

UNIVERSIDADE VALE DO RIO DOCE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Rafael Grossi Botelho

TOXICIDADE DE HERBICIDAS PARA *Escherichia coli* E ALEVINOS DE
Ctenopharyngodon idella

Governador Valadares
Janeiro de 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

RAFAEL GROSSI BOTELHO

**TOXICIDADE DE HERBICIDAS PARA *Escherichia coli* E ALEVINOS DE
*Ctenopharyngodon idella***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Vale do Rio Doce – Univale para obtenção do título de mestre.

Governador Valadares

Janeiro de 2010

RAFAEL GROSSI BOTELHO

**TOXICIDADE DE HERBICIDAS PARA *Escherichia coli* E ALEVINOS DE
*Ctenopharyngodon idella***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Vale do Rio Doce – Univale para obtenção do título de mestre.

Governador Valadares, ____ de _____ de _____

Banca examinadora:

Prof. Dr. Jose Barbosa dos Santos – Orientador
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM

Prof. Dr. Clóvis Andrade Neves
Universidade Federal de Viçosa – UFV

Professor Dr. Alexandre Sylvio Vieira da Costa
Universidade Vale do Rio Doce – UNIVALE

Dedico a minha família pelo incentivo e apoio durante o curso de mestrado e a Deus pela força nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter iluminado meu caminho ao longo de todos esses anos e por me ajudar a superar todos os obstáculos.

Aos meus pais por terem me incentivado durante todo o curso. Pai e Mãe, obrigado por tudo, amo vocês.

A minha esposa Nayara por estar comigo em todos os momentos e ainda pela paciência e compreensão.

Ao meu filho Danilo, que mesmo ainda não entendendo nada, foi fundamental para a conclusão desse trabalho.

Ao meu orientador José Barbosa dos Santos, pela dedicação, compromisso, responsabilidade e pela confiança em mim.

Ao professor Clovis Andrade Neves pela recepção na Universidade Federal de Viçosa e pela ajuda na parte de histologia.

Ao mestre Kenner por todos os momentos legais que passamos em Viçosa, pela cervejinha tomada e pela ajuda na parte da histologia.

Ao técnico do laboratório de Biologia Estrutural da Universidade Federal de Viçosa Alex Bhering por todo auxílio e amizade.

A professora Alda por sempre me acolher nos momentos de dificuldades, pelos conselhos e pela ajuda durante todo o curso.

Ao professor Alexandre Sylvio por ter aceitado fazer parte da banca e pelas sugestões no trabalho.

A minha amiga Chaiana pelo compromisso, ajuda e dedicação no experimento de microbiologia.

A minha grande amiga Taciane, que mesmo estando a mais de 4.000 quilômetros de distancia nunca esteve ausente.

Aos técnicos do laboratório de Imunologia que me instruíram a trabalhar no espectrofotômetro.

A Adileia e Helaine pela recepção e auxílio no laboratório de microbiologia.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

RESUMO

O aumento populacional nas últimas décadas, a geração de produtos industriais e o avanço tecnológico, inclusive a síntese de produtos químicos como fertilizantes, inseticidas e herbicidas, têm contribuído significativamente para os elevados índices de contaminação dos ambientes aquáticos. Os testes de toxicidade aquática têm constituído importante ferramenta na análise da poluição ambiental, pois detectam a capacidade de um agente tóxico em produzir efeitos deletérios em organismos vivos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade de herbicidas formulados na bactéria *Escherichia coli* e alevinos de *Ctenopharyngodon idella*. Foram propostos dois experimentos sendo o primeiro visando avaliar o crescimento de *E. coli* em cultura contendo diversos herbicidas. No segundo trabalho, além da determinação da concentração letal a 50% (CL₅₀) dos herbicidas atrazine e picloram para alevinos de *C. idella*, avaliou-se alterações histopatológicas do fígado e de brânquias sob efeito de doses sub-letais desses produtos. Dentre todos os herbicidas testados no crescimento de *Escherichia coli* apenas o paraquat foi tóxico para a bactéria. Os valores da CL₅₀ dos herbicidas atrazine e picloram para alevinos de *C. idella* foram, respectivamente, 31,80 mg/L e 4,63 mg/L, e apenas o primeiro promoveu mudanças comportamentais na natação dos alevinos. Já em relação à massa corporal, tanto o atrazine quanto o picloram promoveram perda de peso em função das concentrações testadas. Não foram encontradas alterações no fígado dos alevinos expostos aos herbicidas atrazine e picloram quando comparados com o controle. Quatro tipos de alterações foram encontrados nas brânquias de alevinos expostos às concentrações do atrazine: elevação epitelial, proliferação celular parcial, fusão de lamelas secundárias e aneurisma. Já as concentrações do herbicida picloram promoveram elevação epitelial, proliferação celular parcial e fusão de lamelas secundárias. Conclui-se que dentre os herbicidas testados apenas o gramoxone inibiu o crescimento da *E. coli* e a CL₅₀ observada dos herbicidas atrazine e picloram sobre alevinos de *C. idella* é menor do que aquela informada para peixes. Ainda, os herbicidas atrazine e picloram causaram alterações branquiais de segundo estágio nos alevinos de *C. idella*.

Palavras-chaves: ecotoxicologia, ecossistemas aquáticos, alterações histológicas

ABSTRACT

The population increase in recent decades, the generation of industrial products and technological advancement, including the synthesis of chemicals such as fertilizers, insecticides and herbicides, have contributed significantly to the high levels of contamination of aquatic environments. The aquatic toxicity tests have constituted an important tool in the analysis of environmental pollution because the ability to detect a toxic agent to produce deleterious effects on living organisms. The objective of this study was to evaluate the toxicity of herbicides formulated in the bacteria *Escherichia coli* and *Ctenopharyngodon idella* fingerlings. Two experiments were proposed as the first to evaluate the growth of *E. coli* in medium containing various herbicides. In the second work, was determined the medium lethal concentration to 50% (LC50) of herbicides atrazine and picloram to *C. idella* fingerlings, we assessed the histopathological changes of liver and gills under the effect of sublethal doses of these products. Of all the herbicides tested on growth of *E.coli*, only paraquat was able to inhibit the bacterial growth. The LC50 values of atrazine and picloram to *C. idella* fingerlings were respectively 31.80 mg/L and 4.63 mg/L, and only the first promoted behavioral changes in swimming fingerlings. In relation to body mass, both atrazine and picloram promoted weight loss in function of the concentrations tested. No changes were found in the liver of fingerlings exposed to atrazine and picloram when compared with the control. Four types of alterations were found in the gills exposed to concentrations of atrazine: lifting of the epithelium, cellular proliferation with partial fusion of some secondary lamellae and aneurysm. The concentrations of the herbicide picloram promoted lifting of the epithelium, cellular proliferation with partial fusion of some secondary lamellae. Concluded that among the herbicides tested, Gramoxone only inhibited the growth of *E. coli* and observed LC50 of atrazine and picloram on *C. idella* fingerlings is lower than that reported for fish. Still, the herbicides atrazine an picloram caused alteration of second stage in the gills of *C. idella* fingerlings.

Key-words: ecotoxicology, aquatics ecosystems, histological alterations

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 Os agrotóxicos.....	12
2.2 Contaminação de ambientes aquáticos por agrotóxicos.....	14
2.3 Importância dos bioindicadores de qualidade da água para a saúde ambiental e pública.....	16
2.4 Os peixes como bioindicadores de qualidade de águas.....	17
2.5 A bactéria <i>Escherichia coli</i>	20
2.6 A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento dos ecossistemas aquáticos.....	25
3. JUSTIFICATIVA.....	16
4. OBJETIVOS	26
4.1 Objetivos geral	26
4.2 Objetivos específicos.....	26
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
5.1 Toxicidade de herbicidas sobre o crescimento de <i>Escherichia coli</i>	27
5.2 Teste de toxicidade para carpa capim (<i>Ctenopharyngodon idella</i>).....	31
6. RESULTADOS.....	34
6.1 Toxicidade de herbicidas sobre o crescimento de <i>Escherichia coli</i>	34
6.2 Toxicidade dos herbicidas atrazine e picloram sobre alevinos de carpa capim (<i>Ctenopharyngodon idella</i>).....	38
7. DISCUSSÃO.....	47
7.1 Toxicidade de herbicidas sobre o crescimento de <i>Escherichia coli</i>	47
7.2 Toxicidade dos herbicidas atrazine e picloram sobre alevinos de carpa capim (<i>Ctenopharyngodon idella</i>).....	50
8. CONCLUSÃO.....	57
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	58
10. ANEXOS.....	75

1. INTRODUÇÃO

A qualidade de vida de uma população está relacionada à disponibilidade e qualidade da água, sendo esta, o recurso natural mais crítico e suscetível a impor limites ao desenvolvimento em muitas partes do mundo (FORNO, 1999). Atualmente em várias regiões do planeta, observa-se que os ecossistemas aquáticos vêm sofrendo alterações muitas vezes associadas à atividade humana decorrente do processo de desenvolvimento industrial, urbano e agrícola. Em relação a este ambiente, todas estas atividades geram impactos negativos, promovendo lentas e muitas vezes irreversíveis modificações (BOHRER, 1995), e deste modo o ser humano tem participado com atitudes contrárias à manutenção do equilíbrio ambiental.

O alto nível de industrialização, a necessidade de aumento da produção de alimentos, juntamente com a alta densidade populacional, tem aumentado significativamente os lançamentos de despejos e resíduos nos corpos de água (ZAGATTO, 2006). Os principais fatores que contribuem para a degradação dos corpos de água são as fontes de poluição pontuais e difusa (LLOYD, 1992). As fontes de poluição pontuais são aquelas introduzidas diretamente no ambiente, como os esgotos domésticos e industriais (LLOYD, 1992; MOZETO e ZAGATTO, 2006). Já as fontes de poluição difusa tais como a precipitação atmosférica, e o escoamento urbano e agrícola são difíceis de quantificar e visualizar (LLOYD, 1992; MOZETO; e ZAGATTO, 2006). Dentre as formas de poluição não pontuais, o escoamento agrícola é preocupante, uma vez que a atividade é bastante disseminada no país, ocupa grandes extensões e inclui uma grande variedade de atividades (BAPTISTA *et al.*, 2003). Além disso, o aporte de agrotóxicos e fertilizantes, ricos em compostos fosfatados e nitrogenados (ASARE *et al.*, 2000; FRACÁCIO *et al.*, 2001; BAPTISTA *et al.*, 2003), são produtos químicos sintéticos estranhos ao ambiente, de difícil assimilação e que interferem negativamente na estrutura e funcionamento do ambiente (FRACÁCIO *et al.*, 2001).

A partir de 1950, profundas mudanças foram observadas na agricultura tradicional, bem como seus impactos no ambiente. Novas tecnologias, muitas delas baseadas no uso extensivo de agrotóxicos, foram disponibilizadas para o controle de doenças, proteção contra pragas agrícolas e plantas daninhas visando aumento da produtividade, (MOREIRA *et al.*, 2002). Este fato teve como consequência a disposição de novas substâncias no ambiente aquático, e aliado à falta de tratamento dos resíduos líquidos oriundos de tais atividades, fez com que os

ecossistemas sofressem alterações em suas funções e provesses cada vez mais, como esperado, da má qualidade da água, diminuição da diversidade biológica e proliferação excessiva de espécies indesejáveis (PASTRO, 1995).

De fato, a quantidade e diversidade de produtos tóxicos que chega aos ambientes aquáticos decorrentes de diversas fontes de emissão, vem aumentando significativamente com o passar dos anos. Uma vez que a saúde ambiental interfere diretamente na saúde humana, um meio para que haja diminuição nos níveis de poluição nestes compartimentos é um planejamento de utilização de compostos tóxicos nas diversas atividades e ainda a conscientização humana de que é necessária a preservação e proteção do ambiente.

Dentre os agrotóxicos, os herbicidas recebem especial atenção em função da grande quantidade lançada anualmente nos campos agrícolas (SILVA, 1999). Neste grupo, vários produtos como o atrazine, 2,4-D e picloram, apresentam considerável risco de lixiviação podendo, muitas vezes atingir e contaminar o lençol freático. Assim, neste estudo, foram abordados os aspectos da contaminação pelo grupo de agrotóxicos usados no controle de plantas daninhas – herbicidas -, particularmente aqueles de persistência moderada a longa e com elevado potencial de lixiviação para cursos hídricos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Os agrotóxicos

De acordo com o Decreto federal nº 4.074 de 4 de Janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7802/1989, agrotóxicos são produtos de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, preservando-as da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (SINDAG, 2003).

Conhecidos também como defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas, produtos fitossanitários, venenos, remédios de plantas, biocidas etc. (RIGOLIN-SA, 1998; ALVES e OLIVEIRA-SILVA, 2003; PERES *et al.*, 2003), a nomenclatura correta destes produtos, que varia de acordo com o interesse dos grupos envolvidos, apresenta discussões tão extensas quanto a sua lista de efeitos danosos (ALVES e OLIVEIRA-SILVA, 2003; PERES *et al.*, 2003) porém, o termo agrotóxico é utilizado na legislação brasileira (ALVES e OLIVEIRA-SILVA, 2003; PERES *et al.*, 2003).

Sua classificação é baseada em diversos critérios como estado físico (suspensão, grânulos etc.) (LAWS, 1993), espécies-alvo (inseticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas etc.) (ALVES e OLIVEIRA-SILVA, 2003; SANCHES *et al.*, 2003), padrão de uso (desfolhantes, repelentes, dessecantes, entre outros) (ALVES e OLIVEIRA-SILVA, 2003; SANCHES *et al.*, 2003), mecanismos de ação (anticolinesterásicos, anticoagulantes, etc) (ALVES e OLIVEIRA-SILVA, 2003) ou estrutura química (piretróides, organofosforados, organoclorados, carbamatos) (LAWS, 1993; ALVES e OLIVEIRA-SILVA, 2003).

Em 30 anos, a área ocupada com lavouras no Brasil cresceu 76% passando de 28,4 milhões de hectares em 1960 (IBGE, 1985) para 50 milhões de hectares em 1991 (IBGE, 1993) e em função disto, o aumento no consumo de agrotóxicos no mesmo período foi de 276,2% (BARBOSA, 2004).

Em 1991, o Brasil utilizou cerca de 3.186.276 toneladas de agrotóxicos, sendo que apenas 300.000 toneladas cumpriram sua função (MACEDO, 2002). Este mesmo autor salienta que em média apenas 1 % do agrotóxico aplicado atingi o alvo, e o restante vai para o solo, ar e água. De 1993 a 1998, o crescimento médio anual no mundo foi de 4% chegando a U\$ 33

bilhões. Em 1999, entretanto, as vendas caíram cerca de 5,1 %, totalizando U\$ 30,07 bilhões, declínio atribuído a vários fatores, como diminuição nos preços das mercadorias, aumento na plantação de espécies melhoradas geneticamente, redução nos preços dos herbicidas devido à competição entre os fabricantes e queda na infestação das lavouras de algodão (BARBOSA, 2004). Embora o gasto com agrotóxicos seja alto para os agricultores, estima-se que para cada dólar investido o retorno financeiro seja, pelo menos, quatro vezes maior, o que, por si só, justifica o grande consumo destes produtos (BARBOSA, 2004).

No Brasil, aproximadamente 35 % do dinheiro investido com agrotóxicos se destina à cultura da soja. As outras culturas que mais contribuem para as vendas são: algodão, café, cana-de-açúcar, citrus, feijão e milho, além das pastagens que consomem milhares de litros de herbicidas anualmente. Juntamente com a soja, estas culturas consomem por volta de 73% dos agrotóxicos vendidos no país (BARBOSA, 2004).

A venda total de agrotóxicos no Brasil em 2004 atingiu US\$ 4,5 bilhões, 43,3% a mais em faturamento do que em 2003 de acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG). O consumo desses produtos difere nas regiões brasileiras e pela elevada quantidade de herbicidas usados, as culturas da soja, milho e cana-de-açúcar merecem atenção por ocuparem extensas áreas no Brasil (ROMAN, 2004).

Dados do Sindag (2008) mostram que foram gastos com agrotóxicos no período de Janeiro a Outubro de 2007 R\$ 7,8 milhões de reais, já no mesmo período de 2008 foram gastos R\$ 10.2 milhões de reais apresentando um crescimento de 31%, e mostra ainda que a classe de agrotóxicos mais consumida nos dois anos foi a dos herbicidas (Tabela 1).

Tabela 1 – Estimativa da comercialização de agrotóxicos no Brasil entre os anos de 2007 e 2008 (milhões R\$).

SEGMENTOS	MERCADO (ESTIMATIVA)		
	2007	2008	%VAR
Herbicidas	3446	4643	35
Fungicidas	1728	2173	26
Inseticidas	2244	2944	31
Acaricidas	146	176	21
Outros	257	309	20
TOTAL	7.821	10.246	31

Fonte: Sindicato Nacional da Industria de Produtos para Defesa Agrícola (Sindag), 2008

Herbicidas são compostos orgânicos sintetizados quimicamente utilizados na agricultura para o controle de plantas daninhas (KHAN, 1980). Em relação a vendas, estes produtos vêm se destacando há muito tempo como a maior classe de agrotóxico consumida. Em 1999, o volume usado na agricultura aumentou 85% (SILVA, 1999). Comparando todas as classes de agrotóxicos em 2004, mundialmente, os herbicidas foram responsáveis por mais de 60% do faturamento (ROMAN, 2004).

2.2 Contaminação de ambientes aquáticos por agrotóxicos

Por muito tempo, a preocupação que se tinha com a qualidade da água para abastecimento humano restringia-se a parâmetros estéticos e microbiológicos (EPA, 2000). Após a Segunda Guerra Mundial, durante a qual foram sintetizadas inúmeras substâncias químicas até então inexistentes, como os agrotóxicos, os problemas relacionados à poluição das águas ficaram mais complexos (BADELLINO, 2006).

Segundo a Embrapa (2006) a contaminação da água, do solo, do ar e do ser humano por resíduos sólidos e agrotóxicos talvez seja o problema mais grave da agricultura intensiva.

A contaminação de sistemas aquáticos superficiais por agrotóxicos pode se dar pelas seguintes formas: aplicação direta no meio aquático para o controle de algas e invertebrados indesejáveis; lavagem de solo ou lixões contendo resíduos de produtos tóxicos; deriva, em que as gotículas ou partículas do produto são levadas pela corrente de ar; despejos de efluentes domésticos e industriais contaminados; chuvas contaminadas com resíduos voláteis de

agrotóxicos e pelo escoamento superficial de áreas cultivadas, que é considerada a maior rota de entrada de agrotóxicos para o meio aquático (NINMO, 1985; DORES e DE LAMONICA-FREIRE, 1999; TOMITA e BEYRUTH, 2002; ZAGATTO, 2006). Os agrotóxicos também podem atingir ecossistemas aquáticos subterrâneos (lençóis freáticos) por meio de percolação da água no solo (TOMITA e BEYRUTH, 2002; BRIGANTE, *et al.*, 2003). O potencial de um agrotóxico poluir reservatórios de água subterrânea depende de sua mobilidade no solo (LOURENCETTI *et al.*, 2005), onde se o contaminante apresenta elevada pressão de vapor e baixa afinidade com os constituintes do solo, sofre rápida volatilização, contudo se é uma substância hidrossolúvel, pode ser lixiviada facilmente, atingindo águas subterrâneas ou aquíferos como ilustra a figura 1.

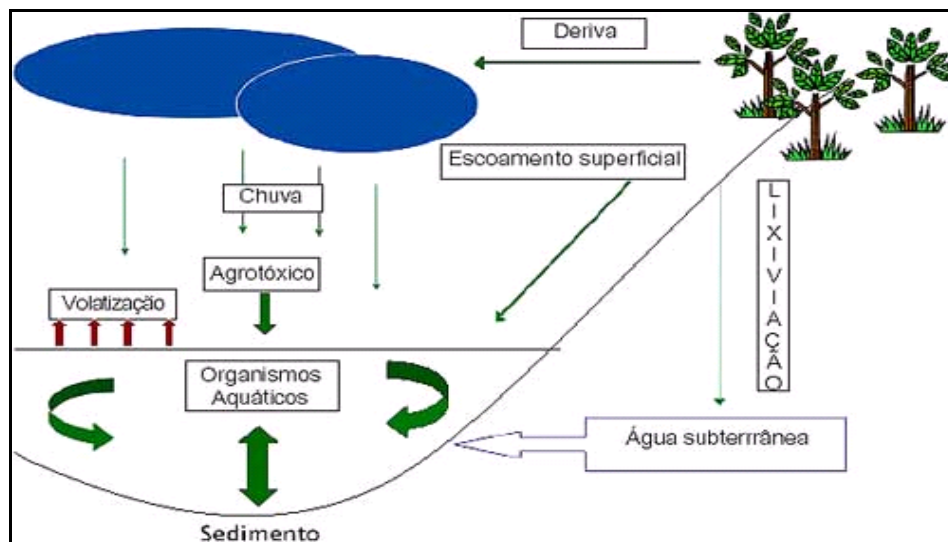


Figura 1- Possibilidades de contaminação de ambientes aquáticos por agrotóxicos (Tomita e Beiruth, 2002).

