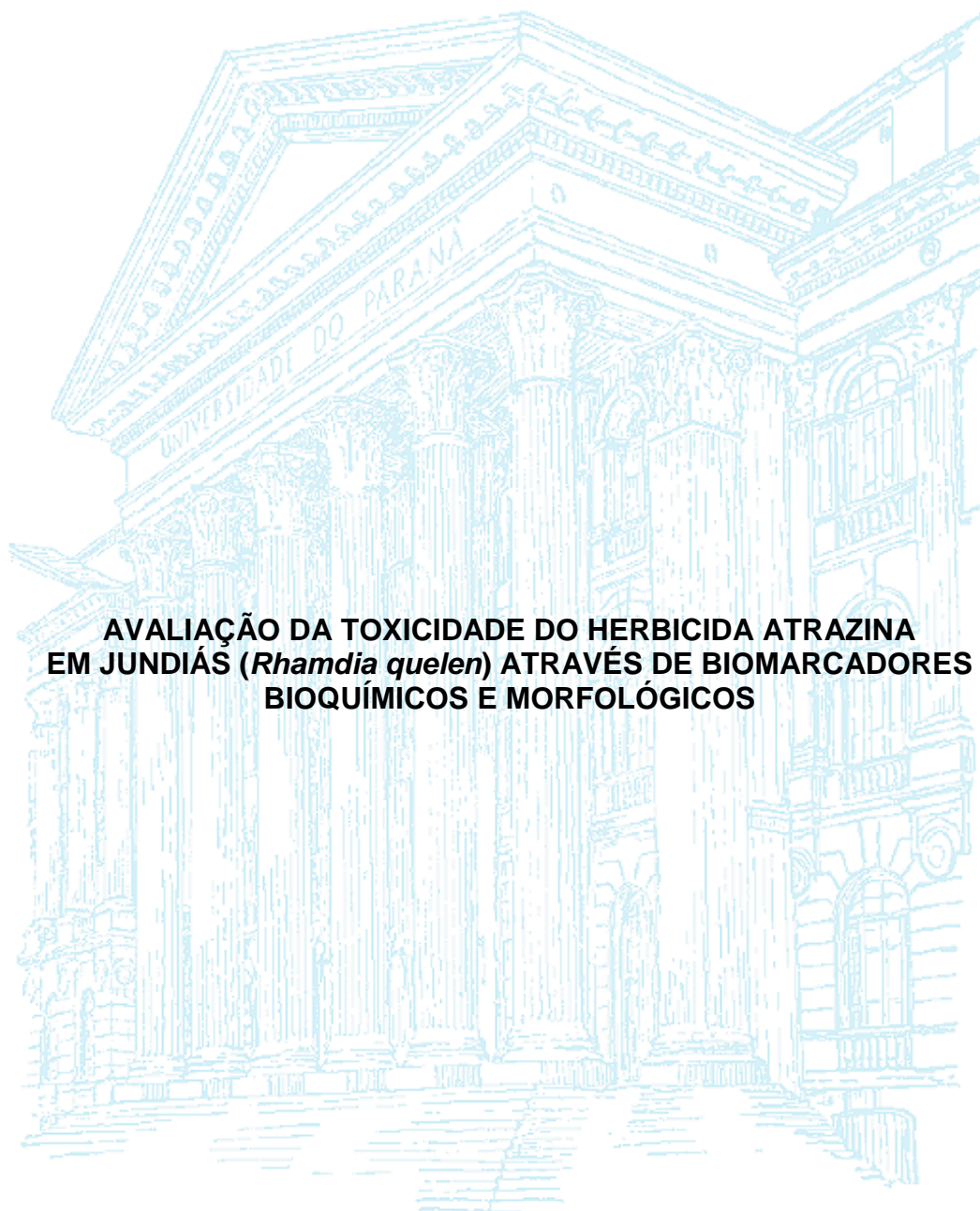


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETÍCIA DA SILVA PEREIRA



**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO HERBICIDA ATRAZINA
EM JUNDIÁS (*Rhambdia quelen*) ATRAVÉS DE BIOMARCADORES
BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS**

CURITIBA
2012

LETÍCIA DA SILVA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO HERBICIDA ATRAZINA
EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) ATRAVÉS DE BIOMARCADORES
BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS**

Monografia apresentada à disciplina de Estágio em Farmacologia, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, Curso Ciências Biológicas, pelo Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Helena Cristina da Silva de Assis

Co-orientadora: Doutoranda Izonete Cristina Guiloski

CURITIBA
2012

RESUMO

O uso de agrotóxicos ainda é o meio mais utilizado para assegurar a eficiência da produção agrícola, porém seu uso indiscriminado pode acarretar em efeitos deletérios aos organismos aquáticos. A atrazina é um herbicida seletivo, utilizado mundialmente, constituindo assim um importante contaminante ambiental, especialmente de ambientes aquáticos. O jundiá (*Rhamdia quelen*) é um peixe endêmico da América do Sul, presente em regiões onde são utilizados agrotóxicos, como a atrazina. Assim, este trabalho objetivou avaliar os efeitos tóxicos deste herbicida sobre *Rhamdia quelen*, através do uso de biomarcadores bioquímicos e morfológicos. A exposição foi realizada com as concentrações de 2, 10 e 100 µg/L de atrazina, em ensaio do tipo estático. Após 96 horas de exposição os peixes foram anestesiados, eutanasiados por secção medular e o fígado, cérebro e músculo foram retirados para as análises bioquímicas e morfológicas. Os resultados obtidos mostraram que a atrazina não alterou a atividade das enzimas acetilcolinesterase cerebral e muscular e da superóxido dismutase, e também não causou aumento na peroxidação lipídica e nos centros de melanomacrófagos. No entanto, em todas as concentrações testadas ela causou a redução da atividade das enzimas glutathione S-transferase, glutathione reductase e catalase. Foram também observadas lesões no tecido hepático, como necrose, infiltração leucocitária e vacuolização de hepatócitos, bem como aumento no número de melanomacrófagos livres. Estes dados sugerem que a concentração máxima de atrazina permitida pelo CONAMA em ambientes aquáticos brasileiros, de 2 µg/L, não representa um limite seguro para peixes da espécie *Rhamdia quelen*.

Palavras-chave: Atrazina. Herbicida. Biomarcadores. Peixe. *Rhamdia quelen*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1 ATRAZINA.....	6
1.2 BIOINDICADOR: <i>Rhamdia quelen</i>	8
1.3 BIOMARCADORES.....	9
1.3.1 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS.....	10
1.3.1.1 Acetilcolinesterase.....	10
1.3.1.2 Catalase.....	11
1.3.1.3 Glutaciona S-transferase.....	12
1.3.1.4 Glutaciona redutase.....	13
1.3.1.5 Superóxido dismutase.....	13
1.3.1.6 Lipoperoxidação.....	14
1.3.2 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS.....	15
1.3.2.1 Histopatologia.....	15
1.3.2.2 Centros de melanomacófagos e melanomacrófagos livres.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 ANIMAIS.....	18
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	18
3.3 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS.....	18
3.3.1 Atividade da Acetilcolinesterase.....	19
3.3.2 Atividade da Catalase.....	19
3.3.3 Atividade da Glutaciona S-transferase.....	20
3.3.4 Atividade da Glutaciona redutase.....	20
3.3.5 Atividade da Superóxido dismutase.....	21
3.3.6 Lipoperoxidação.....	21
3.3.7 Concentração proteica.....	21
3.4 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS.....	22
3.4.1 Histopatologia.....	22

3.4.2 Centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres.....	23
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
4 RESULTADOS.....	24
4.1 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS.....	24
4.1.1 Atividade da Acetilcolinesterase.....	24
4.1.2 Atividades Enzimáticas da Catalase, Glutathione S-transferase, Glutathione redutase e Superóxido dismutase e Lipoperoxidação.....	25
4.2 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS.....	27
4.2.1 Histopatologia.....	27
4.2.2 Centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres.....	29
5 DISCUSSÃO.....	30
6 CONCLUSÕES.....	35
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

1. INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são substâncias artificialmente sintetizadas com o intuito de combater pragas e assim melhorar a produção agrícola. Sua eficiência está no fato de que normalmente são tóxicos a organismos vivos e de difícil degradação. Assim, estas substâncias também são frequentemente acumuladas em alguns órgãos e/ou são dispersos pelo ambiente, contaminando o solo e as águas subterrâneas e/ou superficiais (CLAVER *et al.*, 2006). Fatores importantes como: solubilidade, persistência no meio, o tipo de solo e o volume e a intensidade de chuvas, podem afetar esta contaminação do solo e águas (TARAZONA; CARRASCO; SABATER, 2003). Além disso, estas substâncias podem ser dispersas no ambiente por lixiviação, escoamento superficial e volatilização (BICALHO *et al.*, 2010). Portanto, seu uso deve ser equilibrado diante da necessidade de se manter a qualidade das águas, e a sustentabilidade dos habitats de diversas espécies de plantas e animais (AZEVEDO; KANWAR; PEREIRA, 2000).

No entanto, o uso de agrotóxicos ainda é a principal estratégia para assegurar a qualidade e a quantidade da produção agrícola. No Brasil, até dezembro de 1999, 322 ingredientes ativos tiveram seu uso agrícola aprovado, com quase 2.000 produtos registrados, os quais incluem: inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, reguladores de crescimento, feromônios, moluscicidas e protetores de sementes (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1999).

O aumento do aporte de agrotóxicos contaminando as águas tem causado efeitos deletérios em organismos aquáticos, como doenças genéticas, alterações fisiológicas e até mesmo a morte. Alguns organismos aquáticos podem concentrar estes químicos até 1000 vezes, por bioacumulação ou por ingestão de material particulado contaminado (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 2001; VENTURA; ANGELIS; MARTIN-MORALES, 2008).

Alguns estudos mostram que a bioacumulação gradual através da ingestão de pequenas quantidades de certos agrotóxicos podem atingir concentrações que causam distúrbios hormonais e diminuição da viabilidade de espermatozoides em humanos, feminilização de peixes e répteis, proporcionam o aparecimento de câncer, entre outros (CRISP *et al.*, 1998; LAWS *et al.*, 2000; HOFMEISTER;

BONEFELD JORGENSEN, 2004; ARGEMI; CIANNI; PORTA, 2005; GRISOLIA, 2005; HOEKSTRA *et al.*, 2006; EPA, 2007).

1.1 ATRAZINA

A atrazina (FIGURA 1) é um herbicida seletivo, pertencente à família das s-triazinas. Desde sua introdução na década de 50 ela é utilizada mundialmente no controle de ervas-daninhas em culturas de milho, sorgo, cana-de-açúcar e soja (SILVESTRE *et al.*, 2002; MEHLER; SCHULER; LYDY, 2008; SALABERRIA *et al.*, 2009), tendo cerca de 70.000 a 90.000 t aplicadas ao ano (PREMAZZI; STECCHI, 1990). Seu mecanismo de ação é a inibição da fotossistema II, bloqueando a síntese de clorofila (SAWICKI *et al.*, 1998; HOCK; ELSTNER, 1995).

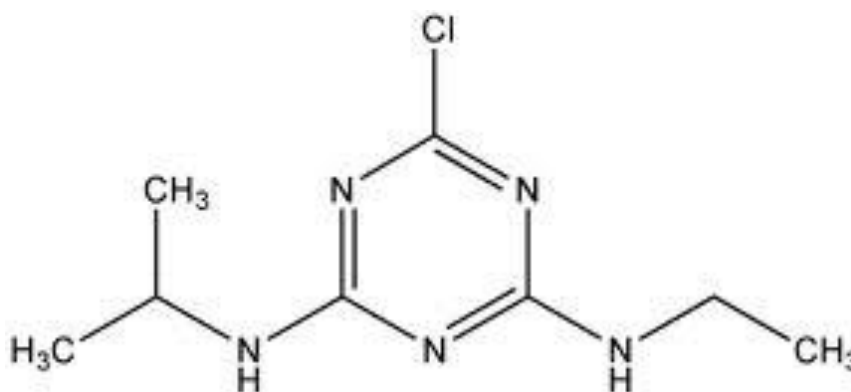


FIGURA 1: Estrutura química do herbicida atrazina.

Devido a sua ampla utilização, moderada solubilidade em água (32 mg/L), alta persistência no meio ambiente, grande mobilidade no solo e na água, meia-vida de cerca de três dias em água-doce, podendo chegar a 385 dias em determinados tipos de solo e por ser pouco afetada pelos processos naturais de degradação, a atrazina tem causado a contaminação quase permanente do solo e das águas superficiais e subterrâneas (EISLER, 1989; OULMI; NEGELE; BRAUNBECK, 1995; SAGLIO; TRIJASSE, 1998; BOYD, 2000; TAVERA-MENDOZA *et al.*, 2002; ORME; KEGLEY, 2004; BECKER *et al.*, 2009).

Este herbicida entra nos sistemas aquáticos primeiramente pela erosão e escoamento da água, e secundariamente através da lixiviação e drenagem, mas

também pode chegar diretamente na água através de aplicações descuidadas que não atingem apenas a lavoura alvo, e acabam contaminando corpos d'água que estejam próximos à área (LIU *et al.*, 2006; SOLOMON *et al.*, 2008). No Brasil, a concentração máxima permitida de atrazina em ambientes aquáticos é de 2 µg/L, segundo o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, Resolução 357/05).

