

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CONTAMINAÇÃO POR HERBICIDAS EM CORPOS
HÍDRICOS DA MICROBACIA DO CÓRREGO RICO (SP) E
ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DE ATRAZINE A JUVENIS
DE *Piaractus mesopotamicus***

Edson Aparecido dos Santos
Engenheiro Agrônomo

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CONTAMINAÇÃO POR HERBICIDAS EM CORPOS
HÍDRICOS DA MICROBACIA DO CÓRREGO RICO (SP) E
ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DE ATRAZINE A JUVENIS
DE *Piaractus mesopotamicus***

Edson Aparecido dos Santos

**Orientador: Prof. Dr. Robinson Antonio Pitelli
Coorientadora: Profa. Dra. Núbia Maria Correia**

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor em Agronomia
(Produção Vegetal)**

2013

S237c Santos, Edson Aparecido dos
Contaminação por herbicidas em corpos hídricos da microbacia do Córrego Rico (SP) e aspectos toxicológicos de atrazine a juvenis de *Piaractus mesopotamicus* / Edson Aparecido dos Santos. – – Jaboticabal, 2013
iv, 83 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientador: Robinson Antonio Pitelli
Banca examinadora: Marcelo da Costa Ferreira, Julio Cezar Durigan, Edivaldo Domingues Velini, Lino Roberto Ferreira
Bibliografia

1. Acetilcolinesterase cerebral. 2. Gesaprim 500. 3. Pacu-toxicidade aguda. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 574.64:632.95.024

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CONTAMINAÇÃO POR HERBICIDAS EM CORPOS HÍDRICOS DA MICROBACIA DO CÔRREGO RICO (SP) E ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DE ATRAZINE A JUVENIS DE *Piaractus mesopotamicus*

AUTOR: EDSON APARECIDO DOS SANTOS

ORIENTADOR: Prof. Dr. ROBINSON ANTONIO PITELLI

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. NÚBIA MARIA CORREIA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ROBINSON ANTONIO PITELLI

Departamento de Biologia Aplicada À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. MARCELO DA COSTA FERREIRA

Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. JULIO CEZAR DURIGAN

Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. EDIVALDO DOMINGUES VELINI

Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. LINO ROBERTO FERREIRA

Departamento de Fitotecnia / Universidade Federal de Viçosa / Viçosa/MG

Data da realização: 03 de maio de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Edson Aparecido dos Santos – nasceu em 10 de junho de 1983, em São Paulo/SP, tornou-se Engenheiro Agrônomo em 2007 pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa/MG e pela mesma instituição, concluiu o Mestrado em Fitotecnia em 2009. Durante os anos de iniciação científica, na graduação, e de mestrado, desenvolveu trabalhos nas áreas de biologia e ecologia de plantas daninhas; integração lavoura/pecuária; eficiência de herbicidas nas culturas de cana-de-açúcar, soja, feijão e milho; fitorremediação de áreas tratadas com herbicidas; relações entre plantas daninhas e microrganismos edáficos e impacto ambiental do uso de herbicidas; além disso, obteve experiência acadêmica e didática por meio de estágios e monitorias de apoio às disciplinas FIT 320 e FIT 620 (Biologia e Controle de Plantas Daninhas) que compõem cursos de graduação e pós-graduação da UFV. Obteve experiência profissional em trabalhos de produção de sementes de milho e soja e consultoria empresarial agrícola (2008 – 2010). Finalmente, no doutorado, deu continuidade aos estudos sobre contaminação de ambientes por herbicidas, em especial aqueles utilizados em cana-de-açúcar, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP -, Câmpus Jaboticabal/SP. E graças ao apoio dessa instituição e da CAPES, em 2012, desenvolveu trabalhos relacionados à avaliação da eficiência de herbicida em ambiente aquático, na Universidade da Florida, em Gainesville, FL, EUA.

“O que deve caracterizar a juventude é a modéstia, o pudor, o amor, a moderação, a dedicação, a diligência, a justiça e a educação. São essas as virtudes que devem formar o seu caráter.”

Sócrates

À minha Mãe Maria Marta e ao meu Pai Sebastião, por me ensinarem o valor do que é ser uma pessoa de boa fé, por serem juntos amor, amizade, carinho e acolhimento, por serem também exemplos de humildade e caráter e mostrarem que trabalho e honestidade, somados, completam qualquer pessoa.

Dedico.

Certamente, assim como outras, mais essa etapa da minha vida não seria tão gratificante e digna não fossem vocês, meus queridos irmãos, José Barbosa, Gorete, Arnaldo, Maria, Inês, José Carlos e Elizângela.

Obrigado!!!

AGRADECIMENTOS

Todas as nossas tarefas são melhor realizadas quando são frutos de um trabalho conjunto, que envolve a força de cada ente, que seja pequena ou grande, mas exclusivamente, que seja! Por isso, gostaria de dizer MUITO OBRIGADO...

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, que por meio de seus professores e colaboradores, me recebeu de braços abertos e me apoiou todo o período do doutorado;

À CAPES, pela concessão de bolsa para desenvolvimento dos trabalhos;

Aos Professores Julio Cezar Durigan, Núbia Maria Correia e Robinson Antonio Pitelli, pela exemplar ORIENTAÇÃO de doutorado, pelos conselhos extra acadêmicos e por todo o conhecimento transmitido;

Ao Professor Dr. Edivaldo Domingues Velini, pela brilhante coorientação no desenvolvimento dos trabalhos e pela disponibilidade do NUPAM, na UNESP/Botucatu, para realização das análises;

Ao Químico José Roberto Marques Silva, da UNESP/Botucatu, pelo excelente e fundamental trabalho nas análises cromatográficas;

À professora Dra. Teresa Cristina Tarlé Pissarra e à doutoranda Beatriz Oliveira Costa, pela amigável e muito gentil ajuda na confecção dos mapas da microbacia do Córrego Rico;

Ao professor Dr. Claudinei da Cruz e à doutoranda Patrícia Carraschi, pelo dom de ensinar e pelo brilhante auxílio no desenvolvimento dos trabalhos realizados no NEPEAM;

Aos professores Doutores Pedro Luis da Costa Aguiar Alves e Joaquim Gonçalves Machado Neto, pelos conselhos técnicos na redação e apresentação dos resultados;

À Coordenadoria de Assistência Técnica Regional – CATI – de Jaboticabal, que, por meio de seus excelentes colaboradores, Vera Lúcia Palla, Scheilla Bolonhezi Verdade e Antônio Roberto Lopes, auxiliou nos trabalhos de

viagens, levantamento de informações e coletas de água nas propriedades da microbacia do Córrego Rico;

Aos amigos da Fitossanidade, Gilson Leite, Dionísio Figueiredo e Jurandir de Oliveira, que sempre apresentaram grande disposição e eficiência no auxílio aos trabalhos, além de terem contribuído muito para o desenvolvimento de meu conhecimento durante o doutorado;

À parte do grande grupo NEPEAM: Adilson, Alfredo, Aline, Ana Cristina, Cynthia, Joani, Lê, Luis, Natália, Nathália, Neto, Roberto, Ronaldo e Taíse, que foram sempre prestativos e também contribuíram para o desenvolvimento de meu aprendizado na UNESP;

À minha mãe em Jaboticabal, Dona Teresa, e aos meus queridos amigos de república, Claudio Roselli, Daniel Jordan, Marcos Buzanskas, Ismael Urbinati e Thiago Bruno, que sempre me fizeram rir nos tombos e provaram que não precisamos ter laços genéticos para formarmos uma família.

Finalmente, a todos aqueles que de alguma forma auxiliaram nessa importante fase da minha vida.

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Contaminação de corpos de água por herbicidas utilizados em cana-de-açúcar	04
2.2. Toxicidade de herbicidas a peixes	08
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Qualificação e quantificação de resíduos de herbicidas, em corpos de água de uma microbacia hidrográfica ocupada por canaviais	13
3.1.1. Caracterização da área de avaliação	13
3.1.2. Caracterização dos pontos e coletas de água	15
3.1.3. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas	19
3.2. Toxicidade e risco ambiental do herbicida atrazine para juvenis de Pacu	24
3.2.1. Ensaio de toxicidade aguda	24
3.2.2. Ensaio de toxicidade crônica	26
3.2.3. Risco ambiental do herbicida atrazine para juvenis de Pacu	27
3.3. Bioindicadores da toxicidade de atrazine em juvenis de Pacu	28
3.3.1. Análises histopatológicas de brânquias e fígado	28
3.3.2. Atividade da acetilcolinesterase cerebral	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Resíduos de herbicidas em corpos de água de uma microbacia hidrográfica ocupada por canaviais	30
4.2. Toxicidade e risco ambiental do atrazine para juvenis de Pacu	49

4.3. Análises histopatológicas de brânquias e fígado de juvenis de Pacu expostos ao atrazine	57
4.4. Atividade da acetilcolinesterase cerebral em juvenis de Pacu submetidos a concentrações letais e subletais de atrazine	62
5. CONCLUSÕES	64
6. REFERÊNCIAS	65
ANEXOS	77

CONTAMINAÇÃO POR HERBICIDAS EM CORPOS HÍDRICOS DA MICROBACIA DO CÓRREGO RICO (SP) E ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DE ATRAZINE A JUVENIS DE *Piaractus mesopotamicus*

RESUMO – Objetivou-se, com os trabalhos, verificar a contaminação de amostras de água de chuvas, córregos, nascentes, poços artesianos e lagoas, por herbicidas, na microbacia hidrográfica do Córrego Rico, SP. Adicionalmente, após seleção de um dos mais importantes herbicidas, realizar testes toxicológicos utilizando-se de juvenis de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), com o objetivo de determinar a toxicidade letal média (CL50:48h) e verificar os efeitos do herbicida em ensaio crônico, o que possibilitou calcular também o risco ambiental do herbicida. Além disso, buscou-se avaliar os efeitos do herbicida, em concentrações letais e subletais, em cortes histopatológicos em órgãos dos peixes e na atividade da enzima acetilcolinesterase no cérebro. Foram coletadas amostras de água, em três épocas, na microbacia, e as mesmas foram submetidas à análise de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas. Foram avaliados os herbicidas ametryn, amicarbazone, atrazine, clomazone, diclosulan, diuron, hexazinone, imazapic, imazapyr, isoxaflutole, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone, sulfometuron-methyl e tebuthiuron. Para determinação da CL50:48h aos peixes, foi selecionado o herbicida atrazine e o ensaio foi de 48 horas, onde avaliaram-se também o comportamento e os sintomas de intoxicação em exposição a 15, 20, 25, 35 e 45 mg L⁻¹. No ensaio crônico, os peixes foram expostos por sete dias, em concentrações de 0,265; 0,530; 2,65 e 5,29 mg L⁻¹, onde também foram avaliados o comportamento e os sintomas de intoxicação. Para avaliação do atrazine, nas concentrações supracitadas, em brânquias e fígado, os tecidos foram submetidos à técnica de coloração com hematoxilina-eosina e ácido periódico de Schiff, finalmente, para avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase no cérebro de peixes utilizados no ensaio de toxicidade aguda, o órgão foi coletado imediatamente após finalização do teste, e a atividade da enzima foi expressa por meio da verificação de hidrólise da acetiltiocolina 37 mM em 412 nm. Observou-se que 87,6% das amostras possuem pelo menos um herbicida como contaminante e córregos têm maiores frequência e concentrações de herbicidas. Ametryn, atrazine, clomazone, hexazinone, s-metolachlor, sulfentrazone e tebuthiuron foram detectados independente da matriz, no entanto, amicarbazone, diclosulan, diuron, imazapic, imazapyr, isoxaflutole e pendimethalin também foram detectados. A CL50:48h do atrazine a juvenis de Pacu foi de 26,46 mg L⁻¹ e esse herbicida provoca prolapso labial, hemorragia bucal e mudanças no equilíbrio dos peixes como sintomas mais importantes. Em exposição crônica, não houve mortalidade. O atrazine é classificado como de baixo risco e com nenhum efeito adverso. Os órgãos de juvenis de Pacu apresentam sintomas de intoxicação pelo atrazine, tais como mudanças no epitélio interlamelar nas brânquias e desarranjos celulares no fígado, como sintomas mais importantes. O herbicida também aumenta a atividade da acetilcolinesterase em cérebro de peixes, expostos por 48 horas, em concentrações até 35 mg L⁻¹.

Palavras-chave: acetilcolinesterase cerebral, contaminação ambiental, gesaprim 500, histopatologia, Pacu, toxicidade aguda

HERBICIDES AS CONTAMINANTS IN WATER BODIES IN A WATERSHED FROM CÓRREGO RICO (SP) AND TOXICOLOGICAL ASPECTS OF ATRAZINE TO JUVENILES OF *Piaractus mesopotamicus*

ABSTRACT - The study aimed to verify the water contamination of rains, streams, springs, wells and ponds, by herbicides, in a watershed in Córrego Rico, SP, Brazil. One of the most important herbicides was selected to do toxicological tests using *Piaractus mesopotamicus* juveniles. The effects of the herbicide on fish behavior in acute and chronic tests were also evaluated prior to calculate the environmental risk of the herbicide. The herbicide effects in the gills and liver of the fish were measured in addition to the determination of its effect on acetylcholinesterase activity in fish brain. The water samples were collected in three periods of the year and were evaluated by High-performance Liquid Chromatography combined with Mass Spectrometry (LC-MS/MS). The evaluated herbicides were: ametryn, amicarbazone, atrazine, clomazone, diclosulan, diuron, hexazinone, imazapic, imazapyr, isoxaflutole, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone, sulfometuron-methyl and tebuthiuron. The most important herbicide detected was atrazine. In order to evaluate acute toxicity (CL50;48h), the fishes were exposed for 48 hours and to the chronic test during seven days. In the acute test were used 15, 20, 25, 35 and 45 mg L⁻¹, and to chronic test were used 0.265; 0.530; 2.65 e 5.29 mg L⁻¹. To determine the environmental risk, were used CL50;48h, predicted environmental concentration and the highest dose of atrazine found in the water samples. Furthermore, the gills and liver of the fish were submitted to staining with hematoxylin-eosin and periodic acid-Schiff to evaluate the acetylcholinesterase activity in the fishes' brain. The organ was collected immediately after completion of the test, and the enzyme activity was expressed by checking the hydrolysis of acetylthiocholine 37 mM in 412 nm. As results, it was observed that 87.6 % of all water samples have at least one herbicide as contaminant; in addition, streams have a higher frequency and values of herbicide concentrations. The herbicides ametryn, atrazine, clomazone, hexazinone, s-metolachlor, sulfentrazone and tebuthiuron were detected in rain, streams, springs, wells and ponds; however, amicarbazone, diclosulan, diuron, imazapic, imazapyr, isoxaflutole and pendimethalin were also detected due to the collection matrix. It weren't detected sulfometuron-methyl and diquetonitrila. The median lethal toxicity of atrazine to Pacu was 26.46 mg L⁻¹ and there was no mortality in chronic test. The fishes changed the behavior and there were changes in the fish body as effect of atrazine, especially in the skin color and in the mouth. Atrazine is classified as low risk and with no adverse effects to juvenile Pacu. Finally, changes in interlamellar gill epithelium and cellular derangements in the liver were the most important symptoms after poisoning by atrazine. The herbicide also increases the activity of acetylcholinesterase in the brain of fish exposed for 48 hours at concentrations up to 35 mg L⁻¹.

Key-words: brain acetylcholinesterase, environmental contamination, gesaprim 500, histopathology, Pacu, acute toxicity

1. INTRODUÇÃO

Em função de avanços na saúde, educação, indústria, infraestrutura e melhores condições sociais em geral, a humanidade vem evoluindo de forma progressiva nas últimas décadas e, a demanda crescente e irreversível da população por alimentos, energia, fibras e matérias-primas, faz com que a Agricultura tenha papel fundamental em todas as relações e degraus da sociedade. Nesse sentido, o Brasil se destaca no cenário mundial, não apenas pela quantidade de alimentos produzida, mas também, devido à variedade e qualidade dos produtos e outras características que o direcionam como o principal produtor agrícola nos próximos anos.

Uma das principais características da agricultura convencional é a grande dependência de insumos, principalmente produtos fitossanitários, que têm seu uso diretamente relacionado a maiores produções. O Brasil é o maior consumidor desses produtos atualmente e, um dos pontos a se melhorar, diz respeito aos crescentes relatos de detecção de resíduos em alimentos, animais e no meio ambiente em geral.

Esses produtos agrícolas são aplicados nos campos com o objetivo de controlar pragas, doenças e plantas daninhas, evitando que essas diminuam o potencial produtivo das culturas, são também utilizados para facilitar a colheita, prolongar a vida de prateleira dos produtos colhidos etc. Destaca-se também que os produtos fitossanitários são ferramentas utilizadas pelo homem, para atividades não agrícolas, como produção de energia elétrica ou transportes, dentre outras.

Portanto, há dois lados a se considerar: produção agrícola com oferta, de acordo com a demanda mundial, e segurança aos recursos naturais. O que remete à obrigatoriedade dos sistemas agrícolas em produzirem com sustentabilidade ambiental. Por isso, recentes avanços são relatados como: a criação de comitês de proteção ao meio ambiente, melhorias em leis de produção agrícola e utilização de produtos fitossanitários, possibilidade de utilização de variedades modificadas geneticamente, políticas internacionais de comércio de produtos agropecuários etc.

Porém, em função do grande número de produtos, da variabilidade de sistemas de produção, culturas, regiões agrícolas, condições ambientais e educação no campo, são necessários estudos mais completos, no Brasil, a respeito de

informações relacionadas a perdas de produtos fitossanitários, possíveis contaminações e consequências ambientais. Muitas vezes, a utilização de informações científicas de outros países pode ser interpretada ou adaptada de forma equivocada.

Em se tratando de perdas de produtos fitossanitários para o meio ambiente, dois fatores têm recebido maior destaque, são eles o uso de herbicidas e os corpos hídricos. O destaque é maior principalmente em países que têm a agricultura desenvolvida há mais tempo e, graças a programas de monitoramento de corpos de água, é possível a determinação periódica da concentração de um herbicida no ambiente aquático e conseqüentemente a tomada de decisão sobre estratégias para diminuir as perdas durante o manejo agrícola e mitigar possíveis efeitos negativos.

Dessa forma, países europeus, os Estados Unidos da América, o Canadá, dentre outros, possuem legislação que regulamenta a concentração máxima de resíduo de determinado herbicida em um corpo de água e, ancorados em diversos testes toxicológicos, com organismos representativos, tem-se a extrapolação de um possível dano negativo à saúde humana ou ao ambiente como um todo, o que permite aos órgãos competentes, gerirem o uso dos produtos na agricultura.

Por outro lado, o Brasil, apesar da importância agrícola no mundo, não possui um programa oficial de monitoramento da contaminação de corpos de água por herbicidas, adicionalmente, a heterogeneidade de agrossistemas e a evolução recente da agricultura são fatores que remetem à forte tendência de contaminação de águas superficiais, subsuperficiais e subterrâneas pelos produtos, e muitas vezes, quando um herbicida é identificado como contaminante em águas, é provável que outros compartimentos já o contenham.

Em se tratando de agrossistemas, o Brasil é o principal produtor de cana-de-açúcar. Cultura que se caracteriza pela ocupação de grandes áreas e utilização intensiva de herbicidas, principalmente no sudeste e centro oeste do país. Além disso, o cultivo em áreas não indicadas e a falta de critério, muitas vezes, aceleram a chegada dos herbicidas na água, em regiões onde se pratica a cultura, mas, atualmente, informações sobre este tipo de contaminação são escassas no Brasil.

Uma vez no ambiente aquático, os herbicidas são ameaças à fauna e flora do agrossistema, em caso de utilização da água para abastecimento de cidades ou

casas rurais, o residual do produto ainda oferece risco ao homem de forma direta. Por esses motivos, os peixes, como topo da cadeia alimentar no ambiente aquático, são utilizados na padronização de modelos toxicológicos internacionais e, somando-se ao conhecimento biológico dos organismos, testes são desenvolvidos, inclusive em processos de registro de um produto comercial. Porém, os animais utilizados oficialmente não ocorrem naturalmente nos agrossistemas brasileiros.

Portanto, diante da periculosidade dos herbicidas ao ambiente aquático, existem protocolos internacionalmente conhecidos para a avaliação dos possíveis danos ao ecossistema. Destacam-se os testes de toxicidade aguda, que são utilizados para avaliação da letalidade em curto período de tempo, e determinação da concentração letal média. A partir disso, podem-se efetuar testes de toxicidade crônica, onde os peixes são submetidos ao contaminante em concentrações subletais, sendo possível avaliar os danos no crescimento, na reprodução, na fisiologia, em órgãos ou no comportamento.

Adicionalmente, a partir dos valores de concentração ambiental do herbicida e dos dados gerados no teste de toxicidade aguda, é possível o cálculo do risco ambiental. Goktepe, Portier e Ahmedna (2004) destacam que a avaliação do risco ambiental permite orientar ações de tomada de decisão sobre estimativas de riscos adversos de produtos fitossanitários ao ambiente.

Outra análise complementar diz respeito à determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase nos animais. Finalmente, a reunião do maior número de informações possíveis sobre os efeitos negativos de um herbicida, em um organismo modelo, representante do agrossistema, é etapa fundamental para a determinação do potencial de risco negativo ao ambiente.

Dessa forma, objetivou-se com os trabalhos:

i: identificar e quantificar resíduos de herbicidas, em amostras de água de chuvas, córregos, lagoas, nascentes e de poços artesianos, pertencentes a uma microbacia hidrográfica representante de região com cultivo de cana-de-açúcar;

ii: avaliar a toxicidade do herbicida atrazine para juvenis de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), por meio da determinação das toxicidades aguda e crônica;

iii: calcular o risco ambiental do herbicida atrazine para juvenis de Pacu;

iv: avaliar alterações histológicas nas brânquias e fígado, e a atividade da enzima acetilcolinesterase em cérebro de juvenis de Pacu submetidos ao herbicida atrazine, utilizando-se de concentrações letais e subletais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Contaminação de corpos de água por herbicidas utilizados em cana-de-açúcar

A agricultura brasileira é destaque no cenário mundial, não apenas pela quantidade de alimentos produzida mas também, devido à variedade e qualidade dos produtos. Atualmente o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar, laranja e frutas tropicais em geral, café, carne bovina e acaba de conseguir o título de maior produtor de biodiesel. O país se destaca em diversas outras atividades agrícolas e tem o agronegócio crescente ano após ano, o que o classificará como maior produtor de alimentos nos próximos anos (FAO, 2013).

Por trás de tamanha supremacia em agronegócio, podem se citar diversos fatores: tradicionalismo agrícola, grandes áreas com características agrônômicas favoráveis, clima, água para irrigação, dentre outros. Somando-se esses fatores à crescente industrialização do segmento, nota-se intensivo investimento no setor. A indústria do agronegócio investe cerca de U\$ 7 bilhões anualmente apenas em produtos fitossanitários, o que possibilita a aplicação de mais de 800 mil toneladas desses produtos (SINDAG, 2012; CONAB, 2013). E, dentre eles, maior destaque é dado à classe dos herbicidas, que representam até 60% do volume de produtos e até 30% dos custos de produção (SILVA et al., 2007).

Uma das principais *commodities* agrícolas do Brasil é a cana-de-açúcar. Atualmente, o país produz aproximadamente 45% do volume mundial, possui a maior área cultivada e lidera as exportações no setor sucroalcooleiro. Na safra 2011/2012 foram moídas cerca de 570 milhões de toneladas e a previsão para a próxima é que 600 milhões de toneladas sejam moídas. As áreas de produção de cana continuam aumentando, principalmente no sudeste e centro-oeste (CONAB, 2013; FAO, 2013).

Quanto aos tratos culturais, o cultivo de cana-de-açúcar se baseia em intensivo preparo do solo, utilização de maquinário pesado e aplicação maciça de insumos, principalmente de herbicidas. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2013) são registrados, para uso nos canaviais, 229 herbicidas formulados, com a aplicação aproximada de $4,0 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ (FRANCONERE, 2010). Esse fato remete à preocupação quanto às perdas dos produtos para o meio ambiente e a possibilidade de contaminações e de ineficácia (ARMAS et al., 2007).

Mais de 70% dos herbicidas registrados para o cultivo da cana-de-açúcar possuem ação residual no solo (RODRIGUES e ALMEIDA, 2011). Fato que classifica a cultura como a que apresenta maior potencial de risco de contaminação de ambientes por resíduos de herbicidas (LASKOWSKI et al., 1982; GUSTAFSON, 1989). Isso ocorre porque os herbicidas residuais inibem a germinação e a emergência das plantas daninhas por vários meses após a sua aplicação. Porém, a presença do produto, na forma original, no solo por longo período de tempo, o predispõe a perdas por lixiviação, volatilização, erosão eólica e carregamentos pela água da chuva. Principalmente em função do manejo da área e características edafoclimáticas (INOUE et al., 2011).

De acordo com a área de cana-de-açúcar no Brasil atualmente, estimada em 8,4 milhões de hectares (CONAB, 2013), e do volume de herbicidas aplicados, calcula-se que 33,6 milhões de quilos de herbicidas sejam lançados nos campos anualmente. Considerando ainda que fatores como volatilização, escoamento superficial, lixiviação e fluxo preferencial promovem, juntos, perdas de 2 a 90% (TAYLOR, 1995; FLURY, 1996 e VICARY, ROSSI PISA e CATIONE, 1999), acredita-se que ano após ano a concentração de herbicidas no ambiente aquático aumente consideravelmente.

Conforme relatado por Armas et al. (2007), que seguiram à qualificação e quantificação de triazinas (ametryn, atrazine e simazine), hexazinone, glyphosate e clomazone em águas subsuperficiais e sedimentos do rio Corumbataí, estado de São Paulo, região com intensivo cultivo de cana-de-açúcar. Além da detecção dos herbicidas nos corpos de água, os autores relataram elevada concentração de atrazine, considerando potencial de toxicidade a diversos organismos que habitam a

bacia em questão, e, por meio da quantificação, alertaram sobre níveis desse produto, acima do padrão permitido oficialmente no Brasil.

A avaliação pontual de contaminação de um corpo de água por um herbicida é apenas um indicador de danos ao ecossistema. Tal fato se deve à dinâmica de fatores no ambiente e assim, consideram-se pouco conhecidos os impactos de moléculas de agroquímicos nos estudos realizados até o momento (QUEIROZ et al., 2009). No caso especial de contaminação de águas subterrâneas, quando algum dano negativo é percebido, os efeitos já atingiram larga escala (CUSTODIO e LLAMAS, 1996), sendo portanto, subestimados nos sistemas. Porém, em diversos trabalhos são relatadas concentrações preocupantes de moléculas de herbicidas em ambientes aquáticos.

Gomes et al. (2006), objetivando avaliar a movimentação do herbicida tebutiuron em função de dois tipos de solos, como possível contaminação de área de recarga do aquífero Guarani, destacam a importância do carbono orgânico do solo como barreira à movimentação do herbicida e salientam a necessidade de estudos sobre destino de herbicidas no perfil do solo, em especial nos solos arenosos cultivados com cana-de-açúcar. De fato, as propriedades físico-químicas do solo, bem como dos herbicidas, norteiam seu comportamento no ambiente e sua dinâmica.

Spadotto (2002) destaca que os processos de adsorção, absorção, decomposição, degradação, deriva, volatilização, lixiviação, escoamento superficial e principalmente, as interações desses processos, influenciam a fugacidade e tornam muito complexo o estudo de moléculas no ambiente. Além disso, o autor ressalva para a variedade de estruturas e propriedades das substâncias químicas, que se somando a condições meteorológicas, composição das populações de microrganismos no solo, presença ou ausência de plantas, localização do solo na topografia e práticas de manejo dificultam o monitoramento e determinação de toxicidade dos produtos lançados.

Assim, características intrínsecas de cada região determinam a dinâmica dos produtos utilizados, e na maioria das vezes, o destino final dos compostos é o recurso hídrico (ARIAS et al., 2007). Que no Brasil, é protegido pela Lei Federal 9.433, de oito de janeiro de 1997, que institui a Política Nacional de Recursos

Hídricos e que adota, como unidade principal de estudo entre a rede de drenagem e as populações locais, a microbacia.