Dependendo das características físico-químicas, o resíduo do agrotóxico na água pode se ligar ao material em suspensão, depositar no sedimento do fundo ou ser absorvido por organismos, podendo então ser destoxificados ou acumulados. O material em suspensão pode ser encontrado na forma de partículas ou de gotículas (como óleo) e os contaminantes podem estar dissolvidos a estas gotículas ou partículas sólidas. Estas formas podem ser transportadas pela água por longas distâncias (AZEVEDO e CHASIN, 2003). Alguns agrotóxicos e/ou metabólitos também podem retornar à atmosfera por volatilização (TOMITA e BEYRUTH, 2002).

Atividades agrícolas desenvolvidas sob áreas próximas a ambientes aquáticos têm causado preocupação pelo risco de contaminação decorrentes das aplicações de agrotóxicos. O conhecimento da influência exercida por estas atividades sobre os recursos naturais é de

fundamental importância para assegurar a qualidade da água (PESSOA, 2003), e embora a agricultura seja apenas uma das inúmeras fontes não-pontuais de poluição da água, geralmente é apontada como a maior contribuinte de todas as categorias (EDWIN, 1996).

2.3 Importância dos bioindicadores de qualidade da água para a saúde ambiental e pública

A poluição das águas doces superficiais é um dos grandes problemas ambientais do mundo (LOBO *et al.*, 2002) e a deterioração dos ambientes em função das atividades antrópicas tem gerado necessidades de desenvolvimento e adequação de métodos de avaliação da qualidade ambiental (BRUSCHI JR *et al.*, 2000). Os programas de monitoramento ambiental têm sido instrumentos utilizados que consistem em medições e observações específicas, em geral, dirigidas a alguns parâmetros, com objetivo de verificar se determinados impactos ambientais estão ocorrendo, dimensionar a sua magnitude e, ainda, avaliar se as medidas preventivas estão sendo ou não eficazes (BITAR e ORTEGA, 1998).

Atualmente, o uso de bioindicadores tem estado presente na avaliação de impactos ambientais provocados pela má administração de ambientes, pois, animais, plantas, microrganismos e suas complexas interações com o meio respondem de maneira diferenciada às modificações ambientais produzindo informações que não só indicam a presença de poluentes, mas como estes interagem com a natureza, proporcionando uma melhor indicação de seus impactos na qualidade dos ecossistemas (SOUZA, 2001).

Bioindicadores são organismos escolhidos por sua sensibilidade ou tolerância a vários parâmetros, como poluição orgânica ou outros tipos de poluentes (WASHINGTON, 1984). Segundo Johnson *et al.* (1993), um bioindicador "ideal" deve possuir as seguintes características: ser taxonomicamente bem definido e facilmente reconhecível por não-especialistas, apresentar distribuição geográfica ampla, ser abundante ou de fácil coleta, ter baixa variabilidade genética e ecológica, preferencialmente possuir tamanho grande, apresentar baixa mobilidade e longo ciclo de vida, dispor de características ecológicas bem conhecidas, e ter possibilidade de uso em estudos em laboratório.

No caso da avaliação da qualidade da água, embora análises químicas indiquem a existência em potencial de uma condição perturbadora ao ambiente, elas não indicam os danos causados ao ecossistema. Já os bioindicadores podem interagir espacialmente com os poluentes e

indicar uma dimensão temporal dos mesmos, colaborando na identificação do estado do sistema (McCARTHY e SHUGART, 1990).

Há uma relação complexa entre saúde e ambiente, sendo assim a utilização de bioindicadores em avaliações ambientais é de extrema importância não só para a saúde do ambiente como também para a saúde pública, uma vez que é através destes organismos que conhecemos os efeitos danosos que podem ser causados aos seres humanos se determinados produtos tóxicos chegarem até eles.

2.4 Os peixes como bioindicadores de qualidade de águas

Avaliar a qualidade da água não é uma tarefa simples. Wooton (1990) ressalta que isto vem sendo feito através da análise de parâmetros físicos e químicos, como o oxigênio dissolvido, condutividade, pH, temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido e a turbidez. Entretanto, se tratando da qualidade da água, estes parâmetros geralmente são empregados com um enfoque voltado ao consumo humano, estabelecendo valores que demonstram os níveis de potabilidade, mas não se preocupando, necessariamente, com a manutenção da biota aquática. Além disso, somente o uso destes parâmetros não é suficiente para retratar a realidade de um ambiente, necessitando de indicadores biológicos por serem mais eficientes (WOOTON, 1990; CASTRO e CASATTI, 1997; SMITH *et al.*, 1997) sendo os peixes excelentes para esse propósito (KARR, 1981; SMITH *et al.*, 1997; ARAÚJO, 1998).

A importância dos peixes como bioindicadores de qualidade da água está centrada em dois fatores: ecológicos, uma vez que, na maturidade, certos peixes ocupam altos níveis na cadeia trófica (TONISSI, 1999; BERTOLETTI, 2000); e econômico, já que representam importantes fontes de alimentos para o ser humano (TONISSI, 1999). Os peixes apresentam numerosas vantagens como organismos indicadores, como a disponibilidade de informações sobre o ciclo de vida de grande número de espécies, por incluírem uma variedade de níveis tróficos (onívoros, herbívoros, insetívoros, planctívoros, carnívoros). A posição dos peixes no topo da cadeia alimentar em relação a outros indicadores de qualidade de água, como diatomáceas e invertebrados, favorece uma visão integrada do ambiente aquático. Além disso, são relativamente fáceis de serem identificados, e situações críticas, como mortalidade de peixes, podem ser

informadas pelo público em geral, o que pode chamar a atenção para alterações nas condições de qualidade de água dos ambientes.

O crescimento populacional nas proximidades de ambientes aquáticos e a expansão da indústria nas últimas décadas faz com que populações de peixes sejam expostas a águas contaminadas (SEELIGER e KNAK, 1982). Araújo (1998) salientou que as atividades antrópicas têm exercido uma profunda e negativa influência nos peixes de água doce. Amaraneni e Pillala (2001) encontraram resíduos de vários agrotóxicos em duas espécies de peixes usados como bioindicadores, coletados no lago Kolleru, Índia. Os resultados demonstraram que os peixes continham resíduos de agrotóxicos em níveis superiores aos padrões estabelecidos pela *Food and Agriculture Organization* (FAO). Os resultados refletiram também no nível de poluição destes compostos naquele lago bem como o perigo ao quais os habitantes estavam expostos ao consumirem os peixes contaminados. Autores como Bruschi Jr *et al.* (2000), Flores-Lopes *et al.* (2001) e Malabarba *et al.* (2004), utilizaram a comunidade de peixes como indicadores de qualidade ambiental em programas de monitoramento na região Sul do Brasil.

Quando peixes e outros organismos são expostos a ambientes muito degradados, os efeitos dos poluentes podem ser dramáticos e no caso de poluição severa pode haver mortalidade quase instantânea. Longos períodos de exposição a ambientes menos degradados podem resultar na morte de alguns indivíduos dentro de uma população, ou ainda em prejuízos bastante visíveis. Por outro lado, a curta exposição pode resultar em alterações que, mesmo não sendo letais, prejudicam a habilidade do peixe em realizar suas funções fisiológicas (JOBILING, 1995).

As brânquias são órgãos alvo da ação de poluentes em peixes, por estarem em contato permanente com o ambiente aquático e apresentarem uma área superficial muito grande, representada pelas lamelas secundárias (POLEKSIC e MITROVIC-TUTUNDŽIC, 1994). Este órgão exerce funções vitais nos teleósteos, tais como respiração, osmorregulação e excreção. Constituem ainda o sítio de tomada e depuração de contaminantes e o local onde a desintoxicação e o metabolismo de agentes tóxicos podem ocorrer. A presença de poluentes na água pode induzir alterações morfológicas e conseqüentemente, estas alterações podem ser utilizadas como parâmetros para o monitoramento ambiental (VEIGA *et al.*, 2002; PACHECO e SANTOS, 2002; MELETTI *et al.*, 2003).

As brânquias na maioria dos teleósteos são formadas por quatro arcos branquiais, nos quais esta inserida duas fileiras de filamentos branquiais ou lamela primária. Na região

interbranquial se encontram os vasos sanguíneos, músculos e terminações nervosas. Na superfície dos filamentos branquiais existem dobras que dão origem às lamelas secundárias, onde ocorrem as trocas gasosas (HUGHES, 1984). Essas estruturas são compostas por três tipos de células, as pavimentosas ou respiratórias, as células cloreto (responsáveis pela troca iônica) e as células mucosas que desempenham função de proteção (NEWMAN e JAGOE, 1994). O epitélio não respiratório é formado por várias camadas de células, enquanto que o respiratório (lamelas secundárias) é formado por duas camadas de células pavimentosas (PERRY e LAURENT, 1993).

As brânquias apresentam uma grande área superficial, através da qual as trocas gasosas entre o sangue e o meio externo ocorrem (NEWSTEAD, 1987), e pelo fato deste órgão estar em contato direto com a água, substâncias tóxicas podem interferir nas suas funções. Segundo Poleksic e Mitrovic-Tudundzic (1994), além de trocas gasosas, as brânquias realizam excreção e osmorregulação e por este órgão não ter proteção da pele e boca, sua sensibilidade é maior.

O fígado é um órgão chave quando se considera a ação de poluentes químicos sobre o peixe. É o primeiro órgão na biotransformação de produtos tóxicos e provavelmente também para excreção de metais. Assim, muitos metais e outros tóxicos se acumulam no fígado, de modo que as células hepáticas ficam expostas a um nível elevado de agentes químicos que podem estar presentes, no ambiente ou em outros órgãos do peixe (HEATH, 1987).

O fígado de peixes teleósteos tem um considerável volume em relação ao corpo. É de cor marrom nas espécies carnívoras e marrom claro nas espécies herbívoras, mas em certos períodos do ano pode apresentar cor amarela e inclusive esbranquiçada. É composto por dois lobos: o lobo direito que está ao lado da vesícula biliar e o lobo esquerdo próximo ao baço (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995). Sua localização é na porção anterior da cavidade celomática, sendo que em algumas espécies se estende ao longo desta cavidade, ou está estreitamente unido a outras vísceras. Em outras espécies de peixes, é um órgão compacto que se combina com o pâncreas formando o hepatopâncreas, sendo que as células do pâncreas exócrino (pâncreas intra-hepático) encontram-se distribuídas pelo parênquima hepático ao longo da veia porta. Em outras espécies, o fígado se encontra completamente separado do pâncreas (ARANA, 1995; TAKASHIMA e HIBIYA, 1995). É composto de células parenquimatosas (células hepáticas ou hepatócitos) e uma rede de fibras cuja função é de suportar os elementos celulares. A superfície do fígado é envolvida por membrana serosa, e alguns septos do tecido conjuntivo desta cápsula se estendem para o interior do parênquima (GARTNER e HIATT, 2007).

O hepatócito tem forma poligonal contendo um núcleo central esférico claramente visível, embora células binucleadas possam ser observadas (ROBERTS, 1981; VERLAG, 1982). O núcleo está localizado na região central ou no pólo celular voltado para o capilar sinusóide (ARANA, 1995) e usualmente possui um nucléolo bem evidente. Grande quantidade de material nutritivo como lipídeos e glicogênio é armazenada no citoplasma das células hepáticas como produtos de reserva, sendo liberados para o sangue como fonte de energia, quando necessário (GARTNER e HIATT, 2007). As células hepáticas são responsáveis por diversas funções essenciais para a sobrevivência da espécie, além de realizarem importante papel no metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos. Servem como sítios de armazenamento para muitos nutrientes, como a glicose e desintoxicam o organismo e, além disso, estão envolvidas na hematopoiese durante a vida larval e na secreção da bile (KUMAR e ANSARI, 1986).

Devido à sua função no metabolismo de poluentes e sua sensibilidade a estes, o fígado tem recebido atenção especial em estudos toxicológicos relacionados à contaminação de diferentes espécies de peixes, por agentes químicos orgânicos e inorgânicos (HINTON *et al.*, 1992). Assim, os efeitos hepatotóxicos dos diversos agentes químicos podem ser utilizados como biomarcadores de contaminação aquática (GUNDERSEN *et al.*, 2000; HINTON *et al.*, 1992). Na presença de poluentes, o fígado pode desenvolver alterações histológicas nos hepatócitos que podem ser usadas para o monitoramento de efeitos de contaminantes (HINTON *et al.*, 1992; PARIS-PALÁCIOS *et al.*, 2000; SCHWAIGER, 2001; PACHECO e SANTOS, 2002; FANTA *et al.*, 2003; THOPHON *et al.*, 2003).

2.5 A bactéria *Escherichia coli*

As bactérias do gênero *E.coli* pertencem à família Enterobacteriaceae e são microrganismos anaeróbios facultativos, reduzem nitrato a nitrito, fermentam glicose, e é oxidase-negativa. Metaboliza uma ampla variedade de substâncias como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos e ácidos orgânicos. Produz catalase, utiliza glicose, amônia e nitrogênio como fontes de carbono (BRASIL, 2001).

O principal habitat de *E. coli* é o trato intestinal dos humanos e de outros animais de sangue quente. A maioria dos sorogrupos de *E. coli* faz parte da flora comensal do intestino dos mamíferos. No entanto, certos sorotipos são patogênicos para o homem e para outros animais e estes não são considerados como fazendo parte da flora intestinal normal. A transmissão das

infecções causadas por *E. coli* seguem principalmente três vias: o contato direto com animais, o contato com humanos e o consumo de alimentos contaminados (PELCZAR, CHAN e KRIEG, 1997).

Algumas estirpes de *E. coli* conseguem crescer em ambientes com temperaturas entre 7 e 46°C e têm uma temperatura ótima de crescimento entre 35 e 40°C (temperatura à qual a taxa específica de crescimento é máxima). As estirpes patogênicas sobrevivem, geralmente, às temperaturas de refrigeração, apesar de ocorrer uma ligeira redução após uma a cinco semanas de armazenamento (VARMAN e EVANS, 1996). O efeito do pH no crescimento depende do tipo de ácido presente. A *E. coli* é destruída por irradiação. A presença de oxigênio aumenta o efeito letal da irradiação, que é máximo a temperaturas entre os 45 e os 55°C (BUCHANAM e KLAWITER, 1992).

2.6 A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento dos ecossistemas aquáticos

De acordo com Soares (1991) a preocupação em monitorar a ação antrópica levou a criação da Ecotoxicologia, ciência que estuda os efeitos de agentes químicos, em nível de indivíduo, e suas consequências na estrutura e funcionamento das populações, comunidades e ecossistemas. O termo ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez em junho de 1969, durante uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions* (ICSU), em Estocolmo, pelo toxicologista francês Rene Truhaut (TRUHAUT, 1977). Segundo este autor, a Ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado (PLAA, 1982; CAIRNS e NIEDERLEHNER, 1995 APUD. ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Ramade (1977) publicou o primeiro livro de Ecotoxicologia, definindo-a como a ciência que tem por objetivo estudar as modalidades de contaminação do ambiente pelos poluentes naturais ou sintéticos, produzidos por atividades humanas, seus mecanismos de ação e seus efeitos sobre os seres vivos que habitam a biosfera. Deste modo, a Ecotoxicologia nasceu como ferramenta de monitoramento ambiental, baseada principalmente na resposta de organismos individuais a estressores químicos.

Os testes de toxicidade aquática, importante ferramenta da Ecotoxicologia para avaliar a poluição em ambientes aquáticos, apresentam-se como mecanismos para a compreensão dos efeitos de impactos antropogênicos sobre este compartimento, utilizando-se de organismos vivos que atuam como bioindicadores. Através destes testes, tem sido possível avaliar o efeito de um grande número de produtos sobre diferentes espécies (CAMPAGNA, 2005). A primeira iniciativa em termos metodológicos se deu em 1975, num programa internacional de padronização de testes de toxicidade aguda com peixes, desenvolvido pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas da *International Organization for Standardization* (ISO), com participação da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) a convite da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). A partir de 1975, foram desenvolvidos e adaptados vários métodos de ensaios de toxicidade aguda e crônica, de curta duração, utilizando alguns grupos e espécies de organismos, dentre os quais se destacam as algas (ABNT, 1992, CETESB, 1994), microcrustáceos (ABNT, 1993; CETESB, 1994) e peixes (CETESB, 1990; ABNT, 2004) de águas continentais e marinhas e testes com sedimentos (ZAGATTO e BERTOLETTI 2006).

Os testes de toxicidade permitem avaliar a contaminação ambiental por diversas fontes poluidoras, tais como: efluentes agrícolas, industriais e domésticos, sedimentos, medicamentos e produtos químicos em geral, assim como, o resultado de seus efeitos sinérgicos e antagônicos (LOMBARDI, 2004; MARSCHNER, 1999) e ainda detectam a capacidade de um agente tóxico ou uma mistura em produzir efeitos deletérios nos organismos vivos, permitindo saber em que medida as substâncias são nocivas, como e onde se manifestam os efeitos (MAGALHÃES e FILHO, 2008). Eles ainda fornecem informações sobre o perigo potencial de uma substância tóxica aos organismos aquáticos tais como, letalidade, carcinogênese, mutagênese, teratogênese, desordens comportamentais, efeitos fisiológicos cumulativos, antagônicos e sinérgicos (BAUDO, 1987).

Os testes toxicológicos são realizados com organismos indicadores, que devido as suas características de pequeno limite de tolerância ecológica, a determinadas substâncias químicas, apresentam alguma alteração, seja ela fisiológica, morfológica ou comportamental, quando expostos a determinados poluentes. As exposições são feitas em diferentes concentrações de substâncias e compostos químicos, amostras de efluentes ou água bruta, por um determinado período de tempo (SCHVARTSMAN, 1991).

Existem os testes de toxicidade aguda, que medem efeitos sofridos por organismos a um curto período de exposição. Nestes, a finalidade é determinar a concentração de uma substância teste que produz efeitos deletérios em um grupo de organismos teste sob condições controladas. O efeito observado é a letalidade, a partir da qual se determina a concentração do agente tóxico que causa 50% de mortalidade (CL_{50}) à espécie teste (RAND e PETROCELLI, 1985). Existem ainda os testes de toxicidade crônica cujos organismos são expostos continuamente a produtos tóxicos por um período de tempo significativo do ciclo de vida que pode variar da metade a dois terços do ciclo (RAND e PETROCELLI, 1985). Nesses testes são avaliados efeitos subletais em organismos, tais como alterações no crescimento e na reprodução, mudanças no comportamento (dificuldade de movimentação, aumento na frequência da abertura do opérculo), na fisiologia, bioquímica e alterações teciduais (LAWS, 1993; ADANS, 1995). Os testes de toxicidade crônica dependem diretamente dos resultados dos testes de toxicidade aguda, uma vez que as concentrações subletais são calculadas a partir da CL_{50} .

Em ambientes aquáticos a ocorrência dos efeitos crônicos é mais frequente, devido: a diluição dos poluentes oriunda das águas de contribuição, as relações antagonistas entre as substâncias, a rápida associação que ocorre entre a maioria das partículas e a matéria húmica e a sedimentação de sólidos em suspensão. Desta forma, os organismos se expõem a baixas concentrações de determinados poluentes durante longos períodos de tempo (STEPHAN e MOUNT, 1973), ocasionando efeitos crônicos a níveis subletais e, até mesmo, letais ao longo do tempo.

Várias espécies vêm sendo empregadas internacionalmente em testes de toxicidade, e, dentre os principais grupos de organismos utilizados em ensaios laboratoriais, destacam-se: microalgas, microcrustáceos, equinóides, poliquetas, oligoquetas, peixes e bactérias, representando os mais diversos ecossistemas e níveis tróficos (MAGALHÃES e FILHO, 2008). No entanto, para a escolha do organismo-teste geralmente usam-se os seguintes critérios de seleção: abundância e disponibilidade; significativa representação ecológica dentro das biocenoses; cosmopolitismo da espécie; conhecimento da sua biologia, fisiologia e hábitos alimentares; estabilidade genética e uniformidade de suas populações; baixo índice de sazonalidade; sensibilidade constante e apurada; importância comercial; facilidade de cultivo em laboratório e, se possível, a espécie deve ser nativa para a melhor representatividade dos ecossistemas (RAND e PETROCELLI, 1995).

Considerando-se a dificuldade em encontrar uma espécie com todas estas características, existem muitas espécies padronizadas que podem ser utilizadas, sendo extremamente importante a realização de bioensaios com espécies representativas do ambiente de estudo, pois respondem melhor as condições encontradas nos ambientes naturais onde vivem (MAGALHÃES e FILHO, 2008).

Segundo Burton e Scott (1992) e Burton e Macphersom (1995) os organismos de água doce que tem sido mais comumente utilizados em avaliações de toxicidade aquática são: *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia* (exposição de 7 dias), o peixe *Pimephales promelas* (exposição de 7 dias), os quironomídeos *Chironomus tentans* e *Chironomus riparus* (exposição de 7 e 10 dias), o anfípodo *Hyalella azteca* (exposição de 7 e 28 dias) e *Hexagenia limbata* e *Hexagenia bilineata* (exposição de 10 dias).

