

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**TOXICIDADE DE IMIDACLOPRID E CARBOFURAN
PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS DE
DIFERENTES NÍVEIS TRÓFICOS**

**Juliana Heloisa Pinê Américo-Pinheiro
Bióloga**

Jaboticabal, São Paulo

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**TOXICIDADE DE IMIDACLOPRID E CARBOFURAN
PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS DE
DIFERENTES NÍVEIS TRÓFICOS**

Juliana Heloisa Pinê Américo-Pinheiro

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Jaboticabal, São Paulo

2015

A512t Américo-Pinheiro, Juliana Heloisa Pinê
Toxicidade de imidacloprid e carbofuran para organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos / Juliana Heloisa Pinê Américo-Pinheiro. -- Jaboticabal, 2015
xix, 106 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2015

Orientador: Joaquim Gonçalves Machado Neto

Banca examinadora: Claudinei da Cruz, Laura Satiko Okada Nakaghi, Marco Antônio de Andrade Belo, Matheus Nicolino Peixoto Henares

Bibliografia

1. Agrotóxicos. 2. Daphnia magna. 3. Tilápia. 4. Risco ambiental. 5. Histologia. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.09:574.64

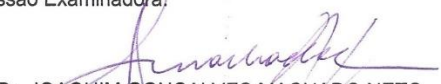
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Toxicidade de imidacloprid e carbofuran para organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos

AUTORA: JULIANA HELOISA PINE AMERICO-PINHEIRO


ORIENTADOR: Prof. Dr. JOAQUIM GONÇALVES MACHADO NETO

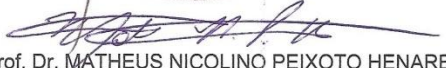
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Aquicultura , pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOAQUIM GONÇALVES MACHADO NETO
Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. CLAUDINEI DA CRUZ
Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos, Curso de Agronomia, Barretos-SP


Profa. Dra. LAURA SATIKO OKADA-NAKAGHI
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO
Universidade Camilo Castelo Branco, UNICASTELO, Descalvado-SP


Prof. Dr. MATHEUS NICOLINO PEIXOTO HENARES
Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos, Barretos-SP

Data da realização: 17 de agosto de 2015.

“É melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

Dedico

*Aos meus amados pais, **Marlene e Ricardo Américo**, por todo amor, incentivo e pela boa educação que sempre dedicaram a mim.*

Agradecimentos

A Deus, pela vida, saúde, força e coragem para superar as dificuldades e por me mostrar o caminho nas horas incertas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), pela oportunidade e apoio institucional.

Ao Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto, pela orientação, disposição, confiança e ensinamentos compartilhados que sempre agregaram conhecimento. Obrigada por todo aprendizado proporcionado durante o período do meu doutorado.

Ao Prof. Dr. Claudinei da Cruz, pela sua disposição, amizade, pelos esclarecimentos em questões que se revelaram importantes no direcionamento do meu trabalho, auxílio nas análises histológicas e oportunidades proporcionadas durante o doutorado.

À Profa. Dra. Márcia Rita Fernandes Machado, por conceder seu laboratório para realização das rotinas histológicas, muito obrigada.

Aos meus pais, Marlene e Ricardo Américo, por terem me dado a vida, pela educação, pelo amor incondicional e apoio durante todas as fases da minha vida. Obrigada por sempre acreditarem em mim.

À toda minha família, em especial minha irmã e amiga Gabriela Américo e minha tia e segunda mãe Maria de Lurdes Pinê pelo amor, apoio, cumplicidade e por sempre torcerem pelo meu sucesso.

Ao meu marido e amigo Rafael Silvio Bonilha Pinheiro, pelo amor, carinho, companheirismo, conselhos e pela paciência principalmente na reta final do doutorado. Agradeço pelo auxílio prestado durante os finais de semana com os experimentos da tese, pelas análises estatísticas e por sempre incentivar o meu crescimento profissional.

Às amigas do LABORSEG, Angela Aparecida Machado, Naiara Fernanda Ignácio, Maria Amália da Silva e Ana Carla Coleone, pela amizade, pelo auxílio na realização dos experimentos da tese, conhecimentos compartilhados e bons momentos vividos.