A microbacia é, portanto, uma unidade que requer total atenção nos estudos com objetivo de se avaliar movimentações de resíduos de herbicidas no ambiente, principalmente se ocorre fornecimento de água tratada a cidades (TUNDISI, 2008). A resolução CONAMA nº 357/05 dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, estabelecendo condições para lançamento de efluentes e padrões de qualidade das águas com limites de níveis para diversas substâncias. Mesmo assim, uma gama de moléculas não é englobada pela resolução, o que contempla a maioria dos herbicidas utilizados em cana-de-açúcar (RODRIGUES e ALMEIDA, 2011).

Devido à utilização intensiva de herbicidas, manejo de solo, declividade do terreno, tipo de solo, dentre outros, a atividade canavieira em microbacias promove o acúmulo de herbicidas em águas de diferentes profundidades (LAINI et al., 2012). Tal fato é evidenciado em trabalho realizado por Belluck et al. (1991), que, objetivando avaliar a qualidade de águas de poços residenciais, com diferentes profundidades, nos Estados Unidos, constataram a presença do herbicida atrazine, em quantidades acima do permitido pelo ministério da saúde daquele país.

Além da avaliação dos herbicidas presentes em água nas microbacias, destaca-se também a capacidade das moléculas ficarem retidas em sedimentos de rios, lagoas ou córregos, constituindo-se como acúmulo e conseqüentemente potenciais contaminantes após distúrbios diversos (PINHO et al., 2006). Neste sentido, Jacomini (2006), objetivando avaliar a presença do herbicida ametryn em sedimentos de quatro rios representantes de bacias do estado de São Paulo, detectaram o herbicida em todas as avaliações.

Em função do grande número de herbicidas aplicados nos canaviais e alto custo para análises em águas de microbacias (ARMAS et al., 2005), a escolha da molécula a ser avaliada é feita considerando características dos produtos, como índice GUS (GUSTAFSON, 1989) e LEACH (LASKOWSKI et al., 1982), também, informações sobre produtos empregados auxiliam nesta definição, por meio de entrevistas a produtores ou cooperativas de estoques e vendas (ARMAS et al., 2005).

Em relação aos índices, para o GUS, que avalia o risco do herbicida a águas subterrâneas, são utilizados como parâmetros o coeficiente de adsorção ao carbono orgânico do solo (K_{oc}) e a meia vida dos herbicidas ($t_{1/2}$). De tal forma que valores de GUS, menores ou iguais a 1,8, indicam que o herbicida é não lixiviável, valores entre 1,8 e 2,8 formam uma faixa de transição, e finalmente, valores acima de 2,8 classificam os produtos como lixiviáveis (GUSTAFSON, 1989). De forma complementar, o índice LEACH, que descreve também a possibilidade de contaminação de águas superficiais, é calculado utilizando-se do K_{oc} , da $t_{1/2}$, da solubilidade em água (SA) e da pressão de vapor (PV) dos produtos. E para avaliação, quanto maior o valor LEACH, maior a probabilidade de lixiviação (LASKOWSKI et al., 1982).

Outro fator determinante é a pluviosidade do local, as chuvas são responsáveis por carrear o produto nos sentidos vertical e horizontal do solo, em direção a reservatórios ou rios. A precipitação também condensa moléculas de herbicidas suspensas no ar retornando-as para o solo ou depositando-as em lagos, como foi relatado por Goolsby et al. (1997). Esses autores constataram que 0,6% de atrazine e 0,4% de alachlor, aplicados na cultura do milho, foram encontrados em chuvas distantes do local de aplicação.

Portanto, em função da grande variabilidade de condições ambientais e do alto número de moléculas aplicadas, a verificação da contaminação de corpos de água por herbicidas utilizados em uma microbacia hidrográfica ocupada por cana-de-açúcar, é passo fundamental para a tomada de decisão no sentido de melhor gerenciamento das aplicações de herbicidas e proteção ao agrossistema cana-de-açúcar.

2.2. Toxicidade de herbicidas a peixes

A avaliação da qualidade de águas é uma tarefa complexa e muito relativa às condições da bacia hidrográfica em questão (WOOTTON, 1990). Além da avaliação direta da concentração de determinado contaminante, monitoram-se parâmetros físico-químicos como turbidez, concentração de oxigênio dissolvido, salinidade, condutividade, pH e temperatura. Porém, esses indicadores são eficientes em se tratando de potabilidade na eminência do consumo humano. Dessa forma, fatores

de importância biológica em nível de agrossistema devem também ser priorizados, principalmente se tratando da origem do contaminante. E, para isso, a utilização de peixes como bioindicadores é muito recomendada (SMITH; BARRELA e CETRA, 1997).

Considerando ainda, a nocividade dos herbicidas à vida aquática, para obtenção de registro e legalização do uso de determinado produto comercial, diversos testes toxicológicos são realizados, utilizando-se de outros modelos biológicos. São realizados testes em organismos não alvo, tais como microrganismos do solo, abelhas, microcrustáceos, dentre outros.

Os peixes, por serem muitas vezes o topo da cadeia alimentar no ambiente aquático (ADAMS, 2002), utilizados para alimentação humana, apresentarem facilidade para manejo e criação em cativeiro, fácil acesso e multiplicação, dentre outras características, têm sido utilizados em diversos testes de toxicidade a fim de se estabelecer limites permissíveis para vários herbicidas. Destaca-se que estes animais são sensíveis à presença de xenobióticos na água e apresentam, como resposta, mudanças em nível celular e tecidual, fato que pode ocorrer até mesmo antes de uma mudança comportamental. Os testes são utilizados também para identificar, letalidade, mutagênese, carcinogênese e efeitos fisiológicos diversos (BAUDO, 1987).

Oficialmente, para registro de herbicidas, são utilizados os peixes *Danio rerio* e *Pimephales promelas* no Brasil. Animais que são facilmente adquiridos e manejados e têm o comportamento, a fisiologia e características genéticas bem conhecidos, porém, segundo Rand e Petrocelli (1985), outra características de suma importância nestes testes diz respeito à origem das espécies. Ou seja, busca-se estudar o impacto do herbicida em animais que fazem parte do agrossistema em questão, naturalmente (LACHER e GOLDSTEIN, 1997).

Neste sentido, cita-se o Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, (Characidae: Serrasalminae, Holmberg, 1887), peixe nativo e endêmico da bacia da prata, onde mais de 60% da área com cana-de-açúcar do Brasil se insere (ROCHA, 1997). Este exemplar de teleósteo (peixes ósseos), como nativo, é a segunda espécie mais cultivada no Brasil (IBAMA, 2008) e é indicado para sistema intensivo de criação

(SILVA, 1985), principalmente por apresentar facilidades na reprodução de alevinos e no manejo.

A espécie é indicada em testes na avaliação da toxicidade de produtos fitossanitários, pois, de acordo com órgãos ambientais do Brasil (IBAMA, 1987 e CETESB, 1999), são recomendados como organismos-teste, peixes pertencentes à família Characidae. Apesar da rusticidade e capacidade de adaptação do Pacu, sua população natural está em processo de redução em função da ação antrópica (LOPERA-BARRERO et al., 2008).

Bertoletti (2009) relata que os peixes exóticos, utilizados em testes oficiais, apresentam sensibilidade diferenciada a contaminantes em relação a organismos nativos, e são poucos publicados no Brasil estudos sobre a toxicidade de xenobióticos a peixes nativos. Por esse motivo, Albinati et al. (2007) relatam que a toxicidade aguda do glyphosate a juvenis de *Leporinus macrocephalus*, peixe nativo, é de 15,8 mg L⁻¹. Estes autores ainda destacam que a exposição a glyphosate, por 96 horas, em concentração de 6,67 mg L⁻¹, causa alterações hepáticas nos peixes.

Apesar de peixes nativos não serem utilizados em testes para registro de herbicidas aplicados em canaviais, a legislação brasileira, por meio da resolução CONAMA, n. 357 de 2005, indica a realização de testes toxicológicos, com herbicidas importantes, em diversos organismos não alvo. Isso ocorre também porque a resolução, que limita a concentração de produtos fitossanitários contaminantes em água, não diz respeito à maioria dos herbicidas utilizados em cana-de-açúcar.

Neste sentido, Nakagome, Noldim e Resgalla (2007), avaliando a toxicidade aguda dos herbicidas (utilizados em cana-de-açúcar) 2,4-D e clomazone, ao peixe *Danio rerio*, verificaram que o segundo produto é aproximadamente 16 vezes mais tóxico que o primeiro. Mesmo assim, os produtos comerciais do 2,4-D e do clomazone são classificados como extremamente tóxico e moderadamente tóxico respectivamente, finalmente, a resolução não diz respeito à concentração máxima permitida para o clomazone em corpos de água. Ressalta-se, portanto, a necessidade de utilização de outros modelos biológicos nos testes e a verificação da toxicidade de outros herbicidas.

A respeito dos ensaios utilizados para avaliação da toxicidade de um herbicida a peixes, de acordo com Heath (1995), deve-se iniciar com a determinação da toxicidade aguda (CL50), em ensaios de 24 a 96 horas. O que permite a identificação da concentração letal média, além disso, concentrações do herbicida, abaixo do valor de CL50, são consideradas subletais, mas também são importantes em diversas outras alterações biológicas nos peixes. Tomita e Beiruth (2002) destacam ainda que os testes de toxicidade aguda são experimentos de curta duração que proporcionam rápidas respostas em estudos sobre efeitos tóxicos letais.

Porém, diante de concentrações subletais de contaminantes na água, os peixes apresentam mudanças comportamentais ou fisiológicas, nesse sentido, torna-se necessário a avaliação da toxicidade crônica, onde os animais são expostos aos contaminantes, por uma fase do ciclo de vida, o que pode ser de sete dias a meses (LOMBARDI, 2004).

Para Albinati et al. (2009), a exposição a 10% da concentração letal média de glyphosate, ao *Leporinus macrocephalus*, peixe nativo e criado comercialmente no Brasil, provocou efeitos negativos no fígado e nas brânquias dos animais. Os autores ainda destacam que a maior parte dos danos histopatológicos é mais intensa até 14 dias em relação ao período entre 14 e 28 dias de exposição.

A toxicidade crônica ou subletal é inclusive mais comum em um ambiente aquático em relação à aguda, o que pode acarretar em mudanças morfológicas e funcionais nos órgãos dos peixes, como relatado por Rand e Petrocelli (1985). Esses autores mostraram que fêmeas de *Pimephales promelas* produzem apenas 17% de ovos viáveis, quando submetidas a concentrações subletais de produtos fitossanitários, em relação a um grupo controle. De acordo com os mesmos autores, os efeitos negativos são similares para *Pecilia reticulata* e *Brachydanio rerio*.

Um importante órgão, com funções na respiração dos peixes, é o conjunto branquial, que formado em arcos, promove as trocas gasosas e aquisição de oxigênio pelos animais por meio da filtragem da água. As lamelas ficam em contato constante com o poluente e um possível efeito negativo pode ser maximizado em função da grande superfície específica (POLEKSIC e MITROVIC-TUTUNDŽIC, 1994). Jiraungkoorskul et al. (2002) destacam que o herbicida glyphosate, em doses

subletais, causa diversos efeitos negativos nas brânquias de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), peixe exótico no Brasil.

As brânquias auxiliam na respiração dos peixes e nos processos de osmorregulação e excreção, adicionalmente, no local podem ocorrer depuração e desintoxicação por poluentes (POLEKSIC e MITROVIC-TUDUNDZIC, 1994), dessa forma, Meletti, Rocha e Martinez (2003) consideram o tecido um importante bioindicador da contaminação de águas, e Henares et al. (2008) relacionam a alta sensibilidade da Tilápia do Nilo a concentrações subletais do herbicida diquat, aos danos provocados nas brânquias.

Além das brânquias, os contaminantes podem entrar no organismo dos peixes pela alimentação, com a água ingerida ou pela pele, e, uma vez no interior dos animais, um importante órgão para o metabolismo, é o fígado. Segundo Heath (1995), o fígado é o primeiro órgão relacionado à biotransformação de herbicidas. E, um fato importante sobre a utilização do fígado dos peixes, como bioindicador, está relacionado a características celulares. De acordo com Gartner e Hiatt (2007), este órgão é formado por células parenquimatosas, também chamadas de hepatócitos, organizadas por uma rede de fibras.

Em condições normais, os hepatócitos possuem arranjo poligonal com núcleo central e nucléolo de fáceis visualização (HEATH, 1995), observa-se o acúmulo de substâncias de reserva como glicogênio e lipídeos no citoplasma, material a ser liberado para o sangue como fonte de energia (GARTNER e HIATT, 2007). Portanto, diferenciações nessas condições são excelentes biomarcadores nos peixes (GUNDERSEN et al., 2000), principalmente por meio da visualização de alterações histológicas nos hepatócitos (THOPHON et al., 2003).

Nesse sentido, Henares et al. (2007) verificaram que a concentração subletal de 0,31 mL L⁻¹ do herbicida Reward® (diquat), para Pacu, provocou desarranjos nos hepatócitos dos animais. Por outro lado, Henares et al. (2008), trabalhando com *Oreochromis niloticus* e utilizando o princípio ativo diquat, verificaram que concentrações subletais não afetaram negativamente o fígado dos animais.

Os herbicidas também afetam o sistema nervoso dos peixes, por meio de efeito indireto à acetilcolina. Esse neurotransmissor tem sua atividade governada pela acetilcolinesterase e essa enzima é afetada por produtos fitossanitários,

principalmente organofosforados e carbamatos, porém, sabe-se que outros produtos e herbicidas também afetam a atividade (MIRON et al., 2005).

O equilíbrio corporal dos peixes, assim como o funcionamento muscular, é diretamente governado pelos neurotransmissores, portanto, uma vez afetada a atividade da enzima acetilcolinesterase, observa-se acúmulo de acetilcolina e a consequente falta de equilíbrio, tremores, super estimulação e natação errática dos peixes, o que faz com que os mesmos tenham dificuldades em se alimentar ou nadar, o que pode até ser letal (SAGLIO e TRIJASSE, 1998). Portanto, a avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase, em órgãos dos peixes, é também estratégia importante na aferição sobre o efeito tóxico de herbicidas à comunidade aquática (DUTTA e ARENDS, 2003).

Assim, diante dos diversos fatores que convergem para a contaminação de corpos de água, por herbicidas, e a danos aos peixes e outros organismos, faz-se necessário o desenvolvimento de critérios para estabelecimento de níveis aceitáveis do herbicida em questão ao indivíduo (IBAMA, 1987). Nesse sentido, a avaliação de risco ambiental, por meio de índices como a concentração letal média e a concentração ambiental estimada, é também ferramenta utilizada para avaliação do uso de um herbicida e tem se mostrado um importante item de verificação (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Qualificação e quantificação de resíduos de herbicidas, em corpos de água de uma microbacia hidrográfica ocupada por canais

3.1.1. Caracterização da área de avaliação

Em área de intenso cultivo de cana-de-açúcar do estado de São Paulo, encontra-se a cidade de Jaboticabal (centro-norte do estado e pertencente à região administrativa de Ribeirão Preto), que tem 70% de seu abastecimento de água advindo da microbacia hidrográfica do Córrego Rico, vinculada ao comitê de bacias do rio Mogi Guaçu (SÃO PAULO, 1974). A bacia abrange também os municípios de Monte alto, Santa Ernestina, Taquaritinga e Guariba (Figura 1).

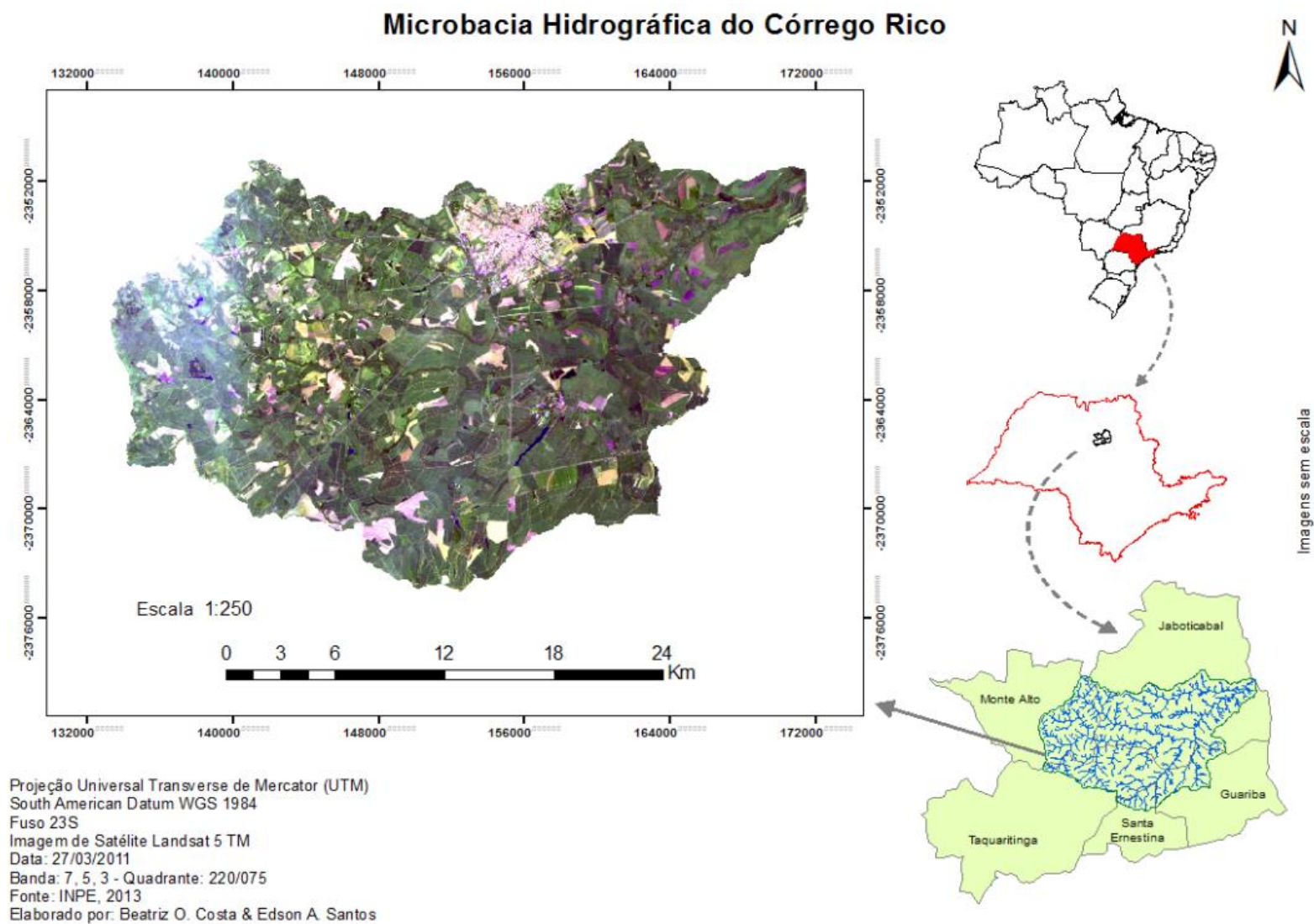


Figura 1. Fotografia por satélite da microbacia hidrográfica do Córrego rico e mapa de localização

O ponto mais baixo da microbacia situa-se a 410 m acima do nível do mar e o ponto mais alto a 740 m. O clima local é mesotérmico de inverno seco, de acordo com a classificação Köppen, com precipitação média entre 1.100 e 1.700 mm por ano e temperaturas mensais médias menores abaixo de 18 °C e médias maiores acima de 22 °C.

Destaca-se que, para utilização antrópica, 80% do volume de água são captados superficialmente, 15% subterrâneo e 5% subsuperficialmente (ITALIANO et al., 2003). A microbacia tem área aproximada de 541 km² e boa parte do solo composta por arenitos consolidados (SÃO PAULO, 1974). Mais de 90% da área é utilizada para cultivo de cana-de-açúcar, e o restante, basicamente por plantios de milho, citros, frutíferas e hortaliças (BRASIL, 2010).

A microbacia possui diversas propriedades rurais, nas quais se encontram poços artesianos, lagoas, córregos e nascentes. A produção canavieira é governada por sítiantes e por usinas, destacando-se problemas recentes de degradação ambiental, como desmatamentos, assoreamento de leitos de rios, não proteção de nascentes, perdas de solo agrícola, contaminações diversas na água de consumo humano etc. Eventos relacionados à ocupação para produção canavieira (DONADIO, GALBIATTI e PAULA, 2005; SATAKE et al., 2012).

3.1.2. Caracterização dos pontos e coletas de água

Durante os meses de junho e julho/2010, foram efetuadas visitas às propriedades rurais da microbacia e abordagem aos produtores, observando-se a posição da lavoura canavieira em relação a algum recurso hídrico, presença de poços artesianos, possibilidade de coleta de água e informações sobre histórico de herbicidas utilizados nos últimos três anos e a dose mais comumente utilizada. O questionário possibilitou identificar os herbicidas aplicados nas áreas, pelo menos uma vez no período (Tabela 1). Os responsáveis pelas aplicações de herbicidas nas áreas próprias e arrendadas de usinas, que fazem parte da microbacia, também foram abordados e finalmente, foram consultadas cooperativas de vendas da região.

Tabela 1. Herbicidas utilizados em lavouras na microbacia hidrográfica do Córrego Rico, nos anos de 2008, 2009 ou 2010.

Ingrediente ativo	Dose utilizada (g ha⁻¹ do i. a.)	Época de aplicação
2,4-D	800	Pré e pós-emergente
Acetochlor	2.950	Pós-emergente
Ametryn	3.000	Pré e pós-emergente
Amicarbazone	1.050	Pré e pós-emergente
Atrazine	2.650	Pré e pós-emergente
Carfentrazone-ethyl	30	Pré e pós-emergente
Clomazone	500	Pré-emergente
Diclosulan	25	Pré-emergente
Diuron	500	Pré e pós-emergente
Glyphosate	2.000	Pré, pós-emergente e maturador
Halosulfuron-methyl	750	Pós-emergente
Hexazinone	150	Pré e pós-emergente
Imazapic	225	Pré e pós-emergente
Imazapyr	200	Pré e pós-emergente
Isoxaflutole	750	Pré e pós-emergente
Mesotrione	120	Pré e pós-emergente
Metribuzin	720	Pré-emergente
Metsulfuron-methyl	25	Pós-emergente
MSMA	1.800	Pós-emergente
Paraquat	400	Pós-emergente
Pendimethalin	1.375	Pré-emergente
Picloram	3.000	Pré-emergente
Simazine	1.600	Pré e pós-emergente
S-metolachlor	2.400	Pré-emergente
Sulfentrazone	1.400	Pré-emergente
Sulfometuron-methyl	25	Pré-emergente e maturador
Tebuthiuron	600	Pré-emergente
Trifloxysulfuron-sodium	32	Pós-emergente
Trifluralin	810	Pré-emergente

O cruzamento de todas as informações proporcionou a definição dos herbicidas a serem avaliados de acordo com o método analítico, foram definidas também as propriedades e locais de coleta, distribuição dos pontos de amostragem e o número de amostras por local/referência, identificados por coordenadas globais.

A identificação geográfica e as matrizes de coleta (chuvas, córregos, nascentes, poços e lagoas) são destacadas na Tabela 2 e nos anexos 1, 2, 3, 4 e 5.

Tabela 2. Identificação, por sistema de posicionamento global, dos pontos de coleta de água de chuvas (CH), córregos (CO), nascentes (NA), poços artesianos (PO) e lagoas (LA), para verificação de resíduos de herbicidas, na microbacia do Córrego Rico, Jaboticabal/SP.

Ponto	Coordenada		Ponto	Coordenada	
	S	O		S	O
----- chuvas -----					
CH1	21° 17' 00,40"	48°22' 00,77"	CH3	21° 17' 42,71"	48°25' 29,09"
CH2	21° 16' 24,49"	48°23' 48,53"	CH4	21° 17' 21,77"	48°26' 04,36"
----- córregos -----					
CO1	21° 16' 33,52"	48°21' 09,91"	CO15	21° 16' 34,75"	48°24' 59,38"
CO2	21° 16' 37,65"	48°21' 24,82"	CO16	21° 17' 46,75"	48°25' 26,98"
CO3	21° 17' 41,75"	48°23' 15,97"	CO17	21° 19' 06,56"	48°24' 07,64"
CO4	21° 19' 01,29"	48°24' 34,55"	CO18	21° 19' 07,42"	48°24' 06,56"
CO5	21° 17' 55,85"	48°22' 31,65"	CO19	21° 16' 33,27"	48°20' 53,97"
CO6	21° 17'46,91"	48°25' 46,95"	CO20	21° 18' 04,13"	48°21' 27,34"
CO7	21° 17'46,21"	48°26' 30,05"	CO21	21° 19' 03,04"	48°17' 33,14"
CO8	21° 18'45,52"	48°26' 55,82"	CO22	21° 19' 20,05"	48°16' 24,43"
CO9	21° 16' 17,92"	48°23' 49,63"	CO23	21° 18' 37,35"	48°19' 25,69"
CO10	21° 15' 27,43"	48°23' 55,58"	CO24	21° 17' 42,99"	48°15' 52,08"
CO11	21° 15' 39,16"	48°23' 50,77"	CO25	21° 17' 21,12"	48°15' 38,47"
CO12	21° 16' 53,60"	48°24' 56,70"	CO26	21° 17' 02,26"	48°15' 25,25"
CO13	21° 16' 09,16"	48°24' 47,58"	CO27	21° 16' 44,53"	48°15' 35,56"
CO14	21° 16' 35,56"	48°24' 58,62"	CO28	21° 16' 42,95"	48°15' 06,11"
----- nascentes -----					
NA1	21° 18' 51,32"	48°24' 38,13"	NA8	21° 16' 08,47"	48°24' 49,61"
NA2	21° 17' 45,88"	48°25' 12,71"	NA9	21° 16' 43,57"	48°25' 08,62"
NA3	21° 18' 46,31"	48°23' 24,63"	NA10	21° 17' 22,25"	48°26' 09,01"
NA4	21° 17' 12,47"	48°25' 35,26"	NA11	21° 18' 05,02"	48°22' 38,87"

continua ...

... continuação					
NA5	21° 17' 26,65"	48°23' 13,30"	NA12	21° 17' 42,71"	48°25' 29,09"
NA6	21° 16' 15,02"	48°23' 04,32"	NA13	21° 18' 42,14"	48°23' 26,63"
NA7	21° 16' 16,77"	48°23' 35,01"			
----- poços -----					
PO1	21° 16' 36,88"	48°21' 10,46"	PO4	21° 17' 00,40"	48°22' 00,77"
PO2	21° 16' 43,58"	48°21' 22,14"	PO5	21° 16' 51,49"	48°22' 08,94"
PO3	21° 17' 42,25"	48°21' 56,09"	PO6	21° 17' 59,32"	48°23' 20,32"
PO7	21° 18' 51,32"	48°24' 33,04"	PO20	21° 16' 03,80"	48°24' 50,78"
PO8	21° 18' 49,00"	48°23' 24,67"	PO21	21° 16' 33,32"	48°24' 55,85"
PO9	21° 17' 51,20"	48°25' 54,49"	PO22	21° 16' 37,82"	48°24' 58,04"
PO10	21° 17' 57,35"	48°26' 37,12"	PO23	21° 16' 44,66"	48°24' 57,86"
PO11	21° 16' 56,19"	48°25' 23,70"	PO24	21° 16' 39,70"	48°25' 02,69"
PO12	21° 16' 59,54"	48°25' 22,64"	PO25	21° 17' 22,07"	48°26' 08,09"
PO13	21° 17' 18,39"	48°21' 57,23"	PO26	21° 18' 36,26"	48° 25' 17,91"
PO14	21° 17' 36,18"	48°23' 05,80"	PO27	21° 17' 42,71"	48°25' 29,09"
PO15	21° 16' 19,55"	48°23' 06,84"	PO28	21° 19' 12,84"	48°24' 12,63"
PO16	21° 16' 24,49"	48°23' 48,53"	PO29	21° 19' 12,84"	48°24' 12,63"
PO17	21° 15' 31,66"	48°23' 57,95"	PO30	21° 19' 12,84"	48°24' 12,63"
PO18	21° 15' 39,06"	48°26' 53,15"	PO31	21° 18' 53,73"	48°24' 04,40"
PO19	21° 16' 41,26"	48°25' 56,01"	PO32	21° 18' 44,57"	48°23' 25,94"
----- lagoas -----					
LA1	21° 16' 38,80"	48°21' 26,23"	LA10	21° 16' 20,15"	48°23' 48,40"
LA2	21° 16' 49,77"	48°22' 03,40"	LA11	21° 15' 34,31"	48°23' 52,78"
LA3	21° 16' 56,11"	48°22' 00,07"	LA12	21° 15' 31,44"	48°23' 54,80"
LA4	21° 16' 57,70"	48°22' 08,43"	LA13	21° 15' 41,22"	48°26' 53,04"
LA5	21° 18' 59,29"	48°23' 29,98"	LA14	21° 16' 41,56"	48°25' 00,92"
LA6	21° 17' 33,34"	48°23' 12,10"	LA15	21° 16' 07,11"	48°24' 47,98"
LA7	21° 17' 33,39"	48°23' 12,26"	LA16	21° 16' 34,04"	48°24' 57,60"
LA8	21° 16' 13,24"	48°23' 02,41"	LA17	21° 18' 38,71"	48°25' 13,87"
LA9	21° 16' 46,27"	48°22' 40,35"	LA18	21° 17' 41,10"	48°25' 26,19"

Em três épocas: 26/11/2010 a 04/12/2010 (época 1), 01/02/2011 a 08/02/2011 (época 2) e 09/05/2011 a 18/05/2011 (época 3), foram coletadas amostras de água de chuvas, córregos, lagoas, nascentes e poços artesianos em quatro, 28, 18, 13 e 32 pontos georreferenciados respectivamente.

