

EFEITO DA AMETRINA EM LARVAS E ADULTOS DE PAULISTINHA (*DANIO RERIO*)*M.A.M. Moura^{1**}, I. Domingues², R. Oliveira², C.M. Jonsson³, A.J.A. Nogueira

¹Instituto Biológico, Centro Experimental Central, Rodovia Heitor Penteado, km 3, CEP 13092-543, Campinas, SP, Brasil. E-mail: monica_moura@biologico.sp.gov.br

RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar empregada na produção de açúcar e etanol. O Estado de São Paulo é o maior produtor do país, tendo sido responsável pela produção de, aproximadamente, 400 mil toneladas de cana-de-açúcar, em 2010. A elevada produtividade desta cultura demanda o uso intensivo de implementos e insumos, que acabam por levar ao comprometimento dos ecossistemas e a poluição dos corpos d'água adjacentes às áreas de cultivo. O herbicida ametrina é um dos mais usados pelas usinas de cana-de-açúcar para o controle das plantas daninhas, que podem comprometer a produtividade das lavouras. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade da ametrina em exposições agudas do peixe paulistinha (*Danio rerio*) e quantificar biomarcadores bioquímicos (glutathione S-transferase "GST" e colinesterase "CHE") como indicadores de exposição a esse herbicida. Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, Portugal. O ensaio com embriões/larvas foi conduzido seguindo-se o protocolo OECD do Teste FET (*Fish Embryo Test*) de 2006 e, para os adultos, foi adotado o protocolo OECD TG 203 de 1992. Para determinação da toxicidade da ametrina para ovos/larvas foram usados os seguintes tratamentos: 0 (controle), 0+ (controle solvente), 10,0; 16,8; 28,3; 47,6 e 80 mg L⁻¹ de ametrina. No caso dos adultos, os tratamentos foram: 0, 0+, 2, 4, 6, 12 e 20 mg L⁻¹ de ametrina. Finalmente, no ensaio para determinação da atividade dos biomarcadores, os tratamentos consistiram em: 0, 0+, 5,0; 10,0; 7,17; 10,10; 14,20 e 19,99 mg L⁻¹ de ametrina. A concentração letal a 50% da população em 96 horas de exposição (CL_{50-96h}) foi calculada com o auxílio da planilha ToxCalc, desenvolvida no software Microsoft Excel. Para análise dos dados de atividade enzimática, foi empregado o teste *One-way* ANOVA, do software SigmaPlot 11.0. A CL_{50-96h} para os estágios iniciais do desenvolvimento do paulistinha foi determinada em 48,46 ± 2,20 mg L⁻¹ e, para os peixes adultos, em 7,65 ± 1,91 mg L⁻¹. Em relação aos biomarcadores, observou-se um aumento da atividade da enzima GST nas larvas, porém o mesmo não ocorreu com os adultos. Tanto em jovens como em adultos, a atividade da CHE foi inibida quando da exposição à ametrina. Os parâmetros avaliados neste trabalho permitiram um melhor entendimento do modo de ação e da toxicidade da ametrina ao *Danio rerio*. Diante do exposto, conclui-se que a utilização dos biomarcadores é uma ferramenta útil para avaliar o risco de exposição dos peixes, mesmo em níveis subletais.

PALAVRAS-CHAVE: Teste FET, toxicidade aguda, biomarcadores.

ABSTRACT

EFFECTS OF AMETRYN ON EARLY-LIFE STAGES AND ADULTS OF ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*). Brazil is the world's largest producer of sugarcane used in the production of sugar and ethanol. The state of São Paulo is the largest producer in the country, having been responsible for producing approximately 400 thousand tons of sugarcane in 2010. The high productivity of this culture demands the intensive use of equipment and inputs, which ultimately lead to the impairment of ecosystems and pollution of waterbodies adjacent to cultivation areas. Ametryn is one of the widely used herbicides applied on sugarcane crops to control weeds that can compromise their productivity. The objective of this study was to evaluate the toxicity of ametryn in acute exposure of zebrafish (*Danio rerio*) and quantify biochemical biomarkers (glutathione S-transferase "GST" and cholinesterase "CHE") as indicators of exposure to this herbicide. This work was performed at the Laboratory of Ecotoxicology, Department of Biology, University of Aveiro, Portugal. The

²Universidade de Aveiro, Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Departamento de Biologia, Aveiro, Portugal.

³Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, Brasil.

*Financiador : FAPESP e CESAM.

**Bolsista Novas Fronteiras FAPESP (Processo nº 2010/07118-9).

test with embryos / larvae was conducted following the OECD's protocol for the Fish Embryo Toxicity (FET) Test, 2006, and for adults, the protocol adopted was OECD TG 203, 1992. To determine the toxicity of ametryn for eggs / larvae we used the following treatments: 0 (control), 0 + (solvent control), 10.0, 16.8, 28.3, 47.6 and 80.0 mg L⁻¹ of ametryn. For adults, the treatments were 0, 0 +, 2, 4, 6, 12 and 20 mg L⁻¹ of ametryn. Finally, in the test to determine the biomarkers' activity, the treatments were: 0, 0 +, 5.0, 10.0, 7.17, 10.10, 14.20 and 19.99 mg L⁻¹ of ametryn. The lethal concentration for 50% of the population in 96 horas of exposure (LC_{50-96h}) was calculated with the help of ToxCalc spreadsheet developed in Microsoft Excel software. For data analysis of enzyme activity, we used the One-Way ANOVA test, of SigmaPlot 11.0. LC_{50-96h} for the zebrafish early-life stages was determined in 48.46 ± 2.20 mg L⁻¹, and for adult fish in 7.65 ± 1.91 mg L⁻¹. Regarding biomarkers, we observed an increase in GST enzyme activity in larvae, but it did not occur for adults. In both young and adult fish, the activity of CHE was inhibited when exposed to ametryn. The parameters evaluated in this study allowed a better understanding of the mode of action and toxicity of ametryn to *Danio rerio*. Therefore, we conclude that biomarkers are a useful tool to evaluate the risk of fish exposure, even at sublethal levels.

KEY WORDS: Fish embryo toxicity test, acute toxicity, biomarkers.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar empregada na produção de açúcar e etanol, um combustível que vem chamando cada vez mais a atenção do resto do mundo por configurar-se como uma alternativa ao uso do petróleo, com vantagens ambientais e econômicas (PIACENTE, 2005). Somente no ano de 2010 foram produzidas, no Estado de São Paulo, aproximadamente, 400 mil toneladas de cana-de-açúcar, numa área de cinco milhões de hectares plantados (IEA, 2010), colocando o Estado como o maior produtor do país. Essa elevada produtividade só pôde ser alcançada graças ao uso intensivo de implementos e insumos, que acabam por levar ao comprometimento dos ecossistemas e a poluição dos corpos d'água adjacentes às áreas de cultivo (BRASIL, 2004). Dentre os insumos mais utilizados pela agroindústria canavieira encontram-se os herbicidas pré e pós-emergentes (80%), utilizados no combate às plantas daninhas.

Uma vez no ambiente aquático, os herbicidas apresentam distribuição complexa, determinada pela dinâmica dos processos de partição entre os ecótonos água, biota e sedimento. Mesmo que as concentrações do contaminante encontradas na água estejam dentro dos limites estabelecidos pela legislação competente, ele poderá se acumular, atingindo níveis elevados e causando efeitos deletérios aos organismos não-alvo. Tal processo é conhecido como bioacumulação e pode não ser notado até que quantidades significativas do contaminante sejam lançadas no meio (BURATINI; BRANDELLI, 2006).

ARMAS *et al.* (2007) realizaram um diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas em águas superficiais e no sedimento da sub-bacia do rio Corumbataí, uma região com extensa área de cultivo de cana-de-açúcar. Segundo os autores, as triazinas (ametryn, atrazina e simazina) foram detectadas na água em níveis superiores ao padrão de potabilidade

brasileiro, principalmente nas áreas de recarga do aquífero Guarani. A carga residual para a soma de agrotóxicos foi de duas a 13 vezes maior que o limite máximo de 0,5 µg L⁻¹, estipulado pela Comunidade Europeia, e os níveis de atrazina foram observados acima do padrão CONAMA 357/05, configurando-se como um risco à biota aquática associada.

