



SETAC – Brazil

## Toxicidade Aguda e Histopatologia do Herbicida Reward® na Brânquia e no Fígado do Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

M. N. P. HENARES,<sup>1,3</sup> C. CRUZ,<sup>1\*</sup> G. R. GOMES,<sup>1,3</sup> R. A. PITELLI<sup>1</sup> & M. R. F. MACHADO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia da FCAV da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, Brasil

<sup>3</sup>Centro de Aqüicultura da Unesp/Caunesp, Campus de Jaboticabal, Brasil

(Received, March 6, 2007; Accepted, November 21, 2007)

### RESUMO

A concentração letal (CL(I)50;96h) e os efeitos histopatológicos do Reward® para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) foram avaliados em três experimentos. Os peixes foram submetidos às concentrações de 0; 0,27; 0,31; 0,35; 0,39; 0,43; e 0,48 mL de Reward® L<sup>-1</sup> e a histologia da brânquia e do fígado foi avaliada nos peixes sobreviventes. A CL(I)50;96h do Reward® estimada foi de 0,34 mL L<sup>-1</sup>. Nos tratamentos controle e 0,27 mL L<sup>-1</sup> não ocorreram alterações histopatológicas nas brânquias e nos fígados dos peixes expostos. Nas brânquias, os tratamentos com 0,31 e 0,35 mL L<sup>-1</sup> causaram edema subepitelial nas células de revestimento das lamelas secundárias. Nos tratamentos com 0,39 mL L<sup>-1</sup> e 0,43 mL L<sup>-1</sup> ocorreram hiperplasia das células de revestimento e fusão apical das lamelas secundárias. No fígado os tratamentos com 0,31, 0,35 e 0,39 mL L<sup>-1</sup> causaram desarranjo, hipertrofia e presença de vacúolos nos hepatócitos, respectivamente. No tratamento com 0,43 mL L<sup>-1</sup> ocorreu necrose dos hepatócitos. O herbicida Reward® foi pouco tóxico para o pacu e as alterações histopatológicas mais severas, como a fusão apical das lamelas secundárias nas brânquias e a necrose dos hepatócitos, ocorreram apenas nas maiores concentrações avaliadas.

*Palavras-chave:* peixe teleósteo, ecotoxicologia, histopatologia, concentração letal, Diquat.

### ABSTRACT

#### Acute toxicity and histopathological of Reward® herbicide on gill and liver of pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

The lethal concentration 50% (LC(I)50;96h) and the histopathological effects of the herbicide Reward® on the pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*) were evaluated under three laboratory assays. The fishes were submitted to 0; 0.27; 0.31; 0.39; 0.43; and 0.48 ml of Reward® L<sup>-1</sup> and gills and livers histologies were evaluated on the surviving fishes. The Reward® CL(I)50;96h estimated was of 0.34 mL L<sup>-1</sup>. In the treatments control and in the 0.27 mL L<sup>-1</sup> no histopathological alterations in the gills and livers of the exposed fishes were found. On the gills, the 0.31 and 0.35 mL L<sup>-1</sup>, treatment caused subepithelial edema in the secondary lamellas coating cells. In the 0.39 mL L<sup>-1</sup> and 0.43 mL L<sup>-1</sup> treatments hyperplasia of the coating cells and apical fusion of the secondary lamellae were observed. On the liver, the 0.31, 0.35 and 0.39 mL L<sup>-1</sup> treatment caused diarrhea, hypertrophy and presence of glycogen granules inside the hepatocytes, respectively. In the 0.43 mL L<sup>-1</sup> treatment hepatocytes necrosis was registered. The Reward® herbicide was not very toxic on the pacu and the most severe histopathological alterations like fusion of secondary lamellas on gills and necrosis of hepatocytes were noticed only on higher evaluated concentrations.

*Key words:* fish teleost, ecotoxicology, histopathological, lethal concentration, Diquat.

\*Corresponding author: Dr. Claudinei da Cruz, e-mail: cruzcl@yahoo.com.

