das atividades enzimáticas envolvidas em processos fisiológicos, pode-se compreender os efeitos relacionados à neurotransmissão, desintoxicação, respiração e respostas antioxidantes (BRITO et al., 2012; OLIVEIRA, 2014; SANTANA et al., 2018; LIU; DING; NIE, 2019).

Dentre os biomarcadores bioquímicos mais empregados em ensaios ecotoxicológicos a acetilcolinesterase (AChE) desenvolve uma função central no mecanismo de neurotransmissão, uma vez que promove a clivagem do neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético. Quando esta enzima é inibida, ocorre o bloqueio na transmissão de impulsos nervosos, resultando em efeitos agudos como a paralização das funções vitais (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016). A enzima AChE é sensível a exposição de pesticidas organofosforados e carbamatos, sendo a sua atividade empregada como biomarcador de efeito, com o intuito de verificar efeitos primários de contaminação ambiental a estes compostos (PAYNE et al., 1996; OSORIO et al., 2013).

Enzimas metabólicas e antioxidantes como a glutathione S-transferase (GST), são consideradas biomarcadores de estresse oxidativo para uma série de contaminantes em uma variedade de organismos, tendo em vista que sua indução representa uma resposta específica a xenobióticos, pois estas enzimas catalisam a conjugação de substratos com a glutathione reduzida (GSH) (KEEN; HABIG; JAKOBY, 1976; OSORIO et al., 2013). Dentre as enzimas antioxidantes, a catalase (CAT) é utilizada frequentemente como biomarcador do estresse oxidativo para uma variedade de organismos que reagem a diversos contaminantes, como os pesticidas (XIONG et al., 2018). Esta enzima é responsável por catalisar a dismutação de moléculas de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e por realizar a peroxidação quando seu comportamento é apenas como acceptora de elétrons (AHMAD, 1995). A superóxido dismutase (SOD), juntamente com a catalase (CAT), são enzimas que atuam para converter a produção de ERO em metabólitos inofensivos. Através da SOD, o peróxido de hidrogênio gera a catalisação de radicais superóxidos, que posteriormente degrada-se em água e oxigênio molecular através da CAT (YANG et al., 2019).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 5 apresenta um resumo dos organismos-teste utilizados nos ensaios ecotoxicológicos e os respectivos parâmetros avaliados para determinação da toxicidade dos padrões analíticos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura, em concentrações de relevância ambiental.

**Figura 5:** Organismos-teste utilizados nos ensaios ecotoxicológicos e os respectivos parâmetros avaliados.

<i>Aedes aegypti</i>	<i>Allium cepa</i>	<i>Daphnia magna</i>	<i>Rhamdia quelen</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Imobilidade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citotoxicidade</li> <li>• Genotoxicidade</li> <li>• Mutagenicidade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Imobilidade</li> <li>• Sobrevivência</li> <li>• Primípara</li> <li>• Reprodução</li> <li>• Biomarcadores bioquímicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sobrevivência</li> <li>• Deformidades morfológicas</li> <li>• Biomarcadores bioquímicos</li> </ul>

Fonte: A autora.

### 4.1 SOLUÇÕES TESTE

As soluções estoque dos padrões analíticos de atrazina (CAS nº 1912-24-9, Sigma Aldrich, pureza  $\geq 98\%$ ) e glifosato (CAS nº 1071-83-6, Sigma Aldrich, pureza  $\geq 98\%$ ) foram preparadas em água processada por osmose reversa, nas concentrações de 20 e 500 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. As soluções estoque dos produtos comerciais dos herbicidas atrazina (formulação comercial contendo 40% do ingrediente ativo atrazina m/v, 66% outros ingredientes m/v) e glifosato (formulação comercial contendo 48% do princípio ativo glifosato m/v, 35,56% equivalente ácido m/v, 68,39% outros ingredientes m/v) foram preparadas baseando-se na quantidade do ingrediente ativo, na concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup> em água processada por osmose reversa. Após preparadas, estas soluções foram mantidas refrigeradas (4 °C) durante toda a realização dos ensaios.

As concentrações avaliadas nos ensaios ecotoxicológicos foram definidas com base nos valores de concentrações ambientais relatados nos estudos apresentados nas Figuras 2 e 3. Dessa forma, foram definidas como concentrações-

teste: 2 e 25  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para atrazina (ATZ), e 65 e 160  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para glifosato (GF), além da mistura (MIX) das menores (2 e 25  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e maiores (65 e 160  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) concentrações de atrazina e glifosato, tanto para os padrões analíticos (PA), quanto para os produtos comerciais (COM). Ressalta-se que para o preparo das misturas seguiu-se a ordem de adicionar primeiramente o herbicida atrazina e em seguida o herbicida glifosato.

#### 4.2 TESTE DE ECOTOXICIDADE AGUDA UTILIZANDO LARVAS DE *Aedes aegypti*

A metodologia utilizada para o desenvolvimento do ensaio de ecotoxicidade aguda empregando *Aedes aegypti* foi baseada em Lima (2017) e Ferreira (2018), de acordo com o protocolo da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1981), com algumas modificações de acordo com Utzig et al. (2019).

Para tanto, foram utilizados ovos sadios dos organismos *Aedes aegypti* (linhagem Rockefeller), gentilmente cedidos pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores do Instituto Oswaldo Cruz, os quais foram adicionados a 500 mL de água mineral e mantidos em incubadora do tipo BOD com temperatura ( $28 \pm 2$  °C) e fotoperíodo (16 horas luz/8 horas escuro) controlados. Os mesmos foram alimentados com ração para peixe (Alcom Basic®). Cerca de 96 horas após a eclosão dos ovos, as larvas iniciaram o 4º estágio (Figura 4), o qual é definido com base no desenvolvimento do abdômen, do sifão respiratório, da papila anal e do tórax. Neste momento, as larvas foram selecionadas para exposição aguda aos padrões analíticos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura, nas concentrações apresentadas no Quadro 3, além de um controle negativo, utilizando apenas água processada com sistema de osmose reversa.

O teste foi composto por quatro réplicas, onde 20 larvas foram expostas por béquer (50 mL) contendo 25 mL de solução teste. Os organismos foram incubados por um período de 24 horas, sem alimentação e com temperatura controlada de  $23 \pm 2$  °C, sem fotoperíodo. Após o período de exposição, a imobilidade dos organismos foi observada, a olho nu, com o objetivo de determinar se as concentrações de relevância ambiental testadas eram concentrações subletais, visando a posterior realização de ensaios para avaliação de biomarcadores bioquímicos.

**Quadro 3:** Grupos avaliados no ensaio de toxicidade aguda empregando larvas de *Aedes aegypti* e suas respectivas concentrações.

Grupo	Concentração
Atrazina padrão analítico (ATZPA 2)	2 µg.L <sup>-1</sup>
Glifosato padrão analítico (GFPA 65)	65 µg.L <sup>-1</sup>
Atrazina + glifosato padrão analítico (MIXPA 2+65)	2+65 µg.L <sup>-1</sup>
Atrazina produto comercial (ATZCOM 2)	2 µg.L <sup>-1</sup>
Glifosato produto comercial (GFCOM 65)	65 µg.L <sup>-1</sup>
Atrazina + glifosato produto comercial (MIXCOM 2+65)	2+65 µg.L <sup>-1</sup>
Atrazina padrão analítico (ATZPA 25)	25 µg.L <sup>-1</sup>
Glifosato padrão analítico (GFPA 160)	160 µg.L <sup>-1</sup>
Atrazina + glifosato padrão analítico (MIXPA 25+160)	25+160 µg.L <sup>-1</sup>
Atrazina produto comercial (ATZCOM 25)	25 µg.L <sup>-1</sup>
Glifosato produto comercial (GFCOM 160)	160 µg.L <sup>-1</sup>
Atrazina + glifosato produto comercial (MIXCOM 25+160)	25+160 µg.L <sup>-1</sup>

Fonte: A autora.

#### 4.3 TESTE DE CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE EMPREGANDO SEMENTES DE *Allium cepa* COMO ORGANISMOS-TESTE

Para o ensaio utilizando *Allium cepa* como bioindicador, foi utilizada a metodologia descrita por Guerra e Souza (2002) e Leme e Marin-Morales (2008). Sementes comerciais da variedade *Baia periforme*, com índice de germinação de 94%, livre de defensivos, foram utilizadas. Estas foram submetidas a um processo de seleção para verificar sua viabilidade, onde foram adicionadas a um banho de hipoclorito (0,1%), por 10 minutos. As sementes que permaneceram submersas foram submetidas a três banhos com água processada por osmose para remoção do hipoclorito, e foram selecionadas para utilização no ensaio (RODRIGUES, 2016). Ainda, com o intuito de evitar a contaminação, as placas de Petri utilizadas, juntamente com os papéis filtro foram submetidas à radiação ultravioleta por 15 minutos em fluxo laminar.

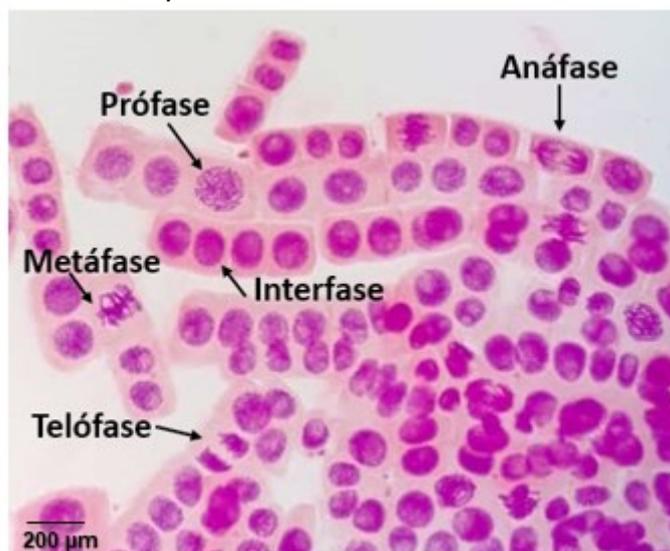
Para tanto, o ensaio foi realizado em duplicata (n=40), onde 20 sementes foram distribuídas equidistantemente em placas de Petri, sobre papel-filtro embebido com 4 mL das soluções teste correspondentes aos padrões analíticos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura, nas concentrações apresentadas no Quadro 3, além de um controle negativo contendo apenas água processada por osmose reversa, e um controle positivo composto pelo agente mutagênico metil metanosulfonato - MMS (CAS 66-27-3, Sigma-Aldrich, pureza  $\geq 99\%$ ) na concentração de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ .

As placas de Petri foram envolvidas com papel filme e incubadas a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  até as raízes atingirem aproximadamente 2 cm de comprimento, este período teve duração de 96 horas. Após o período de crescimento, as raízes foram coletadas e fixadas em Fixador Carnoy (álcool:ácido acético - 3:1), por 6 horas em temperatura ambiente ( $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Em seguida, as raízes foram lavadas com água processada por osmose reversa por 5 minutos em três repetições, e transferidas para frascos contendo  $\text{HCl } 1 \text{ mol.L}^{-1}$  mantidos em banho-maria a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , para realização do processo de hidrólise. A hidrólise foi interrompida após 10 minutos, com as sementes sendo transferidas para placas contendo água processada por osmose reversa. Após a lavagem, que consistiu novamente em três banhos de 5 minutos, as raízes foram transferidas para frascos contendo reativo de Schiff, onde permaneceram por 2 horas protegidas da luz. Decorrido este período, as sementes foram adicionadas novamente a água processada por osmose reversa, onde permaneceram até a confecção das lâminas.

Foram confeccionadas 10 lâminas por tratamento, sendo que, para o preparo das lâminas utilizou-se a região meristemática, a qual corresponde a extremidade das raízes, e carmim (CAS 1390-65-4, Sigma-Aldrich) acético 2% foi utilizado como corante. As lâminas foram fixadas utilizando nitrogênio líquido, onde as mesmas foram mergulhadas por 15 segundos e imediatamente as lamínulas foram retiradas, após fixadas, as lâminas permaneceram em temperatura ambiente ( $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) até a secagem. Por último, uma gota de bálsamo do Canadá (B1001-08-BG, Synth) foi adicionada às lâminas, que foram recobertas com lamínula. Após 24 horas de secagem das lâminas, a leitura foi realizada em microscopia de luz, utilizando um aumento de 400x, onde 500 células foram observadas em 10 lâminas, totalizando 5000 células por tratamento.

Na análise das lâminas, foram identificadas e contabilizadas células em interfase e em processo de divisão celular mitótica: prófase, metáfase, anáfase e telófase (Figura 6).

**Figura 6:** Fases da divisão celular observadas em uma lâmina contendo amostra do meristema apical de *Allium cepa*, com aumento de 400x.



Fonte: A autora.

Também foram observadas células que apresentavam anormalidades, como irregularidades na morfologia, células polinucleadas, brotos nucleares, micronúcleos, deslocamento periférico do núcleo e fragmentação do núcleo. E analisada a presença de células mitóticas multipolares, com aderências, pontes e atrasos cromossômicos, e quebras e perdas cromossômicas. A partir dos dados observados, foi possível determinar o índice mitótico, o índice de alterações cromossômicas, o qual compreende os efeitos aneugênico e clastogênico, e o índice de mutagenicidade.

A citotoxicidade foi verificada através do índice mitótico, calculado a partir da equação (3), e corresponde a relação entre as células em divisão (NCD) e o número de células observadas (NCO).

$$\text{Índice Mitótico} = \frac{\text{NCD}}{\text{NCO}} \times 100 \text{ (Equação 3)}$$

A genotoxicidade foi verificada a partir do índice de alterações cromossômicas, calculado a partir da equação (4), que representa a relação entre a soma do número de células que apresentaram dano aneugênico (CDA) devido à perda, atraso,

aderência ou broto, e dano clastogênico (CDC) devido à quebra e/ou ponte cromossômica, pelo número de células observadas (NCO).

$$\text{Índice de Alterações Cromossômicas} = \frac{\sum \text{CDA} + \sum \text{CDC}}{\text{NCO}} \times 100 \text{ (Equação 4)}$$

Para o cálculo do índice de mutagenicidade foram considerados o número de células com presença de micronúcleos (NMN) e feita a relação por número de células observadas (NCO), como descrito na equação (5).

$$\text{Índice Mutagênico} = \frac{\text{NMN}}{\text{NCO}} \times 100 \text{ (Equação 5)}$$

#### 4.4 CULTIVO DO MICROCRUSTÁCEO *Daphnia magna*

A metodologia relacionada ao cultivo e aos testes utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna* seguiram as prescrições da NBR 12.713 (ABNT, 2016). Para tanto, o cultivo dos organismos-teste *Daphnia magna* foi realizado em béqueres de 2 L, os quais eram mantidos com um volume de 1,5 L de meio de cultivo (ANEXO A), devidamente identificados por seus lotes e respectivas datas de abertura. Cerca de 50 organismos-teste de cada lote eram incubados com temperatura controlada a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

O meio de cultivo foi renovado totalmente duas vezes por semana (segundas e sextas-feiras), e parcialmente (1/3 do meio de cultivo) nos demais dias da semana (terças, quartas e quintas-feiras), sendo as matrizes transferidas para o novo meio, e o meio antigo descartado. A troca do meio de cultivo foi realizada prioritariamente nos mesmos horários, com o objetivo de garantir que os neonatos fossem obtidos entre 2 até 26 horas de vida. A coleta dos neonatos para utilização nos bioensaios foi realizada com o auxílio de uma rede com malha de 1 mm para retenção das matrizes (*D. magna* adultas), e de 0,75 mm para retenção dos neonatos.

A alimentação dos microcrustáceos ocorreu nos mesmos dias da troca do meio de cultivo, com aproximadamente 500  $\mu\text{L}$  de suspensão celular da microalga *Desmodesmus subspicatus* ( $10^6$  células. $\text{mL}^{-1}$ ), cultivada no mesmo laboratório, seguindo a metodologia apresentada na NBR 12.648 (ABNT, 2018).

#### 4.5 TESTE DE SENSIBILIDADE PARA O MICROCRUSTÁCEO *Daphnia magna*

A estabilidade dos organismos-teste é fundamental para a confiabilidade dos resultados, tendo em vista que todos os procedimentos relacionados à cultura de dafinídeos refletem na sua sensibilidade (KNIE; LOPES, 2004). Paralelamente a manutenção das culturas, foram realizados testes de sensibilidade, em períodos que compreendiam a abertura de lotes novos e a realização de ensaios agudos.

Com o objetivo de também assegurar a confiabilidade dos dados, o sulfato de zinco heptahidratado ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) foi a substância de referência utilizada para a geração da carta-controle para os ensaios de sensibilidade (APÊNDICE A). Dentre os critérios para a escolha desta substância estavam a segurança durante sua manipulação, uma vez que não oferece riscos para os pesquisadores e para o meio ambiente.

Os testes de sensibilidade consistiram na exposição dos neonatos de *D. magna* (máximo 26 horas de vida) à substância de referência. Para isso, foram utilizados béqueres (50 mL) contendo 20 mL da solução de referência ( $1-50 \text{ mg.L}^{-1} ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) e um controle contendo apenas água de diluição (ANEXO B), onde foram adicionados 10 indivíduos em cada réplica. Este ensaio foi realizado em triplicata, sendo os recipientes cobertos com alumínio e acondicionados em incubadora BOD, sem fotoperíodo e com temperatura controlada ( $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ), por um período de 48 horas. Decorrido o período de exposição, os organismos imóveis foram contabilizados para o cálculo da  $CE_{50-48h}$ , determinada através da análise de Probitos, utilizando o Software BioStat 5.0. A carta-controle dos organismos utilizados neste trabalho foi elaborada através da realização de vinte ensaios de sensibilidade (APÊNDICE A).

#### 4.6 TESTE PRELIMINAR DE ECOTOXICIDADE AGUDA COM *Daphnia magna*

O teste preliminar de ecotoxicidade foi realizado com o intuito de confirmar se as concentrações ambientais, selecionadas para realizar os ensaios, poderiam ser consideradas subletais. Para tanto, os testes preliminares de ecotoxicidade aguda tiveram uma duração de 48 horas, onde 10 indivíduos jovens de *Daphnia magna*, com 2 até 26 horas de vida, foram colocados em recipientes contendo 20 mL das soluções testadas (Quadro 3), sendo o controle negativo composto somente por água de

diluição e o controle positivo composto pela maior concentração da mesma substância de referência utilizada nos testes de sensibilidade ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ). As concentrações avaliadas foram  $2 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  para atrazina padrão analítico e produto comercial,  $65 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  para glifosato padrão analítico e produto comercial, e também a mistura de  $2 + 65 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  de atrazina e glifosato, respectivamente, para o padrão analítico e o produto comercial.

O ensaio foi realizado de acordo com a NBR 12.713 (ABNT, 2016), um ensaio estático, sem alimentação e sem renovação do meio, e os recipientes contendo os organismos-teste ficaram incubados com temperatura controlada ( $20 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$ ) e sem fotoperíodo. Após 48 horas de exposição foi verificado, a olho nu, se houve imobilidade dos organismos em cada concentração.

#### 4.7 TESTE DE ECOTOXICIDADE CRÔNICA MULTIGERACIONAL COM *Daphnia magna*

Os testes de ecotoxicidade crônica foram realizados de acordo com os protocolos padrão (OECD, 2012), os quais tiveram duração de 21 dias e foram compostos por 12 réplicas de cada concentração avaliada. Os organismos-teste permaneceram submetidos às amostras dos padrões analíticos (PA) e produtos comerciais (COM) de atrazina ( $2 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ) e glifosato ( $65 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ) isolados, e também a mistura dos herbicidas nas mesmas concentrações, conforme ilustrado na Figura 7. O ensaio contou ainda com um controle negativo (C) composto somente pelo meio de cultivo (ANEXO A).

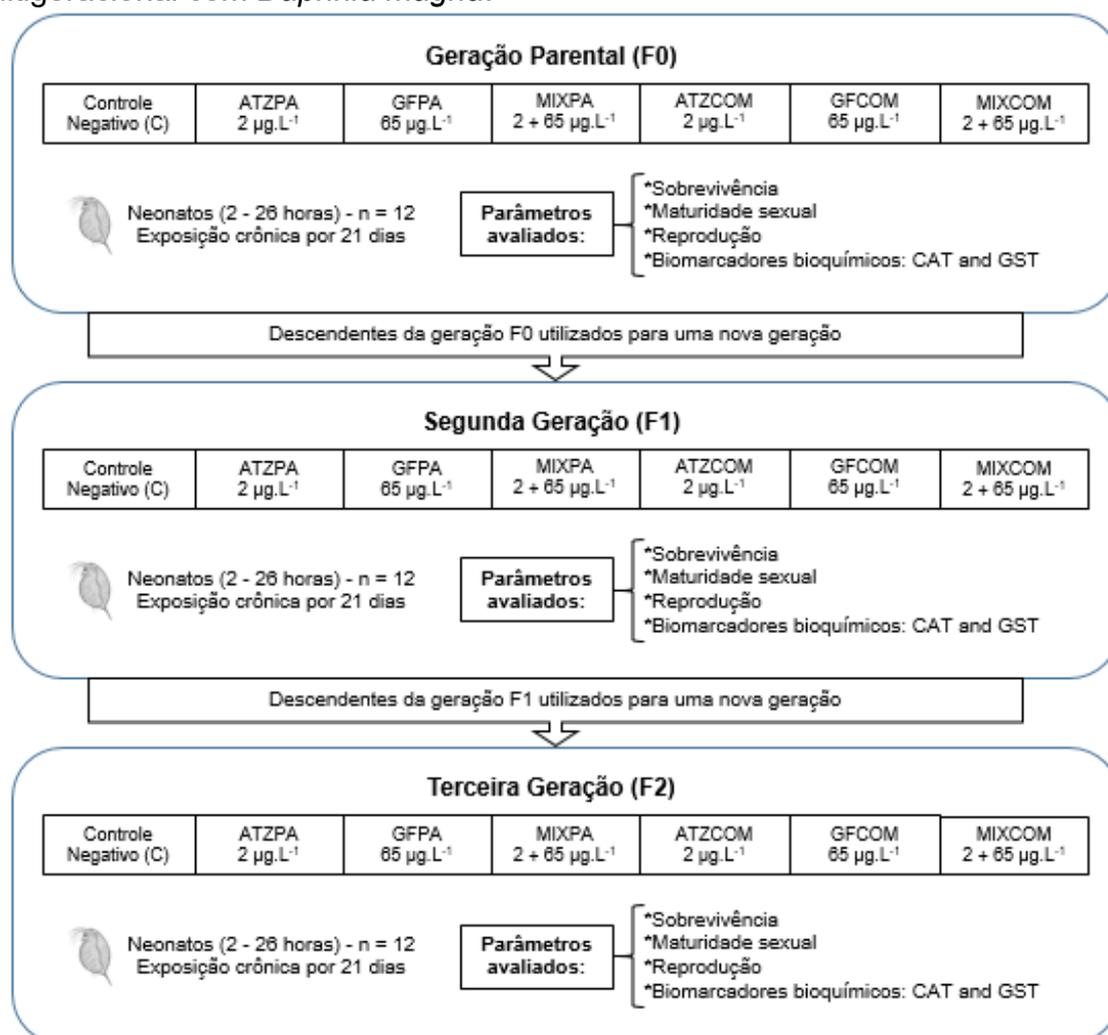
Neste ensaio, a primeira geração (F0) foi composta por um indivíduo jovem de *D. magna* (2 a 26 horas de vida) adicionado a cada um dos béqueres (50 mL) contendo 40 mL de solução-teste. Os mesmos permaneceram em incubadora BOD, onde a renovação total do meio, com soluções da mesma concentração, e a alimentação com aproximadamente 500  $\mu\text{L}$  de uma suspensão celular de *Desmodesmus subspicatus* ( $10^6 \text{ células.mL}^{-1}$ ), foram realizadas cinco vezes durante a semana, com controle de temperatura ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo (16 horas luz/8 horas escuro).

Ao longo dos 21 dias do experimento, os organismos foram verificados diariamente para avaliação da sobrevivência e do estado reprodutivo, sendo os indivíduos recém-nascidos contabilizados e descartados. Os parâmetros analisados

no teste crônico, foram a sobrevivência, a maturação sexual e a reprodução. A sobrevivência foi determinada por meio da contagem dos indivíduos adultos sobreviventes após o período de exposição de 21 dias. A maturação sexual foi determinada através da observação do início da produção de filhotes por matriz (primípara), e o parâmetro reprodução foi avaliado através da contabilização do número de filhotes produzidos por matriz no decorrer dos 21 dias do teste. Além disso, os organismos sobreviventes após a exposição crônica também foram utilizados para análise de biomarcadores bioquímicos.