Os estudos ecotoxicológicos em sistemas aquáticos têm sido conduzidos preferencialmente com biomarcadores, em detrimento daqueles que visam a quantificar alterações estruturais ou de função dos ecossistemas, uma vez que, quando uma alteração significativa é evidenciada, o ambiente já pode estar irreversivelmente comprometido (NASCIMENTO *et al.*, 2006). Biomarcadores já foram empregados em trabalhos de exposição de peixes a herbicidas e apresentando-se como ferramentas úteis na detecção de anomalias decorrentes de exposição em curto prazo (VENTURA *et al.*, 2008; DOMINGUES *et al.*, 2010).

O herbicida ametryn é usado pelas usinas de cana-de-açúcar na dose de 2,0 kg ha⁻¹ de ingrediente ativo (i.a.), num volume de calda de aplicação de 300 L ha⁻¹, o que resulta numa concentração de 6,7 g L⁻¹ por i.a. A CL_{50-96h} da ametryn determinada para a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) foi de 5,0 mg L⁻¹; para o "bluegill sunfish" (*Lepomis macrochirus*), foi de 19,0 mg.L⁻¹ e para o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), de 25,0 mg.L⁻¹ (TOMLIN, 1994). Para o paulistinha (*Danio rerio*), uma espécie de clima tropical, a CL_{50-96h} determinada foi de 9,8 mg L⁻¹ (LOPES *et al.*, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do herbicida ametryn sobre o peixe paulistinha (*D. rerio*), a saber: avaliar a toxicidade da ametryn em exposições agudas de larvas e adultos e quantificar biomarcadores bioquímicos dos peixes, com a finalidade de determinar a eficiência das enzimas CHE e GST como indicadores de exposição a esse herbicida.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, Portugal. O ensaio com embriões/larvas foi conduzido seguindo-se o protocolo OECD do Teste FET (OECD, 2006). Os ovos de paulistinha foram coletados 30 minutos após a postura. Aproximadamente 3 horas após a fertilização, os ovos foram observados com a ajuda de um microscópio estereoscópio com zoom, encontrando-se em estágio de gástrula. Os ovos não fertilizados, que sofreram injúrias ou apresentaram irregularidades durante o processo de clivagem foram descartados.

Os ovos foram distribuídos entre sete tratamentos: 0 (controle), 0+ (controle solvente, com 5 mL⁻¹ de acetona, que corresponde à maior concentração de solvente nos demais tratamentos), 10,0; 16,8; 28,3; 47,6 e 80 mg L⁻¹ de ametrina. Cada tratamento era composto por 10 organismos, com três repetições, distribuídos individualmente em microplacas de poliestireno não estéril de 24 poços, cada poço com 2,0 ml de solução teste.

Um segundo teste foi realizado, empregado-se *design* similar, a fim de coletar larvas para as análises de biomarcadores (CHE e GST). Os ovos foram distribuídos entre 8 tratamentos: 0 (controle), 0+ (controle solvente), 5,0; 10,0; 7,17; 10,10; 14,20 e 19,99 mg L⁻¹ de ametrina. Foram utilizadas concentrações mais baixas do que no primeiro ensaio, seguindo-se as recomendações de DENTON *et al.* (1994), segundo os quais, os efeitos tóxicos começam sempre abaixo de 25% da CL_{50-96h}, faixa na qual as abordagens são mais seguras para a prevenção de impactos negativos.

Cada tratamento foi conduzido em triplicata. Os ovos (n = 75) foram distribuídos em placas de petri de poliestireno não estéril de 90 mm de diâmetro, contendo aproximadamente 15,0 ml de solução teste. A água utilizada para o preparo de soluções foi a mesma do sistema de recirculação usado no cultivo das matrizes (pH 7,00 ± 0,5 e condutividade elétrica 500 ± 50 µS cm⁻¹). O controle solvente contém 5 mL L⁻¹ de acetona, que corresponde à maior concentração de solvente nos demais tratamentos.

Os tratamentos foram observados diariamente durante o período de 96 horas, com a ajuda do microscópio estereoscópio. As unidades experimentais foram mantidas em sala climatizada (temperatura de 27,0 ± 1° C, em ciclo de fotoperíodo claro: escuro de 16h08), a fim de garantir aos peixes em sua fase inicial de desenvolvimento, condições ambientais similares às de cultivo das matrizes. Ao final do ensaio, foram adicionadas sete larvas por repetição em eppendorfs de 2,0 mL de volume, contendo 0,5 mL de tampão pH 7,0 e congeladas imediatamente, por imersão em nitrogênio líquido.