Para coletas de águas de chuvas, momentos antes da primeira precipitação do dia (a partir de 8:00 h), um balde inoxidável com capacidade para 9,0 L foi posicionado no solo, de tal forma que a água entrasse diretamente no mesmo. Quando completado volume aproximado de 3,0 L, uma amostra de 1,0 L foi retirada do coletor e armazenada em frasco âmbar de polietileno. Foram coletadas amostras de água de chuvas em quatro locais e em três épocas, porém, na terceira época, não houve chuvas em dois locais (CH3 e CH4), além disso, todas as precipitações que originaram as coletas foram suficientes para preencherem os coletores com mais de 3,0 L de água.

Para coletas de água em córregos, no ponto de maior velocidade da água e na superfície, o coletor (balde com volume de 9,0 L) foi posicionado contra a direção da água até preenchimento aproximado de 1,0 L, três vezes no mesmo ponto, somando-se 3,0 L, que após misturados, uma amostra composta de 1,0 L foi retirada. Procedimento similar adotado para coletas em nascentes, onde a água foi coletada em raio máximo de 1,0 m do olho de água.

Já em lagoas, as amostras compostas foram originadas após a colocação do coletor, três vezes, há 0,5 m do limite da lagoa, no mesmo ponto, de tal forma que possibilitou a coleta de 3,0 L na superfície dos lagos. Finalmente, para coletas de água em poços, que tinham profundidade variável entre oito e 300 m, foram succionados 3,0 L de água utilizando-se da bomba elétrica. Após coleta de 3,0 L, imediatamente 1,0 L foi acondicionado no frasco âmbar.

Todas as amostras compostas, acondicionadas em frascos âmbar com volume de 1,0 L, foram transportadas imediatamente para laboratório em caixa de isopor com gelo e seguiram para freezer a -20 °C.

3.1.3. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

As análises cromatográficas foram realizadas no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM), na Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA/UNESP campus de Botucatu/SP.

Após descongelarem em temperatura ambiente, em laboratório, as amostras foram agitadas manualmente e, utilizando-se de seringas descartáveis e filtros Millex

HV (Millipore), com 0,45 μm e membrana durapore 13 mm; aproximadamente 1,5 mL foram filtrados e acondicionados em *vial* âmbar de 9,0 mm e capacidade total de 2,0 mL (*Flow Supply*).

Obedecendo aos princípios de validação do método analítico (curva analítica, linearidade, nível de detecção e de quantificação, precisão e exatidão), foi realizada uma análise multirresíduo das amostras objetivando-se a detecção e quantificação de 15 herbicidas (Tabela 3). O método de análise foi o de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), acoplada à Espectrometria de Massas (sistema LC-MS/MS), e possibilitou de forma eficiente a caracterização dos 15 produtos. Ressalta-se que os padrões analíticos utilizados na curva são de pureza acima de 99,8%.

Tabela 3. Tempo de Retenção (T.R.), em minutos, massa molecular (M.M.), em g mol^{-1} dos analitos e íons secundários (fragmentos) gerados.

Analito	T.R.	M.M.	Íons secundários		
Ametryn	8,53	228,13	186,1	68,1	96,2
Amicarbazone	7,85	505,31	165,3	264,2	183,3
Atrazine	8,82	216,24	174,2	68,1	104,1
Clomazone	9,12	240,20	125,1	89,1	99,1
Diclosulan	8,13	405,94	160,9	90,2	125,1
Diuron	8,98	234,03	72,0	73,1	174,0
Hexazinone	8,28	253,30	171,2	71,2	85,2
Imazapic	6,96	276,14	163,2	69,1	86,1
Imazapyr	6,18	262,12	78,2	69,2	86,2
Isoxaflutole	8,53	360,05	251,2	220,2	144
Pendimethalin	10,98	282,21	212,2	194,2	118,1
S-metolachlor	9,77	284,21	252,3	176,2	91,1
Sulfentrazone	8,02	386,95	110,2	146,1	273,1
Sulfometuron-methyl	7,85	365,08	150,2	107,1	67,2
Tebuthiuron	8,25	229,25	172,3	116,1	62

O sistema LC-MS/MS (Figura 2) é equipado com um cromatógrafo Shimadzu, modelo Proeminence UFLC, que contém duas bombas LC-20AD, degazeificador

DGU-20A5, autoinjeter SIL-20AC, sistema controlador CBM-20A e forno CTO-20A, com função de controle da temperatura da coluna. De forma conjunta e totalmente automatizada, as bombas permitem com que a concentração dos solventes seja dinâmica na corrida do metabólito na coluna cromatográfica C18, da marca Synergi 2.5 μ Hydro-RP 100 Å, de dimensões 50 x 4,6 mm, fluxo de 0,4 mL por minuto e injeção de 30 μ L.

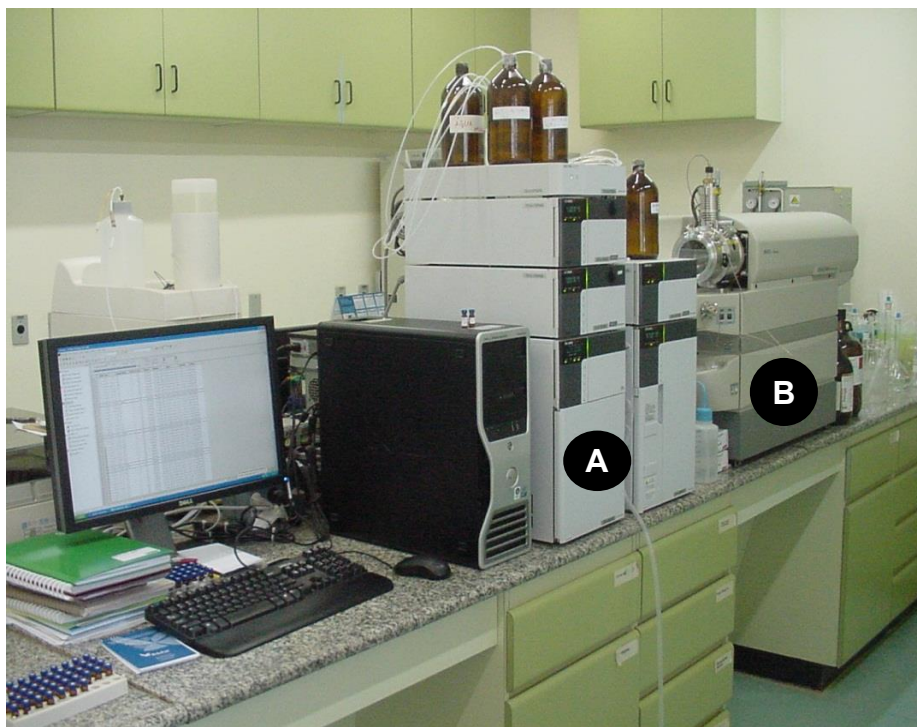


Figura 2. Sistema LC-MS/MS. Cromatógrafo Líquido Shimadzu, modelo Proeminence UFLC (A) e espectrômetro de massas 3200 Q TRAP Applied Biosystems (B).

Após separação dos analitos no cromatógrafo, de forma complementar, ocorre o funcionamento do espectrômetro de massas, modelo 3200 Q TRAP (Applied Biosystems), com híbrido triplo quadrupolo, utilizado para captura de íons carregados dos analitos. Esse aparelho recebe os compostos e a partir dos mesmos, cria os íons carregados (fragmentos), que, em função da relação massa/carga dos analitos, permite com que um detector conte os elétrons gerados e possibilite a caracterização.

Assim, dos três quadrupolos, um (Q1) é fragmentado em massas menores, possibilitando a formação, no cromatograma, dos picos do analito e do fragmento

(Figura 3), o que confere altas sensibilidade e reprodutibilidade, além de baixo ruído (concentração menor detectada) e medição simultânea de muitos compostos, 15 analitos no presente trabalho. Os valores de tempo de retenção, a massa molecular dos herbicidas e os fragmentos são apresentados na Tabela 3. O analito isoxaflutole foi analisado conjuntamente com seu metabólito mais estável, o diquetonitrila (DKN), de tal forma que os valores encontrados representam apenas um.

No cromatógrafo, a fase móvel foi constituída por metanol e água, com 0,5% de ácido acético em modo gradiente, de tal forma que a proporção entre os solventes teve início em 20:80 (metanol:água), aos oito minutos foi a 95:5, que se manteve até 12 minutos, e aos 15 minutos, retornou à condição inicial.

O tempo total de corrida foi de 19 minutos, além disso, os limites de quantificação, gerados a partir do primeiro fragmento de cada analito (Tabela 3), foram de $3,13 \mu\text{g L}^{-1}$ para diuron, $1,56 \mu\text{g L}^{-1}$ para pendimethalin e $0,391 \mu\text{g L}^{-1}$ para os demais herbicidas.

Para confecção da equação de linearidade (Tabela 4), foram utilizados seis pontos (concentrações) da solução padrão para os herbicidas diuron e pendimethalin, e oito pontos para os demais herbicidas, o que possibilitou a determinação da resposta do detector à concentração padrão conhecida, avaliados por meio do coeficiente de correlação.

Em função da dinâmica dos fatores que influenciam a contaminação de corpos de água por herbicidas, os resultados foram expressos em frequência de contaminação pelos resíduos, média de valores, maiores valores e somatório de resíduos totais.

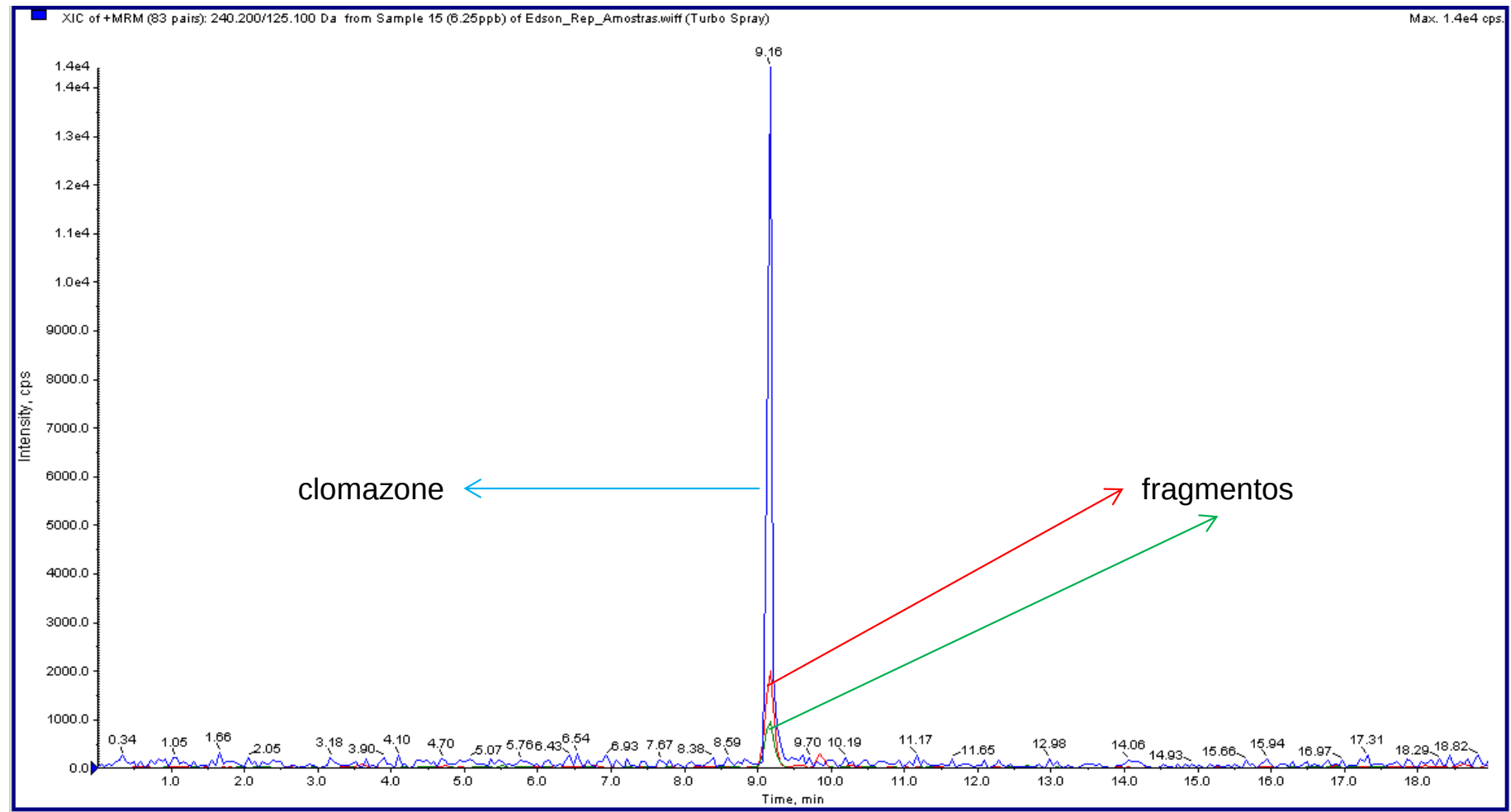


Figura 3. Cromatograma do analito clomazone (pico azul), na concentração padrão de $6,25 \mu\text{g L}^{-1}$, e dos íons gerados (fragmentos vermelho e verde) por LC-MS/MS.

Tabela 4. Equação de linearidade e coeficiente de correlação gerado após análise das soluções padrões dos herbicidas caracterizados.

Herbicida	Equação de linearidade	Coeficiente de correlação
Ametryn	$y = 20700x - 2880$	0,9952
Amicarbazone	$y = 15900x - 9610$	0,9934
Atrazine	$y = 6580x - 432$	0,9934
Clomazone	$y = 11200x + 3810$	0,9944
Diclosulan	$y = 4040x + 176$	0,9950
Diuron	$y = 191x + 158$	0,9919
Hexazinone	$y = 12100x - 411$	0,9956
Imazapic	$y = 1690x - 530$	0,9517
Imazapyr	$y = 810x - 57,5$	0,9961
Isoxaflutole	$y = 5990x + 849$	0,9953
Pendimethalin	$y = 5090x - 1350$	0,9932
S-metolachlor	$y = 10100x + 3010$	0,9967
Sulfentrazone	$y = 1250x + 2000$	0,9916
Sulfometuron-methyl	$y = 3800x - 111$	0,9964
Tebuthiuron	$y = 10500x - 959$	0,9901

3.2. Toxicidade e risco ambiental do herbicida atrazine para juvenis de Pacu

Os ensaios foram realizados no Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia, NEPEAM, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, campus de Jaboticabal.

Como trabalhos preliminares, juvenis de Pacu, foram mantidos em quarentena no setor de criação do NEPEAM, por período maior que 30 dias e, no final, estavam com peso entre 10 e 16 gramas.

3.2.1. Ensaio de toxicidade aguda

Em tanque de criação, após observação de comportamento normal dos animais em relação ao aspecto nutricional e patológico, os mesmos foram transferidos para sala de bioensaio para período de aclimação de 10 dias.

Durante esse período, os animais, em número de 80 por tanque, ficaram sob condições controladas: temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas em reservatório de amianto com volume total preenchido de 250 L. O sistema foi submetido a aeração de forma contínua (por meio da utilização de bombas de ar), circulação de água e sifonagem diariamente, o que permitiu manutenção de oxigênio dissolvido na água acima de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$. O pH permaneceu entre 7,0 e 8,0 e a condutividade elétrica entre $170,0$ e $180,0 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$ (ABNT, 2011). E ainda, durante os 10 dias, os peixes foram alimentados, *ad libitum*, com ração comercial contendo 32% de proteína.

Após o período de aclimação, como passo seguinte para a determinação da toxicidade aguda, seguiu-se à avaliação preliminar da sensibilidade do grupo de peixes, por meio do teste de toxicidade aguda com a substância referência cloreto de potássio (KCl) (ABNT, 2011). Para isso, em aquários com volume total de 10,0 L, foram colocados 7,0 L de água e três peixes com peso entre 16,2 e 16,9 g, em sistema com aeração contínua. Foram avaliadas cinco concentrações do sal e três repetições.

De acordo com o teste, a $CL_{50}(48h)$ foi estimada em $1,54 \text{ g L}^{-1}$ do sal para os peixes, com limites inferior e superior iguais a 1,36 e $1,71 \text{ g L}^{-1}$ respectivamente. Adicionalmente, foram realizados testes preliminares com o herbicida atrazine, com o objetivo de se encontrar as concentrações do herbicida: menor, a ponto de causar 100% de mortalidade e maior, a ponto de não causar mortalidade.

Os testes preliminares possibilitaram encontrar a faixa de concentração do herbicida atrazine para realização do último ensaio. Assim, para o teste agudo definitivo, foram utilizadas as seguintes concentrações de atrazine: 15, 20, 25, 35 e 45 mg L^{-1} . Foi utilizado o produto comercial Gesaprim 500 CIBA-GEIGY®, que contém 500 g L^{-1} de atrazine e 500 g L^{-1} de ingredientes inertes com formulação em suspensão concentrada. O teste foi conduzido em sistema estático, por 48 horas, sem sifonagem ou renovação da água. Foram mantidos três peixes (peso entre 16,4 e 17,1 g) por aquário (volume preenchido de 7,0 L). Finalmente, houve

monitoramento do pH, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e temperatura nos aquários (ABNT, 2011).

Para determinação da CL50(48h), utilizou-se o método Trimmed Sperman Karber (HAMILTON et al., 1977). E, de forma complementar, foram avaliados às 0, 4, 24 e 48 horas após a aplicação dos herbicidas, os sintomas de intoxicação: agitação, batimento opercular, capacidade de arfagem, letargia, busca por oxigênio, natação errática, dispersão na coluna d'água, efeitos externos e espasmos (MURTY, 1988). Às 48 horas após montagem do ensaio, os animais vivos foram direcionados aos procedimentos para análises histopatológicas e da atividade da enzima acetilcolinesterase.

3.2.2. Ensaio de toxicidade crônica

Nas mesmas condições do ensaio anterior, após quarentena em tanque de criação, juvenis de Pacu foram aclimatados em sala de bioensaio por 10 dias. E para determinação da toxicidade crônica, foram utilizadas as concentrações de atrazine, em função da toxicidade aguda determinada no experimento anterior (ABNT, 2011).

Dessa forma, em aquários preenchidos com 7,0 L, foram colocados peixes com peso entre 12,6 e 13,1 g, em quatro concentrações de atrazine: CL50(48h)/100, CL50(48h)/50, CL50(48h)/10 e CL50(48h)/5, além de aquários controle, que representaram respectivamente: 0,265; 0,530; 2,650, 5,290 e 0,0 mg L⁻¹ de atrazine. Foram utilizados três peixes por aquário e três repetições por tratamento.

Os peixes foram mantidos nessas condições por sete dias, em sistema estático, com aporte de oxigênio todos os dias, e alimentação com ração comercial nos dias 1, 3, 5 e 7 no período da manhã (08:00 - 09:00 h). Nesses mesmos dias, porém à tarde (14:00 - 16:00 h), foram monitoradas as características da água (condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, pH e temperatura).

Adicionalmente, foram monitorados os sintomas de intoxicação: agitação, batimento opercular, capacidade de arfagem, letargia, busca por oxigênio, natação errática, dispersão na coluna d'água, efeitos na pele ou órgãos externos e espasmos (MURTY, 1988). Após o ensaio, três peixes, por tratamento, foram direcionados para os procedimentos de análises histopatológicas.

3.2.3. Risco ambiental do herbicida atrazine para juvenis de Pacu

Urban e Cook (1986) e Goktepe, Portier e Ahmedna (2004) propõem a avaliação do risco ambiental e ranqueamento dos produtos, em função da Concentração Ambiental Estimada (CAE) e da toxicidade letal média (CL50) a determinado organismo, calculando-se o quociente (QR) da relação entre eles (CAE/CL50). De forma similar, a União Europeia, classifica o herbicida em dois grupos: com risco de intoxicação e sem risco de intoxicação, levando em consideração a CAE e a maior concentração a não causar mortalidade (CENO) nos ensaios de toxicidade crônica (CEC, 2003), calculando-se também o quociente da relação entre eles (CAE/CENO). No mesmo sentido, Solomon et al. (1996) propõem um fator de segurança multiplicando o QR por 100.

Dessa forma, para Urban e Cook (1986), o contaminante apresenta risco com nenhum efeito adverso se $QR \leq 0,1$; Risco com possibilidade de efeito adverso se $0,1 \leq QR \leq 10$; e risco com probabilidade de efeito adverso se $QR > 10$. De forma semelhante, para Goktepe, Portier e Ahmedna (2004), o contaminante apresenta alto risco se o quociente calculado for maior que 0,5; médio risco se estiver entre 0,05 e 0,5, e finalmente, baixo risco quando menor que 0,05. Para CEC (2003), o contaminante causa risco de intoxicação caso o quociente seja igual ou maior que 1,0. Tendo em vista a importância do atrazine no presente trabalho, foi calculado o risco ambiental do mesmo para juvenis de Pacu. E, para determinação da CAE, foram utilizados valores de acordo com a recomendação de campo (RODRIGUES e ALMEIDA, 2011) e aplicações do herbicida nos campos da microbacia hidrográfica do Córrego Rico (Tabela 1).

Foram consideradas 100% da menor ($1,75 \text{ kg ha}^{-1}$) e maior ($4,0 \text{ kg ha}^{-1}$) doses recomendadas de acordo com (SETAC, 1994). E, para cálculo da CAE, foi considerado o pior cenário de acordo com Urban e Cook (1986) e Urban e Lee (1994), em que se pressupõe aplicação direta do herbicida no corpo de água (estático) sem interação com material suspenso na água, ou sedimentos, e diluição imediata e uniforme até 2,0 metros de profundidade. Finalmente, considerou-se também, como valor de CAE, a maior concentração do resíduo do herbicida na análise multirresíduos na microbacia em estudo ($10,4 \mu\text{g L}^{-1}$ de atrazine).

Dessa forma, foram calculados seis quocientes (Figura 4) para classificação do herbicida atrazine de acordo com seu risco ambiental a juvenis de Pacu. Os parâmetros considerados são apresentados na Tabela 5.

$QR\ 1 = \frac{CAE\ 1}{CL50(48h)}$	$QR\ 2 = \frac{CAE\ 2}{CL50(48h)}$	$QR\ 3 = \frac{CAE\ 3}{CL50(48h)}$
$QR\ 4 = \frac{CAE\ 1}{CENO}$	$QR\ 5 = \frac{CAE\ 2}{CENO}$	$QR\ 6 = \frac{CAE\ 3}{CENO}$

Figura 4. Fórmulas para cálculo dos Quocientes de Risco (QR), de acordo com a relação entre Concentração Ambiental Estimada (CAE) e a toxicidade letal média (CL50(48h)) ou a Concentração de Efeito Não Observado (CENO).

Tabela 5. Concentração Ambiental Estimada (CAE), toxicidade letal média (CL₅₀(48h)) e Concentração de Efeito Não Observado (CENO), utilizados para determinação do quociente de risco ambiental do atrazine para juvenis de Pacu

Parâmetro	Valor	Unidade	Critério
CAE 1	0,0104	mg L ⁻¹	Maior concentração residual do herbicida na microbacia do Córrego Rico
CAE 2	1.750.000	mg ha ⁻¹	Menor concentração utilizada em cana-de-açúcar
CAE 3	4.000.000	mg ha ⁻¹	Maior concentração utilizada em cana-de-açúcar
CL50(48h)	26,46	mg L ⁻¹	Determinada por teste de toxicidade aguda (CL50:48h)
CENO	5,26	mg L ⁻¹	Determinada por teste de toxicidade crônica

3.3. Bioindicadores da toxicidade de atrazine em juvenis de Pacu

3.3.1. Análises histopatológicas de brânquias e fígado

Os trabalhos de histopatologia foram realizados no setor de Técnicas Morfológicas do Laboratório de Anatomia da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal.

Após o teste definitivo para determinação da toxicidade aguda, não ocorreu mortalidade em todos os peixes expostos às concentrações de 15,0; 20,0; 25,0 e 35,0 mg L⁻¹ de atrazine. Dessa forma, três animais, em cada concentração, e três peixes do controle, foram selecionados para avaliação do efeito do herbicida no fígado e nas brânquias. Da mesma forma, no teste de toxicidade crônica, três animais de cada tratamento (0,0; 0,265; 0,530; 2,650 e 5,290 mg L⁻¹ de atrazine) foram avaliados quanto aos efeitos histopatológicos do herbicida.

Para tal procedimento, os peixes foram mortos por secção da medula, sem utilização de anestésico, para não provocar mudanças nos órgãos analisados. Imediatamente após, com auxílio de pinças, estiletes e tesouras, foram retirados dois arcos branquiais de cada lado dos peixes e o fígado, que seguiram para imersão imediata em solução fixadora, contendo 10% de formaldeído tamponado.

Os tecidos permaneceram por 24 horas no fixador e após, foram submetidos à desidratação de forma crescente com álcool (70, 80, 90 e 100%), posterior diafanização em xilol e imersão em parafina plástica (Histosec[®] Merck). A seguir, o conjunto foi acomodado em freezer para formação dos blocos, que foram cortados com micrótomo automático (Leica, RM-2155). Esse procedimento possibilitou cortes com espessura de 5 µm, que foram posicionados em lâminas microscópicas e submetidos aos tratamentos com hematoxilina-eosina e reação em ácido periódico de Schiff, de acordo com Behmer et al. (1976).

Após corados, os cortes foram visualizados e analisados em microscópio Leica 5000MB, acoplado com câmera fotográfica DP10. E, os efeitos do atrazine, em concentrações subletais e letal, foram avaliados de forma qualitativa por meio da identificação de mudanças nas lamelas branquiais e células do fígado dos peixes.

3.3.2. Atividade da acetilcolinesterase cerebral

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Bioquímica Adaptativa da Universidade Federal de São Carlos.

Imediatamente após o teste de toxicidade aguda, três peixes de cada tratamento, que permaneceram por 48 horas sob as concentrações de 15, 20, 25 e

35 mg L⁻¹ de atrazine, além do controle, foram mortos por secção da medula, e com auxílio de estiletes e pinças, o cérebro foi coletado, transportado em gelo seco e armazenado a -80 °C. A seguir, as amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato (10 mM) a pH 7,0, em glicerina anidra (50%) e centrifugadas (21000 g) a 4 °C por três minutos. Assim, foi possível utilizar o sobrenadante como fonte de enzima.