Os efeitos multigeracionais foram observados quando realizada a exposição de uma nova geração pelo mesmo período e nas mesmas condições de teste. Dessa forma, a segunda geração (F1) foi composta por indivíduos jovens obtidos da primeira geração (F0). Portanto, após o período correspondente ao nascimento da terceira ninhada do grupo controle da geração F0, a geração F1 teve início. Para tanto, os neonatos da geração F0 obtidos em todas as réplicas de um mesmo grupo, foram adicionados a um mesmo recipiente, para que os organismos fossem dispostos de forma aleatória no início da nova geração. Estes neonatos permaneceram 48 horas nas mesmas condições de teste, até o momento em que foram dispostos individualmente em 12 réplicas, de acordo com os grupos correspondentes, representando a geração F1. O mesmo foi realizado para a obtenção da terceira geração (F2), onde foram utilizados indivíduos jovens obtidos da segunda geração (F1). Ao final da terceira geração ainda foi realizado um ensaio de sensibilidade com os neonatos obtidos do grupo controle, para verificar se o valor de  $CE_{50-48h}$  estaria dentro dos limites aceitáveis estabelecidos pela carta controle de sensibilidade (APÊNDICE A).

**Figura 7:** Ilustração do desenho experimental utilizado para o ensaio crônico multigeracional com *Daphnia magna*.



Fonte: A autora.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM *Daphnia magna*

Os ensaios relacionados aos biomarcadores bioquímicos em *Daphnia magna*, corresponderam a quantificação de proteínas totais e a determinação das atividades de acetilcolinesterases, catalases, glutatona S-transferases e superóxido dismutases. As absorbâncias foram determinadas em leitora de microplacas Fluostar® Omega - BMG Labtech. Esta avaliação ocorreu após a exposição de 48 e 96 horas, e após o período de 21 dias, referente a exposição crônica, para as gerações F0, F1 e F2.

As metodologias para análise de enzimas em espécies de *Daphnia* ainda não são bem definidas, portanto, com o intuito de otimizar a metodologia para a determinação dos biomarcadores bioquímicos após 48 e 96 horas de exposição,

foram avaliadas a quantidade de organismos e a quantidade de tampão utilizado na homogeneização.

Para o ensaio crônico, após o período de exposição de 21 dias, os organismos foram distribuídos em três grupos (triplicata) compostos por quatro organismos em cada grupo (réplica/pool). Os organismos foram reunidos em pools devido a pouca quantidade de material das amostras individuais, o que resulta em uma quantidade insuficiente de proteínas para as análises. Para as amostras onde ocorreram mortes de matrizes, as réplicas foram compostas por quatro ou três organismos. Sendo assim, estes indivíduos foram adicionados a microtubos de 2 mL onde foram homogeneizados em 250  $\mu$ L de tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,2) utilizando um homogeneizador rotativo de tecidos. As amostras homogeneizadas foram mantidas refrigeradas durante todo o processo (4 °C), e centrifugadas a 8.000 g por 10 minutos a 4 °C, em centrífuga Hitachi. Os testes referentes aos biomarcadores bioquímicos foram realizados imediatamente, utilizando o sobrenadante das amostras obtido após a centrifugação, e o tampão empregado na homogeneização das amostras utilizado como branco. Para todos os cálculos de atividade, os valores de branco foram previamente descontados.

#### 4.8.1 Concentração de Proteínas

A concentração de proteínas das amostras foi determinada de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Bradford (1976). A quantificação foi realizada em leitora de microplacas em comprimento de onda de 595 nm, onde albumina de soro bovino (BSA) (CAS 9048-46-8, Sigma-Aldrich, pureza  $\geq$  98%) foi utilizada como padrão para a construção da curva de calibração, com o objetivo de expressar as atividades enzimáticas em função da quantidade de proteínas. As réplicas analisadas foram compostas por 10  $\mu$ L das amostras em triplicata e 250  $\mu$ L do reativo de Bradford (B6916, Sigma-Aldrich). Os resultados foram expressos em miligrama de proteína por mililitro. Após a construção da curva analítica, o coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) foi verificado e a equação da reta foi obtida. Para a análise dos dados foram aceitos valores de  $R^2$  acima de 0,99. As amostras foram normalizadas para 1 mg de proteína.mL<sup>-1</sup> para serem utilizadas nas análises sequenciais.

#### 4.8.2 Acetilcolinesterases

A determinação da atividade de acetilcolinesterases (AChE) foi realizada em leitora de microplaca a 405 nm, através do método descrito por Ellman et al. (1961), adaptado para microplaca e otimizado para *D. magna* por Guilhermino et al., (2000). Este método consistiu em detectar o 2-nitrobenzoato-5-mercaptopicolina e o 5-tio-2-nitrobenzoato formados por meio da reação entre a tiocolina, resultado da hidrólise da acetiltiocolina pela AChE, e do ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB). As réplicas analisadas foram compostas por 20 µL das amostras, 130 µL de solução DTNB 0,75 mmol.L<sup>-1</sup> (CAS 69-78-3, Sigma-Aldrich, pureza ≥ 98%) e 50 µL da solução de iodeto de acetiltiocolina 9 mmol.L<sup>-1</sup> (CAS 1866-15-5, Sigma-Aldrich, pureza ≥ 98%). As absorbâncias foram medidas por 15 minutos, em ciclos que ocorriam a cada 30 segundos. A atividade de AChE é calculada a partir da equação 1 e os resultados expressos em micromoles de acetiltiocolina hidrolisada por minuto por miligrama de proteína.

$$\text{AChE} = \frac{\Delta\text{ABS}}{\text{min}} \times 1,22549 / [\text{proteínas da amostra}] \text{ (Equação 1)}$$

#### 4.8.3 Catalases

A atividade de catalases (CAT) foi determinada de acordo com o método descrito por Aebi (1984). O princípio de análise corresponde a cinética do decréscimo de absorbância, o qual foi medido a 240 nm, devido à degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Este ensaio foi realizado em microplaca de quartzo, onde as réplicas foram compostas por 30 µL das amostras, 70 µL de tampão Tris HCl (50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8) e 150 µL do meio de reação (Tampão Tris-HCl 1 mol.L<sup>-1</sup>, EDTA 5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0; água processada por osmose reversa e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mmol.L<sup>-1</sup>). As absorbâncias foram medidas por 2 minutos, em ciclos que ocorriam a cada 20 segundos. Para a análise dos dados foram considerados os intervalos de decaimento da absorbância com R<sup>2</sup> acima de 0,95, e empregada a equação 2. Os resultados foram expressos em milimoles de peróxido de hidrogênio degradado por minuto por miligrama de proteína.

$$\text{CAT} = \frac{\frac{\Delta\text{ABS}}{\text{min}} \times 100}{40} / [\text{proteínas da amostra}] \text{ (Equação 2)}$$

#### 4.8.4 Glutathione S-transferases

A atividade de glutathione S-transferases (GST) foi determinada a partir do método descrito por Keen, Habig e Jakoby (1976). A leitura de absorbância foi realizada a 340 nm. A GST catalisa a reação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (CAS 97-00-7, Sigma-Aldrich, pureza  $\geq 97\%$ ) com glutathione (GSH) (CAS 70-18-8, Sigma Aldrich, pureza  $\geq 98\%$ ), formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento da absorbância. As réplicas foram compostas por 20  $\mu\text{L}$  das amostras e 180  $\mu\text{L}$  do meio de reação (GSH 1,5  $\text{mmol.L}^{-1}$ ; CDNB 2  $\text{mmol.L}^{-1}$  e tampão fosfato de potássio 1  $\text{mol.L}^{-1}$ ). As absorbâncias foram medidas por 6 minutos, em ciclos que ocorriam a cada 20 segundos. Para a análise dos dados foram considerados os intervalos de decaimento da absorbância com  $R^2$  acima de 0,95. A equação 3 foi utilizada para o cálculo das atividades, onde os resultados foram expressos em micromoles de tioéter formado por minuto por miligrama de proteína.

$$\text{GST} = \frac{\frac{\Delta\text{ABS}}{\text{min}} \times 10}{5,76} / [\text{proteínas da amostra}] \text{ (Equação 3)}$$

#### 4.8.5 Superóxido dismutases

Para a determinação da atividade de superóxido dismutases (SOD) seguiu-se o proposto por Marklund e Marklund (1974) e Maciel et al. (2013), adaptado para microplaca. A leitura da absorbância foi realizada em 320 nm, onde o princípio do método consistiu na análise do aumento da absorbância, causada pelo consumo do radical superóxido, sendo a auto-oxidação do pirogalol em pH básico responsável pela geração do radical superóxido. Para tanto, 50  $\mu\text{L}$  de amostra foram incubados juntamente com 1,4 mL de tampão Tris HCl (50  $\text{mmol.L}^{-1}$ , EDTA 1  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 9), por 25 minutos a 25 °C em banho-maria. Para a leitura em microplaca, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  do material incubado mais 34  $\mu\text{L}$  da solução de pirogalol (1  $\text{mmol.L}^{-1}$ , HCl 1  $\text{mmol.L}^{-1}$ ).

As absorbâncias foram medidas por 5 minutos, em ciclos que ocorriam a cada 20 segundos. Para a análise dos dados foram considerados os intervalos de aumento

da absorvância com  $R^2$  acima de 0,95. A atividade de SOD, expressa em U por miligrama de proteína, foi definida utilizando valores de porcentagem de inibição em relação a auto-oxidação do pirogalol (AOP), sendo que 1 unidade (1U) de SOD equivale a 50% da inibição.

#### 4.9 ECOTOXICIDADE EMPREGANDO EMBRIÕES DE *Rhamdia quelen* COMO ORGANISMOS-TESTE

O ensaio de toxicidade aguda utilizando embriões de *Rhamdia quelen* passou por aprovação prévia do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEUA-UTFPR), conforme processo nº 23064.040940/2019-19, aprovado em 10 de setembro de 2019 (APÊNDICE B). Todos os procedimentos seguiram as prescrições das normas e legislações vigentes, quanto a ética no uso de animais em pesquisas. Sendo assim, a metodologia utilizada foi baseada no protocolo 236 da OECD (2013) e nos trabalhos de Azevedo-Linhares et al. (2018), Paula (2019) e Gomes et al. (2020).

A fertilização para obtenção dos embriões ocorreu a partir de um macho e uma fêmea na piscicultura Panamá, localizada na cidade de Paulo Lopes - SC. Aproximadamente seis horas após a fertilização (hpf), os organismos viáveis, ou seja, os embriões que não estavam coagulados antes da eclosão, foram selecionados e distribuídos em placas de 96 poços, contendo 250  $\mu$ L das soluções, sendo quatro placas para cada tratamento, totalizando 384 embriões por grupo. As concentrações das soluções contendo os herbicidas avaliados neste ensaio estão apresentadas no Quadro 3. O ensaio contou ainda com um controle negativo composto somente por água reconstituída (pH 7,46) (ANEXO C) e um controle positivo composto por uma solução de sulfato de zinco heptahidratado (10 mg.L<sup>-1</sup>).

A exposição dos organismos ocorreu durante 96 horas, sendo as placas mantidas em incubadora do tipo BOD com temperatura controlada de  $24 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. A renovação parcial das soluções (125  $\mu$ L) e a observação do desenvolvimento dos embriões ocorreu em ambiente climatizado ( $24 \pm 2$  °C) e iluminado, após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição. Após a renovação das soluções, os organismos eram observados individualmente com auxílio de estereomicroscópio para avaliação dos parâmetros morfológicos. As deformidades morfológicas foram distribuídas em categorias de

acordo com a região em que ocorreram, assim, foram atribuídos valores de 1 a 4 (escores), sendo 1 para danos mais brandos e 4 para danos mais severos (POWERS et al., 2011; GOMES et al., 2020), conforme apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1:** Escores associados às categorias e respectivas deformidades observadas em embriões de *Rhamdia quelen*.

<b>Categoria</b>	<b>Deformidade</b>	<b>Escore</b>
Axial	Cifose, escoliose ou lordose	4
	Esqueleto atrofiado	4
	Enrolamento caudal	4
Cefálica	Ausência de olhos	4
	Ausência de barbilhão	4
	Deformidade bucal	4
	Deformidade facial	3
	Edema ocular	4
Nadadeiras	Atrofia ou deformidade	2
	Lesão	1
Toráx/Abdômen	Atrofia corporal	2
	Distensão corporal	2
	Edema cardíaco	4
	Edema do saco vitelínico	4

Fonte: A autora, adaptado de Powers et al. (2011) e Gomes et al. (2020).

Decorrida a exposição, os organismos sobreviventes foram distribuídos em microtubos, sendo um microtubo para cada placa de 96 poços (pool), totalizando quatro réplicas/pools por tratamento. Após sacrificados por congelamento instantâneo em ultrafreezer (- 80 °C), a análise dos biomarcadores bioquímicos foi realizada seguindo a mesma metodologia do ensaio com *D. magna*, entretanto, cada pool de organismos foi homogeneizado em 500 µL de Tampão Tris-HCl (20 mmol.L<sup>-1</sup>, EDTA 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,6).

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

No estudo das larvas de *Aedes aegypti* não foi observado nenhum efeito, não sendo necessária a análise estatística dos dados.

Os resultados obtidos no ensaio com sementes de *Allium cepa* foram analisados quanto a normalidade pelo teste de Kolmogorov Smirnov. O índice mitótico e o índice de alterações cromossômicas foram analisados através da análise de variância (ANOVA - um critério) seguido de Tukey, e o índice mutagênico foi analisado através de Kruskal-Wallis seguido de Dunn, com intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

Os resultados obtidos na avaliação da sensibilidade dos organismos *Daphnia magna* foram expressos em concentração efetiva que causou imobilidade em 50% da população exposta no período de 48 horas ( $CE_{50-48h}$ ), a qual é determinada através da análise de Probitos, utilizando o software BioStat®.

Os dados obtidos no ensaio crônico de *D. magna* foram analisados com intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), utilizando o software GraphPad Prism 5.0. O parâmetro reprodução foi analisado quanto a normalidade pelo teste de Kolmogorov Smirnov. Para a 1ª e 3ª geração, os dados referentes a reprodução foram analisados através de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. O parâmetro reprodução da 2ª geração, a primípara em todas as gerações e as atividades enzimáticas em todas as gerações foram analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA - um critério) seguida do teste de Dunnett e Tukey.

No ensaio utilizando embriões de *Rhamdia quelen*, os dados foram verificados quanto à normalidade através do teste de Shapiro-Wilk e homoscedasticidade através do teste de Bartlett, seguido por ANOVA - one way e pós-teste de Dunnett e Tukey para dados paramétricos, ou teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para dados não paramétricos, com intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As propriedades ecotoxicológicas de misturas de pesticidas, quando comparadas com os mesmos compostos individuais, são pouco investigadas. No entanto, nos compartimentos ambientais, uma grande variedade destes pesticidas é frequentemente detectada, em baixas concentrações, consideradas ambientalmente relevantes (SRIVASTAVA; MISHRA, 2009; BIANCHI; MANTOVANI; MARIN-MORALES, 2015). Além disso, os efeitos causados pelos ingredientes ativos dos pesticidas normalmente diferem dos efeitos oriundos das formulações dos produtos comerciais, devido a presença de surfactantes (BRIDI et al., 2017; ZOCCHI; SOMMARUGA, 2019; NAGY et al., 2020). Este trabalho apresenta resultados primordiais no que se refere a estudos que avaliam a mistura dos compostos atrazina e glifosato, em concentrações de relevância ambiental, e a comparação entre ingredientes ativos e produtos comerciais, uma vez que são escassos os trabalhos sobre este tema na literatura.

### 5.1 TESTE DE ECOTOXICIDADE AGUDA UTILIZANDO LARVAS DE *Aedes aegypti*

A utilização de larvas de *Aedes aegypti* como bioindicador teve como objetivo avaliar os efeitos dos pesticidas sobre insetos, os quais são organismos não-alvo dos herbicidas. Sendo assim, após a exposição aguda das larvas aos padrões analíticos e aos produtos comerciais dos herbicidas, foi verificado que as concentrações ambientais avaliadas para atrazina e glifosato, bem como suas misturas, não causaram efeito agudo (imobilidade) aos organismos. Este fato corrobora com informações de que esta espécie é resistente (VALLE; BELINATO; MARTINS, 2015) e que através de ensaios agudos não se pode inferir quais são os possíveis efeitos causados a estes organismos.

Insetos aquáticos são indicadores da contaminação por xenobióticos, pois sua exposição ocorre em estágios críticos do seu ciclo de vida, como o desenvolvimento larval e a fase de pupa (MORALES et al., 2011). Bara, Montgomery e Muturi (2014) avaliaram a exposição de larvas de *Aedes aegypti* aos herbicidas atrazina e glifosato, na concentração de 5 mg.L<sup>-1</sup>, e observaram que as taxas e os tempos de emergência

de *Aedes aegypti* do tratamento utilizando atrazina foram significativamente maiores quando comparadas ao controle e aos tratamentos utilizando glifosato. Os autores utilizaram uma concentração consideravelmente maior ( $5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) do que as concentrações ambientais avaliadas em nosso estudo (ATZ = 2 e  $25 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  e GF = 65 e  $160 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ), dessa forma, estudos crônicos ou transgeracionais, para abranger uma maior parte do ciclo de vida, ou a avaliação de biomarcadores, para obter respostas a níveis bioquímicos, seriam uma alternativa para identificar possíveis efeitos da exposição a baixas concentrações de pesticidas.

Nossos resultados corroboram com os dados observados por Jacquet et al. (2015), onde atrazina não causou mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* independente da concentração testada (0,03, 0,3, 3 e  $30 \text{ mg.L}^{-1}$ ). No entanto, os autores avaliaram a pré-exposição das larvas de *Aedes aegypti* à atrazina (1, 10, 100 e  $1000 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ), as quais foram posteriormente tratadas com o inseticida organofosforado temefós, e observaram que a pré-exposição de 48 horas ao herbicida foi responsável por diminuir significativamente a mortalidade das larvas expostas ao inseticida. Riaz et al. (2009) também estudaram os efeitos da exposição de larvas de *Aedes aegypti* ao herbicida glifosato em uma concentração subletal, semelhante a empregada em nosso estudo ( $169,1 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ), e revelaram o potencial deste herbicida na tolerância subsequente a inseticidas químicos, sendo este fato possivelmente atrelado a indução cruzada de genes específicos, os quais codificam enzimas de desintoxicação. Estes estudos demonstram a importância de avaliar os efeitos da exposição de organismos não-alvo aos herbicidas atrazina e glifosato, de forma isolada, mas não em mistura como no presente estudo.

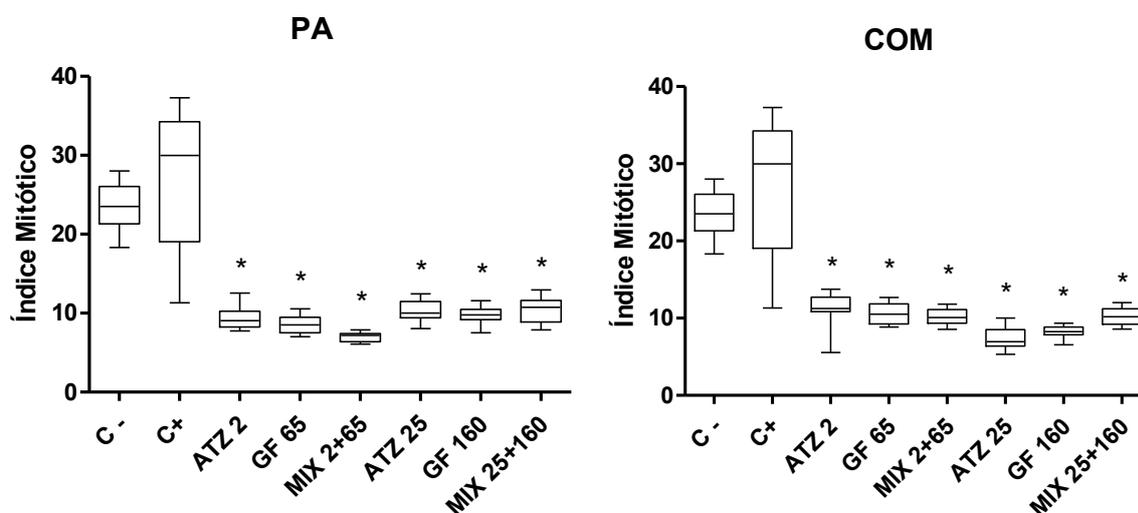
Portanto, percebe-se que são necessários demais ensaios, para avaliar os efeitos em concentrações subletais, bem como, avaliar outros parâmetros, como biomarcadores bioquímicos e moleculares, uma vez que nos mosquitos já foi demonstrado que inseticidas induzem enzimas de desintoxicação. Além disso, a sensibilidade deste organismo ainda deve ser investigada, e a utilização de um inseticida já definido como eficaz para o controle deste mosquito, pode ser utilizado como controle positivo.

## 5.2 TESTE DE CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE EMPREGANDO *Allium cepa* COMO ORGANISMOS-TESTE

Quanto a análise relacionada ao índice mitótico, que permite estimar a frequência de divisão celular (RODRÍGUEZ et al., 2015), foi verificado que para as amostras avaliadas, tanto dos padrões analíticos quanto dos produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, nas menores e nas maiores concentrações, ocorreu a inibição do processo de divisão celular, uma vez que todas as amostras avaliadas apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao controle negativo (água processada com sistema de osmose reversa), exceto o grupo correspondente ao controle positivo (MMS  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ ), o qual foi utilizado com o intuito de validar o ensaio (Figura 8).

A tendência dos resultados obtidos indica que o índice mitótico foi afetado por ambos os herbicidas, e igualmente, pela mistura destes. A diferença significativa em relação ao controle negativo, denota a inibição da proliferação celular causada pelos compostos químicos (SILVEIRA et al., 2015).

**Figura 8:** Índice mitótico obtido para amostras do meristema radicular de *Allium cepa* expostas ao controle negativo (água processada com sistema de osmose reversa), controle positivo (MMS  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e aos padrões analíticos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura.



Onde \* indica a diferença estatística em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).

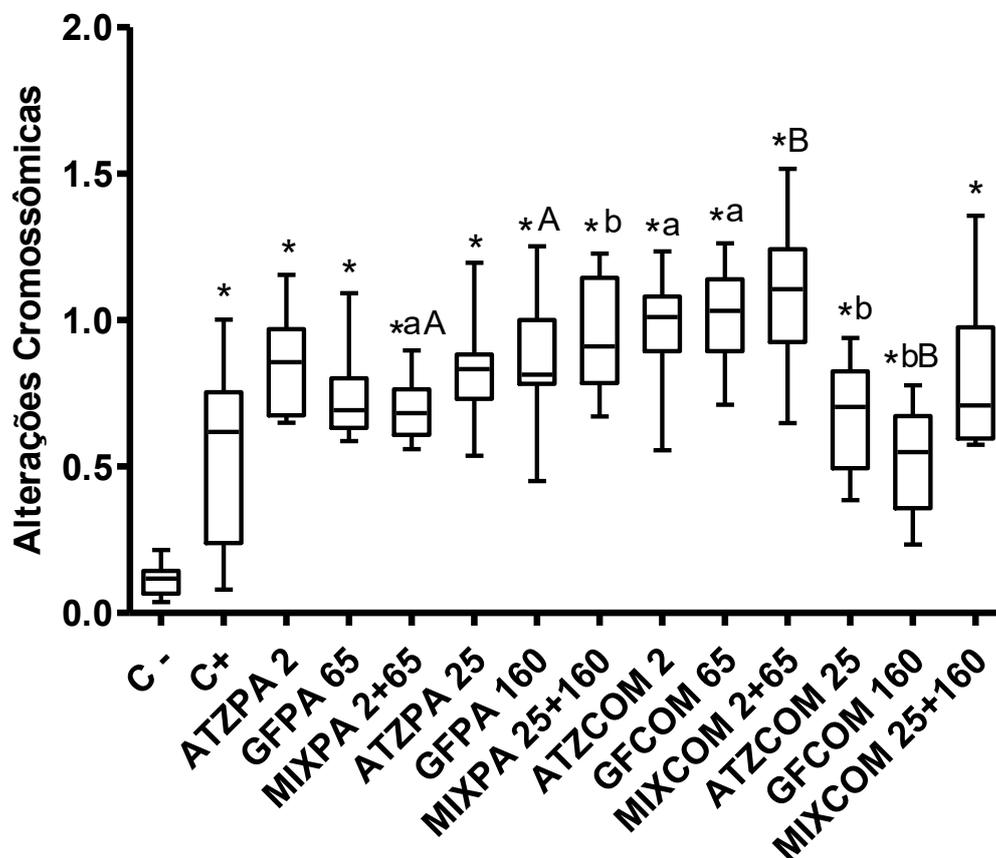
Fonte: A autora.