Sabe-se que herbicidas podem alterar direta ou indiretamente o comportamento dos peixes, pois alteram a percepção de substâncias químicas naturais (SAGLIO; TRIJASSE, 1998). Algumas das alterações comportamentais já relatadas após exposição à atrazina foram a preferência por habitat com substratos escuros, redução da mobilidade, distúrbios de equilíbrio e escurecimento da superfície do corpo (GRAYMORE; STAGNITTI; ALLINSON, 2001).

Em peixes a concentração letal de atrazina está em entre 3 e 45 mg/L (ELIA; WALLER; NORTON, 2002). Alterações hormonais (SPANO *et al.*, 2004), diminuição do crescimento (ALVAREZ; FUIMAN, 2005), alterações morfológicas do rim (FISCHER-SCHERL *et al.*, 1991) e defeitos no desenvolvimento embrionário (WIEGAND *et al.*, 2001) têm sido relatados na exposição a atrazina.

A atrazina é facilmente absorvida pelo trato gastrointestinal de animais, e logo distribuída principalmente para o rim e fígado, portanto conhecer sua ação sobre as enzimas de desintoxicação do fígado é muito importante (ISLAM; HARA; MIYAKE, 2002). Vários estudos demonstram que ela pode induzir o estresse oxidativo em mamíferos e peixes, por aumentar a concentração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e produtos de danos oxidativos, como peróxidos lipídicos (ELIA; WALLER; NORTON, 2002; JIN *et al.*, 2010).

Apesar da atrazina ainda ser usada em muitos países sem muitas restrições, devido as suas características nocivas seu uso está banido na Alemanha desde 1992. Recentemente também foi banida em toda a Europa e muitos países africanos estão restringindo seu uso (FLEISCHER, 1998; COADY *et al.*, 2005; SALABERRIA *et al.*, 2009).

1.2 BIOINDICADOR: *Rhamdia quelen*

Muitos trabalhos em toxicologia utilizam peixes como modelo animal de toxicidade. Fatores como a manutenção em laboratório, cuidados com a limpeza, alimentação, baixos custos para manutenção dos animais e a fácil aquisição dos exemplares favorece a utilização deste grupo em bioensaios. O peixe *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824, Siluriformes, Heptapteridae) (FIGURA 2), também conhecido popularmente como jundiá, é uma espécie de água doce, endêmica da América do Sul (BARCELLOS *et al.*, 2003), ocorrendo do sul do México ao centro da Argentina (GOMES *et al.*, 2000).



FIGURA 2 – Exemplar de *Rhamdia quelen*

Esta espécie é onívora e alcança a maturidade sexual já no primeiro ano de vida. Em seu ambiente natural possui dois picos reprodutivos por ano, um no verão e outro no inverno, com várias desovas em cada um. Não apresenta cuidado parental com os ovos ou com as larvas, e as desovas ocorrem em águas calmas e claras com fundo rochoso. Seu desenvolvimento embrionário é rápido, com desenvolvimento larval entre três e cinco dias (GOMES *et al.*, 2000).

O jundiá apresenta boa resistência nos meses frios do inverno e alta taxa de crescimento nos meses mais quentes, o que o torna uma ótima alternativa para criação em regiões de clima temperado, como o presente no sul do Brasil, por isso sua criação vem se expandindo (GOMES *et al.*, 2000; GOLOMBIESKI *et al.*, 2003). Estudos mostram que a espécie possui alta taxa de fertilidade e em criadouros, a uma densidade de um a quatro animais por m², eles podem chegar de 600-800 g de

peso corporal em apenas oito meses (BARCELLOS *et al.*, 2004). Assim, o interesse comercial pela espécie está aumentando, o que também se deve ao sabor agradável de sua carne (GOMES, *et al.*, 2000; BARCELLOS *et al.*, 2001; LAZZARI *et al.*, 2006).

Em 2004, o jundiá alcançou 0,2% da produção total da aquicultura nacional, o que representa cerca de 550 toneladas (BOSCARDIN, 2008), e sua produção tem se tornado uma alternativa para a substituição da criação de peixes exóticos, como a carpa comum e a tilápia do Nilo (SCHULZ; LEUCHTENBERGER, 2006).

Devido a estas características, e por ser uma espécie comum em rios e criadouros próximos a áreas de intensa agricultura, onde pesticidas são amplamente utilizados (MELO *et al.*, 2008), o jundiá tem sido amplamente estudado em diversos aspectos, como sua fisiologia geral e reprodutiva (BELLO *et al.*, 2000, BARCELLOS *et al.*, 2001, 2002) e suas respostas à exposição a agrotóxicos (MIRON *et al.*, 2005; GLUSCZAK *et al.*, 2007; SOSO *et al.*, 2007; KREUTZ *et al.*, 2008) e anti-inflamatórios, como a dipirona (PAMPLONA *et al.*, 2011).

1.3 BIOMARCADORES

Biomarcadores são alterações bioquímicas, fisiológicas, celulares ou teciduais em resposta a poluentes ambientais, que podem ser mensuradas, indicando a presença, o efeito e por vezes o grau de contaminação (WALKER *et al.*, 1996). Eles podem ser divididos em diferentes classes: - biomarcadores de exposição: que detectam e mensuram a quantidade de uma substância exógena, seus metabólitos ou o produto da interação entre o xenobiótico (substância estranha ao ambiente) e a molécula ou célula alvo em um compartimento do organismo; - biomarcadores de efeito: que incluem alterações bioquímicas, fisiológicas ou outra alteração nos tecidos ou fluidos corporais de um organismo que podem ser reconhecidos e associados com uma doença ou possível prejuízo a saúde; - biomarcadores de susceptibilidade: que indicam a habilidade de um organismo a responder a exposição a um xenobiótico específico, incluindo fatores genéticos e mudanças nos receptores que alteram a susceptibilidade de um organismo a uma dada exposição (National Research Council, 2003; IPCS, 1993).

Biomarcadores bioquímicos detectam efeitos do agente tóxico em enzimas e proteínas, enquanto biomarcadores morfológicos permitem a avaliação dos efeitos de xenobióticos em células e tecidos (HINTON *et al.*, 1992), portanto, seu uso em conjunto permite avaliar as respostas fisiológicas a agentes estressores e também avaliar o grau de toxicidade dos contaminantes.

Por refletir o *status* saudável do organismo nos níveis mais baixos de organização (celular e molecular), apresentarem rápida resposta ao estresse e possuírem grande importância toxicológica, os biomarcadores podem ser utilizados como indicadores precoces de alterações ambientais, auxiliando na tomada de decisões que evitem ou mitiguem danos ambientais, antes que estes se tornem irreversíveis (SILVA DE ASSIS, 1998; HUGGETT *et al.*, 1992; SILVA, 2007).

Um biomarcador deve medir diferentes respostas a diferentes estressores (HUGGETT *et al.*, 1992), ou seja, o ideal é que seja específico para um composto ou classe de compostos, podendo ser utilizado em diferentes espécies (IPCS, 1993). E sua eficiência e vantagem no monitoramento ambiental estão relacionadas à grande susceptibilidade, boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise quando comparados às análises químicas (NICARETA, 2004; KODO FILHO, 2006).

Assim, seguindo o exemplo de países europeus e norte americanos, o Brasil vem desenvolvendo estudos que buscam a padronização de biomarcadores para as espécies nativas, os quais posteriormente poderão ser utilizados em programas de monitoramento ambiental (KLEMZ; SILVA DE ASSIS, 2005).

1.3.1 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

1.3.1.1 Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima, que em peixes, é encontrada no cérebro, músculos e eritrócitos (KLEMZ, 2002). Ela é responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) na sinapse, facilitando a transmissão de impulsos nervosos de um neurônio para outro (VIRGENS, 2009), prevenindo que ocorra um estímulo contínuo do neurônio, mantendo o funcionamento normal do sistema motor e sensorial (PAYNE *et al.*, 1996). Sua atividade é importante para

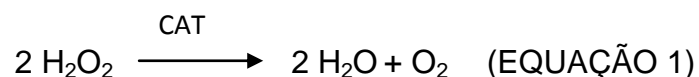
diversas funções fisiológicas dos peixes, como localização da presa, fuga do predador e orientação em direção ao alimento (DUTTA; ARENDS, 2003).

A inibição desta enzima é amplamente estudada. Ela é considerada um biomarcador específico para carbamatos e organofosforados, mas outros estudos têm demonstrado que substâncias como organoclorados, metais pesados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) também podem inibi-la (PAYNE *et al.*, 1996; MARTINEZ-TABCHE *et al.*, 1997; AKAISHI *et al.*, 2004).

Quando ocorre a inibição de sua atividade há o acúmulo do neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses, levando a uma super-estimulação (MIRON, 2009), que causa o bloqueio da transmissão dos impulsos nervosos, podendo acarretar na paralisia de algumas funções do organismo (STENESH, 1998), distúrbios na locomoção, no equilíbrio, tremores, convulsões e até mesmo morte dos peixes (SAGLIO; TRIJASSE, 1998; BRETAUD; TOUTANT; SAGLIO, 2000; SANCHO; CERÓN; FERRANDO, 2000; FERNÁNDEZ-VEGA *et al.*, 2002; ROEX; KEIJZERS; VAN GESTEL, 2003).

1.3.1.2 Catalase

A catalase (CAT) é uma enzima com capacidade de degradar rapidamente o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (EQUAÇÃO 1). Sua atividade está associada aos peroxissomos, pois ao metabolizar ácidos graxos, os peroxissomos produzem H_2O_2 , que logo deve ser degradado pela CAT, evitando a formação de $OH\cdot$ que pode causar danos à membrana celular. Ela é a única das enzimas degradantes de H_2O_2 que não consome equivalentes redutores celulares e possui um mecanismo muito eficiente em remover o H_2O_2 formado sob condições de estresse (HUGGET *et al.*, 1992).



O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma espécie reativa de oxigênio (ERO), que assim como os radicais livres, ele é formado durante o metabolismo oxidativo e

de xenobiontes. As EROs e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) são tão reativas quanto os radicais livres, no entanto não possuem elétrons desemparelhados em sua órbita externa. Normalmente estas espécies reativas são produzidas durante o metabolismo do organismo, mas sob condições normais, as enzimas antioxidantes são capazes de remover 99% dos danos causados por elas (ROSSI, 2008).

Quando há um desequilíbrio entre a produção destas espécies reativas e sua remoção pelas defesas antioxidantes, diz-se que o organismo está sob estresse oxidativo, ou seja, com elevadas concentrações de espécies reativas, o que causa diversos danos a estruturas celulares, podendo levar à inativação enzimática, lipoperoxidação, danos de DNA e até a morte celular (ROSSI, 2008).

1.3.1.3 Glutationa S-transferase

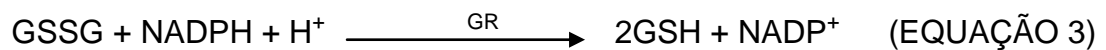
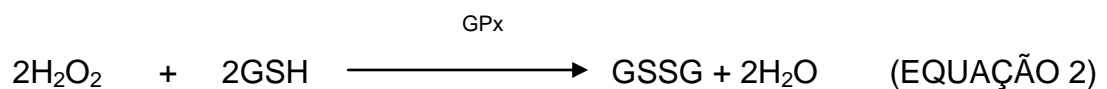
A glutaciona S-transferase (GST) é uma enzima que atua na proteção contra danos causados por compostos potencialmente reativos, porque os conjuga com a glutaciona reduzida (GSH), durante a fase II da biotransformação, para serem eliminados do organismo (SILVA, 2007).

A biotransformação de compostos químicos é necessária para que se altere a atividade do composto, e assim possa ser cessada a interação entre o composto e a célula. Este processo envolve diversos sistemas enzimáticos, com a função de converter compostos tóxicos em menos tóxicos, e lipofílicos em hidrofílicos, para que possam ser mais facilmente excretados (ROSSI, 2008).

Esse mecanismo de biotransformação envolve reações conhecidas como reações de fase I e de fase II, que podem ou não ocorrer sequencialmente. As reações de fase I são catabólicas (oxidação, redução, hidrólise), e normalmente geram produtos mais reativos, portanto algumas vezes mais tóxicos que o composto original. As reações de fase II são anabólicas, e envolvem conjugação, normalmente gerando produtos inativos (RANG *et al.*, 2004).

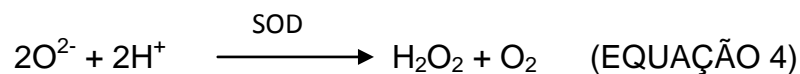
1.3.1.4 Glutationa redutase

Para que seja mantido o estado redutor intracelular é necessário que a razão entre glutaciona reduzida (GSH) e glutaciona oxidada (GSSG) seja mantida elevada. Portanto, a glutaciona redutase (GR) é uma enzima de grande importância no metabolismo da glutaciona, pois ela utiliza NADPH e reduz a GSSG, que é produzida pelos processos oxidativos e pela atividade da GPx (EQUAÇÃO 2), regenerando a GSH (EQUAÇÃO 3) (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2004; TREVISAN, 2008).



