

TOXICIDADE AGUDA DO HERBICIDA CLOMAZONE NO PEIXE *Hyphessobrycon scholzei*: AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO LETAL MEDIANA E DE ALTERAÇÕES NO CONTEÚDO DE NUTRIENTES

CLAUDIO MARTIN JONSSON *
ALINE DE HOLANDA NUNES MAIA *

Avaliou-se a toxicidade aguda do herbicida Clomazone sobre o peixe *Hyphessobrycon scholzei*. Foram também estudadas possíveis alterações no conteúdo de proteína total e de macro e microelementos (Na, K, Ca, P, S, Mg, Mn, Zn, Fe e Cu) nos tecidos, decorrentes da exposição aguda. Os resultados demonstraram que o valor da CL50-96 h foi equivalente a 27,67 (24,29-31,51) mg/L. Este valor representa a concentração do herbicida presente em lâmina de água de 10 cm, decorrente da aplicação de aproximadamente 40 vezes a dose agrônômica. Não houve evidência de alterações significativas provocadas pelo Clomazone nos níveis dos nutrientes estudados.

1 INTRODUÇÃO

O uso de herbicidas na agricultura tem crescido nos últimos anos com o intuito de combater plantas daninhas e garantir maior oferta de alimentos. Porém, o uso ilimitado destes produtos pode afetar negativamente organismos não alvo, tais como peixes, num sistema aquático.

O Clomazone é um herbicida pós-emergente amplamente usado, em sistemas de arroz irrigado no Sul do Brasil, para controlar a gramínea *Echinochloa crusgali*, entre outras. A dose recomendada deste composto sob a forma de concentrado emulsionável é de 700 g/ha. Importante via de contaminação do ecossistema aquático por este herbicida pode ocorrer pela drenagem de água da área de aplicação para a região de entorno.

A literatura pertinente quase não apresenta dados relacionados aos efeitos adversos do Clomazone sobre importantes espécies aquáticas bioindicadoras.

* Pesquisadores II, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental (EMBRAPA-CNPMA), Jaguariúna, SP, Brasil. (e-mail: jonsson@cnpma.embrapa.br / ahmaia@cnpma.embrapa.br).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda do herbicida Clomazone através do cálculo do valor da CL50-96 horas no peixe *Hyphessobrycon scholzei*, uma espécie autóctone pertencente à família Characidae. As alterações induzidas pela exposição aguda no conteúdo de proteína total e de macro e microelementos dos tecidos do peixe foram também estudadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PRODUTO-TESTE

O Clomazone (2-(2-clorofenil) metil - 4,4 - dimetil -3 - isoxalidlinona) foi usado sob a forma de concentrado emulsionável comercial (GAMIT^R, FMC), na concentração de 500 g/L.

2.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

Foram utilizados peixes da espécie *Hyphessobrycon scholzei* (família Characidae), pesando em média 0,35 g e medindo em média 3,5 cm, adquiridos de fornecedor local. Os peixes foram previamente aclimatizados nas condições ambientais utilizadas durante a exposição ao agente tóxico (temperatura = 27 ± 2 °C, fotoperíodo = 16h luz/8h escuro; pH = 7,8; dureza total = 36 mg/L CaCO₃ e condutividade = 190 uS/cm). A concentração de oxigênio dissolvido manteve-se superior a 60% da saturação. Durante o período de aclimação e realização do teste foi utilizada água potável proveniente de poço artesiano.

Os peixes foram alimentados diariamente durante o período de aclimação com ração floculada, a qual foi suspensa 24 horas antes do início do teste.

O ensaio foi realizado em aquários de vidro com capacidade de 10 litros, contendo soluções-teste com volumes equivalentes a 8 litros. As soluções-teste foram preparadas a partir de solução-estoque contendo 50 g de ingrediente ativo por litro. Diluiu-se o produto-teste diretamente na água de maneira a se obter as concentrações nominais de Clomazone de: 0,0 (controle); 9,0; 16,2; 29,4; 53,1 e 95,6 mg/L. Com auxílio de rede de "nylon" foram introduzidos 20 organismos em cada recipiente, sendo que para cada concentração de exposição o teste foi realizado em duplicata.

O ensaio foi conduzido em sistema estático e teve 96 horas de duração. Durante este período foram mantidas condições ambientais semelhantes às do período de aclimação.