No trabalho de Mercado e Caleño (2020) com *Allium cepa* empregado como bioindicador, foi possível verificar que o índice mitótico diminuía quando as concentrações de glifosato, produto comercial, aumentavam. Sendo que na maior concentração de glifosato avaliada pelos autores ( $30 \text{ mg.L}^{-1}$ ) houve uma inibição da mitose de 90,8%. O mesmo pode ser observado neste estudo quando avaliado o produto comercial que contém glifosato como princípio ativo, pois foi verificada a diminuição do índice mitótico na maior concentração ( $160 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ) do herbicida quando comparada a menor concentração ( $65 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ) avaliada.

Grillo et al. (2012), também verificaram a diminuição do índice mitótico e a indução de aberrações cromossômicas em células de *A. cepa*, tratadas com atrazina, padrão analítico, nas concentrações de 1, 10 e  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ , e concluíram que estes resultados indicam o elevado potencial citotóxico deste herbicida. Srivastava e Mishra (2009), avaliaram células de *A. cepa* expostas a um produto comercial contendo atrazina como princípio ativo, nas concentrações de 15, 30 e  $60 \text{ mg.L}^{-1}$ , e igualmente observaram a redução do índice de divisão celular e o aumento de aberrações cromossômicas dependente da concentração, dessa forma, os autores concluíram que este herbicida pode produzir efeitos genotóxicos em plantas.

A inibição da síntese e da replicação, bem como, as quebras de DNA, são as principais responsáveis por alterações cromossômicas, que podem ser espontâneas ou induzidas por agentes externos (FELISBINO et al., 2018; RODRÍGUEZ et al., 2015). Quanto a análise do índice de alterações cromossômicas, todas as amostras avaliadas apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparadas ao controle negativo. Além disso, os grupos MIXPA, ATZCOM e GFCOM apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre a maior e menor concentração avaliada em cada grupo, indicando uma resposta dependente da concentração. Ainda, com relação a diferença entre os tratamentos com padrões analíticos e produtos comerciais, os grupos correspondentes a mistura dos herbicidas MIXPA (2+65) e MIXCOM (2+65), e os grupos GFPA (160) e GFCOM (160), também apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre si (Figura 9).

**Figura 9:** Índice de alterações cromossômicas obtido para amostras do meristema radicular de *Allium cepa* expostas ao controle negativo (água processada com sistema de osmose reversa), controle positivo (MMS 10 mg.L<sup>-1</sup>) e aos padrões analíticos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura.



Onde \* indica a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle negativo, letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as concentrações avaliadas para um mesmo tratamento, e letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos com padrões analíticos e produtos comerciais.

Fonte: A autora.

Dentre as alterações mais observadas para a maioria dos grupos estavam aderências e brotos, seguidas de pontes e atrasos, no entanto, quebras e perdas não foram tão frequentes (Tabela 2). A Figura 10 apresenta algumas das anormalidades cromossômicas que foram observadas durante a análise das lâminas. A grande presença de aderências cromossômicas (Figura 10F) pode acarretar em morte celular, uma vez que estas entram em processo de divisão, mas não encerram o ciclo mitótico, tendo em vista que a adesão não pode ser reparada (FELISBINO et al., 2018; SILVEIRA et al., 2017; LIMA et al., 2019). Quanto aos brotos que também foram

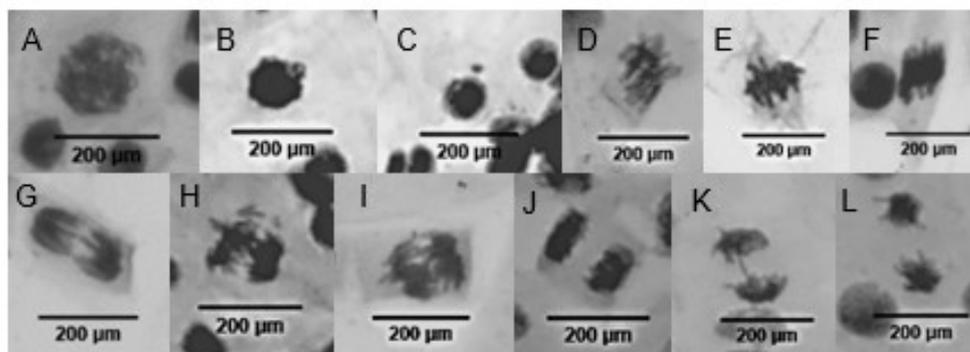
observados com frequência, estes são originários dos cromossomos atrasados envolvidos pela membrana celular, que formam um compartimento parcialmente separado do núcleo (Figura 10B) (SERRANO-GARCÍA; MONTERO-MONTOYA, 2001), porém, de acordo com Fernandes, Mazzeo e Marin-Morales (2009), essa alteração não representa uma anormalidade, pois ainda pode assumir a sua morfologia característica. Silveira et al. (2017), observaram que as células de *A. cepa* tratadas com atrazina ( $3 \text{ g.L}^{-1}$ ) apresentaram uma frequência de aberrações cromossômicas elevada em relação ao controle negativo, sendo adesão cromossômica e pontes as mais prevalentes.

**Tabela 2:** Frequência de anormalidades observadas em células do meristema radicular de *Allium cepa* relativas ao número total de células analisadas nos tratamentos compostos pelos princípios ativos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura.

Grupo	Ponte	Quebra	Perda	Atraso	Adesão	Broto
C -	0,22	0,02	0,00	0,28	0,02	0,02
ATZPA 2	0,93	0,02	0,00	0,97	1,18	1,17
GFPA 65	0,88	0,00	0,04	0,94	1,13	0,70
MIXPA 2+65	0,51	0,00	0,02	0,63	1,17	1,13
ATZCOM 2	0,86	0,00	0,08	1,14	1,23	1,55
GFCOM 65	1,27	0,04	0,08	1,07	1,20	1,37
MIXCOM 2+65	1,35	0,00	0,04	1,36	1,41	1,29
ATZPA 25	0,94	0,02	0,00	0,92	1,04	1,19
GFPA 160	0,93	0,06	0,00	0,87	1,46	1,04
MIXPA 25+160	0,74	0,13	0,04	0,94	1,30	1,61
ATZCOM 25	0,56	0,03	0,02	0,55	1,01	1,16
GFCOM 160	0,65	0,00	0,02	0,49	0,89	0,54
MIXCOM 25+160	0,76	0,00	0,00	0,78	1,30	1,15
C+	0,64	0,11	0,11	1,00	0,44	0,45

Fonte: A autora.

**Figura 10:** Exemplos de alterações do ciclo celular verificados em células do meristema radicular de *Allium cepa*, após exposição aos padrões analíticos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura, obtidos em microscópio ótico com aumento de 400x.



Onde, (A) Prófase; (B) Brotamento; (C) Micronúcleo; (D) Metáfase; (E) Metáfase com atraso cromossômico; (F) Metáfase com aderência cromossômica; (G) Anáfase; (H) Anáfase com atraso e perda cromossômica; (I) Anáfase com ponte e atraso cromossômico; (J) Telófase; (K) Telófase com ponte cromossômica; (L) Telófase com atraso cromossômico.

Fonte: A autora.

Como pode-se observar neste trabalho, o índice mitótico e igualmente a frequência de alterações cromossômicas diminuiu nos grupos correspondentes as amostras dos produtos comerciais de atrazina e glifosato na maior concentração avaliada, quando comparados aos mesmos grupos na menor concentração avaliada. Este fato pode estar relacionado a concentração utilizada, uma vez que ATZCOM 25  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e GFCOM 160  $\mu\text{g.L}^{-1}$  induziram uma frequência menor de células aberrantes quando comparados a ATZCOM 2  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e GFCOM 65  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . De acordo com Ventura (2004), isso se deve a inibição do índice mitótico, tendo em vista que aproximadamente 92% e 91% das células das raízes de *Allium cepa* apresentavam-se em interfase para os grupos expostos a ATZCOM 25  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e GFCOM 160  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente, enquanto para os grupos ATZCOM 2  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e GFCOM 65  $\mu\text{g.L}^{-1}$  as células em interfase corresponderam a 88% e 89%, respectivamente. Dessa forma, a maior concentração apresentou um efeito mais drástico sobre a divisão celular, acarretando na morte das células.

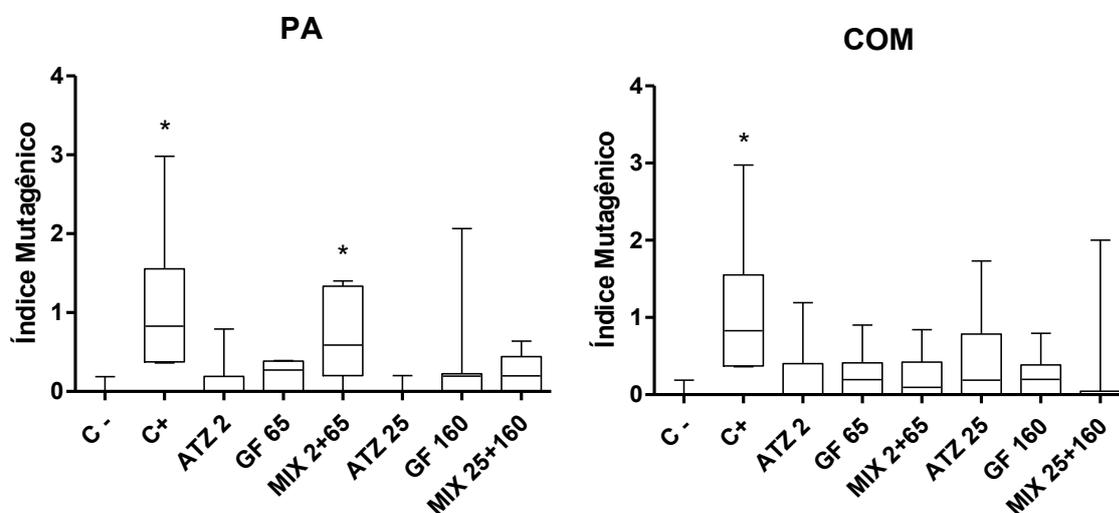
Mahapatra et al. (2019) apresentam em seu estudo, informações sobre os efeitos de quatro pesticidas, sendo dois fungicidas (triciclazol e tiabendazol) e dois inseticidas (Plethora e Slash-360), testados em concentrações que correspondem a 2 e 4 vezes da concentração recomendada, em *Trigonella foenum – graecum*. Os autores observaram a indução de estresse oxidativo e efeitos como a redução do

índice mitótico e a presença de anormalidades cromossômicas, onde metáfases com aderências, similarmente a este trabalho, e pontes anafásicas, foram as aberrações mais frequentes. Bianchi, Mantovani e Marin-Morales (2015) observaram que o inseticida malathion, em todas as concentrações avaliadas (1,5; 0,75; 0,37 e 0,18 mg.L<sup>-1</sup>), apresentou efeitos genotóxicos em células de *A. cepa*, sendo as pontes cromossômicas as alterações mais presentes, indicando seu efeito clastogênico.

Os micronúcleos são originados a partir de quebras cromossômicas ou de distúrbios no processo mitótico durante a divisão celular (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; GHISI; OLIVEIRA; PRIOLI, 2016). Neste trabalho, a presença de micronúcleos não foi frequentemente relatada, o que pode ter ocorrido devido as concentrações avaliadas, a inibição da divisão celular e a baixa frequência de quebras cromossômicas observadas (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007).

Para o parâmetro relacionado ao índice mutagênico, que abrange a presença de micronúcleos, os grupos correspondentes ao controle positivo (MMS 10 mg.L<sup>-1</sup>) e a mistura dos padrões analíticos dos herbicidas atrazina e glifosato na menor concentração avaliada (MIXPA2+65), apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle negativo (Figura 11).

**Figura 11:** Índice mutagênico obtido para amostras do meristema radicular de *Allium cepa* expostas ao controle negativo (água processada com sistema de osmose reversa), controle positivo (MMS 10 mg.L<sup>-1</sup>) e aos padrões analíticos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura.



Onde \* indica a diferença estatística em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora.

Ghisi, Oliveira e Prioli (2016) expõem que na comparação entre o princípio ativo e as formulações comerciais de glifosato, a maior frequência de micronúcleos, quando avaliados diferentes organismos, como *Allium cepa*, camundongos, peixes, jacarés e anfíbios, é observada quando o produto comercial é testado. No entanto, nossos resultados não estão de acordo com esta afirmação, tendo em vista que o único grupo responsável por resposta significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle negativo, foi a mistura dos padrões analíticos dos herbicidas. Rodríguez et al. (2015), observaram que a frequência de micronúcleos se mostrou dependente da concentração, uma vez que apresentou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) na maior concentração testada do inseticida imidaclopride quando avaliaram a exposição de *Allium cepa*. Da mesma forma, nossos resultados divergem dos apresentados pelos autores, pois indicam que a maior frequência de micronúcleos ocorreu no grupo exposto a mistura da menor concentração dos herbicidas.

A mistura de herbicidas também foi estudada por Felisbino et al. (2018), onde mesotriona associada a atrazina, em concentrações de relevância ambiental, promoveu aumento da genotoxicidade em raízes *Allium cepa*, uma vez que as frequências de aberrações cromossômicas e de micronúcleos foram superiores aos efeitos dos mesmos isolados, indicando que o uso de mesotriona em mistura com outros herbicidas genotóxicos atua como co-mutagênica. Bianchi, Fernandes e Marin-Morales (2016) avaliaram os pesticidas imidaclopride e sulfentrazone e sua mistura, e verificaram que células com micronúcleos não foram frequentes significativamente, e as principais aberrações cromossômicas observadas foram pontes e aderências cromossômicas. Quanto a mistura dos pesticidas, esta resultou em efeitos citotóxicos e genotóxicos, acarretando na redução do índice de divisão celular, e do mesmo modo que apresentado neste trabalho, a aderência cromossômica foi a principal aberração observada.

Percebe-se desta forma, que as misturas de pesticidas são responsáveis por diferentes efeitos sobre os organismos bioindicadores, uma vez que os compostos podem interagir entre si, alterando os efeitos ecotoxicológicos, sendo frequentemente relatadas como causadoras de efeitos potenciais quando comparadas as moléculas isoladas (GOUJON et al., 2014).

### 5.3 TESTE PRELIMINAR DE ECOTOXICIDADE AGUDA COM *Daphnia magna*

Através dos ensaios preliminares realizados com o organismo-teste *Daphnia magna* foi possível verificar que as concentrações selecionadas para os padrões analíticos e produtos comerciais: 2 e 25  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para atrazina, e 65 e 160  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para glifosato, e a mistura das menores e maiores concentrações destes herbicidas, não causaram a imobilidade dos organismos expostos. Ou seja, são concentrações subletais, que possibilitam a realização de ensaios crônicos para avaliação de efeitos subletais como reprodução e análise de biomarcadores. A viabilidade dos organismos empregados nos ensaios de ecotoxicidade pode ser confirmada através da carta controle de sensibilidade elaborada no período de execução das atividades 2019/2020 (APÊNDICE A).

### 5.4 TESTE DE ECOTOXICIDADE CRÔNICA MULTIGERACIONAL COM *Daphnia magna*

Após a exposição crônica (21 dias) dos organismos *D. magna* foi possível verificar conforme os dados apresentados na Tabela 3, que o parâmetro sobrevivência não foi afetado na primeira geração de organismos expostos, diferentemente das gerações seguintes, principalmente quando estes organismos foram submetidos às misturas, onde observou-se uma mortalidade de 33% no grupo MIXPA, e de 75% no grupo MIXCOM.

Dentre as análises, percebe-se que os grupos correspondentes a mistura dos herbicidas foram os responsáveis pelos maiores efeitos de letalidade dos indivíduos, quando comparados com os grupos dos herbicidas isolados. Esta letalidade ocorreu de forma crescente através das gerações, indicando que a exposição crônica afeta consideravelmente os organismos não-alvo.

Além disso, foi possível perceber que a mistura dos produtos comerciais, provavelmente devido a presença de surfactantes, foi mais tóxica para os organismos, quando comparadas com seus ingredientes ativos (SÁNCHEZ et al., 2017). As formulações comerciais utilizadas neste estudo apresentam uma concentração dos ingredientes ativos puros, atrazina e glifosato de 40 e 48%, respectivamente, o que demonstra a dimensão deste efeito, pois o tratamento MIXCOM foi duas vezes mais tóxico que o tratamento MIXPA.

**Tabela 3:** Percentual de sobrevivência dos organismos-teste *Daphnia magna*, obtido para os grupos avaliados no ensaio de exposição crônica multigeracional.

Grupo	Sobrevivência (%)		
	F0	F1	F2
Controle	100	100	83
ATZPA (2 µg.L <sup>-1</sup> )	100	92	100
GFPA (65 µg.L <sup>-1</sup> )	100	100	92
MIXPA (2 + 65 µg.L <sup>-1</sup> )	100	92	67
ATZCOM (2 µg.L <sup>-1</sup> )	100	100	83
GFCOM (65 µg.L <sup>-1</sup> )	92	92	100
MIXCOM (2 + 65 µg.L <sup>-1</sup> )	100	83	25

Fonte: A autora.

Este fato já foi relatado por outros autores, onde a formulação comercial contendo glifosato foi mais tóxica para larvas de libélula *Coenagrion pulchellum*, quando comparado com o ingrediente ativo, sendo verificado efeitos negativos na sobrevivência, no comportamento e em características fisiológicas, quando avaliadas concentrações de 1 e 2 mg.L<sup>-1</sup> (JANSSENS; STOKS, 2017). Loughlin et al. (2016) também não observaram efeitos de letalidade significativos, quando comparados ao controle, em lagostins *Cherax quadricarinatus* expostos a atrazina (produto comercial), embora a concentração avaliada no estudo tenha sido maior que concentrações ambientais (0,1; 0,5 e 2,5 mg.L<sup>-1</sup>).

García-Espiñeira, Tejada-Benitez e Olivero-Verbel (2018), avaliaram organismos *Caenorhabditis elegans*, e verificaram que a atrazina causou uma letalidade de 12%, 15% e 18% para as concentrações de 6, 60 e 600 µM, respectivamente, enquanto o glifosato produziu uma letalidade de 20%, 50% e 100% para as concentrações de 0,01, 10 e 100 µM, respectivamente. Quando avaliada a mistura dos herbicidas atrazina (600 µM) e glifosato (1000 µM), uma letalidade de 80% foi constatada. Dessa forma, os autores concluíram que os efeitos observados eram dependentes das concentrações empregadas.

Embora muitos estudos demonstrem a toxicidade de princípios ativos e de formulações comerciais de herbicidas em termos de mortalidade de espécies não-alvo, muitas informações ainda são necessárias sobre efeitos subletais

envolvendo concentrações ambientais realistas (JANSSENS; STOKS, 2017; SÉGUIN et al., 2017). De acordo com Religia et al. (2019), é importante estudar os efeitos subletais uma vez que se estima o que acontece no ecossistema real, principalmente relacionado aos herbicidas aplicados sazonalmente em atividades agrícolas.

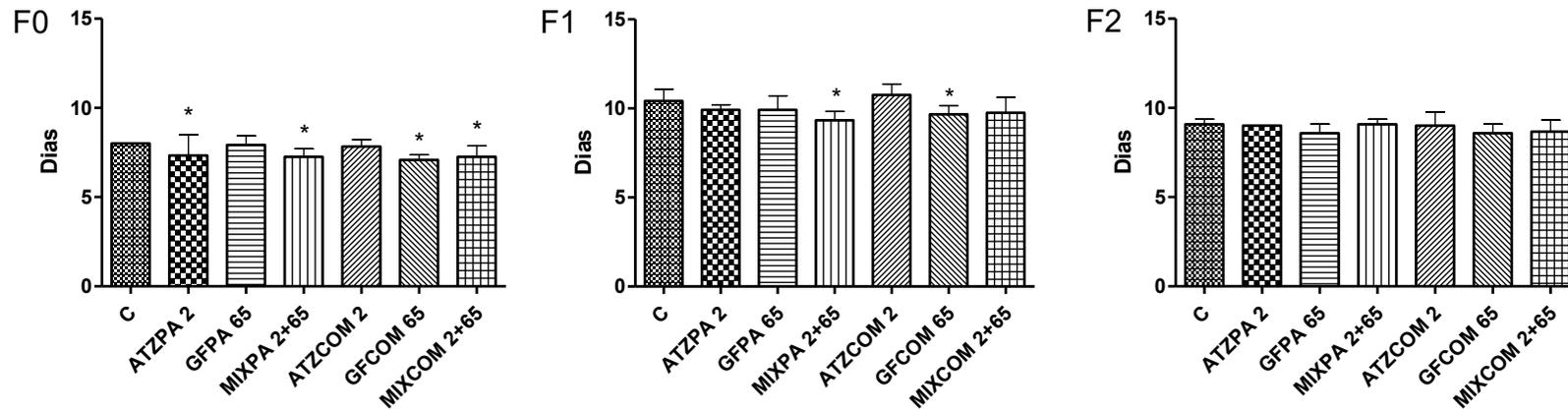
Nesse sentido, tendo em vista que *Daphnia magna* é uma das espécies mais empregadas em testes ecotoxicológicos, existe uma discussão acerca dos efeitos adversos observados, os quais podem ser dependentes da origem dos organismos e do alimento utilizado, e influenciar na sua tolerância a determinadas moléculas, tendo em vista que o metabolismo destes invertebrados aquáticos é afetada adversamente por concentrações ambientais relevantes (CUHRA; TRAAVIK; BOHN, 2013; MOREIRA, 2017; ZOCCHI; SOMMARUGA, 2019).

Os resultados obtidos para o parâmetro relacionado ao tempo médio (dias) para o início da produção de filhotes por fêmea (primípara) estão expostos na Figura 12, onde é possível observar que na primeira geração, a diferença estatística quando comparada ao grupo controle, foi verificada para os grupos ATZPA, MIXPA, GFCOM e MIXCOM, e na segunda geração, quando comparado ao grupo controle, em dias, a diferença estatística foi verificada para os grupos MIXPA e GFCOM.

Para a terceira geração de filhotes expostos aos grupos avaliados, não foi verificada diferença estatística, e além disso, foi observado que em uma réplica do grupo ATZCOM, não houve a produção de filhotes, e o organismo possuía tamanho inferior as demais matrizes, o que pode ser considerado como um organismo macho. Este fato pode ter ocorrido devido ao estresse causado pelo contaminante, uma vez que este herbicida possui características de desregulador endócrino, tendo apresentado este efeito em outros organismos (BRODEUR et al., 2013; EHRSAM; KNUTIE; ROHR, 2016; LOUGHLIN et al., 2016). Mer et al. (2013) também observaram a presença de um único organismo do sexo misto, nos peixes *Gasterosteus aculeatus* expostos à atrazina ( $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), e nenhum no grupo exposto ao glifosato.