Aos amigos do NEPEAM, Cynthia Ikefuti, Silvia Patrícia Carraschi, Nathalia Garlic, Mayara Tedesque, Alfredo Yamauchi, Adilson da Silva, Roberto Barbuio e Natália Shiogiri, pelo ajuda e colaboração na realização desse trabalho e pelas boas conversas.

A querida amiga Carolina Cipriano Pinto, pelo carinho, conversas e desabafos compartilhados. Obrigada por sempre me ouvir, tentar acalmar minhas angústias e pelos momentos de lazer em conjunto, principalmente pelas corridas de rua.

Às amigas do coração, Nádia Hortense Torres, Cláudia Morgado, Mariela Zúcolo, Juliana Lourenção e Lígia Lavezzi que muitas vezes de longe sempre me apoiaram e incentivaram.

Aos funcionários do CAUNESP (David, Vera e Márcio) e da FCAV (Gilson e Márcia) que sempre estiveram dispostos a ajudar no que fosse necessário.

À CAPES pela bolsa de doutorado concedida.

Lista de Figuras

Manuscrito 1 - Risco de intoxicação ambiental de organismos aquáticos não alvos pelos inseticidas imidacloprid e carbofuran

- Figura 1.** Aspectos do cultivo e da realização dos ensaios com o microcrustáceo. **(A)** Exemplar de *D. magna*. **(B)** Organismos mantidos em câmara climatizada do tipo BOD. **(C)** Separação dos neonatos com 2 a 26 horas de vida para realização dos ensaios. **(D)** Recipientes testes utilizados nos ensaios 25
- Figura 2.** Aspectos do cultivo e da realização dos ensaios com *L. minor*. **(A)** Cultivo das macrófitas em meio Hoagland's. **(B)** Separação das quatro colônias de *L. minor* com três frondes cada **(C)** Recipientes teste dos ensaios com três réplicas por concentração do inseticida 27
- Figura 3.** Aspectos do cultivo e da realização dos ensaios com caramujo. **(A)** Aclimação dos caramujos em sala de bioensaios alimentados com *H. verticillata*. **(B)** Exemplares de *P. canaliculata*. **(C)** Recipientes teste com três réplicas por concentração do inseticida 29
- Figura 4.** Aspectos do cultivo e da realização dos ensaios com tilápia. **(A)** Recipiente de aclimação dos peixes em sala de bioensaio. **(B)** Exemplares de *O. niloticus* com aproximadamente 1 g. **(C)** Recipientes teste com três réplicas por concentração do inseticida 31
- Figura 5.** Concentração de oxigênio dissolvido e condutividade elétrica avaliada durante o ensaio de toxicidade aguda em 0, 24 e 48 horas após a exposição do *P. canaliculata* às concentrações de imidacloprid testadas 39
- Figura 6.** Concentração de oxigênio dissolvido e condutividade elétrica avaliada durante o ensaio de toxicidade aguda em 0, 24 e 48 horas após a exposição do *P. canaliculata* às concentrações de carbofuran testadas 40
- Figura 7.** Concentração de oxigênio dissolvido e condutividade elétrica avaliada durante o ensaio de toxicidade aguda em 0, 24 e 48 horas após a exposição de *O. niloticus* às concentrações de imidacloprid testadas 42
- Figura 8.** Concentração de oxigênio dissolvido e condutividade elétrica avaliada durante o ensaio de toxicidade aguda em 0, 24 e 48 horas após a exposição de *O. niloticus* às concentrações de carbofuran testadas 44

Manuscrito 2 - Alterações hematológicas e histológicas em tilápia (*Oreochromis niloticus*) exposta a concentrações subletais de imidacloprid e carbofuran

- Figura 1.** Condutividade elétrica avaliada durante o período de exposição no ensaio de toxicidade crônica do imidacloprid para *O. niloticus* 61
- Figura 2.** Fotomicrografias de brânquias de *Oreochromis niloticus*. **(A)** Controle não exposto ao imidacloprid. **(B)** Congestão sanguínea (CS) e aumento do epitélio interlamelar (AEI) em peixe exposto a 2,810 mg L⁻¹ de imidacloprid. **(C)** Desestruturação da lamela secundária (DLS) em peixe exposto a 2,810 mg L⁻¹ de imidacloprid. **(D)** Edema em peixe exposto a 28,100 mg L⁻¹ de imidacloprid. LP: lamela primária e LS: Lamela secundária. Coloração PAS 68