Dessa forma, de acordo com o método modificado de Ellman et al. (1961), seguiu-se à determinação da atividade cerebral da acetilcolinesterase por meio da hidrólise da acetiltiocolina 37 mM em 412 nm. A atividade da enzima foi expressa em unidades de acetilcolina hidrolisada por miligrama de proteína. Cada unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima utilizada para transformar 1,0 µmol de substrato para cada minuto. Além disso, foi previamente determinado o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 16,95 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Para análises, foi realizado teste de significância e comparação de médias em teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Resíduos de herbicidas em corpos de água de uma microbacia hidrográfica ocupada por canaviais

Após análise de todas as amostras de água por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas, foi observado que a maior parte (87,6%) é contaminada por no mínimo um herbicida dos avaliados. Considerando primeiramente a análise de todas as amostras, observou-se que ametryn, atrazine, clomazone, hexazinone, s-metolachlor, sulfentrazone e tebuthiuron são contaminantes, independente da matriz de coleta. De forma similar, o diuron só não ocorre em água de chuvas (Tabela 6).

Os herbicidas pendimethalin e diclosulan são contaminantes em água coletadas em poços, córregos e lagoas. O imazapyr foi detectado em amostras advindas de córregos, nascentes e poços e o isoxaflutole foi encontrado em uma nascente e em quatro lagoas. Em amostras de lagoas (2) e córregos (2), também foi detectado residual de imazapic e finalmente, em cinco das 96 amostras de poços, havia o herbicida amicarbazone. Por outro lado, dos 15 analitos investigados,

apenas o herbicida/maturador sulfometuron-methyl não foi detectado em qualquer amostra (Tabela 6).

Sabe-se que qualquer recurso hídrico, em uma microbacia hidrográfica, atua de forma integrada aos processos biogeoquímicos, e dessa forma, qualquer atividade que provoque distúrbio à água, ou ao outro compartimento, irá afetar ambos (KONSTANTINO et al., 2006). Assim, a utilização de herbicidas, para manejo de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar, faz com que boa parte dos produtos aplicados atinja corpos de água. Principalmente nas condições de manejo da área de estudo.

Tabela 6. Número total de amostras contaminadas por resíduos de herbicidas, coletadas em três épocas do ano em diferentes matrizes, na microbacia hidrográfica do Córrego Rico.

Herbicida	Matriz				
	Chuvas (10) ¹	Córregos (84)	Nascentes (39)	Poços (96)	Lagoas (54)
Ametryn	3	1	1	3	1
Amicarbazone	0	0	0	5	0
Atrazine	8	26	10	43	17
Clomazone	9	44	24	62	19
Diclosulan	0	1	0	1	1
Diuron	0	26	7	14	19
Hexazinone	1	31	4	11	15
Imazapic	0	2	0	0	2
Imazapyr	0	1	2	4	0
Isoxaflutole	0	0	1	0	4
Pendimethalin	0	7	0	2	5
S-metolachlor	1	23	6	8	16
Sulfentrazone	4	20	8	28	15
Sulfometuron-methyl	0	0	0	0	0
Tebuthiuron	1	2	1	7	2

¹ número total de amostras coletadas somando-se as três épocas.

Nesse sentido, Bortoluzzi et al. (2006) destacam que a existência de grandes quantidades de herbicidas nos corpos de água, em ambiente agrícola, se deve especialmente às práticas de manejo que provocam erosão. Adicionalmente, a utilização dos produtos de forma intensiva, com altas quantidades, variados ingredientes ativos e o não entendimento do comportamento dos produtos no ambiente são entraves a um desenvolvimento agrícola sustentável (CHANDLER, et al. 2011).

Dos herbicidas detectados nas amostras de água, todos são utilizados pelos agricultores da microbacia (Tabela 1), porém possuem características físico-químicas diferentes, são usados em dosagens variáveis e são também contaminantes em outras regiões com cultivo canavieiro (GOOLSBY et al., 1997; ARMAS et al., 2007). Destaca-se também que, particularidades de cada gleba produtiva ou de cada lavoura, fazem com que os produtos cheguem de forma diferente à água e em concentrações variadas.

Segundo Armas et al. (2007), o cultivo de cana-de-açúcar em outra microbacia no estado de São Paulo provocou a contaminação de águas de rios por atrazine, ametryn, clomazone e hexazinone, com valores de concentrações semelhantes aos detectados na microbacia do Córrego Rico. Da mesma forma, Britto et al. (2012) e Cerdeira et al. (2005) relatam a ocorrência de ametryn e diuron em rio, de abastecimento de cidades, envolto por cultivo de cana-de-açúcar.

Porém, é importante considerar que é possível que os herbicidas venham de outras microbacias. Chang et al. (2011) verificaram que o herbicida glyphosate é detectado em água de chuvas, e no ar, em regiões (microbacia) onde não é aplicado. Segundo esses autores, a precipitação faz com que o produto chegue a corpos de água distantes em concentrações máximas de $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$. De forma similar, o herbicida atrazine também é detectado há quilômetros do local de aplicação, transportado principalmente pelo vento (LAZORKO-CONNOR e ACHARI, 2009).

Em relação às épocas de coletas, observou-se que, de acordo com os parâmetros: média de resíduos por época (Tabela 7), maior resíduo de cada herbicida (Tabela 8) e frequência de amostras contaminadas (Figuras 5, 6 e 7), a quantidade e intensidade de contaminação, na primeira época, são maiores. Apesar

de alguns herbicidas serem aplicados no meio do ano, muitos são utilizados para controle de plantas daninhas no período de início das chuvas (setembro e outubro), quando a maioria das plantas daninhas emerge.

Tabela 7. Médias de resíduos de herbicidas ($\mu\text{g L}^{-1}$) em função da época de coleta de água, na microbacia do Córrego Rico.

Herbicidas	Épocas de coleta		
	29/11 a 08/12/2010	01 a 08/02/2011	09 a 18/05/2011
Ametryn	0,0055	0,0016	0,0035
Amicarbazone	0,0000	0,0000	0,0048
Atrazine	0,1452	0,1483	0,0401
Clomazone	0,0502	0,0258	0,0402
Diclosulan	0,0001	0,0000	0,0000
Diuron	0,3739	0,2223	0,0386
Hexazinone	0,0282	0,0852	0,0236
Imazapic	0,0174	0,0000	0,0000
Imazapyr	0,0024	0,0075	0,0065
Isoxaflutole	0,0004	0,0000	0,0000
Pendimethalin	0,0000	0,0000	0,0536
S-metolachlor	0,1202	0,0012	0,0128
Sulfentrazone	0,0545	0,0307	0,1117
Tebuthiuron	0,0059	0,0019	0,0029

Outro fator, que provavelmente contribui com a maior contaminação de águas por herbicidas no mês de novembro, é o plantio quando realizado nesse mês. O revolvimento do solo, que contém herbicidas residuais, e consequente exposição do mesmo, faz com que ocorra a perda de material para córregos, lagoas e para a atmosfera. Adicionalmente, o menor volume de água na microbacia, em função da menor intensidade de chuvas acumuladas, faz com que a concentração de herbicidas seja maior (FERRACINI et al., 2001), fato relatado também por Armas et al. (2007).

Tabela 8. Maior resíduo (R) de herbicidas ($\mu\text{g L}^{-1}$) detectados em função da matriz e da época de coleta (E), sendo 1: entre 29/11/2011 e 08/12/2010, 2: 01/02/2011 e 08/02/2011 e 3: 09/05/2011 e 18/05/2011, na microbacia do Córrego Rico.

Herbicida	Matriz									
	Chuva		Córregos		Nascentes		Poços		Lagoas	
	R	E	R	E	R	E	R	E	R	E
Ametryn	0,331	1	0,037	2	0,033	3	0,205	3	0,008	2
Amicarbazone	-	-	-	-	-	-	0,162	3	-	-
Atrazine	0,233	1	10,400	1	0,124	1	0,291	3	1,670	3
Clomazone	0,270	1	0,243	3	-	-	0,336	1	0,375	3
Diclosulan	-	-	0,003	2	-	-	0,003	3	0,011	1
Diuron	-	-	7,650	1	1,340	1	2,650	2	2,970	1
Hexazinone	0,117	1	4,300	2	0,107	3	0,718	3	0,540	2
Imazapic	-	-	1,520	1	-	-	-	-	0,107	1
Imazapyr	-	-	0,312	2	0,553	3	0,403	2	-	-
Isoxaflutole	-	-	-	-	0,024	1	-	-	0,004	1
Pendimethalin	-	-	1,030	3	-	-	0,251	3	0,770	3
S-metolachlor	0,015	3	10,200	1	0,099	3	0,112	1	0,116	3
Sulfentrazone	0,800	3	1,220	3	0,640	1	0,606	3	0,431	1
Tebuthiuron	0,035	3	0,077	1	0,080	3	0,113	2	0,136	1

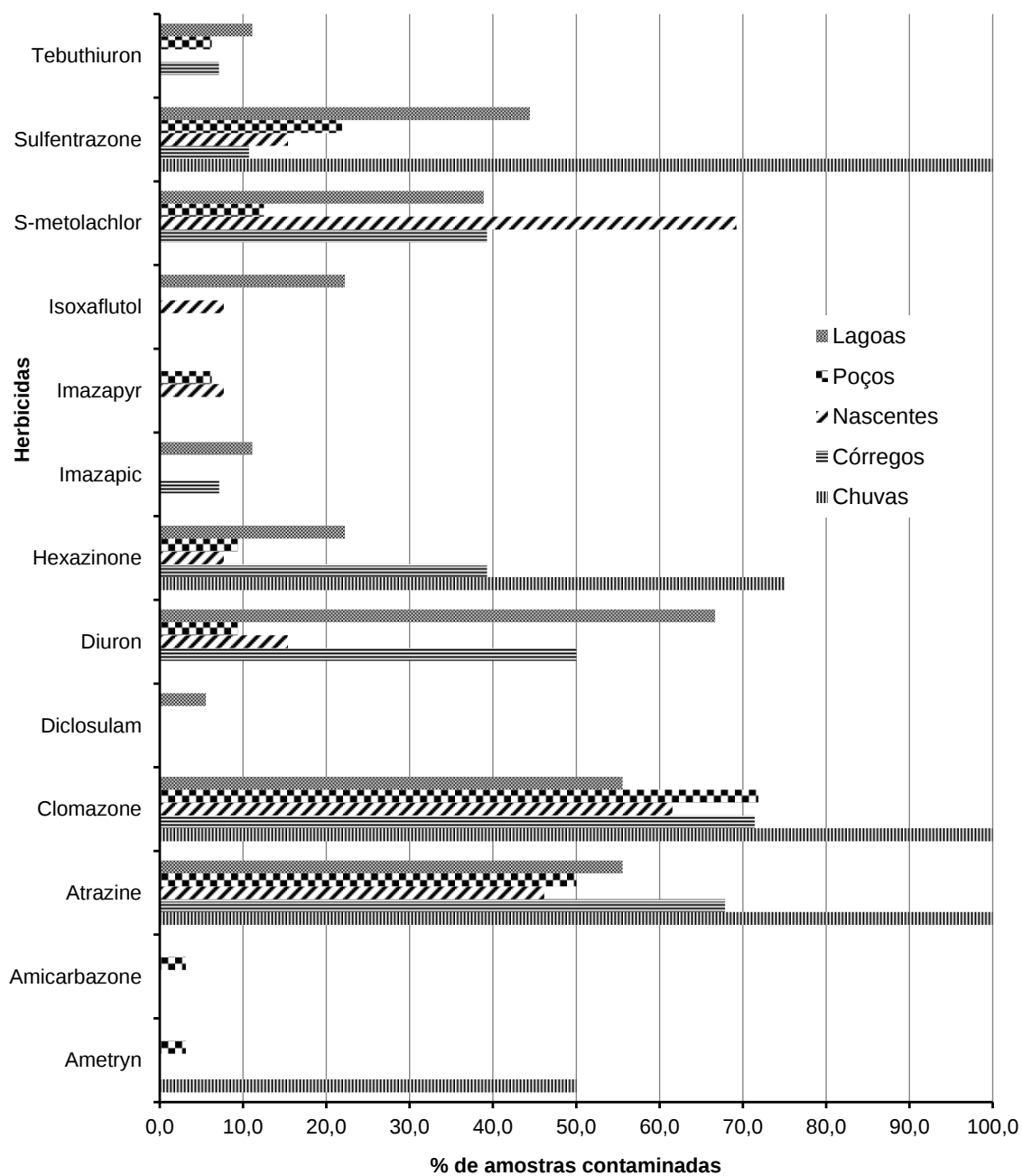


Figura 5. Porcentagem de amostras, com resíduos de herbicidas, coletas em cinco matrizes na primeira época (entre 29/11/2010 e 08/12/2010), na microbacia hidrográfica do Córrego Rico.

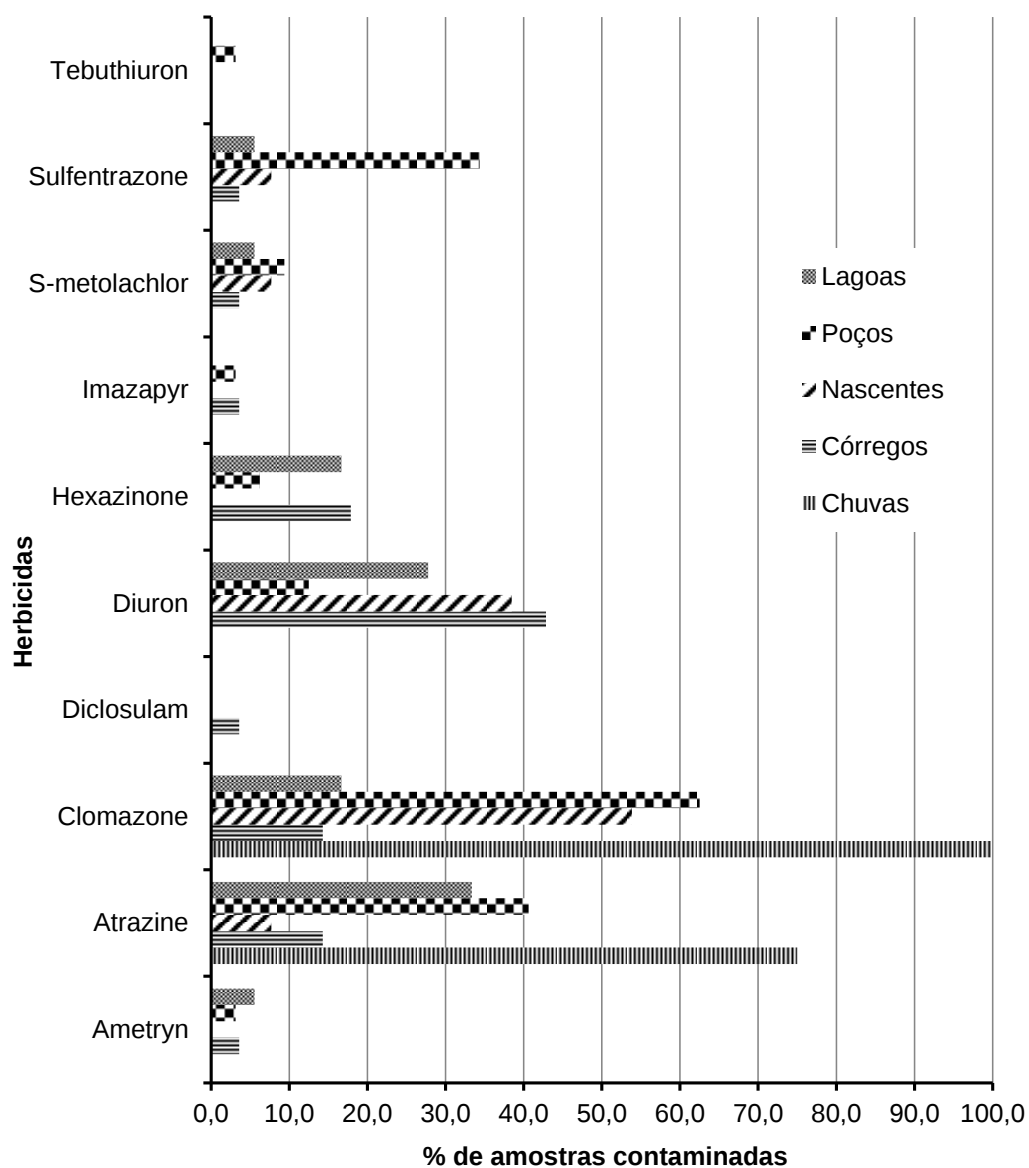


Figura 6. Porcentagem de amostras, com resíduos de herbicidas, coletas em cinco matrizes na segunda época (entre 01/08/2011 e 08/02/2011), na microbacia hidrográfica do Córrego Rico.

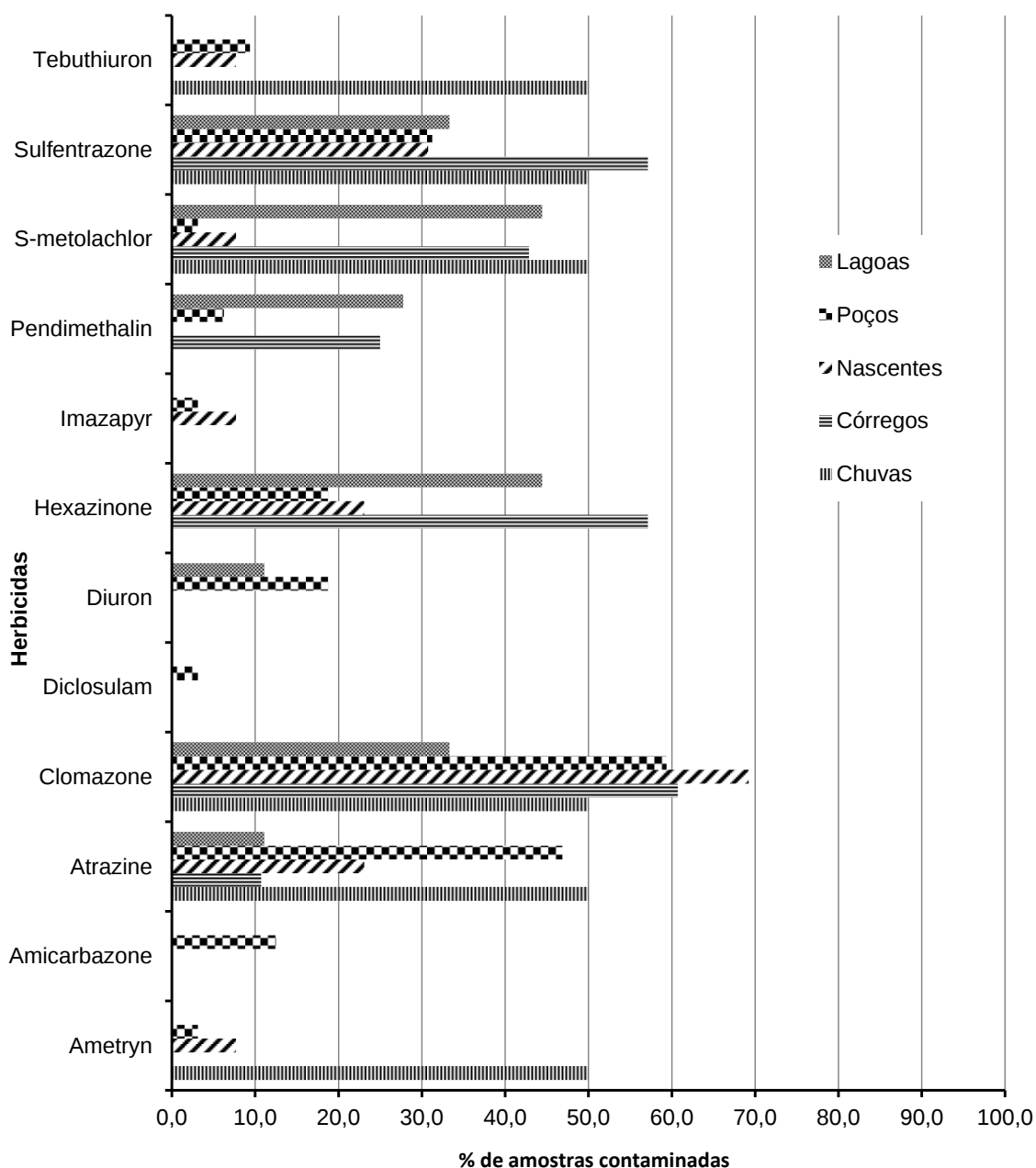


Figura 7. Porcentagem de amostras, com resíduos de herbicidas, coletas em cinco matrizes na terceira época (entre 09/05/2011 e 18/05/2011), na microbacia hidrográfica do Córrego Rico.

Com relação às matrizes, observou-se que as maiores concentrações de herbicidas foram detectadas nos córregos, posteriormente em lagoas, seguidas de poços, nascentes e finalmente nas chuvas (Tabelas 6 e 9 e Figuras 5, 6 e 7).

Tabela 9. Médias de resíduos de herbicidas ($\mu\text{g L}^{-1}$) em função da matriz de coleta, na microbacia do Córrego Rico.

Herbicida	Matriz				
	Chuvas	Córregos	Nascentes	Poços	Lagoas
Ametryn	0,04650	0,00044	0,00085	0,00472	0,00015
Amicarbazone	0,00000	0,00000	0,00000	0,00464	0,00000
Atrazine	0,04968	0,30659	0,00901	0,02195	0,05257
Clomazone	0,07426	0,04159	0,03164	0,04328	0,02344
Diclosulan	0,00000	0,00004	0,00000	0,00003	0,00020
Diuron	0,00000	0,34869	0,12038	0,11108	0,28853
Hexazinone	0,00975	0,12638	0,00537	0,01141	0,01743
Imazapic	0,00000	0,01827	0,00000	0,00000	0,00226
Imazapyr	0,00000	0,00371	0,01546	0,00655	0,00000
Isoxaflutole	0,00000	0,00000	0,00063	0,00000	0,00027
Pendimethalin	0,00000	0,03228	0,00000	0,00523	0,03285
S-metolachlor	0,00175	0,13864	0,00683	0,00278	0,00991
Sulfentrazone	0,16337	0,08319	0,05787	0,05201	0,05710
Tebuthiuron	0,00577	0,00119	0,00205	0,00566	0,00457

De fato, nas lavouras de cana-de-açúcar da microbacia do Córrego Rico, os córregos são mais expostos à contaminação pelos produtos fitossanitários, porque ocorrem em grande número e são desprotegidos em função da existência de poucas matas ciliares (DONADIO, GALBIATTI e PAULA, 2005; SATAKE et al., 2012). Além disso, as operações de preparo do solo para plantio, principalmente nas áreas com inclinação (PISSARRA, POLITANO e FERRAUDO, 2004), permitem que o solo seja carregado pela água da chuva até os córregos (KRUTZ et al., 2005), conforme relatado na Figura 8.

Uma forma de fácil verificação da chegada de solo ao leito dos córregos é a visualização de argila ou outro material em suspensão na água (ARCOVA e CICCIO, 1997). Na bacia em questão, foi observada em todos os córregos, alta concentração de material disperso e suspenso na água de córregos (Figura 8), principalmente em locais onde não havia mata ciliar.



Figura 8. Perda de solo provocada por água de chuvas (A) e alta concentração de material suspenso em água de córrego (B) no ponto de coordenadas 21° 17 '46,75" S e 48° 25' 26,98" O, na microbacia do Córrego Rico. Imagens de 06/12/2010.

Estes córregos, quando alimentam lagoas, fazem com que a contaminação por herbicidas também chegue a esse corpo de água. Porém, águas de chuvas, contaminadas por herbicidas também contribuem para tal fato (RAINHA et al., 2011). Adicionalmente, conforme relatado por Tavella et al. (2011), o descarte de embalagens vazias e a lavagem de tanques de pulverização conferem grande aporte de herbicidas aos lagos, uma vez que os pontos de lavagem ou acúmulo de embalagens comumente são próximos aos reservatórios.

Citam-se também, na área de estudo, como características favoráveis à contaminação das lagoas, o relevo com muitos declives; o solo arenoso (PISSARRA, POLITANO e FERRAUDO, 2004); o clima, com baixa umidade relativa do ar no período de estiagem, altas temperaturas e precipitações de altas intensidades (BORGES, GALBIATI e FERRAUDO, 2003); a não proteção dos corpos de água (DONADIO, GALBIATTI e PAULA, 2005) e a utilização intensiva dos herbicidas residuais (FRANCONERE, 2010).

Para se tornarem contaminantes em águas de poços, os herbicidas precisam lixiviar e se depositar no reservatório subterrâneo. Na área de estudo, foram coletadas amostras de água de 32 poços tubulares, com profundidades variando entre oito e 300 metros. Não houve relação entre a profundidade e os parâmetros de resíduos e em apenas um poço, com 300 metros, foi detectado somente o herbicida diuron, em concentração de $2,65 \mu\text{g L}^{-1}$, na segunda época de coleta. É provável

que essa contaminação tenha ocorrido pelo escoamento de água, contendo o herbicida, nas paredes externas do poço, por não haver a detecção em alguns poços menos profundos, e próximos, e também por ser comum a prática de lavagem de implementos e embalagens de herbicidas nas proximidades dos poços (Tavella et al., 2011).

Porém, sabe-se que a movimentação dos herbicidas no perfil do solo pode ocorrer em função do fluxo de água, que está diretamente relacionado à porosidade; ou por difusão. E diversos outros fatores físico-químicos interferem na chegada dos produtos à água subterrânea, tais como o pH do solo e a solubilidade dos produtos (VENCILL, 2002). No caso específico do diuron, sabe-se que o mesmo, em função de seu coeficiente de adsorção, é lixiviável e tem o comportamento no perfil do solo muito influenciado pelo teor de matéria orgânica, nesse sentido, justifica-se a detecção nos poços, uma vez considerado os baixos teores de carbono orgânico dos solos na microbacia.

Informações sobre a contaminação com resíduos de herbicidas em águas subterrâneas é fato recente e de extrema importância na área de estudo (RUY e REIS, 2012), pois é região de recarga do aquífero Guarani, mais importante reserva de água doce da América do Sul e um dos maiores aquíferos do mundo (ROCHA, 1997).

A detecção de atrazine, por técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, é relatada por Cerdeira et al. (2005) nesse aquífero. De forma similar, Carabias-Martínez et al. (2002) e Cerejeira et al. (2003) relatam a presença de herbicidas, utilizados em cana-de-açúcar, em poços artesianos da Europa, com destaque para o atrazine que foi detectado em concentração máxima de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ em poços em Portugal.

Gomes et al. (2006), verificaram que um dos maiores fatores influentes na movimentação do tebuthiuron no perfil, e contaminação de águas do aquífero Guarani, é também o teor de matéria orgânica do solo. O que corrobora com o resultado obtido nesse trabalho, onde foi detectado este herbicida em sete amostras de poços e em profundidade de até 130 metros.

O lençol freático que mantém o poço com água para utilização antrópica, quando aflora, é caracterizado como nascente, sendo portanto, diretamente exposto

ao contaminante na superfície. Em função da origem, as nascentes devem apresentar água de boa qualidade e em fluxo contínuo durante o ano, caracterizando um manejo sustentável da microbacia (BRASIL, 2012).

Porém, diante da detecção de contaminantes nos poços, águas de nascentes têm grande probabilidade em apresentar os xenobióticos. De fato, observou-se que foram detectados os herbicidas ametryn, atrazine, clomazone, diuron, hexazinone, imazapyr, isoxaflutole, s-metolachlor, sulfentrazone e tebuthiuron nas nascentes, e desses, apenas o isoxaflutole não foi detectado nos poços (Tabela 8).

Oficialmente no Brasil, águas de nascentes são consideradas apropriadas para consumo humano, sem prévio tratamento. Porém, desde que estejam em pé de morro com vegetação nativa exuberante. A preservação das nascentes e proteção das matas, que as comportam, são premissas básicas para o desenvolvimento agrícola sustentável e garantidas por meio da Lei 12.727, de 17 de outubro de 2012 (BRASIL, 2012).

Dessa forma, a atividade canavieira, na microbacia do Córrego Rico, contribui para a violação do código florestal brasileiro, o que ocorre também em áreas agrícolas na microbacia do Arroio Lino, em Agudo/RS, de acordo com Bortoluzzi et al. (2005). Esses autores verificaram a contaminação de águas das nascentes pelos herbicidas utilizados na cultura do fumo: atrazine, simazine e clomazone, que são também utilizados em cana-de-açúcar.