Em intervalos de 24 horas e no final da exposição, os organismos que não responderam a estímulos tácteis foram considerados mortos, sendo imediatamente removidos. Para cada concentração de exposição o

número de organismos mortos foi registrado para se calcular a concentração letal mediana de exposição durante 96 horas (CL50-96 h).

2.3 ANÁLISE DO CONTEÚDO DE PROTEÍNA TOTAL E DE MACRO E MICROELEMENTOS

No final da exposição, os organismos que sobreviveram aos efeitos tóxicos do herbicida (concentrações de 9,0 e 16,2 mg/L) foram sacrificados com "overdose" de triclaína metanossulfonato de sódio (Sigma Chemical, Co) e guardados em "freezer" para posterior análise de nutrientes nos tecidos.

Os espécimes foram secos em estufa a temperatura de aproximadamente 60 °C, durante período mínimo de 48 horas, até a obtenção de peso constante. Os peixes inteiros desidratados foram triturados em almofariz e pesados. As amostras foram subdivididas em dois grupos, cada um deles com massa de 0,1 g e 0,25 g, sendo que o primeiro e o segundo sofreram digestão sulfúrica e nítrica, respectivamente. As amostras digeridas em meio sulfúrico foram analisadas quanto aos teores de N, Ca, Na, K, Mg e P. A digestão em meio nítrico permitiu a análise dos seguintes elementos: S, Zn, Mn, Fe e Cu. Calculou-se o teor de proteína total a partir da porcentagem de nitrogênio total determinada pelo método Kjeldahl (semi-micro) (22) e multiplicando-se este valor pelo fator 6,25.

Analisou-se Na e K por fotometria de chama em equipamento Micronal B262. Utilizou-se o método de TEDESCO et al. (22) para determinar os teores de P e S, mediante espectrofotometria visível em equipamento Bekman DU-8B, nos comprimentos de onda de 660 e 440 nm, respectivamente. Os demais elementos foram analisados em equipamento Shimadzu AA680, pela técnica de espectrofotometria de absorção atômica em chama.

As análises foram realizadas em réplicas de quatro amostras para cada concentração de exposição.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

2.4.1 Concentração letal mediana

Estimou-se a CL50 - 96 h pelo método Spearman-Kärber (9), pois os métodos proibito, logito ou Litchfield não são adequados, quando apenas uma dose apresenta mortalidade parcial (entre 0 e 100%) (20).

2.4.2 Conteúdo de proteína total e de macro e microelementos

Foram calculados os teores médios de proteína, macro e microelementos em cada uma das doses. Para buscar evidências sobre o efeito do Clomazone (aumento ou decréscimo no teor do nutriente com o aumento da dose) realizou-se teste permutacional (13), baseado na alteração (+ ou -) do teor médio de cada nutriente entre as doses 0,0; 9,0 e 16,2 mg/L.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados demonstraram que os efeitos agudos letais em 96 horas de exposição, só se manifestaram em concentrações superiores a 16,2 mg/L de Clomazone. Nas concentrações de exposição que resultaram em mortalidade parcial (soluções teste de 29,4; 53,1 e 95,6 mg/L) os peixes apresentaram inicialmente letargia e nado errático no transcorrer do tempo, perda total de equilíbrio e morte. Já, os organismos expostos a doses menores não demonstraram sinais aparentes de intoxicação.

Na Tabela 1 são apresentados os resultados referentes a mortalidade dos organismos nas diferentes doses de exposição.

TABELA 1 - DOSE-RESPOSTA DO PEIXE *Hyphessobrycon scholzei* EXPOSTO A FORMULAÇÃO DO HERBICIDA CLOMAZONE

Concentração nominal de Clomazone (mg/L)	nº inicial de organismos	nº de organismos mortos por réplica				% de mortalidade
		24 h	48 h	72 h	96 h	
0,0 (controle)	20	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0
9,0	20	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0
16,2	20	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0
29,4	20	4 / 2	10 / 7	10 / 11	11 / 13	60
53,1	20	20 / 20	20 / 20	20 / 20	20 / 20	100
95,6	20	20 / 20	20 / 20	20 / 20	20 / 20	100

A concentração letal mediana estimada (CL50-96 h) foi equivalente a 27,67 mg/L, sendo o intervalo de confiança de 95% de 24,29 a 31,51 mg/L. Segundo este valor, o Clomazone seria classificado como "fracamente ôxico" para o organismo teste (23). Valor de CL50-96 h com semelhante ordem de grandeza (34,6 mg/L) foi calculado para o poecilídeo *Poecilia*

reticulata (8), porém não se tem informação precisa se este valor foi expresso em termos de ingrediente ativo ou de produto formulado.