3. JUSTIFICATIVA

A contaminação de ambientes aquáticos por herbicidas tem sido uma preocupação, principalmente aqueles com alto poder de lixiviação. Desta forma, os organismos desses ambientes se tornam alvos destas moléculas através do contato com a água. Por consequência, eles sofrem efeitos adversos a curto, médio ou longo prazo; e ainda são capazes de transferir estes agentes químicos através da cadeia alimentar podendo muitas vezes atingir o ser humano.

A utilização de testes de toxicidade para avaliação de efeitos deletérios de agentes químicos em organismos aquáticos tem sido cada vez mais importante, pois permitem o reconhecimento dos produtos que apresentam menores riscos de impacto ambiental e toxicidade. O estudo de alterações fisiológicas, comportamentais, crescimento ou de sobrevivência em um organismo, ou em uma população, através destes testes, é de extrema importância já que fornecem informações sobre a qualidade do seu ambiente ou parte dele e ainda é capaz de mensurar qual a concentração utilizada de um determinado produto é letal.

Do ponto de vista ecológico, as bactérias e peixes são extremamente importantes nos ambientes aquáticos. A primeira participa da ciclagem de matéria orgânica, além de outras funções, já o segundo podem servir de alimento para outros organismos. Podendo haver deslocamento de herbicidas para cursos de água, um encontro destas substâncias com estes organismos podem ocorrer, e desta forma é importante a realização de testes de toxicidade utilizando bactérias aquáticas e peixes como organismo teste.

O conhecimento de alvos biológicos de herbicidas poderá contribuir para o aprimoramento de instrumentos que possam minimizar os riscos ao ser humano e ao ambiente devido ao uso destes produtos, já que estes podem chegar aos seres humanos através da cadeia alimentar. Sendo assim é de suma importância visualizar os efeitos destes compostos em organismos aquáticos, pois somente através do conhecimento destes efeitos é que se irá adotar medidas de prevenção da utilização indiscriminada destes produtos.

4. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a toxicidade de herbicidas utilizando *Escherichia coli* e alevinos de *Ctenopharygodon idella* como organismos teste.

Objetivos específicos

Avaliar a toxicidade dos herbicidas 2,4-D, alachlor + atrazine, atrazine, fluazifop-p-butil, glyphosate, S-metolachlor, MSMA + diuron, MSMA, paraquat, picloram, picloram + 2,4 D, tebuthiuron e trifluralin sobre o crescimento de *Escherichia coli*;

Estimar a Concentração Letal do atrazine e picloram (CL₅₀) para alevinos de *Ctenopharygodon idella*;

Investigar mudanças comportamentais de natação, peso e alterações histopatológicas no fígado e brânquias de alevinos de *C. idella* expostos aos herbicidas atrazine e picloram;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Toxicidade de herbicidas sobre o crescimento de *Escherichia coli*

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade Vale do Rio Doce – UNIVALE, localizada na cidade de Governador Valadares, MG. Todas as soluções herbicidas foram preparadas antes do seu uso, e posteriormente esterilizadas por filtração (filtro Millipore, 0,22 µm) em capela de fluxo laminar. Após o processo de esterilização, as soluções foram estocadas em geladeira (recipientes vedados e enroladas em papel laminado) até o momento da utilização (Figura 2).

Os herbicidas utilizados no presente estudo, bem como suas concentrações e algumas informações técnicas podem ser observados na tabela 2. A definição das concentrações utilizadas baseou-se na dose comercialmente recomendada levando-se em consideração a concentração letal média (CL₅₀) para a vida silvestre aquática (peixes) (RODRIGUES e ALMEIDA, 2005). Na Tabela 2 são apresentadas informações técnicas sobre os herbicidas utilizados.

Para avaliação do efeito de herbicidas sobre o crescimento de *Escherichia coli* foi utilizado a estirpe ATCC 25922 obtida da coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Vale do Rio Doce (Figura 3 A).

Para a multiplicação da cultura de *Escherichia coli*, alíquota de 50 µL do inóculo inicial (meio de preservação) foi pipetado em um tubo de vidro contendo 4 mL de caldo BHI. O caldo BHI é composto em grama por: cloreto de sódio 5, dextrose 2, fosfato bibásico de sódio 2,5, infuso de cérebro e coração 17,5, peptona de carne 5, peptona de caseína 5, e com pH ajustado em 7,4 à temperatura de 25°C. A mistura do inóculo inicial com BHI foi incubada (24 h/37°C) e estufa e, após este período foi feita coloração de Gram para verificação da pureza da cultura.

Tabela 2 - Informações técnicas sobre herbicidas propostos para avaliação de toxicidade sobre organismos não alvo.

Produto Comercial	Produto técnico	Grupo químico	Concentração produto técnico	Concentração utilizada (mg/L)	Mecanismo de ação
DMA	2,4- D	Ácido fenoxiacético	670 g/L	0,23	Mimetizador de auxina
Agimix	alachlor + atrazine	Cloroacetanilida + triazina	260 g/L + 260 g/L	0,10	Inibe a divisão celular
Siptran, Atranex e Herbitrim	atrazine	Triazina	500 g/L	0,10	Inibe o fotossistema II
Fusilade	fluazifop p-butyl	Aril oxifenoxipropinato	125 g/L	0,23	Inibe a enzima ACCase
Gliz e Roundup original	glyphosate	Derivado da glicina	480 g/L	0,09	Inibe a enzima EPSPs
Dual	s-metalachlor	Acetanilidas	960 g/L	0,06	Inibe a divisão celular
Fortex	MSMA + diuron	organoarsênico + uréia	360 g/L + 140 g/L	0,232	Inibe o fotossistema II
MSMA	MSMA	Organoarsênico	720 g/L	0,12	Não bem conhecido
Gramoxone	paraquat	Bipiridílios	200 g/L	0,08	Produção de íon superóxido
Padron	picloran	Ácido piridinocarboxílico	388 g/L	0,03	Mimetizadores de auxinas
Tordon	picloram +2,4 D	Acido picolinico e fenoxiacético	64 g/L + 240 g/L	0,10	Mimetizador de auxina
Combine	tebuthiuron	Derivados da uréia	500 g/L	0,11	Inibe o fotossistema II
Trifluralina	Trifluralin	Dinitroanilina	445 g/L	0,045	Inibe a formação de microtúbulos

Fonte: Rodrigues e Almeida (2005). */ I: Altamente tóxico; II: tóxico; III: medianamente tóxico e IV: pouco tóxico.

A densidade do inóculo foi padronizada de acordo com a escala de Mcfarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC) como é proposto pela NCCLS (CLSI). Foram adicionados 200 μL da concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml em 19,8 μL de meio BHI atingindo a concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC. Do inóculo de $1,5 \times 10^6$ UFC foram adicionados 100 μL em 29,9 μL de meio BHI, obtendo uma concentração final do inóculo de $1,5 \times 10^5$ UFC.

Para inoculação foram utilizadas placas de microdiluição com 96 células de 300 μL de capacidade volumétrica, onde foram adicionados 180 μL de meio BHI + inóculo e posteriormente 20 μL de cada solução estoque de herbicida. Um controle negativo (200 μL meio BHI) e controle positivo (200 μL de inóculo + meio BHI) foram utilizados (Figura 3 B).

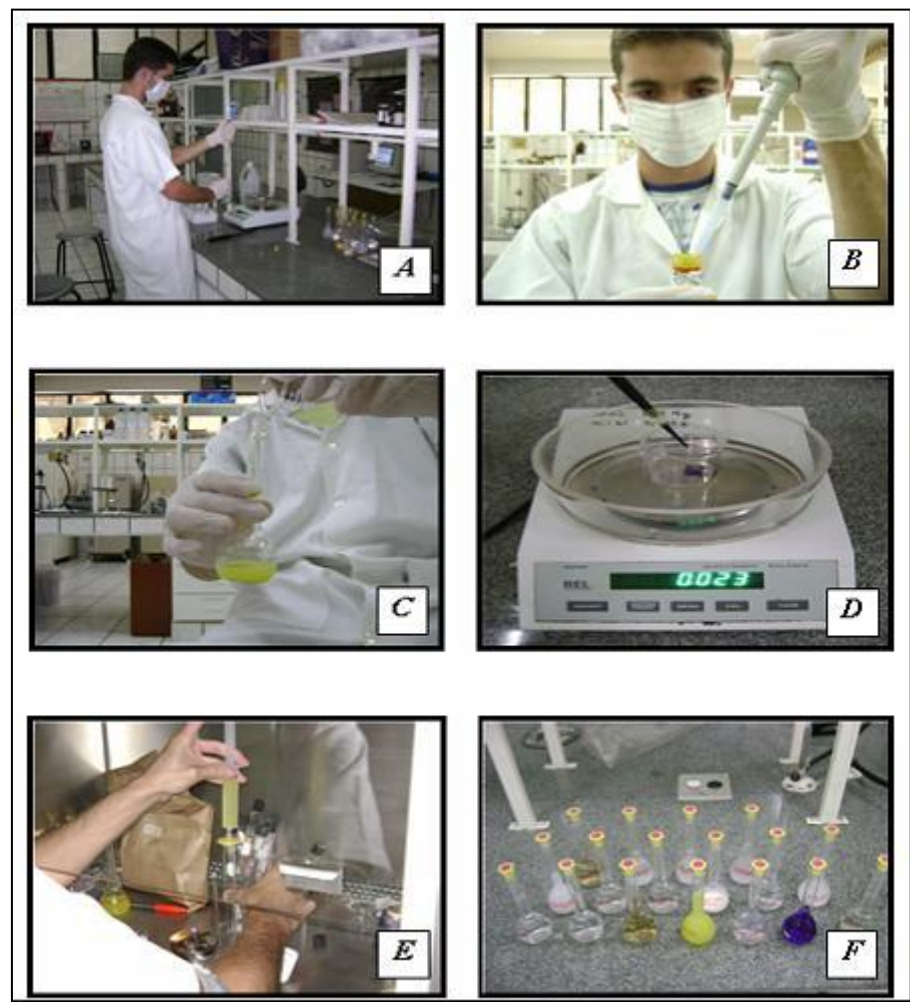


Figura 2- Detalhes do Laboratório de Microbiologia (A); preparação das concentrações das concentrações desejadas (A, B, C e D); filtração das soluções obtidas (E) e soluções-estoque prontas para aplicação (F).

Após a preparação das placas elas foram colocadas em câmara de incubação a 37° C, sendo tiradas somente para a realização da leitura. O crescimento das bactérias foi avaliado pela leitura da densidade ótica a 655 nm em espectrofotômetro (Figura 3 C) em intervalos de 10 em 10 minutos nas primeiras 2 horas e 30 minutos, de 30 em 30 minutos nas próximas 4 horas e 30 minutos e de hora em hora até 24 horas.

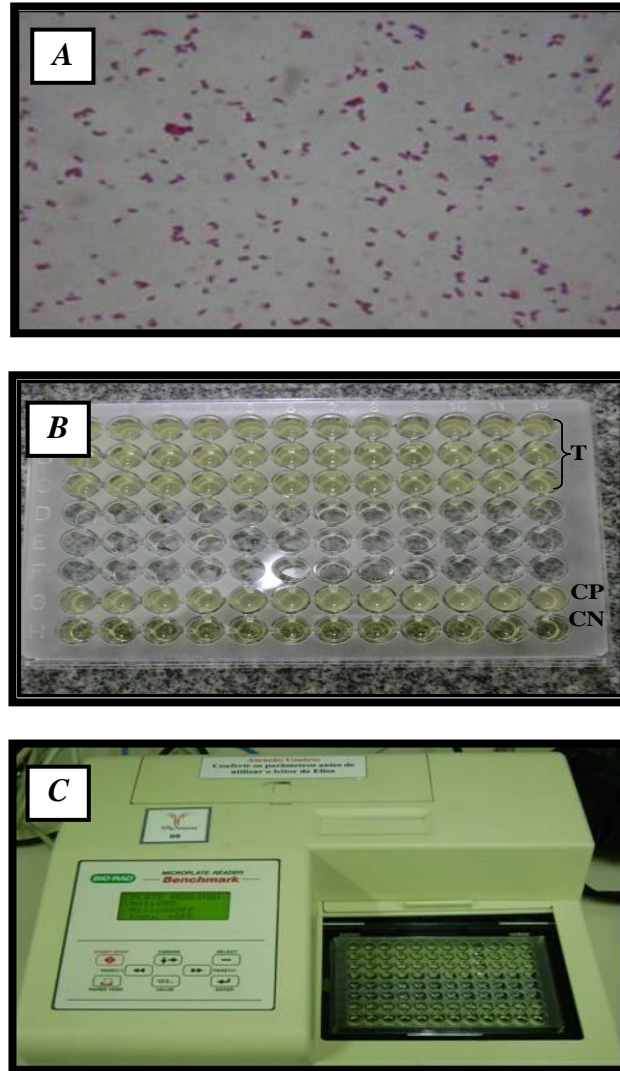


Figura 3- Isolados de *Escherichia coli* coradas pelo método Gram (A). Distribuição dos tratamentos na placa de microdiluição (B) sendo: T = tratamentos (soluções de herbicidas + BHI + inóculo), CP = controle positivo e CN = controle negativo. Leitura da placa de microdiluição em espectrofotômetro (C).

Para interpretação dos resultados foram confeccionadas curvas de crescimentos a partir da relação UFC x tempo, para cada herbicida testado. Dados obtidos aos 600 minutos da

leitura das placas no espectrofotômetro foram submetidos a análise de variância, sendo as médias, quando significativas, comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

5.2 Teste de toxicidade para alevinos de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*)

O estudo foi realizado no Laboratório de Ecologia da Universidade Vale do Rio Doce. Para os testes de toxicidade foram utilizados alevinos de Carpa capim medindo de 2 a 5 cm de comprimento e pesando 1 a 3 gramas provenientes de uma empresa certificada na cidade de Governador Valadares, MG.

Primeiramente os alevinos foram aclimatados por um período de sete dias antes do início dos testes para observação das condições de saúde, recuperação do estresse provocado pelo transporte e adaptação ao novo meio (APHA *et al.* 1991). A escolha da carpa se baseou na disponibilidade, representatividade na comunidade aquática e boas condições de adaptabilidade em laboratório (RESGALLA JR *et al.*, 2002). Os herbicidas atrazine e picloram foram selecionados, pois ambos têm alto poder de lixiviação e são utilizados em grande quantidade no território brasileiro.

Testes preliminares foram realizados com o objetivo de se estabelecer o intervalo das concentrações a serem utilizadas nos testes definitivos. Para cada herbicida foram utilizadas seis concentrações além do controle. Neste teste (preliminar) foi determinado o intervalo de concentração dos herbicidas que causa 0 e 100% de mortalidade a ser usado nos testes definitivos (IBAMA, 1987; APHA, 1991). As concentrações dos herbicidas atrazine e picloram utilizadas foram: 2, 6, 18, 54, 162 e 486 mg/L mais o tratamento controle com três repetições cada. Os alevinos foram colocados em bandejas de material PVC com sistema de aeração individual (Figura 4) e cada bandeja continha três alevinos e 1,5 litros de água proveniente de um poço semi artesiano.

No teste definitivo foram utilizadas seis concentrações entre as que causaram 0 e 100 % de mortalidade no teste preliminar para cada herbicida. As concentrações utilizadas do herbicida atrazine foram 18, 48, 78, 108, 138 e 168 mg/L e as do herbicida picloram foram 1, 2, 3, 4, 5 e 6 mg/L. Durante este teste (definitivo) foi observada a natação dos alevinos durante os primeiros 60 minutos após a aplicação dos herbicidas. Neste teste, cada tratamento constou de

três repetições incluindo o controle (sem o herbicida). Para o armazenamento dos alevinos utilizou-se bandejas de material PVC com sistema de aeração contendo cinco alevinos e 1,5 litros de água cada uma proveniente de um poço semi artesiano. O sistema de realização do teste foi o estático, ou seja, sem renovação da água, e para aplicação da solução contendo o herbicida foi utilizada uma pipeta.



Figura 4- Bandejas retangulares utilizadas como unidades experimentais para a avaliação da toxicidade dos herbicidas atrazine e picloram para *Ctenopharyngodon idella*.

A cada 24 horas os alevinos foram contados, sendo retirados os que se encontravam mortos. O período de exposição dos animais aos herbicidas foi de 96 horas, sendo após, determinada a taxa de mortalidade, estimada por meio de regressão (log-logística) e a Concentração Letal Média do produto a 50% dos indivíduos (CL_{50}), pelo método Trimmed Spearman Karber (HAMILTON *et al.*, 1977).

Com base nos resultados do teste agudo efetuado para os herbicidas, ou seja, no valor da CL_{50} – 96h determinado, foram selecionadas concentrações sub-letais (valor da CL_{50} dividido por 2), com o objetivo de expor os organismos a uma concentração baixa por um período de sete dias, a fim de detectar alguma alteração histopatológica do fígado e brânquias proveniente da exposição aos herbicidas. Foram utilizadas para o estudo histológico seis concentrações crescentes dos herbicidas atrazine (0,50; 1,00; 1,99; 3,97; 7,95 e 15,90 mg/L) e cinco concentrações crescentes do picloram (0,14; 0,29; 0,58; 1,16; 2,31 mg/L), mais o grupo controle. Estas concentrações também foram utilizadas para avaliação de peso antes e após a aplicação dos herbicidas. Os alevinos foram colocados em bandejas de material PVC com sistema de aeração individual e cada bandeja constou-se de cinco alevinos e 2 litros de água. Os experimentos foram

realizados com três réplicas para cada concentração, inclusive o grupo controle. Ao final do período de exposição os alevinos vivos foram coletados das bandejas para os procedimentos histológicos. Os estudos histológicos foram realizados no Laboratório de Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa - UFV.

Após sete dias de exposição dos alevinos aos herbicidas, cinco exemplares de cada tratamento foram colocados em recipiente com fixador Bouin por 48 horas a fim de se preservar órgãos e tecidos, e, após a fixação os exemplares foram transferidos para solução de álcool 70% onde permaneceram até o momento dos procedimentos histológicos. Estruturas como fígado e brânquias (segundo arco branquial) foram retiradas e desidratadas em série alcoólica, 80, 90, 95 e 100% (absoluto) por 30 minutos cada uma. Após a desidratação, as estruturas foram pré-infiltradas em resina usada por duas horas em temperatura ambiente, seguido de infiltração em resina nova por 24 horas e após este período, em resina pura + endurecedor. As amostras foram incluídas em moldes apropriados e colocadas em estufa (50°C/24 horas). Após a polimerização da resina, as amostras foram colocadas em pequenos blocos de madeira para a realização de cortes de 3 µm de espessura em micrótomo LEICA 2055 MULTICUT. Os cortes foram fixados em lâminas e corados com azul de toluidina. As imagens digitais foram capturadas por meio de fotomicroscópio OLYMPUS BX 41.

Para as análises histológicas das brânquias foram qualificadas e quantificadas as seguintes alterações utilizando 10 campos/ animal: aneurisma, elevação epitelial, proliferação celular e fusão de lamelas secundárias. Foram confeccionadas regressões relacionando o número de ocorrência das alterações branquiais com a concentração dos herbicidas atrazine e picloram, sendo os coeficientes testados por “t” de student a 5% de probabilidade de erro.

Para o fígado, foi realizada apenas uma análise descritiva de suas estruturas após exposição aos mesmos herbicidas citados acima.

6. RESULTADOS

6.1 Toxicidade de herbicidas sobre o crescimento de *Escherichia coli*

Não foi observado aumento exponencial na população da bactéria nos primeiros 100 minutos de exposição às formulações Agimix, Atranex, Siptran e Herbitrin, indicando possível fase de adaptação da bactéria ao meio contendo os referidos herbicidas. Porém, após este intervalo, verificou-se crescimento exponencial da bactéria para os herbicidas testados, sendo possível observar multiplicação celular até 300 minutos após a incubação. Independentemente do herbicida, o crescimento de *E. coli* foi maior no tratamento testemunha (isento de herbicidas) (Figura 5).

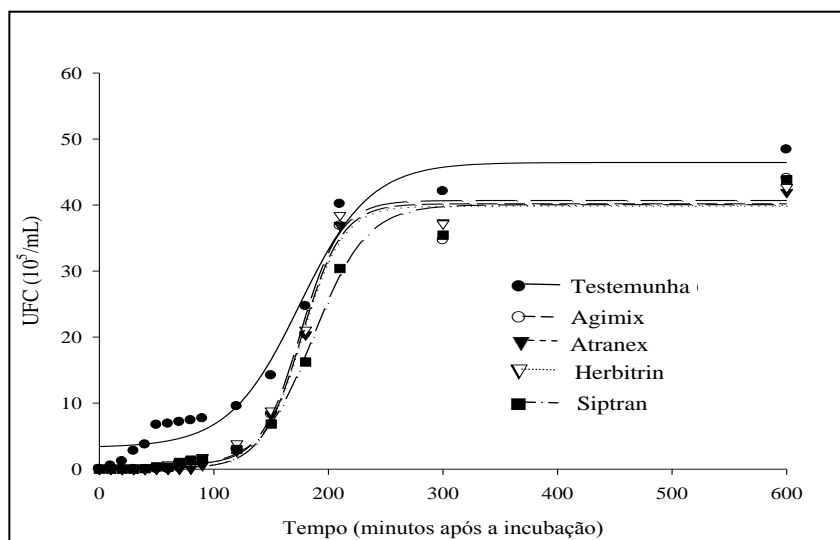


Figura 5 – Crescimento de *Escherichia coli* em meio de cultura BHI contendo diferentes formulações do herbicida atrazine, incubada por 600 minutos. Regressões não lineares testadas por “t” a 5% de probabilidade de erro, com coeficiente de determinação superior a 90% (apresentadas no anexo 1).