A agência de proteção ambiental do estado da Califórnia, EUA, monitora os resíduos de herbicidas em corpos de água, e, em levantamento realizado em 2009, verificou que águas superficiais são contaminadas por diversos herbicidas, sendo que os mais importantes são diuron e hexazinone, presentes em 52% e 43% das amostras respectivamente (ENSMINGER, 2009).

Outra matriz de água, com resíduos de herbicidas na microbacia do Córrego Rico, são as chuvas. Todas as amostras apresentaram resíduos de pelo menos um herbicida, e atrazine e clomazone são os mais importantes (Tabelas 6 e 9 e Figuras 5, 6 e 7). Caracterizando a importância da análise de água de precipitações em uma microbacia, observa-se que os herbicidas que ocorrem em chuvas, ocorrem também em todos os outros corpos de água.

Após o início da precipitação, parte da mesma infiltra no solo e, em função de características físico-químicas do mesmo, a água se mantém até o preenchimento e consequente infiltração, transbordo, utilização pela biota ou evaporação (CHOW et al., 1988). Esses processos são a base de formação dos córregos e fazem com que os resíduos de herbicidas se dissipem nos diferentes compartimentos.

Importante fator envolvido na detecção de herbicidas em chuvas é o manejo agrícola. Destaca-se a palha formada em função da colheita mecânica da cana. A quantidade de resíduo vegetal chega a 30 t ha^{-1} (TRIVELIN; RODRIGUES e VICTORIA, 1996) e tem influência direta na dinâmica dos herbicidas, principalmente, aqueles aplicados no período da seca. Esse período dura em torno de quatro meses na região de estudo e, uma vez sobre a palha, os produtos podem ser perdidos para a atmosfera (GOOLSBY et al., 1997), em função, principalmente, da pressão de vapor dos mesmos, da umidade relativa do ar, dos ventos e da temperatura do ambiente (VENCILL et al., 2002).

A contaminação de águas por produtos fitossanitários agrícolas é preocupação em muitos países, principalmente onde a agricultura intensiva é praticada há mais tempo. Por esse motivo, existem leis especiais para gerenciamento de resíduos em águas. Nesse sentido, vale exemplificar o Canadá, Estados Unidos e os países europeus que possuem programas de monitoramento de contaminantes em água e são pré determinados os limites máximos dos produtos em água potável.

No Canadá, dentre os herbicidas aqui avaliados, o máximo permitido para diuron é de $0,15 \text{ mg L}^{-1}$ e para atrazine é de $0,5 \text{ µg L}^{-1}$ de água potável, como exemplos (HEALTH CANADA, 2013). Nesse aspecto, ressalta-se que a concentração máxima de diuron detectada na bacia do Córrego Rico é bem menor ($7,6 \text{ µg L}^{-1}$) que o limite citado, por outro lado, a do atrazine aqui encontrada é 20 vezes maior que o limite máximo (Tabela 8), inviabilizando a água do córrego Rico, sem tratamento, em termos de potabilidade.

Nos Estados Unidos, por meio da Agência de Proteção Ambiental (EPA), é regulamentada a concentração máxima dos herbicidas, em água potável, de acordo com cada produto. Para o atrazine, esse valor é de $3,0 \text{ µg L}^{-1}$, e para o diuron o limite aceitável é de 10 µg L^{-1} . Porém, mais da metade dos contaminantes orgânicos,

em água potável no país, não têm regulamentação a fim de se definir limites máximos permitidos (EWG, 2009).

Situação semelhante no Brasil, uma vez que se tem definidos, por meio da Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde, os valores máximos de herbicidas em água potável, apenas para atrazine ($2,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e pendimethalin ($300 \mu\text{g L}^{-1}$) dos produtos avaliados na microbacia do Córrego Rico. De forma semelhante, a resolução CONAMA, n 357/2005, considera o valor máximo de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ apenas para o atrazine, inexistindo portanto, padrões mínimos para a grande maioria dos herbicidas contaminantes, conforme já relatado por Dores e De-Lamonica-Freire (2001).

Assim, de acordo com a carência de parâmetros mensuráveis, o grande número de moléculas utilizadas atualmente na agricultura e a alta probabilidade de contaminação dos corpos de água, em países europeus o máximo permitido para qualquer herbicida é de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$, e, considerando o somatório de todos os contaminantes, o valor não pode exceder $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (COUNCIL DIRECTIVE, 1998). Nesse sentido, observa-se que várias amostras de água estariam com o somatório de resíduos acima do permitido de acordo com a União Europeia (Tabela 10).

Tabela 10. Amostra mais contaminada, após o somatório dos resíduos de todos os herbicidas, de águas coletadas em cinco matrizes e em três épocas, na microbacia hidrográfica do Córrego Rico.

Matriz	Somatório do resíduo de herbicidas ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	29/11/2010 - 08/12/2010	01/02/2011 - 08/02/2011	09/05/2011 - 18/05/2011
Chuva	0,78000	0,09190	1,0040
Córrego	24,0107	15,5900	1,95800
Nascente	1,37540	0,91200	0,58600
Poço	1,91130	2,65000	1,27782
Lagoa	3,10505	2,94000	1,86900

Porém, avaliando-se a água para consumo humano, destaca-se que a mesma é utilizada após coletas em poços ou nascentes. Dessa forma, admitindo-se que uma pessoa consuma aproximadamente 2,0 L de água diariamente, no caso de consumo da água da microbacia do Córrego Rico, em um ano (365 dias), menos

que 1,0 mg de herbicidas seria administrado por uma pessoa. Comparando-se esse valor ao da Ingestão Diária Aceitável (ANVISA, 2010), conclui-se que a água é segura para o consumo humano, em valores acima de 100 vezes o máximo permitido segundo a agência.

De acordo com a discrepância entre os limites máximos adotados nos diferentes países, há certa discussão pela carência de testes toxicológicos para suplantar os limites impostos pela União Europeia, que se baseia no princípio da precaução e define o valor máximo de resíduo em função do limite de quantificação do método analítico. Entretanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) dita premissas para a definição de um limite máximo aceitável de determinado contaminante: i – há fortes evidências de contaminação da água pelo herbicida em questão; ii – o produto tem importância internacional ou iii – é integrante na lista de pesticidas avaliados pela OMS (OMS, 2004).

Por isso, com o intuito de monitoramento, são relatados herbicidas contaminantes em água, principalmente produtos utilizados em cana-de-açúcar no Brasil (FERRACINI et al., 2001; GOMES et al., 2006; ARMAS et al., 2007; BRITTO et al., 2012), alguns desses produtos têm importância internacional, como o herbicida atrazine, considerado aqui o mais importante contaminante. Porém, outros produtos encontrados em altas frequências e concentrações na microbacia em estudo, como clomazone e diclosulan, não são citados em qualquer norma das supracitadas, inclusive na OMS.

Avaliando-se os herbicidas individualmente, o atrazine pode ser considerado um dos mais importantes, devido às altas frequência e concentrações detectadas, em todas as matrizes (Tabelas 6 a 10 e Figuras 5 a 7). Como herbicida, é considerado um dos maiores poluidores de água (BEITZ; SCHMIDT e HERZEL, 1994; SPADOTTO, 2002), principalmente, em função da alta persistência ($t/12$ - Tabela 11), ampla utilização (ARMAS et al., 2005) e alta dosagem recomendada (RODRIGUES e ALMEIDA, 2011). A alta frequência de ocorrência em corpos de água, fez com que os Estados Unidos (DACP, 2012) e a União Europeia (ACKERMAN, 2007) proibissem a utilização.

O atrazine é considerado como muito suscetível à lixiviação, de acordo com os índices GUS e LEACH, e a média de resíduo em corpos de água em áreas de

agricultura é de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (NWANI, 2010). Apesar de apresentar baixa pressão de vapor, características edafoclimáticas, a alta concentração no ambiente e a baixa adsorção ao solo (expressa por meio do Koc – Tabela 11) contribuem para que o mesmo seja encontrado em todos os corpos de água, com maior frequência em poços, conforme relatado por Rohr e McCoy (2010).

Tabela 11. Características físico-químicas dos herbicidas detectados em amostras de água da microbacia do Córrego Rico, Jaboticabal, SP.

Herbicida	$T_{1/2}^1$	Koc ²	SA ³	PV ⁴	GUS ⁵	Le ⁶	CT ⁷
Ametryn	53	300	200	$3,7 \times 10^{-4}$	5,98	6,9	IV
Amicarbazone	150	30	4600	0,0013	3,34	nd	II
Atrazine	146	155	33	$3,9 \times 10^{-5}$	4,4	6,1	III
Clomazone	24	150	1100	$1,9 \times 10^{-2}$	2,1	3,7	II
Diclosulan	75	90	6,3	$6,7 \times 10^{-10}$	3,46	nd	III
Diuron	372	480	42	$9,2 \times 10^{-6}$	3,38	6,5	III
Hexazinone	222	54	33000	$3,0 \times 10^{-5}$	2,8	9,5	III
Imazapic	140	112	2200	0,01	3,61	nd	III
Imazapyr	90	100	11300	0,013	1,98	nd	III
Isoxaflutole	18	134	6,2	$1,0 \times 10^{-6}$	0,59	nd	I
Pendimethalin	1220	310	0,33	$4,0 \times 10^{-3}$	4,7	2,5	II
S-metolachlor	33	200	488	$1,3 \times 10^{-7}$	1,94	nd	I
Sulfentrazone	548	43	490	$1,3 \times 10^{-7}$	6,48	10,9	IV
Tebuthiuron	1220	80	2500	$10,7 \times 10^{-4}$	6,31	8,1	III

¹valores médios de meia vida em solo (dias); ² coeficiente de sorção normalizado pela fração de carbono orgânico do solo ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$); ³ solubilidade em água a 20°C (mg/L^{-1}); ⁴ pressão de vapor (mPa); ⁵ Groundwater Ubiquity Score (Gustafson, 1989); ⁶ Índice Leach; ⁷ Classe toxicológica do produto comercial mais utilizado na microbacia do Córrego Rico.

Outro herbicida, muito importante como contaminante das águas da microbacia do Córrego Rico, é o clomazone. É o produto mais frequentemente encontrado em todas as matrizes (Tabela 6). Uma das principais particularidades diz respeito à sua pressão de vapor (Tabela 11), que classifica o produto como

moderadamente volátil (RODRIGUES e ALMEIDA, 2011) e, em função de características ambientais da microbacia, seu resíduo é facilmente detectado em diversos sítios. Apesar de $t_{1/2}$ média de apenas 24 dias, outras características possibilitam as perdas do produto para o ambiente.

Na microbacia do Córrego Rico, facilmente as temperaturas ultrapassam 25 °C nos canaviais, a presença da palha e a baixa umidade do ar contribuem para a excessiva perda do produto para atmosfera, detecção em água de chuvas e consequentemente em outros compartimentos. Segundo Locke et al. (1996), a não ocorrência de chuvas permite com que até 43% do clomazone seja perdido logo após a aplicação sobre a palha, porém, essa perda pode se estender a 90% (TAYLOR, 1995).

O herbicida diuron é um produto com destaque mundial no quesito contaminação de águas (COUNCIL DIRECTIVE, 1998; PFEUFFER e RAND, 2004). Na bacia em estudo ele é considerado muito importante porque foi detectado em altas frequência e concentração, principalmente em coletas realizadas no principal córrego da bacia. (Tabelas 6 a 10 e Figuras 5 a 7).

No levantamento realizado, constatou-se que o diuron é um dos herbicidas mais utilizados, aliados a esse fato, sua alta persistência e sorção extremamente dependente do carbono orgânico do solo (Tabela 11), fazem com que o produto seja facilmente detectado nos corpos de água da bacia. Em função de ser não volátil, o herbicida não foi detectado em águas de chuva, no entanto, apesar de apresentarem pressões de vapor menores, outros herbicidas foram detectados nas precipitações (Tabela 6).

O herbicida sulfentrazone é eficiente no controle de espécies importantes em cana-de-açúcar, como ciperaceas e convolvulaceas (RODRIGUES e ALMEIDA, 2011). Sua utilização confere vantagens ao cultivo em função do manejo da cultura e de características fisiológicas da espécie, pois, herbicidas com alto residual realizam o controle das plantas daninhas no período anterior ao sombreamento, que é longo nessa cultura.

Dessa forma, por apresentar elevado período residual e baixa adsorção ao solo, o sulfentrazone é considerado pelos índices GUS e LEACH como o mais provável à contaminação de águas (Tabela 11). Adicionalmente, em função da

elevada $t_{1/2}$, durante a perda de partículas de argila para a atmosfera, em situações de fortes ventos, é provável que ocorra transporte do herbicida, que será consequentemente detectado nas primeiras chuvas.

O s-metolachlor também é classificado como um dos principais contaminantes de água, principalmente em poços (Tabelas 6 a 10 e Figuras 5 a 7). Esse herbicida tem sido utilizado com sucesso para controle de diversas monocotiledôneas, principalmente nas culturas de cana-de-açúcar e milho, e em função de suas características físico-químicas (Tabela 11), é uma molécula considerada segura quanto à possibilidade de contaminação de águas. Porém, o fator manejo agrícola, pode se sobrepor às características da molécula e determinar a contaminação. Nesse sentido, Procópio et al. (2001) relatam que solos com baixos teores de matéria orgânica permitem a perda de seletividade do s-metolachlor, por possibilitar maior movimentação do produto, o que também aumenta a possibilidade de lixiviação.

Devido à sua alta solubilidade em água e eficácia em sistema de cana crua, o hexazinone é utilizado em aplicações na época seca. O produto é aplicado sobre a palha, no período de estiagem, e chega ao solo lixiviado pela água de chuva, mas durante esse período sobre a palha, boa parte é perdida em função da instabilidade, o que pode ocorrer devido à volatilização, pois, apesar do produto ter baixa pressão de vapor (Tabela 11), as altas temperaturas na superfície da palha, a baixa umidade do ar e o tempo de exposição podem colocar o produto na atmosfera (LOCKE e BRYSON, 1997).

Porém, uma vez ultrapassada a barreira de palha, o herbicida apresenta alto poder residual no solo e baixa adsorção (Tabela 11), aliado a isso, precipitações intensas e os baixos teores de matéria orgânica nos solos aumentam as chances do hexazinone ser lixiviado ou carregado superficialmente em direção aos corpos de água.

O herbicida tebuthiuron foi detectado em concentração máxima de $0,136 \mu\text{g L}^{-1}$ em uma amostra de água coletada em lagoa, porém, sua maior frequência foi em poços (Tabela 6). Dos produtos aqui avaliados, os índices GUS e LEACH classificam o tebuthiuron como altamente perigoso a águas subterrâneas e superficiais em função, principalmente, de seu alto valor de $t_{1/2}$ (Tabela 11). Assim, mesmo se for

utilizado em baixas concentrações, a quantidade do produto no solo pode aumentar ano após ano, assim como a periculosidade aos corpos de água, de acordo também com sua baixa adsorção ao solo ($K_{oc} = 80 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$).

Em menor frequência, porém presente em todos os corpos de água (Tabela 6), o herbicida ametryn é muito utilizado em misturas para controle de diversas plantas daninhas que ocorrem em cana-de-açúcar, milho e outras culturas (RODRIGUES E ALMEIDA, 2011). Devido aos ótimos índices de controle, o ametryn é comercializado em mais de 10 produtos formulados e o Brasil é o maior consumidor (HERI et al., 2008).

De acordo com os índices GUS e LEACH, o ametryn tem grande probabilidade de atingir águas superficiais e subterrâneas (Tabela 11), e, um fator que diz respeito à sua mobilidade no solo, é o pH. Por ser um herbicida básico, o aumento do pH do solo provoca a movimentação do ametryn no sentido vertical, em função da falta de afinidade da molécula com as cargas negativas das argilas (FERRI et al., 2000). Destaca-se também que menores teores de matéria orgânica também possibilitam tal fato (ANDRADE et al., 2010).

O herbicida pendimethalin é classificado como não móvel no solo pelo governo da Inglaterra (PPDB, 2013), em função de sua baixa solubilidade e alta adsorção ao solo (Tabela 11). Porém, esse herbicida possui meia vida acima de três anos, aliado a isso, o alto valor para pressão de vapor, também o classifica como importante contaminante de corpos de água (COUNCIL DIRECTIVE, 1998; PFEUFFER e RAND, 2004).

Detectado em frequência semelhante ao pendimethalin, o herbicida imazapyr é utilizado na microbacia em estudo, em dose de 200 g ha^{-1} , comumente em misturas (RODRIGUES e ALMEIDA, 2011). Esse produto tem sua movimentação no solo muito influenciada pelo pH (ISMAIL e AHMAD, 1994). Segundo Monquero et al. (2008), o imazapyr é menos lixiviável que ametryn, hexazinone e diuron, em Latossolo Vermelho distrófico, mesmo assim, é classificado como medianamente perigoso a corpos de água em função de sua solubilidade, segunda maior dos herbicidas aqui avaliados (Tabela 11).

Em uma amostra de água de córrego, do ponto CO16 (coordenadas $21^\circ 17' 46,75'' \text{ S}$ e $48^\circ 25' 26,98'' \text{ O}$), na coleta realizada em dezembro de 2010, foram

detectados $1,52 \mu\text{g L}^{-1}$ do herbicida imazapic. Com exceção dessa amostra, a contaminação das demais pelo próprio imazapic, amicarbazone, isoxaflutole e diclosulan ocorreram em baixas frequências (Tabela 6) e em concentrações abaixo do limite de quantificação do método analítico.

O amicarbazone possui elevada solubilidade em água e baixa pressão de vapor (VENCILL, 2002). Após as chuvas, o herbicida possui alta mobilidade e eficácia no solo, justificando o seu uso no sistema de cana crua. Já o imazapic, é utilizado em baixo volume (ARMAS et al., 2005), mas possui $t_{1/2}$ aproximada de quatro meses. Por outro lado, o isoxaflutole apresenta baixo valor de $t_{1/2}$ e é utilizado em dosagem aproximada de 750 g ha^{-1} (Tabela 1). Finalmente, o herbicida diclosulan, é utilizado em baixa dosagem e apesar de encontrado em baixa frequência, é classificado pelo índice GUS como altamente de alto risco para contaminação de água subterrânea.

Dessa forma, é provável que os fatores mais influentes na detecção desses herbicidas, sejam a utilização pelos agricultores e a não implementação de práticas básicas de manejo de solo e tecnologia de aplicação. Ressalta-se também, que em trabalho realizado por Armas et al. (2005), constatou-se menor frequência de uso desses herbicidas em cana-de-açúcar na bacia hidrográfica do rio Corumbataí, em Piracicaba, SP.

O herbicida sulfometuron-methyl, considerado moderadamente móvel no solo, é utilizado como maturador de cana-de-açúcar, ou em mistura com hexazinone e diuron para o controle de plantas daninhas, com dose utilizada de 20 e 30 g ha^{-1} respectivamente (RODRIGUES e ALMEIDA, 2011). É provável que esses fatores propiciaram a não detecção do herbicida nas amostras de água.

4.2. Toxicidade e risco ambiental do atrazine para juvenis de Pacu

Foi utilizado o atrazine para os testes de toxicologia em função de sua importância como contaminante em corpos de água no Brasil (DORES et al., 2001; BORTOLUZZI et al., 2006; ARMAS et al., 2007; BRITTO et al., 2012), outros países (SPRAGUE; HERMAN e HORNBERGER, 2000; OMS, 2004; ACKERMAN, 2007; COUNCIL DIRECTIVE, 2009; DACP, 2012) e principalmente, no trabalho em questão. O ingrediente ativo foi detectado em 37% de todas as amostras e em

concentração de até $10,4 \mu\text{g L}^{-1}$ no Córrego Rico. Ressalta-se que os peixes foram expostos ao produto comercial e portanto, os efeitos estão relacionados à formulação e não exclusivamente ao ingrediente ativo.

As condições da água se mantiveram de acordo com normas oficiais (ABNT, 2011) durante as 48 horas de condução do teste de toxicidade aguda, porém, em função da toxicidade do herbicida, os peixes apresentaram sintomas de intoxicação. Imediatamente após exposição, todos os peixes apresentaram aumento no batimento opercular, agitação e mudança na tonalidade cutânea (Figura 9), ao passo que os animais do controle apenas ficaram agitados. Ainda com zero hora de exposição, os animais submetidos à maior concentração de atrazine já apresentavam busca por oxigênio (Tabela 12).

Após quatro horas de exposição, todos esses sintomas ainda foram observados, com exceção aos peixes do controle. Observou-se também que esse tempo de exposição foi suficiente para provocar hemorragia bucal em todos os peixes (Figura 9). Adicionalmente, quatro horas de exposição a 35 e 45 mg L^{-1} de atrazine, também provocaram letargia, espasmos musculares, busca por oxigênio, arfagem e natação errática. E, em função da busca por oxigênio desde zero hora de exposição, peixes submetidos a 45 mg L^{-1} de atrazine permaneceram na posição mais alta do aquário.

A cor escura da pele e a hemorragia bucal permaneceram nos peixes até o fim do ensaio. Aqueles submetidos a 35 e 45 mg L^{-1} mantiveram o maior batimento opercular, a busca por oxigênio (que manteve alguns na superfície), arfagem, natação errática, letargia e espasmos musculares. Em análise realizada um dia após início do ensaio, observou-se que 20, 25 e 35 mg L^{-1} de atrazine provocaram prolapso labial nos peixes (Figura 9) e os animais, submetidos a 15, 20 e 25 mg L^{-1} , demonstravam perda de equilíbrio (Figura 9) e se mantiveram no fundo do aquário até finalização do ensaio.

Tabela 12. Sintomas de intoxicação observados em juvenis de Pacu expostos a cinco concentrações do herbicida atrazine por 48 horas.

Sintomas de intoxicação	Horas após o tratamento			
	0	4	24	48
	----- Concentrações de atrazine que provocaram o sintoma (mg L^{-1}) -----			
Maior batimento opercular	15, 20, 25, 35 e 45	15, 20, 25, 35 e 45	35 e 45	15 e 20
Menor batimento opercular	-	-	-	25 e 35
Busca por oxigênio	45	35 e 45	35 e 45	25 e 35
Arfagem	-	35 e 45	35 e 45	35
Natação errática	-	35 e 45	35 e 45	25
Agitação	todas	15, 20, 25, 35 e 45	15	-
Permanência na superfície	-	45	35 e 45	35
Permanência no fundo	-	-	15, 20 e 25	15, 20 e 25
Letargia	-	35 e 45	35 e 45	35
Espasmos musculares	-	35 e 45	35 e 45	35
Corrosão da pele	-	-	-	-
Mudança de coloração da pele	15, 20, 25, 35 e 45	15, 20, 25, 35 e 45	15, 20, 25, 35 e 45	15, 20, 25 e 35
Hemorragia bucal		15, 20, 25, 35 e 45	15, 20, 25, 35 e 45	15, 20, 25 e 35
Prolapso labial	-	-	20, 25 e 35	20, 25 e 35

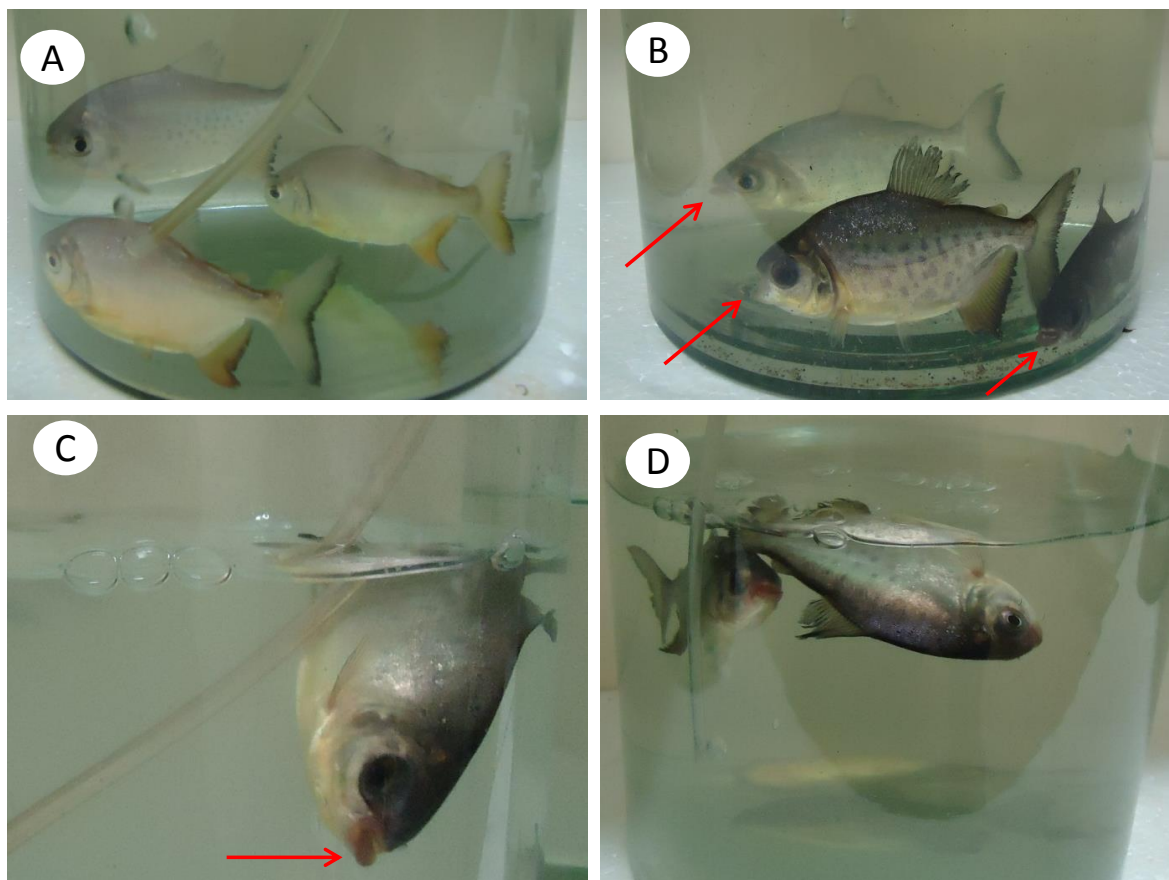


Figura 9. Sintomas de intoxicação ao herbicida atrazine apresentados por juvenis de Pacu expostos por 24 horas. A - peixes do controle. B - prolápio labial (setas) e mudança na coloração da pele em exemplares submetidos a 20 mg L^{-1} . C - hemorragia bucal (seta) em peixe exposto a 25 mg L^{-1} . D - Perda de equilíbrio em peixes expostos a 35 mg L^{-1} .

Às 48 horas após o início do ensaio, peixes submetidos a 15 e 20 mg L^{-1} apresentavam alto batimento opercular em relação ao controle, ao passo que os animais submetidos a 25 e 35 mg L^{-1} apresentavam baixo batimento opercular. Alguns peixes ainda apresentavam letargia e espasmos musculares e os exemplares submetidos a 15 , 20 e 25 mg L^{-1} permaneceram no fundo dos aquários. Por outro lado, o atrazine não provocou corrosão na pele dos animais.

Em concentração de apenas $6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, o herbicida atrazine provoca distúrbios na respiração e no equilíbrio em exemplares de *Brachidanio rerio* (STEINBERG et al., 1995) e *Carassius auratus* (SAGLIO e TRIJASSE, 1988). Conforme destacado por Shiogiri (2011), dois dos primeiros sintomas de intoxicação apresentados por exemplares de Pacu, ao herbicida glyphosate, são o aumento no batimento

opercular e problemas de equilíbrio. Mas, a mudança de coloração é também indicativo de estresse por contaminações diversas (BALDISSEROTO e GOMES, 2010) e a mudança de comportamento é muito comum em peixes diante da presença de herbicidas na água (SAGLIO; OLSÉN e BRETAUD, 2001).

Apesar de se estudar os efeitos do atrazine a peixes há mais de 40 anos (PETERS e COOK, 1973) e verificar sintomas de intoxicação em exposições de curto ou longo período, diante de baixas e altas concentrações, a comunidade científica tem dificuldade para explicar qual é a principal ação do atrazine sobre os organismos. Sendo que o produto não bioacumula e é rapidamente metabolizado (SOLOMON et al., 2008).