## INTRODUÇÃO

O Reward® (1-1'-etileno-2-2'-dibrometo de bipiridílio) é um herbicida utilizado nos EUA para o controle de macrófitas aquáticas (Syngenta, 2002). No Brasil, o Reward® foi utilizado para o controle das seguintes macrófitas: *Salvinia molesta*, *Eichhornia crassipes* e *Pistia stratiotes* (Martins et al., 2002); *Polygonum lapathifolium* (Terra et al., 2003); *Eichhornia crassipes* e *Pistia stratiotes* (Pitelli et al., 2004); e *Egeria densa* e *Egeria najas* (Martins et al., 2005). Porém, apesar da eficácia comprovada, no Brasil o Reward® ainda não possui registro para uso em corpos hídricos, sendo necessários estudos ecotoxicológicos e histopatológicos para avaliar os efeitos tóxicos e as possíveis alterações na morfofisiologia dos peixes (Mallatt, 1985).

Assim, para o Reward®, como para qualquer substância química a ser utilizada no ambiente, a avaliação ecotoxicológica é fundamental para a regulamentação do seu uso e para a classificação quanto ao potencial de risco ambiental. A identificação do perigo e a avaliação da relação dose-resposta são etapas iniciais no processo de avaliação da toxicidade ou risco ambiental (USEPA, 2002).

Neste contexto, em razão do interesse de registro do herbicida Reward® para o controle de macrófitas aquáticas e diante da importância dos estudos de toxicidade aguda na avaliação do risco ambiental, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de estimar o valor da concentração letal 50% (CL(I)50;96h) resultante da exposição do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) ao herbicida Reward®. Os efeitos histopatológicos na brânquia e no fígado foram também avaliados. O pacu é uma espécie neotropical de importância ecológica e econômica nos corpos hídricos brasileiros e membro da família Characidae, recomendada para testes de toxicidade (IBAMA, 1987).

## MATERIALE MÉTODOS

### Condições ambientais, testes preliminares e definitivos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Impacto Ambiental do Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal.

Os peixes utilizados com peso médio de  $6,9 \pm 1,0$  g, na densidade de  $1,74$  g de peixes  $L^{-1}$ , foram aclimatados por 10 dias na sala de bioensaios com temperatura mantida em  $27 \pm 2^{\circ}C$  e fotoperíodo de 12 h L/12 h E. A aclimação foi realizada em um recipiente com capacidade para 250 L, com sistema de aeração contínuo, promovido por bombas de ar e circulação contínua de água. Neste período os peixes foram alimentados uma vez por dia com ração comercial, *ad libitum*.

Os testes preliminares de toxicidade aguda foram realizados para determinar o intervalo de concentração do Reward® entre os valores que causaram zero e 100% de mortalidade dos peixes (CETESB, 1999). Em todos os experimentos os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado

(DIC), com três réplicas e três animais em cada réplica, na densidade de  $3,45$  g de peixes  $L^{-1}$ .

O período de exposição dos peixes foi de 96 horas e o sistema de condução dos testes foi o estático, sem substituição ou sifonagem de água nem alimentação dos animais durante o período de exposição dos peixes ao herbicida. A avaliação da mortalidade foi diária, com a retirada dos peixes mortos das unidades experimentais.

As variáveis de qualidade da água foram mantidas em pH  $7,34 \pm 0,4$ ; oxigênio dissolvido em  $7,68 \pm 0,5$  mg  $L^{-1}$ ; condutividade elétrica  $180,0 \pm 5,0$   $\mu S$   $cm^{-1}$  e dureza em  $58 \pm 2,0$  mg de  $CaCO_3$   $L^{-1}$ , de acordo com as recomendações do IBAMA (1987).

Para o controle de sensibilidade dos organismos-teste foram realizados testes periódicos de toxicidade aguda com a substância referência dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ), com teor de pureza de 99%, de acordo com a recomendação do IBAMA (1987). A utilização de peixes com peso de  $6,9 \pm 1,0$  g não apresentou diferença de sensibilidade ao dicromato de potássio, sendo que o valor médio da CL(I)50-96h desta substância estimada para o pacu foi de  $167,58 \pm 19,67$  mg  $L^{-1}$ . O valor médio de sensibilidade para o pacu neste estudo foi similar ao obtido para o pacu (*P. mesopotamicus*)  $1 \pm 0,5$  g (Cruz et al., 2004).