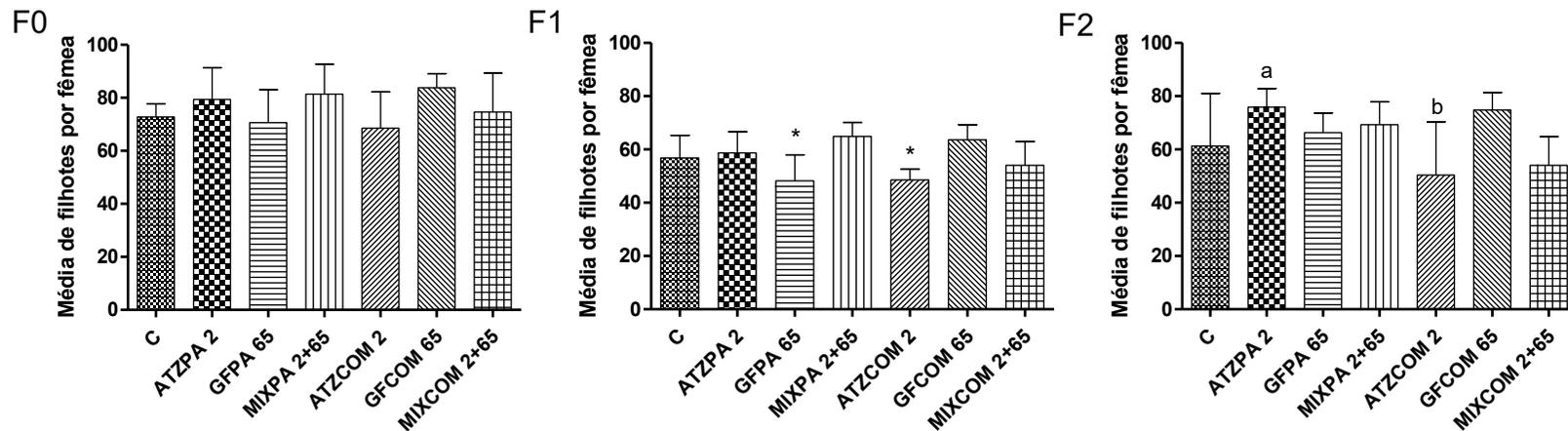
Para análise do parâmetro reprodução foram considerados somente os filhotes de fêmeas que permaneceram vivas até o final do período de exposição de 21 dias. A Figura 13 apresenta os resultados correspondentes a média de filhotes produzidos por fêmea viva, obtidos nas três gerações avaliadas, onde para a primeira geração de filhotes expostos, não foi verificada diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as amostras.

**Figura 12:** Tempo médio (média  $\pm$  DP) para o início da produção de filhotes por fêmea, para a primeira (F0), segunda (F1) e terceira (F2) geração de *D. magna* avaliadas após exposição crônica, onde \* indica a diferença estatística em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).



Fonte: A autora.

**Figura 13:** Filhotes produzidos por fêmea viva (média  $\pm$  DP), após o período de exposição de 21 dias, para a primeira (F0), segunda (F1) e terceira (F2) geração de *D. magna* avaliadas após exposição crônica, onde \* indica a diferença estatística em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).



Fonte: A autora.

No entanto, para a segunda geração, houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ), quando comparado com os resultados obtidos no grupo controle para as amostras de GFPA e ATZCOM, resultando na inibição da capacidade reprodutiva. Quanto a terceira geração, a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) foi verificada entre os grupos ATZPA e ATZCOM, onde o efeito reprodutivo também foi afetado resultando em uma média elevada do número de filhotes por fêmea no grupo ATZPA e inibição do efeito reprodutivo em ATZCOM.

Este fato pode estar associado ao estresse causado pela exposição aos herbicidas, onde os organismos direcionam sua energia para a reprodução, aumentando o número de descendentes (MOREIRA et al., 2020). Ou estar relacionado ao efeito hormese, o qual corresponde a uma resposta estimulante ou benéfica em baixas concentrações e inibitória ou tóxica em altas concentrações, quando organismos são expostos a moléculas tóxicas (DRZYMAŁA; KALKA, 2020). Este efeito pode ser induzido diretamente ou ocorrer devido ao desequilíbrio da homeostase como resultado de ações compensatórias (MOREIRA et al., 2020).

García-Espiñeira, Tejeda-Benitez e Olivero-Verbel (2018) verificaram efeitos na reprodução de *Caenorhabditis elegans*, uma vez que houve a redução do tamanho da ninhada em 67% e 93% após a exposição a atrazina 0,06 e 6  $\mu\text{M}$ , respectivamente, e 23% e 93% após exposição ao glifosato 0,01 e 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Quanto a mistura dos herbicidas, também houve uma redução na população em todos os tratamentos, porém, esta não foi dependente da concentração avaliada. Moreira (2017), observou que em concentrações subletais (2, 4 e 6  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) dos pesticidas Kraft® 36 EC e Score® 250 EC, que possuem abamectina e difenoconazol como princípios ativos, respectivamente, quando testados isolados e também em mistura, não afetaram a reprodução de *D. magna*.

Tendo em vista que concentrações de atrazina que induzem toxicidade também podem retardar o desenvolvimento e causar anormalidades em algumas espécies (YOON et al., 2019), Religia et al. (2019), avaliaram gerações de *D. magna*, as quais eram alimentadas com *Raphidocelis subcapitata* exposta ao herbicida atrazina (150  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Neste trabalho, os autores verificaram que as matrizes alimentadas com este fitoplâncton não apresentaram anormalidades, porém, produziram descendentes não viáveis. Inicialmente, o número de descendentes inviáveis foi alto, mas diminuiu nas fases posteriores, o que indicou que *R. subcapitata* exposta à concentração subletal deste herbicida afetou a dinâmica populacional de

*D. magna*. Marcus e Fiumera (2016), também sugerem que o herbicida atrazina, em doses ecologicamente relevantes (2 e 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e 2 e 20  $\text{mg.L}^{-1}$ ), tem efeitos sobre características físicas de *Drosophila melanogaster*, e que a redução no tempo de vida dos organismos avaliados, pode ser devido ao estresse oxidativo causado pelo herbicida.

Xu et al. (2017) relataram que em concentrações elevadas, o glifosato induziu toxicidade aguda no molusco *Pomacea canaliculata*, porém, os autores avaliaram concentrações que não ocorrem frequentemente no ambiente (175  $\text{mg.L}^{-1}$ ). Os autores ainda afirmam que após exposição prolongada, este herbicida inibiu a ingestão de alimentos, limitando o crescimento e alterando o perfil metabólico do organismo avaliado. Cleary et al. (2019) avaliaram organismos *Oryzias latipes* expostos a atrazina (5 e 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), e seus resultados sugerem que, mesmo que a exposição precoce a este herbicida não tenha causado fenótipos significativos na primeira geração diretamente exposta, as gerações seguintes de peixes estavam suscetíveis a maiores riscos de disfunção reprodutiva. Por isso, estudar os efeitos a longo prazo e através de gerações torna-se necessário.

## 5.5 AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM *Daphnia magna*

### 5.5.1 Avaliação de biomarcadores bioquímicos após exposição aguda

Após a confirmação referente as concentrações ambientais subletais, foi possível a realização de testes bioquímicos preliminares, com o objetivo de otimizar a metodologia para os ensaios de menor tempo de exposição. A Tabela 4 apresenta as condições utilizadas para determinar a quantidade de organismos, o tempo de exposição e a quantidade de tampão necessários para avaliação dos parâmetros bioquímicos após 48 e 96 horas de exposição.

Sendo assim, com os dados obtidos, definiu-se o emprego de 150 e 90 organismos para os testes bioquímicos realizados após 48 e 96 horas de exposição, respectivamente, além de fixar um valor de 200  $\mu\text{L}$  para o tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,2) utilizado na homogeneização dos organismos. Esta definição foi baseada na quantificação de proteínas, a qual é o princípio para a determinação das atividades enzimáticas.

**Tabela 4:** Condições utilizadas para otimizar a realização dos ensaios bioquímicos após 48 e 96 horas de exposição.

Quantidade de organismos	Tampão empregado na homogeneização ( $\mu\text{L}$ )	Tempo de exposição (h)	Proteínas totais ( $\text{mg.mL}$ )
50	300	48	0,257
150	200	48	0,701
150	250	48	0,775
150	300	48	0,520
125	275	96	0,798
150	250	96*	0,851

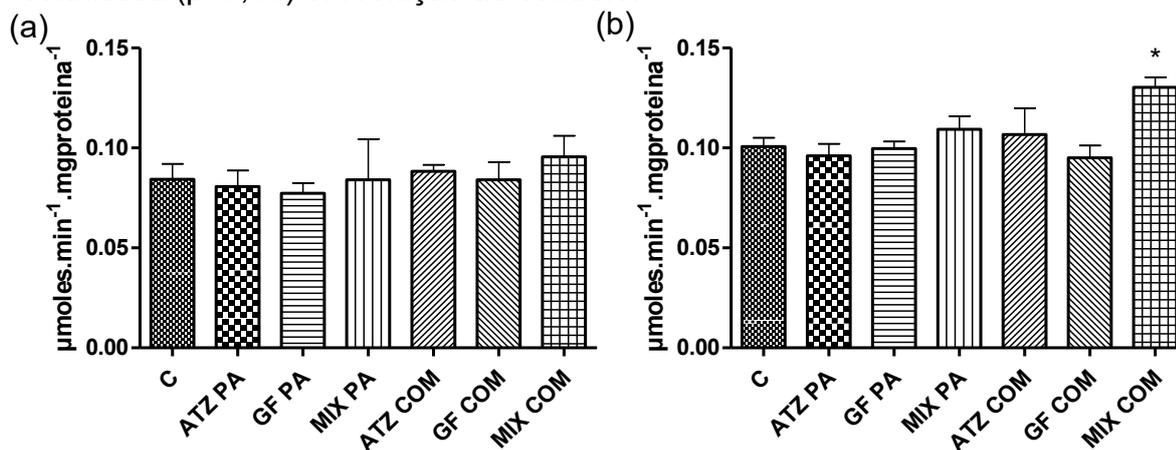
\* Para este ensaio houve a necessidade de diluição da amostra, uma vez que o valor obtido de proteínas totais ultrapassou o valor máximo da curva de calibração de proteínas.

Fonte: A autora.

Após a realização dos ensaios, os biomarcadores correspondentes as atividades de acetilcolinesterases, catalases e superóxido dismutases não foram consideradas para apresentação neste trabalho, uma vez que os dados apresentaram um coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) inferior a 95%, sendo necessárias adequações da metodologia para estes tempos de exposição.

As atividades de glutathiona S-transferases foram determinadas (Figura 14), e observou-se que após o período de exposição de 48 h, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos avaliados. Entretanto, após o período de exposição de 96 h, o tratamento composto pela mistura dos produtos comerciais dos herbicidas apresentou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao controle.

**Figura 14:** Atividades enzimáticas de glutathiona S-transferases (média  $\pm$  DP) obtidas após (a) 48 e (b) 96 horas de exposição de *Daphnia magna*, onde \* indica a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle.



Fonte: A autora.

As diferenças apresentadas entre os tratamentos compostos pelas misturas dos padrões analíticos e das formulações comerciais nos tempos de exposição de 48 e 96 horas demonstram que os efeitos podem ser dependentes do período de exposição. De acordo com Moreira (2017), na avaliação dos efeitos tóxicos de misturas devem ser incluídos aspectos de toxicocinética e toxicodinâmica, indicando a necessidade de compreender a toxicidade implícita e a via de desintoxicação de xenobióticos, além destes mecanismos também serem diferentes de acordo com as concentrações de misturas de pesticidas e em diferentes organismos-teste.

### 5.5.2 Avaliação de biomarcadores bioquímicos após exposição crônica

Dentre os biomarcadores bioquímicos avaliados após a exposição crônica dos organismos aos compostos, nas suas respectivas gerações, a determinação das atividades de superóxido dismutases e acetilcolinesterases também não foram consideradas para apresentação neste trabalho, uma vez que os dados correspondentes a relação da absorbância pelo tempo, apresentaram um coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) inferior a 95%, sendo necessária a adaptação da metodologia. Ainda, cabe ressaltar que para o grupo MIXCOM da terceira geração, não houve organismos suficientes para compor a triplicata, logo, não foram determinados os biomarcadores bioquímicos para este grupo, nesta geração. Para o grupo MIXPA, da terceira geração, os ensaios bioquímicos foram realizados em duplicata, também devido a mortalidade ocorrida no grupo durante o período de exposição de 21 dias.

A produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO) acarreta danos oxidativos, afetando a molécula de DNA, as proteínas e os lipídios, interrompendo processos fisiológicos celulares em diversos organismos vivos (YOON et al., 2019). A catalase, responsável pelos mecanismos antioxidantes, ao reduzir o conteúdo de peróxido de hidrogênio, age como biomarcador molecular auxiliando na avaliação dos efeitos de herbicidas, devido a sua atuação na desintoxicação de  $H_2O_2$  gerado sob condições normais de estresse (MONA et al., 2013).

Neste estudo, a atividade da catalase não apresentou diferença estatística ( $p > 0,05$ ) quando comparada ao controle na primeira geração avaliada (Figura 15). No entanto, para a segunda geração, a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparado

ao controle, ocorreu para os grupos ATZPA e MIXPA, enquanto que na terceira geração, a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao controle ocorreu somente para o grupo MIXPA. Além disso, através da análise dos dados por ANOVA – um critério, seguido de Tukey, não foi verificada diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os controles de todas as gerações avaliadas.

Neste estudo, pode-se inferir que organismos expostos apresentaram indícios de estresse oxidativo nos grupos em que foram verificadas as diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) em virtude do aumento da atividade desta enzima, destacando-se o grupo correspondente a mistura dos padrões analíticos dos herbicidas (MIXPA), que apresentou significância tanto na segunda quanto na terceira geração.

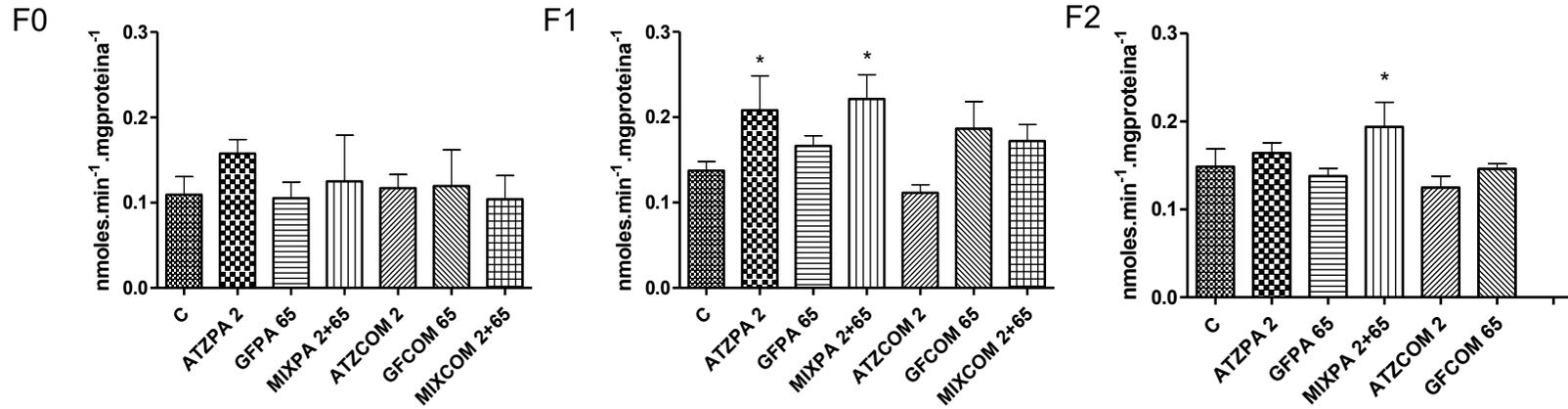
As glutathione S-transferases são amplamente estudadas quando referidas a herbicidas, devido a sua atuação em processos de desintoxicação contra xenobióticos (PERAGÓN; AMORES-ESCOBAR, 2018). Estas enzimas desempenham um papel importante na remoção do excesso de ERO, que causam estresse oxidativo em organismos vivos, sendo o aumento significativo na sua atividade já relatado como resposta a estressores ambientais em organismos aquáticos (YOON et al., 2019).

Neste trabalho, a atividade de glutathione S-transferases não apresentou diferença estatística ( $p > 0,05$ ) para a primeira geração avaliada (Figura 16). Para a segunda e terceira gerações, a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) ocorreu quando comparamos o controle com os grupos ATZPA, MIXPA e GFCOM.

No entanto, através da análise dos dados por ANOVA – um critério, seguido de Tukey, foi verificada diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os controles da segunda e terceira geração. Autores afirmam que a resposta de enzimas antioxidantes a produtos químicos apresenta uma tendência de aumento inicial, devido a ativação da síntese enzimática, seguido da redução ou inibição da atividade (VIARENGO et al., 2007; SÉGUIN et al., 2017).

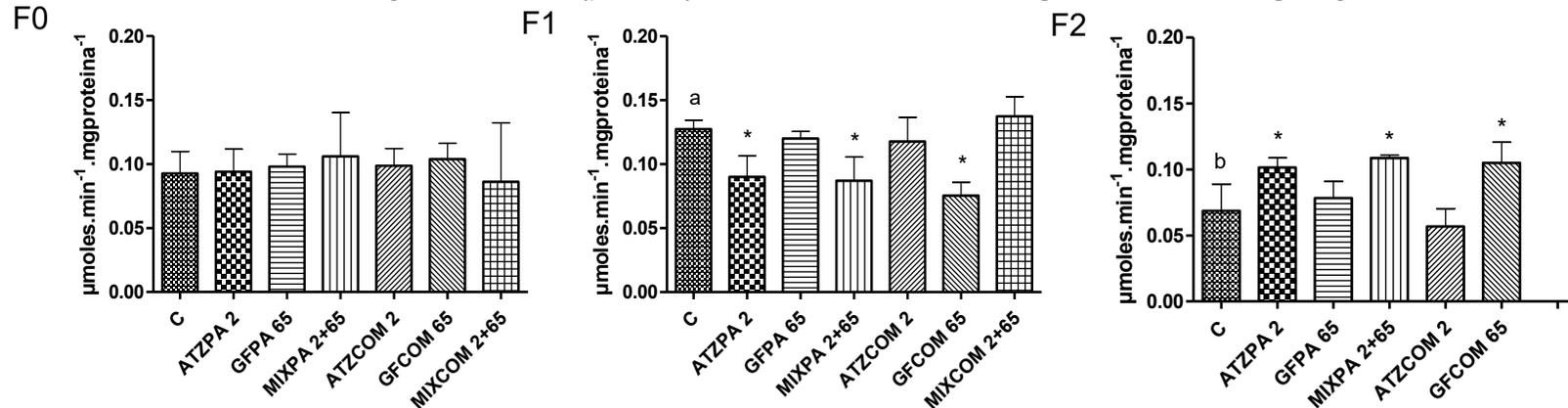
No estudo de Yoon et al. (2019), avaliando os artrópodos *Tigriopus japonicus*, foi verificado que as atividades de GST aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) nos grupos expostos a atrazina nas concentrações de 5 e 10 mg.L<sup>-1</sup>, entretanto para a concentração de 20 mg.L<sup>-1</sup> a atividade diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) em comparação ao controle.

**Figura 15:** Atividades enzimáticas de catalases (média  $\pm$  DP) para a primeira (F0), segunda (F1) e terceira (F2) geração de *D. magna* avaliadas após exposição crônica, onde \* indica a diferença estatística em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).



Fonte: A autora.

**Figura 16:** Atividades enzimáticas de glutiona S-transferases (média  $\pm$  DP) para a primeira (F0), segunda (F1) e terceira (F2) geração de *D. magna* avaliadas após exposição crônica, onde \* indica a diferença estatística em relação ao controle ( $p < 0,05$ ), e letras diferentes indicam a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os controles da segunda e terceira geração.



Fonte: A autora.

Contardo-Jara, Klingelmann e Wiegand (2009) não verificaram alterações na atividade de CAT após a exposição de *Lumbriculus variegatus* ao glifosato e sua formulação comercial, porém, quando avaliaram a enzima de biotransformação GST, foi observado um aumento significativo das atividades, para os dois tratamentos, na concentração de 0,05 mg.L<sup>-1</sup>. Os autores afirmam que, como a via bioquímica de atuação do glifosato é exclusiva de plantas e de alguns microrganismos, é esperado que a toxicidade para organismos não-alvo seja reduzida.

Séguin et al. (2017) observaram que as atividades de CAT avaliadas na glândula digestiva de *Crassostrea gigas* não variaram significativamente de acordo com as condições de exposição, entretanto, uma diferença significativa foi registrada quando ostras do grupo controle apresentaram uma atividade de CAT superior aos grupos expostos ao glifosato (0,1, 1 e 100 µg.L<sup>-1</sup>). Quanto as atividades de GST, houve diferença significativa apenas ao examinar as variações temporais. Dessa forma, os autores sugerem que herbicidas que contêm glifosato como ingrediente ativo não apresentam efeitos em decorrência das diferentes concentrações e condições testadas, sendo necessária a associação com outros biomarcadores para compreender os resultados.

Moreira (2017) avaliou concentrações ambientais dos pesticidas Kraft® 36 EC (abamectina) e Score® 250 EC (difenoconazol), isolados e em mistura, em organismos *D. magna*, e verificou que estes compostos quando isolados não causaram efeitos na atividade de catalase (CAT), mas as misturas promoveram aumento desta enzima. O mesmo foi observado neste estudo, uma vez que o efeito da mistura dos herbicidas foi significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) na atividade de CAT nos grupos expostos em relação ao controle, tanto na segunda quanto na terceira geração de *D. magna* avaliadas.

Santos e Martinez (2014), também avaliaram biomarcadores bioquímicos após exposição aos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura no molusco *Corbicula fluminea*, e não verificaram diferença estatística quando avaliada a enzima GST. No entanto, quando os mesmos autores avaliaram a enzima catalase da glândula digestiva, verificaram diferença estatística no grupo exposto ao glifosato na concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup> em relação ao grupo controle.

De acordo com Mesnage et al. (2015) os efeitos causados pela exposição ao herbicida glifosato, podem ser devido a ruptura endócrina e estresse oxidativo, resultando em alterações metabólicas, as quais dependem da concentração e do

tempo de exposição. Além disso, os efeitos tóxicos dos produtos comerciais, podem ser explicados pela presença de adjuvantes, que apresentam sua própria toxicidade, mas também podem aumentar a toxicidade dos princípios ativos, indicando que as formulações podem ser de maior relevância ecotoxicológicas (CONTARDO-JARA; KLINGELMANN; WIEGAND, 2009; CAVAS, 2011).

Alguns trabalhos relatam que as atividades de enzimas antioxidantes aumentam quando os organismos são expostos a baixas concentrações dos produtos químicos ou quando as exposições ocorrem em curto espaço de tempo, porém, podem diminuir ou serem inibidas quando os organismos são expostos a altas concentrações ou após uma exposição prolongada, dependendo da concentração testada (WANG; LU; CHANG, 2011; MOREIRA, 2017). Além disso, este efeito também pode ser resultado da hormese induzida por produtos químicos, a qual exhibe uma variação temporal, com um aumento inicial, seguido por um declínio (AGATHOKLEOUS; KITAO; CALABRESE, 2020). Efeitos induzidos por mistura de agroquímicos e outros contaminantes ambientais já foram relatados em diferentes sistemas, sendo os componentes de uma mistura responsáveis por efeitos antagônicos ou sinérgicos na resposta estimulatória (CHAMSI et al., 2019; AGATHOKLEOUS; KITAO; CALABRESE, 2020).

A influência nas atividades enzimáticas de CAT e GST em *D. magna* tem sido frequentemente relacionada à presença de contaminantes da classe de pesticidas, sendo os valores determinados para estas enzimas ligeiramente variados quando comparados os dados relatados em diversos estudos (RIVETTI et al., 2015). Este fato pode estar atrelado a vários fatores que podem causar variabilidade nestes parâmetros, como por exemplo, as espécies de algas utilizadas na alimentação, a idade e a ninhada dos organismos, e também as condições experimentais como temperatura e fotoperíodo (MOREIRA, 2017).

Analisando os resultados deste estudo, pode-se perceber que quanto aos biomarcadores bioquímicos avaliados após a exposição crônica, os efeitos passaram a ser significativos a partir da segunda geração de organismos expostos, o que demonstra a importância de avaliar concentrações próximas as detectadas nos ecossistemas, e como isso afeta os organismos através das gerações. Além disso, estes resultados evidenciam a necessidade de avaliar diversos biomarcadores bioquímicos após diferentes tempos de exposição, e sobretudo, que mesmo em concentrações ambientais, inferiores às concentrações normalmente avaliadas, é

possível obter uma resposta acerca do estresse oxidativo causado indiretamente a organismos não alvo.