O herbicida atrazine provoca efeitos negativos nas brânquias dos teleósteos (WIEGAND et al., 2001), e devido à importância vital desse órgão, danos ao mesmo refletem em diferente comportamento dos animais, principalmente reflexos relacionados a distúrbios respiratórios, como busca por oxigênio e prolapso labial, além de dificuldade em manutenção e movimentação na coluna de água (GRAYMORE; STAGNITTI e ALLINSON, 2001).

Adicionalmente, devido à maior exposição bucal dos peixes ao contaminante, e às características lipofílicas do herbicida atrazine, otimizada pela formulação comercial do produto (RODRIGUES e ALMEIDA, 2011), ocorre rápida absorção do mesmo nas células da região bucal. Dessa forma, de acordo com características tóxicas às células, como formação de radicais tóxicos, estresse oxidativo e consequente lipoperoxidação observa-se hemorragia. Elia, Waller e Norton (2002) e Wiegand et al. (2001) relatam o aumento na atividade de enzimas antioxidantes em peixes expostos ao atrazine.

Na determinação da dose letal média (CL50), observou-se que o atrazine, em concentração de até 15 mg L⁻¹, não causou mortalidade após 48 horas. Por outro lado, houve 33, 44, 67 e 100% de mortalidade aos peixes submetidos a 20, 25, 35 e 45 mg L⁻¹ de atrazine respectivamente, o que demonstra a letalidade de forma dose-dependente (Figura 10). Dessa forma, a CL50:48h foi estimada em 26,46 mg L⁻¹, com limites inferior e superior iguais a 22,69 e 30,85 mg L⁻¹ respectivamente.

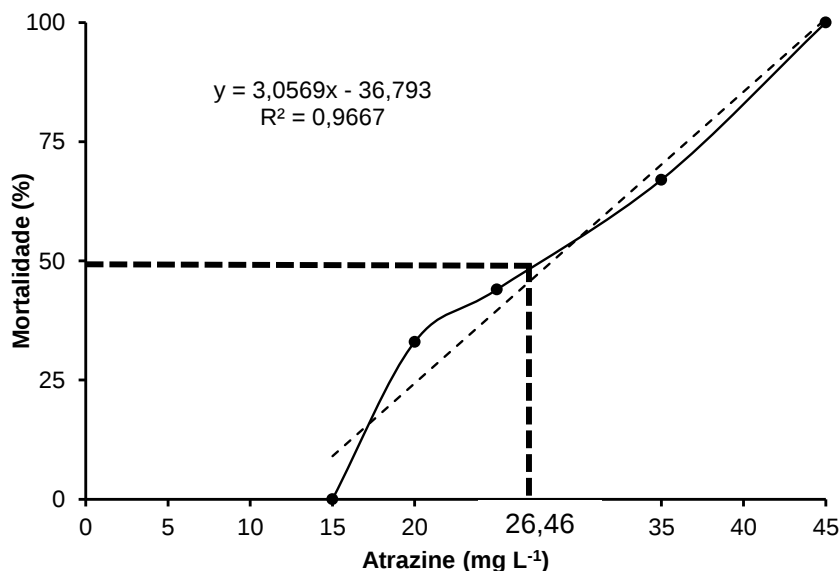


Figura 10. Efeito de atrazine a juvenis de Pacu em teste para determinação de toxicidade aguda (CL50:48h).

Em classificação proposta por Zucker (1985), o atrazine é considerado ligeiramente tóxico ao Pacu em função do valor calculado de CL50 ($10 < \text{CL50} < 100 \text{ mg L}^{-1}$). Outros valores de CL50 o enquadrariam em extremamente tóxico (abaixo de 0,1), altamente tóxico (entre 0,1 e 1,0), moderadamente tóxico (entre 1,0 e 10,0) ou praticamente não tóxico (acima de 100 mg L^{-1}). No Brasil, os produtos comerciais que contêm atrazine se enquadram nas classes II, III ou IV, sendo portanto, pouco, medianamente ou altamente tóxicos. Todos são considerados altamente perigosos ao meio ambiente (BRASIL, 2013).

De acordo com Rodrigues e Almeida (2011), o atrazine tem CL50 estimada em $9,9 \text{ mg L}^{-1}$ para trutas (*Oncorhynchus mykiss*), já para Botelho et al. (2009), este parâmetro para alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) é de $5,02 \text{ mg L}^{-1}$. Por outro lado, para Santos e Botelho (2009), a CL50 de atrazine para alevinos de carpa (*Ctenopharyngodon idella*) é de $36,83 \text{ mg L}^{-1}$ e, para SOLOMON et al. (2008), é de 100 mg L^{-1} para pimpão (*Carassius carassius*). Essas espécies são originárias da América do Norte, África, Ásia e Europa respectivamente (KUNZ, 2004).

Nesse sentido, observa-se que a CL50 para juvenis de Pacu se encontra em posição intermediária em relação aos outros peixes, e esse parâmetro é importante em estudos sobre o impacto de atrazine ao agrossistema cana, principalmente em função da importância do Pacu no Brasil em relação ao seu ambiente natural (bacia

do rio da prata), pois grande parte dos rios é alimentada por águas de bacias hidrográficas com cultivo intenso de cana-de-açúcar (BRASIL, 2013).

No teste para avaliação da toxicidade crônica do atrazine, aos juvenis de Pacu, não ocorreu mortalidade durante os sete dias de exposição. Os sintomas de intoxicação observados foram apenas de agitação e mudança na coloração da pele para os exemplares expostos à maior concentração ($5,29 \text{ mg L}^{-1}$). Novamente, os sintomas foram provocados em função da toxicidade do atrazine, uma vez que os parâmetros da qualidade de água foram iguais em relação ao controle.

Porém, houve aumento da condutividade elétrica da água e diminuição do oxigênio dissolvido em todos os aquários, graças à ração e aos resíduos liberados pelos peixes (BOYD, 1990). A menor concentração de O_2 mensurada ocorreu no último dia de avaliação e foi de $3,6 \text{ mg L}^{-1}$, e, o maior valor de condutividade elétrica foi também detectado no sétimo dia de ensaio e acusou $248,3 \mu\text{S.cm}^{-1}$.

Mas, de acordo com Bastos et al. (2007) e Baldisseroto e Gomes (2010), a mudança observada na qualidade da água não provoca mortalidade ao Pacu. Dessa forma, de acordo com a faixa de concentrações utilizadas, fica evidente que para juvenis de Pacu as concentrações de efeito observado e não observado (CEO e CENO) se encontram acima de $5,26 \text{ mg L}^{-1}$.

O fato de juvenis de Pacu não apresentarem mortalidade após sete dias de exposição ao herbicida atrazine, não significa que o produto, nas concentrações avaliadas, não é tóxico aos animais (OLIVI et al., 2008). Inclusive, nas concentrações, determinadas em função da $\text{CL}_{50:48\text{h}}$, como bioindicadores os peixes podem apresentar mudanças fisiológicas e bioquímicas, dentre outras (CAZENAVE et al., 2009), que justificam estudos em níveis teciduais.

De acordo com os valores obtidos de: concentração letal média, concentração de efeito não observado (no teste de toxicidade crônica) e valores de concentração ambiental do herbicida atrazine, foram verificados diferentes valores de quociente de risco do herbicida aos juvenis de Pacu (Tabela 13).

Porém, de acordo com a classificação citada por Urban e Cook (1986), o atrazine é considerado como contaminante que apresenta risco com nenhum efeito adverso, independente da CAE utilizada. De forma similar, Goktepe, Portier e Ahmedna (2004) classificam o herbicida em baixo risco ao Pacu, pois o QR

calculado foi menor que 0,05. Adicionalmente, para CEC (2003) o atrazine não causa risco de intoxicação ao Pacu em função do QR ser menor que 1.

Tabela 13. Valores de Quociente de Risco (QR) de atrazine para juvenis de Pacu, em função de valores de Concentração Ambiental Estimada (CAE), concentração letal média (CL50:48h) e Concentração de Efeito não Observado (CENO), corrigidos por fator de segurança (SOLOMON et al., 1996).

QR	CAE		Valor	QRfs	Fonte
1	0,0104	CL50:48h: 26,46	0,0004	0,04	Urban & Cook,1986 e Goktepe, Portier e Ahmedna, 2004
2	0,0875		0,0033	0,33	
3	0,2000		0,0075	0,75	
4	0,0104	CENO: 5,26	0,0020	0,20	Commission of the European Communities, 2003
5	0,0875		0,0166	1,66	
6	0,2000		0,0380	3,80	

É indicado que a avaliação de risco parta do pressuposto de pior cenário (Urban e Cook, 1986) nas condições em questão (risco do herbicida atrazine ao bioindicador Pacu). Nesse sentido, diversos programas de avaliação de risco são utilizados, porém, Wu et al. (2008) destacam que a maior parte está associada a alto grau de incertezas por partirem de premissas arbitrárias.

Avaliando-se o QR corrigido pelo fator de segurança proposto por Solomon et al. (1996), e considerando-se a concentração real encontrada no córrego da microbacia do Córrego Rico, o herbicida atrazine ainda é considerado de baixo risco aos juvenis de Pacu de acordo com os critérios de Urban e Cook (1986), CEC (2003) e Goktepe, Portier e Ahmedna (2004). Porém, se consideramos as doses utilizadas em campo, observam-se diferentes classificações para o herbicida: para as doses de 1,75 e 4,0 kg ha⁻¹, o herbicida causa risco de intoxicação com probabilidade de efeito adverso para o Pacu (URBAN e COOK, 1986; CEC, 2003); ou, o herbicida é de moderado risco, se utilizada a menor dose; e de alto risco, caso seja utilizada a maior (GOKTEPE, PORTIER e AHMEDNA, 2004).

Em trabalho similar, Moura (2009) demonstrou que para *Oreochromis niloticus*, *Colossoma macropomum* e *Cyprinus carpio*, considerando o pior cenário e maior dose de campo, o herbicida glyphosate é classificado em moderado risco.

Além disso, o autor verificou valores de CAE e CL50 acima dos níveis aceitáveis, sugerindo outras análises toxicológicas.

4.3. Análises histopatológicas de brânquias e fígado de juvenis de Pacu expostos ao atrazine

No teste para determinação da concentração letal média (CL50), após o término (48 horas), houve 100% de mortalidade apenas nos animais expostos a 45 mg L⁻¹ de atrazine. Dessa forma, seguiu-se à análise histopatológica dos animais sobreviventes. E no teste crônico, três exemplares de cada concentração, foram avaliados, pois não houve mortalidade em qualquer concentração.

No ensaio agudo, os peixes que permaneceram, por 48 horas, sem a contaminação por atrazine, não apresentaram evidências de intoxicação nas brânquias. Observa-se organização original das lamelas primárias e secundárias e morfologia normal das células. De forma diferente, animais expostos a 15 mg L⁻¹ apresentaram aumento no epitélio interlamelar e no número de células mucosas na lamela secundária, observou-se também, fusão de lamelas em todos os peixes expostos a mais de 15 mg L⁻¹.

Os peixes expostos a 20 e 25 mg L⁻¹ de atrazine apresentaram os sintomas acima descritos e também estase sanguínea no interior da lamela. Destaca-se que o número de células mucosas é maior conforme a concentração. Finalmente, em concentração letal (35 mg L⁻¹) o atrazine provocou os sintomas anteriormente citados, edema subepitelial e desarranjo na sustentação das lamelas (Figura 11).

Os peixes que foram submetidos ao atrazine por sete dias, apresentaram menos danos nas brânquias e em menor frequência. Foram observadas estase sanguínea (Figura 11) e diminuição do espaço interlamelar nos tratamentos correspondentes a 5,29 e 2,65 mg L⁻¹ de atrazine. Por outro lado, os exemplares expostos às menores concentrações não apresentaram sintomas de intoxicação.

Devido ao seu poder oxidante, conferido pelo cloro no anel heterocíclico, e características de lipofilicidade, a molécula de atrazine é abrasiva e de infiltração rápida no tecido branquial (Wang et al., 2011). O que pode também provocar a formação de estase sanguínea, como mecanismo para aumento da oxigenação, conforme relatado por Avilez (2008). Foi também detectada baixa concentração de

O₂ (abaixo de 4,0 mg L⁻¹) ao sétimo dia no ensaio crônico, o que também aumenta a necessidade por melhor respiração branquial.

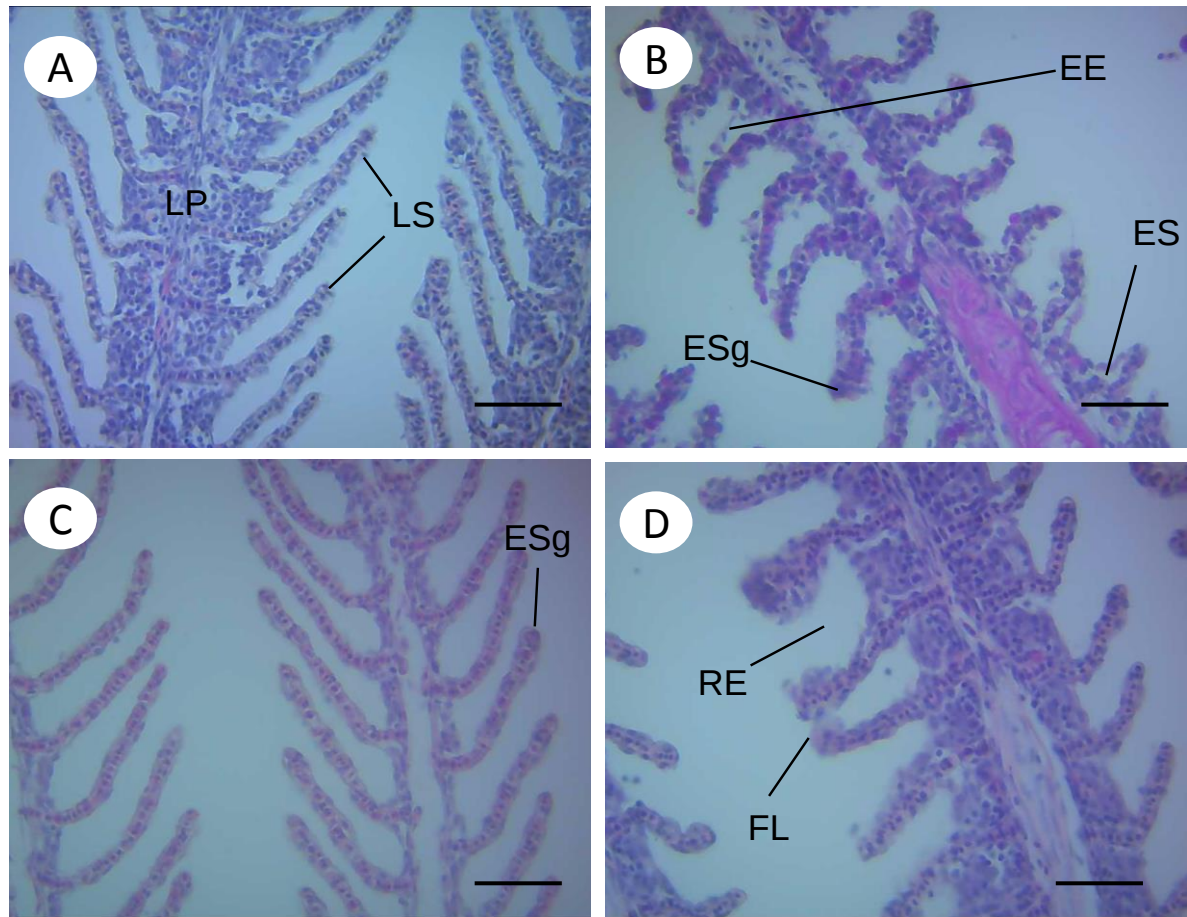


Figura 11. Cortes longitudinais de filamentos branquiais de juvenis de Pacu expostos ao atrazine. Barra de escala = 50 µm. A - organização de Lamelas Primária (LP) e Secundária (LS) do exemplar controle. B - Elevação do Epitélio lamelar (EE), Edema Subepitelial (ES) e Estase Sanguínea (ESg) em peixe exposto a 35 mg L⁻¹ por 48 horas. C - Estase Sanguínea em exemplar exposto a 5,29 mg L⁻¹ por sete dias. D - Redução do Espaço interlamelar (RE) e Fusão apical de Lamelas (FL) em peixe exposto a 20 mg L⁻¹ por 48 horas.

Uma das mais importantes e pioneiras formas de defesa branquial contra partículas abrasivas, microrganismos patogênicos e poluentes são as células mucosas presentes na superfície do filamento epitelial. O muco produzido por elas ocorre de forma instantânea após detecção do contaminante e evita danos a constituintes menos expostos das lamelas (MORON; ANDRADE e FERNANDES, 2009).

Durante os processos de hematose, a maquinaria branquial é composta basicamente por epitélio pavimentoso ancorado por células pilares, em sistema com espaços intercalares para o fluxo, por onde se inserem os capilares sanguíneos (HIBIYA, 1982). Diante de um contaminante, uma estratégia desenvolvida pelos peixes é a diminuição do espaço para trocas, assim, a fusão lamelar e a diminuição da área interlamelar, apresentada pelos peixes expostos ao atrazine, pode ser considerada uma tentativa de amenizar a intoxicação (BARRETO, 2007).

Uma vez que o contaminante persiste no ambiente branquial e os danos aos constituintes aumentam, observam-se sintomas mais severos de intoxicação, como edema subepitelial na lamela secundária e consequente desarranjo (SIMONATO; ALBINATI e MARTINEZ, 2006), conforme ocorreu a peixes submetidos a 35 mg L^{-1} de atrazine. A partir desse estágio, a entrada do contaminante no organismo aumenta progressivamente e os danos se estendem aos outros órgãos (RAJBANSHI e GUPTA, 1988). Nesse caso, a concentração de 35 mg L^{-1} de atrazine pode ser caracterizada letal em virtude desses danos iniciais às brânquias.

Desarranjos das lamelas e edemas são de fato mecanismos de defesa, principalmente diante de intoxicação constante. Jayachandran e Pugazhendy (2009) observaram que brânquias de *Labeo rohita* (carpa indiana), expostas por 120 horas, a $0,18 \text{ mg L}^{-1}$ de atrazine, apresentaram esses sintomas. Porém, os edemas podem aumentar em função do aumento do fluxo sanguíneo requerido graças à demanda metabólica para detoxificação (WILSON e LAURENT, 2002). Adicionalmente, os danos celulares também provocam estase sanguínea e desarranjos (ROSETY-RODRIGUES et al., 2002).

Finalmente, destaca-se que todos os sintomas histopatológicos apresentados não são exclusividade do herbicida atrazine. Essas alterações são também relatadas após exposição de peixes a inseticidas organofosforados (FANTA et al., 2003), derivados de petróleo, (SIMONATO; GUEDES e MARTINEZ, 2008), cobre (MAZON et al., 2002), alumínio (CAMARGO; FERNANDES e MARTINEZ, 2009), ao herbicida diquat (HENARES et al., 2010), dentre outros.

O fígado, muitas vezes, é o principal órgão envolvido na biotransformação de compostos tóxicos (VAN DER OOST; BEYER e VERMEULEN, 2003) ao organismo dos peixes, no caso do atrazine, há evidências de que seja o principal (SANTOS et

al., 2010). Por esse motivo, devido aos danos provocados às brânquias, é de se esperar que ocorram danos histopatológicos no fígado também.

De fato, os juvenis de Pacu expostos a atrazine, independente da concentração ou período de exposição, apresentaram aumento no diâmetro do capilar sinusóide como o mais frequente sintoma de intoxicação. Conforme relatado por Solomon et al. (2008), esse sintoma pode ser indicativo de aumento de fluxo sanguíneo na região de contaminação, com o intuito de eliminação mais rápida do xenobiótico e posterior excreção renal ou branquial.

Caso não haja total excreção, o processo de desintoxicação pode envolver a proliferação de membranas endoplasmáticas no fígado dos peixes, o que também remete ao aumento do diâmetro do capilar sinusóide em juvenis de pacu (SIMONATO et al., 2006). Mas, essa espécie apresenta o mesmo sintoma em caso de intoxicação por triclorfon (MATAQUEIRO, 2006), um inseticida organofosforado, e pelo herbicida diquat (HENARES et al., 2010).

Em condições normais, o fígado de Pacu é constituído por capilares sinusóides e hepatócitos em arranjo cordonal característico. As células possuem formato hexagonal com citoplasma evidente e o núcleo tem posição parcialmente marginal, conforme exemplar controle (Figura 12). É possível também a observação de grânulos de glicogênio em visualização de material corado em reação de PAS (SOUZA et al., 2001).

Assim, observa-se que, além do aumento do diâmetro do capilar sinusóide, peixes submetidos ao atrazine também apresentaram ligeiras modificações nos hepatócitos. Peixes expostos a 0,265 e 0,530 mg L⁻¹ de atrazine, por sete dias, apresentaram desarranjo cordonal na organização dos hepatócitos e houve consumo de glicogênio em locais próximos ao capilar. À medida que se aumentou a concentração de atrazine na solução, maior foi o consumo de glicogênio, de tal modo que peixes expostos a 35 mg L⁻¹, por 48 horas, não apresentaram glicogênio estocado.

A integridade dos hepatócitos foi afetada apenas nos peixes submetidos ao ensaio crônico, em concentrações de 5,29 e 2,65 mg L⁻¹ de atrazine. Mesmo em concentração letal (35 mg L⁻¹), o atrazine não causou danos à integridade das células hepáticas, sugerindo que o fator tempo é mais importante que a

concentração de atrazine na solução e que os danos são reversíveis diante de concentrações agudas, conforme relatado por Poleksic e Mitrovic-Tundundzia (1994).

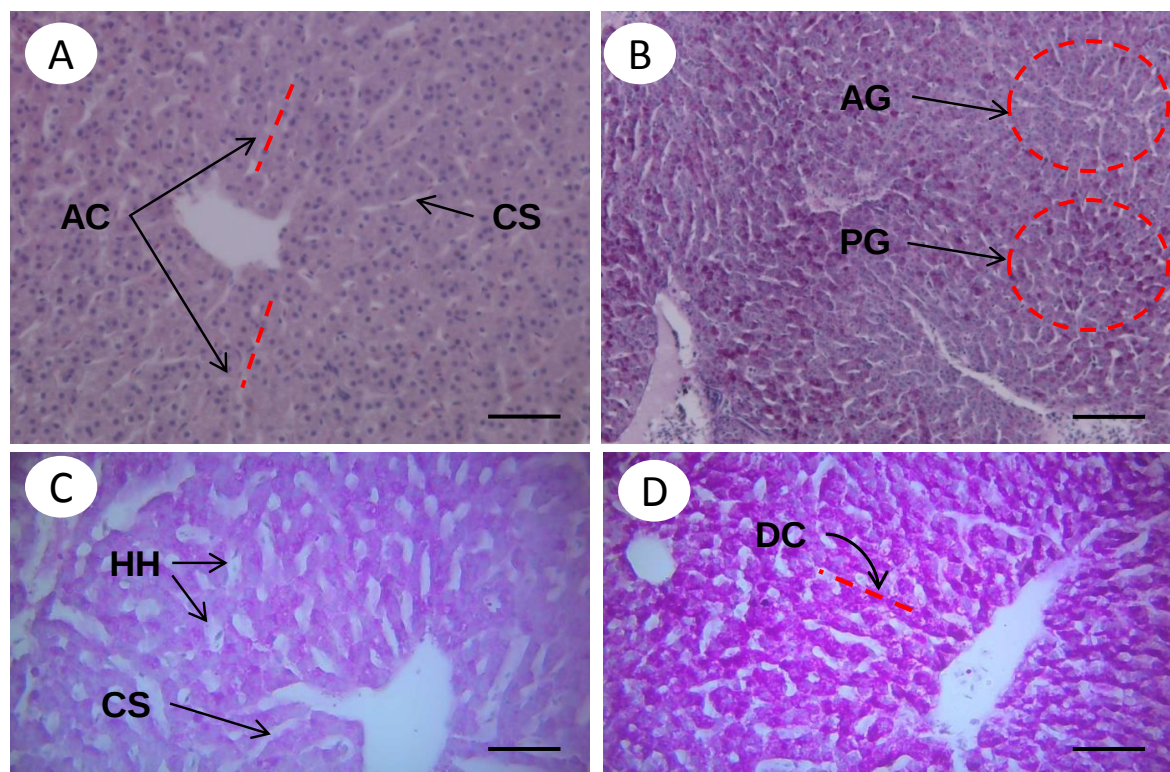


Figura 12. Cortes transversais do fígado de juvenis de Pacu expostos ao atrazine. Barra de escala = 40 μm . A - organização dos hepatócitos em Arranjo Cordonal (AC) e Capilar Sinusóide (CS) de exemplar do controle. B - hepatócitos com Ausência (AG) e presença de Glicogênio (PG) em exemplar exposto a 25 mg L^{-1} por 48 horas. C - aumento do diâmetro do Capilar Sinusóide (CS) em exemplar exposto a 5,29 mg L^{-1} por sete dias. D – Desorganização do Capilar sinusóide (DC) em exemplar exposto a 0,53 mg L^{-1} por sete dias.

Para processo de degradação do atrazine, ocorre aumento na maquinaria enzimática, o que provoca deslocamento do núcleo celular e hipertrofia dos hepatócitos (SINDERMAN, 1983). Somando-se a isso, o metabolismo consome o glicogênio, principalmente em região próxima ao capilar, local de primeiro contato do xenobiótico com o órgão, dessa forma, é possível observar diferentes concentrações de glicogênio de acordo com a posição dos hepatócitos em função do capilar sinusóide, de forma evidente em peixe exposto a 25 mg L^{-1} de atrazine por 48 horas (Figura 12).

4.4. Atividade da acetilcolinesterase cerebral em juvenis de Pacu submetidos a concentrações letais e subletais de atrazine

Na avaliação dos sinais de intoxicação apresentados pelos peixes em ensaio agudo, observou-se natação errática, agitação, letargia e espasmos musculares, sintomas relacionados ao equilíbrio dos animais na coluna de água, o que pode ser dependente da atividade da enzima acetilcolinesterase (MIRON et al., 2005).

De fato, observou-se que a quantidade de acetilcolina hidrolisada foi influenciada pelo atrazine. Independente da concentração, peixes expostos ao herbicida apresentaram atividade da acetilcolinesterase cerca de 50% a mais em relação aos animais do controle, porém, não houve diferença em relação às concentrações (Figura 13).

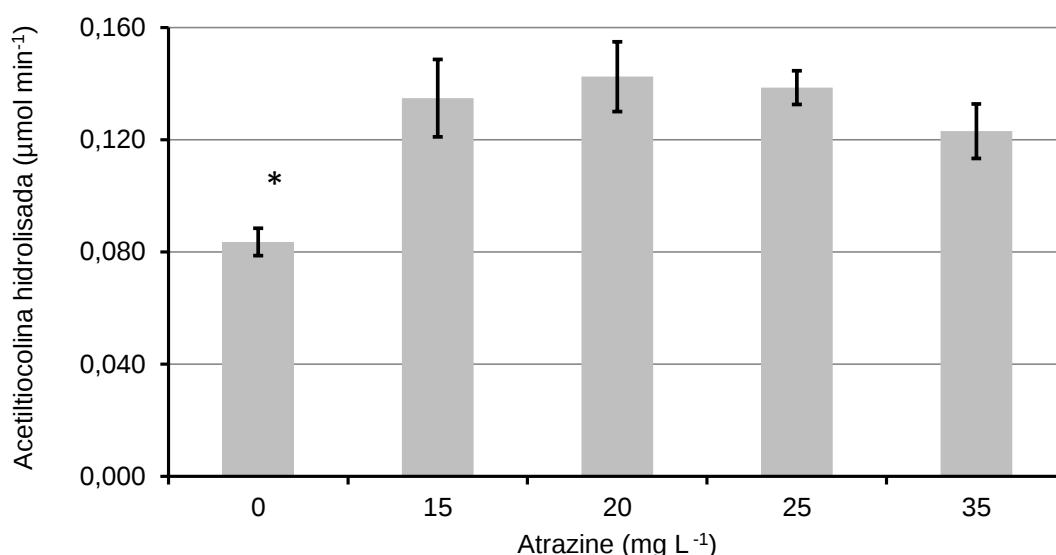


Figura 13. Acetilcolina hidrolisada (micromol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) em cérebro de juvenis de Pacu após exposição, por 48 horas, a cinco concentrações de atrazine. *diferença significativa ($P > 0,05$).