Para a determinação da CL(I)50;96h do Reward® foram realizados três experimentos ( $n = 3$ ) utilizando-se sete concentrações: de 0; 0,27; 0,31; 0,35; 0,39; 0,43; e 0,48 mL Reward  $L^{-1}$  (que correspondem a um equivalente teórico de 0; 65; 75; 85; 95; 105; e 115 mg Diquat  $L^{-1}$ , respectivamente). Os valores da CL(I)50;96h foram calculados pelo método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977).

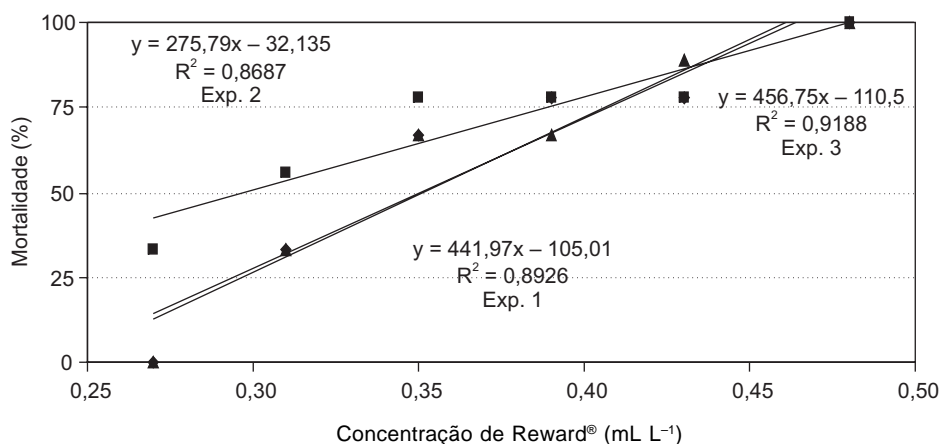
### Análise histopatológica da brânquia e do fígado

Para a análise histopatológica das brânquias e dos fígados dos peixes expostos ao herbicida foram utilizados três animais sobreviventes de cada tratamento. Os órgãos foram retirados e fixados por 24 h em solução de formaldeído tamponado (0,1 M; pH 7.3). Após a fixação, os fragmentos dos órgãos foram desidratados em etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina plástica (Histosec® Merck). A seguir, foram realizados cortes histológicos em micrótomo automático (Leica – RM-2155), obtendo-se seções de 3 a 5  $\mu m$  de espessura, que foram coradas com hematoxilina-eosina e submetidas ao PAS (Behmer et al., 1976).

## RESULTADOS

### Toxicidade aguda (CL (I) (50-96h) do Reward®

A concentração letal 50% (CL(I)50;96h) média do herbicida Reward® estimada para o pacu nos três experimentos foi de  $0,34 \pm 0,003$  mL  $L^{-1}$  (equivalente a  $82,72 \pm 0,66$  mg teórica de Diquat  $L^{-1}$ ), com o intervalo de confiança com limite inferior de  $0,32 \pm 0,002$  mL  $L^{-1}$  e superior de  $0,37 \pm 0,003$  mL  $L^{-1}$ . A equação linear que representa a relação concentração-resposta e coeficiente de determinação da análise de regressão ( $R^2$ ) do Reward® estimada para o pacu esta apresentada na Figura 1.



**Figura 1** – Representação da relação concentração-resposta, CL (I)50;96h e R<sup>2</sup> do herbicida Reward® para o pacu nos três experimentos (Exp.).

Nos tratamentos controle e 0,27 mL L<sup>-1</sup> não ocorreram mortalidade dos peixes após 96 horas de exposição ao Reward®. No tratamento com 0,31 mL L<sup>-1</sup> ocorreu 33,33% de mortalidade; com 0,35 mL L<sup>-1</sup>, 66,66%; com 0,39 e 0,43 mL L<sup>-1</sup>, 77,77%; e com 0,48 mL L<sup>-1</sup> ocorreu 100% de mortalidade dos peixes.