1.3.1.5 Superóxido dismutase

A superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima essencial ao sistema de defesa antioxidante, pois catalisa a dismutação do radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), formando peróxido de hidrogênio (EQUAÇÃO 4). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por sua vez, será degradado pela catalase (CAT) ou pela glutaciona peroxidase (GPx). (VENTURA, 2004; TREVISAN, 2008)



Existem três formas conhecidas de SOD, a Cu, Zn- SOD, presente no citoplasma de eucariontes, a Mn-SOD, presente em bactérias e mitocôndrias e a Fe-SOD, presente apenas em bactérias (VENTURA, 2004). Em peixes há diferenças na atividade da SOD de acordo com o tecido e com a espécie, sendo esta maior em peixes marinhos, quando comparados aos peixes de água doce, e em peixes herbívoros (WILHELM FILHO, 1996; LACKNER, 1998).

1.3.1.6 Lipoperoxidação

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) é considerada a principal causa de morte e injúria celular, estando associada a várias condições patológicas. Seus danos nas membranas biológicas podem variar de reduções localizadas na fluidez da membrana à ruptura total da integridade da bicamada lipídica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2005).

Ela é um dos danos mais importantes causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) e as membranas celulares são os locais mais suscetíveis. A LPO acontece pela retirada de prótons H^+ do grupo metileno dos fosfolipídios pelos radicais livres, produzindo dienos conjugados e formando hidroperóxidos lipídicos, que continuarão uma reação em cascata (SILVA, 2007) (FIGURA 3).

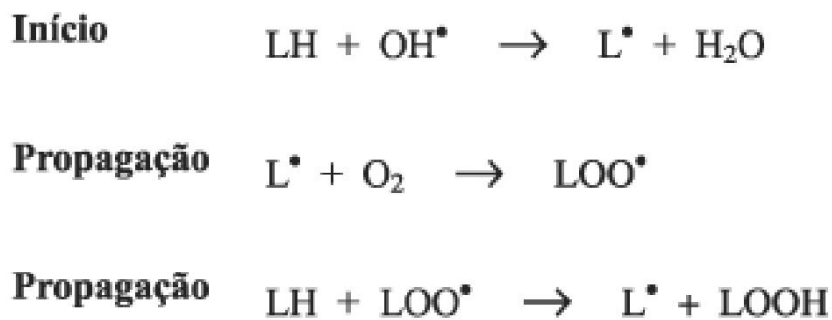


FIGURA 3 - Mecanismo de início e propagação da lipoperoxidação (LH: ácido graxo insaturado; OH^{\bullet} : radical livre; L^{\bullet} : radical lipídico, LOO^{\bullet} : Radical peroxila e LOOH: hidroperóxido lipídico. FONTE: GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007.

Assim, a LPO é a expressão do dano causado pelo estresse oxidativo, mostrando que a produção de EROs excedeu as defesas antioxidantes (AHMAD; PACHECO; SANTOS, 2006; AHMAD *et al.*, 2008), causando perda da integridade da membrana celular devido ao aumento da sua permeabilidade, alteração no influxo de íons, disfunção no transporte Na^+/K^+ , excessivo influxo de cálcio e ativação de enzimas como proteases, fosfolipases e nucleases (OLIVEIRA, 1999; MEAGHER; FITZGERALD, 2000; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

1.3.2 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS

1.3.2.1 Histopatologia

A histopatologia contribui para a determinação de danos primários e permite avaliar as consequências nas funções vitais dos organismos expostos a contaminantes. Além disso, o estudo histopatológico pode colaborar com o diagnóstico da saúde do indivíduo, objetivando a identificação da presença de danos irreversíveis ao organismo o que poderia levar à morte dos mesmos ou colocar a espécie em risco de extinção. De acordo com Hinton *et al.* (1992) a histopatologia é um dos mais rápidos e eficientes métodos para detectar o nível dos efeitos tóxicos em órgãos e tecidos. Entretanto, os efeitos histopatológicos, quando utilizados de forma isolada, não são suficientes para um diagnóstico preciso sobre a ação de contaminantes tóxicos, fazendo-se necessário a associação com outros biomarcadores presentes em outros níveis de organização biológica. As lesões detectadas em células, tecidos ou órgãos representam uma integração dos efeitos cumulativos dos estressores em nível fisiológico e bioquímico e potencialmente em níveis mais altos de organização biológica (MYERS; FOURNIE, 2002), o que a torna a histopatologia um biomarcador para demonstrar efeitos decorrentes da exposição a agentes estressores.

1.3.2.2 Centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres

A função básica dos melanomacrófagos é remover, através de fagocitose, partículas estranhas derivados da degradação celular, e eles são caracterizados pela presença de vesículas pigmentadas próximas uma das outras e células fagocíticas. A diferença no número destas estruturas pode ser utilizada como um biomarcador de poluição aquática e de saúde em peixes e o número de melanomacrófagos livres (MLs) e de centros de melanomacrófagos (CMMs) são parâmetros biológicos que podem ser influenciados pela exposição de peixes a contaminantes (RABITTO *et al.*, 2005).

Ao longo do tempo os CMMs vêm sendo relacionados ao envelhecimento (BROW; GEORGE, 1985), à degradação de tecidos (AGIUS; ROBERTS, 1981), às condições alimentares (MOCCIA *et al.*, 1984), à poluição (THIYAGARAJAH; HARTLEY; ABDELGHANI, 1998), às condições patológicas e inflamatórias (VOGELBEIN; FOURNIE; OVERSTREET, 1987) e à privação de alimento (RIOS, 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do herbicida atrazina em peixes da espécie *Rhamdia quelen* através do uso de biomarcadores bioquímicos e morfológicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o estresse oxidativo da atrazina no fígado de *Rhamdia quelen* através da atividade das enzimas Catalase (CAT), Glutathione S-Transferase (GST), Glutathione Redutase (GR) e Superóxido Dismutase (SOD) e da Lipoperoxidação (LPO).
- Avaliar a neurotoxicidade da atrazina no cérebro e no músculo de *Rhamdia quelen* através da atividade da acetilcolinesterase (AChE).
- Avaliar os efeitos histopatológicos da atrazina no fígado de *Rhamdia quelen*.
- Quantificar os centros de melanomacrófagos e os melanomacrófagos livres no fígado de *Rhamdia quelen* expostos a atrazina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 80 indivíduos de *Rhamdia quelen* adquiridos da estação de piscicultura do Instituto de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (IPAGRI-SC), localizada em Caçador.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os peixes foram aclimatados por 30 dias em tanques de 250 L, com água filtrada, temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, aeração constante e fotoperíodo de 12 horas. Após este período, foram divididos em 4 grupos (20 indivíduos por grupo), dispostos em 8 aquários (10 indivíduos por aquário - duplicata) de 20L.

Os animais foram expostos às concentrações de 2, 10 e 100 $\mu\text{g/L}$ de atrazina, e foi mantido um grupo controle (sem adição do herbicida à água), por 96 horas, em ensaio do tipo estático, ou seja, sem a troca de água durante a exposição.

Logo após as 96 horas de exposição os animais foram anestesiados em água contendo benzocaína 10% e eutanaziados por secção medular. Foram coletados o fígado, o cérebro e uma porção da musculatura axial para as análises dos biomarcadores.

Os procedimentos realizados neste experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

3.3 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

As amostras de cérebro e músculo obtidas de cada indivíduo foram pesadas e homogeneizadas, com o uso de microhomogeneizador, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,5, na proporção de 1:10. Estes homogeneizados foram centrifugados a $10000 \times g$, por 20 minutos, a 4°C e em seguida os sobrenadantes foram armazenados a -20°C

para a análise da atividade da AChE cerebral e muscular, e para quantificar a concentração protéica.

Para as amostras de fígado foram utilizados *pools* de dois fígados, os quais foram pesados e divididos em duas partes. Uma delas foi homogeneizada em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, na proporção de 1:10, como o auxílio de microhomogeneizador, posteriormente centrifugada a 12000 x g, por 30 minutos, a 4°C e o sobrenadante obtido foi aliquoteado para a análise das atividades da catalase, superóxido dismutase, glutatona redutase e glutatona S-transferase, e concentração protéica. A outra parte foi homogeneizada, também na proporção 1:10, em metanol 30% e centrifugada a 12000 x g, a 4°C, por 30 minutos, e o sobrenadante obtido foi utilizado para a análise da lipoperoxidação.

3.3.1 Atividade da Acetilcolinesterase

As amostras de músculo e cérebro foram descongeladas em gelo moído e diluídas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,5, na proporção de 1:10 (ou 10% V/V). Em microplaca foram pipetadas quatro réplicas de 50 µl para cada amostra, seguida de 200 µl de DTNB a 0,75 mM (5,5-Ditio-bis-2nitrobenzoato) e 50 µl de ATC a 12 mM (iodeto de acetiltiocolina).

Este é o método proposto por Ellman *et al.* (1961), modificado para microplaca por Silva de Assis (1998), cujo princípio se baseia no desenvolvimento da reação colorimétrica entre o ATC e o DTNB na presença da AChE. A leitura foi feita a 405 nm, em espectrofotômetro SYNERGY HT. Os resultados foram expressos em $\text{nmol.mgproteína}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

3.3.2 Atividade da Catalase

A atividade da catalase foi avaliada segundo o método proposto por Aebi (1984), que se baseia no consumo do peróxido de hidrogênio exógeno pela catalase, gerando oxigênio e água, o que pode ser mensurado por espectrofotometria.

As amostras de fígado foram descongeladas e diluídas na proporção de 1:5 (ou 5% V/V) em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2. Em cubetas de quartzo foram pipetados 990 μ l de solução reação (Tampão Tris 1M / EDTA 5 mM pH 8,0, peróxido de hidrogênio 20 mM e água MilliQ), seguido de 10 μ l de amostra. Foi monitorada a absorbância de três réplicas para cada amostra, em espectrofotômetro ULTROSPECT 4300 PRO, com comprimento de onda a 240 nm, por 1 minuto e 30 segundos. A atividade foi expressa em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgproteína}^{-1}$.

3.3.3 Atividade da Glutathione S-transferase

As amostras de fígado foram descongeladas e diluídas na proporção 1:10 (V/V) em tampão fosfato 0,1M, pH 6,5. Em microplaca foram pipetados 20 μ l de amostra, em 4 réplicas, seguido de 180 μ l da solução reação, composta por CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) 3,0 mM e GSH (glutathione reduzida) 3,0 mM.

O método foi proposto por Keen *et al.* (1976), e seu princípio é a conjugação do CDNB com a GSH pela ação da GST, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento da absorbância. A leitura foi feita em espectrofotômetro SYNERGY HT, a 340 nm e a atividade foi expressa em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgproteína}^{-1}$.

3.3.4 Atividade da Glutathione reductase

Para a análise da atividade da GR foi utilizado o método proposto por Sies *et al.* (1979). Foram pipetados, em microplaca, 50 μ l de amostra, em 4 réplicas, e 100 μ l do meio de reação (GSSG a 5,0 mM e NADPH a 0,5mM). Foi realizada uma leitura a cada 30 segundos, por três minutos a 340 nm, em espectrofotômetro SYNERGY HT.

O princípio do método é a redução da glutathione oxidada (GSSG), através da oxidação do NADPH, pela ação da GR, gerando um decréscimo de absorbância que pode ser medido espectrofotometricamente. Os resultados foram expressos em $\text{nmol}\cdot\text{mgproteína}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.3.5 Atividade da Superóxido dismutase

Para a análise da atividade da SOD foi utilizado o método proposto por Crouch *et al.* (1981), cujo princípio é a inibição da redução do nitrobluetetrazólio (NBT) para azul pela SOD, através do O_2^- gerado pela hidroxilamina em solução alcalina, sendo esta redução medida espectrofotometricamente, a 560 nm, em espectrofotômetro SYNERGY HT.

Na microplaca foram pipetados 20 μ l de cada amostra (com 25% de etanol), seguidos de 70 μ l da solução de NBT e 110 μ l de tampão carbonato de sódio (182 mM, pH 10,2) com hidroxilamina 67mM. A leitura foi realizada durante uma hora com intervalos de cinco minutos. Os resultados foram expressos em $U.mL.mgproteína^{-1}.min^{-1}$.

3.3.6 Lipoperoxidação

A análise da LPO foi feita através da avaliação da concentração de hidroperóxidos pelo ensaio FOX (Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method), proposto por Jiang *et al.* (1992).

O sobrenadante das amostras foi diluído em metanol 30%, na proporção de 1:5 e centrifugado a 10000 x g por 10 minutos a 4°C. Foram pipetados em microplaca 30 μ l de cada amostra, em 4 réplicas, seguido de 270 μ l da solução reação (laranja de xilenol a 100 μ M, H_2SO_4 a 25 mM, BHT (hidroxitolueno butilato) a 4 μ M, $FeSO_4NH_4$ (sulfato ferroso amoniacal) a 250 μ M, acrescentados na seqüência descrita a metanol 90%). A leitura foi feita a 570 nm em espectrofotômetro SYNERGY HT. Os resultados foram expressos em concentração de hidroperóxidos (μ mol.mgproteína⁻¹).

3.3.7 Concentração protéica

A concentração de proteínas totais foi medida segundo o método proposto por Bradford (1976), com o objetivo de normalizar os dados para os diferentes ensaios bioquímicos. Para tanto foi utilizada um curva-padrão, feita com soro de albumina

bovina (BSA) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda em 620nm.