O ensaio com adultos foi conduzido seguindo-se

o protocolo OECD TG 203 (OECD 1992), em sistema estático. Foram utilizados paulistinhas adultos de peso similar (2±1 cm) e os tratamentos, preparados da mesma maneira como ocorreu com as larvas, foram: 0, 0+ (5 mL⁻¹ de acetona), 2, 4, 6, 12 e 20 mg L⁻¹ de ametrina. Cada tratamento era composto por nove organismos, com três repetições. Os peixes foram distribuídos em unidades experimentais com volume de 2 L, sendo que o peso máximo era de 1 g de peixe por litro de solução. Os valores de oxigênio foram mantidos 80% acima da saturação e as unidades experimentais mantidas na mesma sala climatizada descrita anteriormente. Os peixes não foram alimentados durante o ensaio.

A mortalidade foi registrada a cada 24 horas. Ao final de 96 horas, os peixes vivos foram sacrificados por choque térmico, sendo extraídos cabeça, brânquias, fígado e músculo dos mesmos. Os tecidos foram armazenados em eppendorfs de 2,0 mL de volume, contendo 0,5 mL com tampão pH 7,0 e congelados imediatamente, por imersão em nitrogênio líquido. Até o momento da quantificação dos biomarcadores, as amostras de larvas e adultos foram mantidas em ultrafreezer, sob temperaturas de -80° C.

No dia da análise dos biomarcadores, as amostras eram retiradas do ultrafreezer, colocadas em gelo e homogeneizadas com auxílio de um homogenizador Ystral GmbH D-7801. Para análise de CHE, amostras de cabeça e músculo dos adultos e amostras compostas de sete larvas foram homogeneizadas, respectivamente, com 0,5 e 0,4 mL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2). O sobrenadante foi obtido por centrifugação (4° C, 9.000 rpm por 10min) e utilizado como extrato de enzimas para determinação da atividade da CHE. A atividade total da CHE foi determinada a 414 nm de acordo com o método de Ellman (ELLMAN *et al.*, 1961), adaptada para microplaca (GUILHERMINO *et al.*, 1996). Para determinação da GST, amostras de brânquias, cabeça e fígado dos adultos e amostras compostas de sete larvas foram homogeneizadas, respectivamente, com 0,5 e 0,4 mL de tampão fosfato (0,1 M, pH 6,5). Após a centrifugação (4° C, 9.000 rpm por 10min) o sobrenadante foi coletado para análise da atividade enzimática, medida, seguindo-se a metodologia descrita por HABIG; JAKOBY (1981) e adaptada para microplaca por FRASCO; GUILHERMINO (2002).

As atividades enzimáticas foram determinadas em quadruplicata e expressas em nanomoles do substrato hidrolisado por minuto por miligrama de proteína. A concentração de proteína das amostras foi determinada, por sua vez, em quadruplicata pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), a 595 nm, usando γ-globulin como padrão. O leitor de microplacas Labsystems Multiskan Spectrum foi utilizado em todas as determinações bioquímicas.

O pacote SigmaPlot 11.0 foi utilizado para as análises estatísticas. Para análise dos dados foi empregado o teste *One-way* ANOVA. Quando os dados não passaram no teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Quando foram encontrados resultados significativos, empregaram-se os testes de Dunnett ou Dunn, a fim de se verificar diferenças estatísticas entre as concentrações testadas e o tratamento controle. A CL_{50-96h} para as fases iniciais do desenvolvimento e para os adultos, foi calculada com o auxílio da planilha ToxCalc, desenvolvida pelo prof. Dr. A.J.A. Nogueira no software Microsoft Excel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 podem ser observados os efeitos da exposição de ovos e larvas à ametrina, com a proporção de ovos e embriões mortos, vivos e eclodidos, além de larvas mortas e vivas. Em relação ao tratamento 0 e 0+, estes apresentaram desenvolvimento normal, como descrito por KIMMEL *et al.* (1995), sendo que a mortalidade em ambos tratamentos esteve sempre abaixo de 10%, como necessário para validação do teste. Como não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos 0 e 0+ ($P < 0,05$), são apresentados os dados médios dos dois tratamentos, como sendo apenas tratamento controle (0).