Nas primeiras 24 horas de exposição dos peixes ao Reward® foi observada mortalidade parcial apenas nas concentrações de 0,43 e 0,48 mL L<sup>-1</sup>. Com 48 horas de exposição os peixes permaneceram no fundo do aquário, com aumento do batimento opercular e natação não coordenada. Após 48 horas, os peixes apresentaram sinais de intoxicação, com tremores e natação errática. Com 72 e 96 horas de exposição, verificou-se aumento na porcentagem de mortalidade em todas as concentrações avaliadas.

#### **Histopatologia das brânquias e dos fígados**

As brânquias dos tratamentos controle e 0,27 mL L<sup>-1</sup> apresentaram lamelas primárias que, em intervalos regulares, formavam as lamelas secundárias. As lamelas secundárias são formadas por duas camadas de células epiteliais pavimentosas, células pilares, células-cloreto e células mucosas (Figura 2a). Nos tratamentos com 0,31 e 0,35 mL L<sup>-1</sup> ocorreram edema subepitelial no epitélio de revestimento das lamelas secundárias (Figura 2b), enquanto nos tratamentos 0,39 e 0,43 mL L<sup>-1</sup> a exposição ao Reward® causou hiperplasia das células de revestimento, desenvolvimento do epitélio interlamelar (Figura 2c) e fusão das lamelas secundárias (Figura 2d).

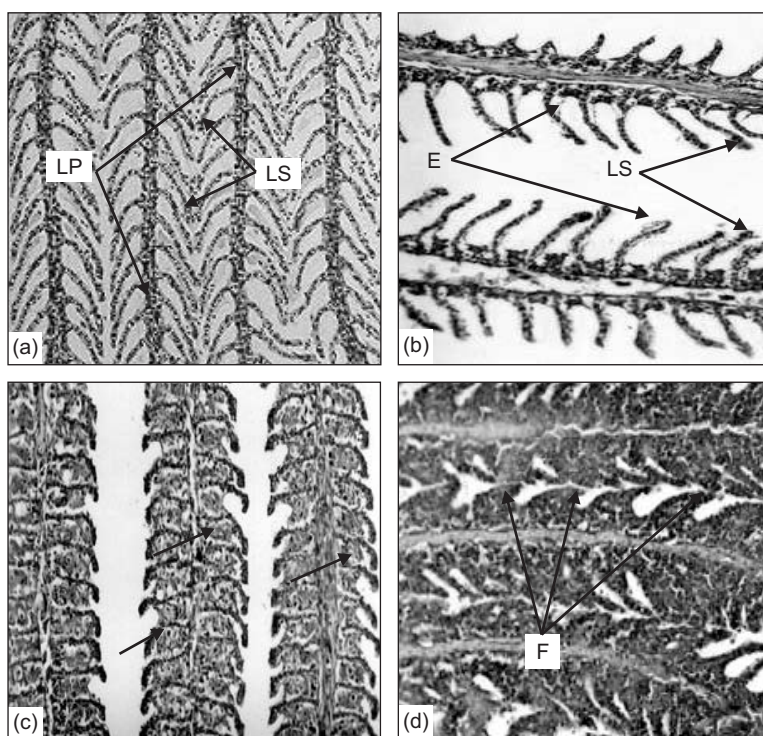
O fígado, no tratamento controle e 0,27 mL L<sup>-1</sup>, apresentou hepatócitos levemente arredondados, com citoplasma claro (baixa acidofilia), com a presença de grânulos de glicogênio (PAS-positivo) organizados em arranjo cordonal (Figura

3a). Nos tratamentos com 0,31 e 0,35 mL L<sup>-1</sup> ocorreram desarranjos da organização cordonal e hipertrofia dos hepatócitos (Figura 3b). No tratamento com 0,39 mL L<sup>-1</sup> ocorreu, em algumas regiões do fígado, congestão no interior dos capilares sinusóides, desarranjo da organização cordonal e presença de vacúolos no interior dos hepatócitos, indicando consumo de glicogênio e fusão celular, enquanto no tratamento com 0,43 mL L<sup>-1</sup> ocorreu necrose dos hepatócitos (Figura 3c).