## 5.6 ECOTOXICIDADE EMPREGANDO EMBRIÕES DE *Rhamdia quelen* COMO ORGANISMOS-TESTE

### 5.6.1 Sobrevivência de embriões de *Rhamdia quelen*

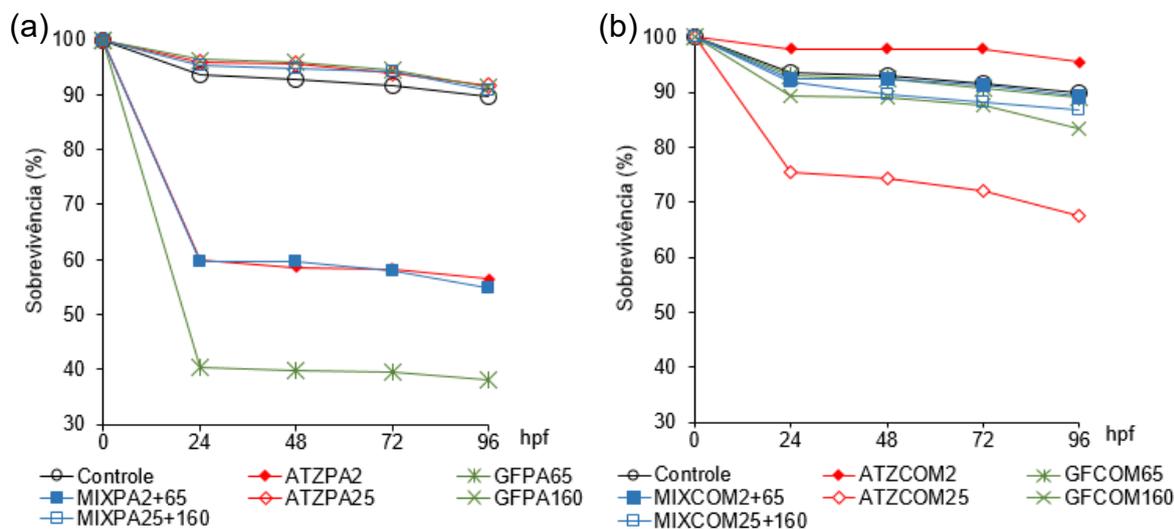
Peixes em fase inicial da vida são mais sensíveis ao estresse químico devido a sua maior taxa metabólica e ao seu sistema imunológico imaturo (AZEVEDO LINHARES et al., 2018). Nesse sentido, a sobrevivência dos embriões foi considerada através da observação de parâmetros como a coagulação e a ausência de batimentos cardíacos após 24, 48, 72 e 96 horas pós fertilização (hpf). Antes do nascimento, os embriões não viáveis se tornaram opacos (coagulados), e após a eclosão, foram identificados como mortos aqueles que não apresentavam nenhum tipo de movimento (SOBJAK et al., 2017). O grupo controle positivo ( $ZnSO_4 - 10 \text{ mg.L}^{-1}$ ) não apresentou nenhum organismo vivo após 72 horas de exposição.

A Figura 17 apresenta o percentual de sobrevivência obtido após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição para os grupos correspondentes aos padrões analíticos (a) e as formulações comerciais (b) dos herbicidas, na qual é possível observar que os grupos correspondentes aos padrões analíticos na menor concentração avaliada apresentaram uma mortalidade consideravelmente maior, quando comparada ao controle negativo (água reconstituída – ANEXO C) e aos demais grupos avaliados.

Analisando os resultados, percebe-se que os grupos ATZPA2, GFPA65 e MIXPA2+65, logo nas primeiras 24 horas, apresentaram um número expressivo de organismos coagulados, mas ao longo das observações a mortalidade foi estabilizada. Portanto, acredita-se que estes grupos possam ter sido influenciados no início da exposição, ou seja, no momento do preparo do experimento, uma vez que foram os primeiros grupos a serem expostos, tendo seu início apenas 5 horas após a fecundação. Quanto aos grupos correspondentes aos padrões analíticos na maior concentração avaliada, a sobrevivência foi semelhante e até minimamente superior ao percentual apresentado pelo grupo controle negativo. Os grupos representados pelos produtos comerciais dos herbicidas apresentaram percentuais de sobrevivência

semelhantes ao controle negativo, sendo o grupo ATZCOM25, o único a apresentar uma redução considerável de organismos vivos.

**Figura 17:** Percentual de letalidade dos organismos-teste *Rhamdia quelen*, obtido após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição ao controle negativo e aos padrões analíticos (a) e produtos comerciais (b) dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura.



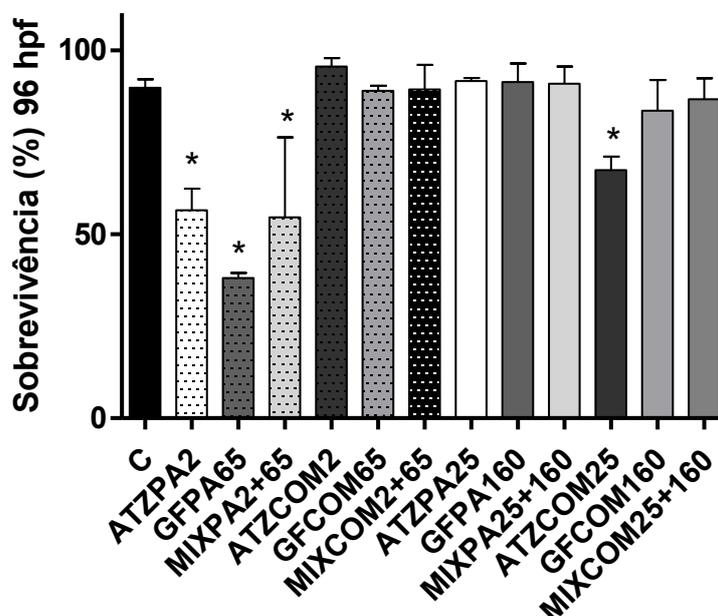
Fonte: A autora.

A Figura 18 apresenta o percentual de letalidade dos organismos *Rhamdia quelen* após 96 horas de exposição, onde através da análise dos dados foi verificada diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao controle negativo, para os grupos ATZPA2, GFPA65, MIXPA2+65 e ATZCOM25.

A diminuição da taxa de sobrevivência e o aumento das deformações podem ser favorecidos pelo desequilíbrio do sistema antioxidante (FOLLE et al., 2020), sendo a atrazina uma molécula identificada como desregulador endócrino e agente imunotóxico para algumas espécies de peixes (HEDAYATIRAD et al., 2020).

Ao avaliar concentrações realísticas de formulações comerciais dos herbicidas atrazina (2,5, 5, 10 e 15  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e glifosato (18, 36, 72 e 144  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), Persch et al. (2017) observaram que não houve mortalidade dos peixes durante o procedimento experimental, confirmando que estas concentrações são subletais para juvenis de *Rhamdia quelen*. Este fato demonstra a importância de também avaliar o período embrio-larval desta espécie, uma vez que neste estudo, foram avaliadas concentrações próximas as estudadas por Persch et al. (2017) e foi verificada a mortalidade significativa dos organismos expostos ao grupo ATZCOM (25  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ).

**Figura 18:** Percentual de sobrevivência dos organismos-teste *Rhamdia quelen*, obtido após 96 horas de exposição ao controle negativo e aos padrões analíticos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura.



Onde \* indica a diferença estatística em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora.

Mer et al. (2013) não observaram efeitos significativos na sobrevivência de peixes *Gasterosteus aculeatus* expostos por 42 dias aos padrões analíticos de atrazina e glifosato, nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , porém, os autores não avaliaram a mistura destes herbicidas. Embora *R. quelen* não seja considerada uma espécie-alvo, também pode sofrer efeitos nocivos em decorrência da interação entre os herbicidas atrazina e glifosato (ADEYEMI; MARTINS-JUNIOR; BARBOSA, 2015; PERSCH et al., 2017).

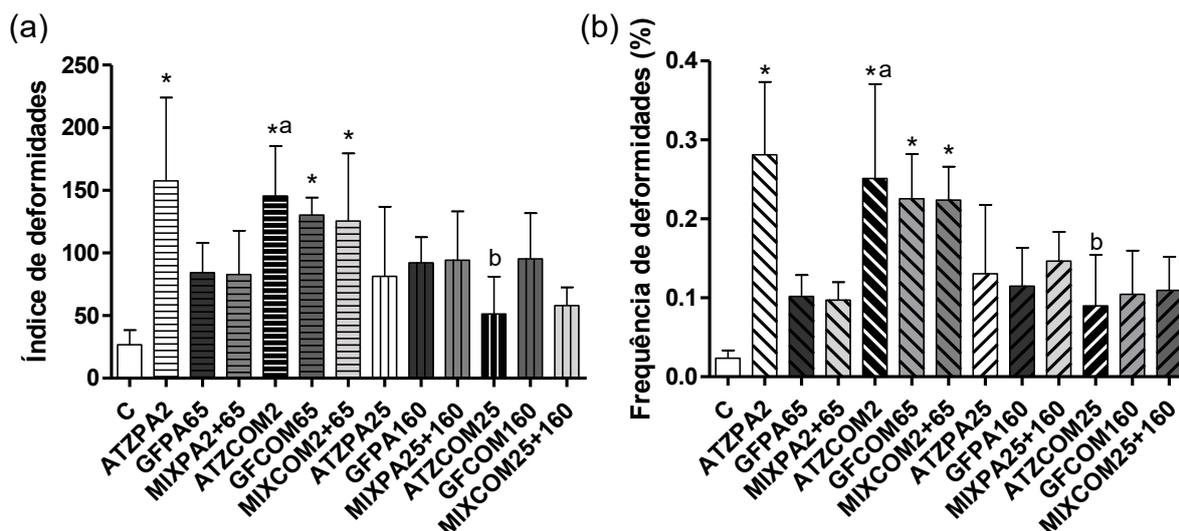
Além disso, xenobióticos como os herbicidas, podem promover resistência dos organismos quando expostos por longos períodos, resultando em efeitos subletais e levando a redução da longevidade das populações (SOBJAK et al., 2017). Séguin et al. (2017) investigaram os efeitos da exposição subcrônica de *Crassostrea gigas* ao glifosato, e observaram baixas taxas de mortalidade, no entanto, verificaram que parâmetros como o crescimento da casca e a reprodução são muito informativos e podem ser priorizados ao estudar exposições crônicas e o biomonitoramento de ecossistemas.

### 5.6.2 Índice e frequência de deformidades em embriões de *Rhamdia quelen*

Em virtude das deformidades obtidas no início do desenvolvimento embrionário, as fases seguintes do ciclo de vida desses organismos, que envolvem a locomoção, a busca por alimentos e a defesa, podem ser comprometidas devido a desvantagem na competição com organismos que não foram afetados (BARRERA, 2013; LI et al., 2018; BLAHOVA et al., 2020a).

Nesse sentido, o índice e a frequência de deformidades totais foram analisados, sendo possível concluir que os grupos ATZPA2, ATZCOM2, GFCOM65 e MIXCOM2+65 apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle negativo, e os grupos ATZCOM2 e ATZCOM25 apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre si (Figura 19). Diante das avaliações, identificou-se que os grupos que apresentaram maior frequência de deformidades, foram também os grupos que apresentaram maior percentual de sobrevivência, exceto o grupo ATZPA2.

**Figura 19:** Índice de deformidades totais (a) e frequência de deformidades totais (b) obtidos para as amostras relacionadas ao controle negativo e aos padrões analíticos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura.



Onde \* indica a diferença estatística em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ) e letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora.

Dentre as deformidades observadas nos embriões de *Rhamdia quelen* ao longo do experimento, os danos axiais, como lordose, escoliose e cifose, e os danos nas nadadeiras foram os mais frequentes, em contrapartida, edemas cardíaco e do

saco vitelínico, enrolamento caudal, atraso na formação do barbilhão e deformidades faciais foram danos observados com menor frequência (Tabela 5).

**Tabela 5:** Frequência de embriões de *Rhamdia quelen* apresentando cada tipo de deformidade (cefálica, nadadeiras, axial e tórax/abdômen) após 96 horas de exposição aos padrões analíticos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura.

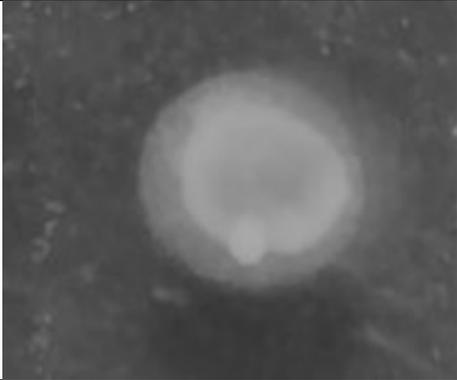
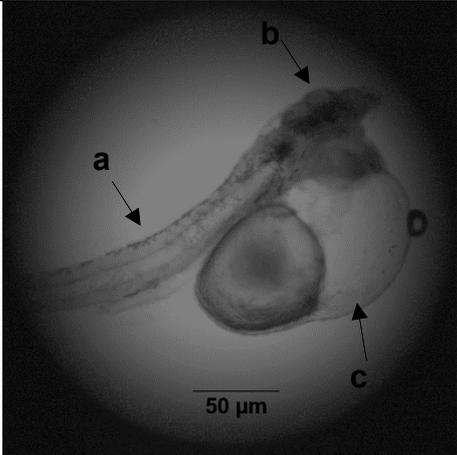
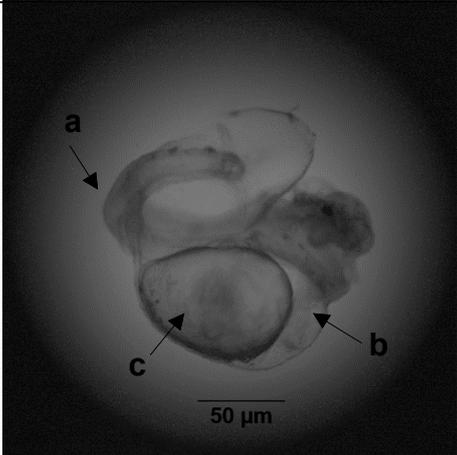
Grupo	Cefálica	Nadadeiras	Axial	Tórax/Abdômen
C	0,00	1,66	0,29	0,57
ATZCOM 2	2,88	22,93	3,13	0,51
ATZCOM 25	2,16	10,16	0,35	1,81
ATZPA 2	6,61	44,53	3,98	3,69
ATZPA 25	1,36	10,66	1,89	0,55
GFCOM 65	1,96	16,07	2,80	0,00
GFCOM 160	1,15	9,93	1,72	0,27
GFPA 65	1,98	24,34	3,32	1,96
GFPA 160	1,32	8,33	3,80	0,27
MIXCOM 2+65	2,61	17,38	5,36	4,29
MIXCOM 25+160	0,58	8,74	3,76	0,84
MIXPA 2+65	3,01	13,61	3,06	1,98
MIXPA 25+160	1,10	11,49	3,78	1,62

Fonte: A autora.

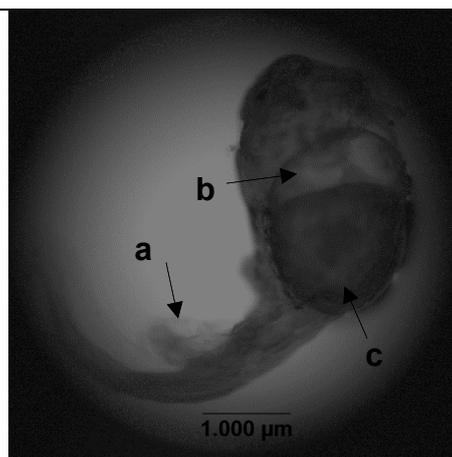
A Tabela 6 apresenta algumas das deformidades morgológicas observadas no decorrer do experimento, em embriões de *Rhamdia quelen* após a exposição aos padrões analíticos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura.

Devido a ação de contaminantes, a ocorrência de anormalidades morfológicas pode indicar distúrbios em processos como a multiplicação celular, a formação de tecidos, de órgãos e de sistemas, os quais acontecem durante o período de desenvolvimento embrio-larval (ADEYEMI; MARTINS-JUNIOR; BARBOSA, 2015; LI et al., 2018). Através da pesquisa em literatura recente, percebe-se a falta de trabalhos que abordam parâmetros morfológicos de embriões de *R. quelen*, e principalmente utilizando os herbicidas que avaliamos.

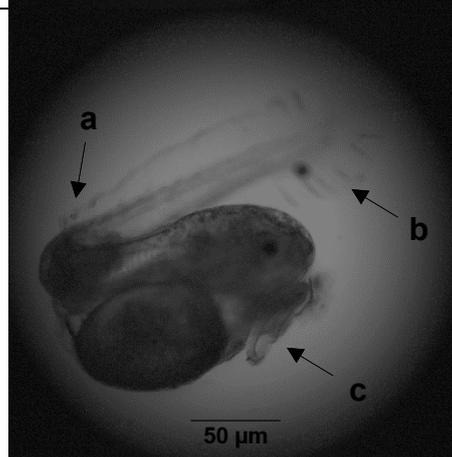
**Tabela 6:** Deformidades observadas em embriões de *Rhamdia quelen* após a exposição aos padrões analíticos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura.

Categoria	Deformidades observadas
Coagulação - 24 hpf	
Lordose (a), deformação facial (b), edema cardíaco (a) - 48 hpf	
Enrolamento caudal (a), edema cardíaco (b) e edema do saco vitelínico (c) - 48 hpf	

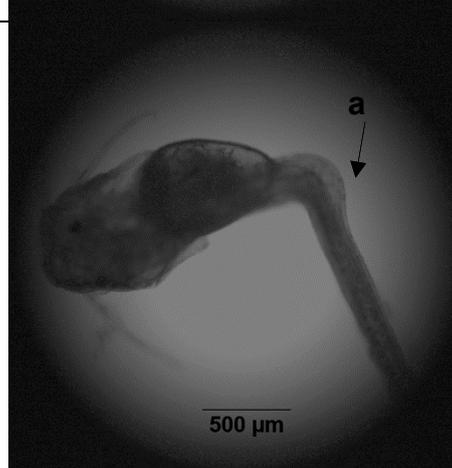
Lordose (a), edema cardíaco (b) e edema do saco vitelínico (c) - 48 hpf



Escoliose (a), dano na nadadeira (b) e atraso na formação de barbilhão (c) - 72 hpf



Escoliose (a) - 72 hpf



Embrião normal - 96 hpf



Fonte: A autora.

Hirano et al. (2019) avaliaram os efeitos dos mesmos herbicidas utilizados em nosso estudo, isolados e em mistura, ao organismo *Podocnemis unifilis*, e observaram resultados similares aos obtidos em nosso trabalho, ou seja, as taxas de malformações dos embriões diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) do controle, para os tratamentos compostos por atrazina ( $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) e pelas misturas dos dois herbicidas ( $2+65 \mu\text{g.L}^{-1}$  e  $200+6500 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), sendo as misturas responsáveis por efeitos sinérgicos na malformação embrionária. A exposição ao glifosato na forma de padrão analítico e em sua formulação comercial, já apresentou como efeito alterações morfológicas e comportamentais em larvas de *Danio rerio*, mesmo em concentrações próximas às ambientais ( $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) (BRIDI et al., 2017). A comparação entre condições de campo e de laboratório para exposição de longo prazo a formulação comercial do herbicida glifosato também já foi estudada. Isso resultou na identificação de alterações histopatológicas e ultraestruturais nas brânquias, no fígado e nos rins do peixe *Heteropneustes fossilis* (GHOSHA et al., 2016). Efeitos agudos (96 h) da exposição a formulação comercial do herbicida glifosato ( $0,36$  e  $3,62 \text{ mg.L}^{-1}$ ) também foram observados no peixe *Austrolebias nigrofasciatus*, indicando que este pesticida tem efeitos prejudiciais sobre a reprodução e o desenvolvimento embrionário desta espécie de peixes (ZEBRAL et al., 2018).

A anormalidade observada por Blahova et al. (2020a) quando avaliada a exposição de *Danio rerio* ao herbicida atrazina e seus produtos de degradação, foi edema pericárdico, o qual foi verificado após 72 e 96 horas da fertilização. Resultados similares foram observados em nosso estudo com embriões de *Rhamdia quelen*. A exposição crônica ao herbicida atrazina ( $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) também resultou na redução da ingestão de alimento, seguida por uma diminuição do peso corporal e alterações morfológicas nas brânquias do peixe *Cyprinus carpio* (BLAHOVA et al., 2020b).

O Rio Iguaçu – PR está sujeito, dentre tantas fontes, a contaminação por insumos de pesticidas devido a proximidade com as culturas agrícolas, principalmente de milho, trigo e soja (YAMAMOTO et al., 2016; SOUZA-BASTOS et al., 2017; SANTANA et al., 2018). Brito et al. (2018) avaliaram a exposição de embriões de *R. quelen* à água do Rio Iguaçu, e as principais deformidades morfológicas observadas foram alterações da coluna vertebral, como lordose e cifose, as quais afetam o sistema de locomoção, e edema cardíaco como principal deformidade torácica. Estes danos são os mesmos observados em nosso estudo, o que corrobora com a ideia de que estes efeitos podem ser causados pela exposição a pesticidas. Os autores

sugerem que estes efeitos, em estágios iniciais de desenvolvimento, podem acarretar na redução da densidade populacional, e ainda, pode ser considerado como determinante na avaliação do risco de extinção local de espécies de peixes.

A presença destas anormalidades pode levar a disfunções reprodutivas ou a morte, quando organismos são expostos cronicamente a esses contaminantes, em concentrações semelhantes às encontradas em ambientes naturais (PERSCH et al., 2017; HEDAYATIRAD et al., 2020). Estes organismos indicadores auxiliam no monitoramento da contaminação por pesticidas em ecossistemas aquáticos, sendo a reavaliação dos níveis toleráveis destes herbicidas em corpos hídricos um assunto a ser debatido e considerado (MELA et al., 2013; GHOSHA et al., 2016; BRIDI et al., 2017).

### 5.6.3 Biomarcadores bioquímicos em embriões de *Rhamdia quelen*

Os efeitos morfológicos, como as deformidades observadas, são geralmente precedidos por alterações bioquímicas ou moleculares (FOLLE et al., 2020). No entanto, como os ensaios foram realizados com amostras provenientes da desagregação dos embriões inteiros, não se pode afirmar quais tecidos foram mais afetados pela exposição aos herbicidas. Buscando uma resposta relativamente mais sensível, a Figura 20 apresenta os resultados da avaliação dos biomarcadores superóxido dismutase, catalase, glutathione S-transferase e acetilcolinesterase.

A enzima SOD é uma das primeiras a atuar na defesa contra ERO, pois catalisa a conversão de ânions superóxido em peróxido de hidrogênio, posteriormente desintoxicado pela enzima CAT (SANTOS; MARTINEZ, 2012; PIANCINI et al., 2015). O biomarcador SOD apresentou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle negativo para o grupo GFPA65, MIXPA2+65, MIXPA25+160 e ATZCOM25, diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos com padrões analíticos e produtos comerciais para GFPA65 e GFCOM65, MIXPA2+65 e MIXCOM2+65 e MIXPA25+160 e MIXCOM25+160, e ainda diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre a menor e maior concentração avaliada para GFPA65 e GFPA160. Jin et al. (2010) observaram o aumento da atividade de SOD no fígado do peixe *Danio rerio* exposto ao herbicida atrazina nas concentrações de 100 e 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Em nosso estudo, o aumento de SOD para os tratamentos contendo atrazina só foi observado para ATZCOM25, sendo

que, os grupos correspondentes a este herbicida não apresentaram respostas estatísticas ( $p > 0,05$ ) na avaliação deste biomarcador.

O biomarcador CAT apresentou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle negativo para os grupos GFPA160 e GFCOM160, e também diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos GFPA65 e GFPA160, indicando um efeito entre a menor e maior concentração avaliada do herbicida glifosato, como foi observado para SOD. O aumento da atividade de CAT nos grupos correspondentes ao herbicida glifosato, tanto PA quanto COM, na maior concentração ( $160 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), evidencia a geração de estresse oxidativo causado por este pesticida, uma vez que a elevação da atividade de CAT em peixes auxilia na desintoxicação do herbicida (DEY et al., 2016). Segundo Persch et al. (2017) organismos *Rhamdia quelen* têm a capacidade de ajustar suas defesas antioxidantes, incluindo as enzimas CAT e SOD, de modo que não sofram danos oxidativos quando expostos a formulações comerciais contendo atrazina (Primoleo®) e glifosato (Roundup®) como princípios ativos.