De acordo com o valor de CL50-96 h calculado neste estudo, a toxicidade aguda do Clomazone para *H. scholzei* é semelhante àquela observada para a microalga *Selenastrum capricornutum* e para a macrofita *Lemna valdiviana*. Para estes bioindicadores aquáticos os valores de CL50-96 h são equivalentes a 31,9 e 32,2 mg/L, respectivamente (11). A toxicidade do Clomazone é aproximadamente duas vezes maior para o microcrustáceo *D. similis* (11) do que para *H. scholzei*. Esta constatação levaria a supor que os efeitos adversos do herbicida para peixes nos ecossistemas aquáticos ocorreriam de forma indireta, afetando as populações de organismos zooplancônicos, o que comprometeria a disponibilidade de alimento.

A toxicidade do Clomazone para a espécie aqui estudada é semelhante à apresentada pelo herbicida Paraquat sobre duas espécies de peixes autóctones sudamericanas tais como *Bryconamericus ineringii* e *Oncorhynchus mykiss*, tendo-se registrado os valores de CL50-96 h equivalentes a 20 e 32 mg/L, respectivamente (4).

Comparando-se a toxicidade aguda do Clomazone com a de outros herbicidas comumente usados em culturas de arroz irrigado observa-se que, esta é aproximadamente 130 e 23 vezes menor que a dos herbicidas Molinate (15) e Thiobencarb (19), respectivamente, para a espécie *Salmo gairdneri*. Porém, o Clomazone apresenta maior toxicidade que o herbicida Bensulfuron metil para a truta arco iris (14). A toxicidade do MCPA ((4-cloro-2-metil-fenoxi) ácido acético) para a carpa (*Cyprinus carpio*) (14) mostrou-se semelhante a apresentada pelo Clomazone para *H. scholzei*. Com relação a outros dois herbicidas de amplo uso em culturas de arroz irrigado no Rio Grande do Sul, isto é, o Quinclorac e Propanil, cuja toxicidade aguda em peixes foi também estudada (3,17), o Clomazone se apresenta como menos tóxico.

O valor de CL50-96 h obtido no presente trabalho corresponde a aproximadamente 40 vezes a dose recomendada do herbicida aplicada em campo e distribuída em lâmina de água de 10 cm de profundidade. Este valor permite também estimar as concentrações máximas permissíveis para prevenir efeitos agudos e crônicos (2,4), as quais seriam atingidas, respectivamente, pela aplicação de 13 e 4 vezes a dose recomendada, quando existe lâmina de água da mesma profundidade à citada anteriormente.

Na Tabela 2 são apresentados os dados relativos à análise dos nutrientes no tecido de *H. scholzei* exposto ao Clomazone e de alguns parâmetros estatísticos analisados.

Não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) nos teores de proteína, macro e microelementos nos tecidos dos peixes, com o aumento da dose de Clomazone. Os elementos Na, Mn e Fe apresentaram alterações consistentes negativas (--), enquanto que o teor de proteína apresentou alterações consistentes positivas (++) entre as doses

TABELA 2 - TEORES MÉDIOS DE NUTRIENTES EM *Hyphessobrycon scholzei* EXPOSTO A DIFERENTES DOSES DE CLOMAZONE DURANTE 96 HORAS - VARIAÇÃO DOS TEORES ENTRE AS DOSES 0,0 E 9,0 (DIF 9,0 - 0,0) E 9,0 E 16,2 (DIF 16,2 - 9,0) - SENTIDO DA VARIAÇÃO (+ OU -) E VALOR P ASSOCIADO AO TESTE PERMUTACIONAL