Figura 3. Fotomicrografias de fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> . (A) Controle não exposto ao imidacloprid com muitos grânulos de glicogênio (GG) no interior dos hepatócitos. (B) Hipertrofia dos hepatócitos, deslocamento do núcleo para periferia da célula (asterisco), estase no capilar sinusóide (E) e ponto de necrose (N) em peixe exposto a 28,100 mg L ⁻¹ de imidacloprid. VC: veia central. Coloração PAS	71
Figura 4. Fotomicrografias de rim de <i>Oreochromis niloticus</i> . (A) Controle não exposto ao imidacloprid. (B) Pontos de necrose nos túbulos proximal e distal (N), ausência de espaço intercelular (asterisco) e desprendimento da cápsula glomerular (DCG) em peixe exposto a 2,810 mg L ⁻¹ de imidacloprid. TD: túbulo distal. TP: túbulo proximal. Coloração PAS	73
Figura 5. Fotomicrografias de gônada masculina de <i>Oreochromis niloticus</i> . (A) Controle não exposto ao imidacloprid. (B) Pontos de necrose nas espermatogônias (N) e desarranjo da parede do túbulo seminífero em peixe exposto a 14,050 mg L ⁻¹ de imidacloprid. ES: espermatogônias. Coloração PAS	75
Figura 6. Condutividade elétrica durante o período de exposição no ensaio de toxicidade crônica do carbofuran para <i>O. niloticus</i>	76
Figura 7. Fotomicrografias de brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> . (A) Controle não exposto ao carbofuran. (B) Aumento do epitélio interlamelar (AEI) em peixe exposto a 0,0880 mg L ⁻¹ de carbofuran. (C) Desestruturação da lamela secundária (DLS) em peixe exposto a 0,0044 mg L ⁻¹ de carbofuran. (D) Congestão sanguínea em peixe exposto a 0,0088 mg L ⁻¹ de carbofuran. LP: lamela primária e LS: Lamela secundária. Coloração PAS	82
Figura 8. Fotomicrografias de fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> . (A) Controle não exposto ao carbofuran com muitos grânulos de glicogênio (GG) no interior dos hepatócitos. (B) e (C) Hipertrofia dos hepatócitos, deslocamento do núcleo para periferia da célula (asterisco), estase no capilar sinusóide (E) e ponto de necrose (N) em peixe exposto a 0,0880 mg L ⁻¹ de carbofuran. (D) Fusão celular em peixe exposto a 0,0044 mg L ⁻¹ de carbofuran. VC: veia central. Coloração PAS	85
Figura 9. Fotomicrografias de rim de <i>Oreochromis niloticus</i> . (A) Controle não exposto ao carbofuran. (B) Ausência de espaço intercelular (asterisco) e desprendimento da cápsula glomerular (DCG) em peixe exposto a 0,0088 mg L ⁻¹ de carbofuran. (C) Pontos de necrose (N) nos túbulos distal e proximal em peixe exposto a 0,0440 mg L ⁻¹ de carbofuran. (D) Desprendimento da cápsula glomerular (DCG) e pontos de necrose (N) nos túbulos 0,0880 mg L ⁻¹ . TD: túbulo distal. TP: túbulo proximal. Coloração PAS	87
Figura 10. Fotomicrografias de gônada masculina de <i>Oreochromis niloticus</i> . (A) Controle não exposto ao imidacloprid. (B) Pontos de necrose nas espermatogônias (N) e desarranjo da parede do túbulo seminífero em peixe exposto a 0,0440 mg L ⁻¹ de carbofuran. ES: espermatogônias. Coloração PAS em (A) e HE em (B)	89

Lista de Tabelas

Considerações gerais

Tabela 1. Características gerais e propriedades físico-químicas do inseticida neonicotinóide imidacloprid	10
Tabela 2. Características gerais e propriedades físico-químicas do inseticida carbamato carbofuran	11