3.4 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS

Logo após a remoção, parte de cada fígado foi imersa em fixador ALFAC durante 16 horas, em seguida as amostras passaram por desidratação em série alcoólica crescente, diafanização em xilol, impregnação e inclusão em Paraplast Plus® (Sigma) (56°C). Os blocos foram trimados para a obtenção dos cortes histológicos, estes com espessura de 5µm, que foram distendidos em lâmina histológica e corados com Hematoxilina e Eosina. As lâminas foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio Leica DME.

3.4.1 Histopatologia

As alterações observadas foram avaliadas segundo o método descrito por Bernet *et al.* (1999), de acordo com os fatores de importância (TABELA 1), onde (1) representa importância mínima, (2) importância moderada e (3) importância marcante. Também foram atribuídos valores aos diferentes graus de ocorrência, sendo: (0) Inalterado, (2) ocorrência ocasional, (4) ocorrência moderada e (6) ocorrência severa (lesão difusa). O Índice de lesão (IL) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$IL = \sum_{pr} \sum_{alt} (a \times w)$$

Onde: pr = padrão de reação, alt = alteração, a = valor atribuído à alteração e w = fator de importância.

Unidade Funcional	Alteração	Fator de importância
Fígado	Necrose	3
	Infiltração leucocitária	2
	Vacuolização dos hepatócitos	1

TABELA 1: Alterações histopatológicas analisadas em fígado de *Rhamdia quelen* e seus respectivos fatores de importância (modificado a partir de Bernet *et al.*, 1999).

3.4.2 Centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres

Os centros de melanomacrófagos (CMM) e melanomacrófagos livres (ML) foram quantificados através de um sistema-teste quadriculado (área total: 1mm²; área do quadrículo: 0,01 mm²) acoplado a uma das oculares do microscópio. Foram considerados melanomacrófagos livres os locais que continham 1 a 4 células pigmentadas e centros de melanomacrófagos os que continham um número igual ou superior a 5 células pigmentadas.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados dos biomarcadores foram analisados estatisticamente com o uso do programa *GraphPad Prism 5*. Para os biomarcadores bioquímicos, CMM e ML foi utilizado ANOVA de uma via, seguida de prova de Dunnett, com limite de significância em 0,05 e os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média. E para o índice de lesão foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS

3.6 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

3.6.1 Atividade da Acetilcolinesterase

Não foram observadas alterações significativas na atividade da AChE, tanto cerebral (FIGURA 4), quanto muscular (FIGURA 5), entre os grupos-teste e controle.

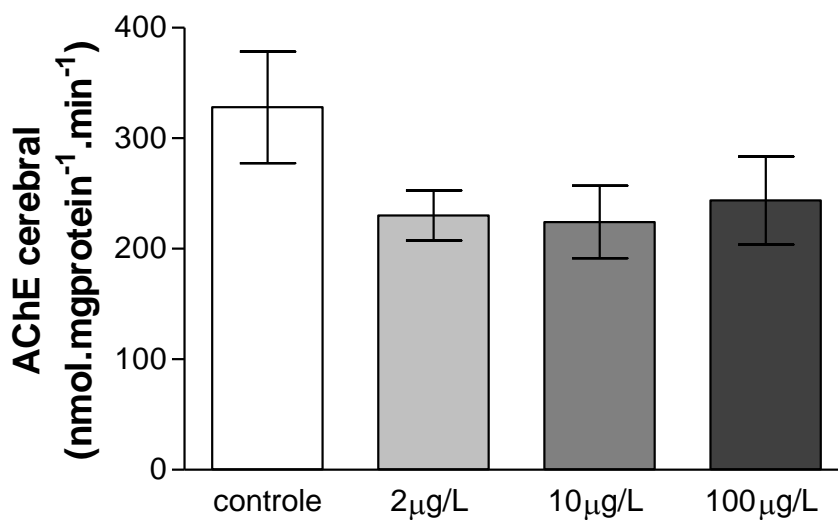


FIGURA 4 – Atividade da acetilcolinesterase cerebral em *Rhamdia quelen* expostos à atrazina por 96 horas. As barras expressam a média da atividade da acetilcolinesterase cerebral \pm erro padrão.

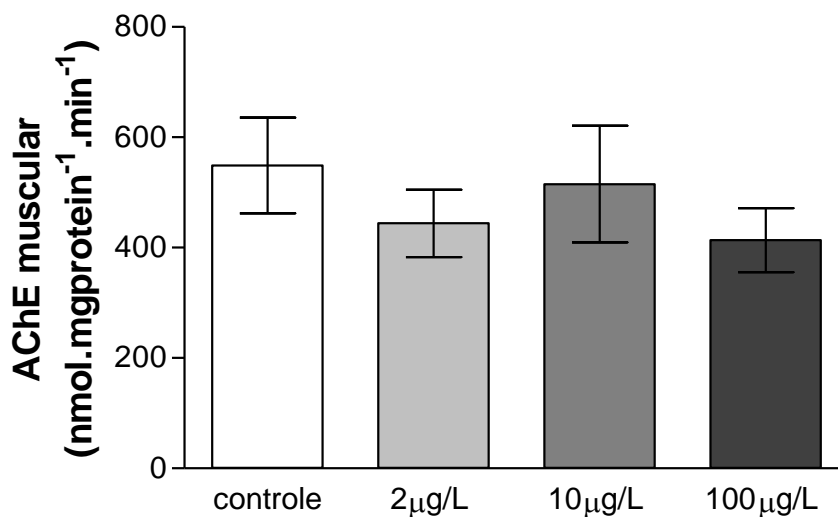


FIGURA 5 – Atividade da acetilcolinesterase muscular em *Rhamdia quelen* expostos à atrazina por 96 horas. As barras expressam média da atividade da acetilcolinesterase muscular \pm erro padrão.

3.6.2 Atividades Enzimáticas da Catalase, Glutathione S-transferase, Glutathione Redutase e Superóxido dismutase e Lipoperoxidação

A atividade das enzimas antioxidantes CAT (FIGURA 6), GST (FIGURA 7) e GR (FIGURA 8) foi inibida em todos os grupos expostos a atrazina (2 μL , 10 μL e 100 μL), quando comparados ao controle. Apenas a enzima SOD (FIGURA 9) não apresentou alteração significativa em sua atividade em nenhum dos grupos expostos quando comparados ao grupo controle.

A LPO (FIGURA 10) também não se encontrou alterada quando comparados os grupos expostos a atrazina ao grupo controle.

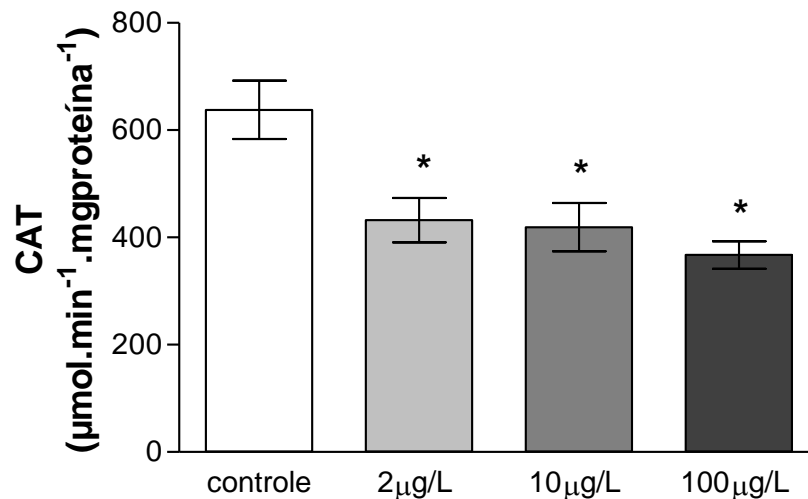


FIGURA 6 – Atividade da catalase em *Rhamdia quelen* expostos à atrazina por 96 horas. As barras expressam média da atividade da catalase \pm erro padrão. * = difere significativamente do controle ($p < 0,05$) quando testados por ANOVA de uma via seguida de Teste de Dunnett.

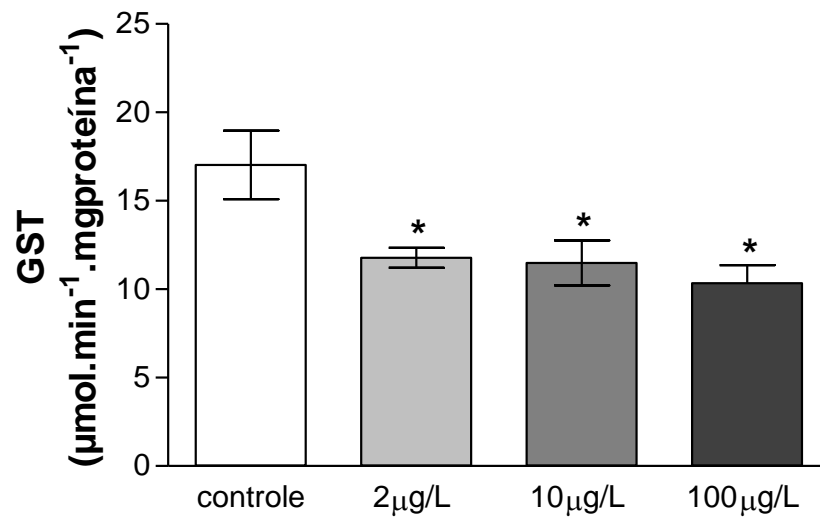


FIGURA 7 – Atividade da glutatona S-transferase em *Rhamdia quelen* expostos à atrazina por 96 horas. As barras expressam média da atividade da glutatona S-transferase \pm erro padrão. * = difere significativamente do controle ($p < 0,05$) quando testados por ANOVA de uma via seguida de Teste de Dunnett.

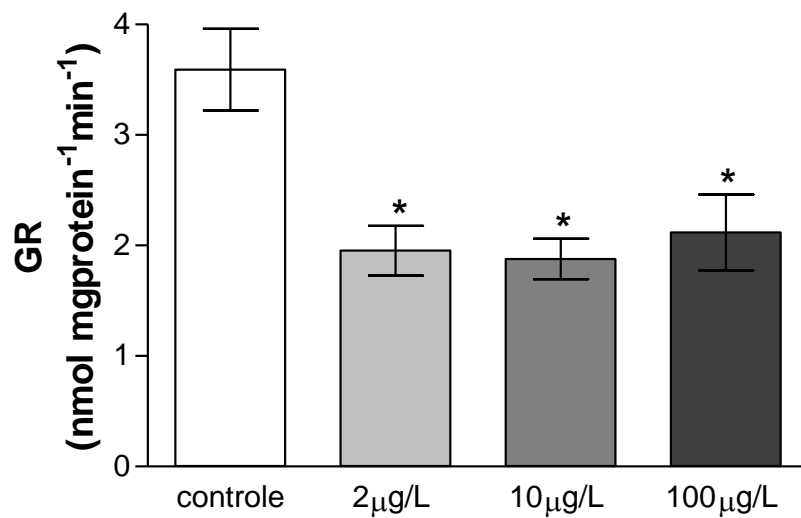


FIGURA 8 – Atividade da glutatona redutase em *Rhamdia quelen* expostos à atrazina por 96 horas. As barras expressam média da atividade da glutatona redutase \pm erro padrão. * = difere significativamente do controle ($p < 0,05$) quando testados por ANOVA de uma via seguida de Teste de Dunnett.

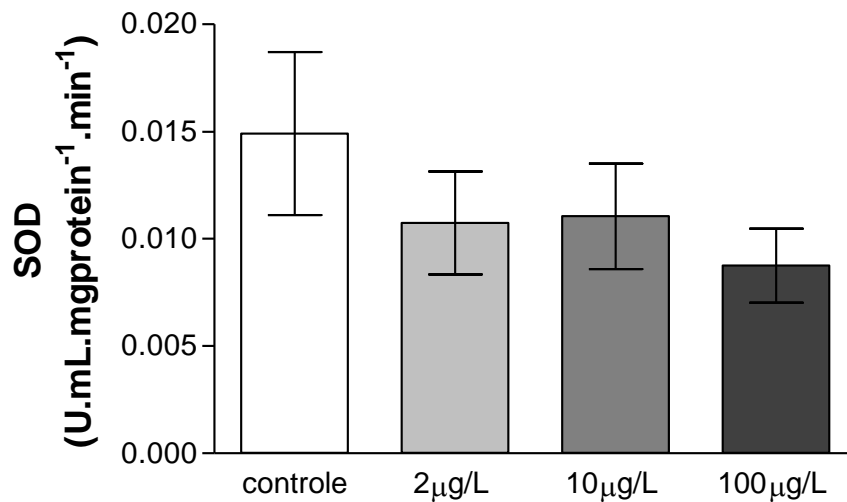


FIGURA 9 – Atividade da superóxido dismutase em *Rhamdia quelen* expostos à atrazina por 96 horas. As barras expressam média da atividade da superóxido dismutase \pm erro padrão.

