

ANÁLISE DE RISCO AMBIENTAL E EXPOSIÇÃO DE LARVAS DE TILÁPIA-DO-NILO APÓS ESTRESSE EM NÍVEIS SUBLETAIS DE ATRAZINA

Bruna Milke **Chiste**¹; Natalia Akemi **Takeshita**²; Cristiano Campos **Mattioli**³; Robson Monticelli **Barizon**⁴; Hamilton **Hisano**⁵

Nº 20413

RESUMO – A atrazina é um herbicida amplamente utilizado para o controle de plantas daninhas, sendo encontrada frequentemente em solos e ambientes aquáticos. Objetivou-se nesse estudo avaliar os efeitos de concentrações subletais da atrazina em condições pós-estresse (exposição ao ar) em larvas de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus*, e avaliar o risco ambiental agudo deste herbicida aos peixes. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 15 aquários com volume útil de 1 L (10 peixes/aquário), onde foram expostos a quatro concentrações subletais de atrazina 0,18; 6; 12 e 18 mg L⁻¹. Peixes do grupo controle 0 mg L⁻¹ e 0,18 mg L⁻¹ não apresentaram mortalidade no período de 24 e 48 horas após o estresse. Após 24 horas de exposição à atrazina, 10% de mortalidade foi observada em peixes submetidos a 6 mg L⁻¹, 40% a 12 mg L⁻¹ e 50% a 18 mg L⁻¹. Os tratamentos de 12 e 18 mg L⁻¹ apresentaram diferença estatística em 24 e 48 horas. Após 48 horas de exposição, a mortalidade acumulada atingiu 70% a 18 mg L⁻¹, 60% a 12 mg L⁻¹ e 20% a 6 mg L⁻¹. O pH, temperatura e oxigênio dissolvido apresentaram diferença ($P < 0,05$), porém permaneceram dentro da faixa ideal recomendada para espécie. As larvas de tilápia-do-nilo submetidas ao estresse (exposição ao ar) e expostas a doses subletais de atrazina apresentaram mortalidade significativa, indicando que o estresse ao ar pode aumentar o efeito tóxico da atrazina. Por outro lado, com base nas análises de risco, a atrazina apresenta baixo risco agudo para larvas de tilápia-do-nilo.

Palavras-chaves: Aquicultura, herbicida, impacto ambiental, toxicidade, *Oreochromis niloticus*.

1 Autor, Bolsista CNPq (ITI-A): Graduação em Medicina Veterinária, UniFAJ, Jaguariúna-SP; milkechistebruna@yahoo.com.br.

2 Colaborador, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Medicina Veterinária, UniFAJ, Jaguariúna-SP.

3 Colaborador: Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial do CNPq – Nível B, Jaguariúna-SP.

4 Colaborador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

5 Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; hamilton.hisano@embrapa.br.



ABSTRACT – Atrazine is an herbicide widely used for weed control, being found in soils and aquatic systems. The objective of this study was to evaluate the effects of sub-lethal concentrations of atrazine in post-stress conditions (exposure to air) in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* larvae, and to evaluate the environmental risk caused by this herbicide. The fish were randomly distributed in 15 aquaria with a useful volume of 1 L (10 fish / aquarium), where they were exposed to four concentrations of atrazine 0.18; 6; 12 and 18 mg L⁻¹. Control group fishes 0 mg L⁻¹ and 0.18 mg L⁻¹ did not show mortality within 24 and 48 hours after stress. After 24 hours the exposure to atrazine, 10% of mortality was observed in fish with 6 mg L⁻¹, 40% at 12 mg L⁻¹ and 50% at 18 mg L⁻¹. The 12 and 18 mg L⁻¹ controls show statistical difference at 24 and 48 hours. After 48 hours of exposure, accumulated mortality reached 70% to 18 mg L⁻¹, 60% to 12 mg L⁻¹ and 20% to 6 mg L⁻¹. The pH, temperature and dissolved oxygen showed a difference ($P < 0.05$), but remained within ideal range recommended for species. Nile tilapia larvae submitted to stress (air exposition) and exposed to sub-lethal doses of atrazine showed significant mortality, indicating that stressors may increase the toxic effect of atrazine. On the other hand, based on risk analyzes, atrazine has a low acute risk for Nile tilapia larvae.