Manuscrito 1 - Risco de intoxicação ambiental de organismos aquáticos não alvos pelos inseticidas imidacloprid e carbofuran

Tabela 1. Concentrações dos inseticidas imidacloprid e carbofuran utilizadas nos ensaios definitivos de toxicidade aguda para <i>D. magna</i>	26
Tabela 2. Concentrações dos inseticidas imidacloprid e carbofuran utilizadas nos ensaios definitivos de toxicidade aguda para <i>L. minor</i>	28
Tabela 3. Concentrações dos inseticidas imidacloprid e carbofuran utilizadas nos ensaios definitivos de toxicidade aguda para <i>P. canaliculata</i>	30
Tabela 4. Concentrações dos inseticidas imidacloprid e carbofuran utilizadas nos ensaios definitivos de toxicidade aguda para <i>O. niloticus</i>	32
Tabela 5. Classes de toxicidade aguda propostas Zucker (1985) e IBAMA (2015), baseadas nos valores de CE50, CI50 e CL50 de agrotóxicos para organismos não alvos	33
Tabela 6. Classes de risco de intoxicação ambiental segundo Goktepe et al. (2004)	33
Tabela 7. Concentração efetiva média estimada (CE50;48h) dos inseticidas imidacloprid e carbofuran para o microcrustáceo <i>Daphnia magna</i>	35
Tabela 8. Concentração de inibição média estimada (CI50;7d) dos inseticidas imidacloprid e carbofuran para a macrófita <i>Lemna minor</i>	36
Tabela 9. Concentração efetiva média estimada (CE50;48h) dos inseticidas imidacloprid e carbofuran para a macrófita <i>Pomacea canaliculata</i>	38
Tabela 10. Concentração letal média estimada (CL50;48h) dos inseticidas imidacloprid e carbofuran para tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	41
Tabela 11. Valores do quociente de risco (RQ) e suas respectivas classificações de risco para imidacloprid, representados pela razão entre as diluições da CAE e a CE/CI/CL50 dos organismos aquáticos avaliados, considerando-se a maior dose recomendada para citros (200 g i.a ha ⁻¹) em um corpo de água com área de 1 ha e profundidade de 0,3 m	45
Tabela 12. Valores do quociente de risco (RQ) e suas respectivas classificações de risco para imidacloprid, representados pela razão entre as diluições da CAE e a CE/CI/CL50 dos organismos aquáticos avaliados, considerando-se a maior dose recomendada para citros (200 g i.a ha ⁻¹) em um corpo de água com área de 1 ha e profundidade de 2,0 m	46
Tabela 13. Valores do quociente de risco (RQ) e suas respectivas classificações de risco para carbofuran, representados pela razão entre as diluições da CAE e a CE/CI/CL50 dos organismos aquáticos avaliados,	

considerando-se a maior dose recomendada para cana-de-açúcar (1750 g i.a ha⁻¹) em um corpo de água com área de 1 ha e profundidade de 0,3 m 47

Tabela 14. Valores do quociente de risco (RQ) e suas respectivas classificações de risco para carbofuran, representados pela razão entre as diluições da CAE e a CE/CI/CL50 dos organismos aquáticos avaliados, considerando-se a maior dose recomendada para cana-de-açúcar (1750 g i.a ha⁻¹) em um corpo de água com área de 1 ha e profundidade de 2,0 m 48

Manuscrito 2 - Alterações hematológicas e histológicas em tilápia (*Oreochromis niloticus*) exposta a concentrações subletais dos inseticidas imidacloprid e carbofuran

Tabela 1. Valores de quociente e respectivas concentrações utilizadas nos ensaios de toxicidade crônica do imidacloprid e carbofuran para tilápia, *O. niloticus* 58

Tabela 2. Valores médios e erro padrão das variáveis hematológicas de tilápias, *O. niloticus*, expostas a concentrações subletais do inseticida imidacloprid durante sete dias 63

Tabela 3. Valores médios e erro padrão dos índices hematimétricos de tilápias, *O. niloticus*, expostas a concentrações subletais do inseticida imidacloprid durante sete dias 64

Tabela 4. Valores médios e erro padrão do trombograma e do teor de proteínas plasmáticas de tilápias, *O. niloticus*, expostas a concentrações subletais do inseticida imidacloprid durante sete dias 65