Entre os herbicidas mimetizadores de auxinas, também não foi observado crescimento antes dos 100 minutos. Após este período, observa-se longo intervalo de multiplicação celular entre 100 e 400 minutos de exposição da bactéria ao Tordon. Observou-se ainda que a bactéria exposta às formulações DMA e Padron cresceram igualmente até 150 minutos de incubação, observando-se, após este período, elevado e rápido aumento na população bacteriana exposta a este comparado àquele. As bactérias submetidas à exposição ao Padron começaram a crescer após 100 minutos se estabilizando próximo a 230 minutos após a incubação.

Comparando a toxicidade para *Escherichia coli* dos herbicidas DMA, Padron e Tordon observa-se que a bactéria foi mais sensível ao herbicida Padron (Figura 6).

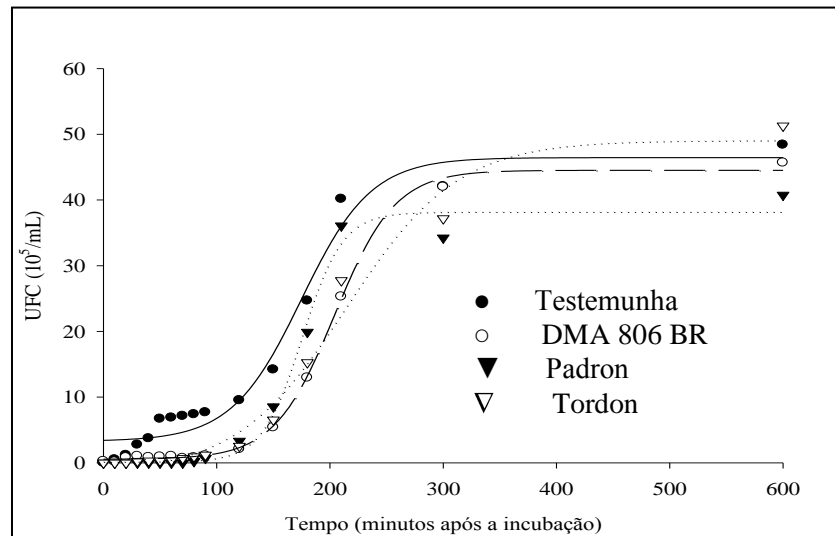


Figura 6 – Crescimento de *Escherichia coli* em meio de cultura BHI contendo os herbicidas DMA, Padron e Tordon, incubado por 600 minutos. Regressões não lineares testadas por “t” a 5% de probabilidade de erro, com coeficiente de determinação superior a 90% (apresentadas no anexo 1).

Em relação aos herbicidas considerados dessecantes (não seletivos) Gliz, Roundup e Gramoxone, não se observou crescimento na população da bactéria em nenhum dos herbicidas testados nos primeiros 100 minutos. No entanto, após este período, a bactéria cresceu igualmente quando exposta aos herbicidas Gliz e Roundup mantendo este padrão até a fase estacionária, quando, foi observado maior número de unidades formadoras de colônia deste sobre aquele (Figura 7).

Em relação ao herbicida Gramoxone, nos primeiros 300 minutos de incubação não houve crescimento das células bacterianas expostas a este herbicida, mostrando extrema sensibilidade deste organismo ao produto. Dessa forma, sua fase de crescimento comparado a dos outros herbicidas apareceu somente após 300 minutos de incubação e terminou aproximadamente em 320 minutos. Após este período, nota-se que as células bacterianas pararam de se dividir entrando assim na fase estacionária (Figura 7).

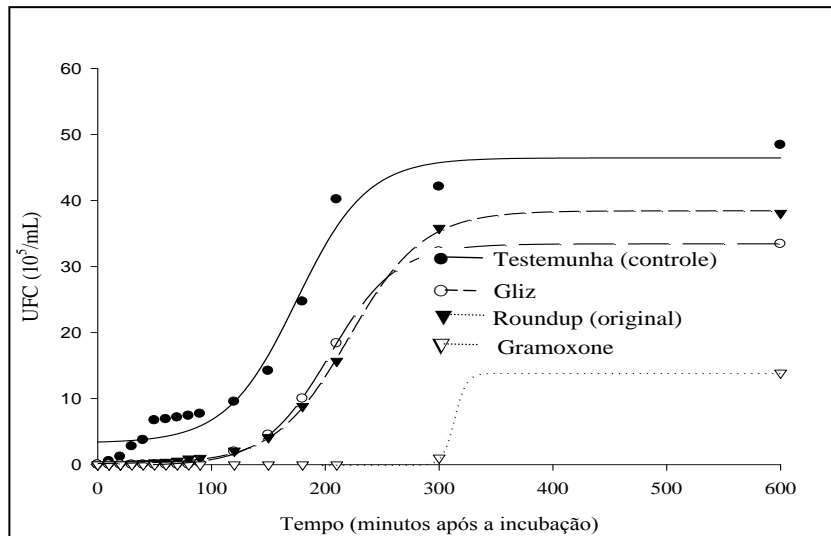


Figura 7 – Crescimento de *Escherichia coli* em meio de cultura BHI contendo diferentes formulações de herbicidas usados para dessecação em sistema de plantio direto, incubada por 600 minutos. Regressões não lineares testadas por “t” a 5% de probabilidade de erro, com coeficiente de determinação superior a 90% (apresentadas no anexo 1).

Entre os herbicidas Dual, Fortex, Combine, Fusilade, MSMA e Trifluralina nota-se por meio do comportamento das curvas que a bactéria tem sensibilidade semelhante para todos estes produtos, apresentando número superior de colônias formadas na testemunha (Figura 8).

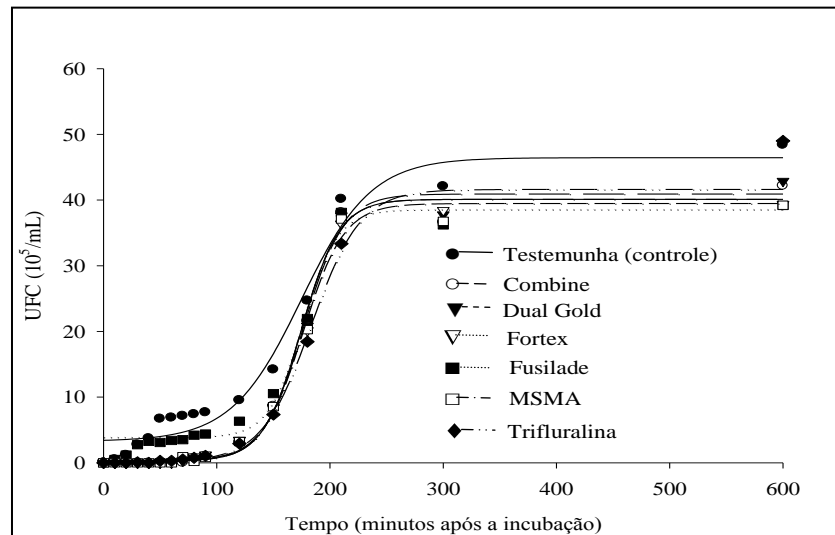


Figura 8 – Crescimento de *Escherichia coli* em meio de cultura BHI contendo diferentes formulações de herbicidas, incubada por 600 minutos. Regressões não lineares testadas por “t” a 5% de probabilidade de erro, com coeficiente de determinação superior a 90% (apresentadas no anexo 1).

Considerando-se a fase exponencial de crescimento de *E. coli* (neste trabalho observada entre, aproximadamente, 120 e 210 minutos), verifica-se por meio da determinação de coeficientes para este período que a taxa de multiplicação celular foi maior para os produtos Agimix, Atranex, Combine, Dual, Herbitrin e MSMA (Tabela 3). Não diferiram da testemunha

neste mesmo período, Fortex, Fusilade, Padron e Trifluralina. Considerando os demais herbicidas, DMA, Gliz, Roundup, Siptran e Tordon apresentaram, na taxa de crescimento, reduções médias aproximadas de 25, 46, 56, 11 e 18%, respectivamente, em relação à testemunha (Tabela 3). A formulação Gramoxone não permitiu desenvolvimento bacteriano neste intervalo (Tabela 3).

Assim em relação ao crescimento exponencial observou-se uma escala decrescente de intoxicação dos herbicidas sobre *Escherichia coli*: Gramoxone > Roundup = Gliz > DMA = Tordon = Siptran > Trifluralina = Fusilade = Padron = Fortex > MSMA = Agimix = Atranex = Dual = Herbitrim = Combine.

Em 600 minutos da incubação foi possível estabelecer, com base no número de UFC, a seguinte escala decrescente de intoxicação dos herbicidas sobre *E. coli*: Gramoxone > Gliz > Roundup = Fusilade = MSMA = Fortex = Padron = Atranex = Combine = herbitrin = Dual > Siptran = Agimix > DMA > Tordon = Trifluralina.

Assim, fica evidenciado que o herbicida mais tóxico para a *Escherichia coli* foi o Gramoxone e os menos tóxicos, Tordon e Trifluralina.

Tabela 3 – Valores observados para a taxa de crescimento exponencial de *E. coli* (estimados entre 120 e 210 e em 600 minutos de incubação) em função linear com o respectivo coeficiente de determinação (r^2) e número total de unidades formadoras de colônia (UFC) ao final do período de incubação.

Herbicida (produto comercial®)	Taxa de crescimento (120-210 minutos após incubação)	Coefficiente de determinação	UFC ($\times 10^5$) ao final do período de incubação (600 minutos)
Testemunha (sem herbicida)	0,3415 b	0,98	48,41a
Agimix	0,3786 a	0,97	44,07 b
Atranex	0,3825 a	0,95	41,94 bc
Combine	0,3928 a	0,96	42,16 bc
DMA	0,2572 c	0,93	45,68 ab
Dual	0,3830 a	0,95	42,88 bc
Fortex	0,3680 ab	0,96	39,35 c
Fusilade	0,3560 b	0,94	39,18 c
Gliz	0,1823 d	0,95	33,40 d
Gramoxone	0,0000 e	0,00	13,90 e
Herbitrin	0,3867 a	0,95	42,67 bc
MSMA	0,3778 a	0,95	39,22 c
Padron	0,3655 ab	0,95	40,75 bc
Roundup	0,1517 d	0,95	38,08 c
Siptran	0,3054 c	0,94	43,86 b
Tordon	0,2810 c	0,95	51,29 a
Trifluralina	0,3412 b	0,95	49,00 a
C.V. (%)	6,75	5,24	9,68

Médias seguidas por letras iguais em cada coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

6.2 Toxicidade dos herbicidas atrazine e picloram sobre alevinos de *Carpa capim* (*Ctenopharyngodon idella*)

Após 96 horas de exposição dos alevinos ao herbicida atrazine e picloram foi possível correlacionar a taxa de mortalidade em função das concentrações utilizadas (relação dose-resposta). Os valores de CL_{50} do atrazine (Figura 9) e picloram (Figura 10) para *Carpa capim* foram respectivamente: 36,83 mg/L e 4,43 mg/L.

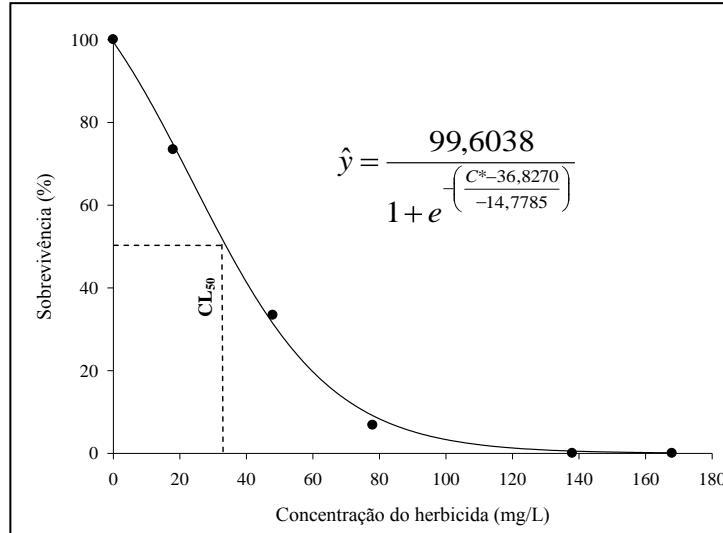


Figura 9 - Estimativa da CL_{50} (96 h) do herbicida atrazine para alevinos de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) (*significativo pelo teste t a 5% de probabilidade de erro, com $R^2=0,99$).

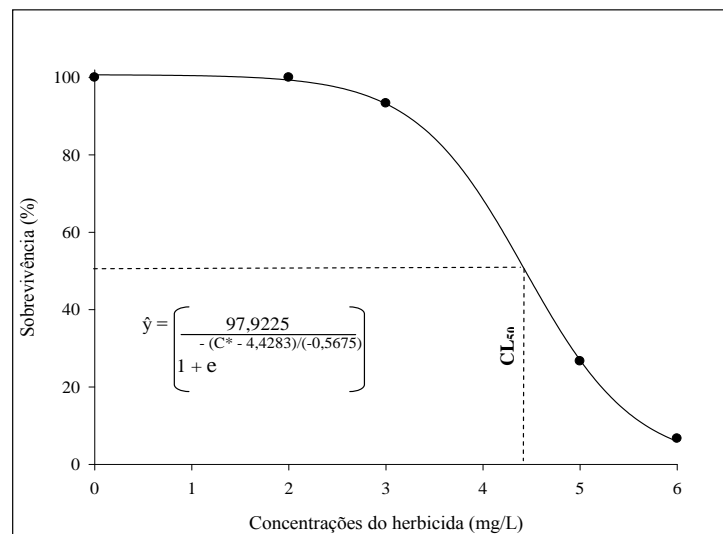


Figura 10 - Estimativa da CL_{50} (96 h) do herbicida picloram para alevinos de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) (*significativo pelo teste t a 5% de probabilidade de erro, com $R^2=0,99$).

Mudanças comportamentais de natação foram observadas nos alevinos expostos às concentrações do herbicida atrazine. Já os alevinos expostos ao picloram não apresentaram mudança em sua natação (Figura 11).

Em relação ao atrazine, durante os 10 primeiros minutos de exposição às concentrações testadas, os alevinos se mostraram bastantes agitados. Entre 10 e 20 minutos foram observados nas concentrações de 138 e 168 mg/L natação irregular, perda de equilíbrio (tombavam lateralmente) e perda de sentido da natação. Entre 20 e 30 minutos foram observados

os mesmo sintomas na concentração de 78 mg/L. De 30 a 40 minutos de exposição na concentração de 48 mg/L foi possível observar natação irregular e perda de equilíbrio. Não foram observadas mudanças comportamentais dos alevinos expostos à concentração de 18 mg/L.

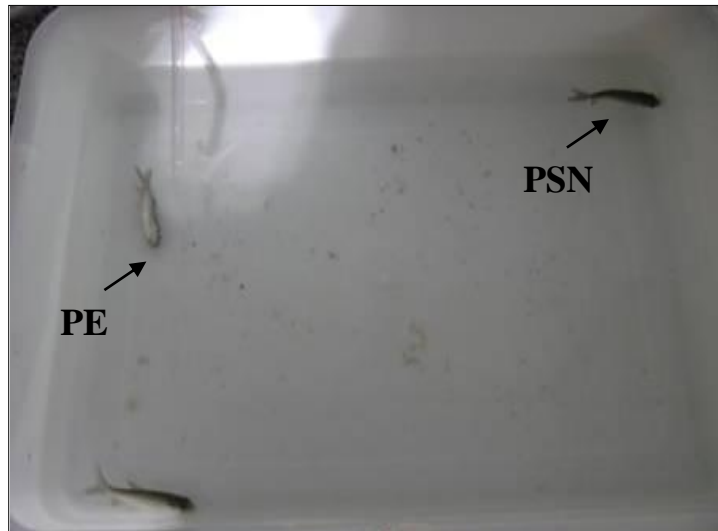


Figura 11 – Alteração comportamental de natação dos alevinos de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) expostos às concentrações 48, 78, 108, 138 e 168 mg/L do herbicida atrazine. Observar perda do sentido de natação (PSN) e perda de equilíbrio (PE).

Quanto ao peso dos alevinos expostos ao herbicida atrazine, foi possível fazer uma relação com as concentrações testadas do produto. Assim, observa-se que as concentrações 0,49; 0,99 e 1,98 mg/L influenciaram aumentando o peso e as concentrações 3,97; 7,95 e 15,9 mg/L influenciaram diminuindo. Considerando a perda de peso dos alevinos em função do aumento das concentrações do atrazine, verifica-se que a partir de 3 mg/L deste herbicida há perda de peso e que a taxa observada é de 21,17 mg de peso corporal por cada unidade do herbicida adicionado presente por litro de água (Figura 12).

Em relação ao herbicida picloram foi observado que concentrações superiores a 0,88 mg/L são suficientes para promover a perda de peso em taxa equivalente a 60,89 mg de peso corporal por cada mg de herbicida adicionado (Figura 13)

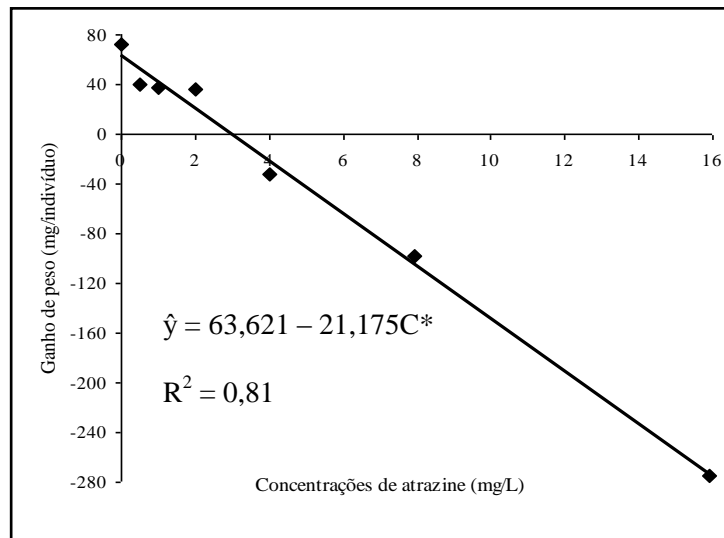


Figura 12 - Variação no peso corporal de alevinos de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) após 168 horas de exposição em solução contendo concentrações (C) crescentes do atrazine.*/ significativo a 5% de probabilidade de erro pela teste “t”.

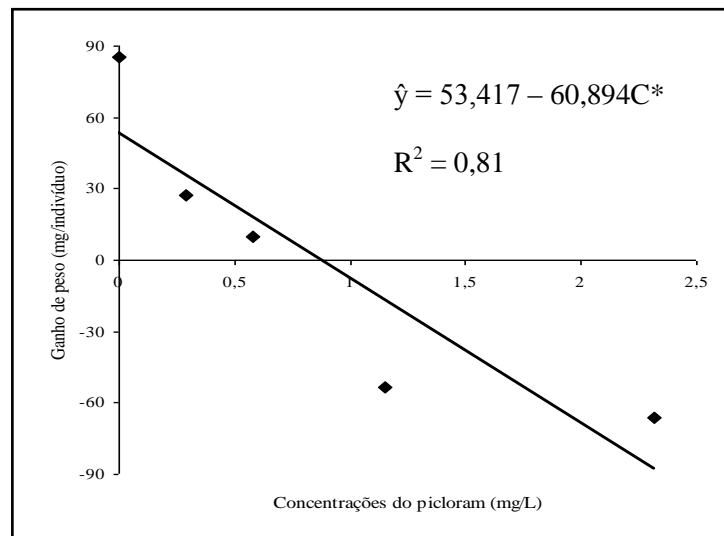


Figura 13 - Variação no peso corporal de alevinos de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) após 168 horas de exposição em solução contendo concentrações (C) crescentes do picloram.*/ significativo a 5% de probabilidade de erro pela teste “t”.

Considerando-se o estudo histológico, não foram encontradas diferenças morfológicas dos componentes estruturais do fígado quando se compara o grupo controle (cortes provenientes de alevinos não tratados com herbicidas) e os tratamentos (Figuras 14).