Keywords: Aquaculture, herbicide, environmental impact, toxicity, *Oreochromis niloticus*.

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura – FAO (2018), a aquicultura é uma das atividades zootécnicas que apresenta o maior crescimento em nível mundial. Em 2018, a produção total de peixes no Brasil gerou mais de 4,9 milhões de reais, sendo que a tilápia correspondeu a 35,79% da produção nacional de peixes (311 mil t), com a liderança do estado do Paraná, seguido por São Paulo e Minas Gerais (IBGE, 2019).

Os principais estados produtores de tilápia, são também importantes produtores de grãos, o que estimula a instalação de pisciculturas nessas regiões, devido as menores despesas com logística e transporte. A atrazina (2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina) é um herbicida que pertence ao grupo das triazinas, utilizado para o controle de plantas daninhas, principalmente nas culturas de sorgo, milho e cana-de-açúcar, sendo uma substância encontrada em solos e águas subterrâneas (COUTINHO *et al.*, 2005). Por conta de sua presença em meio aquático torna-se importante estudos relacionados a toxicidade deste herbicida para os peixes.



De acordo com o Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (BRASIL, 2005) a quantidade máxima de atrazina permitida ser encontrada em águas superficiais é de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$. A atrazina pode causar nos peixes desregulações fisiológicas, como alterações na enzima acetilcolinesterase, na hemoglobina e hematócrito, e ainda pesquisas *in-vitro* indicam que a atrazina pode influenciar no cortisol (BISSON; HONTELA, 2002; HUSSEIN *et al.*, 1996) um importante hormônio indicador de estresse. A interferência da secreção de cortisol pode também ser causada pelo estresse, e afeta significativamente o desenvolvimento inicial dos peixes.

Considerando a importância ecotoxicológica e carência de informações para fases iniciais de vida dos peixes, objetivou-se nesse estudo avaliar os efeitos de concentrações subletais da atrazina em condições pós-estresse (exposição ao ar) em larva de tilápia-do-nilo e avaliar o risco ambiental agudo deste herbicida.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram conduzidos no Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança (LEB) da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna - SP. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – Embrapa Meio Ambiente (Protocolo nº 011/2018) e realizado de acordo com as diretrizes da OECD (1992).

Previamente ao experimento, as larvas foram aclimatadas durante 48 horas, em aquário 250 L com renovação de água diária, aeração constante, temperatura controlada com termostato (28°C), alimentação com ração comercial contendo 56% de proteína bruta, e controle de fotoperíodo de 12 horas. Foi utilizada água oriunda do poço artesiano. Os parâmetros de qualidade da água mensurados foram: temperatura (26°C), pH (6,8), oxigênio dissolvido ($> 5 \text{ mg L}^{-1}$), condutividade ($14 \mu\text{S cm}^{-1}$) e amônia total ($< 0,1 \text{ mg L}^{-1}$). As tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) foram adquiridas de piscicultura comercial localizada na cidade de Monte Mor – SP.

Realizou-se o ensaio avaliando a mortalidade das larvas de tilápia após estresse ao ar e exposição a doses subletais de atrazina, que foram acompanhados por período de 48 horas. Foram utilizadas 150 larvas de tilápia com peso médio inicial de $17,9 \pm 1,7 \text{ mg}$. As larvas foram retiradas dos aquários, colocadas em uma superfície seca, e com auxílio de papel absorvente foi retirado o excesso de água dos peixes onde permaneceram por cinco minutos. Após o estresse por exposição ao ar, os peixes foram distribuídos aleatoriamente em 15 aquários com volume útil de 1 L (10 peixes/aquário), onde foram expostos a quatro concentrações de atrazina 0,18; 6; 12 e 18 mg L^{-1} , totalizando cinco tratamentos e três repetições. Foi realizada a pesagem da atrazina em balança analítica, e cada concentração do composto foi diluída em 2ml de acetona. Com o auxílio de um bastão de vidro foi realizada a homogeneização do composto com a acetona, e então foi



acrescentado á 48 ml de água destilada, realizando novamente a homogeneização. A mortalidade foi contabilizada 24 e 48 horas após a exposição aos tratamentos. Os parâmetros de qualidade da água (pH, oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade, dureza e amônia total) foram avaliados nos tempos 0, 24 e 48 horas.