É sabido que de maneira geral, alguns herbicidas são inibidores da enzima acetilcolinesterase em peixes. Em juvenis de *Carassius auratus*, diuron e nicosulfuron causam mais de 50% de inibição em exposição por 48 horas de concentrações subletais (BRETAUD; TOUTANT e SAGLIO, 2000). Da mesma forma, para Miron et al. (2005), alevinos de *Rhamdia quelen* têm até 83% de diminuição na atividade da acetilcolinesterase em cérebro, quando submetidos ao

clomazone. Assim, se a atividade dessa enzima estiver diminuída, ocorre acúmulo de acetilcolina na sinapse colinérgica central e consequente distúrbios musculares (SAGLIO e TRIJASSE, 1998).

Porém, com os juvenis de Pacu aqui avaliados, houve efeito positivo do atrazine à enzima, resultados que corroboram com os descritos por Miron et al. (2005). Esses autores verificaram que alevinos de *Rhamdia quelen*, quando submetidos ao herbicida quinclorac e metsulfuron-methyl, tiveram a atividade da enzima acetilcolinesterase cerebral aumentada em 98 e 173% respectivamente, indicando que o efeito inibidor e estimulante à acetilcolinesterase, pode provocar resultados similares no processo de neurotransmissão colinérgica.

Os herbicidas clomazone e metsulfuron-methyl e o inseticida propanil também provocam aumento na atividade da acetilcolinesterase em músculo de *Leporinus obtusidens*, ao passo que o clomazone e o quinclorac provocam o efeito oposto no cérebro (MORAES et al., 2007). Os autores destacam que a ativação da enzima pode estar relacionada a um aumento rápido em seu substrato acetiltiocolina, em resposta ao contaminante, e por esse motivo, ocorre aumento na atividade apenas em curto período e em concentrações elevadas.

Em revisão recente, Wang et al. (2011) relatam os efeitos do atrazine na acetilcolinesterase em músculo e cérebro de peixes. Em sua maioria, os resultados indicam inibição da enzima em exposições a concentrações crônicas em médio período. Porém, há também relatos de efeito positivo à atividade em cérebro de *Cyprinus carpio* (XING et al., 2010). Esses autores destacam que o atrazine pode estar diretamente envolvido na expressão de genes relacionados à enzima, em estudo após verificarem mudanças nos níveis de RNAm da acetilcolinesterase. A depender da espécie de peixe, ocorre estímulo ao RNAm e síntese enzimática de acordo com a intoxicação e período, porém, há a necessidade de maiores estudos, principalmente em peixes.

5. CONCLUSÕES

Na avaliação da detecção de herbicidas, utilizados em cana-de-açúcar, verificou-se que 87,6% das amostras de água da microbacia hidrográfica do Córrego Rico possuem pelo menos um herbicida como contaminante.

Em amostras de chuva, córregos, nascentes e poços artesianos, o clomazone é o mais frequente. Além disso, foram detectados ametryn, amicarbazone, atrazine, diclosulan, diuron, hexazinone, imazapic, imazapyr, isoxaflutole, pentimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone e tebuthiuron.

O maior resíduo de herbicida encontrado foi em uma amostra de córrego, na primeira época de coleta, e foi igual a $10,4 \mu\text{g L}^{-1}$ de atrazine. Adicionalmente, somando-se todos, foram detectados até $24,01 \mu\text{g L}^{-1}$ de herbicidas em uma amostra de córrego, também na primeira época de coleta.

Quanto à toxicidade aos juvenis de Pacu, a $\text{CL}_{50};48\text{h}$ determinada foi de $26,46 \text{ mg L}^{-1}$ de atrazine e não houve mortalidade no ensaio de toxicidade crônica.

Considerando a maior contaminação de atrazine na microbacia hidrográfica do Córrego Rico, esse herbicida é classificado como de baixo risco e com nenhum efeito adverso a juvenis de Pacu.

Com 48 horas de exposição, a 15 mg L^{-1} de atrazine, houve aumento no epitélio interlamelar e no número de células mucosas, na lamela secundária de brânquias de juvenis de Pacu, e no mesmo período, mas em concentração de 20 e 25 mg L^{-1} , surge também estase sanguínea.

Quando os peixes foram submetidos por sete dias ao atrazine, foi observado, no fígado, desarranjo cordonal dos hepatócitos e consumo de glicogênio em exposições de 0,265 e $0,530 \text{ mg L}^{-1}$. A concentração de $2,65 \text{ mg L}^{-1}$ provocou também hipertrofia dos hepatócitos e esses efeitos aumentaram na concentração de $5,29 \text{ mg L}^{-1}$.

Após 48 horas de exposição a 15, 20, 25 e 35 mg L^{-1} de atrazine, é constatado aumento, de aproximadamente 50%, na atividade da enzima acetilcolinesterase em cérebros de juvenis de Pacu.

6. REFERÊNCIAS

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 15088: **Ecotoxicologia aquática**. Toxicidade aguda. Método de ensaio com peixes. São Paulo, 2011. 19 p.
- ACKERMAN, F. The Economics of Atrazine. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v. 13, n. 6, p. 441 - 448, 2007.
- ADAMS, S. M. **Biological indicators of aquatic ecosystem stress**. Am. Fish. Sc. 3, 104-112, 2002
- ALBINATI, A. C. L. MOREIRA, E. L. T. ALBINATI, R. C. B. CARVALHO, J. V. SANTOS, G. B. LIRA, A. D. Toxicidade aguda do herbicida roundup® para piaçu (*Leporinus macrocephalus*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 3, p. 184-192, 2007
- ALBINATI, A. C. L., MOREIRA, E. L. T., ALBINATI, R. C. B., CARVALHO, J. V., LIRA, A. D., SANTOS, G. B., e VIDAL, L. V. O. Biomarcadores histológicos: toxicidade crônica pelo Roundup em piaçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 621-627, 2009
- ANDRADE, S. R. B.; SILVA, A. A.; LIMA, C. F.; D'ANTONINO, L.; QUEIROZ, M. E. L. R.; FRANÇA, A. C.; FELIPE, R. S. e VICTORIA FILHO, R. Lixiviação do ametryn em argissolo vermelho-amarelo e latossolo vermelho-amarelo, com diferentes valores de pH. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 655-663, 2010
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Toxicologia**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/para>>. Acesso em 17 maio de 2013.
- ARCOVA, F. C. S.; CICCIO, V. Características do deflúvio de duas microbacias hidrográficas no laboratório de hidrologia florestal Walter Emmench, Cunha, SP. **Revista do Instituto Florestal de São Paulo**, v. 9, n. 2, p. 153-170, 1997
- ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R. E BAPTISTA, D. F. Use of bioindicators for assessing and monitoring pesticides contamination in streams and rivers. **Ciência Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007
- ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R.; AMÂNCIO, A. V.; CORREA, R. M. L. E GUERCIO, M. A. The use of pesticides in sugar cane at the Corumbataí river basin and the risk of water pollution. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 975-982, 2005.
- ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. S.; ANTUNES, P. M. e SANTOS, M. A. P. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**, v. 30, n. 5, 2007.
- AVILEZ, I. M. **Metabolismo antioxidativo, biotransformação hepática e alterações histológicas de Matrinxã (*Brycon amazonicus*, SPIX & AGASSIZ, 1829, CHARACIDAE) exposto ao fenol**. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) Universidade Federal de São Carlos, 90f., 2008
- BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C. (Ed.) **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2010. 608 p.

BARRETO, T. R. **Alterações morfofuncionais e metabólicas no teleósteo de água doce matrinxã, *Brycon cephalus* (GÜNTHER, 1869) exposto ao organofosforado metil paration (Folisuper 600 BR®).** 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2007.

BASTOS, V. L. F. C.; SALLES J. B.; VALENTE R. H.; LEÓN I. R.; PERALES J.; DANTAS R. F.; ALBANO R. M.; BASTOS F. F.; BASTOS J. C. Cytosolic glutathione peroxidase from liver of pacu (*Piaractus mesopotamicus*), a hypoxia-tolerant fish of the Pantanal. **Biochimie**, v. 89, n. 7. p. 1332- 1342, 2007.

BAUDO, R. Ecotoxicological testing with *Daphnia* in: PETERS, R.H. & DE BERNARDI, R. ED. *Daphnia*. Memoria Dell Instituto Italiano di Idrologia Dr. Marco de Marchi. Corsiglio Nazionale Ricerche, Verbania, Pallanza v. 45, p. 461-482, 1987.

BEHMER, A. O.; TOLOSA, E. M. C. e FERITAS-NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.** 1ª edição, Ed. Edusp/edart, 1976, 239p.

BEITZ, H.; SCHMIDT, H. e HERZEL, F. **Pesticides in ground and surface water;** Börner, H., ed.; Springer-Verlag: Berlin, 1994, 268 p.

BELLUCK, D. A.; BENJAMIN, S. L.; DAWSON, T. **Groundwater contamination by atrazine and its metabolites.** In: Pesticide Transformation Products, ACS Symposium Series, American Chemical Society, 1991, p. 254-273.

BERTOLETTI, E. Sensibilidade de Algumas Espécies de Peixes de Água Doce Utilizadas no Brasil. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 4, n. 1-3, p. 9-13, 2009.

BORGES, M. J.; GALBIATI, J. A.; FERRAUDO, A. S. Monitoramento da qualidade hídrica e eficiência de interceptores de esgoto em cursos d'água urbanos na bacia hidrográfica do córrego Jaboticabal. **Revista Brasileira de recursos Hídricos**, v. 8, n. 2, p. 161-171, 2003

BORTOLUZZI, E. C.; RHEINHEIMER, D. S.; GONÇALVES, C. S.; PELLEGRINI, J. B. R., ZANELLA, R. E COPETTI, A. C.C. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, n. 04, p. 881-887, 2006.

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

BOYD, C. E. **Water quality in ponds for aquaculture.** Alabama Agricultural Experimental Station, Auburn University, Alabama, USA, 482 p, 1990.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo 2010, **Cidades. Lavoura temporária.** Disponível em <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Acessado em 12 de Fevereiro de 2013.

BRASIL: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. AGROFIT – **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários.** Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 20 de março de 2013

- BRETAUD, S.; TOUTANT, J. P.; SAGLIO, P. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicol Environ Safety**, v. 47, n. 2, p. 117-124, 2000.
- BRITTO, F. B.; VASCO, A. N.; PEREIRA, A. P. S.; Mélo JR., A. V. e NOGUEIRA, L. C. Herbicidas no alto rio Poxim, Sergipe e os riscos de contaminação dos recursos hídricos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 390-398, 2012
- CAMARGO, M. M. P.; FERNANDES, M. N.; MARTINEZ, C. B. R. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 94, n. 6, p. 40-46, 2009
- CARABIAS-MARTÍNEZ, R.; GONZALO, E. R.; HERNANDEZ, E. H.; ROMAN, F. J. S. e FLORES, M. G. P. Determination of herbicides and metabolites by solid-phase extraction and liquid chromatography: Evaluation of pollution due to herbicides in surface and groundwaters. **Journal of Chromatography A**, v. 950, n. 1-2, p.157–166, 2002
- CAZENAVE, J.; BACCHETTA, C.; PARMA, M. J.; SCARABOTTI, P. A.; WUNDERLIN, D. A. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). **Environmental Pollution**, v. 157, n. 11, p. 3025 - 3033, 2009.
- CEC (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES). **Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances**. Part II, environmental risk assessment. Luxembourg: Office for official publication of the European Communities, 2003, p. 337.
- CERDEIRA, A., PESSOA, M., GUINAIM DOS SANTOS, N., LANCHOTE, V. Lixiviação de atrazina em solo em área de recarga do aquífero guarani. **Revista Brasileira de Herbicidas**. v. 4, n. 2, p. 92-101, 2005.
- CEREJEIRA, M. J.; VIANA, P.; BATISTA, S.; PEREIRA, T.; SILVA, E.; VALÉRIO, M. J.; SILVA, A.; FERREIRA, M.; SILVA-FERNANDES, A. M. Pesticides in Portuguese surface and ground waters. **Water Research**, v. 37, n. 11, p. 1055–1063, 2003.
- CETESB. Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos. Água – **teste de toxicidade aguda com peixes** – parte I – sistema estático. São Paulo. v. II, 1999, p. 1-29.
- CHANDLER, D.; BAILEY, A. S.; TATCHELL, G. M.; DAVIDSON, G.; GREAVES, J.; GRANT, W. P. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 366, n. 1573, p.1987–1998, 2011
- CHANG, F.; SIMCIK, M. F.; CAPEL, P. D. Occurrence and fate of the herbicide glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 3, p. 548-555, 2011
- CHOW, V. T.; MAIDMENT, D. R.; MAYES, L. W.; Applied Hydrology. McGraw-Hill Series in Water Resources and Environmental Engineering. McGraw-Hill: New York. ISBN 0-07-010810-2. xiii, 1988, 572 p.
- CONAB. **Séries históricas**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2>>. Acesso em: 14 Março de 2013.

COUNCIL DIRECTIVE. **Quality of water intend for human consumption**. Jornal Oficial das Comunidades Europeias, 1998. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:330:0032:0054:EN:PDF>. Acesso em: 30 de janeiro de 2013

CUSTODIO, E.; LLAMAS, M. **Hidrología Subterránea**. 2. ed. Barcelona: Omega, 2v. 1996

DACP: Wisconsin Department of Agriculture, **Trade and Consumer Protection**. Disponível em: http://datcp.wi.gov/Environment/Water_Quality/Atrazine/Atrazine_Prohibition_Areas/index.aspx. Acessado em 18 de março de 2013

DONADIO, N. M. M.; GALBIATTI, J. A. e PAULA, R. C. Qualidade da água de nascentes com diferentes usos do solo na bacia hidrográfica do Córrego Rico, São Paulo, Brasil. **Engenharia Agrícola**, v. 25, n. 3, p. 115-125, 2005.

DORES, E. F. G. C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas: estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso: análise preliminar. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 27-36, 2001

DUTTA, H. M., ARENDS, D. A. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. **Environment Research**. v. 91, n. 6, p.157-162. 2003

ELIA, A. C.; WALLER, W. T. e NORTON, S. J. Biochemical Responses of Bluegill Sunfish (*Lepomis macrochirus*, Rafinesque) to Atrazine Induced Oxidative Stress. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 68, n. 6. p. 809-816, 2002.

ELLMAN, G. L. COURTNEY, K. D.; ANDRES, JR. V. e FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 12, p. 88-95, 1961.

ENSMINGER, M. **Surface Water Monitoring for Rainy Season Use Herbicides in California, USA**. California Environmental Protection Agency, 2009. Disponível em http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/ehapreps/ensminger_report_255_final.pdf. Acesso em 20 de março de 2013.

EWG. Environmental Work Group. **National Drinking Water database. Over 300 Pollutants in U.S. Tap Water**. 2009. Disponível em: <http://www.ewg.org/tap-water/>. Acesso em 20 de Março de 2013.

FANTA, E. RIOS, F. S.; ROMÃO, S.; VIANNA, A. C.; CASAGRANDE, C. e REIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, n. 2, p. 119-130, 2003

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations -. **Dados de produção mundial**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>. Acesso em 14 de Setembro de 2012.

FERRACINI, V. L.; PESSOA, M. C. Y. P.; SILVA, A. S.; SPADOTTO, C. A. Análise de risco de contaminação das águas subterrâneas e superficiais da região de

Petrolina (PE) e Juazeiro (BA). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 11, n. 2, p. 1-16, 2001

FERRI, M. V. W.; VIDAL, R. A.; MEROTTO JR., A., E FLECK, N. G. Atividade dos herbicidas flumetsulam e trifluralin em diferentes valores de pH e densidade do solo. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 11-15, 2000.

FLURY, M. Experimental evidence of transport of pesticides through field soils, a review, **Journal of Environmental Quality**, v. 25, n.1 p. 25-45, 1996.

FRANCONERE, R. **Mercado de herbicidas na cultura da cana-de-açúcar**. 2010, 54 f. Dissertação (Mestrado em Agroenergia) - Escola de Economia da Fundação Getúlio Vargas, Brasília, DF, 2010.

GARTNER, L. P; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 3ª Edição. Rio de Janeiro, RJ. Elsevier, 2007. 426 p.

GOKTEPE, I.; PORTIER, R.; AHMEDNA, M. Ecological risk assessment of Neembased pesticides. **Journal of Environmental Science and Health, Part B. Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**. v. 39, n. 2, p. 311-320, 2004.

GOMES, M. A. F.; SPADOTTO, C. A.; PEREIRA, A. S.; MATALLO, M. B.; LUCHINI, L. C. Movimento do herbicida tebutiuron em dois solos representativos das áreas de recarga do aquífero Guarani. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 10, n. 2, p. 479 – 483, 2006.

GOOLSBY, D. A.; THURMAN, E. M.; POMES, M.; MEYER, M. E BATTAGLIN, W. Herbicides and Their Metabolites in Rainfall: Origin, Transport, and Deposition Patterns across the Midwestern and Northeastern United States, 1990–1991. **Environmental Science & Technology**, v. 31, n. 5, p. 1325-1333, 1997.

GRAYMORE M.; STAGNITTI, F. ALLINSON, G. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. **Environment International**, v. 26, n. 7-8, p. 483-495, 2001.

GUNDERSEN, D. T.; MILLER, R.; MISCHLER, A.; ELPERS, K.; MIMS, S. D. 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

GUSTAFSON, D. I. Groudwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 339-357, 1989.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C e THURSTON, V. Trimed Spearman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays **Environmental Science & Technology**, v. 7, n. 2, p. 714-719, 1977.

HEALTH CANADA. Canadian Drinking Water Guidelines. Disponível em http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/2012-sum_guide-res_recom/index-eng.php. Acesso em 20 de Março de 2013.

HEATH, A. G. **Water pollution and fish physiology**. 2 ed. Lewis Publishers, Boca Raton. 1995.

HENARES, M. N. P.; CRUZ, C.; GOMES, G. R.; PITELLI, R. A. e MACHADO, M. R. F. Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do herbicida diquat na brânquia e no

fígado da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum Biology Science**, v. 30, n. 1, p. 77-82, 2008.

HENARES, M. N. P.; CRUZ, C.; GOMES, G. R.; PITELLI, R. A. e MACHADO, M. R. F. Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do diquate na brânquia e no fígado do piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Pesticidas: Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 17, n. 1, p. 107-116, 2007.

HENARES, M. N. P.; CRUZ, C.; PITELLI, R. A. e MACHADO, M. R. F. Toxicidade aguda do herbicida diquat para três espécies de peixes. In. XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, 2010, Ribeirão Preto. SP. **Resumos...** Londrina: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2010, p. 3244.

HERI, W.; PFISTER, F.; CARROLL, B.; PARSHLEY, T. e NABORS, J. B. **Production, development, and registration of Triazine herbicides**. u: LE BARON H.; MCFARLAND, J.; BURNSIDE O. (ur.) The Triazine Herbicides, 50 Years Revolutionizing Agriculture, p. 31-45, 2008.

HIBIYA, T. **An atlas of fish histology. Normal and pathological features**. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1982, 147 p.

IBAMA. **Avaliação da toxicidade aguda para peixes**. Parte D. 3. Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos. Brasília, DF, 1987.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2008. **Estatística da pesca 2007**. Brasil, grandes regiões e unidades da Federação. Brasília, 151p.

INOUE, M. H.; MENDES, K. F.; SANTANA, C. T. C. e POSSAMAI, A. C. S. Atividade residual de herbicidas pré-emergentes aplicados em solos contrastantes. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 10, n. 3, p. 232-242, 2011.

ISMAIL, B. S.; AHMAD, A. R. Attenuation of the herbicidal activities of glufosinate - ammonium and imazapyr in two soils. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 47, n. 2, p. 279-285, 1994.

ITALIANO, W. L.; HOJAIJ, A.; COSTA JR., LOURENÇO, L.; GIACOMETTI, L.; ZANETTI, L. M. G. F.; GALBIATTI, J. A.; PISSARRA, T. C. T.; PALLA, V. L. Técnicas de sensoriamento remoto e sistemas de informação geográfica aplicados nos projeto de gestão hídrica do município de Jaboticabal - Córrego Rico Limpo. **Anais XI SBSR**. Belo Horizonte, MG, Brasil, INPE, p. 575-581, 2003.

JACOMINI, A. E. **Estudo comparativo da presença do herbicida ametrina em águas, sedimentos e moluscos, nas bacias hidrográficas do Estado de São Paulo**. 2006. 113 p. Tese (Doutorado em Ecologia) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. Ribeirão Preto, 2006.

JAYACHANDRAN, K. e PUGAZHENDY, K. Histopathological Changes in the Gill of *Labeo rohita* (Hamilton) Fingerlings Exposed to Atrazine. **Journal of Scientific Research**, v. 4, n. 3, p. 219-221, 2009

JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E. S.; KRUATRACHUE, M. SAHAPHONG, S. e VICHASRI-GRAMS, S. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Science Asia**, v. 28, n. 2, p. 121-127, 2002.

- KONSTANTINOU, I. K.; HELA, D. G.; ALBANIS, T. A. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. **Environmental Pollution**, v. 141, n. 03, p. 555-570, 2006.
- KRUTZ, L. J.; SENSEMAN, S. A.; DOZIER, M. C. HOFFMAN, D. W. E TIERNEY, D. P. Infiltration and adsorption of dissolved metolachlor, metolachlor oxanilic acid, and metolachlor ethanesulfonic acid by buffalograss (*Buchloe dactyloides*) filter strips. **Weed Science**, v. 52, n. 1, p. 166-171, 2004.
- KUNZ, Y. W. **Developmental biology of Teleost fishes**. Dordrecht (the Netherlands): Springer. 636 p. 2004.
- LACHER JR. T.; GOLDSTEIN, M. I. Tropical ecotoxicology: status and needs. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 100–111, 1997.
- LAINI, M. A.; BARTOLIB, L. L.; ETTORE C.; BALDERACCHIA, M.; TREVISANA, M. Herbicide contamination and dispersion pattern in lowland springs. **Science of The Total Environment**. v. 438, n. p. 312-318, 2012.
- LASKOWSKI, D. A., GORING, C. A., MCCALL, P. J., and SWANN, R. L. Terrestrial environment. In: CONWAY, R. A. (Ed.). **Environmental risk analysis for chemicals**. New York: Van Nostrand Reinhold Co., 1982. p. 198-240.
- LAZORKO-CONNOR, S.; ACHARI, G. Atrazine: its occurrence and treatment in water. **Environmental Reviews**, v. 17, n. 1, p. 199-214, 2009
- LOCKE, M. A. e BRYSON, C. T. Herbicide-soil interaction in reduced tillage and plant residue management systems. **Weed Science**, v. 45, n.12, p. 307-320, 1997.
- LOCKE, M. A.; SMEDA, R. J.; HOWARD, K. D.; REDDY, K. N. Clomazone volatilization under varying environmental conditions. **Chemosphere**, v. 33, n. 7, p. 1213-1225, 1996.
- LOMBARDI, J. V. **Fundamentos de Toxicologia Aquática**. In: Ranzani-Paiva, M.J.T.; Takemoto, R.M.; Lizama, M.A.P. (Eds.). Sanidade de Organismos Aquáticos. Ed. Varela, São Paulo. p.263-272. 2004
- LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; GOMES, P. C.; VARGAS, L. OLIVEIRA, S. N. Caracterización genética de lotes de peces usados en programas de repoblamiento y su importancia en la conservación genética en la piscicultura. **Zootecnia Tropical**., v. 26, n. 4, p. 515-522, 2008.
- MATAQUEIRO, M . I. **Toxicidade aguda e subaguda do inseticida methyl parathion no pacu (*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887)**. 2006, 41f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Centro de Aquicultura, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2002
- MAZON, A. F.; MONTEIRO, E. A. S.; PINHEIRO, G. H. D.; FERNANDES, M. N. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. **Brazilian Journal of Biology**. v. 62, n. 1, p. 621-631, 2002.
- 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. e VIEIRA, V. L. P. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, n. 3, p. 398-403. 2005

MONQUERO, P. A.; AMARAL, L. R.; BINHA, D. P.; SILVA, A. C. e SILVA, D. P. Potencial de lixiviação de herbicidas no solo submetidos a diferentes simulações de precipitação. **Planta daninha**, v. 26, n. 2, p. 2008

MORAES, B. S.; LORO, V. L.; GLUSCZAK, L.; PRETTO, A.; MENEZES, C.; MARCHESAN, E. e MACHADO, S. L. O. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**. v. 68, n. 8, p.1597-1601, 2007

MORON, S. E.; ANDRADE, C. A. e FERNANDES, M. N. Response of mucous cells of the gills of traíra (*Hoplias malabaricus*) and jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) (Teleostei: Erythrinidae) to hypo- and hyper-osmotic ion stress. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 3, p. 491-498, 2009.

MOURA, E. E. S. **Determinação da Toxicidade Aguda e Caracterização do Risco Ambiental do Herbicida Roundup (Glifosato) sobre Três Espécies de Peixe**. Dissertação (Mestrado em Bioecologia Aquática). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2009.

MURTY, A. S. **Toxicology of pesticide to fish**. Boca Raton, Editora: CRC Press., v.1, 1988, 129p.

NAKAGOME, F. K., NOLDIM, J. A. & RESGALLA Jr., C. Toxicidade aguda de alguns herbicidas e inseticidas utilizados em lavouras de arroz irrigado sobre o peixe *Danio rerio*. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 17, n. 1 p.117-122, 2007

NWANI, C. D.; LAKRA, W. S.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; e SRIVASTAVA, S. K. Toxicity of the Herbicide Atrazine: Effects on Lipid Peroxidation and Activities of Antioxidant Enzymes in the Freshwater Fish *Channa Punctatus* (Bloch). **International Journal of environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 8, p. 3298-3312, 2010

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

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Guidelines for Drinking Water Quality: Recommendations**. The Third Edition. Geneva. 2004. Chemical facts sheets, p. 296.

PETERS, J. W. e COOK, R. M. Effects of atrazine on reproduction in rats. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 9, n. 5. P. 301-304, 1973.

PFEUFFER, R. J. e RAND, G. M. South Florida ambient pesticide monitoring program. **Ecotoxicology**, v. 13, n. 1, p. 195-205, 2004.

PINHO, A. P.; MATOS, A. T.; COSTA, L. M.; MORRIS, L. A. e MARTINEZ, M. A. Modelagem da retenção de herbicidas em zonas ripárias. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 10, n. 4, p. 896-902, 2006.

PISSARRA, T. C. T.; POLITANO, W. e FERRAUDO, A. S. Avaliação de características morfométricas na relação solo-superfície da Bacia Hidrográfica do Córrego Rico, Jaboticabal (SP). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, n. 2, p. 297-305, 2004.

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.

PPDB: Pesticide Properties DataBase. **Agriculture & Environment Research Unit**. Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/Reports/511.htm>. Acesso em 19 de março de 2013.

PROCOPIO, S. O.; SILVA, A. A.; SANTOS, J. B.; FERREIRA, L. R.; MIRANDA, G. V.; SIQUEIRA, J. G. Efeito da irrigação inicial na profundidade de lixiviação do herbicida s-metolachlor em diferentes tipos de solos. **Planta daninha**, v. 19, n. 3, p. 409-417, 2001.

QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI, V. L.; GOMES, M. A. F. e ROSA, M. A. Comportamento do herbicida hexazinone em área de recarga do aquífero Guarani cultivada com cana-de-açúcar. **Química Nova**. v. 32, n. 2, p. 378-381, 2009.

RAINA, R.; ETTER, M. L.; BUEHLER, K.; STARKS, K.; e YOWIN, Y. Phenoxyacid Herbicides in Stormwater Retention Ponds: Urban Inputs. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 2, n.1, p. 962-970, 2011.

RAJBANSHI, V. K.; GUPTA, A. K. Alterations in the architecture of gill surface produced by water borne copper in Heteropneustes fossilis (Bloch). **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, v. 16, n. 2, p. 325-332, 1988.