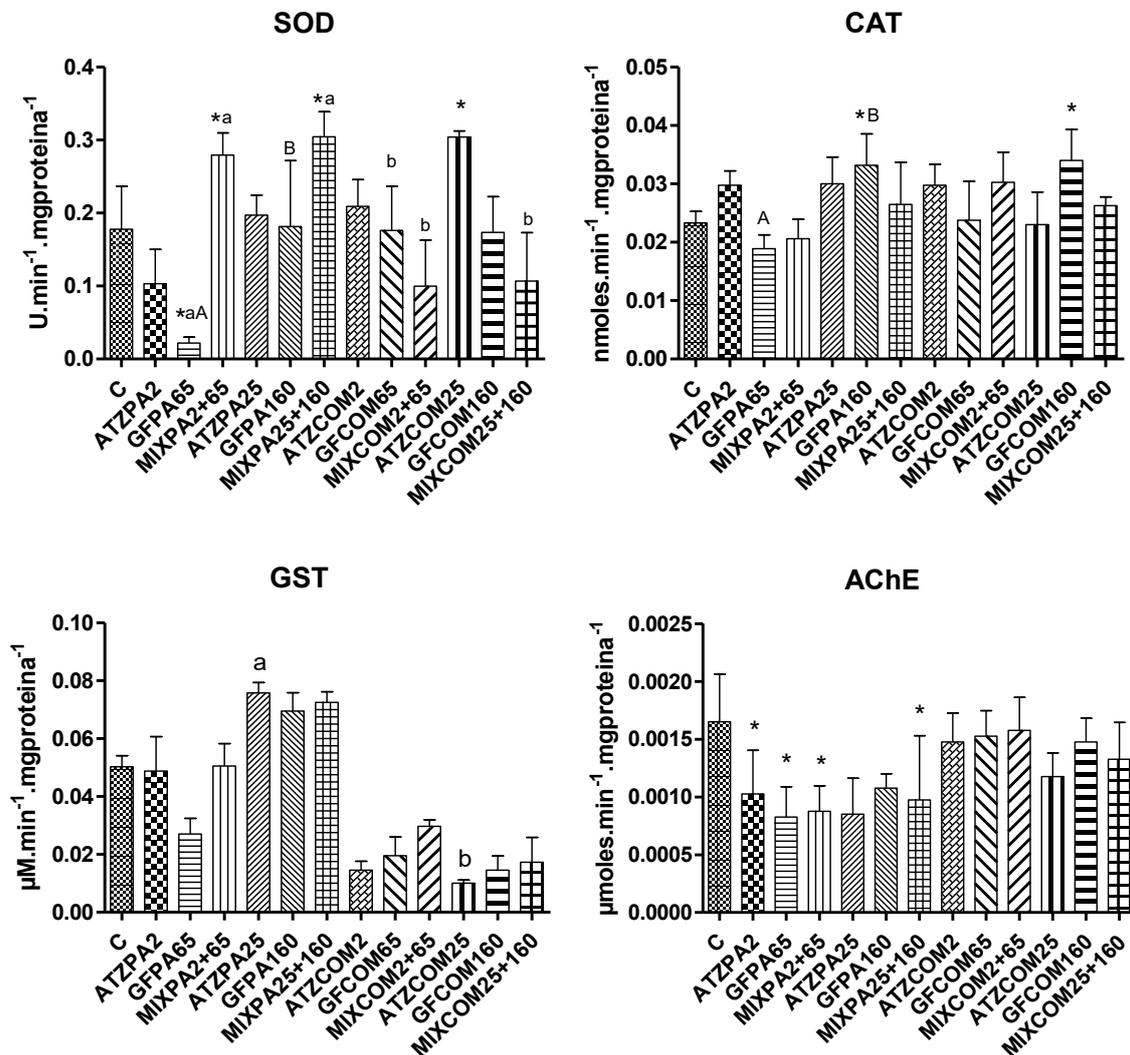
A atividade de CAT apresenta resultados variados, os quais podem ser influenciados por alterações antioxidantes devido a espécie ou órgão analisado (SOBJAK et al., 2017). Como observado por Persch et al. (2018), em relação ao estresse oxidativo causado a organismos *Rhamdia quelen*, os órgãos mais afetados pela exposição aos herbicidas Primoleo® e Roundup® foram fígado e rins.

A atividade de GST apresentou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos ATZPA25 e ATZCOM25, onde foi observada uma atividade elevada desta enzima no grupo correspondente ao padrão analítico em comparação ao grupo representado pelo produto comercial. O aumento da atividade de GST durante o período de exposição, expressa o aumento do processo de biotransformação do xenobiótico, apontando a ativação dos mecanismos de defesa (DEY et al., 2016). Entretanto, a presença de oxidantes pode ativar ou inibir essa enzima, dois efeitos tóxicos, sendo a diminuição da sua atividade responsável por afetar negativamente o processo de desintoxicação, podendo resultar em danos oxidativos (SÁNCHEZ et al., 2017).

O biomarcador de neurotransmissão AChE, apresentou diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle negativo para os grupos ATZPA2, GFPA65, MIXPA2+65 e MIXPA25+160. Considerando que os tratamentos compostos pelas menores concentrações dos padrões analíticos dos herbicidas apresentaram a maior mortalidade de embriões, a inibição da atividade deste biomarcador pode estar relacionada ao estresse causado nestes grupos. A inibição da atividade desta enzima

acarreta em danos ou atrasos no desenvolvimento do organismo, principalmente neste estágio inicial do ciclo de vida, resultando em uma desvantagem competitiva para a espécie (FOLLE et al., 2020).

**Figura 20:** Atividades enzimáticas de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa S-transferase (GST) e acetilcolinesterase (AChE), obtidas para os grupos controle negativo, padrões analíticos e produtos comerciais dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura.



Onde \* indica a diferença estatística em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ), letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos com padrões analíticos e produtos comerciais, e letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as maiores e menores concentrações de um mesmo tratamento.

Fonte: A autora.

Da mesma forma que em nosso trabalho, a inibição da atividade de AChE já foi relatada por Wang et al. (2015) quando avaliou a exposição de *Danio rerio* a atrazina (0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 e 1 mg.L<sup>-1</sup>), e efeitos neurotóxicos, devido às mudanças na atividade de AChE, também foram observados em embriões de *R. quelen* expostos ao glifosato (6,5 mg.L<sup>-1</sup>) (SOBJAK et al., 2017). Sánchez et al. (2017) concluíram que formulações comerciais de glifosato (0,5 mg.L<sup>-1</sup>) são tóxicas para o peixe *Jenynsia multidentata*, pois promovem estresse oxidativo e inibição da atividade de AChE.

Mela et al. (2013) também avaliaram a exposição (96 horas) de juvenis de *Rhamdia quelen* ao herbicida atrazina (2, 10 e 100 µg.L<sup>-1</sup>) e observaram a redução das atividades de SOD, CAT, GST e AChE no tratamento composto pela mesma concentração empregada em nosso estudo (2 µg.L<sup>-1</sup>). Os autores afirmam que a diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da atividade das enzimas antioxidantes avaliadas, a qual foi observada nos peixes expostos a este pesticida, pode refletir a toxicidade real a qual estão submetidos no ambiente. Barky et al. (2012) estudaram os efeitos dos mesmos herbicidas utilizados em nosso trabalho, mas utilizando os caramujos *Biomphalaria alexandrina*, e verificaram que as atividades de SOD, CAT e AChE foram reduzidas nos tratamentos compostos por atrazina (0,33 mg.L<sup>-1</sup>) e glifosato (0,84 mg.L<sup>-1</sup>) após exposição de 4 semanas. Ainda, concluíram que a poluição do meio aquático por esses agrotóxicos afeta adversamente o metabolismo dos organismos testados, tendo efeitos em sua reprodução.

A bioconcentração de produtos químicos é baseada principalmente em suas características físico-químicas, além da disposição fisiológica dos organismos e das condições ambientais, enquanto a bioacumulação de pesticidas pode ser influenciada por aspectos que envolvem a solubilidade do poluente e os processos metabólicos do organismo (DEY et al., 2016). Nesse sentido, a inibição ou o aumento da bioacumulação devido aos efeitos causados pela exposição a pesticidas, pode resultar na perda da capacidade de resposta para lidar com os estressores ambientais e para manter a homeostase (MOTTIER et al., 2015). Isso acarretaria, em longo prazo, em limitações reprodutivas, bem como, na redução do ciclo de vida dos organismos, alterando a estrutura das comunidades e mais drasticamente ocasionando a perda de biodiversidades (SOBJAK et al., 2017).

Um único biomarcador não pode estimar o processo de degradação ambiental, entretanto, um conjunto de biomarcadores pode fornecer uma base mais ampla de argumentação para estudos ecotoxicológicos (DEY et al., 2016; SÁNCHEZ et al.,

2017; VIEIRA et al., 2017; SANTANA et al., 2018). Os complexos mecanismos que ocorrem entre os constituintes de uma mistura podem afetar a toxicidade observada, nos desafiando a interpretar e avançar nos estudos sobre este tema.

Portanto, nossos resultados demonstram que os estágios iniciais da vida de vertebrados, especificamente os embriões de *Rhamdia quelen*, são pertinentes na avaliação da toxicidade de misturas de contaminantes. Através das diferentes análises, mostramos que tanto a atrazina quanto o glifosato podem ser potencialmente tóxicos, por apresentarem efeitos nesta etapa do ciclo de vida, mesmo em baixas concentrações.

## 6. CONCLUSÃO

Considerando a necessária utilização de produtos para o controle de pragas, o conhecimento dos efeitos de herbicidas em organismos não-alvo torna-se fundamental. Através da avaliação de diferentes modelos biológicos foi possível compreender de forma mais ampla como os organismos vivos são afetados. Tendo em vista que as concentrações avaliadas neste trabalho foram na ordem de  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , as respostas obtidas foram satisfatórias, indicando que os organismos não-alvo utilizados foram sensíveis, e são importantes para a determinação de aspectos ecotoxicológicos em concentrações relevantes, as quais estão presentes nos diversos compartimentos ambientais.

De forma geral, os bioindicadores avaliados neste estudo apresentaram sensibilidade diferente aos compostos, destacando-se a mistura dos produtos, assunto ainda escasso na literatura. Neste trabalho, as misturas tanto dos princípios ativos quanto das formulações comerciais dos herbicidas foram as responsáveis por mais respostas significativas ( $p < 0,05$ ) na avaliação do bioindicador *D. magna*. A mistura dos princípios ativos dos herbicidas na menor concentração testada destacou-se quando avaliado o bioindicador *A. cepa*, por ser o único grupo a apresentar resposta significativa ( $p < 0,05$ ) ao índice mutagênico. Quanto ao ensaio com *R. quelen*, a mistura das formulações comerciais dos herbicidas na menor concentração testada, foi o grupo que apresentou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) com relação ao índice e a frequência de deformidades em relação ao controle negativo, e os biomarcadores bioquímicos SOD, CAT, GST e AChE foram os parâmetros que tiveram respostas significativas ( $p < 0,05$ ) na maioria dos tratamentos.

Na natureza existem vários agentes estressores, portanto, é fundamental entender os efeitos causados devido a mistura de compostos químicos. As respostas apresentadas em nosso estudo podem ser consideradas como biomarcadores de poluição por herbicidas, além de gerarem dados de base para avaliações de risco ecológico de contaminantes ambientais.

## REFERÊNCIAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 12.648**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (*Chlophyceae*): NBR 12.648. Rio de Janeiro. 2018.

\_\_\_\_\_. **NBR 12.713**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (*Cladocera*, *Crustacea*): NBR 12.713. Rio de Janeiro. 2016.

ABRASCO - Associação Brasileira de Saúde Coletiva. **Dossiê ABRASCO: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Expressão Popular, Rio de Janeiro/São Paulo, 2015.

ADEYEMI, J.A.; MARTINS-JUNIOR, A.C.; BARBOSA, F. Teratogenicity, genotoxicity and oxidative stress in zebrafish embryos (*Danio rerio*) co-exposed to arsenic and atrazine. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 172-173, p. 7-12, 2015.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, p.121-126, 1984.

AGATHOKLEOUS, E.; KITAO, M.; CALABRESE, E. J. Hormesis: highly generalizable and beyond laboratory. **Trends in Plant Science**, 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Guia para elaboração de rótulo e bula de agrotóxicos, afins e preservativos de madeira**. Guia nº 12/2018 – Versão 1, 2018.

AGOSTINETO, M. C.; CARVALHO, L. B.; ANSOLIN, H. H.; ANDRADE, T. C. G. R.; SCHMIT, R. Sinergismo de misturas de glyphosate e herbicidas inibidores da PROTOX no controle de corda-de-violão. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 15, n. 1, p.8-15, 2016.

AHMAD, S. Antioxidant mechanisms of enzymes and proteins. In: AHMAD, S. (Ed.). **Oxidative stress and antioxidant defenses in biology**. New York: Chapman & Hall, p. 238-272, 1995.

ALONSO, L. L.; DEMETRIO, P. M.; ETCHEGOYEN, M. A.; MARINO, D. J. Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. **Science of the Total Environment**, v. 645, p.89-96, 2018.

ANDRADE, L. L.; PEREIRA, A. E. S.; FRACETO, L. F.; MARTINEZ, C. B. R. Can atrazine loaded nanocapsules reduce the toxic effects of this herbicide on the fish *Prochilodus lineatus*? A multibiomarker approach. **Science of the Total Environment**, v. 663, p.548-559, 2019.

ARANHA, R. C. **Potencial de toxicidade dos herbicidas glifosato e imazetapir em *Colossoma macropomum* (PISCES)**. 67 f. Dissertação (Mestrado), Programa de pós-graduação em recursos naturais da Amazônia - Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, 2013.

- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetylcholinesterase - AChE: A Pharmacological Interesting Enzyme. **Revista Virtual de Química**, v. 8, p.1818-1834, 2016.
- ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. T.; ANTUNES, P. M.; SANTOS, M. A. P. F.; CAMARGO, P. B. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1119-1127, 2007.
- ASSIS, H. C. S.; NAVARRO-MARTÍN, L.; FERNANDES, L.S.P.; CARDOSO, C.C.; PAVONI, D.P.; TRUDEAU, V.L. Cloning, partial sequencing and expression analysis of the neural form of P450 aromatase (cyp19a1b) in the South America catfish *Rhamdia quelen*. **Comparative biochemistry and physiology part B: Biochemistry and molecular biology**. v. 221-222, p. 11-17, 2018.
- AZEVEDO-LINHARES, M.; SOUZA, A.T.C.; LENZ, C.A.; LEITE, N. F.; BRITO, I.A.; FOLLE, N.M.T.; GARCIA, J.E.; FILIPAK NETO, F.; RIBEIRO, C.A. O. Microcystin and pyriproxyfen are toxic to early stages of development in *Rhamdia quelen*: an experimental and modelling study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 166, p. 311-319, 2018.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p.444-447, 2007.
- BAPTISTA, D. F.; BUSS, D. F.; EGLER, M. Macroinvertebrados como bioindicadores de ecossistemas aquáticos contaminados por agrotóxicos. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 151-168.
- BARA, J. J.; MONTGOMERY, A.; MUTURI, E. J. Sublethal effects of atrazine and glyphosate on life history traits of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 113, n. 8, p.2879-2886, 2014.
- BARATA, C., BAIRD, D.J., SOARES, A.M.V.M., GUILHERMINO, L. Biochemical factors contributing to response variation among resistant and sensitive clones of *Daphnia magna* Straus exposed to ethyl parathion. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.49, p.155-163, 2001.
- BARATA, C., VARO, I., NAVARRO, J.C., ARUN, S., PORTE, C. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. **Comparative biochemistry and physiology. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.140, p.175-186, 2005.
- BARKY, F.A.; ABDELSALAM, H.A.; MAHMOUD, M.B.; HAMDY, S.A.H. Influence of Atrazine and Roundup pesticides on biochemical and molecular aspects of *Biomphalaria alexandrina* snails. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 104, n. 1, p. 9-18, 2012.

BARRERA, E. A. L. **Avaliação dos efeitos da exposição de nanopartículas de prata em larvas de *Rhamdia quelen* e da coexposição com Benzo(a)pireno em indivíduos adultos**. 160 p. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação - Universidade Federal do Paraná, 2013.

BARROSO, A. L. L.; SHIMOHIRO, A. K.; DAN, H. A.; DAN, L. G. M.; ALMEIDA JÚNIOR, J. J.; PROCÓPIO, S. O.; BRAZ, G. B. P. Seletividade de associações herbicidas pós-emergentes em variedade de soja precoce. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.7, n.2, p. 36-42, 2008.

BASTOS, D. N. **Toxicidade do herbicida Glifosato em *Daphnia magna* e pós-larvas de *Rhamdia quelen***. 38 f. Dissertação (Mestrado). Centro de Engenharias e Ciências Exatas – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2013.

BATTAGLIN, W. A.; MEYER, M. T.; KUIVILA, K. M.; DIETZE, J. E. Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation, **Journal of the American Water Resources Association**, v. 50, p. 275-290, 2014.

BERMAN, M. C; MARINO, D. J. G.; QUIROGA, M. V.; ZAGARESE, H. Occurrence and levels of glyphosate and AMPA in shallow lakes from the Pampean and Patagonian regions of Argentina. **Chemosphere**, v. 200, p. 513-522, 2018.

BERTOLETTI, E. **Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no estado de São Paulo**. Série Manuais. 2 ed. São Paulo: CETESB, 2013.

BIANCHI, J.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**, v. 144, p.475-483, 2016.

BIANCHI, J.; MANTOVANI, M. S.; MARIN-MORALES, M. A. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. **Journal of Environmental Sciences**, v. 36, p.102-111, 2015.

BITENCOURT, F.; FRIGHETTO, R. T. S.; QUEIROZ, J. F.; LOSEKANN, M. E.; LUIZ, A. J. B.; ALMEIDA, E. A.; PALHARES, J. C. Enzimas de biotransformação em tilápia (*Oreochromis niloticus*) exposta ao hormônio natural 17 $\beta$ -estradiol. **Boletim de Pesquisa**, p. 1-32, 2011.

BLAHOVA, J.; COCILOVO, C.; PLHALOVA, L.; SVOBODOVA, Z.; FAGGIO, C. Embryotoxicity of atrazine and its degradation products to early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 77, p. 103370, 2020a.

BLAHOVA, J.; DOBSIKOVA, R.; ENEVOVA, V.; MODRA, H.; PLHALOVA, L.; HOSTOVSKY, M.; MARSALEK, P.; MARES, J.; SKORIC, M.; VECEREK, V. Comprehensive fitness evaluation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) after twelve weeks of atrazine exposure. **Science of the Total Environment**, v. 718, p. 135059, 2020b.

BOMBARDI, L. M., 1972 - **Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Europeia**. - São Paulo: FFLCH - USP, 296 p. 2017, revisado em 2019.

BONFLEUR, E. J. **Comportamento da associação entre os herbicidas glifosato e atrazina em um latossolo vermelho-escuro do bioma cerrado brasileiro**. 85 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. 2010.

BONFLEUR, E. J.; TORNISIELO, V. L.; REGINATO, J. B.; LAVORENTI, A. The effects of glyphosate and atrazine mixture on soil microbial population and subsequent impacts on their fate in a tropical soil. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, p.21, 2015.

BORDIN, E. R., CAMARGO, A. F., ROSSETTO, V., SCAPINI, T., MODKOVSKI, T. A., WEIRICH, S., CAREZIA, C., FRANCESCHETTI, M.; BALEM, A., GOLUNSKI, S., GALON, L., FUZINATTO, C. F., REICHERT JÚNIOR, F., FONGARO, G., MOSSI, A., TREICHEL, H. Non-Toxic Bioherbicides Obtained from *Trichoderma koningiopsis* Can Be Applied to the Control of Weeds in Agriculture Crops. **Industrial Biotechnology**, v. 14, n. 3, p.157-163, 2018.

BORTOLUZZI, E.C., RHEINHEIMER, D. D., GONÇALVES, C. S., PELLEGRINI, J. B. R., ZANELLA, R., COPETTI, A. C. C. 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**, v.10, n.4, p. 881-7, 2007.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRAGA, J. R. M.; LOPES, D. M. Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* L. como bioindicador. **Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 10, n. 1, p.130-140, 2015.

BRAIN, R. A.; SCHNEIDER, S. Z.; ANDERSON, J. C.; KNOPPER, L. D.; WOLF, J. C.; HANSON, M. L. Extended fish short term reproduction assays with the fathead minnow and Japanese medaka: No evidence of impaired fecundity from exposure to atrazine. **Chemosphere**, v. 205, p.126-136, 2018.

BRANDÃO, F.P.; PEREIRA, J.L.; GONÇALVES, F.; NUNES, B. The Impact of Paracetamol on Selected Biomarkers of the Mollusc Species *Corbicula fluminea*. **Environmental Toxicology**, v.29, p.74-83, 2011.

BRASIL, **Portaria MS nº 5**, de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL, **Resolução CONAMA nº357**, de 17 de março de 2005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. Publicado no D.O.U.

BRIDI, D.; ALTENHOFEN, S.; GONZALEZ, J. B.; REOLON, G. K.; BONAN, C. S. Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. **Toxicology**, v. 392, p.32-39, 2017.

BRILISAUER, K.; RAPP, J. RATH, P.; SCHOLLHORN, A.; BLEUL, L.; WEIB, E.; STAHL, M.; GROND, S.; FORCHHAMMER, K. Cyanobacterial antimetabolite 7-deoxy-sedoheptulose blocks the shikimate pathway to inhibit the growth of prototrophic organisms. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.

BRITO, I.A.; FREIRE, C.A.; YAMAMOTO, F.Y.; ASSIS, H.C.S.; BASTOS, L.R.S.; CESTARI, M.M.; GHISI, N.C.; PRODOCIMO, V.; NETO, F.F.; RIBEIRO, C.A.O. Monitoring water quality in reservoirs for human supply through multi-biomarker evaluation in tropical fish. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 14, n. 2, p.615-625, 2012.

BRITO, I.A.; GARCIA, J.R.E.; SALAROLI, A.B.; FIGUEIRA, R.C.L.; MARTINS, C.C.; CORDEIRO NETO, A.; GUSO-CHOUERI, P.K.; CHOUERI, R.B.; ARAUJO, S.B.L.; RIBEIRO, C.A.O. Embryo toxicity assay in the fish species *Rhamdia quelen* (Teleostei, Heptaridae) to assess water quality in the Upper Iguaçú basin (Paraná, Brazil). **Chemosphere**, v. 208, p. 207-218, 2018.

BRODEUR, J. C.; SASSONE, A.; HERMIDA, G. N.; CODUGNELLO, N. Environmentally-relevant concentrations of atrazine induce non-monotonic acceleration of developmental rate and increased size at metamorphosis in *Rhinella arenarum* tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 92, p.10-17, 2013.

BUARQUE, F. S.; SOARES, C. M. F.; MARQUES, M. N.; CAVALCANTI, E. B.; SOUZA, R. L.; LIMA, A. S. Monitoramento de Diuron e Atrazina na Bacia Hidrográfica do Rio Japaratinga. In: **3º Congresso Internacional da Água - RESAG**, 2018, Belo Horizonte. Contaminantes Ambientais, 2017. v. 1. p. 1-12.

BURGER, J.; DARMENCY, H.; GRANGER, S.; GUYOT, S. H. M.; MESSÉAN, A.; COLBACH N. Simulation study of the impact of changed cropping practices in conventional and GM maize on weeds and associated biodiversity. **Agricultural Systems**, v. 137, p.51-63, 2015.

CARLES, L.; GARDON, H.; JOSEPH, L.; SANCHÍS, J.; FARRÉ, M. ARTIGAS, J. Meta-analysis of glyphosate contamination in surface waters and dissipation by biofilms. **Environment International**, v. 124, p.284-293, 2019.

CARRETTA, L.; CARDINALI, A.; MAROTTA, E.; ZANIN, G.; MASIN, R. A new rapid procedure for simultaneous determination of glyphosate and AMPA in water at sub µg/L level. **Journal of Chromatography A**, v. 1600, p.65-72, 2019.

CAVAS, T. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 6, p.1431-1435, 2011.

CESAR, A.; SILVA, S. L. R.; SANTOS, A. R. **Testes de Toxicidade Aquática no Controle da Poluição**, 37 p. Universidade Santa Cecília - UNISANTA - Santos, São Paulo, Brasil, 1997.

CHAMSI, O.; PINELLI, E.; FAUCON, B.; PERRAULT, A.; LACROIX, L.; SÁNCHEZ-PÉREZ, J.M.; CHARCOSSET, J.Y. Effects of herbicide mixtures on freshwater microalgae with the potential effect of a safener. **Annales de Limnologie - International Journal of Limnology**, v. 55, p. 3, 2019.

CHEN, N; VALDES, D.; MARLIN, C.; BLANCHOU, H.; GUERIN, R.; ROUELLE, M.; RIBSTEIN, P. Water, nitrate and atrazine transfer through the unsaturated zone of the Chalk aquifer in northern France. **Science of the Total Environment**, v. 652, p.927-938, 2019.