Avaliou-se também o risco toxicológico agudo da atrazina sobre as larvas de tilápia-do-nilo pelo método do coeficiente de risco (CR). O coeficiente de risco é calculado pela razão entre a concentração ambiental estimada (CAE) e a $CL_{50-96hs}$. A CAE foi calculada com a adaptação do método do lago padrão da agência de proteção ambiental dos Estados Unidos – USEPA (YOUNG, 2014). Por esta abordagem, a CAE é estimada para uma área agrícola de 10 ha que drena para um corpo d'água de 1 ha e 2 m de profundidade. Como a profundidade da maioria dos tanques de produção de tilápia variam entre 0,5 e 1,5 m, optou-se por empregar o limite superior da profundidade dos tanques, ou seja, 1,5 m. A dose de atrazina empregada no cálculo foi de 3,25 kg/ha, maior dose registrada no Brasil na cultura do milho. A fração de atrazina perdida via escoamento superficial no campo que atinge o corpo d'água foi definida em 0,5% da quantidade total aplicada, sendo considerada um valor médio de perda, baseado nas propriedades físico-químicas da atrazina. A $CL_{50-96hs}$ selecionada para o cálculo do CR foi estabelecida experimentalmente, em estudo anterior. O CR calculado foi então comparado com o nível de preocupação (LOC – *level of concern*), estabelecido pela USEPA, que para o risco agudo de organismos aquáticos é 0,5. O risco é considerado inaceitável quando o valor do CR excede o LOC.

Os resultados obtidos para as diferentes variáveis e análises foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade da variância, seguido por análise de variância (ANOVA). Para avaliação dos resultados de qualidade de água e mortalidade, quando significativo, aplicou-se o de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados foram analisados no programa estatístico R versão 3.5.1. (R CORE TEAM, 2016).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os peixes do grupo controle 0 mg L^{-1} e $0,18 \text{ mg L}^{-1}$ não apresentaram mortalidade no período de 24 e 48 horas após o estresse (Figura 1). Após 24 horas de exposição à atrazina, 10% de mortalidade foi observada em peixes submetidos a 6 mg L^{-1} , 40% a 12 mg L^{-1} e 50% de a 18 mg L^{-1} . Os tratamentos de 12 e 18 mg L^{-1} apresentaram diferença estatística quando comparado os demais tratamentos em 24 e 48 horas. Após 48 horas de exposição, a mortalidade acumulada atingiu 20% a 6 mg L^{-1} , 60% a 12 mg L^{-1} e 70% a 18 mg L^{-1} . A mortalidade foi mais crítica nas primeiras 24 horas (Figura 1).