NUTRIENTE	CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE CLOMAZONE NA ÁGUA (mg/L)		DIF 9,0 - 0,0	DIF 16,2 - 9,0	DELTA 1	DELTA 2	VALOR P*
	0,0	9,0					
Proteína (%)	50,750 ^{abc} (2,750)	52,968 (8,053)	7,906 (13,430)	2,218	4,938	+	0,24
Ca (%)	5,388 (0,072)	4,440 (0,802)	5,158 (0,419)	-0,948	0,718	+	1,00
Na (%)	0,492 (0,017)	0,425 (0,010)	0,397 (0,017)	-0,067	-0,028	-	0,24
K (%)	0,112 (0,000)	0,1125 (0,006)	0,106 (0,006)	0,000	-0,006	-	0,29
Mg (%)	0,249 (0,006)	0,219 (0,112)	0,230 (0,021)	-0,030	0,011	+	1,00
P (%)	1,800 (0,050)	1,653 (0,395)	1,753 (0,170)	-0,167	0,120	+	1,00
S (%)	0,833 (0,900)	0,605 (0,144)	0,633 (0,158)	-0,227	0,030	+	1,00
Zn (ppm)	314,000 (10,660)	337,500 (30,930)	336,000 (11,870)	23,500	-1,500	+	1,00
Mn (ppm)	62,850 (1,726)	62,550 (7,675)	55,125 (2,239)	-6,300	-4,425	-	0,24
Fe (ppm)	90,600 (54,970)	73,975 (30,620)	55,575 (14,970)	-16,625	-20,400	-	0,24
Cu (ppm)	5,000 (0,480)	2,025 (0,617)	2,450 (0,225)	-0,575	0,425	+	1,00

a) cada valor corresponde à média de 4 réplicas.

b) os valores entre parênteses correspondem ao desvio padrão.

c) os valores foram calculados no base do peso seco.

* - Probabilidade de erro tipo I, associado ao teste permutacional empregado.

0,0-9,0 mg/L e 9,0-16,6 mg/L. Tal resultado indica fraca evidência ($p=0,24$) de efeito do Clomazone sobre estes nutrientes.

Os resultados obtidos no presente estudo discordam de certa forma de alguns trabalhos relatados pela literatura especializada a respeito de alterações bioquímicas ocasionadas por biocidas em peixes. Assim, por exemplo, EL-DEEN et al. (7) observaram decréscimo significativo no conteúdo de proteína total no peixe *Ctenopharyngodon idella*, quando exposto ao herbicida Diquat na dose de 53 mg/L, durante o período de 168 horas. SWARUP et al. (21) verificaram que o teor de proteína no rim do peixe *Cirrhinus mrigala* diminuiu em aproximadamente 50% quando comparado ao controle após exposição ao inseticida Endosulfan na concentração de 1,1 $\mu\text{g/L}$, sendo que o valor de LC50-96 h para esta espécie foi equivalente a 1,3 $\mu\text{g/L}$. A diminuição dos níveis de proteína em tecidos do peixe *Channa sp* após a exposição aguda a este inseticida foi também constatada por MURTY e PRIYAMVADA DEVI (16). BEGUM e VIJAYARAGHAVAN (1) observaram que o conteúdo de proteína total, de tecido muscular do peixe *Clarias batrachus* diminuiu significativamente após exposição do organismo-teste a 21,66 mg/L (1/3 LC50-96 h) de formulação comercial do inseticida Dimethoate.

Com relação a alterações no balanço iônico, que implicam em mudanças no teor de macro e micro elementos, também não foram constatados no presente trabalho efeitos deste nível nos tecidos de *H. scholzei*.

O efeito de agrotóxicos sobre a concentração de íons em diferentes espécies de peixes tem sido estudado como bioindicador dos efeitos de poluição por estes produtos. Assim sendo, EISLER e EDMUNDS (6) observaram aumento nos níveis de sódio, potássio, cálcio, magnésio e zinco no plasma do peixe *Sphaeroides maculatus*, exposto a concentrações subletais do inseticida Endrin durante 96 horas, enquanto que a concentração destes elementos no fígado estava diminuída. Portanto, a mobilização dos cátions a partir deste último tecido para o plasma foi evidente. Porém, EISLER (5) expondo esta mesma espécie a 30 $\mu\text{g/L}$ de Metoxiclor, durante 45 dias, não observou alterações no conteúdo de sódio, potássio, cálcio, magnésio, zinco e ferro do plasma. O mesmo autor verificou que os níveis de zinco decresceram no plasma e tecidos quando os organismos foram expostos a Metilparation na concentração de 20 mg/L.