CLEARY, J. A.; TILLITT, D. E.; SAAL, F. S. V.; NICKS, D. K.; CLAUNCH, R. A.; BHANDARI, R. K. Atrazine induced transgenerational reproductive effects in medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental Pollution**, v. 251, p.639-650, 2019.

CONTARDO-JARA, V.; KLINGELMANN, E.; WIEGAND, C. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 1, p.57-63, 2009.

CORDEAU, S.; TRIOLET, M.; WAYMAN, S.; STEINBERG, C.; GUILLEMIN, J. P. Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. **Crop Protection**, v. 87, p. 44-49, 2016.

COSTA, R.C; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.R.; ESPINDOLA, E.L.G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

CRUZEIRO, C., AMARAL, S., ROCHA, E., ROCHA, M. J. Determination of 54 pesticides in waters of the Iberian Douro River estuary and risk assessment of environmentally relevant mixtures using theoretical approaches and *Artemia salina* and *Daphnia magna* bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 145 p. 126-134, 2017.

CUHRA, M.; TRAAVIK, T.; BOHN, T. Clone- and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 2, p.251-262, 2013.

DEY, S.; SAMANTA, P.; PAL, S.; MUKHERJEE, A.K.; KOLE, D.; GHOSH, AR. Integrative assessment of biomarker responses in teleostean fishes exposed to glyphosate-based herbicide (Excel Mera 71). **Emerging Contaminants**, v. 2, n. 4, p. 191-203, 2016.

DORR, F. **Efeito do herbicida glifosato sobre o crescimento e produção de metabólitos secundários em *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii***. 2015. 198 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2015.

DRZYMAŁA, J.; KALKA, J. Elimination of the hormesis phenomenon by the use of synthetic sea water in a toxicity test towards *Aliivibrio fischeri*. **Chemosphere**, v. 248, p. 126085, 2020.

EHRSAM, M.; KNUTIE, S. A.; ROHR, J. R. The herbicide atrazine induces hyperactivity and compromises tadpole detection of predator chemical cues. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 9, p.2239-2244, 2016.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Prevenção e manejo da resistência a herbicidas. **Embrapa Trigo**. 2006. Disponível em: < [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do60\\_4.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do60_4.htm)>. Acesso em: 20 set. 2018.

\_\_\_\_\_. Plantas daninhas resistentes aumentam custo de produção de soja. **Embrapa Soja**. 2017. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/29194891/plantas-daninhas-resistentes-aumentam-custo-de-producao-de-soja>>. Acesso em: 20 set. 2018.

EUROPEAN COMMISSION. 1998. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. **Official Journal of the European Communities** 330:32– 54. Off J Eur Communities L 330:32–54.

FELISBINO, K.; SANTOS-FILHO, R.; PIANCINI, L. D. S.; CESTARI, M. M.; LEME, D. M. Mesotrione herbicide does not cause genotoxicity, but modulates the genotoxic effects of Atrazine when assessed in mixture using a plant test system (*Allium cepa*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 150, p.83-88, 2018.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p.252-259, 2007.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 6, p.1680-1686, 2009.

FERREIRA, L. R. **Avaliação do crescimento e determinação da concentração letal média (CL50) da espécie botânica *Ruta graveolens* L. e do fármaco nitazoxanida em vetor das principais arboviroses no Brasil, *Aedes aegypti***. 2018. 72f. Dissertação de Mestrado - Ciência e Tecnologia Ambiental – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

FOLLE, N.M.T.; AZEVEDO-LINHARES, M.; GARCIA, J.R.E.; SOUZA, A.T.C.; GRÖTZNER, S.R.; OLIVEIRA, E.C.; PAULIN, A.F.; LEITE, N.F.; FILIPAK NETO, F.; RIBEIRO, C.A.O. Low concentration of 2,4,6-tribromophenol (TBP) represents a risk to South American silver catfish *Ramdia quelen* (Quoy and Gaimard, 1824) population. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 187, p. 109815, 2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; INTERGOVERNMENTAL TECHNICAL PANEL ON SOILS. 2015. **Status of the World's Soil Resources (SWSR) - Main Report**. Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils, Rome, Italy.

FROTA, R. G.; AMORIM, A. S.; CARNEIRO, J. K. R.; OLIVEIRA, M. A. S. Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da infusão de *Plectranthus barbatus* – Lamiaceae (malva-santa) avaliada pelo sistema teste *Allium cepa*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 18, n. 1, p.67-72, 2019.

FUZINATTO, C. F. **Avaliação da qualidade da água de rios localizados na ilha de Santa Catarina utilizando parâmetros toxicológicos e o índice de qualidade de água**. 245 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

GABARDO, R. P. **Aplicação do método quechers no preparo de amostras de águas superficiais para determinação de atrazina, desisopropilatrizona (dia), desetilatrizona (dea) e carbendazim por Ic-dad**, 123 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2018.

GARCÍA-ESPIÑEIRA, M.; TEJEDA-BENITEZ, L.; OLIVERO-VERBEL, J. Toxicity of atrazine- and glyphosate-based formulations on *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, p.216-222, 2018.

GAZZIERO, D.L.P., ADEGAS, F.S., FORNAROLLI, D., VARGAS, L., KARAM, D., BALBINOT JUNIOR, A.A., VOLL, E. A warning about the glyphosate weed resistance. **Anais**. VI Congresso Brasileiro de Soja, Cuiabá, 2012.

GHISI, N. C.; OLIVEIRA, E. C.; PRIOLI, A. J. Does exposure to glyphosate lead to an increase in the micronuclei frequency? A systematic and meta-analytic review. **Chemosphere**, v. 145, p.42-54, 2016.

GHOSHA, A.; SAMANTA, P.; MUKHERJEE, A.; PAL, S.; KOLE, D. Toxic effects of glyphosate-based herbicide, Excel Mera 71 on gill, liver, and kidney of *Heteropneustes fossilis* under laboratory and field conditions. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 4, n. 3, p. 147-155, 2016.

GOMES, M.F.; PAULA, V.C.S.; MARTINS, L.R.R.; GARCIA, J.R.E.; YAMAMOTO, F.Y.; FREITAS, A.M. Sublethal effects of triclosan and triclocarban at environmental concentrations in silver catfish (*Rhamdia quelen*) embryos. **Chemosphere**, p. 127985, 2020.

GOUJON, E.; STA, C.; TRIVELLA, A.; GOUPIL, P.; RICHARD, C.; LEDOIGT, G. Genotoxicity of sulcotrione pesticide and photoproducts on *Allium cepa* root meristem. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 113, p.47-54, 2014.

GRAYMORE, M.; STAGNITTI, F.; ALLINSON, G. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. **Environment International**, v. 26, p.483-495, 2001.

GREEN, J. M. Current state of herbicides in herbicide-resistant crops. **Pesticides Management Science**, v.70, p. 1351–1357, 2014.

GRILLO, R.; SANTOS, N. Z. P.; MARUYAMA, C. R.; ROSA, A. H.; LIMA, R.; FRACETO, L. F. Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 231-232, p.1-9, 2012.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. São Paulo: **FUNPEC**, 2002.

GUILHERMINO, L.; LACERDA, M. N.; NOGUEIRA, A. J. A.; SOARES, A. M. V. M. In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. **The Science of the Total Environment**, v. 247, p. 137-141, 2000.

GUSTAVSSON, M.; KREUGER, J.; BUNDSCHUH, M.; BACKHAUS, T. Pesticide mixtures in the Swedish streams: Environmental risks, contributions of individual compounds and consequences of single-substance oriented risk mitigation. **Science of the Total Environment**, v. 598, p.973-983, 2017.

HAMADA, N. **Ensaio de toxicidade empregados na avaliação de efeitos no sistema de tratamento de esgotos e efluentes, ETE Suzano, e seu entorno, utilizando organismos aquáticos**. 75 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

HEDAYATIRAD, M.; MIRVAGHEFI, A.; NEMATOLLAHI, M.A.; FORSATKAR, M.N.; BROWN, C. Transgenerational disrupting impacts of atrazine in zebrafish: beneficial effects of dietary spirulina. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 230, p. 108685, 2020.

HIRANO, L.Q.L.; ALVES, L.S.; MENEZES-REIS, L.T.; MENDONÇA, J.S.; SIMÕES, K.; SANTOS, A.L.Q.; VIEIRA, L.G. Effects of egg exposure to atrazine and/or glyphosate on bone development in *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 182, p. 109400, 2019.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Manual para requerimento de avaliação ambiental: agrotóxico e afins**. Brasília: IBAMA, 2009.

\_\_\_\_\_. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Brasília: IBAMA. 2018. Disponível em: <<http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>> Acesso em: 27 nov. 2018.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ (IOC/Fiocruz). **Módulo 2 - Biologia do Aedes - Aedes aegypti**. Disponível em:< <http://auladengue.ioc.fiocruz.br/?p=72>>. Acesso em: 06 Fev. 2020.

JACQUET, M.; TILQUIN, M.; RAVANEL, P.; BOYER, S. Increase in Tolerance of *Aedes aegypti* Larvae (Diptera: Culicidae) to the Insecticide Temephos after Exposure to Atrazine. **African Entomology**, v. 23, n. 1, p.110-119, 2015.

JANSSENS, L.; STOKS, R. Stronger effects of Roundup than its active ingredient glyphosate in damselfly larvae. **Aquatic Toxicology**, v. 193, p.210-216, 2017.

JIN, Y.; ZHANG, X.; SHU, L.; CHEN, L.; SUN, L.; QIAN, H.; LIU, W.; FU, Z. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 78, n. 7, p. 846-852, 2010.

JUNQUEIRA, A. P. F. **Estudo do Potencial Clastogênico e Genotóxico do Extrato de *Piper cubeba* em Células de Roedores *in vivo***. 2006. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Saúde, Universidade José do Rosário Vellano Unifenas, Alfenas, 2006.

KEEN, J.; HABIG, W.; JAKOBY, W. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferase. **Journal of Biological Chemistry**. v. 251, p. 6183-8, 1976.

KIM, K.T., KLAINE, S.J., CHO, J., KIM, S.H., KIM, S.D. Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO<sub>2</sub> nanoparticles according to size fraction. **Science Total Environmental** v.408, p.2268-2272, 2010.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA/GTZ, 289 p. 2004.

KRENCHINSKI, F. H. **Glufosinate e associações com herbicidas em tecnologias de milho com o gene fosfinotricina acetyltransferase**. 89 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp, Botucatu, 2018.

LEE, B. Y.; CHOI, B. S.; KIM, M. S.; PARK, J. C.; JEONG, C. B.; HAN, J.; LEE, J.S. The genome of the freshwater water flea *Daphnia magna*: A potential use for freshwater molecular ecotoxicology. **Aquatic Toxicology**, v. 210, p.69-84, 2019.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - A case study. **Mutation Research/genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, n. 1, p.80-86, 2008.

LESCANO, M. R.; PIZZUL, L.; CASTILLO, M. D. P.; ZALAZAR, C. S. Glyphosate and aminomethylphosphonic acid degradation in biomixtures based on alfalfa straw, wheat stubble and river waste. **Journal of Environmental Management**, v. 228, p.451-457, 2018.

LI, A. J.; LAW, J.C.F.; CHOW, C.H.; HUANG, Y.; LI, K.; LEUNG, K.S.Y. Joint effects of multiple UV filters on *Zebrafish* embryo development. **Environmental science and technology**, v. 52, p. 9460-9467, 2018.

LIMA, M. G. F.; ROCHA, L. C.; SILVEIRA, G. L.; ALVARENGA, I. F. S.; VIEIRA, L. F. A. Nucleolar alterations are reliable parameters to determine the cytogenotoxicity

of environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 174, p.630-636, 2019.

LIMA, R. M. **Avaliação da radiação UVC, processos UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e foto-fenton na degradação do agrotóxico clorpirifós com acompanhamento da ecotoxicidade**. 2017. 94f. Dissertação de Mestrado - Ciência e Tecnologia Ambiental – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

LIU, S.; DING, R.; NIE, X. Assessment of oxidative stress of paracetamol to *Daphnia magna* via determination of Nrf1 and genes related to antioxidant system. **Aquatic Toxicology**, v. 211, p.73-80, 2019.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p.518-534, 2018.

LORO, V.L.; MURUSSI, C.; MENEZES, C.; LEITEMPERGER, J.; SEVERO, E.; GUERRA, L.; COSTA, M.; PERAZZO, G.X.; ZANELLA, R. Spatial and temporal biomarkers responses of *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Characiformes: characidae) from the middle rio Uruguai, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.13, p.569–578, 2015.

LOUGHLIN, C. M; CANOSA, I. S.; SILVEYRA, G. R.; GRECO, L. S. L.; RODRIGUEZ, E. M. Effects of atrazine on growth and sex differentiation, in juveniles of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 131, p.96-103, 2016.

MACHADO, C. S.; ALVES, R. I.S.; FREGONESI, B.M.; TONANI, K.A.A.; MARTINIS, B. S.; SIERRA, J.; NADAL, M.; DOMINGO, J. L.; MUNOZ, S. S. Chemical Contamination of Water and Sediments in the Pardo River, São Paulo, Brazil. **Procedia Engineering**, v. 162, p.230-237, 2016.

MACHADO, C. S.; FREGONESI, B. M.; ZAGUI, G. S.; MARTINIS, B. S.; MUNOZ, S. S. Atrazina na água fluvial: avaliação de risco à saúde humana pela exposição recreacional. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 7, n. 3, p.36, 2018.

MACIEL, C. F. S. **Perda por evaporação durante a pulverização hidráulica em diferentes condições meteorológicas**. 58 f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.

MACIEL, G. M.; INÁCIO, F. D.; NAKANISHI, A. B. S.; HAMINIUK, C. W. I.; CASTOLDI, R.; COMAR, J. F.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Response of *Ganoderma lucidum* and *Trametes* sp. To the herbicide picloram: Tolerance, antioxidants and production of ligninolytic enzymes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 105, p. 84-92. 2013.

MAHAPATRA, K; DE, S.; BANERJEE, S.; ROY, S. Pesticide mediated oxidative stress induces genotoxicity and disrupts chromatin structure in fenugreek (*Trigonella foenum - graecum* L.) seedlings. **Journal of Hazardous Materials**, v. 369, p.362-374, 2019.

- MAHLER, B. J.; METRE, P. C. V.; BURLEY, T. E.; LOFTIN, K. A.; MEYER, M. T.; NOWELL, L. H. Similarities and differences in occurrence and temporal fluctuations in glyphosate and atrazine in small Midwestern streams (USA) during the 2013 growing season. **Science of the Total Environment**, v. 579, p.149-158, 2017.
- MANSANO, A. S. **Efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran, isolados e em mistura, sobre organismos aquáticos e avaliação de risco ecológico**. 238 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.
- MARCUS, S. R.; FIUMERA, A. C. Atrazine exposure affects longevity, development time and body size in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, v. 91-92, p.18-25, 2016.
- MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, n. 3, p.469-474, 1974.
- MARTINS, C. X.; SALVADOR, P. M.; JESUS, J. D.; FERREIRA, L. F. R.; AMÉRICO, J. H. P.; TORRES, N. H.; Análise de atrazina em amostras de água e solo por cromatografia gasosa (GC-ECD). **Bioenergia em revista: diálogos**, v.3, n. 1, p. 128-138, 2014.
- MELA, M.; GUILOSKI, I.C.; DORIA, H.B.; RANDI, M.A.F.; RIBEIRO, C.A.O.; PEREIRA, L.; MARASCHI, A.C.; PRODOCIMO, V.; FREIRE, C.A.; ASSIS, H.C.S. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and environmental safety**. v. 93, p. 13-21, 2013.
- MENDONÇA, C. F. R. **Determinação de glifosato e AMPA nas águas superficiais da Bacia do Paraná 3**. 129 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.
- MER, C. L.; ROY, R. L.; PELLERIN, J.; COUILLARD, C. M.; MALTAIS, D. Effects of chronic exposures to the herbicides atrazine and glyphosate to larvae of the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 89, p.174-181, 2013.
- MERCADO, S. A. S.; CALEÑO, J. D. Q. Cytotoxic evaluation of glyphosate, using *Allium cepa* L. as bioindicator. **Science of the Total Environment**, v. 700, p.134452, 2020.
- MESNAGE, R.; DEFARGE, N.; VENDOMOIS, J. S.; SERALINI, G. E. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p.133-153, 2015.
- MILAN, M., DALLA ROVERE, G., SMITS, M., FERRARESSO, S., PASTORE, P., MARIN, M. G., MATOZZO, V. Ecotoxicological effects of the herbicide glyphosate in non-target aquatic species: Transcriptional responses in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Environmental Pollution**, 237, 442–451, 2018.

MONA, M. H.; GAAFAR, R. M.; HELAL, I. B.; OMRAN, N. E.; SALAMA, W. M. Evaluation of cytotoxic effects of atrazine and glyphosate herbicides on *Biomphalaria glabrata* snails. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, v. 66, p.68-75, 2013.

MONTIEL-LEÓN, J. M.; DUY, S. V.; MUNOZ, G.; BOUCHARD, M. F.; AMYOT, M.; SAUVÉ, S. Quality survey and spatiotemporal variations of atrazine and desethylatrazine in drinking water in Quebec, Canada. **Science of the Total Environment**, v. 671, p.578-585, 2019.

MORALES, M.; PLANELLÓ, R.; MARTÍNEZ-PAZ, P.; HERRERO, O.; CORTÉS, E.; MARTÍNEZ-GUITARTE, J.L.; MORCILLO, G. Characterization of Hsp70 gene in *Chironomus riparius*: expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 1, p. 150-158, 2011.

MOREIRA, R. A. **Efeitos dos agrotóxicos Kraft® 36 EC (Abamectina) e Score® 250 EC (Difenoconazol), isolados e em misturas, sobre organismos zooplantônicos**. 145 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

MOREIRA, R. A.; ARAUJO, G.S.; SILVA, A.R.R.G.; DAAM, M.A.; ROCHA, O.; SOARES, A.M.V.M.; LOUREIRO, S. Effects of abamectin-based and difenoconazole-based formulations and their mixtures in *Daphnia magna*: a multiple endpoint approach. **Ecotoxicology**, v.29, p.1486-1499, 2020.

MOTTIER, A.; SÉGUIN, A.; DEVOS, A.; PABIC, C. L.; VOISEUX, C.; LEBEL, J. M.; SERPENTINI, A.; FIEVET, B.; COSTIL, K. Effects of subchronic exposure to glyphosate in juvenile oysters (*Crassostrea gigas*): From molecular to individual levels. **Marine Pollution Bulletin**, v. 95, n. 2, p.665-677, 2015.

NAGY, K.; DUCA, R. C.; LOVAS, S.; CRETA, M.; SCHEEPERS, P. T. J.; GODDERIS, L.; ADAM, B. Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations. **Environmental Research**, v. 181, p.108926, 2020.

NAKAGOME, F. K., NOLDIN, J. A., RESGALLA JR., C. Toxicidade aguda e análise de risco de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura do arroz irrigado sobre o cladóceros *Daphnia magna*. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.16, p.93-100, 2006.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Summary for CID 2256, Atrazine**. Disponível em:

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Atrazine>>. Acesso em: 22 jan. 2020.

\_\_\_\_\_. **PubChem Compound Summary for CID 3496, Glyphosate**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate>>. Acesso em: 22 jan. 2020.

NATURE. A growing problem. Without careful stewardship, genetically engineered crops will do little to stop the spread of herbicide-resistant weeds. **Nature Editorial**, v.510, p.12, 2014.

NEIVERTH, C. A. Otimização de extração sólido fase método para determinação de atrazina por gas chromatography. **Ambiência**, v. 11, n. 2, p.475-482, 2015.

NONEMACHER, F.; GALON, L.; SANTIN, C. O.; FORTE, C. T.; FIABANE, R. C.; WINTER, F. L.; AGAZZI, L. R.; BASSO, F. J. M.; PERIN, R. R. K. Associação de herbicidas aplicados para o controle de plantas daninhas em soja resistente ao glyphosate. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 16, p.152-162, 2017.

OLIVEIRA NETO, A. M.; OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J.; ALONSO, D. G.; RAIMONDI, M. A.; SANTOS, G.; GEMELLI, A. Modalidades de aplicação e associações de herbicidas no controle de plantas daninhas em milho em espaçamento convencional e reduzido. **Ciências Agrárias**, v.32, p. 81-92, 2011.

OLIVEIRA, F. G.; LIROLA, J. R.; SALGADO, L. D.; MARCHI, G. H.; MELA, M.; PADIAL, A. A.; GUIMARAES, A. T. B.; CESTARI, M. M.; ASSIS, H. C. S. Toxicological effects of anthropogenic activities in *Geophagus brasiliensis* from a coastal river of southern Brazil: A biomarker approach. **Science of The Total Environment**, v. 667, p.371-383, 2019.

OLIVEIRA, L. L. D. **Biomarcadores enzimáticos e testes ecotoxicológicos na avaliação da toxicidade de fármacos em invertebrados aquáticos**. 279 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD/OCD). **Test - 211** - Guidelines for the testing of chemicals - *Daphnia magna* Reproduction, 2012.

\_\_\_\_\_. **Test - 236** - Fish embryo acute toxicity (FET) test, 2013.

OSORIO, F. H. T.; SILVA, L. F. O.; PIANCINI, L. D. S.; AZEVEDO, A. C. B.; LIEBEL, S.; YAMAMOTO, F. Y.; PHILIPPI, V. P.; OLIVEIRA, M. L. S.; MACHADO, C. F. O.; NETO, F. F.; CESTARI, M. M. ASSIS, H. C. S.; RIBEIRO, C. A. O. Water quality assessment of the Tubarão River through chemical analysis and biomarkers in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 9145-9160, 2013.

OUVERNEY, L. **Fases do *Aedes aegypti***. Disponível em: <<http://educaeaedes.federalcubatao.com.br/index.php/noticia/16-fases-do-aedes-aegypti>>. Acesso em: 05 fev. 2020.

PARK, K.; PARK, J.; KIM, J.; KWAK, I.S. Biological and molecular responses of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) to herbicide 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 151, n. 4, p. 439-446, 2010.

PAULA, V.C.S. **Avaliação dos efeitos de fotoprotetores em organismos aquáticos**. 94 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

PAYNE, J.F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W.; FANCEY, L.L. Acetylcholinesterase, and old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, p. 225-230, 1996.

PEAKALL, D.B. Animal biomarkers as pollution indicators. **Ecotoxicology series 1**. Chapman & Hall, London. 1992.

\_\_\_\_\_. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. **Ecotoxicology** v.3, p.157-160, 1994.

PEITER, G. C. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de glifosato e AMPA em águas**. 75 f. 2017. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Tecnologias de Bioprodutos Agroindustriais - Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2017.

PERAGÓN, J.; AMORES-ESCOBAR, M. T. Olive tree glutathione S-transferase and its response against the herbicides oxyfluorfen and glyphosate. **Scientia Horticulturae**, v. 231, p.194-200, 2018.

PEREIRA, E. A. O. **Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em amostras ambientais por cromatografia a líquido em fase reversa controlada por injeção sequencial**. 98 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

PERSCH, T.S.P.; SILVA, P.R.; SANTOS, S.H.D.; FREITAS, B.S.; OLIVEIRA, G.T. Changes in intermediate metabolism and oxidative balance parameters in sexually matured three-barbeled catfishes exposed to herbicides from rice crops (Roundup®, Primoleo® and Facet®). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 58, p. 170-179, 2018.

PERSCH, T.S.P.; WEIMER, R.N.; FREITAS, B.S.; OLIVEIRA, G.T. Metabolic parameters and oxidative balance in juvenile *Rhamdia quelen* exposed to rice paddy herbicides: roundup®, primoleo® and facet®. **Chemosphere**, v.174, p.98-109, 2017.

PIANCINI, L.D.S.; GUILOSKI, I.C.; ASSIS, H.C.S.; CESTARI, M.M. Mesotrione herbicide promotes biochemical changes and DNA damage in two fish species. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 1157-1163, 2015.

PIGNATI, W. A.; LIMA, F. A. N. S.; LARA, S. S.; CORREA, M. L. M.; BARBOSA, J. R.; LEÃO, L. H. C.; PIGNATTI, M. G. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p.3281-3293, 2017.

POIGER, T.; BUERGE, I. J.; BACHLI, A.; MULLER, M. D.; BALMER, M. E. Occurrence of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in surface waters in

Switzerland determined with on-line solid phase extraction LC-S/MS. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 2, p.1588-1596, 2016.