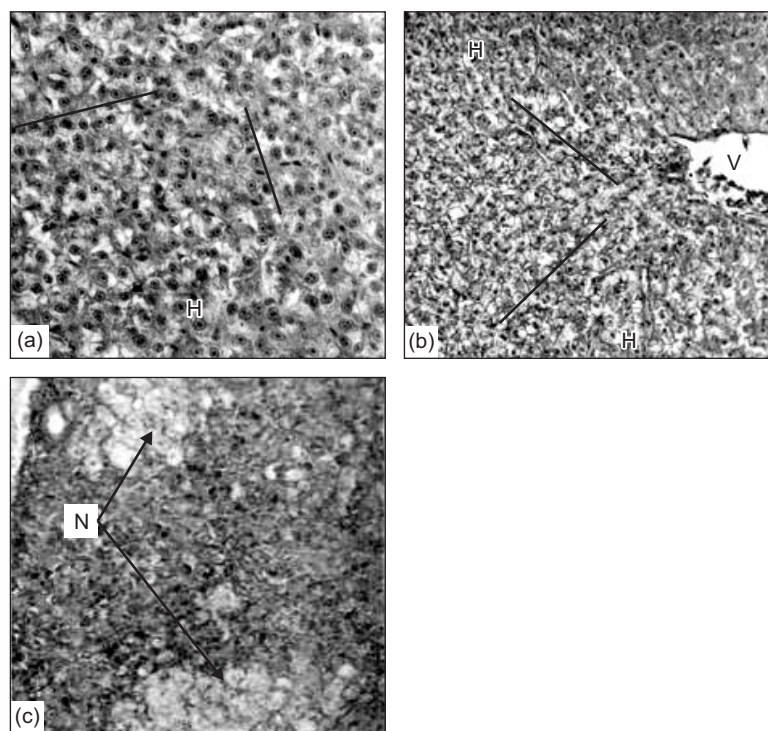
#### **DISCUSSÃO**

A concentração letal 50% (CL50(I); 96h) média de 0,34 ± 0,003 mL L<sup>-1</sup> do herbicida Reward® (equivalente a 82,72 ± 0,66 mg teórico de Diquat L<sup>-1</sup>) foi menos tóxica para o pacu do que o Diquat na formulação Reward® para os peixes *Stizostedion viterum*, *Micropterus salmonides* e *Micropterus dolomieu*, com CL50(I)50;96h entre 0,74 e 4,9 mg L<sup>-1</sup> (Paul *et al.*, 1994). Porém, o Reward® foi mais tóxico para o pacu do que o Diquat na formulação Reward® para *Gambusia affinis*, com CL50(I); 96h de 289 mg L<sup>-1</sup> (Leung *et al.*, 1983), e do que para *Carassius auratus*, com CL50(I); 96h entre 76-95 mg L<sup>-1</sup> (Berry Jr., 1984).

Com relação a outros herbicidas, o Reward® foi menos tóxico para o pacu do que o Gramoxone para *Oreochromis niloticus*, com 11,84 mg L<sup>-1</sup> (Babatunde *et al.*, 2001), e do que o herbicida Clomazone para *Rhamdia quelen*, com CL50 (I); 96h de 7,32 mg L<sup>-1</sup> (Miron *et al.*, 2005). Porém, o Reward® foi mais tóxico para o pacu do que o Glyphosate® para *Cyprinus carpio*, com CL50(I); 96h de 620 mg L<sup>-1</sup> (Neskovic *et al.*, 1996), e do que o herbicida Quinclorac para *Rhamdia quelen*, com CL50(I); 96h de 395 mg L<sup>-1</sup> (Miron *et al.*, 2005).



**Figura 2** – Fotomicrografia da brânquia no tratamento com (a) 0; (b) 0,35; (c) 0,39; e (d) 0,43 mL de Reward® L<sup>-1</sup>. (a) 0,0 mL L<sup>-1</sup> – destacando as lamelas primárias (LP) e lamelas secundárias (LS). HE, 200x; (b) 0,35 mL L<sup>-1</sup> – destacando o edema subepitelial (E) nas lamelas secundárias (LS). HE, 200x; (c) 0,39 mL L<sup>-1</sup> – destacando a hiperplasia das células de revestimento das lamelas secundárias (seta). HE, 200x; (d) 0,43 mL L<sup>-1</sup> – destacando a fusão apical (F) das lamelas secundárias. HE, 200x.