A CL_{50-96h} para os estágios iniciais do desenvolvimento do paulistinha foi determinada em $48,46 \pm 2,20$ mg L⁻¹ (95% IC). No que diz respeito à percentagem de eclosão dos ovos, diferenças significativas em relação ao tratamento controle foram observadas a partir do tratamento 47,6 mg L⁻¹ (Kruskal-Wallis $H = 18,347$, $P = 0,003$). Em relação à mortalidade, essas diferenças foram observadas apenas no tratamento 80 mg L⁻¹ (Kruskal-Wallis $H = 18,517$, $P = 0,002$), chegando a 100%. A CL_{50-96h} para os peixes adultos foi determinada em $7,65 \pm 1,91$ mg L⁻¹ (95% IC), sendo observadas diferenças significativas em relação ao controle nas concentrações de 12 (Kruskal-Wallis $H = 19,447$, $P = 0,002$) e 20,0 mg L⁻¹ (Kruskal-Wallis $H = 20,079$, $P = 0,001$) (Fig. 2).

Os efeitos *in vivo* da ametrina sobre a atividade das enzimas GST e CHE nas larvas e adultos de paulistinha podem ser observados na Figura 3. Nas larvas, a atividade da GST foi induzida nas concentrações 5,09; 7,17; 10,09 e 14,20 mg L⁻¹, quando comparadas com o tratamento controle (Kruskal-Wallis $H = 40,844$, $P \leq 0,001$). Já, a CHE sofreu inibição, porém a diferença só foi significativa entre o tratamento controle e o 19,99 mg L⁻¹ (*Oneway* ANOVA: $F: 3,773$; $P = 0,005$; Figura 3a). Em relação aos adultos, o único tratamento que levou à redução na atividade da GST foi 2,0 mg L⁻¹ (Kruskal-Wallis $H = 13,362$, $P = 0,004$). Em relação à CHE, nenhuma alteração no nível enzimático foi observada (Kruskal-Wallis $H = 4,897$, $P = 0,180$).

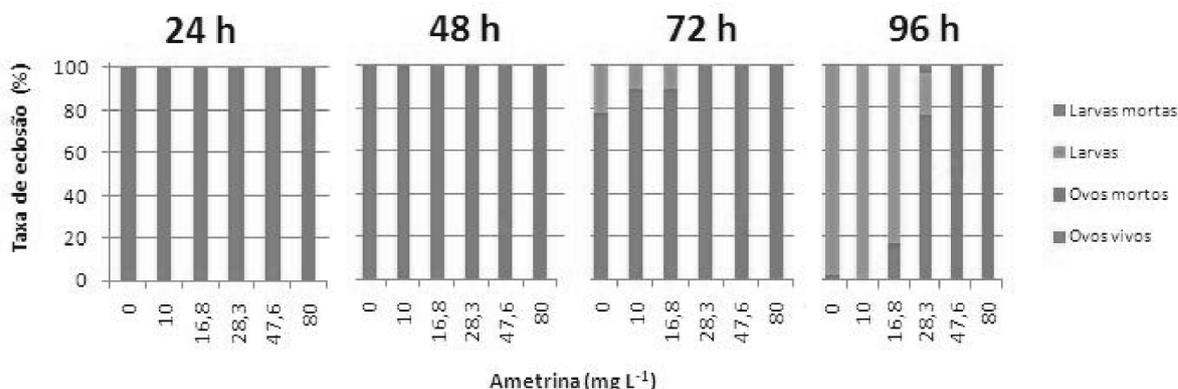


Fig. 1 - Taxa de eclosão dos ovos do paulistinha (*Danio rerio*) expostos ao herbicida ametrina.

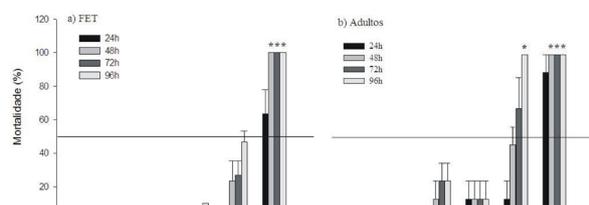


Fig. 2 - Mortalidade média (%) do paulistinha (*Danio rerio*) em fase inicial do desenvolvimento (a) e adulto (b), por exposição ao herbicida ametrina. *Média significativamente diferente do controle.