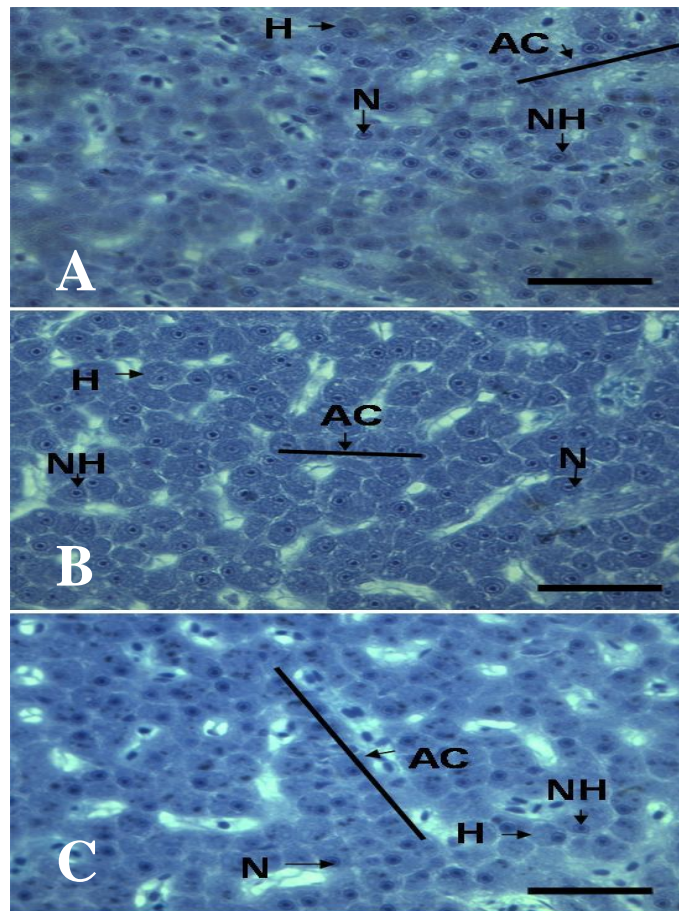


Figura 14 - (A) Organização estrutural do fígado de alevinos de *Ctenopharyngodon idella* do grupo controle. (B e C) Organização estrutural do fígado de alevinos de *C. idella* exposto à concentração de 2,315 mg/L e 6,36 mg/L do herbicida picloram e atrazine respectivamente. Observar hepatócitos (H), arranjo cordonal do hepatócitos (AC), núcleo dos hepatócitos (NH), nucléolo dos hepatócitos (N). Coloração Azul de toluidina. Barra: 50 μ m.

Em relação às brânquias, o grupo controle apresentou-se com distribuição normal dos constituintes celulares e padrão de organização das lamelas primárias, secundárias e vasos sanguíneos (Figura 15).

As alterações histopatológicas encontradas foram fusão de lamelas secundárias, aneurisma, elevação epitelial e proliferação celular parcial. O herbicida atrazine promoveu aparecimento das alterações elevação epitelial, proliferação celular parcial e fusão de lamelas secundárias nas concentrações 0,49 e 0,99 mg/L. Já nas concentrações 1,98; 3,97; 7,95 e 15,9 mg/L observaram-se os três tipos de alterações anteriores mais aneurisma (Figuras 15 e 16).

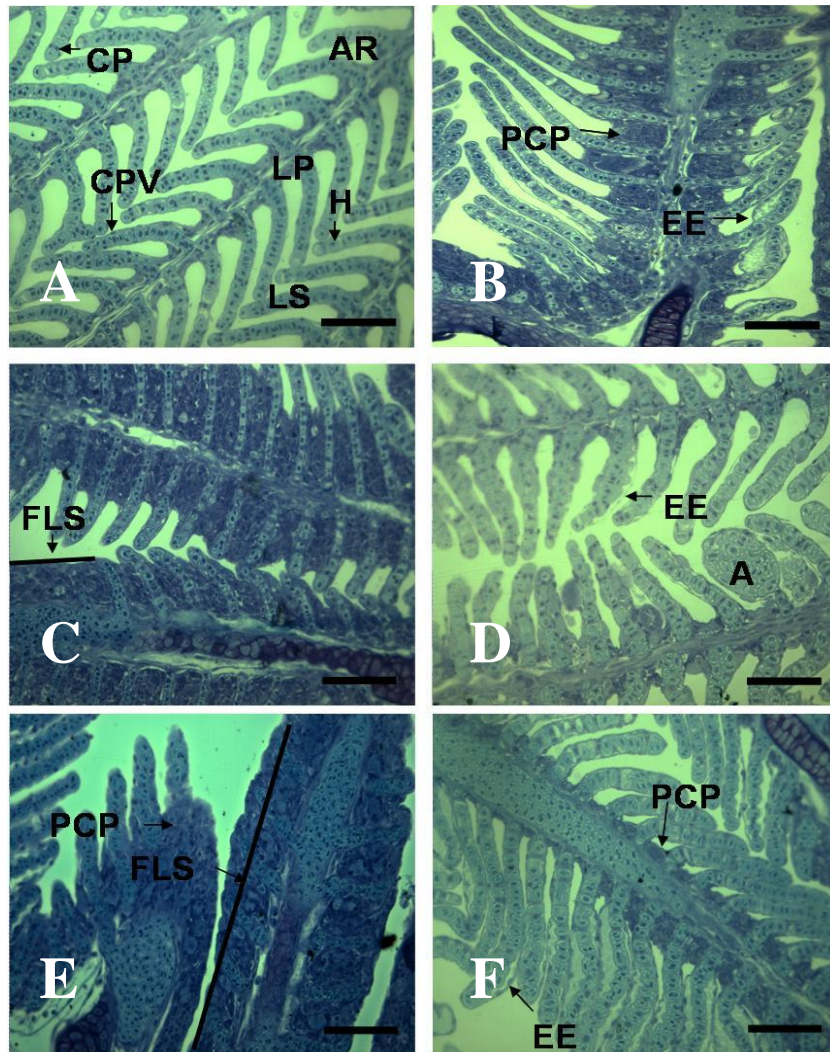


Figura 15 - (A) Brânquias de alevinos de *C. idella* do grupo controle. (B e C). Observar célula pilar (CP), área respiratória (AR), célula pavimentosa (CPV), lamela primária (LP), lamela secundária (LS) e hemácia (H). Brânquias de alevinos de *C. idella* expostas à concentração de 0,49 e 0,99 mg/L do herbicida atrazine. (D e E) Brânquias de alevinos de *C. idella* expostas à concentração de 1,98 e 3,97 mg/L do herbicida atrazine. (F) Brânquias de *C. idella* expostas à concentração de 7,95 e 15,9 mg/L do herbicida atrazine. Observar proliferação celular parcial (PCP) e elevação epitelial (EE), aneurisma (A) e fusão de lamelas secundárias (FLS). Coloração Azul de toluidina. Barra: 50 μ M.

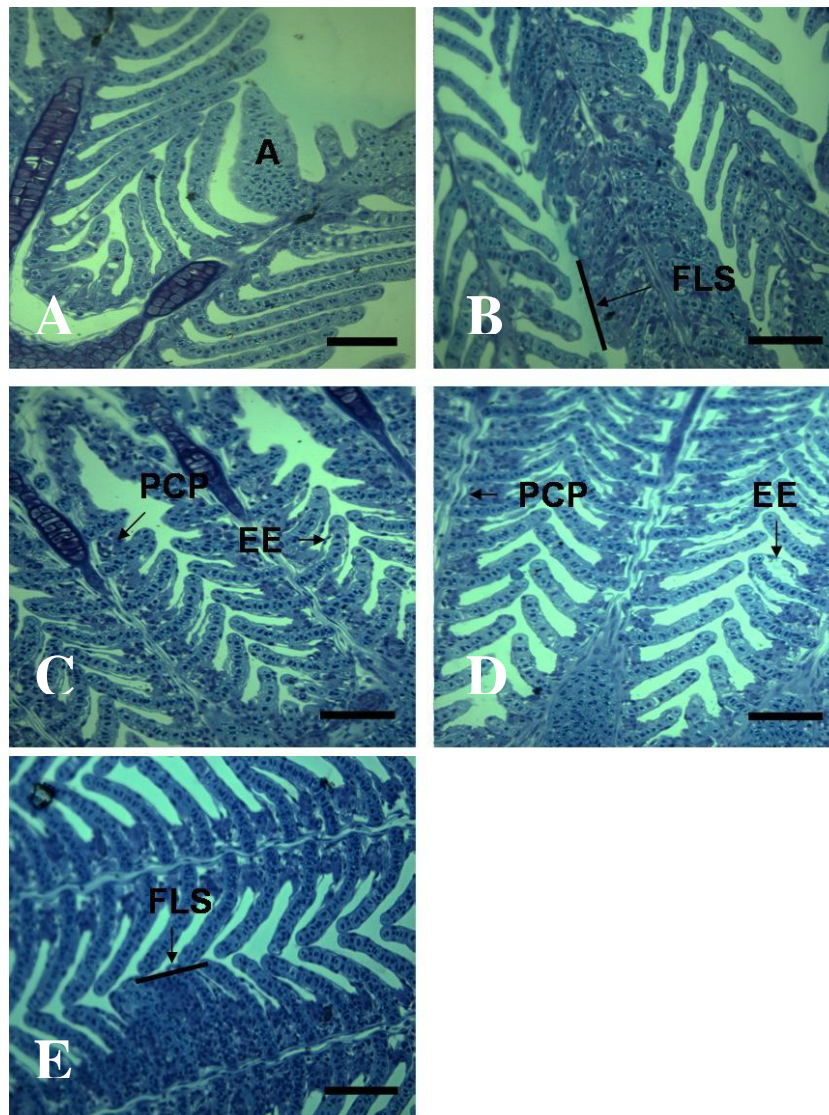


Figura 16 - (A e B) Brânquias de alevinos de *C. idella* expostas à concentração de 7,95 e 15,9 mg/L do herbicida atrazine (C) Brânquias de alevinos *C. idella* expostas à concentração de 0,14 e 0,57 mg/L do herbicida picloram. (D e E) Brânquias de alevinos de *C. idella* expostas à concentração de 0,28, 1,15 e 2,31 mg/L do herbicida picloram. Observar elevação epitelial (EE), proliferação celular parcial (PCP), fusão de lamelas secundárias (FL) e aneurisma (A). Coloração Azul de toluidina. Barra: 50µm.

Considerando-se todas as alterações observadas nos alevinos em função das concentrações do herbicida atrazine, observou-se correlação positiva somente para o tipo aneurisma. Nesse sentido, estimou-se pela regressão, no intervalo e concentrações de 0,0 a 7,0 mg/L de atrazine, que para cada 2,0 mg/L do herbicida adicionado à água, observa-se o aparecimento de uma alteração (aneurisma) nos tecidos amostrados dos alevinos (Figura 17).

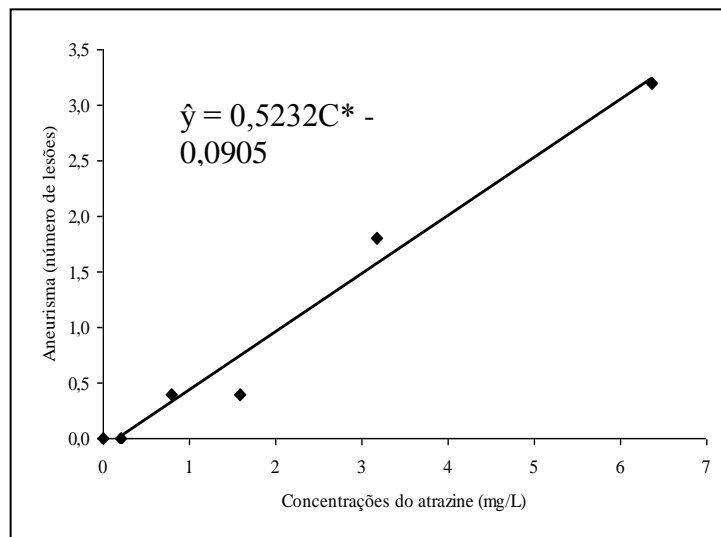


Figura 17 – Relação entre aneurisma (número de ocorrência por tecido amostrado) em brânquias de alevinos de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) expostos a diferentes concentrações do herbicida atrazine. (* Significativo pelo teste “t” a 5% de probabilidade de erro).

Considerando-se a alteração elevação epitelial, foi observado comportamento polinomial de segundo grau para a resposta à adição do herbicida atrazine. Verifica-se a concentração de 2,01 mg/L como aquela correspondente ao máximo de 5,97 elevações epiteliais por tecido amostrado (Figura 18).

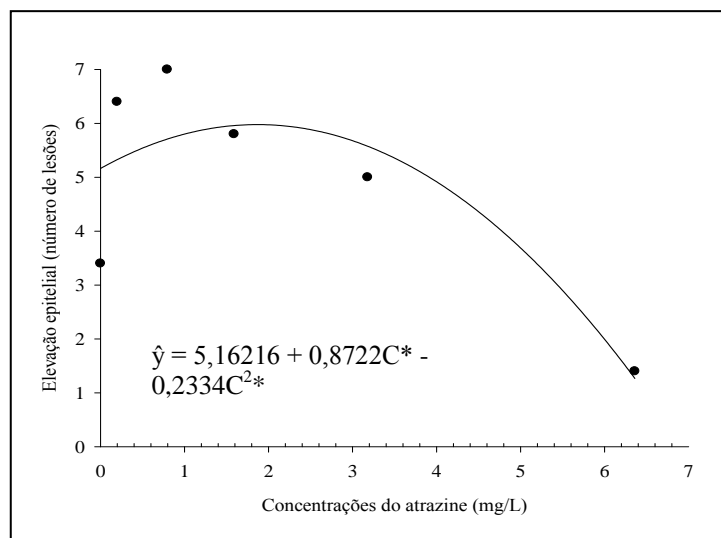


Figura 18 - Relação entre elevação epitelial (número de ocorrência por tecido amostrado) em brânquias de alevinos de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) expostos a diferentes concentrações do herbicida atrazine. (* Significativo pelo teste “t” a 5% de probabilidade de erro).

As concentrações do herbicida picloram promoveram todos os tipos de alterações como no herbicida atrazine, exceto aneurisma. Na concentração de 0,14 e 0,57 mg/L observou-se elevação epitelial e proliferação celular parcial e nas concentrações 0,28; 1,15 e 2,31 mg/L ocorreram além de proliferação celular parcial e elevação epitelial, fusão de lamelas secundárias.

Apesar das concentrações do herbicida picloram terem causado algum tipo de alterações nas brânquias, somente fusão de lamelas secundárias teve correlação significativa com as concentrações testadas. Neste caso, a quantidade desta alteração aumentou à medida que se aumentou a concentração, explicada por equação log-logística (Figura 19).

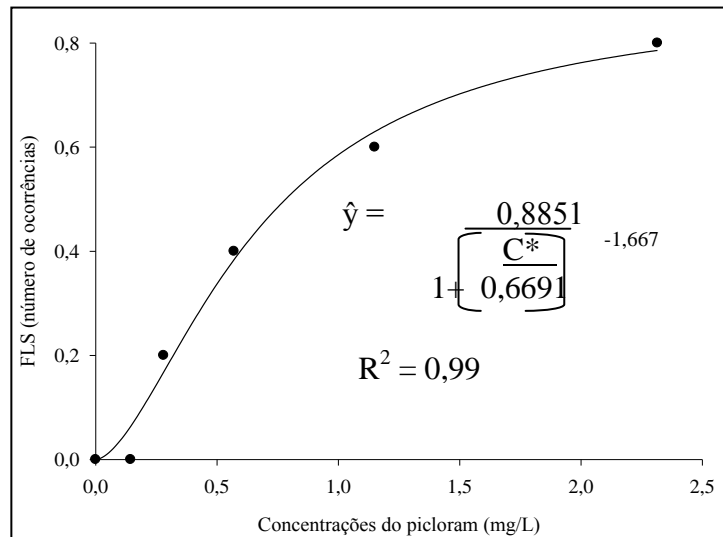


Figura 19 – Relação entre fusão de lamelas secundárias (número de ocorrência por tecido amostrado) em brânquias de alevinos de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) expostos a diferentes concentrações do herbicida picloram. (* Significativo pelo teste “t” a 5% de probabilidade de erro).

7. DISCUSSÃO

7.1 Toxicidade de herbicidas sobre o crescimento de *Escherichia coli*

No presente estudo, os primeiros 100 minutos de exposição da bactéria aos herbicidas correspondem à fase lag de crescimento bacteriano. De acordo com Trabulsi e Alterthum (2008) este é um período de adaptação ao novo meio a qual foi exposta, onde há intensa atividade metabólica e produção de enzimas que são pré-requisitos para sua divisão. No entanto, percebe-se que nesse período iniciou-se crescimento de *Escherichia coli* no tratamento sem herbicida (testemunha), o que pode ser devido à rápida adaptação da bactéria a esse meio isento de herbicida. Após este período, observou-se começo de crescimento bacteriano quando a bactéria foi exposta aos herbicidas (Figura 5-8). Após 100 minutos, a bactéria já adaptada às condições do meio passa para a fase log, ou seja, entra na fase de crescimento exponencial onde absorvem os nutrientes necessários para sua divisão celular. Nesta fase há divisão celular numa velocidade máxima e constante (TRABULSI e ALTERTHUM 2008) até que chega a um ponto em que há falta de nutrientes para a demanda do crescimento e então o número de células que se dividem passa a ser igual ao número de células que morrem (TRABULSI e ALTERTHUM 2008). Este período é conhecido como fase estacionária do crescimento bacteriano.

A bactéria *E. coli* é rotineiramente usada como indicador de qualidade de água, no entanto, sua concentração pode ser influenciada por estressores, que podem inibir (BALAGUE *et al.*, 2001; COLLIER *et al.*, 1990) ou estimular (YUROVSKAYA, 1975) seu crescimento.

Poucos são os trabalhos de toxicidade de compostos que podem chegar a ambientes aquáticos utilizando bactérias como organismo teste. No estudo de Wackett *et al.* (2002), e Foster *et al.* (2004), *E. coli* foi capaz de proliferar em ambientes aquáticos oligotróficos com herbicidas, uma evidência de que essa bactéria pode degradar esses compostos e utilizar o produto da degradação como fonte de nutriente. Apesar de no presente trabalho, todos os herbicidas testados, exceto o paraquat ter permitido o crescimento de *E. coli*, não se pode afirmar que a bactéria degradou os herbicidas e os utilizou como fonte nutricional, pois houve adição de meio de cultura.

O herbicida atrazine é um dos mais utilizados no mundo e tem sido amplamente detectado em cursos de água. Higgins e Hohn (2007) expuseram a bactéria *E. coli* sob

concentrações de atrazine equivalentes a 0,0025; 0,0033; 0,0115; 0,0225 mg/L, constatando que, neste intervalo, não houve inibição do crescimento bacteriano. No trabalho de Koutsotoli *et al.* (2005), o crescimento da bactéria *E. coli* NCTC 9001 também não foi influenciado por concentrações até 0,1 mg/L do herbicida atrazine. Como se percebe, no presente trabalho foi utilizada a mesma concentração do atrazine (em todas as formulações comerciais) que Koutsotoli *et al.* (2005), ou seja 0,1 mg/L e apesar de em ambos os trabalhos os autores terem usados linhagens de *E. coli* diferentes, o herbicida não inibiu seu crescimento. Porém, no trabalho de Koutsotoli *et al.* (2005), não foi utilizado meio de cultura, e segundo este autor o efeito pode ser explicado pelo aumento na permeabilidade da membrana celular e a utilização do composto original ou produtos de sua decomposição como nutrientes complementares. No presente trabalho, todas as formulações testadas contendo o herbicida atrazine não inibiram o crescimento de *E. coli*, sugerindo tolerância desta bactéria ao herbicida.

Além de observarem esta tolerância, Higgins e Hohn (2007) relataram ainda que o herbicida 2,4-D em concentrações variando de 0 a 4 mM não tiveram influência no crescimento de *E. coli*, porém 5 mM e 10 mM foram capaz de inibir significativamente a bactéria quando comparadas com o grupo controle. No trabalho de Balague *et al.* (2002), a bactéria *E. coli* foi exposta a concentrações entre 0 e 10 mM do herbicida 2,4 D e somente a maior concentração foi capaz de causar maior inibição, diferindo estatisticamente em relação ao controle e as demais concentrações utilizadas.

Neste trabalho, o herbicida picloram, 2,4 D + picloram e 2,4 D não foram capazes de inibir a bactéria *E. coli*, porém comparando a toxicidade destes três herbicidas, o picloram foi mais tóxico do que os outros dois. Porém nenhum outro herbicida foi mais tóxico para *E. coli* do que o paraquat (formulação comercial gramoxone) que durante os primeiros 300 minutos de exposição à bactéria, não permitiu seu crescimento, e somente após esse período é que o crescimento bacteriano entrou na fase log ou fase de crescimento exponencial, que durou pouco tempo (aproximadamente 20 minutos). Isto indica a alta toxicidade desse produto para esta bactéria, pois quanto menor a fase log, mais tóxico é um produto, já que esta fase se caracteriza pela divisão celular. O número de UFC no período final de incubação (600 minutos) foi bem menor comparada aos outros herbicidas, sugerindo uma elevada toxicidade por parte do paraquat para esta bactéria, principalmente nos 300 minutos de exposição.