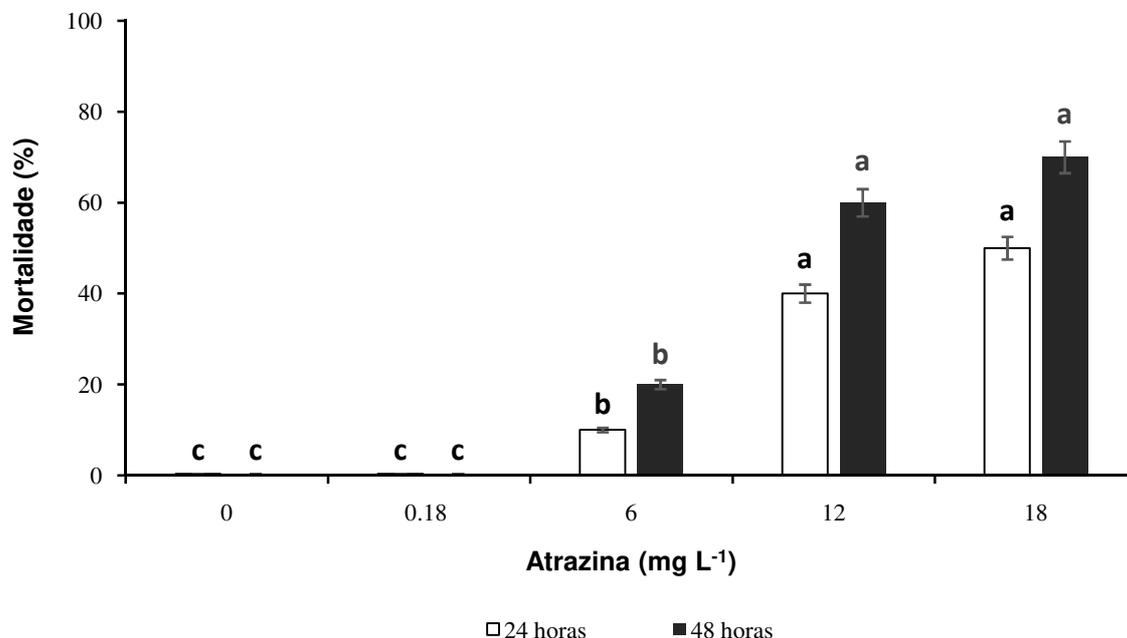


Figura 1. Mortalidade de larvas de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus*, após estresse ao ar durante 5 minutos e exposição à atrazina por 24 e 48 horas. Médias seguidas pela mesma letra dentro do tratamento em cada período, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Considerando a real possibilidade de contaminação com atrazina em corpos d'água foi realizado o presente estudo para avaliar dosagens subletais de atrazina associada ao manejo de estresse simulando possíveis interferências ambientais e de manejo nas pisciculturas. Existem relatos de produtores de peixes sobre mortalidades de tilápias nos estágios iniciais sem sintomas de patógenos. A presença de herbicidas ou outros agrotóxicos na água é uma das possíveis causas de mortalidade desses animais.

As larvas assim que colocadas na água contendo o herbicida, apresentaram sinais de estresse, como movimentos descoordenados, natação irregular com períodos rápidos de natação e letargia. Os peixes em estado crítico se acomodaram ao fundo dos aquários até a morte, o mesmo foi relatado nos experimentos de CL₅₀ de Khoshnood e Khoshnood (2014) utilizando larvas de *Rutilus kutum*. Análises fisiológicas, metabólicas e hematológicas não foram realizadas devido a fase de desenvolvimento dos animais testes. O estresse causado pela exposição ao ar deve alterar a homeostase fisiológica e imunológica, aumentando o efeito tóxico, uma vez que foram utilizadas dosagens subletais. A atrazina além de causar desregulação nos níveis de cortisol, pode causar



também em peixes desregulação na hemoglobina e hematócrito (BISSON; HONTELA, 2002; HUSSEIN et al., 1996).

Em estudo conduzido por Kreutz *et al.* (2010) observou-se imunossupressão em alevinos de jundiá, quando expostos a concentrações subletais de atrazina, e posteriormente submetidos a desafio bacteriano com *Aeromonas hydrophila*. Kirsten *et al.* (2017) sugere que a imunossupressão causada pela atrazina pode estar relacionada a alteração na expressão de genes. *Prochilodus lineatus* expostos a atrazina por 24 horas, e posteriormente submetidos ao estresse (exposição ao ar) exibiu alterações nos níveis de cortisol, eritrócitos, hemoglobina e hematócrito (NASCIMENTO *et al.*, 2012). No presente estudo, provavelmente as condições estressantes alteraram a homeostase fisiológica e imunológica, potencializando os efeitos tóxicos da atrazina, que foram observados na mortalidade das larvas.

O pH, temperatura e OD apresentaram pequenas diferenças ($P < 0,05$) entre 24 e 48 horas e para diferentes concentrações de atrazina (Tabelas 1, 2 e 3). O pH na concentração de 12 mg L^{-1} foi ligeiramente superior ($P < 0,05$) no tempo 0 h quando comparado com o de 48h. Para a temperatura houve diferença ($P < 0,05$) entre o período de 0 h e 24 h para concentração de $0,18 \text{ mg L}^{-1}$. O OD para o tempo 0h nas concentrações de $0,18$, 6 e 12 mg L^{-1} foram maiores ($P < 0,05$) em relação a 48h. A condutividade durante o experimento permaneceu em média a $0,173 \mu\text{S cm}^{-1}$ no tratamento controle, $0,174 \mu\text{S cm}^{-1}$ a $0,18 \text{ mg L}^{-1}$, $0,170 \mu\text{S cm}^{-1}$ a 6 mg L^{-1} , $0,172 \mu\text{S cm}^{-1}$ a 12 mg L^{-1} e $0,173 \mu\text{S cm}^{-1}$ a 18 mg L^{-1} , não demonstrando diferença estatística. A amônia permaneceu em média $< 0,25 \text{ mg L}^{-1}$ em todas as concentrações testadas e durante todo o experimento. No entanto os parâmetros permaneceram na faixa ideal recomendada para a espécie (SHOKO, *et al.*, 2014) e não interferiram no estado fisiológico das larvas.