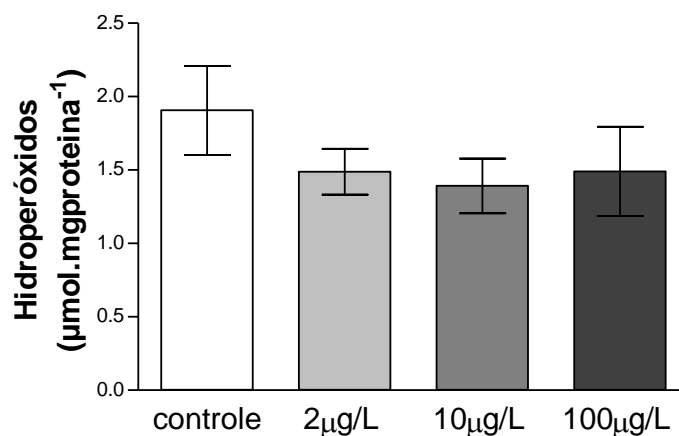


FIGURA 10 – Lipoperoxidação expressa por concentração de hidroperóxidos em *Rhamdia quelen* expostos à atrazina por 96 horas. As barras expressam média da concentração de hidroperóxidos \pm erro padrão.

3.7 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS

3.7.1 Histopatologia

O índice de lesão calculado para os fígados dos jundiás se encontrou elevado nos grupos expostos (2, 10 e 100µg/L de atrazina) (FIGURA 11). Este resultado reflete a presença de infiltrações leucocitárias (FIGURA 12B), áreas necróticas (FIGURA 12C) e vacuolização de hepatócitos (FIGURA 12D), encontradas em

grande parte dos indivíduos. Ao analisarmos o índice de lesão observamos que necrose (50%), seguida da infiltração leucocitária (30%) e vacuolização de hepatócitos (20%).

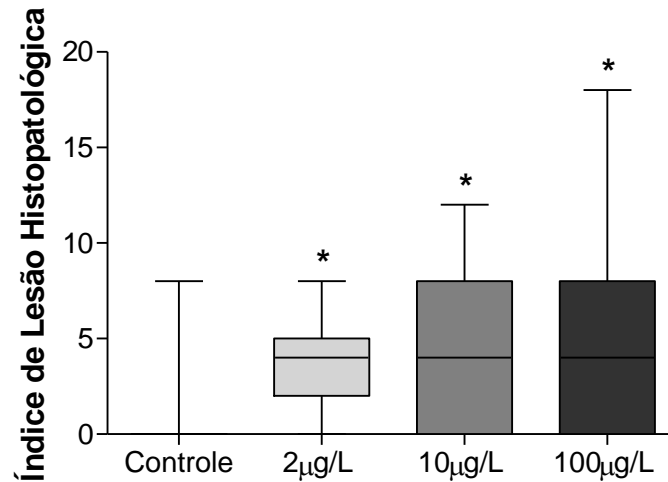


FIGURA 11: Alterações histopatológicas hepáticas avaliadas de acordo com o método descrito por Bernet *et al.* (1999) em *Rhambdia quelen* expostos a atrazina por 96 horas. * = difere significativamente do controle ($p < 0,05$) quando testados por Kruskal-Wallis.

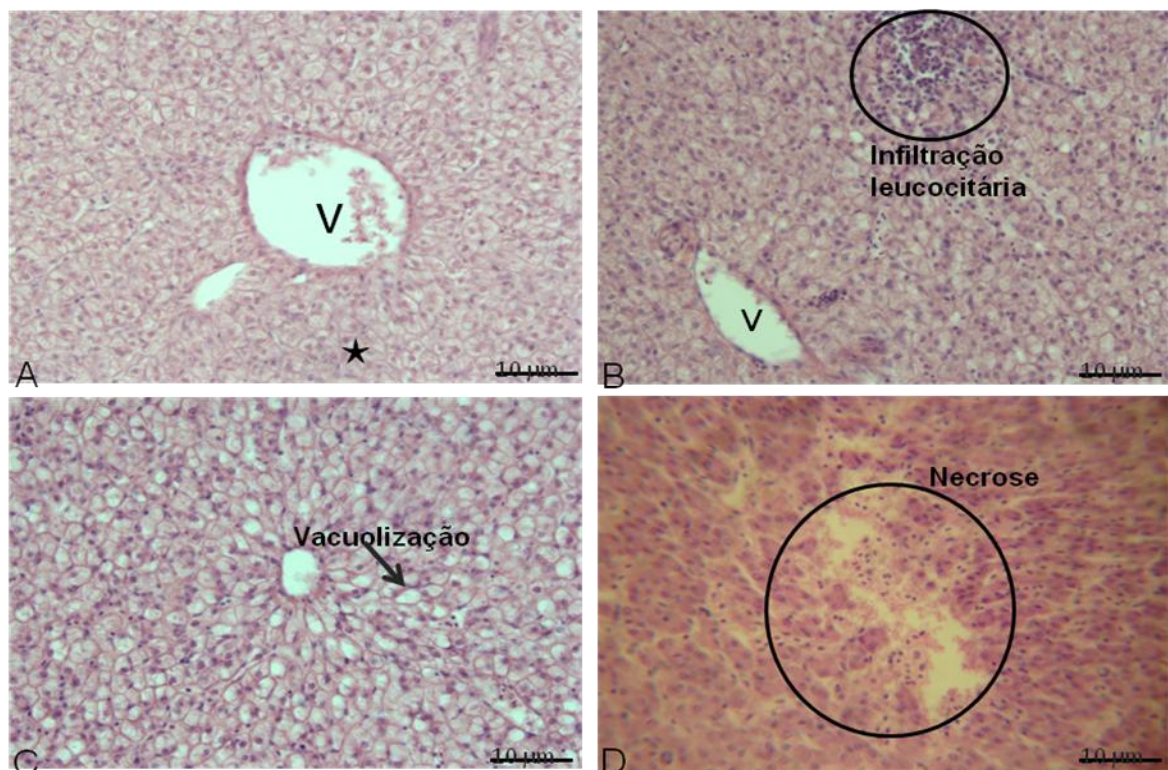


FIGURA 12: Organização estrutural do fígado de *Rhambdia quelen*. A: Grupo controle. Veia centro lobular (V) e parênquima hepático (*). B: Fígado exposto ao herbicida atrazina (10 µg/L). Infiltração leucocitária. C: Fígado exposto ao herbicida atrazina (10 µg/L). Vacuolização dos hepatócitos. D: Fígado exposto ao herbicida atrazina (10 µg/L). Área de necrose.

3.7.2 Centros de melanomacrófagos (CMMs) e melanomacrófagos livres (MLs)

A quantidade de CMMs não apresentou diferença significativa nos grupos expostos em relação ao controle. Já os MLs se apresentaram elevados em todos os grupos expostos (2, 10 e 100 $\mu\text{g/L}$ de atrazina) quando comparados com o grupo controle (FIGURA 14)

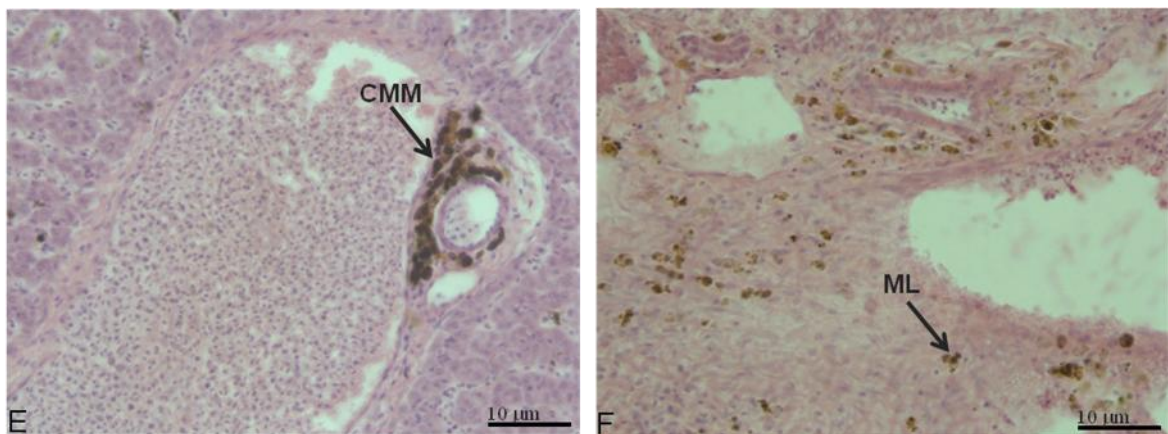


FIGURA 13: E: Fígado exposto ao herbicida atrazina (100 $\mu\text{g/L}$) . Centro de melanomacrófagos (CMM). F: Fígado exposto ao herbicida atrazina (100 $\mu\text{g/L}$) .Melanomacrófago livre (ML).

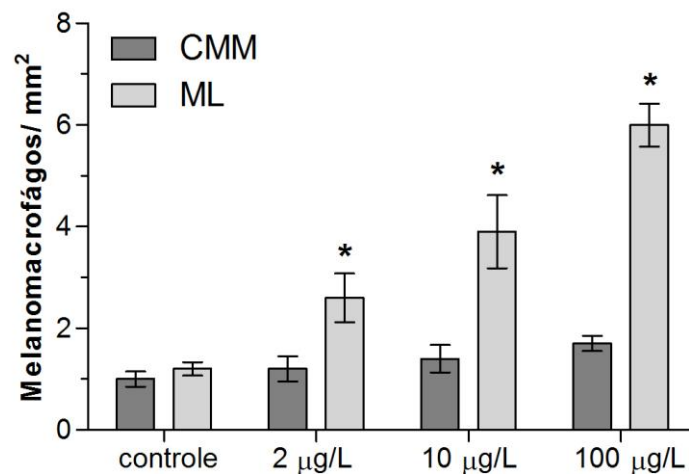


FIGURA 14: Análise quantitativa dos centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres adaptado de Rabitto *et al.*, 2005 em fígados de *Rhamdia quelen* expostos a atrazina por 96 horas. * = difere significativamente do controle ($p < 0,05$) quando testados por ANOVA de uma via seguida de Teste de Dunnett.

4 DISCUSSÃO

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é essencial para a manutenção do funcionamento muscular e das condições normais de comportamento em peixes (PAYNE *et al.*, 1996; KIRBY *et al.*, 2000). A inibição de sua atividade é muito relacionada à exposição a carbamatos e organofosforados, sendo portanto pouco estudada sua relação especificamente com o herbicida atrazina (XING *et al.*, 2010). Neste estudo, a atrazina não demonstrou efeito neurotóxico, visto que tanto a atividade específica da AChE muscular quanto a cerebral nos grupos expostos não apresentaram alterações significativas em relação aos dados do grupo controle. Este resultado difere do encontrado por Xing *et al.* (2010), nos quais, para *Cyprinus carpio*, contaminados com 4,28, 42,8 e 428 µg/L de atrazina por 40 dias, a atividade da AChE, tanto cerebral quanto muscular, apresentou uma relação dose-resposta, tendo queda na atividade com o aumento das concentrações de atrazina, indicando que possivelmente as condições experimentais (tempo de exposição e modelo) e/ou as concentrações de atrazina, utilizadas para a exposição dos jundiás, foram baixas para que causassem uma alteração significativa na atividade da AChE desses animais. Poluentes que não são enzima-específicos, como HPA, metais e pesticidas (GALGANI; BOCQUENE; CADIOU, 1992; MARTINEZ-TABCHE *et al.*, 1997; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2006) podem alterar a atividade da enzima, mas são requeridas altas concentrações destes poluentes para causar inibição (STURM; SILVA DE ASSIS; HANSEN, 1999).

A atrazina tem sido descrita como indutora de estresse oxidativo, pois estudos com algas (*Chlorella* sp.), peixes (*Danio rerio*, *Lepomis macrochirus* e *Oncorhynchus mykiss*), ratos (*Rattus norvegicus*), e vermes (*Lumbriculus variegatus*), entre outros, demonstram aumento nas atividades das enzimas antioxidantes CAT e/ou SOD (ELIA; WALLER; NORTON, 2002; CONTARDO-JARA; WIEGAND, 2008; QIAN *et al.*, 2008; SALABERRIA *et al.*, 2009; JIN *et al.*, 2010; SINGH; SANDHIR; KIRAN, 2010). Segundo KONER *et al.* (1998) a elevação da atividade da CAT está ligada a SOD, sendo uma resposta adaptativa ao aumento da geração de radicais livres.

Neste estudo, não houve alteração na atividade da SOD, o que pode ter acarretado na inibição observada na atividade da CAT, visto que elas atuam

sequencialmente. Sendo a SOD a primeira enzima na linha de defesa contra radicais livres derivados de oxigênio, sua ação gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por sua vez deve ser eliminado pela CAT, que o converte em H_2O e O_2 , evitando a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem causar danos celulares (TREVISAN, 2008).

Já a outra enzima antioxidante, a GR se mostrou inibida nos animais expostos, diferente do encontrado por Elia *et al.* (2002), onde não houve alteração da GR em *Lepomis macrochirus*. A diminuição da atividade desta enzima pode resultar na depleção da GSH, impossibilitando a manutenção do estado redox celular, pois ela regenera a GSH a partir de GSSG.

A inibição observada para a GR possivelmente seja a causa da inibição também observada para a GST, visto que a GST conjuga compostos potencialmente reativos à GSH para posterior eliminação destes compostos, e com a inibição da GR haverá queda nos níveis de GSH. Indicando que a atrazina pode estar atuando diretamente na enzima GST.

Em contrapartida, a atrazina também pode estar atuando diretamente na GR, causando sua inibição, o que acarreta em queda nos níveis de GSH, e conseqüentemente na queda da atividade da GST, devido a falta de substrato para a sua ação.