A toxicidade do herbicida paraquat em diferentes sistemas biológicos tem sido comentada por vários autores (MANZO *et al.*, 1979; SUMMERS, 1980). Em mamíferos este herbicida tem sido associado a danos aos pulmões, particularmente nas células epiteliais levando a perda da função deste órgão (HEATH e SMITH, 1977; WITSCHI *et al.*, 1977).

Em *E. coli* o paraquat tem sido relatado como agente bacteriostático (DAVISON, 1971), informação que foi confirmada por Fisher e Willians (1976). Esta afirmação explicaria o crescimento tardio de *E. coli* nesta pesquisa.

Ainda, em relação à toxicidade do paraquat, evidências sugerem que o oxigênio molecular é fundamental para promover tal efeito negativo em plantas (CONNING, *et al.*, 1969), em mamíferos (FISHER, 1977) e em bactérias, como a própria *E. coli* (HASSAN e FRIDOVICH, 1978). Em 1976, Fisher e Willians (1976) observaram que a toxicidade do paraquat no pulmão de ratos e camundongos aumentou quando estes foram expostos simultaneamente a uma atmosfera contendo O₂ puro. Em contraste à elevação de O₂, a sua diminuição de exposição levou a proteção contra o paraquat.

Sobre os mecanismos de toxicidade do paraquat, Farrington *et al.* (1973), demonstraram que o produto reage rapidamente com o oxigênio gerando o radical superóxido (O₂⁻). As defesas antioxidantes enzimáticas são fundamentais e desta forma a enzima superóxido dismutase age sobre o radical O₂⁻ dismutando-o em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e água (H₂O). Essa enzima protege em até 97% os alvos dos ataques do ânion superóxido. Como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) também é tóxico para sistemas biológicos, a catalase, outra importante enzima antioxidante, promove a dissociação deste composto em H₂O + O₂ (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007), e assim a toxicidade do paraquat deixa de existir.

A toxicidade do paraquat tem várias horas para ser expressa a 37° C, onde a exposição relativamente curta leva a letalidade da bactéria (KITZLER *et al.*, 1990).

Algumas informações apresentadas sobre a toxicidade do paraquat foram confirmadas neste trabalho. Em 300 minutos de incubação não foi observado crescimento bacteriano, indicando que neste período o herbicida se mostrou bacteriostático, como proposto por Davison (1971) e Fisher e Willians (1976). Após este período, houve crescimento bacteriano, indicando que realmente a toxicidade do paraquat é dependente do tempo de exposição conforme relatado por Kitzler *et al.* (1990).

7.2 Toxicidade dos herbicidas atrazine e picloram sobre alevinos de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*)

O valor de CL_{50} encontrado para o herbicida atrazine (36,83 mg/L) se mostrou aproximadamente oito vezes maior do que aquele encontrado para o picloram (4,43 mg/L). Em relação ao tempo de exposição, quanto maior foi a concentração utilizada de ambos herbicidas, maior é a mortalidade dos alevinos.

Neskovic *et al.* (1993), fizeram um estudo de toxicidade aguda do produto técnico atrazine sobre carpa comum (*Cyprinus carpio*) e encontraram como CL_{50} (96h) 18,8 mg/L, valor este diferente daquele encontrado no presente trabalho. As várias espécies apresentam susceptibilidade diferencial de acordo com seu aparato metabólico, hábitos alimentares, comportamento, fase de desenvolvimento, entre outros. Ainda de acordo com estes autores, as características do composto químico também influenciam grandemente na toxicidade como, por exemplo, sua composição, ou grau de pureza. Sendo assim os valores de CL_{50} encontrado por Neskovic *et al.* (1993), e o observado neste trabalho, podem ser devidos à utilização de produto técnico por aquele autor e formulação comercial neste trabalho e ainda a utilização de diferentes espécies nos dois trabalhos.

Diversos trabalhos demonstram valores de CL_{50} do herbicida atrazine para diversas espécies de peixes. Em *Tilapia mossambicus* a CL_{50} foi 8,8 mg/L (PRASSAD e REDDY, 1994), em *Cyprinus carpio* foi 18,8 mg/L (NESKOVICK *et al.*, 1993), e em *Oreochromis niloticus*, BOTELHO *et al.* (2009), foi de 5,02 mg/L. No estudo de Botelho *et al.* (2009), a mesma formulação comercial foi utilizada no presente trabalho, porém os valores de CL_{50} são diferentes, o que permite concluir que a tilápia (*Oreochromis niloticus*) é mais sensível ao atrazine do que a Carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*).

Estudos avaliando a toxicidade aguda do herbicida picloram em peixes também têm sido realizados. Fairchild *et al.* (2008), expôs alevinos de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) às seguintes concentrações de picloram: 0, 3, 6, 12, 24 e 48 mg/L e determinaram a CL_{50} (96h) em 36 mg/L, valor muito acima do observado nesse trabalho.

Mayer e Ellersieck (1986) determinaram a CL_{50} do picloram para três espécies de truta as quais foram *Oncorhynchus mykiss* (9,1 mg/L), *Salvelinus namaycush* (3,9 mg/L) e *Oncorhynchus clarkii* (5,1 mg/L). Comparando ao nosso estudo com o de Mayer e Ellersieck

(1986) nota-se que a CL_{50} para *Oncorhynchus mykiss* e *Oncorhynchus clarkii* foram próximas da encontrada no presente trabalho, evidenciando que apesar de serem utilizadas espécies diferentes nos dois estudos, elas possuem sensibilidade parecida ao herbicida picloram.

No presente trabalho, foram detectadas alterações no comportamento de natação de alevinos expostos a concentrações do herbicida atrazine como: perda de equilíbrio ou natação irregular (onde os alevinos quando nadavam tombavam lateralmente) e perda do sentido de natação. Recentes estudos têm demonstrado a correlação entre o comportamento dos peixes e a inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE) em determinadas espécies, sugerindo assim, que a medida da atividade da AChE pode fornecer informações úteis sobre o impacto de substâncias tóxicas presentes no meio aquático (CHANDRASEKARA *et al.*, 2007). Nesse sentido, pode-se inferir que as mudanças de comportamento podem estar relacionadas com a inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) por parte do herbicida atrazine. Em peixes, vários estudos têm demonstrado alterações na atividade de colinesterase em águas contaminadas com herbicidas (DUTTA e ARENDS, 2003; SANCHO *et al.*, 2000). No estudo de Salbego (2005) com piavas (*Leporinus sp*) o herbicida glifosato (formulação comercial Roundup) causou redução na atividade da acetilcolinesterase.

As colinesterases são enzimas que estão presentes tanto em vertebrados como invertebrados (DE LA TORRE *et al.*, 2002). Inseticidas organofosforados e carbamatos são inibidores potentes da enzima AChE (MASSOULIE *et al.*, 1992), mas trabalhos recentes tem relatado que herbicidas também pode afetá-la (BERTAUD e SAGLIO, 2000; DUTTA e ARENDS, 2003; MIRON *et al.*, 2005). Se a atividade da AChE estiver diminuída pela presença de um inibidor, a acetilcolina liberada será acumulada nas sinapses colinérgicas centrais e junções neuromusculares acarretando numa super-estimulação das células alvos. Como consequência a locomoção e o equilíbrio dos organismos expostos podem ser afetados (SAGLIO e BERTAUD, 1998; SAGLIO e TRIJASSE, 1998).

Marcucella e Abramson (1978) definiram ‘Toxicologia Comportamental’ como as mudanças do comportamento de um organismo, induzida pelo estresse, que excede o limite normal de variabilidade. Segundo Olla *et al.* (1980) e Schreck *et al.* (1997), quando um animal é exposto a uma perturbação, a primeira resposta de defesa é comportamental, na maioria das vezes um comportamento de fuga, desenvolvido para diminuir a probabilidade de morte ou economia do gasto metabólico para manter a homeostasia fisiológica. Estas informações vão de encontro

aos dados achados neste trabalho. Quando foi exposto às concentrações do atrazine, durante os dez primeiros minutos de exposição os alevinos se mostraram bastantes agitados.

Kreutz *et al.* (2008), expuseram alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) a concentrações de 4 a 20 mg/L do atrazine e observaram natação errática (principalmente natação vertical) nas maiores concentrações. Em relação ao herbicida 2,4 D, Sarikaya e Yilmaz (2003) observaram mudanças comportamentais na natação de alevinos de carpa comum (*Cyprinus carpio*). Nas concentrações de 48 e 60 mg/L foi observado natação vertical dos alevinos. Na concentração de 72mg/L foi observado desordem na natação e ainda desequilíbrio. Já na concentração de 84 mg/L os peixes apresentavam dificuldades respiratórias. Nesse trabalho as concentrações testadas do picloram (2, 3, 4, 5 e 6 mg/L) não influenciaram o comportamento de natação do alevinos. O fato de não ter sido detectado nenhuma mudança comportamental, pode ser devido a baixas concentrações do herbicida picloram expostas aos alevinos.

Para Little e Finger (1990) o comportamento pode ser usado como um indicador de toxicidade válido e consistente, podendo ser facilmente incorporado em protocolos para avaliar a sensibilidade dos testes de toxicidade padrão. Saglio e Trijasse (1998) observaram alterações no comportamento de natação em peixes expostos ao diuron. Em tilápias (*Sarotherodon mossambicus*) expostas durante 60 dias a $0,55\text{g/L}^{-1}$ de diuron, Reddy *et al.* (1992), observaram natação descoordenada, movimentos operculares lentos e redução da locomoção.

A nível individual, os parâmetros mais comuns a serem levados em conta quando se estudam populações de peixes são o tamanho e o peso, já que podem fornecer um indicativo da condição geral dos mesmos (ARIAS *et al.*, 2007). No presente trabalho, observou-se que os pesos dos alevinos variaram em função das concentrações testadas dos herbicidas atrazine e picloram (Figuras 12 e 13) sendo que nas menores concentrações notou-se menor acúmulo de massa corporal. Isso pode ser promovido por distúrbios osmorregulatórios induzidos pelo estresse, o qual desordena o balanço aquoso e mineral. O estresse neste caso seria o confinamento dos alevinos. De acordo com Kirk (1974) o estresse em peixes marinhos promove perda do peso, já em peixes de água doce ganho de peso. A perda ou ganho de peso, pode influenciar na taxa de “embebição” ou “diurese”, que pode ser explicado pela ação da adrenalina nas funções branquiais, resultando num aumento da permeabilidade da membrana a água. A partir do momento que os alevinos são expostos a concentrações maiores, eles começam a perder peso.

Avaliando a interferência do herbicida atrazine sobre o peso de alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*), Botelho *et al.* (2009), observaram diminuição do peso nas concentrações entre 2,5 e 5 mg/L. No presente estudo a concentração de 2,5 mg/L do herbicida atrazine não promoveu perda de peso nos alevinos de carpa capim. Já na concentração de 5 mg/L foi possível observar queda no peso, assim como observado por aqueles autores.

Observando as figuras 12 e 13, verifica-se que o coeficiente representa a taxa de decréscimo de peso por unidade da concentração do herbicida. Em relação ao herbicida atrazine, cada aumento na unidade deste herbicida (mg/L) corresponde a uma perda de peso de 21,175 mg/indivíduo. Já cada aumento na unidade do herbicida picloram, a perda de peso em mg/L nos alevinos foi de 60,894. Estes valores nos permitir dizer que o herbicida picloram promoveu maior perda de peso nos alevinos do que o atrazine.

Em relação às análises histológicas, o fígado de alevinos de *Ctenopharyngodon idella* do grupo controle e dos grupos expostos aos herbicidas atrazine e picloram se mostraram iguais em relação a estruturas. Observou-se arranjo cordonal dos hepatócitos, sendo que estes possuíam forma hexagonal com alguns núcleos centrais, outros deslocados para a periferia e com nucléolo visível (Figura 14).

Diversos trabalhos têm utilizado o fígado na avaliação de impactos de poluentes em peixes. Neskovic *et al.* (1996), relataram a ocorrência de fibrose e congestão de sinusóides em carpa comum (*Cyprinus carpio*) expostos ao herbicida glifosato. No trabalho de Jiraungkoorskul *et al.*, (2002) foi observado infiltração de leucócitos, aumento do tamanho dos hepatócitos com núcleo picnótico e presença de vacúolos em tilápia (*Oreochromis niloticus*) expostos ao Glifosato.

Hinton e Lauren (1990) classificam o fígado como um órgão desintoxicador essencial para o metabolismo e para a excreção de substâncias tóxicas de dentro do corpo. A exposição a agentes químicos pode causar alterações no fígado e uma investigação histológica pode produzir resultados significativos. Brusle *et al.* (1999), afirmam que estudos com histologia de fígados de peixes poderiam servir como modelos para estudar as interações entre fatores ambientais e estruturas hepáticas e suas funções.

Visualmente, a não toxicidade do fígado por parte dos herbicidas atrazine e picloram foi devido às baixas concentrações as quais os alevinos foram expostos neste estudo, ou ao tempo de exposição.

Em ambientes degradados onde os poluentes ocorrem em concentrações crônicas ou sub-letais, as modificações nas estruturas e função dos organismos aquáticos ocorre mais frequentemente do que a mortalidade em massa (POLEKSIC e MITROVIC-TUDUNDZIC, 1994). Segundo Ewald (1995) os danos histológicos são precedidos por respostas bioquímicas e fisiológicas e quando são detectados em organismos expostos em bioensaios de toxicidade, os efeitos adversos são inquestionáveis.

Poleksic e Mitrovic-Tudundzic (1994) propuseram uma classificação para as alterações branquiais compostas por três estágios progressivos, baseado na capacidade do organismo em recuperar suas funções após certo período de melhoras nas condições do ambiente. O primeiro estágio inclui alterações que podem ser reversíveis caso haja melhoras nas condições ambientais, porém caso estas condições permaneçam elas podem se tornar de segundo estágio, que são compostas por alterações mais graves e difíceis de serem revertidas caso haja uma melhora nas condições ambientais. Nas alterações do terceiro estágio a restauração das estruturas branquiais não se torna possível e o organismo tem sua sobrevivência ameaçada.

Os indivíduos do grupo controle apresentaram as estruturas branquiais com lamelas secundárias bem desenvolvidas e com espaços entre estas bem definidas. Alterações como elevação epitelial (deslocamento das células do epitélio), proliferação celular parcial (hiperplasia) e fusão de algumas lamelas secundárias (fusão completa de algumas lamelas secundárias) foram encontradas nas estruturas branquiais de alevinos expostos ao herbicida atrazine e picloram que segundo Poleksic e Mitrovic-Tudundzic (1994) caracterizam-se por alterações de estágio primário. Já aneurisma também encontrada é pertencente ao estágio secundário. No caso da elevação epitelial, o epitélio lamelar se separa da lamela, formando um espaço que pode ser preenchido por água, podendo levar à formação de um edema (MALLAT, 1985).

O descolamento de epitélio foi observado em estudo relatado por Arellano *et al.* (1999), em peixes expostos a cobre e por Rigolin-sá (1998), em peixes expostos ao organofosforado “Omite” e “Roundup”. Lupi *et al.* (2006), observaram proliferação celular, fusão lamelar e aneurisma em exemplares de tilápia (*Oreochromis niloticus*) coletados no córrego Bebedouro-SP.

As trocas gasosas entre a água que passa nos espaços interlamelares e o sangue que circula no interior das lamelas secundárias ocorrem por difusão, onde a direção do fluxo sanguíneo é sempre oposta à direção da água. Isso mantém um gradiente de difusão, de modo que

o oxigênio difunde-se para o meio interno e o CO₂ para o meio externo (HUGHES e SHELTON, 1962).

Alterações observadas no presente trabalho como elevação epitelial, proliferação celular parcial e fusão de lamelas funcionam como mecanismos de defesa, pois diminuem a área de superfície vulnerável da brânquia e aumenta a barreira de difusão ao poluente (ERKMEN e KOLANKAYA, 2000; KARLSSON-NORRGREN *et al.*, 1985). Estas respostas dificultam o acesso do poluente ao sangue prejudicando a realização de trocas gasosas (MCDONALD e WOOD, 1993).

Para Temmink *et al.* (1989), a fusão de lamelas secundárias é induzida por altas concentrações de substâncias tóxicas e a elevação epitelial (ou deslocamento epitelial) é considerada uma resposta inicial da brânquia, podendo ser induzida por baixas concentrações dessas substâncias (ROBERTS, 1989). Neste trabalho a primeira informação foi confirmada para o herbicida picloram, pois notou-se que nas maiores concentrações a quantidade de lamelas secundárias fundidas era maior. Já em relação à elevação epitelial, as menores concentrações do herbicida atrazine, causaram maiores quantidades desta alteração, e com o aumento das concentrações a quantidade diminuiu.

Segundo Ostrenski *et al.* (2001), os danos branquiais como proliferação tecidual, fusões lamelares e descolamento do epitélio branquial revelaram forte correlação com contaminação aguda. No presente trabalho, todas as concentrações do herbicida atrazine causaram estes três tipos de alterações mais aneurisma, porém somente elevação epitelial e aneurisma foram significativo com as concentrações testadas, assim como as concentrações do herbicida picloram em relação a fusão de lamelas secundárias.

A dilatação do eixo vascular das lamelas conduziu, por vezes, à ruptura das células pilares com perda da sua capacidade de suporte, levando ao aparecimento dos aneurismas lamelares. Resultados similares foram observados por Thophon *et al.* (2003), em *L. calcarifer* submetidos à exposição ao cádmio. Os aneurismas podem prejudicar a função branquial interferindo na composição sanguínea. Se a condição desfavorável persistir, poderá ocorrer rompimento do aneurisma levando a um extravasamento do sangue podendo levar a anemia, além da entrada de agentes patogênicos como bactérias e fungos. A consequência de tais efeitos é a morte dos organismos ao longo do tempo podendo levar a uma diminuição na população (RAND

e PETROCELLI, 1985; POLEKSIC e MITROVIC-TUDUNDZIC, 1994; MAZON, 1997; ANDRADE, 2003).

Deve-se considerar que a intensidade das alterações nos tecidos branquiais varia de acordo com o nível de poluentes de determinado ambiente (FRACÁCIO *et al.*, 2003; GERNHOFER *et al.*, 2001). Vários trabalhos têm demonstrado que alterações em tecidos branquiais são ferramentas confiáveis e eficientes para detectar e monitorar ambientes aquáticos que sofrem influências das atividades antrópicas (ANDRADE, 2003; FRACÁCIO *et al.*, 2003; MELETTI, 2003).

Em uma revisão sobre alterações morfológicas em brânquias, Mallat (1985) verificou que as principais alterações eram: elevação epitelial, necrose, hipertrofia, hiperplasia, fusão de lamelas, ruptura do tecido branquial, hipersecreção, proliferação de células mucosas, mudanças nas células cloreto e vascularização.

É importante notar que a duração do bioensaio e a idade dos organismos são fatores que podem influenciar na caracterização de um ambiente em função de seu grau de poluição, isto é, talvez se fosse utilizado organismos na fase adulta, não seriam detectados efeitos subletais e os herbicidas testados poderiam ser considerados não tóxicos para as estruturas branquiais. Assim, é evidente a importância dos ensaios de toxicidade com a forma inicial de estágio de vida, uma vez que juvenis ainda não apresentam mecanismos de adaptação e defesa completamente maduro, respondendo melhor as condições do ambiente.

8. CONCLUSÃO

- O herbicida paraquat mostrou ser o mais tóxico para a bactéria *Escherichia coli*.
- A CL_{50} (96 h) do herbicida atrazine e picloram para alevinos de *C. idella* são respectivamente 36,83 mg/L e 4,43 mg/L
- Foi possível observar mudanças comportamentais de natação dos alevinos expostos ao herbicida atrazine, o que não foi evidenciado para o picloram.
- O herbicida atrazine e picloram influenciaram no peso dos alevinos, onde nas menores concentrações houve ganho de peso e nas maiores, perda.
- Os herbicidas atrazine e picloram nas concentrações utilizadas não causaram alterações no fígado de alevinos de *C. idella*
- A exposição de alevinos de *C. idella* ao herbicida atrazine e picloram provocou alterações na estrutura das brânquias, sendo que as alterações elevação epitelial e aneurisma mostraram correlação com as concentrações do atrazine e fusão de lamelas secundárias com concentrações do picloram.

9. REFERÊNCIAS

ADAMS, S.M. Aquatic toxicology testing methods. In: HOFFMAN, D.J; RATTNER, B.A; BURTON JR, G.A; CAIRNS, JR, J. (Org). **Handbook of toxicology**. Boca Raton: Lewis, 1995, 755p.

ALVES, S.R.; OLIVEIRA-SILVA, J.J. Avaliação de ambientes contaminados por agrotóxicos. In: PERES, F. (Org.). **E veneno ou e remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p.137-156.

AMARANENI, S.R.; PILLALA, R.R. Concentrations of pesticide residues in tissues of fish from Kolleru Lake in India. **Environmental Toxicology**, v.16, n.6, p.550-556, 2001.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 17th ed. Washington, 1991.

ANDRADE, C.A. **Estudo toxicológico no trecho médio da bacia d Rio Doce – MG**. 2003. 195 f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

ARANA, S. Estrutura histológica do fígado de peixes. Jaboticabal: 1995. **Semana sobre histologia de peixes**, p. 39-41. Resumo.