Tabela 5. Valores médios e erro padrão do leucograma de tilápias, *O. niloticus*, expostas a concentrações subletais do inseticida imidacloprid durante sete dias 66

Tabela 6. Alterações histológicas em brânquias de tilápias, *O. niloticus*, após sete dias de exposição a concentrações subletais de imidacloprid 67

Tabela 7. Alterações histológicas em fígado de tilápias, *O. niloticus*, após sete dias de exposição a concentrações subletais de imidacloprid 70

Tabela 8. Alterações histológicas em rim de tilápias, *O. niloticus*, após sete dias de exposição a concentrações subletais de imidacloprid 72

Tabela 9. Alterações histológicas em gônadas masculinas de tilápias, *O. niloticus*, após sete dias de exposição a concentrações subletais de imidacloprid 74

Tabela 10. Valores médios e erro padrão das variáveis hematológicas de tilápias, *O. niloticus*, expostas a concentrações subletais do inseticida carbofuran durante sete dias 77

Tabela 11. Valores médios e erro padrão dos índices hematimétricos de tilápias, *O. niloticus*, expostas a concentrações subletais do inseticida carbofuran durante sete dias 78

Tabela 12. Valores médios e erro padrão do trombograma e do teor de proteínas plasmáticas de tilápias, *O. niloticus*, expostas a concentrações subletais do inseticida carbofuran durante sete dias 79

Tabela 13. Valores médios e erro padrão do leucograma de tilápias, *O. niloticus*, expostas a concentrações subletais do inseticida carbofuran durante

sete dias	80
Tabela 14. Alterações histológicas em brânquias de tilápias, <i>O. niloticus</i> , após sete dias de exposição a concentrações subletais de carbofuran	82
Tabela 15. Alterações histológicas em fígado de tilápias, <i>O. niloticus</i> , após sete dias de exposição a concentrações subletais de carbofuran	85
Tabela 16. Alterações histológicas em rim de tilápias, <i>O. niloticus</i> , após sete dias de exposição a concentrações subletais de carbofuran	86
Tabela 17. Alterações histológicas em gônadas masculinas de tilápias, <i>O. niloticus</i> , após sete dias de exposição a concentrações subletais de carbofuran.	88

Sumário

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 Introdução Geral	3
2 Objetivos	5
3 Revisão Bibliográfica	6
3.1 Dinâmica e destino ambiental dos agrotóxicos	6
3.2 Inseticidas neonicotinóides	8
3.3 Inseticidas carbamatos	10
3.4 Avaliação do risco de intoxicação ambiental	11
3.5 Organismos aquáticos utilizados nos ensaios de toxicidade	12
3.5.1 <i>Daphnia magna</i>	12
3.5.2 <i>Lemna minor</i>	13
3.5.3 <i>Pomacea canaliculata</i>	14
3.5.4 <i>Tilápia</i>	15
3.6 Efeitos dos neonicotinóides e carbamatos em organismos aquáticos	16
MANUSCRITO 1. RISCO DE INTOXICAÇÃO AMBIENTAL DE ORGANISMOS AQUÁTICOS NÃO ALVOS PELOS INSETICIDAS IMIDACLOPRID E CARBOFURAN	19
1 Introdução	21
2 Material e Métodos	23
2.1 Local da realização dos ensaios	23
2.2 Inseticidas utilizados	24
2.3 Ensaios de toxicidade aguda	24
2.3.1 <i>Daphnia magna</i>	24
2.3.2 <i>Lemna minor</i>	26
2.3.3 <i>Pomacea canaliculata</i>	28
2.3.4 <i>Oreochromis niloticus</i>	30
2.4 Classificação dos inseticidas pela toxicidade aguda	32
2.5 Risco de intoxicação ambiental dos inseticidas para os organismos não alvos estudados	33
2.6 Análise dos dados	34
3 Resultados e Discussão	35