Os resultados observados para a atividade da GST mostram inibição em todas as concentrações testadas, assim como o resultado obtido por Baturó e Lagadic (1996), para o molusco *Lymnaea palustris*. Estes resultados se opõem aos encontrados para outras espécies, como *Lepomis macrochirus* (ELIA; WALLER; NORTON, 2002), *Lumbriculus variegatus* (CONTARDO-JARA; WIEGAND, 2008), *Danio rerio* (WIEGAND *et al.*, 2000) e ratos (SINGH; SANDHIR; KIRAN, 2010), onde a contaminação por atrazina causou a indução da atividade da GST.

Em alguns casos, outras substâncias, como diclorovinilcisteína (DCVC), aminotriazol e 4,6 dinitro-O-cresol (DNOC), são capazes de inibir o sistema antioxidante (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; BAGNYUKOVA; STOREY; LUSHCHAK, 2005). Entretanto, o mecanismo de inibição da atividade antioxidante não é conhecido, sugere-se que algumas destas substâncias podem inibir a transcrição de genes específicos, resultando em redução dos níveis de

RNA_m, o qual pode refletir em menor atividade das enzimas específicas de desintoxicação (SILVA *et al.*, 2010).

Em relação à peroxidação lipídica (LPO) não foram observadas alterações em nenhuma das concentrações testadas, o que indica que mesmo tendo causado alterações em algumas enzimas do sistema antioxidante, as concentrações utilizadas e o tempo de exposição à atrazina não foram suficientes para causar danos de membrana nas células do fígado de *Rhamdia quelen*. No entanto, Piancini (2011), utilizando as mesmas concentrações de atrazina (2, 10 e 100 µg/L), encontrou danos no DNA eritrócitos de *R. quelen*, através do teste de micronúcleo pisceco e de ensaio cometa.

Segundo Ahmad *et al.* (2004) a LPO é um dos principais processos induzidos por estresse oxidativo causado por xenobióticos, corroborando dados obtidos para outras espécies, com diferentes tempos de exposições e diferentes concentrações ou doses, como para os peixes da espécie *Lepomis macrochirus* expostos a 3, 6 e 9 mg/L de atrazina (ELIA; WALLER; NORTON, 2002) e para ratos contaminados com 300 mg/kg de atrazina, por 7, 14 e 21 dias (SINGH; SANDHIR; KIRAN, 2010), foi observada a indução da peroxidação lipídica gerada pela atrazina.

Nos tecidos a toxicidade de um xenobiótico pode se manifestar por degeneração celular, acompanhada de vacuolização, acúmulo de gordura e necrose (ARIENS; SIMONIS; OFFERMEIER, 1976 *apud* TRIPATHI; SRIVASTAV, 2010). Neste trabalho a toxicidade da atrazina foi responsável por vacuolização de hepatócitos, infiltração leucocitária e necrose nos indivíduos expostos as concentrações de 2, 10 e 100 µg/L de atrazina.

O fígado é o principal órgão envolvido no metabolismo e desintoxicação de xenobióticos e excreção de substâncias nocivas, incluindo o herbicida atrazina. Este órgão tem a capacidade de degradar os compostos tóxicos, mas este mecanismo de regulação pode ser alterado por concentrações elevadas e subsequentemente resultar em danos estruturais no tecido hepático (MELA, *et al.*, 2007; AGAMY, 2012).

A vacuolização pode indicar o acúmulo de lipídios ou glicogênio na tentativa de reduzir a concentração do poluente na circulação e nos tecidos (FRANÇA, 2005; TRIPATHI; SRIVASTAV, 2010), podendo atuar como um mecanismo de imobilização de compostos lipofílicos (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005).

A infiltração leucocitária indica sinais de inflamação e hipersensibilidade ao tóxico, e abundância de leucócitos é uma importante resposta diante de qualquer efeito prejudicial que esteja ocorrendo na célula, incluindo a presença de contaminantes (SILVA, 2008; TRIPHATI; SRIVASTAV, 2010). A invasão de leucócitos observada no fígado de *R. quelen* expostos a atrazina parece ter seguido o desenvolvimento de necrose e vacuolização celular, como uma resposta do corpo à presença de tecido danificado. Além disso, a presença de múltiplas áreas de necrose hepática e evidência de infiltração de leucócitos descrito em *R. quelen* são indicativos morfológicos dos efeitos nocivos da atrazina, mesmo sob exposição aguda.

A necrose dos hepatócitos é uma resposta comum à exposição à poluentes, podendo representar danos estruturais e funcionais irreversíveis, e estar relacionada à perda da integridade e com a falência de órgãos, com graves consequências à saúde de organismos expostos a tóxicos (RABITTO *et al.*, 2005).

Diversos estudos com diferentes espécies também encontraram alterações histopatológicas como necrose, infiltração leucocitária, vacuolização de hepatócitos, entre outras, em fígado relacionadas à contaminação por diferentes xenobióticos, como ratos contaminados por clorpirifós (TRIPATHI; SRIVASTAV, 2010) e por 2,4-D (TAYEB *et al.*, 2010), *Cyprinus carpio* expostas à terbutrina (VELISEK *et al.*, 2010), entre outros (ATEEQ; FARAH; AHMAD, 2006; LANGIANO; MARTINEZ, 2008; RABITTO *et al.*, 2005). O mesmo também foi encontrado em *Rhamdia quelen* expostos a 2,4-D (CATTANEO *et al.*, 2008), metilparation e glifosato (FERREIRA *et al.*, 2010), corroborando os dados obtidos neste trabalho com o herbicida atrazina.

O estresse oxidativo em conjunto com as alterações histopatológicas observadas nos jundiás expostos á atrazina corrobora o que descreve Scandalios (2005), onde ele diz que a maior produção de EROs e o conseqüente estresse oxidativo provoca danos celulares que são refletidos em alterações histológicas e morte celular (necrose).

Diversos autores sugerem que a quantificação de ML e CMM pode ser um indicador da saúde dos peixes ou de condições ambientais estressantes, como a exposição a contaminantes (RABITTO *et al.*, 2005; LEKNES, 2007; HINTON *et al.*, 2008). No entanto, a função dos CMM ainda não está clara, uma hipótese é que a

melanina dos macrófagos seja responsável por neutralizar os radicais livres liberados pelo catabolismo de ácidos graxos derivados da fagocitose de membranas celulares (CLEMENTE, 2009). São poucos os estudos que realizam a quantificação de ML, no entanto vários estudos relacionam o aumento de CMM com a exposição a contaminantes (RABITTO *et al.*, 2005; MELA *et al.*, 2007; VIGANÒ *et al.*, 2010; ABDEL-MONEIN; AL-KAHTANI; ELMENSHAWY, 2012).

Neste trabalho não houve diferença no número CMMs nos grupos expostos, no entanto a quantidade de MLs apresentou-se elevada em todas as concentrações utilizadas. Este aumento é justificado pela presença de necrose hepática e infiltração leucocitária, visto que melanomacróforos estão associados a uma resposta inflamatória (RABITTO *et al.*, 2005), decorrente de danos no tecido. Mela (2004) sugere que MLs possuem uma tendência a se agregarem formando os CMMs, portanto supõe-se que com um maior tempo de exposição ocorreria a formação dos CMMs nos indivíduos expostos a atrazina. Portanto, o aumento dos MLs pode ser um indicativo do efeito tóxico da atrazina.

5 CONCLUSÕES

A atrazina, em todas as concentrações testadas (2, 10 e 100µg/L), em peixes da espécie *Rhamdia quelen*:

- interferiu com as defesas antioxidantes, através da inibição das enzimas CAT, GR e GST;
- não apresentou efeito neurotóxico;
- causou danos hepáticos (necrose, infiltração leucocitária e vacuolização de hepatócitos);
- e proporcionou o aumento dos MLs.

Os resultados obtidos demonstram que a concentração máxima de atrazina permitida em ambientes aquáticos de 2 µg/L (CONAMA, Resolução 357/05) não representa um limite seguro para peixes da espécie *Rhamdia quelen*.

6 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MONEIN, A.M.; AL-KAHTANI, M.A.; ELMENSHAWY, O.M. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. **Chemosphere**. 2012.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Academic Press**. 105,121-126. 1984.

AGAMY, E. Histopathological liver alterations in juvenile rabbit fish (*Siganus canaliculatus*) exposed to light Arabian crude oil, dispersed oil and dispersant. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 75, 171-179. 2012.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Toxicologia*. [citado 1999] Disponível em URL:<http://www.anvisa.saude.gov.br>. In: CALDAS, E.D.; SOUZA, L.C.K.R. de. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Jornal de Saúde Pública**. 34, nº 5, 539-537. 2000.

AGIUS, C.; ROBERTS, R.J. Effects of starvation on the melano-macrophage centres of fish. **Journal of Biology**. 19, 161-169. 1981.

AHMAD, I.; MARIA, V.L.; OLIVEIRA, M.; SERAFIM, A.; BEBIANO, M.J.; PACHECO, M.; SANTOS, M.A. DNA damage and lipid peroxidation vs. protection responses in the gill of *Dicentrarchus labrax* L. from a contaminated coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). **Science of the Total Environment**. 406 (1-2), 298–307. 2008.

AHMAD, I.; PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Enzymatic and enzymatic antioxidants as an adaptation to phagocytes induced damage in *Anguilla Anguilla* L. following in situ harbor water exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 57, 290-295. 2004.

AHMAD, I.; PACHECO, M.; SANTOS, M.A. *Anguilla Anguilla* L. oxidative stress biomarkers: an in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). **Chemosphere**. 65, 952–962. 2006.

AKAISHI, F.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; JAKOBI, S.C.G.; EIRAS-STOFELLA, D.R.; ST-JEAN, S.D.; COURTENAY, S.C.; LIMA, E.F., WAGENER, A.L.R.; SCOFIELD, A.L.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (wsf) of crude oil. **Archives of Environment. Contamination and Toxicology**. 46, 244–253. 2004.

ALVAREZ, M.D.; FUIMAN, L.A. Environmental levels of atrazine and its degradation products impair survival skills and growth of red drum larvae. **Aquatic Toxicology**. 74, 229–241. 2005.

ARGEMI, F.; CIANNI, N.; PORTA, A. Disrupción endócrina: perspectivas ambientales y salud pública. **Toxicologia ambiental**. 39, 291–300. 2005.

ARIENS, E.J.; SIMONIS, A.M.; OFFERMEIER, J. introduction to General toxicology. **Academic Press**, Inc., new York. 1976. In: TRIPATHI, S.; SRIVASTAV, A.K. Liver profile of rats after long-term ingestion of different doses of chlorpyrifos. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 97, 60-65. 2010.

ARUFE, M.I.; ARELLANO, J.; MORENO, M.J.; SARASQUETE, C. Comparative toxic effects of formulated simazine on *Vibrio fischeri* and gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae. **Chemosphere**. 57, 1725–1732. 2004.

ATEEQ, B.; FARAH, M.A.; AHMAD, W. Evidence of apoptotic effects of 2,4-D and butachlor on walking catfish, *Clarias batrachus*, by transmission electron microscopy and DNA degradation studies. **Life Sciences**. 78, 977 – 986. 2006.

AZEVEDO, A.S.; KANWAR, R.S.; PEREIRA, L.S. Atrazine Transport in Irrigated Heavy- and Coarse-Textured Soils, Part I: Field Studies. **Journal of Agricultural Engineering Research**., 76, 165-174. 2000.

AZEVEDO, M. **A osmorregulação como biomarcador para a análise do impacto de contaminantes: avaliação de regiões costeiras brasileiras**. Dissertação de Mestrado em Zoologia. Universidade Federal do Paraná. 2005.

BAGNYUKOVA, T.V., STOREY, K.B., LUSHCHAK, V.I. Adaptive response of antioxidant enzymes to catalase inhibition by aminotriazole in goldfish liver and kidney. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 142, 335-341. 2005.

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard) fingerlings. **Aquaculture**. 253, 317-321. 2006a.

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; FIOREZE, I.; RODRIGUES, L.B.; SOSO, A.B.; RITTER, F.; CONRAD, J.; CERICATO, L.; FAGUNDES, M.; LACERDA, L.A.; TERRA, S. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae) provoked by usual aquaculture practices, with emphasis on immunosuppressive effects. **Aquaculture**. 237, 229-236. 2004.

BARCELLOS, L.J.G.; RITTER, F.; KREUTZ, L.C.; SILVA, L.B.; CERICATO, L.; QUEVEDO, R.M. The color of illumination affects stress response of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, Heptapteridae). **Ciência Rural**. 36, 1249–1252. 2006b.

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; RODRIGUES, L.B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R.M.; CERICATO, L.; CONRAD, J.; SOSO, A.B.; LACERDA, L.A.; TERRA, S. Hematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae) and hormonal and biochemical changes after acute stress. **Aquaculture Research**. 34, 1465-1469. 2003.

BARCELLOS, L.J.G.; WASSERMANN, G.F.; SCOTT, A.P.; WOHL, V.M.; QUEVEDO, R.M.; ITTZEÉS, I.; KRIEGER, M.H.; LULHIER, F. Steroid profiles of

cultured female jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces, Teleostei) during the first reproductive cycle. **General and Comparative Endocrinology**. 121, 325–332. 2001.