PORTIS, I. G.; FIGUEIREDO, F. R. G.; PENA, R. V.; HANUSCH, A. L.; SOUSA, L. P.; MACHADO, R. C.; SILVA, C. C.; CRUZ, A. D. Bioensaio citogenético para a caracterização da mutagenicidade e citotoxicidade da espécie *Choclhospermum regium*. **REFACER**, v. 5, n. 1, 2016.

POWERS, C.M., SLOTKIN, T.A., SEIDLER, F.J., BADIREDDY, A.R., PADILLA, S. Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior: Distinct roles for particle size, coating and composition. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 33, n. 6, p. 708-14, 2011.

RAMOS, C. I.; ROSINI, E. F.; VARGAS, R. R.; AZEVEDO, F. D. Macroinvertebrados aquáticos como bioindicadores da qualidade da água da bacia hidrográfica popucabotinhas, guarulhos (SP), **Revista Geociências UNG-Ser**, Guarulhos-SP, v. 17, n.1, 2018.

RELIGIA, P.; KATO, Y.; FUKUSHIMA, E. O.; MATSUURA, T.; MURANAKA, T.; WATANABE, H. Atrazine exposed phytoplankton causes the production of non-viable offspring on *Daphnia magna*. **Marine Environmental Research**, v. 145, p.177-183, 2019.

RIAZ, M. A.; POUPARDIN, R.; REYNAUD, S.; STRODE, C.; RANSON, H.; DAVID, J. P. Impact of glyphosate and benzo[a]pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics. **Aquatic Toxicology**, v. 93, n. 1, p.61-69, 2009.

RIVETTI, C.; CAMPOS, B.; FARIA, M.; CATALÀC, N. C.; MALIK, A.; MUÑOZ, I.; TAULER, R.; SOARES, A. M.V.M.; OSORIO, V.; PÉREZ, S.; GORGA, M.; PETROVI, M.; MASTROIANNI, N.; ALDA, M. L.; MASIÁ, A.; CAMPO, J.; PICÓ, Y.; GUASC, H.; BARCELÓ, D.; BARATA C. Transcriptomic, biochemical and individual markers in transplanted *Daphnia magna* to characterize impacts in the field. **Science of the Total Environment**, v. 503-504, p.200-212, 2015.

RODRIGUES, L. B. **Efeitos ecotoxicológicos do glifosato e formulações em diferentes organismos**. 2016. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, 2016.

RODRIGUES, S. R., CALDEIRA, C., CASTRO, B.B., GONÇALVES, F., NUNES, B.; ANTUNES, S.C. Cholinesterase (ChE) inhibition in pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) as environmental biomarker: ChE characterization and potential neurotoxic effects of xenobiotics. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v.99, p.181-188, 2011.

RODRÍGUEZ, Y. A.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO, J.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O.; FERREIRA, R. A. C.; FONTANETTI, C. S. *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. **Chemosphere**, v. 120, p.438-442, 2015.

SÁNCHEZ, J.A.A.; VARELA, A.S.; CORCINI, C.D.; SILVA, J.C.; PRIMEL, E.G.; CALDAS, S.; KLEIN, R.D.; MARTINS, C.M.G. Effects of Roundup formulations on biochemical biomarkers and male sperm quality of the livebearing *Jenynsia multidentata*. **Chemosphere**, v. 177, p. 200-210, 2017.

SANTANA, J. S. **Determinação de contaminantes emergentes em mananciais de água bruta e na água para consumo humano do Distrito Federal**. 118 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química – Universidade de Brasília. Brasília, 2013.

SANTANA, M. S.; YAMAMOTO, F. Y.; NETO, L. S.; NETO, F. F.; MACHADO, C.; F.; O.; RIBEIRO, C. A. O.; PRODOCIMO, M. M. Diffuse sources of contamination in freshwater fish: Detecting effects through active biomonitoring and multi-biomarker approaches. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 149, p.173-181, 2018.

SANTOS, K. C.; MARTINEZ, C. B. R. Genotoxic and biochemical effects of atrazine and Roundup®, alone and in combination, on the Asian clam *Corbicula fluminea*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 100, p.7-14, 2014.

SANTOS, T. G.; MARTINEZ, C. B.R. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. **Chemosphere**, v. 89, n. 9, p. 1118-1125, 2012.

SANTOS, T. T. M.; TIMOSSI, P. C.; LIMA, S. F.; GONÇALVES, D. C.; SANTANA, M. V. Associação dos herbicidas diclosulam e glyphosate na dessecação visando o controle residual de plantas daninhas na cultura da soja. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 15, n. 2, p.138-147, 2016

SÉGUIN, A.; MOTTIER, A.; PERRON, C.; LEBEL, J. M.; SERPENTINI, A.; COSTIL, K. Sub-lethal effects of a glyphosate-based commercial formulation and adjuvants on juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) exposed for 35 days. **Marine Pollution Bulletin**, v. 117, n. 1-2, p.348-358, 2017.

SERRANO-GARCÍA, L.; MONTERO-MONTOYA, R. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 38, p.38-45, 2001.

SILVA D. C. V. R., POMPÊO, M., PAIVA, T. C. B. **Ecologia de reservatórios e interfaces**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2015. p. 340-353.

SILVA, L.S.B.; CARDOSO, R.T.N.; FERNANDES, J.L.A.; SILVA, C.A.; EIRAS, A.E. Modelo Entomológico Determinístico sob Efeito da Pluviosidade para o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus*. **TEMA (São Carlos)**, v. 19, n. 2, p. 289-303, 2018.

SILVEIRA, G. L; LIMA, M. G. F.; REIS, G. B.; PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIEIRA, L. F. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p.359-367, 2017.

SILVEIRA, M.A.D.; RIBEIRO, D.L.; SANTOS, T.A.; VIEIRA, G.M.; CECHINATO, C.N.; KAZANOVSKI, M.; D'ARCE, L.P.G. Mutagenicity of two herbicides widely used

on soybean crops by the *Allium cepa* test. **Cytotechnology**, v. 68, p. 1215-1222, 2015.

SINGH, S.; KUMAR, V.; CHAUHAN, A.; DATTA, S.; WANI, A.; SINGH, N.; SINGH, J. Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. **Environmental Chemistry Letters**, v. 16, n. 1, p.211-237, 2017.

SOARES, A.F.S., LEAO, M.M.D., VIANNA, N.M.R., OLIVEIRA, S.M.A.C. Estimativa de risco de contaminação de mananciais por agrotóxicos utilizados em culturas de café. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, n.4, p.425-32, 2012.

SOBJAK, T.M.; ROMÃO, S.; NASCIMENTO, C.Z.; SANTOS, A.F.P.; VOGEL, L.; GUIMARÃES, A.T.B. Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of *Rhamdia quelen* fish. **Chemosphere**, v. 182, p. 267-275, 2017.

SOUSA, A. S.; DUAVI, W. C.; CAVALCANTE, R. M.; MILHOME, M. A. L.; NASCIMENTO, R. F. Estimated Levels of Environmental Contamination and Health Risk Assessment for Herbicides and Insecticides in Surface Water of Ceará, Brazil. **Bulletin Of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96, n. 1, p.90-95, 2015.

SOUZA-BASTOS, L.R.; BASTOS, L.P.; CARNEIRO, P.C.F.; GUILOSKI, I.C.; ASSIS, H.C.S.; PADIAL, A.A.; FREIRE, C.A. Evaluation of the water quality of the upper reaches of the main Southern Brazil river (Iguaçu river) through in situ exposure of the native siluriform *Rhamdia quelen* in cages. **Environmental Pollution**, v. 231, p. 1245-1255, 2017.

SRIVASTAVA, K.; MISHRA, K. K. Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 93, n. 1, p.8-12, 2009.

STARA, A.; KOUBA, A.; VELISEK, J. Biochemical and histological effects of sub-chronic exposure to atrazine in crayfish *Cherax destructor*. **Chemico-biological Interactions**, v. 291, p.95-102, 2018.

STRUGER, J.; THOMPSON, D.; STAZNIK, B.; MARTIN, P.; McDANIEL, T.; MARVIN, C. Occurrence of Glyphosate in Surface Waters of Southern Ontario. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 80, n. 4, p.378-384, 2008.

TREZZI M. M.; FELIPPI, C. L.; NUNES, A. L.; CARNIELETO, C. E.; FERREIRA, A. R. J. Eficácia de controle de plantas daninhas e toxicidade ao milho da mistura de foramsulfuron e iodosulfuron isoladamente ou em associação com atrazine e/ou clorpirifós. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 23, n. 4, p.653-659, 2005.

USEPA. **National Primary Drinking Water Regulations**, 2009. Document ID: EPA 816-F-09-004.

UTZIG, L. M.; LIMA, R. M. L.; GOMES, M. F.; RAMSDORF, W. A.; MARTINS, L. R. R.; LIZ, M. V.; FREITAS, A. M. Ecotoxicity response of chlorpyrifos in *Aedes aegypti* larvae and *Lactuca sativa* seeds after UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UVC oxidation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, p. 449-456, 2019.

VALLE, D.; BELINATO, T.A.; MARTINS, A.J. Controle químico de *Aedes aegypti*, resistência a inseticidas e alternativas. **Dengue: teorias e práticas**. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 93-126, 2015.

VAN BRUGGEN, A. H. C.; HE, M. M.; SHIN, K.; MAI, V.; JEONG, K. C.; FINCKH, M. R.; MORRIS, J. G. Jr. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Science of the Total Environment**, v. 616-617, p.255-268, 2018.

VELÍK, J.; BALIHAROVÁ, V.; GREMMELS, J. F.; BULL, S.; LAMKA, J.; SKÁLOVÁ, L. Benzimidazole drugs and modulation of biotransformation enzymes. **Research in Veterinary Science**, v. 76, p.95-108, 2004.

VENTURA, B. C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste**. 2004. 133 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro - SP, 2004.

VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 3, p.281-300, 2007.

VIEIRA, C. E. D., COSTA, P. G., CABRERA, L. C., PRIMEL, E. G., FILLMANN, G., BIANCHINI, A.; BUENO DOS REIS MARTINEZ, C. A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: Implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 598–609, 2017.

WANG, H.; MU, S.; ZHANG, F.; WANG, H.; LIU, H.; ZHANG, H.; KANG, X. Effects of Atrazine on the Development of Neural System of Zebrafish, *Danio rerio*. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 1-10, 2015.

WANG, K. S.; LU, C. Y.; CHANG, S. H. Evaluation of acute toxicity and teratogenic effects of plant growth regulators by *Daphnia magna* embryo assay. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, n. 1-3, p.520-528, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. **Environmental Health Criteria**, v. 155, n. 106, p. 82, Geneva, 1993.

\_\_\_\_\_. **Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides**. 1981.

XIONG, Q.; SHI, Y.; LU, Y.; PEN K.; DAKHIL, M. A.; ZHANG, L.; XIAO, Y. Sublethal or not? Responses of multiple biomarkers in *Daphnia magna* to single and joint

effects of BDE-47 and BDE-209. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 164, p.164-171, 2018.

XU, Y.; LI, A. J.; LI, K.; QIN, J.; LI, H. Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development and growth of invasive snail (*Pomacea canaliculata*). **Aquatic Toxicology**, v. 193, p.136-143, 2017.

YAMAMOTO, F.Y.; PEREIRA, M.V.M.; LOTTERMANN, E.; SANTOS, G.S.; STREMEL, T.R.O.; DORIA, H.B.; GUSSO-CHOUERI, P.; CAMPOS, S.X.; ORTOLANI-MACHADO, C.F.; CESTARI, M.M.; FILIPAK NETO, F.; AZEVEDO, J.C.R.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Bioavailability of pollutants sets risk of exposure to biota and human population in reservoirs from Iguaçú River (Southern Brazil). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 1-18, 2016.

YANG, H. B.; ZHAO, Y. Z.; TANG, Y.; GONG, H. Q.; GUO, F.; SUN, W. H.; LIU, S. S.; TAN, H.; CHEN, F. Antioxidant defence system is responsible for the toxicological interactions of mixtures: A case study on PFOS and PFOA in *Daphnia magna*. **Science of the Total Environment**, v. 667, p.435-443, 2019.

YOON, D. S.; PARK, J. C.; PARK, H. G.; LEE, J. S.; HAN, J. Effects of atrazine on life parameters, oxidative stress, and ecdysteroid biosynthetic pathway in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. **Aquatic Toxicology**, v. 213, p.105213, 2019.

YORK A.C.; BEAM J.B.; CULPEPPER A.S. Weed science: Control of volunteer glyphosate-resistant soybean in cotton. **Journal of Cotton Science**, v.9 p.102–109, 2005.

ZAGATTO, P.A. Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações. **Anais. IV Seminário sobre Ecotoxicologia**. 2015.

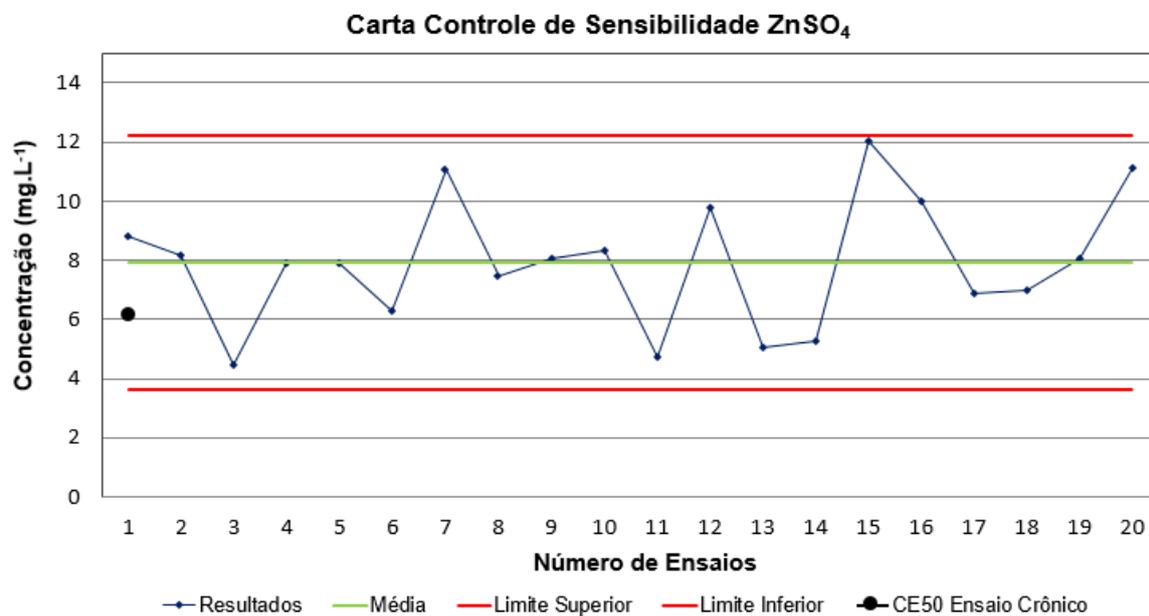
ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. Editora Rima, São Carlos, SP. 478 p. 2006.

ZAGONEL, J.; FERNANDES, E. C. Controle de plantas daninhas e seletividade do herbicida tembotrione na cultura do milho. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.6, n. 2, p.42-49, 2007.

ZEBRAL, Y.D.; LANSINI, L.R.; COSTA, P.G.; ROZA, M.; BIANCHINI, A.; ROBALDO, R.B. A glyphosate-based herbicide reduces fertility, embryonic upper thermal tolerance and alters embryonic diapause of the threatened annual fish *Austrolebias nigrofasciatus*. **Chemosphere**, v. 196, p. 260-269, 2018.

ZOCCHI, M.; SOMMARUGA, R. Microplastics modify the toxicity of glyphosate on *Daphnia magna*. **Science of the Total Environment**, v. 697, p.134194, 2019.

**APÊNDICE A - Carta Controle de sensibilidade de *Daphnia magna* ao sulfato de zinco elaborada no período de 2019 e 2020.**



Ensaio	Data	CE <sub>50-48h</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )
1	12/06/2019	8,80
2	13/06/2019	8,15
3	14/08/2019	4,47
4	21/08/2019	7,91
5	24/08/2019	7,91
6	27/08/2019	6,30
7	10/09/2019	11,07
8	27/09/2019	7,45
9	01/10/2019	8,05
10	08/10/2019	8,34
11	12/10/2019	4,73
12	15/10/2019	9,76
13	18/10/2019	5,07
14	06/11/2019	5,26
15	08/11/2019	12,06
16	12/11/2019	10,00
17	02/12/2019	6,98
18	13/02/2020	6,89
19	14/02/2020	8,05
20	16/02/2020	11,10

## APÊNDICE B - Parecer emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UTFPR) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná

13/09/2019

SEI/UTFPR - 1052387 - Parecer



Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS



PARECER: 20-2019/2019 - CEUA  
PROCESSO Nº: 23064.040940/2019-19  
INTERESSADO: WANESSA ALGARTE RAMSDORF NAGATA

Dois Vizinhos, 12 de Setembro de 2019.

DADOS DO PROJETO / AULA PRÁTICA	Protocolo nº 2019-20
Título: Avaliação ecotoxicológica dos herbicidas atrazina e glifosato em embriões de <i>Rhamdia quelen</i>	
Pesquisador / Professor: Prof. Wanessa Algarte Ramsdorf Nagata	
Área temática: Ciências Ambientais	
Instituição: UTFPR/ (campus) : UTFPR - Curitiba	
Financiamento: Não há financiamento	
PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA	Data da relatoria: 10/09/2019
<p><b>Apresentação do Projeto / Aula prática:</b></p> <p>A pesquisa pretende determinar os potenciais toxicológicos dos herbicidas atrazina e glifosato das seguintes formas: (i) isolados e (ii) de suas misturas. Posteriormente relacionar os resultados obtidos a fatores estressores ao organismo-teste (<i>Rhamdia quelen</i>) como uma alternativa importante para auxiliar no gerenciamento e no controle destes produtos.</p> <p>A pesquisadora espera com a pesquisa contribuir com a área de ecotoxicologia relacionada ao monitoramento de associação de herbicidas.</p>	
<p><b>Objetivo geral:</b></p> <p>Avaliar a ecotoxicidade dos herbicidas atrazina e glifosato, isolados e em mistura, empregando embriões de <i>Rhamdia quelen</i>.</p> <p><b>Objetivos específicos:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Verificar as taxas de mortalidade e anomalias morfológicas a cada 24 horas de exposição;</li> <li>2. Avaliar ao final da exposição de 96 horas, as atividades enzimáticas de acetilcolinesterase, glutatona S-transferase e catalase.</li> </ol>	
<p><b>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</b></p> <p><b>Riscos:</b>Relacionado aos riscos ou possibilidades de ocorrências referentes aos organismos-teste, serão tomadas todas as medidas para evitar possíveis fatores estressores em função do manuseio incorreto, pois o intuito é verificar efeitos oriundos da exposição as amostras que serão avaliadas. Quanto aos riscos de contaminação dos pesquisadores envolvidos e do meio ambiente, os mesmos serão evitados através da utilização dos equipamentos de proteção individuais, e da coleta e armazenamento adequado para o descarte dos resíduos contaminados.</p> <p><b>Benefícios:</b>Como benefícios oriundos da realização do presente projeto de pesquisa, pode ser considerada a quantidade de respostas e informações que serão obtidas por meio da realização das atividades apresentadas. Tendo em vista que existe uma lacuna relacionada a estudos sobre misturas de herbicidas, e igualmente, relatos de ensaios empregando concentrações ambientais em embriões de <i>Rhamdia quelen</i>, este projeto visa apresentar resultados referentes a utilização de herbicidas aplicados em mistura, e utilizando suas concentrações de relevância ambiental. Portanto, espera-se que este trabalho também possa contribuir com a área científica relacionada aos pesticidas, por meio da utilização de bioensaios ecotoxicológicos, visando a possibilidade de publicações e desenvolvendo materiais promissores para que mais estudos sejam realizados e aprofundados nesta linha de pesquisa.</p>	
<p><b>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa / Aula prática:</b></p> <p>A pesquisa apresenta grande relevância científica.</p>	
<p><b>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</b></p> <p>Devem ser apresentados os seguintes termos e documentos:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Requerimento preenchido completamente e assinado pelo pesquisador responsável pelo projeto - apresentado.</li> <li>2) formulário unificado de encaminhamento do CEUA/UTFPR/DV - apresentado.</li> <li>3) projeto de pesquisa completo no modelo da PROPPG-CEUA- apresentado.</li> <li>4) declaração de não início do projeto (com assinatura e data)- apresentado.</li> <li>5) registro de projeto junto a Diretoria responsável (anuência da DIRPPG ou Direc, para pesquisa, e da coordenação de curso para aula prática). - apresentado.</li> </ol>	

6) Médico Veterinário - apresentado.	
Vigência do projeto:	01/10/2019 - 01/02/2020
Espécie/linhagem:	Peixes, <i>Rhamdia quelen</i>
Número de animais:	3500
Peso/Idade:	>0.1g, embriões
Sexo:	ambos
Origem:	Piscicultura comercial
Situação do Parecer: APROVADO.	
Considerações Finais a Critério da CEUA: Todos os procedimentos devem seguir a lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008.	

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação ecotoxicológica dos herbicidas atrazina e glifosato em embriões de *Rhamdia quelen*", protocolo nº 2019-20, sob a responsabilidade de Wanessa Algate Ramsdorf Nagata - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UTFPR) da UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, em reunião de 10/09/2019.

## CERTIFICATE

The Ethics Commission on Animal Use (CEUA) of Federal University of Technology – Paraná (UTFPR), CERTIFIES that the request herein identified by the protocol number 2019-20, coordinated and under the responsibility of Wanessa Algate Ramsdorf Nagata, which involves production, maintenance and / or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub-phylum Vertebrata (except human species), for the purposes of scientific research (or teaching), is in accordance with provisions of the Brazilian Law no. 11794 (October 8th, 2008), the Decree nº 6.899 (July 15th, 2009) and with further regulations published by the Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

Dois Vizinhos, 12 de Setembro de 2019.

Katia Atoji-Henrique

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná



Documento assinado eletronicamente por KATIA ATOJI HENRIQUE, PRESIDENTE DA COMISSÃO, em 12/09/2019, às 14:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.utfpr.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_externo=0](https://sei.utfpr.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_externo=0) informando o código verificador 1052387 e o código CRC 65513EB4.

**ANEXO A - Composição do meio de cultivo M4 para *Daphnia magna*.**

<b>Solução</b>	<b>Reagente</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
1	Cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O)	73,50
2	Sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	123,50
3	Cloreto de potássio (KCl)	5,80
4	Bicarbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	64,8
5	Cloreto de manganês tetra-hidratado (MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O) Cloreto de lítio (LiCl) Cloreto de rubídio (RbCl) Cloreto de estrôncio hexa-hidratado (SrCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O) Cloreto de cobre di-hidratado (CuCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O) Cloreto de zinco (ZnCl <sub>2</sub> ) Cloreto de cobalto hexa-hidratado (CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O)	7,21 6,12 1,42 3,04 0,335 0,26 0,20
6	Nitrato de sódio (NaNO <sub>3</sub> ) Ácido bórico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ) Brometo de sódio (NaBr) Molibdato de sódio di-hidratado (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O) Metavanadato de amônio (NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub> ) Iodeto de potássio (KI) Selenito de sódio (NaSe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	0,548 5,72 0,032 0,126 0,00115 0,0065 0,00438
7	Silicato de sódio (Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> )	21,47
8	Titriplex III (Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O) Sulfato ferroso hepta-hidratado (FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	0,50 0,199
9	Ortofosfato di-hidrogenado de potássio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) Ortofosfato hidrogenado de dipotássio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0,286 0,368
10	Hidrocloreto de tiamina Cianocobalamina (Vitamina B12) D (+) Biotina	0,750 0,01 0,0075

Fonte: ABNT NBR 12.713/2016.

**ANEXO B - Composição do meio básico utilizado para a diluição das amostras.**

<b>Solução</b>	<b>Reagente</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
1	Cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O)	73,50
2	Sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	123,50
3	Cloreto de potássio (KCl)	5,80
4	Bicarbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	64,80

Fonte: ABNT NBR 12.713/2016.

**ANEXO C - Composição da água reconstituída utilizada no ensaio de toxicidade aguda com *Rhamdia quelen***

<b>Solução</b>	<b>Reagente</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
1	Cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O)	0,0065
2	Sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	0,1335
3	Cloreto de potássio (KCl)	0,0004
4	Bicarbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	0,0105

Fonte: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2012.