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

ROCHA, A. G. O Grande Manancial do Cone Sul. **Estudos Avançados**, v. 11, n. 30, p. 191-212, 1997

RODRIGUES, B. N. e ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 6.ed. Londrina: Edição dos Autores, 2011, 697 p.

ROHR, J. R. e McCOY, K. A. A Qualitative Meta-Analysis Reveals Consistent Effects of Atrazine on Freshwater Fish and Amphibians – A Review. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 1, p. 20-32, 2010.

ROSETY-RODRÍGUEZ, M.; ORDOÑEZ, F. J.; ROSETY, M.; ROSETY, J. M. RIBELLES A. E CARRASCO, C. Morpho-histochemical changes in the gills of turbot, *Scophthalmus maximus* L., induced by sodium dodecyl sulfate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 51, n. 6, p. 223-228, 2002

RUY, R.; REIS, T. E. S. Risco de contaminação por agrotóxicos das águas subterrâneas em áreas cultivadas com cana-de-açúcar. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 22, n. 1, p. 77-84, 2012

SAGLIO, P.; OLSÉN, H.; BRETAUD, S. Behavioral and olfactory responses to prochloraz, bentazone and nicosulfuroncontaminated flows in goldfish. **Archives Environmental Contamination Toxicology**, v. 41, n. 10, p.192-200, 2001.

SAGLIO, P.; TRIJASSE, S. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. **Archives of Environment Contamination and Toxicology**, v. 35, n. 2, p. 484-491, 1998.

SANTOS, G. S. **Biomarcadores bioquímicos e genéticos para a detecção dos efeitos do herbicida atrazina no peixe neotropical *Prochilodus lineatus***. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual do Paraná, 2010.

SANTOS, J. B.; BOTELHO, R. G. Toxicidade aguda dos herbicidas atrazine e picloram sobre alevinos de *Ctenopharyngodon idella*. In. XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, 2010, Ribeirão Preto. SP. **Resumos...**Londrina: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2010, p. 3294.

SÃO PAULO. Instituto Geográfico e Geológico. **Mapa geológico do Estado de São Paulo**. IGG, Esc.1: 1.000.000. Color. 1974.

SATAKE, F. M.; ASSUNÇÃO, A. W. A.; LOPES, L. G.; AMARAL, L. A. Qualidade da água em propriedades rurais situadas na bacia hidrográfica do Córrego Rico, Jaboticabal/SP. **Ars Veterinaria**, v. 28, n. 1, p.48-055, 2012

SETAC. **Report of the aquatic risk assessment and mitigation dialogue grupe: Pensacola**, FL: STAC Fundation for Education, 1994. 44p

SHIOGIRI, N. S. **Toxicidade e alterações morfofuncionais em Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) exposto ao herbicida Roundup Ready**. 2011, 80 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais). Universidade de São Carlos, São Carlos/SP, 2011.

SILVA, A. A.; FERREIRA, F. A.; FERREIRA, L. R.; SANTOS, J. B. Métodos de controle de plantas daninhas. In: SILVA, A. A.; SILVA, J. F. (Editores) **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2007. 367p.

SILVA, A. J. **Aspectos da alimentação do pacu adulto, *Colossoma mitrei* (Berg, 1895) (Pisces, Characidae) no pantanal de Mato Grosso**. Dissertação (Mestrado em Zoologia), UFRJ. Rio de Janeiro, 1985. 92p.

SIMONATO, J. D.; ALBINATI, A. C.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of the Water Soluble Fraction of Diesel Fuel Oil on Some Functional Parameters of the Neotropical Freshwater Fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 76, n. 11, p. 505–511, 2006

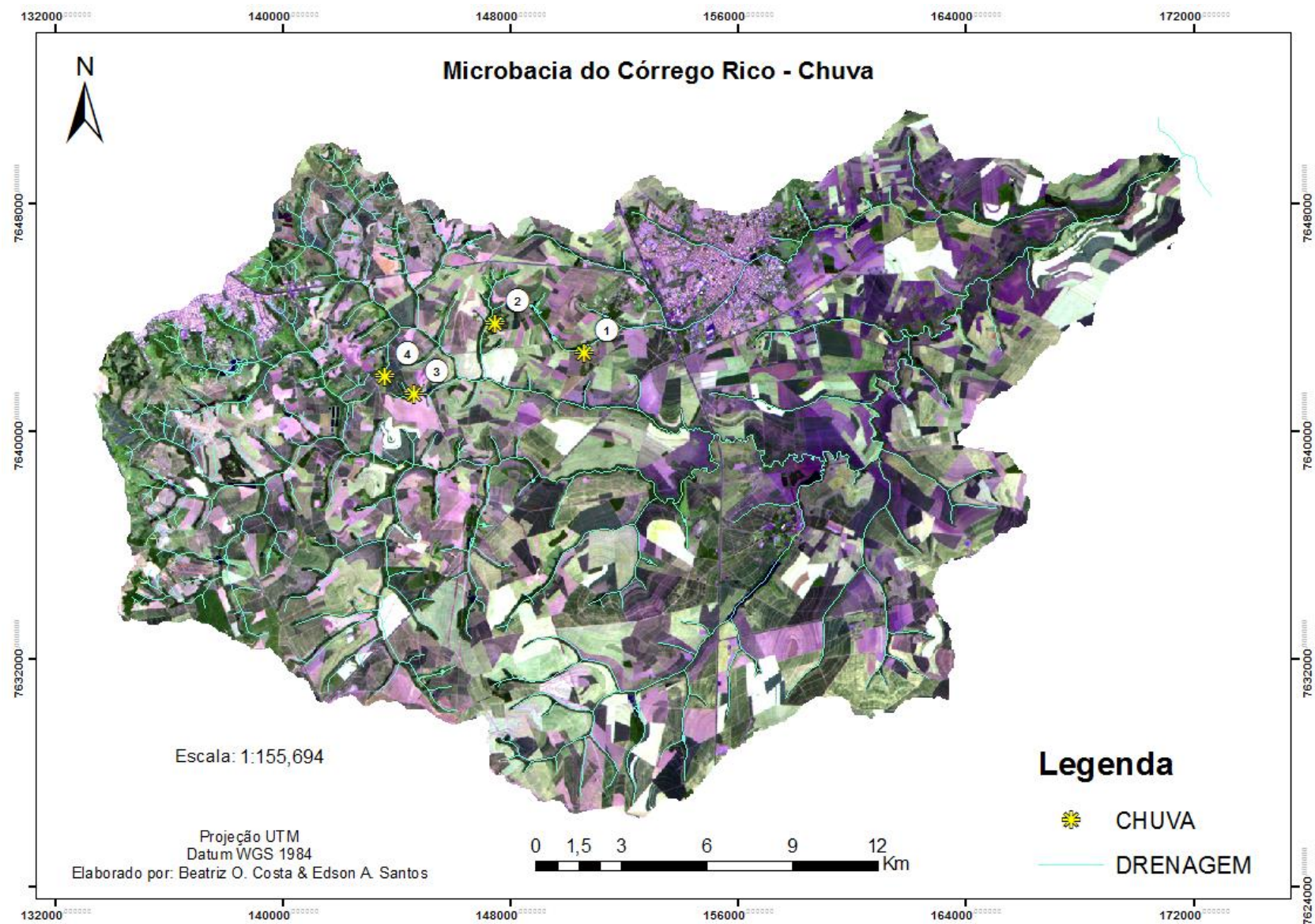
SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, n. 1, p. 112–120, 2008

SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. Disponível em <http://www.sindag.com.br/>. Acessado em 13 de Agosto de 2012.

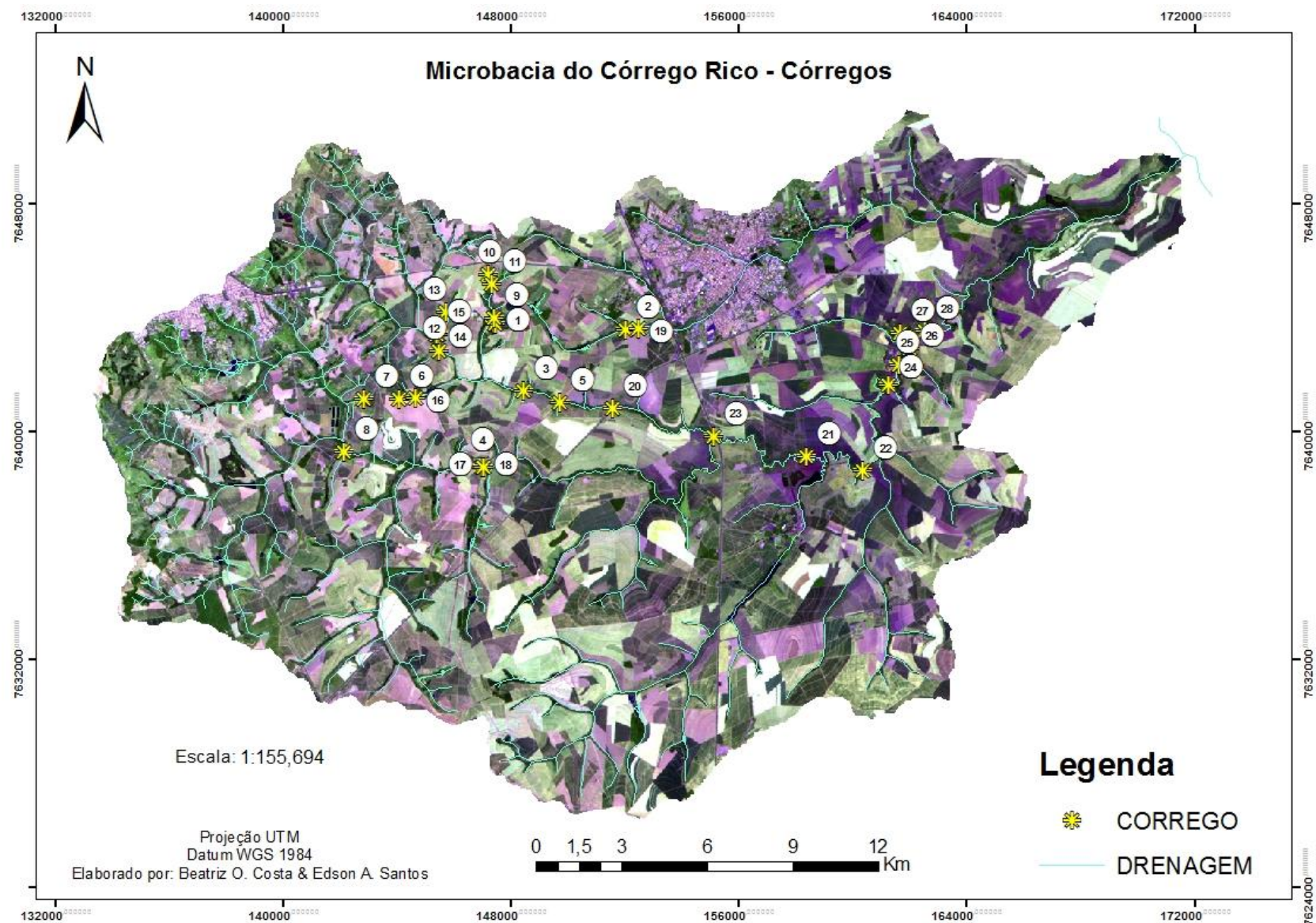
- SINDERMANN, C. J. An examination of relationships between pollution and disease. **Rapport de la Renion du Conseil International pour l'Exploration des Mers**, v. 182, p. 37-43, 1983.
- SMITH, W. S.; BARRELA, W.; CETRA, M. Comunidade de peixes como indicadora de poluição ambiental. **Revista Brasileira de Ecologia**, v. 1, n. 1, p. 67-71, 1997.
- SOLOMON, K. R.; BAKER, D. B.; RICHARDS, R. P.; DIXON, K. R.; KLAINE, S. J.; LA POINT, T. W. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 31-76, 1996.
- SOLOMON, K. R.; CARR, J. A.; DU PREEZ, L. H.; GIESY, J. P.; KENDALL, R. J.; SMITH, E.E.; Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 38, n. 13, p. 721-772, 2008
- SOUZA, V. L.; LUNARDI, L. O.; VASQUES, L. H. CASALETTO, L.; NAKAGHI, L. S. O.; URBINATI, E. C. Morphometric alterations in hepatocytes and ultrastructural distribution of liver glycogen in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) during food restriction and refeeding. **Brazilian Journal Morphology Science**, v. 18, n.1, p. 15-20, 2001.
- SPADOTTO, C. A. **Comportamento e Destino Ambiental de Herbicidas**, Comitê de Meio Ambiente, SBCPD, 2002. Disponível em <<http://www.cnpma.embrapa.br/herbicidas/>> Acesso em 15 de Março de 2013.
- SPRAGUE, L. A.; HERMAN, J. S.; HORNBERGER, G. M. Atrazine adsorption and colloid facilitated transport through the unsaturated zone. **Journal of Environmental Quality**, v. 29, n. 5, p. 1632-1641, 2000.
- STEINBERG C. E. W.; LORENZ, R. SPIESER, O. H. Effects of atrazine on swimming behavior of zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Water Restoration**, v. 29, n. 3, p. 981-985, 1995
- TAVELLA, L. B.; SILVA, I. N.; FONTES, L. O.; DIAS, J. R. M. E SILVA, M. I. L. O uso de agrotóxicos na agricultura e suas consequências toxicológicas e ambientais. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 7, n. 2, p. 6-12, 2011
- TAYLOR, A. W. The volatilization of pesticides residues. In: ROBERTS, T. R.; KEARNEY, P. C. **Environmental behavior of agrochemicals**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 1995. p. 257-306, 1995.
- 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, n. 6, p. 307 – 320, 2003.
- TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 135-142, 2002.
- TRIVELIN, P. C.; RODRIGUES, J. C. S. e VICTORIA, L. R. Utilização por soqueira de cana-de-açúcar de safra do nitrogênio da aquamônia-15N e uréia-15N aplicado ao solo em complemento à vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 89-99, 1996.
- TUNDISI, J. G. Recursos hídricos no futuro: problemas e soluções. **Estudos avançados**, v. 22, n. 63, p. 7-16, 2008.

- URBAN, D. J.; COOK, N. J. **Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure** - Ecological Risk Assessment, U. S. EPA Publication 540/9-86-001, 1986.
- URBAN, J. D.; LEE, R. **The LOC Project**. Washington D. C. USEPA. Office of Pesticides Programs, 1994
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E., Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 5, p. 57-149, 2003.
- VENCILL, V. K. **Herbicide Handbook**, 8th ed.; Weed Science Society of America: Lawrence, KS, 2002, 430 p.
- VICARY, A.; ROSSI PISA, .P; CATIONE, P. Tillage effects on runoff losses of atrazine, metolachlor, prosulfuron and triasulfuron. In: EWRS SYPOSIUM, 11, 1999, Switzerland. **Anais....** Switzerland: Nasail, 1999. p. 40.
- WANG X.; LI, J.; XING, H. e XU, S. Review of Toxicology of Atrazine and Chlorpyrifos on Fish. **Journal of Northeast Agricultural University**, v. 18, n. 4, p. 88-92, 2011.
- WIEGAND, C.; KRAUSE, E.; STEINBERG, C. e PFLUGMACHER, S. Toxicokinetics of Atrazine in Embryos of the Zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and environmental Safety**, v. 49, n. 3, p. 199-205, 2001.
- WILSON, J. M. e LAURENT, P. Fish gill morphology: inside out. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, n 11, p. 192-213, 2002.
- WOOTTON, R. J. **Ecology of teleosts fishes**. Chapman and Hall (London), 1990, 404 p.
- WU, S. S. R.; CHAN, A. K. Y.; RICHARDSON, B. J.; AU, D. W. T. Measuring and monitoring persistent organic pollutants in the context of risk assessment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 57, n. 6-12, p. 236–244, 2008
- XING, H. J.; HAN, Y.; LI, S.; WANG, J.; WANG, X.; XU, S. Alterations in mRNA expression of acetylcholinesterase in brain and muscle of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos [J]. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 7, p. 1666-1670, 2010
- ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática** - Princípios e Aplicações, Editora Rima, São Carlos, 2008, 478 p.
- ZUCKER, E. Hazard Evaluation Division - **Standard Evaluation Procedure**. Acute toxicity test for freshwater fish. (USEPA Publication 540/9-85-006). 1985.

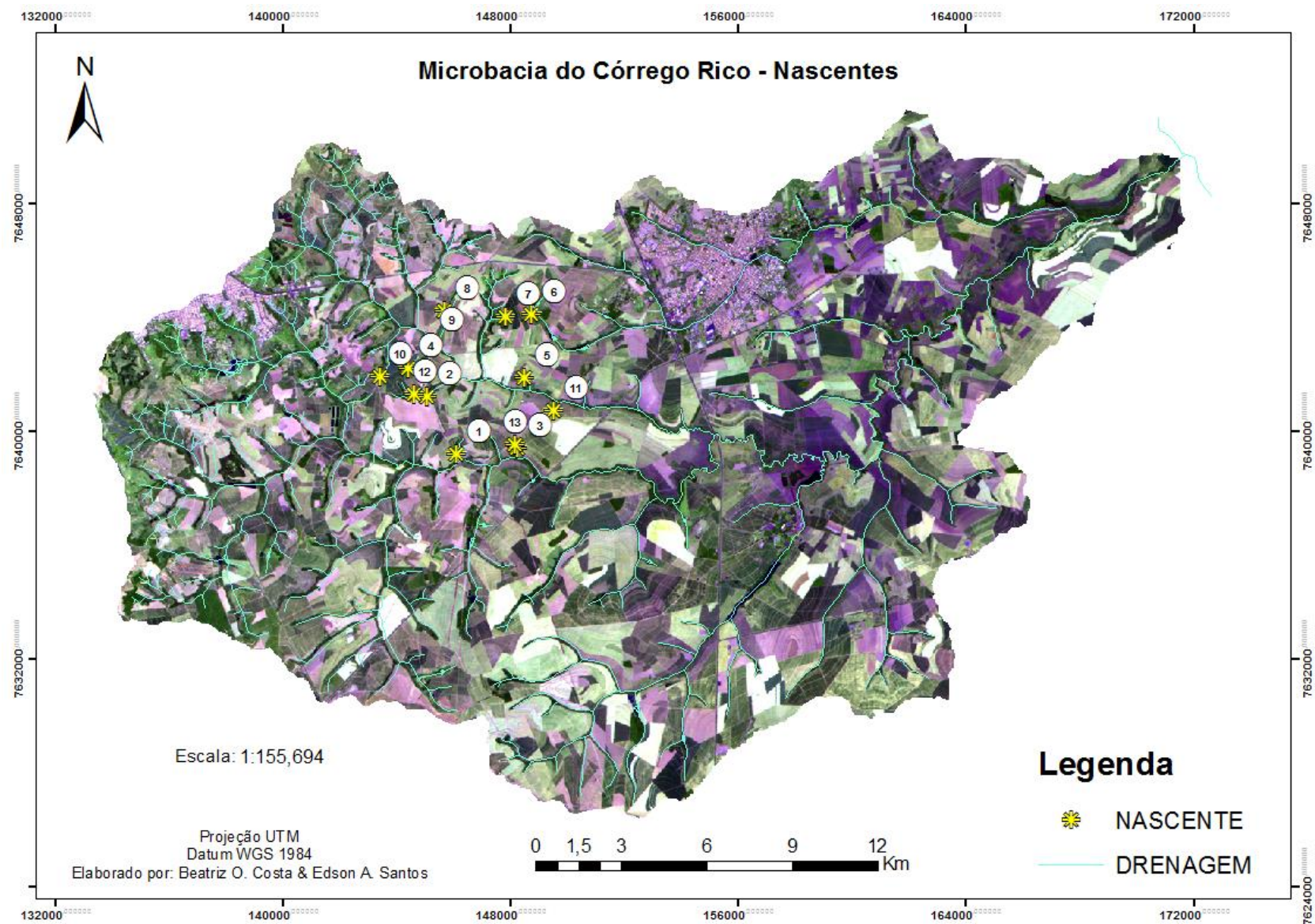
ANEXOS



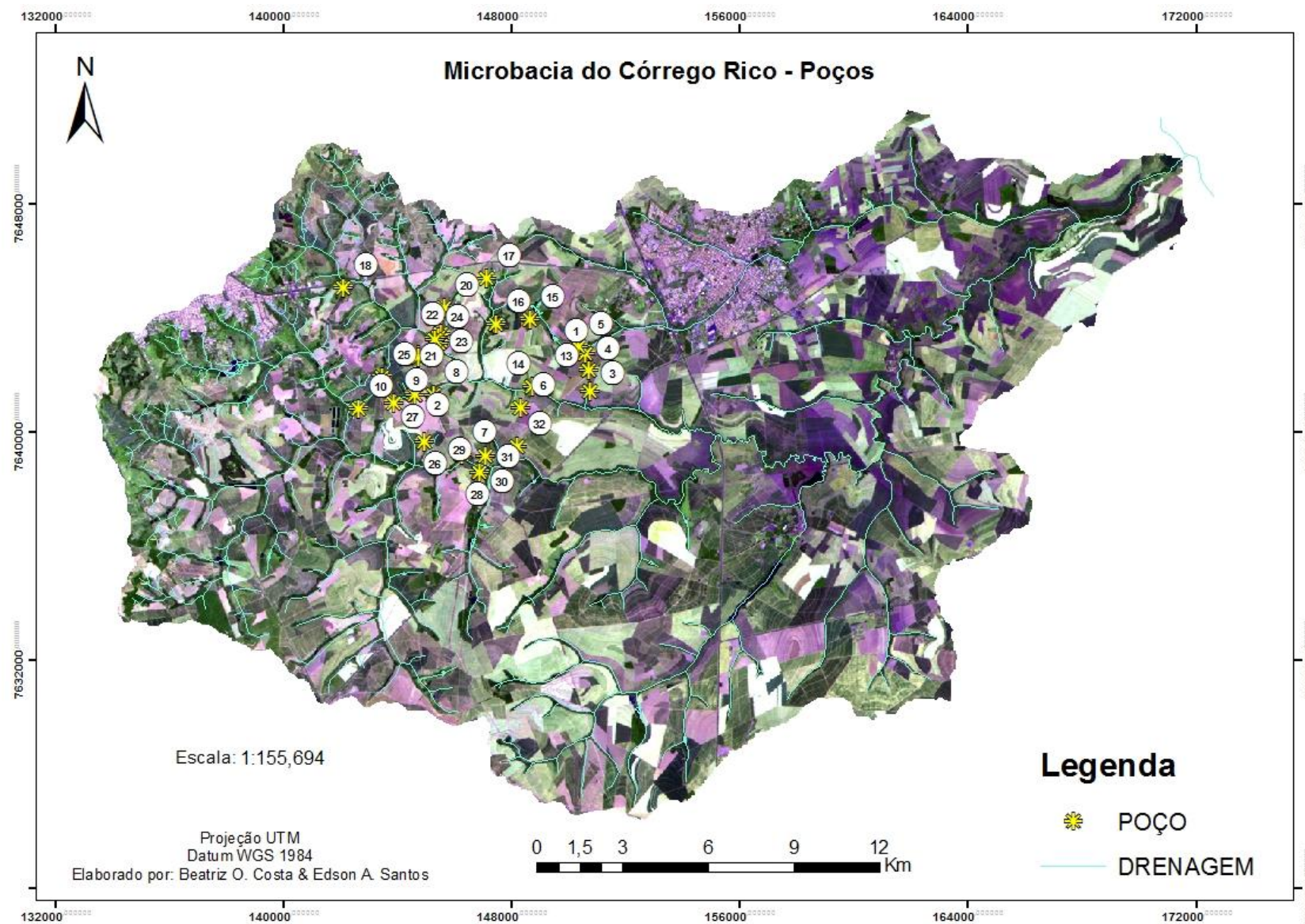
Anexo 1. Representação, por foto de satélite, dos pontos de coletas de água de chuvas, na microbacia hidrográfica do Córrego Rico.



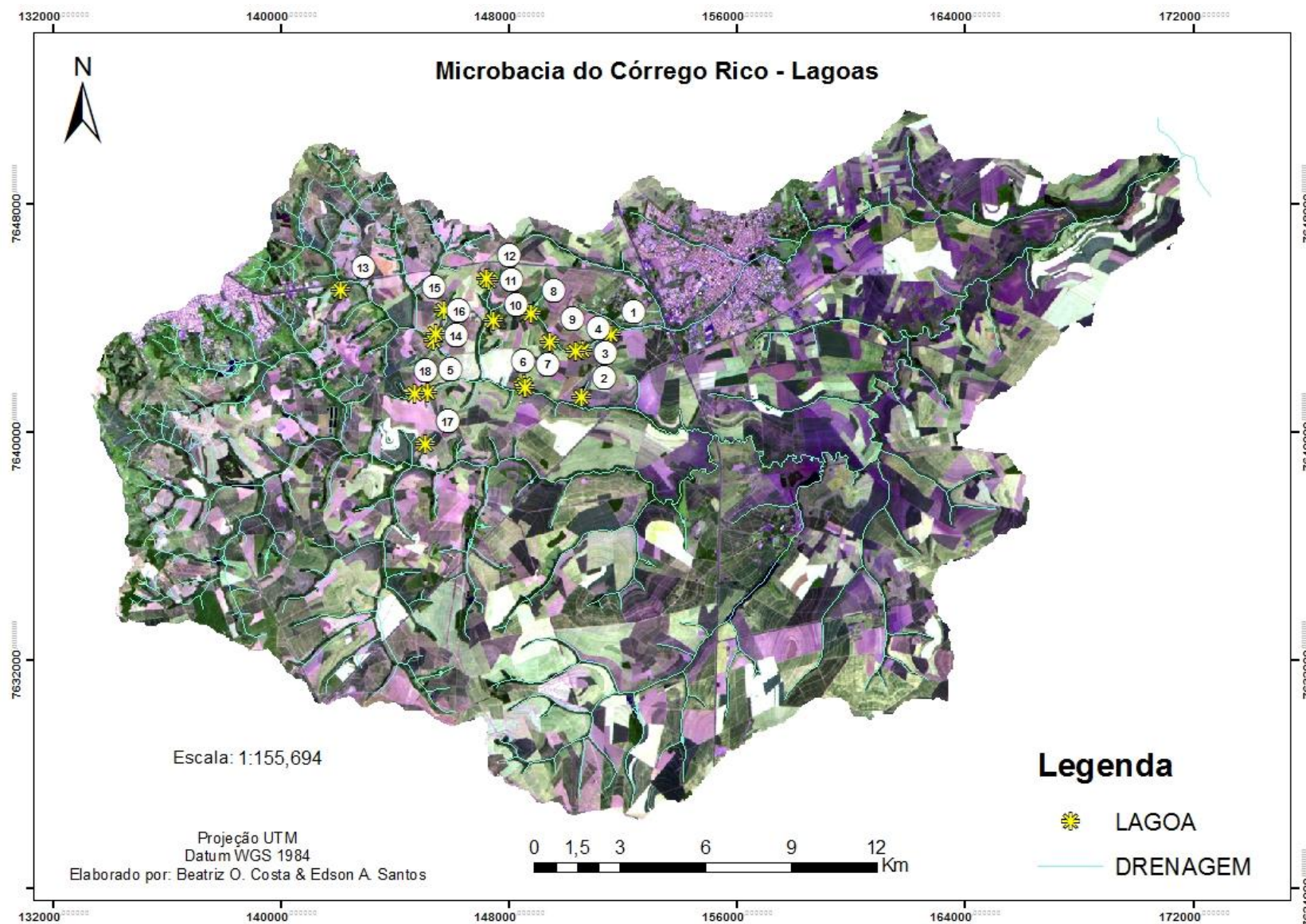
Anexo 2. Representação, por foto de satélite, dos pontos de coletas de água de córregos, na microbacia hidrográfica do Córrego Rico.



Anexo 3. Representação, por foto de satélite, dos pontos de coletas de água de nascentes, na microbacia hidrográfica do Córrego Rico.



Anexo 4. Representação, por foto de satélite, dos pontos de coletas de água de poços, na microbacia hidrográfica do Córrego Rico.



Anexo 5. Representação, por foto de satélite, dos pontos de coletas de água de lagoas, na microbacia hidrográfica do Córrego Rico.