ARAÚJO, F.G. Adaptação do índice de integridade biótica usando a comunidade de peixes para o rio Paraíba do Sul. **Revista Brasileira de Biologia**. v.58, n.4, p.547-558, 1998.

ARELLANO, J.M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and cooper accumulation in liver and gills of Senegales sole, *Solea senegalenses*. **Ecotoxicological and Environmental Safety**. v. 44, p.62-72, 1999.

ARIAS, A.; BUSS, D.F.; DE ALBURQUERQUE, C.; INACIO, A.F.; FREIRE, M.M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D.F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Revista Ciência e Saúde Coletiva**, v.12, n.1, p. 61-72, 2007.

ASARE, D.K.; SITZE, D.O.; MONGER, C.H.; SAMMIS, T.W. Impact of irrigation scheduling practices on pesticides leaching at a regional level. **Agricultural Water Management**, v. 43, p. 311-325, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12648**: Água – Ensaio de toxicidade com *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). 1992.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713**: Água – Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladorcera, Crustacea). 1993.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp. 2004.

AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. **As bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. São Carlos: Rima, 2003.

BADELLINO, C. **Controle Eletroquímico de Herbicida em Soluções Aquosas: Estudo da Degradação do Ácido 2,4-diclorofenoxiacético**. 2006. 110 f. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

BALAGUE, C.E.; STURTZ, N.; DUFFARD, R.; EVANGELISTA DE DUFFARD, A.M. Effect of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid herbicide on *Escherichia coli* growth, chemical composition, and cellular envelope. **Environmental Toxicology**. v.16, n. 1, p. 43-53. 2001.

BALAGUE, C.E.; SILVA DE RUIZ, C.; REY, R.; EVANGELISTA DE DUFFARD, A.M.; NADER-MACIAS, M.E. Effect of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors. **Toxicology**. v. 177, p.143-155, 2002.

BAPTISTA, D.F.; BUSS, D.F.; EGLER, M. Macroinvertebrados como bioindicadores de ecossistemas contaminados por agrotóxicos. In: PERES, F. (Org). **E veneno ou remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p.157-175.

BARBOSA, L.C.A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004

BAUDO, R. Ecotoxicological testing with *Daphnia*. **Intit. Ital. Idrobiol.** v.45, p.461-482. 1987.

BERTAUD, S.; TOTANT, J.P.; SAGLIO, P. Effects of carbofuron, diuron and nicossulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.47, p.117-124, 2000.

BERTOLETTI, E. **Estimativa de efeitos tóxicos crônicos com *Danio rerio*** (Pisces, Cyprinidae). 2000. 118 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

BITAR, O.Y.; ORTEGA, R.D. Gestão Ambiental. In: OLIVEIRA, A.M.S.; BRITO, S.N.A. (Ed). **Geologia de Engenharia**. São Paulo: Associação Brasileira de Geologia de Engenharia, 1998. p.499-508.

BOHRER, M.B.C. **Biomonitoramento das lagoas de tratamento terciário dos efluentes líquidos industriais (SITEL) do Pólo Petroquímico do Sul, Triunfo, RS, através da comunidade zooplanctônica**. 1995. 470 f. Tese (doutorado) Departamento de Ciências, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1995.

BOTELHO, R.G.; SANTOS, J.B.; OLIVEIRA, T.A.; BRAGA, R.R.; BYRRO, E.C.M. Toxicidade aguda de herbicidas a tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Planta daninha**, viçosa, v.27, n.3, p.621-626, 2009.

BUCHANAN, R.L.; KLAWITTER, L.A. The effect of incubation temperature, initial pH And sodium chloride on the growth kinetics of *Escherichia coli* 0157:H7 . **Food Microb**, v.9, p.185-196, 1992.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I e II. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, nº7 p. 45-53, de 10 de janeiro de 2001. Seção 1.

BRIGANTE, J.; ESPINDOLA, E.L.G. Praguicidas no sedimento do rio Mogi-Guacu. In: BRIGANTE, J; ESPINDOLA, E.L.G. **Limnologia fluvial: Um estudo no rio Mogi-Guacu**. São Carlos: Rima, 2003. p.121-128.

BRUSCHI JR., W.; MALABARBA, L.R.; SILVA, J.F.P Da. Avaliação da qualidade ambiental dos riachos através das taxocenoses de peixes. In: Centro de Ecologia/UFRGS. **Carvão e Meio Ambiente**. Porto Alegre: Ed. Da Universidade/UFRGS, 2000. 1006p.

BRUSLE, J.; GONZALEZ, G.; ANADON, G. G. The structure and function of fish liver. *In*: MUNSHI, J.S.D.; DUTTA, H.M. (Eds.). **Fish Morphology Science Publishers**. USA, 1999. pp. 77–93.

BURTON, G.A.; MACPHERSON, C. Sediment toxicity testing issue and methods. *In*: Hoffman, D.J.; Rattner, B.A.; Burton, G.A.; Cairns, J. Jr. **Handbook of Ecotoxicology**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995.p.70-103.

BURTON JR, G.A.; SCOTT, K.J. Sediment toxicity evaluations. Their niche in ecological assessments. **Environmental Science & Technology**. v.26. p. 2068-2075, 1992.

CAIRNS, J.JR.; NIEDERLEHNER, B.R. **Ecological Toxicity Testing**. Lewis Publishers: Boca Raton, 1995.

CAMPAGNA, A.F. **Toxicidade dos sedimentos da bacia hidrografica do rio Monjolinho (São Carlos – SP): ênfase nas substancias cobre, aldrin e heptacloro**. 2005. 268 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

CASTRO, R.M.C.; CASATTI, L. The fish fauna from a small forest stream of the upper Paraná River basin, southeastern Brazil. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**. v.7, n.4, p.337-352, 1997.

CHANDRASEKARA, L. W. H. U.; PATHIRATNE, A. Body size-related differences in the inhibition of brain acetylcholinesterase activity in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by chlorpyrifos and carbosulfan. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, p. 109–119, 2007.

COLLIER, P.J.; RANSEY, A.J.; AUSTIN, P.; GILBERT, P. Growth inhibitory and biocidal activity of some isothiazolone biocides. **Journal of Applied Bacteriology** v. 69, p. 569-577, 1990.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Norma CETESB-L5.019-II: Água – Teste de toxicidade aguda com peixes – ParteII – Sistema Semi-Estatico**.1990.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Norma CETESB L5.018: Água – Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustácea)**.1994.

CONNING, D. M.; FLETCHER, K.; SWAN, A. A. B. **Br. Med. Bull.** Paraquat and related bipyridyls. v.25, p.245-249, 1969.

DAVISON, C.L.; PAPIRMEISTER, B. Bacteriostasis of *Escherichia coli* by the herbicide paraquat. **Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.**, v. 136, p.359-364, 1971.

DE LA TORRE, F.R.; FERRARI, L.; SALIBIAN, A. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase in two fish species. In:_____. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 2002. p.272-280.

DORES, E.F.G.C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E.M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas: via de contaminação e dinâmica dos pesticidas no ambiente aquático. **Pesticidas: Revista de ecotoxicologia em meio ambiente**, v.9, p.1-18, 1999.

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

EDWIN, D.O. Control of water pollution from agriculture. **FAO Irrigation and Drainage Paper**. 1996. p. 1-101

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. **Citação e referencias a documentos eletrônicos.** Disponível em: <www.cnpma.embrapa.br/informativo/index.php3#149> Acesso em: 22 de abril. 2006.

ERKMEN, B.; KOLANKAYA, D. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. **Bulletin of EnvironmentalContaminatin and Toxicology**. v.64, p.418-425, 2000.

EWALD, G. Chronic measures of toxicant – induced effects on fish. **Ann Zool. Fenic**, v. 32, p.311-316, 1995.

FAIRCHILD, J. F.; ALLERT, A.; SAPPINGTON, S.; NELSON, K.J.; VALLE, J.; USDA, F.S. Using accelerated life testing procedures to compare the relative sensitivity of rainbow trout and the threatened bull trout to three commonly-used rangeland herbicides (picloram, 2,4-D and clopyralid). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.27, p.623–630, 2008.

FANTA, E.; RIOS, F.S.A.; ROMÃO, S.; VIANNA, A.C.C.; FREIBERGER. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.54, p.119–130, 2003.

FARRINGTON, J.A.; EBERT, M.; LAND, E.J.; FLETCHER, K. Bipirydylum quaternary salts and related compounds. V. pulses radiolysis studies of the reaction of paraquat radical with oxygen. Implications for the mode of action of bipyridyl herbicides. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 314, p.372-381, 1973.

FISHER, H. K.; G. WILLIAMS. Paraquat is not bacteriostatic under anaerobic conditions. **Life Science** v.19, p.421-426, 1976.

FISHER, H. K. Biochemical Mechanisms of Paraquat Toxicity. In: _____. New York: Academic Press, 1977. p. 57-65.

FLORES-LOPES F.; MALABARBA, L.R.; SILVA, J.F.; PEREIRA, E.H.L. Alterações histopatológicas em placas ósseas do peixe cascudo *Rineloricaria strigilata* (Hensel) (Teleostei, Loricariidae) e sua frequência no lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n.3, p. 699-709, 2001.

FORNO, D.A. Sustainable development starts with agriculture. In: FAIRCLOUGH, A.J. (Ed). **Sustainable agriculture solutions the actions report of the sustainable agriculture initiative**. London: The Novello Press, 1999. p. 8-11.

FOSTER, L.J.; KWAN, B.H.; VANCOV, T. Microbial degradation of the organophosphate pesticides Ethion. **FEMS Microbiology Letters**. v.240, p.49-53, 2004.

FRACÁCIO, R. **Utilização de bioensaios ecotoxicológicos com *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae) e análises limnológicas para avaliação ambiental dos reservatórios do médio e baixo tiete (SP)**. 2001. 233 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

FRACÁCIO, R.; VERANI, N.F.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; ROCHA, O.; RIGOLÍN-SÁ. ; ANDRADE, C.O. Alterations on growth and gill morphology of *Danio rerio* (Pisces, Ciprinidae) exposed to the toxic sediments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 4, p.685-695, 2003.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de histologia em cores**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

GERNHOFER, M.; PAWERT, M.; SCHRAMM, M.; MÜLLER, E.; TRIEBSKORN, R.. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v.8, p.241-260, 2001.

GUNDERSEN, D.T.; MILLER, R.; MISCHLER, A.; ELPERS, K.; MIMS, S.D.; MILLAR, J.G.; BLAZER, G. Biomarker response and health of polychlorinated biphenyl – and chlordane-contaminated paddlefish from the Ohio River Basin, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.19, n.9, p. 2275-2285, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Nova York: Oxford University Press, 2007.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. **Environmental Science Technology**, v.7, n.11, p.714 -719, 1977.

HASSAN, H. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide radicals and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in Escherichia coli. **Journal of Biological Chemistry**. v.253, p. 8143-8148, 1978.

HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. Boca Raton: CRC Press, 1987.

HEATH, D.; SMITH, P. The pathology of the lung in paraquat poisoning. *In*: A. P. Autor (ed.). **Biochemical mechanisms of paraquat toxicity**. London: Academic Press, 1977.p.39-57.

HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D.; MURCHELAN, R.A.; OKIHIRO, M.S. **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and histopathological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992, p.155-208.

HINTON, D.E.; LAUREN, D.J. Integrative histopathological effects of environmental stressors on fishes. *In*: AMERICAN FISHERIES SOCIETY, 8.,1990, p. 51-66.

HIGGINS, J.; HOHN, C. Effects of prevalent freshwater chemical contaminants on in vitro growth of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. **Environmental Pollution**. v.152, p.259-266, 2007.

HUGHES, G.M. Measurement of gill area in fishes. Practices and problems. **Journal of Marine Biology**. Assoc. U.K, v.64, p. 367-655, 1984.

HUGHES, G.M.; SHELTON, G. Respiratory mechanisms and their nervous control in fish. In: LOWENSTEIN, O. (Eds). **Advances in comparative physiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1962. p.275-364.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Avaliação da toxicidade aguda para peixes. In: MANUAL DE TESTES PARA AVALIAÇÃO DE ECOTOXICIDADE DE AGENTES QUÍMICOS. Brasília, DF, Parte D. 3. 1987.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sinopse preliminar do censo agropecuário. Rio de Janeiro, v.4, p.1-90, 1985.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA Levantamento sistemático da produção agrícola. Rio de Janeiro, v.5, p.1-76, 1993.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E.S.; KRUAATCHUE, M.; SAHAPHONG, S.; VICHASRI-GRAMS, S.; POKETHITIYOOK, P. Histopathological effects of roundup, a Glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Science Asia**, v. 28, p. 121-127, 2002.

JOBLING, M. **Environmental biology of fishes**. London: Chapman e Hall, 1995.

JOHNSON, R. K.; WIEDERHOLM, T.; ROSENBERG, D. M. Freshwater biomonitoring using individual organisms, populations, and species assemblages of benthic macroinvertebrates. In: ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H. (Ed.). **Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates**. New York: Chapman and Hall, 1993. p. 195-233.

KARLSSON-NORRGREN, L.; RUNN, P.; HAUX, C. Cadmium-induced changes in gill morphology of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton- uchanan) and rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**., v.27, p.81-95, 1985.

KARR, J.R. Assessment of biotic integrity using fish communities. **Fisheries**, v.6, p.21-27, 1981.

KHAN, S. U. In *Fundamental Science in the Soil Environment*; S. U. Khan Ed., 1980; Cap 2, p 9.

KIRK, W.L. The effects of hypoxia on certain blood and tissue eletrolytes of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Transactions of the American Fisheries Society**, v.103, p.593-600. 1974.

KITZLER, J. W.; MINAKAMI, H.; FRIDOVICH, I. Effects of paraquat on Escherichia coli: differences between B and K-12 strains. **Journal of Bacteriology**. v.172, p. 686-690, 1990.

KOUTSOTOLI, A.D. *et al.* Inductive effects of environmental concentration of atrazine on Escherichia coli and Enterococcus faecalis. **Folia Microbiologica**. v.50, p.283-287, 2005.

KUMAR, K.; ANSARI, B. A. Malathion toxicity: effect on the liver of the fish *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Orlando, v.12, p.199–205, 1986.

KREUTZ, L. C.; BARCELOS, L.J.G.; SILVA, T.O.; ANZILIERO, D.; MARTINS, D.; LORENSON, M.; MARTENINGHE, A.; DA SILVA, L.B. Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. **Ciência Rural**, v.38, n.4, p.1050-1055, 2008.

LAWS, E.A. **Aquatic pollution: an introductory text**. 1993. 2.ed. Interscience publication, John Wiley & Sons, INC, New York.

LITTLE, E.E.; FINGER, S.E. Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.9, p. 13-9, 1990.

LLOYD, R. **Pollution and freshwater fish**. Oxford: Fishing news books, 1992.

LOBO, E.A.; CALLEGARO, V.L.M.; BENDER, E.P. 2002. Utilização de algas diatomáceas epilíticas como indicadoras da qualidade da água em rios e arroios da região hidrográfica do Guaíba, RS, Brasil. EDUNISC, Santa Cruz do Sul, 127p.

LOMBARDI, J.V. Fundamentos de toxicologia aquatica.. *In*: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTA ; R.M.; LIZAMA; M.A.P. (Eds.). **Sanidade de organismos aquáticos**. Sao Paulo: Org. Livraria Varela, 2004. p. 261-270.

LOURENCETTI, C.; SPADOTTO, C.A.; SANTIAGO-SILVA, M.; RIBEIRO, L.M. Avaliação do potencial de contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: Comparação entre métodos de previsão de lixiviação. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.15, p. 1-14, 2005.

LUPI, C.; NHACARINI, N.I.; MAZON, A.F.; RIGOLIN-SÁ. Avaliação da poluição ambiental através das alterações morfológicas nas brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilapia) nos córregos Retiro, Consulta e Bebedouro, município de Bebedouro-SP. **Revista Hispeci & Lema**, v.9, n.3, p. 30-36. 2006.

McCARTH, P.A.L.; SHUGART, L.R (1990). Biological markers of environmental contamination. In: biomarkers of environmental contamination. Chelsea, MI, Lewis Publishers.

MACEDO, J.A.B. Introdução a química ambiental (Química, meio ambiente e sociedade). Juiz de Fora – MG: Jorge Macedo (CRQ-MG), 2002.

MAGALHÃES, D.P.; FILHO, A.S.F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecol. Bras.** v.12, n.3, p. 355-381, 2008.

MALABARBA, L.R.; PEREIRA, E.H.L.; PEZZI DA SILVA, J.F.; BRUSCHI JR, W.; FLORES-LOPES, F. Avaliação da qualidade da água através da frequência de anomalias morfológicas em peixes: estudo de caso do lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia. PUCRS, **Série Zoologia**, v.17, n.2, p. 97-128, 2004.

MALLAT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and irritants: A statistical review. Can. **Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. v.42, p.630-648, 1985.

MANZO, L. C.; GREGOTTI, C.; DI NUCCI, A.; RICHELMI, P. Toxicology of paraquat and related bipyridyls: biochemical, clinical and therapeutic aspects. **Veterinary and Human Toxicology**. v.21, p. 404 – 410, 1979.

MARCUCELLA, H.; ABRAMSON, C.I. Behavioral toxicology and teleost fish. In: MOSTOFKY, D. J (ed.). **The Behavior of fish and other Aquatic Animals**. London :Academic Press, 1978. Pp. 33-77.

MARSCHNER, A. Biologische Bodensanierung und ihre Erfolgskontrolle durch Biomonitoring. In: Oehlmann, J; Markert, B. (Eds.). **Okotoxikologie -Okosystemare Ansätze und Methoden**. Ecomed, Landsberg: 1999. Pp. 568-576.

MASSOULIE, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJCI, E.; VALLETTE, F.M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in neurobiology**, v. 41, p.31-41, 1993.

McDONALD, D.G.; WOOD, C.M. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: FISH ECOPHYSIOLOGY. London: Chapman & Hall, 1993. p.297-321.

MAYER, F.L.; ELLERSIECK, M.R. 1986. Manual of acute toxicity: Interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals. Resource Publication 160. US Fish and Wildlife, Washington, DC.

MAZON, A.F. **Efeito do íon cobre sobre o Curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881)**. 1997. 160 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1997.

MELETTI, P.C.; ROCHA, O.; MARTINEZ, C.B.R. Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e análises histopatológicas em peixes. In: BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E.L.G. (Eds.) **Limnologia Fluvial** – um estudo no rio Mogi-Guaçu. São Carlos: Rima, 2003. p.149-180.

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

MOREIRA, J.C.; JACOB, S.C.; PERES, F.; LIMA, J.S.; MEYER, A.; OLIVEIRA-SILVA, J.J.; SARCINELLI, P.N.; BATISTA, D.F.; EGLER, M.; FARIA, M.V.C.; DE ARAÚJO, A.J.; KUBOTA, A.H.; SOARES, M. DE O.; ALVES, S.R.; MOURA, C.M.; CURI, R. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 7, n.2, p. 299-311, 2002.

MOZETO, A.A.; ZAGATTO, P.A. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: Zagatto, P.A.; Bertoletti, E (Eds.), **Ecotoxicologia aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima Editora, 2006. Cap. 2, p.15-38.

NESKOVIC, N.K.; ELEZOVIC, I.; KARAN, V.; POLEKSIC, V.; BUDIMIR, M. Acute and subacute toxicity of atrazine to carp (*Cyprinus caprio* L). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.25, p. 173-182, 1993.

NESKOVIC, N.K.; POLEKZIC, V.; ELEZOVIC, I. Biochemical and Histopathological Effects of Glyphosate on Carp (*Cyprinus carpio L.*). **Environmental contamination and toxicology**. v. 56, p.295-302, 1996.

NEWMAN, M.C.; JAGOE, C.H. The ligands and bioavailability of metal in aquatic environments. In: HAMELINK, J.L.; LANDRUN, P.F.; BERGMAN, H.L.; BENSON, W.H. **Bioavailability, physical, chemical and biological interactions**. 1994. p.39-62.

NEWSTEAD, J.D. Fine structures the respiratory lamellae of teleostean gills. *Zeitschrift für Zellforschung*, v.70, p.420-445, 1987.

NINMO, D.R. Pesticides. In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R.(Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**, New York: Hemisphere, 1985. p. 335-373.

OLLA, B.L.; PEARSON, W.H.; STUDHOLME, A.L. Applicability of behavioral measures in environmental stress assessment. **Rapports et Procès-verbaux des Réunions du Conseil International pour l'Exploration de la Mer**. v.179, p.162-173, 1980.

OSTRENSKI, A.; CHAVES, P.T.C.; DUBOC, L.F.; GUIMARÃES, A.T.B.; CRUZ, S.R.Z.; WEGBECHER, F.X.; PILCHOWSKI, R.W.; TEIXEIRA, U.A. Monitoramento ictiofaunístico pós-derramamento de óleo nos Rios Barigüí e Iguaçu. In: UN-REPAR/PETROBRÁS. **2º Seminário do Rio Iguaçu**. p. 32-52, 2001.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla L.*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.53, n. 3, p. 331-347. 2002.

PARIS-PALÁCIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulphate. **Aquatic Toxicology**, v.50, p.109-124, 2000.