**Figura 3** – Fotomicrografia do fígado no tratamento com 0,0; 0,31; e 0,43 mL de Reward® L<sup>-1</sup>. (a) 0,0 mL L<sup>-1</sup> – destacando a organização cordonal dos hepatócitos (traço), hepatócito (H); (b) 0,31 mL L<sup>-1</sup> – destacando o desarranjo da organização cordonal (traço) e a hipertrofia dos hepatócitos (H) e veia central (V). HE 200x; (c) 0,43 mL L<sup>-1</sup> – destacando a necrose (N) dos hepatócitos. PAS, 200x.

O Reward® apresentou baixo risco de intoxicação para o pacu, pois o valor da concentração letal 50% estimado é maior que 100 vezes a concentração ambiental estimada (CAE) para o controle de algumas espécies submersas de macrófitas aquáticas ( $400 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Syngenta, 2005). Porém, a utilização deste herbicida no ambiente aquático requer cuidados em razão da grande biodiversidade de organismos presente nesse ambiente.

O efeito histopatológico causado pelo Reward® na brânquia dos peixes submetidos aos tratamentos com  $0,31 \text{ mL L}^{-1}$  e  $0,35 \text{ mL L}^{-1}$  (75 e 85 mg teórico de Diquat  $\text{L}^{-1}$ ) foi similar ao observado em *Cyprinus carpio* expostos ao Glyphosate® (Neskovic *et al.*, 1996). A hiperplasia das células de revestimento, o desenvolvimento do epitélio interlamelar e a fusão das lamelas secundárias causadas nas concentrações de  $0,39$  e  $0,43 \text{ mL L}^{-1}$  (95 e 105 mg teórico de Diquat  $\text{L}^{-1}$ ) foram similares ao observado em *C. carpio* expostas a Trifluralina (Poleksic & Karan, 1999), indicando a redução da eficiência da lamela branquial em realizar suas funções fisiológicas, pois estas lesões histopatológicas descritas podem causar danos à integridade morfofuncional da brânquia (Mallatt, 1985).

Para os tratamentos com  $0,31$  e  $0,35 \text{ mL L}^{-1}$  (75 e 85 mg teórico de Diquat  $\text{L}^{-1}$ ), os efeitos causados pelo Reward® no fígado foram similares aos observados para outros herbicidas pertencentes a outros grupamentos químicos, como o Imazapyr, o Terbutrin e ao Triasulfuron para larvas de *Sparus aurata* (Arufe *et al.*, 2004). Nos tratamentos com  $0,39$  e  $0,43 \text{ mL L}^{-1}$  (95 e 105 mg teórico de Diquat  $\text{L}^{-1}$ ), os efeitos causados pelo Reward® foram similares aos observados em *C. carpio* expostos ao Glyphosate® (Neskovic *et al.*, 1996), e a necrose dos hepatócitos também foi observada em *C. carpio* exposta a Trifluralina (Poleksic & Karan, 1999).