Segundo KABEER AHAMMAD SAHIB et al. (12) a exposição ao inseticida Malation promove diminuição do conteúdo corpóreo de sódio, potássio e cálcio em *Tilapia sp*. JOHAL e DUA (10) constataram que a distribuição e porcentagem de diversos elementos (S, Cl, Fe, P, Ca, Al e Si) presentes nas escamas de *Channa punctatus* foi alterada após a exposição deste organismos a doses subletais de 2,2 e 3,5 $\mu\text{g/L}$ do inseticida Endosulfan, nos prazos de 5 e 15 dias. Estudos de exposição durante 96 horas realizados com este composto no caranguejo de água doce, *Oziotelphusa senex senex*, revelaram decréscimo dos teores de sódio, cloreto e potássio na hemolinfa, hepatopancreas e músculo em

relação ao grupo controle (18). A ausência de efeito sobre os parâmetros bioquímicos em estudo verificada no presente trabalho não permite formular hipóteses sobre o mecanismo de ação de toxicidade do Clomazone em peixes. Sabe-se porém, que no seu organismo-alvo, este herbicida atua por inibição enzimática no processo de síntese de clorofila (8). Os dados também indicam que a análise dos parâmetros aqui estudados não parece funcionar apropriadamente como bioindicador de efeito agudo do Clomazone em peixes.

4 CONCLUSÃO

Apesar de se dispor de escassos trabalhos na literatura relacionados com a ecotoxicidade do Clomazone, o valor de concentração letal mediana determinado em *H. scholzei* é menor ou semelhante ao encontrado para este herbicida em outros organismos aquáticos. Tal constatação é também válida comparando-se a toxicidade do Clomazone para *H. scholzei* com a de alguns herbicidas utilizados em culturas de arroz irrigado em outras espécies de peixes.

A relação dose-efeito, determinada neste estudo para o herbicida Clomazone, sugere a ausência de efeitos nocivos em curto prazo de exposição para a espécie estudada, quando usado na dose de aplicação recomendada num sistema convencional de cultura de arroz irrigado.

O Clomazone não promove alterações no teor de proteína total e de alguns elementos nos tecidos de *H. scholzei*, indicando que não há evidência de interferência nos processos metabólicos destes nutrientes na exposição aguda ao herbicida.

Abstract

The herbicide Clomazone (2-(2-chlorophenyl) methyl-4,4-dimethyl-3-isoxalidinone) is widely used in the southern region of Brazil for control of graminæ that grows in flooded rice fields. Drainage may result in Clomazone contamination of adjacent aquatic environments, promoting adverse effects in aquatic biota. The acute toxicity of Clomazone was evaluated in the Brazilian fish *Hyphessobrycon scholzei*. The LC₅₀ value of 27.29 (24.29 to 31.51) mg/L was obtained in static 96-hour exposure to the herbicide. This LC₅₀ value was approximately the Clomazone concentration found in a 10 cm layer of water after an application 40 times greater than the recommended amount. Total protein, Na, K, Ca, P, S, Mg, Zn, Fe, and Cu were measured in fish tissue. No significant differences ($p > 0.05$) in total protein or to the measured elements were observed in tissues of Clomazone-exposed and unexposed fishes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BEGUM, G., VIJAYARAGHAVAN, S. Alterations in protein metabolism of muscle tissue in the fish *Clarias batrachus* (Linn) by commercial grade dimethoate. **Bull. Environm. Contam. Toxicol.**, New York, v. 57, n. 2, p. 223-228, 1996.