PASTRO, M. A. **Avaliação de risco do produto rodeo (princípio ativo glifosato) para o ambiente aquático**. 1995. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 1995.

PELCZAR, J.R.M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R. **Microbiologia: Conceito e aplicações**. São Paulo-SP: McGraw-Hill, v.2, 1997. Cap. 30, p. 371-397.

PERES, F.; MOREIRA, J.C.; DUBOIS, G.S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F. (Org.). **E veneno ou e remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p.21-41.

PERRY, S.F.; LAURENT, P. Environmental effects on fish gill structure and function. In: RAKIN, J.C; JENSEN, F.B. (Eds). **Fish ecophysiology**. London: Chapman and Hall, 1993. p.231-264.

PESSOA, M.C.P.Y.; GOMES, M.A.F.; NEVES, M.C.; CERDEIRA, A.L.; SOUZA, M.D. Identificação de áreas de exposição ao risco de contaminação de águas subterrâneas pelos herbicidas atrazina, diuron e tebutiuron. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e MeioAmbiente**, v.13, p.111-122, 2003.

PLAA, G.L. Present status: toxic substances in the environment. **Canadian Journal of physiology and Pharmacology**, v.60, p. 1010-1016, 1982.

POLEKSIC, V.; MITROVIC – TUTUNDIZIC, V. Fish gills as monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MULLER, R.; LLOYD, R. **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. United Nation, Fishing News Books, 1994. Cap. 30, p. 339 – 352.

PRASSAD, T.A.V.; REDDY, D.C. Atrazine toxicity on hydromineral balance of fish, *Tilapia mossambicus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.28, p.313-316, 1994.

RAMADE, F. **Ecotoxicologie**. Paris: Masson, 1997.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and application**. London: Hemisphere Publishing Corporation, 1985.

REDDY, D. C.; VIJAYAKUMARI, P.; KALARANI, V.; DAVIES, R.W. Changes in Erythropoietic activity of *Sarotherodon mossambicus* exposed to sublethal concentrations of the herbicide diuron. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 49, p. 730-737, 1992.

RESGALLA, JR.; NOLDIN, J.A.; DOS SANTOS, A.L.; SATO, G.; EBERHARDT, D.S. Toxicidade aguda de herbicidas e inseticida utilizados na cultura do arroz irrigado sobre juvenis de carpa (*Cyprinus carpio*). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e MeioAmbiente**, v.12, p. 59-68, 2002.

RIGOLIN-SÁ, O. **Toxicidade do herbicida roundup (glifosato) e do acaricida Omite (propargito) nas fases iniciais da ontogenia do bagre, Rhandia hilari (Valenciennes, 1840) (Pimelodidae, Siluriforme)**. 1998. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1998.

ROBERTS, R.J. **Patología de los peces**. Madrid: MundiPrensa Libros, 1981.

ROBERTS, R.J. **Fish pathology**. London: Bailliere Tindall, 1989.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. 5.ed. Londrina: Grafmake. 2005.

ROMAN, E. S. **Mecanismos de ação de herbicidas**. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/f_danin. Acesso: 10 de mar. 2004.

SAGLIO, P.; TRIJASSE, S. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. **Arch. Environmental Contamination and Toxicology**. v.35, p.484-491, 1998.

SAGLIO, P.; OLSEN, K.H.; BERTAUD, S. Behavior and olfactory responses to prochloraz, bentazone and nicosulfuron contaminated flows in goldfish. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v.35, p.4-491, 1998.

SALBELGO, J. **Efeito do herbicida Glifosate sobre o crescimento, enzimas digestivas e parâmetros toxicológicos em piavas (*Leporinus sp.*)**. 2005. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

SANCHES, S.M.; DA SILVA, C.H.T. DE PAULA.; DE CAMPOS, S.X.; VIEIRA, E.M. Pesticidas e seus respectivos riscos associados a contaminação da água. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. v.13, p. 53-58, 2003.

SANCHO, E. FERNANDEZ-VEGA, M.; SANCHEZ, M.D. Alterations on AChE activity of the fish *anguilla anguilla* as response to herbicide-contaminated water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.46, p. 57-63, 2000.

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

SCHRECK, C.B.; OLLA, B.L.; DAVIS, M.W. Behavioral response to stress. *In: IWAMA, G.K., PICKERING, A.A.D., SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (eds.). Fish stress and Health in Aquaculture*. Cambridge: Cambridge Univ. Press. 1997. Pp. 145-170.

SCHVARTSMAN, S. **Intoxicações agudas**. 4, ed. Sao Paulo: Sarvier, 1991.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v.6, p.75-86, 2001.

SEELIGER, U.; KNAK, R.B. Origin and concentration of copper and mercury in water and biota of the Patos Lagoon estuary, Brazil. **Atlântica**, v.5, p. 35-42, 1982.

SILVA, S. C. Brasil é o quarto maior consumidor de agrotóxicos. **O Estado de São Paulo**, 18.jul.1999,p. A16, Geral Ambiente.

SINDICATO NACIONAL DA INDUSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA – SINDAG. 2008. Disponível em: <http://www.sindag.com.br/>. Acessado em 22 Set. 2009.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA. 2003. Defensivo Agrícola: O que é? **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em < www.sindag.com.br> Acessado em: 25 abril, 2008.

SMITH, W.S.; BARRELA, W.; CETRA, M. Comunidade de peixes como indicadora de poluição ambiental. **Revista Brasileira de Ecologia**. v.1, n.1, p.67-71, 1997.

SOARES, A.M.V.M. Ecotoxicologia e Determinação de Riscos Ecológicos. Prática e Perspectivas. In: CONFERÊNCIA NACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO AMBIENTE. 1990, Lisboa. Lisboa: Universidade de Lisboa, 1991. p. 43-52.

SOUZA, P.A.P. Importância do uso de bioindicadores de qualidade: o caso específico das águas. In: FELICIDADE, N. *et al.* **Uso e gestão dos recursos hídricos no Brasil**. São Carlos: Rima, 2001. p.55-66.

STEPHAN, C.E.; MOUNT, D.I. 1973. Use of toxicity tests with fish in water pollution control. *In*, Biological Methods for the Assessment of Water Quality, ASTM STP 528. Am. Soc. Testing and materials. Philadelphia, Pa.

SUMMERS, L. A. **The bipyridylium herbicides**. London: Academic Press, 1980.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. 2. ed. Tokyo: Kodansha, 1995.

TEMMINK, J.H.M.; FIELD, J. A.; VAN HAASTRECHT, J. C.; MERKELBACH, R. C. M. Acute and subacute toxicity of bark tannins in carp (*Cyprinus carpio*). **Water research**, v. 23, n.3, p.341-344, 1989.

THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M. UPATHAM.E.S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**, v.121, p.307-320, 2003.

TOMITA, R.Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**, v.64, p.135-142, 2002.

TONISSI, F.B. **Avaliação ecotoxicológica do reservatório de Salto Grande, Americana (SP), com subsídios para análise da qualidade ambiental do sistema**. 1999. 130 f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1999.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2008.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.1, p. 151-173, 1977.

VARMAN, A.H.; EVANS, M.G. Foodborne pathogens. An illustrated text. Marison publishing, 1996. 501p.

VEIGA, M.L.; RODRIGUES, E. L.; PACHECO, F. J.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Histopathologic changes in the kidney tissue of *Prochilodus lineatus Valenciennes, 1836* (Characiformes, Prochilodontidae) induced by sublethal concentration of trichlorfon exposure. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.45, n.2, p.171-175, 2002.

VERLAG, G.F. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. Tokyo: Kodansha, 1982.

ZAGATTO, P.A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). **Ecotoxicologia aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima, 2006. p. 1-13.

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

WACKETT, L.P.; SADOWSKY, M.J.; MARTINEZ, B.; SHAPIR, N. Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzymes to field studies. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.58, p. 39-45, 2002.

WASHINGTON, H.G. Diversity, biotic and similarity indices. A review with special relevance to aquatic ecosystems. **Water Research**, v.18, p.653-694, 1984.

WITSCHI, H. S.; KACEW, K.; HIRAI.; COTE, M.G. In vivo oxidation of reduced nicotamide adenine dinucleotide phosphate by paraquat and diquat in rat lung. **Chem. Biol. Interactions**, v.19, p.143-160, 1977.

WOOTON, R.J. **Fish and fisheries series 1: ecology of teleost fishes**. Nova Iorque : Chapman and Hall, 1990.

YUROVSKAYA, E.M. Behavior and indicator value of some microorganisms under conditions of soil contamination by pesticides. **Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology**. v.19, p.10-16, 1975.

ANEXO 1

Testemunha (controle sem herbicida)

$$f=y_0+a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$$

R = 0.99588714 Rsqr = 0.99179120 Adj Rsqr = 0.98973900

Standard Error of Estimate = 1.4983

	Coefficient	Std. Error	t	P
a	38.8509	1.1901	32.6463	<0.0001
b	19.5650	2.4322	8.0443	<0.0001
x0	180.2877	2.7744	64.9833	<0.0001
y0	6.7826	0.4846	13.9950	<0.0001

x = Tempo

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	3	3254.9432	1084.9811	483.2821	<0.0001
Residual	12	26.9403	2.2450		
Total	15	3281.8835	218.7922		

2,4-D

$$f=y_0+a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$$

R = 0.99939346 Rsqr = 0.99878728 Adj Rsqr = 0.99848410

Standard Error of Estimate = 0.5908

	Coefficient	Std. Error	t	P
a	43.9762	0.5259	83.6140	<0.0001
b	26.6574	1.4188	18.7883	<0.0001
x0	204.3052	1.3943	146.5316	<0.0001
y0	0.5405	0.2022	2.6724	0.0203

x = Tempo

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	3	3449.4936	1149.8312	3294.3755	<0.0001
Residual	12	4.1883	0.3490		
Total	15	3453.6819	230.2455		

Picloram

$$f=y_0+a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$$

R = 0.99464503 Rsqr = 0.98931874 Adj Rsqr = 0.98664842

Standard Error of Estimate = 1.7201

	Coefficient	Std. Error	t	P
a	38.0243	1.3382	28.4148	<0.0001
b	17.7699	2.6212	6.7793	<0.0001
x0	175.0701	3.0517	57.3683	<0.0001
y0	0.1826	0.5512	0.3313	0.7461

x = Tempo

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	3	3288.4458	1096.1486	370.4876	<0.0001
Residual	12	35.5040	2.9587		
Total	15	3323.9498	221.5967		

2,4-D + picloram

$$f=y_0+a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$$

R = 0.99110166 Rsqr = 0.98228250 Adj Rsqr = 0.97785312

Standard Error of Estimate = 2.3566

	Coefficient	Std. Error	t	P
--	--------------------	-------------------	----------	----------

a	50.6950	2.8775	17.6179	<0.0001
b	48.9482	7.8357	6.2468	<0.0001
x0	214.2977	8.4420	25.3846	<0.0001
y0	-1.5923	1.2770	-1.2469	0.2362

x = Tempo

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	3	3694.8836	1231.6279	221.7655	<0.0001
Residual	12	66.6449	5.5537		
Total	15	3761.5285	250.7686		

ANEXO 2

Testemunha (controle sem herbicida)

$$f=y0+a/(1+\exp(-(x-x0)/b))$$

R = 0.99588714 Rsqr = 0.99179120 Adj Rsqr = 0.98973900
Standard Error of Estimate = 1.4983

	Coefficient	Std. Error	t	P
a	38.8509	1.1901	32.6463	<0.0001
b	19.5650	2.4322	8.0443	<0.0001
x0	180.2877	2.7744	64.9833	<0.0001
y0	6.7826	0.4846	13.9950	<0.0001

x = Tempo

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	3	3254.9432	1084.9811	483.2821	<0.0001
Residual	12	26.9403	2.2450		
Total	15	3281.8835	218.7922		

Combine

$f=a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$

R = 0.99602975 Rsqr = 0.99207527 Adj Rsqr = 0.99085608
Standard Error of Estimate = 1.4978

	Coefficient	Std. Error	t	P
a	40.1330	1.0246	39.1707	<0.0001
b	17.3822	2.0257	8.5808	<0.0001
x0	174.3259	2.4192	72.0579	<0.0001

x = Tempo

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	3650.7660	1825.3830	813.7172	<0.0001
Residual	13	29.1624	2.2433		
Total	15	3679.9284	245.3286		

Dual Gold

$f=a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$

R = 0.99658929 Rsqr = 0.99319021 Adj Rsqr = 0.99214255
Standard Error of Estimate = 1.3983

	Coefficient	Std. Error	t	P
a	40.9507	0.9685	42.2845	<0.0001
b	18.2940	1.9223	9.5165	<0.0001
x0	176.2948	2.2872	77.0773	<0.0001

x = Tempo

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	3707.1206	1853.5603	948.0079	<0.0001
Residual	13	25.4178	1.9552		
Total	15	3732.5384	248.8359		

Fortex

$f=a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$

R = 0.99800174 Rsqr = 0.99600747 Adj Rsqr = 0.99539324
Standard Error of Estimate = 1.0306

	Coefficient	Std. Error	t	P
a	39.5071	0.7143	55.3073	<0.0001
b	18.5980	1.4800	12.5665	<0.0001
x0	175.8751	1.7666	99.5558	<0.0001

x = Tempo

Analysis of Variance:

DF	SS	MS	F	P
-----------	-----------	-----------	----------	----------

Regression	2	3444.2771	1722.1386	1621.5420	<0.0001
Residual	13	13.8065	1.0620		
Total	15	3458.0836	230.5389		

FUSILADE

$$f = a / (1 + \exp(-(x - x_0) / b))$$

R = 0.97398257 Rsqr = 0.94864205 Adj Rsqr = 0.94074083

Standard Error of Estimate = 3.3420

		Coefficient	Std. Error	t	P
a	39.4952	2.4490	16.1268	<0.0001	
b	31.5797	6.0692	5.2033	0.0002	
x ₀	166.6623	8.3120	20.0508	<0.0001	

x = Tempo

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	2681.8983	1340.9492	120.0627	<0.0001
Residual	13	145.1936	11.1687		
Total	15	2827.0920	188.4728		

MSMA

$$f = a / (1 + \exp(-(x - x_0) / b))$$

R = 0.9739636 Rsqr = 0.9486687 Adj Rsqr = 0.94674083

Standard Error of Estimate = 3.3420

		Coefficient	Std. Error	t	P
a	39.4952	2.4550	16.1258	<0.0001	
b	31.5797	6.0532	5.2433	0.0002	
x ₀	166.6433	8.3120	20.0208	<0.0001	

x = Tempo

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	2681.8983	1340.9492	120.0627	<0.0001
Residual	13	145.1936	11.1687		
Total	15	2827.0920	188.4728		

Trifluralina

$$f = a / (1 + \exp(-(x - x_0) / b))$$

R = 0.98325933 Rsqr = 0.96679891 Adj Rsqr = 0.96169105

Standard Error of Estimate = 3.0635

		Coefficient	Std. Error	t	P
a	42.6557	2.2012	18.9255	<0.0001	
b	21.2511	4.8647	4.5739	0.0005	
x ₀	180.3356	5.6652	32.3621	<0.0001	

x = Tempo

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	3552.6544	1776.3272	189.2767	<0.0001
Residual	13	122.0026	9.3848		
Total	15	3674.6570	244.9771		

ANEXO 3**Testemunha (controle sem herbicida)**

$$f = y_0 + a / (1 + \exp(-(x - x_0) / b))$$

R = 0.99588714 Rsqr = 0.99179120 Adj Rsqr = 0.98973900
Standard Error of Estimate = 1.4983

	Coefficient	Std. Error	t	P
a	38.8509	1.1901	32.6463	<0.0001
b	19.5650	2.4322	8.0443	<0.0001
x0	180.2877	2.7744	64.9833	<0.0001
y0	6.7826	0.4846	13.9950	<0.0001

x = Tempo

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	3	3254.9432	1084.9811	483.2821	<0.0001
Residual	12	26.9403	2.2450		
Total	15	3281.8835	218.7922		

Gliz

$f=y0+a/(1+\exp(-(x-x0)/b))$

R = 0.99990639 Rsqr = 0.99981280 Adj Rsqr = 0.99976599

Standard Error of Estimate = 0.1759

	Coefficient	Std. Error	t	P
a	33.5984	0.1639	205.0284	<0.0001
b	29.2486	0.5953	49.1330	<0.0001
x0	204.0310	0.5903	345.6225	<0.0001
y0	-0.1668	0.0634	-2.6331	0.0219

x = Tempo

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	3	1982.4754	660.8251	21363.0117	<0.0001
Residual	12	0.3712	0.0309		
Total	15	1982.8466	132.1898		

Roundup Original

$f=y0+a/(1+\exp(-(x-x0)/b))$

R = 0.99980343 Rsqr = 0.99960691 Adj Rsqr = 0.99950863

Standard Error of Estimate = 0.2775

	Coefficient	Std. Error	t	P
a	38.3089	0.2894	132.3956	<0.0001
b	32.5808	0.9359	34.8126	<0.0001
x0	220.9390	1.1209	197.1024	<0.0001
y0	0.1277	0.0984	1.2978	0.2187

x = Tempo

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	3	2350.6084	783.5361	10171.6688	<0.0001
Residual	12	0.9244	0.0770		
Total	15	2351.5328	156.7689		

Gramoxone

$f=y0+a/(1+\exp(-(x-x0)/b))$

R = 1.00000000 Rsqr = 1.00000000 Adj Rsqr = 1.00000000

Standard Error of Estimate = 0.0000

	Coefficient	Std. Error	t	P
a	13.9000	0.00002031199937.0597		<0.0001
b	5.0982	0.0829	61.5199	<0.0001
x0	312.9283	0.2107	1485.1731	<0.0001
y0	-0.0000	0.0000	-0.9287	0.3714

x = Tempo

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	3	180.3375	60.1125	(+inf)	(NAN)
Residual	12	0.0000	0.0000		
Total	15	180.3375	12.0225		

ANEXO 4

Testemunha (controle sem herbicida)

$$f=y_0+a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$$

R = 0.99588714 Rsqr = 0.99179120 Adj Rsqr = 0.98973900
Standard Error of Estimate = 1.4983

	Coefficient	Std. Error	t	P
a	38.8509	1.1901	32.6463	<0.0001
b	19.5650	2.4322	8.0443	<0.0001
x0	180.2877	2.7744	64.9833	<0.0001
y0	6.7826	0.4846	13.9950	<0.0001

x = Tempo

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	3	3254.9432	1084.9811	483.2821	<0.0001
Residual	12	26.9403	2.2450		
Total	15	3281.8835	218.7922		

Agimix

$f=y0+a/(1+\exp(-(x-x0)/b))$

R = 0.99238814 Rsqr = 0.98483422 Adj Rsqr = 0.98104277

Standard Error of Estimate = 2.1356

	Coefficient	Std. Error	t	P
a	39.7067	1.6644	23.8571	<0.0001
b	17.6943	3.1282	5.6564	0.0001
x0	176.5143	3.6217	48.7385	<0.0001
y0	0.2294	0.6819	0.3365	0.7423

x = Tempo

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	3	3554.0595	1184.6865	259.7517	<0.0001
Residual	12	54.7301	4.5608		
Total	15	3608.7896	240.5860		

Atranex

$f=y0+a/(1+\exp(-(x-x0)/b))$

R = 0.99723038 Rsqr = 0.99446843 Adj Rsqr = 0.99308554

Standard Error of Estimate = 1.2950

	Coefficient	Std. Error	t	P
a	40.0626	1.0080	39.7443	<0.0001
b	17.5216	1.8687	9.3766	<0.0001
x0	176.7840	2.1596	81.8601	<0.0001
y0	0.1332	0.4122	0.3232	0.7521

x = Tempo

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	3	3618.1030	1206.0343	719.1220	<0.0001
Residual	12	20.1251	1.6771		
Total	15	3638.2281	242.5485		

Herbitrin

$f=y0+a/(1+\exp(-(x-x0)/b))$

R = 0.99539666 Rsqr = 0.99081452 Adj Rsqr = 0.98851814

Standard Error of Estimate = 1.6793

	Coefficient	Std. Error	t	P
a	40.0728	1.3026	30.7628	<0.0001
b	17.3412	2.3958	7.2383	<0.0001
x0	175.8405	2.7777	63.3054	<0.0001
y0	0.6124	0.5344	1.1459	0.2742

x = Tempo

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	3	3650.3590	1216.7863	431.4697	<0.0001
Residual	12	33.8412	2.8201		
Total	15	3684.2002	245.6133		

Siptran

$f=y_0+a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$

R = 0.99417785 Rsqr = 0.98838959 Adj Rsqr = 0.98548698

Standard Error of Estimate = 1.7587

	Coefficient	Std. Error	t	P
a	39.7320	1.4492	27.4174	<0.0001
b	23.1063	3.3780	6.8403	<0.0001
x0	187.1595	3.6123	51.8111	<0.0001
y0	0.3155	0.5912	0.5335	0.6034

x = Tempo

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	3	3159.8621	1053.2874	340.5184	<0.0001
Residual	12	37.1183	3.0932		
Total	15	3196.9804	213.1320		

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)