Tabela 1. Médias (\pm desvio padrão) de pH da água do experimento com diferentes doses de atrazina.

Tratamentos (mg L^{-1})	0 h	24 h	48 h
0	$6,93 \pm 0,03^a$	$6,85 \pm 0,05^a$	$6,80 \pm 0,14^a$
0,18	$6,92 \pm 0,11^a$	$6,84 \pm 0,09^a$	$6,86 \pm 0,04^a$
6	$6,85 \pm 0,06^a$	$6,86 \pm 0,11^a$	$6,82 \pm 0,10^a$
12	$6,92 \pm 0,07^a$	$6,87 \pm 0,03^{ab}$	$6,65 \pm 0,10^b$
18	$6,83 \pm 0,05^a$	$6,87 \pm 0,03^a$	$6,65 \pm 0,19^a$

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem pelo teste Tukey ($p < 0,05$).



Tabela 2. Médias (\pm desvio padrão) de temperatura da água do experimento com diferentes doses de atrazina.

Tratamentos (mg L ⁻¹)	0 h	24 h	48 h
0	27,03 \pm 0,31 ^a	26,63 \pm 0,23 ^a	26,57 \pm 0,21 ^a
0,18	26,93 \pm 0,12 ^a	26,53 \pm 0,06 ^b	26,73 \pm 0,15 ^{ab}
6	26,47 \pm 0,47 ^a	26,67 \pm 0,12 ^a	26,60 \pm 0,20 ^a
12	26,77 \pm 0,35 ^a	26,60 \pm 0,10 ^a	26,47 \pm 0,21 ^a
18	26,67 \pm 0,21 ^a	26,57 \pm 0,15 ^a	26,63 \pm 0,23 ^a

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 3. Médias (\pm desvio padrão) de oxigênio dissolvido da água do experimento com diferentes doses de atrazina.

Tratamentos (mg L ⁻¹)	0 h	24 h	48 h
0	8,27 \pm 0,15 ^a	7,98 \pm 0,29 ^a	7,17 \pm 0,21 ^b
0,18	8,10 \pm 0,10 ^a	7,67 \pm 0,32 ^{ab}	7,27 \pm 0,31 ^b
6	8,10 \pm 0,10 ^a	7,63 \pm 0,29 ^{ab}	7,33 \pm 0,31 ^b
12	8,03 \pm 0,25 ^a	7,80 \pm 0,10 ^{ab}	7,50 \pm 0,10 ^b
18	8,07 \pm 0,25 ^a	7,87 \pm 0,21 ^a	7,50 \pm 0,30 ^a

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

A redução do OD ao longo do experimento era esperada devido a decomposição da matéria orgânica das perdas metabólicas (fezes) das larvas e pelo consumo de oxigênio que aumentou nos animais estressados.

Vários estudos de toxicidade de atrazina para plantas e animais, concluíram que as plantas aquáticas são afetadas em muitas áreas onde a atrazina é amplamente utilizada, com risco crônico potencial para peixes, anfíbios e invertebrados aquáticos nessas mesmas regiões (YOUNG, 2014).

Com base nas análises de risco, a atrazina apresenta baixo risco agudo para larvas de tilápia-do-nylo. O CR calculado foi de 0,0006 muito menor que o LOC (0,5) estabelecido pela USEPA (2020) para o risco agudo para peixes. Mesmo considerando para o cálculo do CR o valor de CL_{50-96hs} para peixes estabelecido pela USEPA (2020) (2,65 mg L⁻¹), mais restritivo que o valor da CL_{50-96hs} obtido neste trabalho, ainda assim o CR (0,004) indicaria que o risco se encontra em nível aceitável.