BARCELLOS, L.J.G.; WASSERMANN, G.F.; SCOTT, A.P.; WOEHL, V.M.; LULHIER, F.; QUEVEDO, R.M.; ITZÉS, I.; KRIEGER, M.H. Plasma steroid concentrations in relation to the reproductive cycle of cultured male *Rhamdia quelen*. **Journal of Fish Biology**. 61, 751–763. 2002.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. 29, 113-123. 2006.

BATURO, W.; LAGADIC, L. Benzo[a]pyrene hydroxylase and glutathione s-transferase activities as biomarkers in *Lymnaea palustris* (MOLLUSCA, GASTROPODA) exposed to atrazine and hexachlorobenzene in freshwater mesocosms. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 15 (5), 771–781. 1996.

BECKER, A.G.; MORAES, B.S.; MENEZES, C.C.; LORO, V.L.; SANTOS, D.R.; REICHERT, J.M.; BALDISSEROTTO, B. Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 72, 1734–1739. 2009.

BELLO, A.R.; FORTES, E.; BELLO-KLEIN, A.; BELLO, A.A.; LLESUY, S.F.; ROBALDO, R.B.; BIANCHINI, A. Lipid peroxidation induced by *Clinostomum detrunctum* in muscle of the freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Diseases of Aquatic Organisms**. 42, 233–236. 2000.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; & WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**. 22, 25-34. 1999.

BICALHO, S.T.T.; LANGENBACH, T.; RODRIGUES, R.R.; CORREIA, F.V.; HAGLER, A.N.; MATALLO, M.B.; LUCHINI, L.C. Herbicide distribution in soils of a riparian forest and neighboring sugar cane field. **Geoderma**. 158, 392-397. 2010.

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

BRETAUD, S.; TOUTANT, J.P.; SAGLIO, P. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 47, 117-124. 2000.

BROWN, C.L.; GEORGE, C.J. Age dependent accumulation of macrophage aggregates in the yellow perch, *Perca fluviatilis* (Mitchell). **Journal of Fish Diseases**. 8, 135-138. 1985.

BOSCARDIN, N.R. **A produção aquícola brasileira**. In: Ostrensky, A., Borghetti, J.R., Soto, D. (Eds.), *Aqüicultura no Brasil: O Desafio é Crescer*. Editora Brasília, Brasília, 27–72 (in Portuguese). 2008.

BOYD, R.A. Herbicides and herbicide degradates in shallow groundwater and the Cedar river near a municipal well field, Cedar Rapids, Iowa. **Science of the Total Environment**. 248, 241–253. 2000.

CATTANEO, R.; LORO, V.L.; SPANEVELLO, R.; SILVEIRA, F.A.; LUZ, L.; MIRON, D.S.; FONSECA, M.B.; MORAES, B.S.; CLASEN, B. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 92, 133–137. 2008.

CLAVER, A.; ORMAD, P.; RODRÍGUEZ, L.; OVELLEIRO, L. Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain). **Chemosphere**. 64, 1437–1443. 2006.

CLEMENTE, Z. **MONITORAMENTO DO RESERVATÓRIO ALAGADOS, PONTA GROSSA (PR) ATRAVÉS DE BIOMARCADORES E ANÁLISE DE CIANOTOXINAS**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2009.

COADY, K.K.; MURPHY, M.B.; VILLENEUVE, D.L.; HECKER, M.; JONES, P.D.; CARR, J.A.; SOLOMON, K.R.; SMITH, E.E.; VAN DER KRAAK, G.; KENDALL, R.J.; GIESY, J.P. Effects of atrazine on metamorphosis, growth, laryngeal and gonadal development, aromatase activity, and sex steroid concentrations in *Xenopus laevis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 62, 160-173. 2005.

CONAMA. Resolução 357-2005. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2005. <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>.> acessado em 13 de agosto de 2010.

CONTARDO-JARA, V.; WIEGAND, C. Biotransformation and antioxidant enzymes of *Lumbriculus variegatus* as biomarkers of contaminated sediment exposure. **Chemosphere**. 70, 1879–1888. 2008.

CRISP, T.M.; CLEGG, E.D.; COOPER, R.L.; WOOD, W.R.; ANDERSON, D.G.; BAETCKE, K.; HOFFMANN, J.L.; MORROW, M.S.; RODIER, D.J.; SCHAEFFER, J.E.; TOUART, L.W.; ZEEMAN, M.G.; PATE, Y.M. Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. **Environmental Health Perspectives**. 1, 11–56. 1998.

CROUCH, R.K.; GANDY, S. E.; KIMSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**. 35, 235-41. 1981.

DORES, E.F.G. de C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E.M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise Preliminar. **Química Nova**. 24, No. 1, 27-36. 2001.

DUTTA, H.M.; ARENDS, D.A. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. **Environmental Research**. 91(3), 157-162. 2003.

EISLER, R. Atrazine hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. **Biological Report**. 85. 1989.

ELIA, A.C.; WALLER, W.T.; NORTON, S.J. Biochemical Responses of Bluegill Sunfish (*Lepomis macrochirus*, Rafinesque) to Atrazine Induced Oxidative Stress. **Bulletin of Environment Contamination and Toxicology**. 68, 809–816. 2002.

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

EPA — Environmental Protection Agency, 1999. Spray Drift of Pesticides EPA 735F99024. Available: <http://www.epagov/pesticides/factsheets/spraydrifhtm>. 1999. Accessed 16 January 2007. In: BICALHO, S.T.T.; LANGENBACH, T.; RODRIGUES, R.R.; CORREIA, F.V.; HAGLER, A.N.; MATALLO, M.B.; LUCHINI, L.C. Herbicide distribution in soils of a riparian forest and neighboring sugar cane field. **Geoderma**. 158, 392-397. 2010.

FERNÁNDEZ-VEGA, C., SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. Thiobencarb-induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 72, 55-63. 2002.

FERREIRA, D.; MOTTA, A.C.; KREUTZ, L.C.; TONI, C.; LORO, V.L.; BARCELLOS, L.J.G. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. **Chemosphere**. 79, 914–921. 2010.

FISCHER-SCHERL, T.; VEESER, A.; HOFFMANN, R.W.; KÜHNHAUSER, C.; NEGELE, R.D.; EWRINGMANN, T. Morphological effects of acute and chronic atrazine exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Archives of Environment. Contamination and Toxicology**. 20, 454–461. 1991.

FLEISCHER, G. **Economic Analysis of Pesticide Policy – The Case of Registration Decisions**. Vauk-Verlag, Kiel, Germany. 1998.

FRANÇA, P. P. **Uso de biomarcadores na avaliação do impacto do acidente do navio Vicuna/2004 na Baía de Paranaguá, Pr. Análises Preliminares**. Monografia, Departamento Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, 2005.

- GALGANI, F., BOCQUENE', G., CADIOU, Y. Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North Sea. **Marine Ecology Progress Series**. 91, 72–82. 1992.
- GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; MORAES, B. S.; SIMÕES, R. R.; SCHETNGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; LORO, V. L. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comparative Physiology and Biochemistry**. 146C, 519–524. 2007.
- GOLOMBIESKI, J.I.; SILVA, L.V.F.; BALDISSEROTTO, B.; DA SILVA, J.H.S. Transport of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings at different times, load densities, and temperatures. **Aquaculture**. 216, 95–102. 2003.
- GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.; CHIPPARI-GOMES, A.R.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**. 30, 179–185. 2000.
- GRAYMORE, M.; STAGNITTI, F.; ALLINSON, G. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. **Environment International**. 26, 483–495. 2001.
- GRISOLIA, C.K. Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução, Vol. 1. Editora da Universidade de Brasília, Brasília, Brazil. 392 pp. 2005.
- GUARATINI, T; MEDEIROS, M H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidants in the skin: applications and evaluation of their efficacy. **Química Nova**. 30 (1), 206-213. 2007.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press, 936 p. 2005.
- HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D.; MURCHELAN, R.A.; OKIHIRO, M.S. Histopathology biomarkers: biochemical, physiological, and histopatological markers of antropogenic stress.; in: KIMERLEY, R.A.; MEHRLE, P.M.; BERGMAN, H.L. Biomarkers Biochemical Physiological and histological markers of antropogenic stress. **Lewis Publishers**. 155-208. 1992.
- HINTON, D. E. *et al.* Liver toxicity. In: DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. (Eds). **Toxicology of fishes**. D.E. USA: CRC press. p. 327-400. 2008.
- HOCK, B.; ELSTNER, E.F. "**Schadwirkungen in Pflanzen.**" Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 1995.
- HOEKSTRA, P.F.; BURNISON, B.K.; GARRISON, A.W.; NEHELI, T.; MUIR, D.C.G. Estrogenic activity of dicofol with the human estrogen receptor: isomer- and enantiomerspecific implications. **Chemosphere**. 64, 174–177. 2006.

HOFMEISTER, M.V.; BONEFELD-JORGENSEN, E.C. Effects of the pesticides prochloraz and methiocarb on human estrogen receptor α and β mRNA levels analyzed by online RT-PCR. **Toxicology in Vitro**. 18, 427–433. 2004.

HUGGETT, R. J.; KIMERIE, R. A.; MEHRIE Jr., P. M.; BERGMAN, H. L. **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992.

IPCS - INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. **Environmental Health Criteria 155**. Organização Mundial de Saúde, pp. 52, 1993.

ISLAM, M.O.; HARA, M.; MIYAKE, J. Induction of P-glycoprotein, glutathione-S-transferase and cytochrome P450 in rat liver by atrazine. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 12, 1–6. 2002.

JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V.; WOLF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**. 202, 384-389. 1992.

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**. 78, 846–852. 2010.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. **Journal of Biological Chemistry**. 251, 6183-6188. 1976.

KIRBY, M.F.; MORRIS, S.; HURST, M.; KIRBY, S.J.; NEALL, P.; TYLOR, T.; FAGG, A. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. **Marine Pollution Bulletin**. 40 (9), 780–791. 2000.

KLEMZ, C. **Uso de biomarcadores de contaminação ambiental em peixes *Ancistrus sp* (cascudo)**. Dissertação de Mestrado em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2002.

KLEMZ, C.; SILVA DE ASSIS, H.C. Efeitos do endosulfanato na atividade da acetilcolinesterase de cascudo (*Ancistrus multispinnis*, Fish, Teleostei). **Revista Acadêmica, Curitiba**. 3 (4), 51-58. 2005.

KODO FILHO, A.K. **Uso de biomarcadores de contaminação ambiental na avaliação do impacto do vazamento de óleo derivado de petróleo em ecossistemas de água doce**. Dissertação de Mestrado em Ecotoxicologia. Universidade Federal do Paraná. 2006.

KONER, B.C.; BANERJEE, B.D.; RAY, A. Organochlorine pesticide-induced oxidative stress and immune suppression in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**. 36, 395–398. 1998.

KREUTZ, L.C.; BARCELLOS, L.J.G.; SILVA, T.O.; ANZILIERO, D.; MARTINS, D.; LORENSON, M.; MARTENINGHE, A.; SILVA, L.B. Acute toxicity testing of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*), fingerlings. **Ciência Rural** 38, 1050–1055. 2008.

LACKNER, R. “Oxidative stress” in fish by environmental pollutants. In: BRAUNBECK, T.; HINTON, D.E.; STREIT, B. (eds.) Fish ecotoxicology. Basel, Switzerland, Birkhäuser Verlag, p. 203-224. 1998.

LANGIANO, V.C.; MARTINEZ, C.B.R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C 147, 222–231. 2008.

LAZZARI, R.; NETO, J.R.; EMANUELLI, T.; PEDRON, F. de A.; COSTA, M.L.; LOSEKANN, M.E.; CORREIA, V.; BOCHI, V.C. Diferentes fontes protéicas na alimentação do jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**. 36, 240-246. 2006.

LAWS, S.C.; FERRELL, J.M.; STOKER, T.E.; SCHMID, J.; COOPER, R.L. The effects of atrazine on female Wistar rats: an evaluation of the protocol for assessing pubertal development and thyroid function. **Toxicological Science**. 58, 366–376. 2000.

LEKNES, I. L. Melano-macrophage centres and endocytic cells in kidney and spleen of pearl gouramy and platyfish (Anabantidae, Poeciliidae: Teleostei). **Acta Histochemica**. 109, 164-168, 2007.

LIU, X.M.; SHAO, J.Z.; XIANG, L.X.; CHEN, X.Y. Cytotoxic effects and apoptosis induction of atrazine in a grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) cell line. **Environmental Toxicology**. 21, 80–89. 2006.

MARTINEZ-TABCHE, L.; RAMÍREZ, B.M.; GERMÁN-FAZ, C.; GALAR, C.L.; MADRIGAL, O.M.; ULLOA, G.V.; OROZCO, F.M. Toxic effect of sodium dodecylbencensulphonate, lead, petroleum and their mixtures on the activity of acetylcholinesterase of *Moina macrocopa* in vitro. **Environmental Toxicology and Water Quality**. 12, 1–5. 1997.

MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. Indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitation. **Free Radical Biology and Medicine**. 26, 202-226. 2002.

MEHLER, W.T.; SCHULER, L.J.; LYDY, M.J. Examining the joint toxicity of chlorpyrifos and atrazine in the aquatic species: *Lepomis macrochirus*, *Pimephales promelas* and *Chironomus tentans*. **Environmental Pollution**. 152, 217-224. 2008.

MELA, M. **Uso de Biomarcadores na Avaliação dos Efeitos do Metilmercúrio em *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) (Traira)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2004.