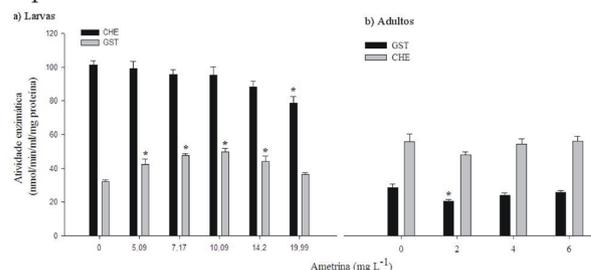


Fig. 3 - Variação da atividade dos biomarcadores (média \pm erro padrão) em larvas e adultos de peixe-zebra (*Danio rerio*) expostos ao herbicida ametrina. *Médias diferentes do tratamento-controle ($p < 0,05$).

A ametrina é um herbicida empregado mundialmente em lavouras de cana-de-açúcar. Na Austrália, LEWIS *et al.*, (2009) observaram que a ametrina não é, apenas, um dos princípios herbicidas encontrados nos corpos d'água adjacentes às áreas de plantio, como também foi detectado a quilômetros de distância, ameaçando o ecossistema marinho da Grande Barreira de Coral, já bastante impactado por outros fatores estressantes, como o aquecimento global. LOPES *et al.* (2004) determinaram a CL_{50-96h} para o paulistinha em $9,8 \text{ mg L}^{-1}$, valor bastante similar ao determinado para os peixes adultos neste trabalho ($7,65 \pm 1,91 \text{ mg L}^{-1}$), porém bastante inferior a CL_{50-96h} encontrada para os estágios iniciais do desenvolvimento ($48,46 \pm 2,20 \text{ mg L}^{-1}$). Segundo OLIVEIRA *et al.* (2009), o córion pode funcionar como uma barreira para alguns contaminantes, protegendo o embrião, o que pode justificar essa menor sensibilidade observada.

PEREIRA-MADUENHO; MARTINEZ (2008) avaliaram parâmetros hematológicos e bioquímicos do curimatá (*Prochilodus lineatus*) após exposição aguda à ametrina. Segundo os autores, a ametrina induziu a alterações hematológicas (redução do tamanho dos eritrócitos circulantes), porém não afetou a atividade das enzimas de transformação, entre elas a GST. Neste trabalho, observou-se um aumento da atividade da enzima GST nas larvas, porém o mesmo não ocorreu com os adultos.

Tanto em jovens como em adultos, a atividade da CHE foi inibida quando da exposição à ametrina. OLIVEIRA *et al.* (2009), avaliando os efeitos da exposição do *D. rerio* ao triclosan, um componente de produtos de higiene pessoal frequentemente encontrado em águas residuárias, observaram alterações importantes na atividade dos biomarcadores (GST, CHE e LDH), mesmo em concentrações que não afetavam a sobrevivência ou desenvolvimento dos peixes, indicando que o nível enzimático é um parâmetro bastante adequado para ser empregado nas avaliações de risco de contaminantes.

Analisando-se as respostas para a GST em larvas, observa-se que para a faixa de concentração $5,09 - 14,20 \text{ mg L}^{-1}$ a atividade da enzima aumentou em aproximadamente 35 - 45%, o que sugere considerar esse como um biomarcador promissor. Apesar das concentrações ambientais da ametrina serem geralmente inferiores às testadas no presente trabalho, a avaliação dessa enzima pode ser considerada como uma ferramenta útil na detecção do herbicida em extratos de amostras.

CONCLUSÃO

Os parâmetros avaliados neste trabalho permitem um melhor entendimento do modo de ação

e da toxicidade da ametrina ao *Danio rerio*. Diante do exposto, conclui-se que a utilização dos biomarcadores foi uma ferramenta útil para avaliar o risco de exposição dos peixes, mesmo em níveis subletais.