Os efeitos histopatológicos causados pelo Reward® no fígado são reversíveis, exceto a ocorrência de necrose, conforme descrito por Montenegro & Franco (1998). Sendo assim, podemos considerar que o Reward® apresentou baixa toxicidade (Zucker, 1985) para o pacu, pois os efeitos histopatológicos agudos na brânquia e no fígado ocorreram em altas doses do herbicida Reward®, que estão acima da recomendação a ser utilizada no controle de algumas espécies de macrófitas aquáticas submersas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARUFE, M. I., ARELLANO, J. & MORENO, M. J., 2004, Toxicity of a commercial herbicide containing terbutryn and triasulfuron to seabream (*Sparus aurata* L.) larvae: a comparison with the microtox test. *Ecotox. Environ. Saf.*, 9: 209-216.
- BABATUNDE, M. M., OLADIMEJI, A. A. & BALOGUN, J. K., 2001, Acute toxicity of gramoxone to *Oreochromis niloticus* (Trewavas). *Water Air Soil Pollut.*, 131: 1-10.
- BEHMER, A. O., TOLOSA, E. M. C. & FERITAS-NETO, A. G., 1976, *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. Edart/Edusp, São Paulo, 239p.
- BERRY Jr., C. R., 1984, Toxicity of the herbicides diquat and endothal to goldfish. *Environ. Pollut.*, 34: 251-258.
- CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 1999, *Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos. Água – teste de toxicidade aguda com peixes – parte I – sistema estático*. São Paulo, v. 2, 29p.
- CRUZ, C., MACHADO-NETO, J. G. & MENEZES, M. L., 2004, Toxicidade aguda do inseticida paration metílico e do biopesticida azadiractina de folhas de neem (*Azadirachta indica*) para alevino e juvenil de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Pesticidas: Ecotox. e Meio Ambiente*, 14: 93-102.
- HAMILTON, M. A., RUSSO, R. C. & THURSTON, V., 1977, Trimmed spearman-karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, 7: 714-719.
- IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), 1987, Avaliação da toxicidade aguda para peixes. In: *Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos*. Brasília, DF, parte D, 23p.
- LEUNG, T. S., NAQVI, S. M. & LEBLANC, C., 1983, Toxicities of two herbicides (Basagran, diquat) and an algicide (Cutrine-plus) to mosquitofish *Gambusia affinis*. *Environ. Pollut.*, 30: 153-160.
- MALLATT, J., 1985, Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42: 630-648.
- MARTINS, D., VELINI, E. D., NEGRISOLI, E. & TOFOLI, G. R., 2002, Controle químico de *Pistia stratiotes*, *Eichhornia crassipes* e *Salvinia molesta* em caixas d'água. *Planta Daninha*, 20: 83-88.
- MARTINS, D., VELINI, E. D. & NEGRISOLI, E., 2005, Controle de *Egeria densa* e *Egeria najas* em caixas d'água utilizando o herbicida diquat. *Planta Daninha*, 23: 381-385.
- MIRON, dos SANTOS., CRESTANI, M., SHETTINGER, M. R., MORSH, V. M., BALDISSEROTTO, B., TIERNO, M. A., MORAES, G. & VIEIRA, A. L. P., 2005, Effects of herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotox. Environ. Saf.*, 61: 398-403.
- MONTENEGRO, M. R. & FRANCO, M., 1998, *Patologia: processos gerais*. Atheneu, São Paulo, 272p.
- NEKOVIC, N. K., POLEKSIC, V., ELEZOVIC, I., KARAN, V. & BUDIMIR, M., 1996, Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 56: 295-302.
- PAUL, E. A., SIMONIN, H. A., SYMULA, J. & BAUER, R. W., 1994, The toxicity of diquat, endothal, and fluridone to the early life stage of fish. *J. Freshwater Ecol.*, 9: 229-239.
- PITELLI, R. A., BISIGATO, A. E. F., MARTINS, A. T., PITELLI, R. L. C. M., & KAWAGUGHI, I., 2004, Controle de *Eichhornia crassipes* com diquat, em duas formulações aplicadas nos períodos diurno e noturno. *Boletim Infor. Soc. Brasil. Ciênc. das Plant. Daninhas*, Viçosa, 10: 111-111.
- POLEKSIC, V. & KARAN, V., 1999, Effects of trifluralin on carp: biochemical and histological evaluation. *Ecotox. Environ. Saf.*, 43: 213-221.
- SYNGENTA, 2002, Reward®. Diquat dibromide: benefits to aquatic weed management. *Technical bulletin*. Greensboro., 2002. Disponível em: <www.syngentaprofessionalproducts.com>. Acesso em: 1 mar. 2005.
- SYNGENTA, 2005, *Reward: landscape and aquatic herbicide*. Disponível em <http://www.syngentaprofessionalproducts.com/labels>. Acesso em: 12 abr. 2005.
- TERRA, M. A., NEGRISOLI, E., CARBONARI, C. A., CARDOSO, L. R. & MARTINS, D., 2003, Controle químico de plantas aquáticas: *Polygonum lapathifolium*. *Planta Daninha*, 21: 85-88.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2002, *Guidelines for the health: risk assesment guidamce for superfund (RAGS)*. Disponível em: <www.epea.gov/superfund/programs/risk/rags/ch.7>. Acesso em: 18 fev. 2005.
- ZUCKER, E., 1985, *Hazard evaluation division. Standard evaluation procedure. Acute toxicity test for freshwater fish*. USEPA publication 540/9-85-006, Washington, 17p.