MELA, M.; RANDI, M.A.F.; VENTURA, D.F.; CARVALHO, C.E.V.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 68, 426–435. 2007.

MELO, G.C.; DONATTI, L.; RUDNIKI, C.A.M.; FANTA, E. Hepatic alterations in the fish *Rhamdia quelen* contaminated with Folidol 600[®]. **Ecotoxicology and Environment Safety**. 71, 821–829. 2008.

MIRON, D.S. **Respostas metabólicas e enzimáticas em jundiás *Rhamdia quelen* (Heptapteridae) e piavas *Leporinus obtusidens* (Anostomidae) expostos a herbicidas utilizados na cultura do arroz irrigado**. Tese de Doutorado em Bioquímica Toxicológica. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. 2009.

MIRON, D.; CRESTANI, M.; SCHETINGER, M. R.; MORSCH, V. M.; BALDISSEROTTO, B.; TIerno, M. A.; MORAES, G.; VIEIRA, V. L. P. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuronmethyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicology and Environment Safety**. 61, 398-403. 2005.

MOCCIA, R.D.; WILKIE, E.J.; MUNKITTRICK, K.R.; THOMPSON, W.D. The use of fine needle endoscopy in fish for in vivo examination of visceral organs, with special reference to ovarian evaluation. **Aquaculture**. 40, 255-259. 1984.

MYERS, M.S.; FOURNIE, J.W. Histopathological biomarkers as integrators of anthropogenic and environmental stressors. In: Biological indicators of aquatic ecosystem stress (ADAMS, S.M.) **American Fisheries Society**. 24, 221-287. 2002.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Oil in the sea III: inputs, fates, and effects**. 1. ed., EUA, pp. 265, 2003.

NICARETA, L. **Biomarcadores para a detecção de efeitos subletais causados pela deltametrina em *Ancistrus multispinnis***. Dissertação de Mestrado em Farmacologia. 2004.

OLIVEIRA, C. P. M. S. **Efeito da silimarina e verapamil no modelo murino de isquemia e reperfusão hepática: citoproteção e redução do estresse oxidativo**. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. São Paulo. 1999.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic Toxicology**. 74, 53-69. 2005.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., FILIPAK NETO, F., MELA, M., SILVA, P.H., RANDI, M.A.F., RABITTO, I.S., ALVES COSTA, J.R.M., PELLETIER, E. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary

doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. **Environmental Research**. 101, 74–80. 2006.

ORME, S.; KEGLEY, S. **PAN Pesticide database Pesticide Action Network**, San Francisco, California. 2004.

OULMI, Y.; NEGELE, R.F.; BRAUNBECK, T. Segment specificity of the cythological response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) renal tubules following prolonged exposure to sublethal concentrations of atrazine. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 32, 39-50. 1995.

PAMPLONA, J.H.; OBA, E.T.; da SILVA, T.A.; RAMOS, L.P.; RAMSDORF, W.A.; CESTARI, M.M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; ZAMPRONIO, A.R.; SILVA de ASSIS, H.C. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 74, 342-349. 2011.

PAYNE, J. F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W.; FANCEY, L. L. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Marine Pollution Bulletin**. 32(2), 225-231. 1996.

PIANCINI, L.D.S. **Utilização de biomarcadores genéticos na avaliação aguda do efeito mutagênico dos contaminantes atrazina e cloreto de cobre em *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae)**. Dissertação apresentada a Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2011.

PREMAZZI, G.; STECCHI, R. **Evaluation of the impact of atrazine on the aquatic environment**. Commission of the European Communities, EUR 12569 EN. 1990.

QIAN, H.F.; SHENG, G.D.; LIU, W.P.; LU, Y.C.; LIU, Z.H.; FU, Z.W. Inhibitory effects of atrazine on *Chlorella vulgaris* as assessed by real-time polymerase chain reaction. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 27, 182–187. 2008.

RABITTO, I.S.; ALVES COSTA, J.R.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; PELLETIER, F.M.; AKAISHI, F.M.; ANJOS, A.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: hitopatological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environment Safety**. 60, 147-156. 2005.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE P.K. Distúrbios neurodegenerativos. In: *Farmacologia*. 5.Ed., Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, p.567-571, 2004.

ROEX, E.W.M.; KEIJZERS, R.; VAN GESTEL, C.A.M. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. **Aquatic Toxicology**. 64, 451-460. 2003.

ROSSI, S. **Uso de biomarcadores para a detecção de efeitos subletais dos**

pesticidas Roundup® e Hexaron® em *Astyanax sp.* (Pisces, Teleostei). Dissertação de Mestrado em Ecologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2008.

SAGLIO, P.; TRIJASSE, S. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. **Archives of Environment. Contamination and Toxicology.** 35, 484-491. 1998.

SALABERRIA, I.; HANSEN, B.H.; ASENSIO, V.; OLSVIK, P.A.; ANDERSEN, R.A.; JENSSEN, B.M. Effects of atrazine on hepatic metabolism and endocrine homeostasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicology and Applied Pharmacology.** 234, 98–106. 2009.

SANCHO, E.; CERÓN, J.J.; FERRANDO, M.D. Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicology and Environment Safety.** 46, 81-86. 2000.

SAWICKI, B.; DURAND, G.; DEWITTE, J.D.; RATANASAVANH, D.; RICHI, C.; LÉGLISE, M.C. Myelosuppressive Activity of Two Herbicides, Atrazine and Dinoterb, on Human Haematopoietic Progenitor Cells: An In V&w Assay to Evaluate the Effects of Intermediate or Long-term Exposure. **Toxicology in Vitro.** 12, 183-190. 1998.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** 38, 995-1014. 2005.

SCHULZ, U.H.; LEUCHTENBERGER, C. Activity patterns of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Brazilian Journal of Biology.** 66A, 565–574. 2006.

SIES, H.; *et al.* Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Letter.** 103: 287- 290, 1979.

SILVA, C. A. **Avaliação da qualidade da água após cinco anos de derramamento de petróleo no município de Araucária, Paraná.** Dissertação de Mestrado em Ecologia e Conservação. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2007.

SILVA, C. A.; MAGALHÃES, V. F.; OBA, E. T.; RAMSDORF, W. A.; CESTARI, M.M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SILVA DE ASSIS, H. C. First report about saxitoxins in freshwater fish *Hoplias malabaricus* through trophic exposure. **Toxicon.** 2010.

SILVA DE ASSIS, H. C. **Der Einsatz Von Biomarkern zur summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen.** Tese de doutorado apresentada na Universidade Técnica de Berlim, Alemanha, p.99. 1998.

SILVA, M.D. **BIOMONITORAMENTO DE UMA RESERVA PARTICULAR DO PATRIMÔNIO NATURAL (RPPN) ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS, MORFOLÓGICOS E GENÉTICOS EM *Astyanax sp.*** Dissertação de Mestrado apresentada na Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2008.

SILVESTRE, F.; TRAUSCH, G.; SPANO, L.; DEVOS, P. Effects of atrazine on osmoregulation in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology C**. 132, 385–390. 2002.

SINGH, M.; SANDHIR, R.; KIRAN, R. Effects on antioxidant status of liver following atrazine exposure and its attenuation by vitamin E. **Experimental and Toxicologic Pathology**. 2010.

SOLOMON, K.R.; CARR, J.A.; DU PREEZ, L.H.; GIESY, J.P.; KENDALL, R.J.; SMITH, E.E.; VAN DER KRAAK, G.J. Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. **Critical Reviews in Toxicology**. 38, 721–772. 2008.

SOSO, A.B.; BARCELLOS, L.J.G.; PAIVA, M.J.R.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; SILVA, T. O.; LIMA, M.R.; SILVA, L.B.; RITTER, F.; BEDIN, A.; FINCO, J. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormones profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 23, 308-313. 2007.

SPANO, L.; TYLER, C.R.; VAN AERLE, R.; DEVOS, P.; MANDIKI, S.N.M.; SILVESTRE, F.; THOME, J.P.; KESTEMONT, P. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). **Aquatic Toxicology**. 66, 369–379. 2004.

STENESH, J. **Biochem Plen**. New York, EUA. p 596. 1998.

STURM, A.; SILVA DE ASSIS, H.C.; HANSEN, P.D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Marine Environmental Research**. 47, 389–398. 1999.

TARAZONA, C.; CARRASCO, J.M.; SABATER, C. 2003. **Monitoring of rice pesticides in an aquatic system of natural park of Albufera, Valencia, Spain**. Hazard Evaluation. XII Symposium Pesticide Chemistry, pp. 727–735.

TAVERA-MENDOZA, L.; RUBY, S.; BROUSSEAU, P.; FOURNIER, M.; CYR, D.; MARCOGLIESE, D. Response of the amphibian tadpole *Xenopus laevis* to atrazine during sexual differentiation of the testis. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 21, 527–531. 2002.

TAYEB, W.; NAKBI, A.; TRABELSI, M.; ATTIA, N.; MELID, A.; HAMMAMI, M. Hepatotoxicity induced by sub-acute exposure of rats to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid based herbicide “Désormone lourde”. **Journal of Hazardous Materials**. 180, 225–233. 2010.

THIYAGARAJAH, A.; HARTLEY, W.R.; ABDELGHANI, A. Hepatic hemosiderosis in buffalo fish (*Ictiobus* spp.). **Marine Environmental Research**. 46: 203-207. 1998.

TREVISAN, R. **Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramentas de monitoramento ambiental: análise de dois ecossistemas catarinenses.** Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do grau em Bacharel apresentada na Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

TRIPATHI, S.; SRIVASTAV, A.K. Liver profile of rats after long-term ingestion of different doses of chlorpyrifos. **Pesticide Biochemistry and Physiology.** 97, 60-65. 2010.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology.** 13, 57-149. 2003.

VELISEK, J.; SUDOVA, E.; MACHOVA, J.; SVOBODOVA, Z. Effects of sub-chronic exposure to terbutryn in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety.** 73, 384–390. 2010.

VENTURA, B.C.; ANGELIS, D. de F. de; MARTIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology.** 90, 42–51. 2008.

VENTURA, E.C. **Biomarcadores Bioquímicos em *Orthopristis ruber* (Cuvier, 1830) (Perciformes- Haemulidae) e *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) (Perciformes-Sciaenidae), coletados na costa sudeste brasileira.** Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2004.

VIGANÒ, L.; BENFENATI, E.; BOTTERO, S.; CEVASCO, A.; MONTEVERDE, M.; MANDICH, A. Endocrine modulation, inhibition of ovarian development and hepatic alterations in rainbow trout exposed to polluted river water. **Environmental Pollution.** 158, 3675-3683. 2010.

VIRGENS, A.C. **Biomarcadores enzimáticos, hematológicos e histológicos em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.) em resposta à exposição ao acefato, difenoconazol e sulfluramida.** Dissertação de Mestrado em Ecologia de Ecossistemas. Centro Universitário Vila Velha. Vila Velha. 2009.

VOGELBEIN, W.K.; FOURNIE, J.W.; OVERSTREET, R.M. Sequential development and morphology of experimentally induced hepatic melano-macrophage centres in *Rivulus marmoratus*. **Journal of Fish Biology.** 31:145-153. 1987.

XING, H.; WANG, J.; LI, J.; FAN, Z.; WANG, M.; XU, S. Effects of atrazine and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and Carboxylesterase in brain and muscle of common carp. **Ecotoxicology and Environment Safety.** 30, 26–30. 2010.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. **Principles of**

Ecotoxicology. Taylor & Francis. Londres, 321p., 1996.

WIEGAND, C.; KRAUSE, E.; STEINBERG, C.; PFLUGMACHER, S. Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environment Safety.** 49, 199–205. 2001.

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S.; GIESE, M.; FRANK, H.; STEINBERG, C. Uptake, Toxicity, and Effects on Detoxication Enzymes of Atrazine and Trifluoroacetate in Embryos of Zebrafish. **Ecotoxicology and Environment Safety.** 45, 122-131. 2000.

WILHELM FILHO, D. Fish antioxidant defenses – A comparative approach. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** 29, 1735-1742. 1996.



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas



**PARECER DA COMISSÃO DE AVALIAÇÃO
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DA DISCIPLINA
DE ESTÁGIO CURRICULAR**

Aos vinte e nove dias do mês de junho de 2012 a Comissão de Avaliação da Monografia de Estágio Curricular do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, composta por: Profa. Helena Cristina da Silva de Assis, Prof. Marco Antonio Ferreira Randi e João Luiz Coelho Ribas, reuniu-se para proceder a avaliação da Monografia intitulada Avaliação da toxicidade do herbicida atrazina em jundiás (*Rhamdia quelen*) através de biomarcadores bioquímicos e morfológicos, de autoria do(a)acadêmico(a) Leticia da Silva Pereira.

A Comissão julgou o trabalho e atribui a nota 95.



Profa. Helena Cristina da Silva de Assis
Orientador(a)



Prof. Marco Antonio Ferreira Randi
Membro da Comissão



João Luiz Coelho Ribas
Membro da Comissão

Curitiba, 29 de junho de 2012.



Ministério da Educação e do Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Farmacologia

A Coordenação do Curso de Ciências Biológicas

Curitiba, 27 de julho de 2012

Prezada Coordenadora,

Venho por meio deste atestar que a aluna Letícia da Silva Pereira realizou as correções sugeridas pela banca referente a sua monografia.

Atenciosamente,


Profª. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis
Orientadora