- 2 CETESB. **Procedimentos para a utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos.** São Paulo : CETESB, 1992. 17 p. (Série Manuais).
- 3 CHEAH, M.L., AVAULT, J.W., GRAVES, J. B. Acute toxicity of selected rice pesticides to crayfish *Procambarus clarkii*. **Prog. Fish Cult.**, Baton Rouge, v. 42, n. 3, p. 169-172, 1980.
- 4 DI MARZIO, V., ALBERDI, J.L., TORTORELLI, M.C. , BERTOLDI, N. Toxicidad aguda de los plaguicidas metamidofos, ciflutrina, paraquat y glifosato sobre peces de agua dulce. **Rev. Bras. Toxicol.**, São Paulo, v. 6, suplemento, p. 59, 1993.
- 5 EISLER, R. **Tissue changes in puffers exposed to methoxychlor and methyl parathion.** Washington, D.C. : U.S. Department of the Interior, Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, 1967. v.1. (Technical Papers, 17).
- 6 EISLER, R., EDMUNDS, P.H. Effects of endrin on blood and tissue chemistry of a marine fish. **Trans. Am. Fish. Soc.**, Bethesda, v. 95, p. 153, 1966.
- 7 EL-DEEN, M.A.S., ROGERS, W. A., SALAH-EL-DEEN, M. A. Changes in total protein and transaminase activities of grass carp exposed to diquat. **J. Aqu. Anim. Health**, Bethesda, v. 5, n. 4, p. 280-286, 1993.
- 8 GAMIT. **Arroz irrigado.** Campinas : F.M.C. do Brasil, Divisão Agroquímica, [199-?]. (Boletim Técnico).
- 9 HAMILTON, M.A., RUSSO, R., THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimated median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environm. Sci. Technol.**, Washington, v. 11, p. 714-718, 1977.
- 10 JOHAL, M.S., DUA, A. Elemental lepidological and toxicological studies in *Channa punctatus* (Bloch) upon exposure to an organochlorine pesticide, endosulfan. **Bull. Environm. Contam. Toxicol.**, New York, v. 55, n. 6, p. 916-921, 1995.
- 11 JONSSON, C.M., MAIA, A.H.N., FERREIRA, C.J.A., RIBEIRO, E.O. Risk assessment of the herbicide Clomazone in the aquatic life. **Verh. Internat. Verein. Limnol.**, Stuttgart, v. 26, p.1724-1726, Maio 1998.
- 12 KABEER AHAMMAD SAHIB, I., JAGANNATHA RAO, K.S., RAMANA RAO, K.V. Effect of malathion exposure on some physical parameters of whole body and on tissue cations of teleost, *Tilapia mossambica* (Peters). **J. Biosci.**, Bangalore, v. 3, p. 17-21, 1981.
- 13 MANLY, B.F.J: **Randomization tests and Monte Carlo methods in Biology.** London : Chapman & Hall,1991. 282 p.

- 14 MABURY, S.A., COX, J.S., CROSBY, D.G. Environmental fate of rice pesticides in California. **Rev. Environm. Contam. Toxicol.**, New York, v. 147, p. 71-117, 1996.
- 15 MAYER, F.L., ELLERSIECK, M.R. **Manual of acute toxicity: interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals.** Washington, DC : U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, 1986. (Resource Publ., 160).
- 16 MURTY, A.S., PRIYAMVADA DEVI, A. The effect of endosulfan and its isomers in tissue protein, glycogen and lipids in the fish *Channa punctata*. **Pest. Biochem. Physiol.**, New York, v. 17, p. 280-286, 1982.
- 17 OOI, G.G., LO, N. P., OOI, P.A.C., LIM, G.S., TENG, P.S. Toxicity of herbicides to Malaysian rice field fish. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PROTECTION IN THE TROPICS, 3., 1990, Highlands, Malasia. **Proceedings...** Kuala Lumpur : Malaysian Plant Protection Society, 1992. v. 3, p. 71-74.
- 18 RAJESWARI, K., KALARANI, V., REDDY, D.C., RAMAMURTHI, R. Acute toxicity of endosulfan to crabs: effects on hydromineral balance. **Bull. Environm. Contam. Toxicol.**, New York, v. 40, n. 2, p. 212-218, 1988.
- 19 SANDERS, H.O., HUNN, I.B. Toxicity, bioconcentration and depuration of the herbicide Bolero 8EC in freshwater invertebrates and fish. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish**, Tokyo, v. 48, p. 1139-1143, 1982.
- 20 STEPHAN, C.E. Methods for calculating an LC50. In: MAYER, F.L., HAMELINK, J.L. **Aquatic toxicology and hazard evaluation.** Philadelphia : American Society for Testing and Materials, 1977. p. 65-84. (ASTM Special Technical Publication, 634).
- 21 SWARUP, P.A., RAO, D.M., MURTY, A.S. Toxicity of endosulfan to the freshwater fish *Cirrhinus mrigala*. **Bull. Environm. Contam. Toxicol.**, New York, v. 27, p. 850-855, 1981.
- 22 TEDESCO, M.J., VOLKWEISS, S.J., BOHNEN, H. **Análise de solo, plantas e outros materiais.** Porto Alegre : Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Dep. de Solos, 1985. p. 3-19. (Boletim Técnico, 5).
- 23 U.S.E.P.A. Hazard Evaluation Division. Standard Evaluation Procedure. **Acute toxicity test for estuarine and marine organisms.** Washington : EPA, 1985. 11 p. (EPA-540/9-85-009).