REFERÊNCIAS

- ARMAS, E.D.; MONTEIRO, R.T.R.; ANTUNES, P.M.; SANTOS, M.A.P.F.; CAMARGO, P.B.; ABAKERLI, R.B. Diagnóstico Espaço-Temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. *Química Nova*. v.30, n.5, p.1119-1127, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000500013&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 24 mar. 2010.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Portaria nº 518 de 25/03/2004*. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/POR-TARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>>. Acessado em: 22 nov. 2007.
- BURATINI, S.V.; BRANDELLI, A. Bioacumulação In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*, São Paulo: RIMA, 2006. p.55-88.
- DENTON, D.L.; STARRETT, G.I.; SMITH, R.H.; JOHNSON, S.C. Comparison of hypothesis testing to point estimate techniques for marine toxicity tests. In: *Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Abstracts, 15th Annual Meeting; 1994 Nov 14-18; Denver, CO, SETAC Pr., Pensacola, FL (1994)*, p.116 MD 12.
- DOMINGUES, I.; AGRA, A.R.; MONAGHAN, K.; SOARES, A.M.V.M.; NOGUEIRA, A.J.A. Cholinesterase and Glutathione-S-Transferase Activities in Freshwater Invertebrates as Biomarkers to Assess Pesticide Contamination. *Environmental Toxicology & Chemistry* v.29, p.5-18, 2010.
- ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDREAS, V.J.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry Pharmacology*, v.7, p.88-95, 1961.
- FRASCO, M.F.; GUILHERMINO, L. Effects of dimethoate and betanaphthoflavone on selected biomarkers of

- Poecilia reticulata. *Fish Physiology and Biochemistry* v.26, p.149-156, 2002.
- GUILHERMINO, L.; LOPES, M.C.; CARVALHO, A.P.; SOARES, A.M.V.M. Acetylcholinesterase activity in juvenile daphnia magna strauss. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* v.57, p.979-985, 1996.
- HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Assays for differentiation of glutathione S-transferase. *Methods in Enzymology*. Academic, New York, 1981. p.398-405.
- IEA, 2010. Área e produção dos principais produtos da agropecuária do Estado de São Paulo. *Banco de Dados*. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/banco/menu.php>>. Acesso em: 20 abr. 2010.
- KIMMEL, C.B.; BALLARD, W.W.; KIMMEL, S.R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T.F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Develop Dynamics*, v.203, p.253-310, 1995.
- LEWIS, S.E.; BRODIE, J.E.; BAINBRIDGE, Z.T.; ROHDE, K.W.; DAVIS, A.M.; MASTERS, B.L.; MAUGHAN, M.; DEVLIN, M.J.; MUELLER, J.F.; SCHAFFELKE, B. (2009) Herbicides: A new threat to the Great Barrier Reef. *Environmental Pollution*, v.157, p.2470-2484, 2009.
- LOPES, R.S.; LOPES, F.R.A.S.; MARANHO, L.A.; LOPES, R.B.; TORNISIELO, V.L. 2004. Avaliação da toxicidade da ametrina e atrazina sobre *Danio rerio* (paulistinha). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 12., 2009, São Paulo. *Anais*. São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.usp.br/siicusp/Resumos/12Siicusp/ficha2371.htm>>. Acesso em: 29 set. 2009.
- NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; LEITE, M.B.N.L. Biomarcadores como instrumentos preventivos de Poluição. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). *Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações*. São Paulo: RIMA, 2006. p.413-432.
- OECD, Organization for Economic Co-Operation and Development. 1992. *Guideline for Testing of Chemicals*. Fish, Acute Toxicity Test. Disponível em: <<http://www.oecd.org/dataoecd/17/20/1948241.pdf>>. Acesso em: 22 abr. 2010.
- OECD, Organization for Economic Co-Operation and Development. 2006. *Guideline for Testing of Chemicals*. Fish Embryo Toxicity (FET) Test. Disponível em: <<http://www.oecd.org/dataoecd/39/59/36817070.pdf>>. Acesso em: 22 abr. 2010.
- OLIVEIRA, R.; DOMINGUES, I.; GRISOLIA, C.K.; SOARES, A.M.V.M. Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. *Environmental Science & Pollution Research*, v.16, n.6, p.679-688, 2009.
- PEREIRA-MADUENHO, L.; MARTINEZ, C.B.R. 2008. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de curimbás após exposição aguda ao herbicida ametrina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 10., 2008, Bento Gonçalves. *Resumos*. Bento Gonçalves, 2008. p.238.
- PIACENTE, F.J. 2005 Agroindústria canavieira e o sistema de gestão ambiental: o caso das usinas localizadas nas bacias hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá. *Tese*. UNICAMP, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000386200&fd=y>>. Acesso em: 19 set. 2011.
- TOMLIN, C. (Ed.) *The pesticide manual*. Alton: British Crop Protection Council, 1994. 1400p.
- VENTURA, B.C.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.90, p.42-51, 2008.