Vale destacar que a maior preocupação do impacto da atrazina sobre peixes e outros organismos aquáticos está relacionada com sua exposição crônica em doses subletais e, neste caso, os endpoints empregados (CENO) são muito mais restritivos e derivados de estudos que avaliam os efeitos endócrinos da atrazina sobre organismos aquáticos.

O risco ambiental de atrazina demonstrou-se em nível aceitável, porém deve-se considerar que efeitos crônicos são de maior preocupação, sendo necessário a realização de novos estudos em relação à toxicidade crônica deste herbicida para as fases iniciais de vida dos peixes.

4 CONCLUSÃO

As larvas de tilápia quando submetidas a exposição ao ar e expostas a concentrações subletais de atrazina apresentam significativos níveis de mortalidade, indicando que fatores estressantes podem potencializar o efeito da atrazina nas larvas de tilápia. Por outro lado, com base nas análises de risco, a atrazina apresenta baixo risco agudo para larvas de tilápia-do-nylo.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos, a Embrapa Meio Ambiente pelo espaço e equipamentos utilizados durante o experimento, e ao pesquisador Claudio Martin Jonsson pelo suporte durante o experimento.

6 REFERÊNCIAS

BISSON, M.; HONTELA, A. Cytotoxic and endocrine-disrupting potential of atrazine, diazinon, endosulfan, and mancozeb in adrenocortical steroidogenic cells of rainbow trout exposed in vitro. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 180, n. 2, p. 110-117, 2002.

BRASIL. Resolução CONAMA nº357, de 17 de março de 2005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do território nacional. **Diário Oficial da União**, n. 053, de 18 mar. 2005, p. 58-63. Disponível em: < <http://www2.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T Pesticidas: mecanismos de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.

ESTEVES, A.F. **Fundamentos de limnologia**. 2º ed. Ed. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 1998. 36 p.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture: meeting the sustainable development goals**. Rome: FAO, 2018. 210p.



HUSSEIN, S. Y.; EL-NASSER, M.A., AHMED, M. Comparative studies on the effects of herbicide atrazine on freshwater fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysichthys auratus* at Assiut, Egypt. **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**, p. 503-510, 1996.

IBGE. **Tabela 3940**: produção da aquicultura por tipo de produto. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>> Acesso em: 14 de jul. 2020.

KHOSHNOOD, Z.; KHOSHNOOD, L. Determination of acute toxicity of atrazine herbicide in Caspian Katum, *Rutilus frissi katum*, larvae. **International Journal of Environmental and Ecological Engineering**, v. 8, n. 12, p. 1371-1375, 2014.

KIRSTEN, K. S. *et al.* Reduced expression of selective immune-related genes in silver catfish (*Rhamdia quelen*) monocytes exposed to atrazine. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 64, p. 78-83, 2017.

KREUTZ, L. C. *et al.* Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Ramdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, p. 694-697, 2010.

NASCIMENTO, C. R. B., SOUZA, M. M., MARTINEZ, C. B. R. Cooper and the herbicide atrazine impair the stress response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 155, p. 456-461, 2012.

OECD. **Fish acute toxicity test**. Adopted by the Council on 17th July 1992. 9 p. (OECD Guidelines of the Testing of Chemical, 203).

R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2018. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 21 mar. 2019.

SHOKO, A. P. *et al.* A comparison of diurnal dynamics of water quality parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) monoculture and polyculture with African sharp tooth catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell, 1822) in earthen ponds. **International Aquatic Research**, v. 6, n. 56, p. 1-13, 2014.

USEPA. **Aquatic life benchmarks and ecological risk assessments for registered pesticides**. Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/aquatic-life-benchmarks-and-ecological-risk#ref_2>. Acesso em: 24 nov. 2019.

YOUNG, D. F. **The variable volume water model**. Washington. DC.: Office of Pesticide Programs, 12 jun. 2014. 38 p. (USEPA/OPP 734F14003.). Disponível em: <<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P100JIT6.PDF?Dockey=P100JIT6.PDF>>. Acesso em: 06 abr. 2020.