3.1 Toxicidade aguda dos inseticidas	35
3.1.1 <i>Daphnia magna</i>	35
3.1.2 <i>Lemna minor</i>	36
3.1.3 <i>Pomacea canaliculata</i>	38
3.1.4 <i>Oreochromis niloticus</i>	41
3.2 Risco de intoxicação ambiental	44
4 Conclusões	48
5 Referências	49
MANUSCRITO 2. ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E HISTOLÓGICAS EM TILÁPIA (<i>Oreochromis niloticus</i>) EXPOSTA A CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DE IMIDACLOPRID E CARBOFURAN	53
1 Introdução	54
2 Material e Métodos	57
2.1 Ensaio de toxicidade crônica	57
2.2 Análises hematológicas	58
2.3 Análises histológicas	59
2.4 Análise estatística dos dados	60
3 Resultados e Discussão	61
3.1 Imidacloprid	61
3.1.1 <i>Ensaio de toxicidade crônica</i>	61
3.1.2 <i>Parâmetros hematológicos</i>	62
3.1.3 <i>Histologia</i>	67
3.1.3.1 <i>Brânquias</i>	67
3.1.3.2 <i>Fígado</i>	69
3.1.3.3 <i>Rim</i>	72
3.1.3.4 <i>Gônadas</i>	73
3.2 Carbofuran	76
3.2.1 <i>Ensaio de toxicidade crônica</i>	76
3.2.2 <i>Parâmetros hematológicos</i>	77
3.2.3 <i>Histologia</i>	81
3.2.3.1 <i>Brânquias</i>	81
3.2.3.2 <i>Fígado</i>	84
3.2.3.3 <i>Rim</i>	86
3.2.3.4 <i>Gônadas</i>	87

4 Conclusões	89
5 Referências	90
CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES	99

RESUMO

A utilização de agrotóxicos pode causar contaminação dos ecossistemas aquáticos e intoxicar organismos não alvos. Objetivou-se avaliar a toxicidade aguda dos inseticidas imidacloprid e carbofuran para organismos aquáticos pertencentes a diferentes níveis tróficos, avaliar variáveis de qualidade de água durante os ensaios, classificar os inseticidas quanto ao risco de intoxicação ambiental para cada organismo e avaliar alterações hematológicas e histológicas causadas por concentrações subletais dos inseticidas em *Oreochromis niloticus*. Ensaios de toxicidade aguda foram realizados com *Daphnia magna*, *Lemna minor*, *Pomacea canaliculata* e tilápia de acordo com as normas da ABNT e OECD. Ensaios de toxicidade crônica foram realizados com tilápia de acordo com a ABNT. Após a exposição dos peixes às concentrações subletais dos inseticidas por sete dias, foram coletadas amostras de sangue para análise hematológica e de órgãos (brânquia, fígado, rim e gônada) para avaliação histológica. O imidacloprid é ligeiramente tóxico para *D. magna* e praticamente não tóxico para *L. minor*, *P. canaliculata* e *O. niloticus*. O risco de intoxicação ambiental do imidacloprid é baixo para os organismos avaliados. O carbofuran é extremamente tóxico para *D. magna*, altamente tóxico para *O. niloticus* e praticamente não tóxico para *L. minor* e *P. canaliculata*. Os riscos de intoxicação ambiental para *L. minor* e *P. canaliculata* devido à contaminação da água com carbofuran classificam-se como baixo. Para *D. magna* e *O. niloticus* o risco varia de alto a médio. A exposição subletal crônica de tilápias aos inseticidas altera os parâmetros hematológicos e causa alterações histológicas em brânquia, fígado, rim e gônada. A presença de imidacloprid e carbofuran em ambientes aquáticos pode comprometer a sobrevivência de organismos não alvos e prejudicar o funcionamento dos órgãos dos peixes expostos. A diluição de imidacloprid e carbofuran aumenta a condutividade elétrica da água.

Palavras-chave: agrotóxicos, *Daphnia magna*, tilápia, risco ambiental, histologia

ABSTRACT

The use of pesticides can cause contamination of aquatic ecosystems and intoxicate non-target organisms. The objective was to assess the acute toxicity of imidacloprid and carbofuran insecticide to aquatic organisms belonging to different trophic levels, assess quality variables of water during rehearsals, classify insecticides on the risk of environmental poisoning for each organism, evaluate hematological and histological changes caused by sublethal concentrations of pesticides in *Oreochromis niloticus*. Acute toxicity tests were performed with *Daphnia magna*, *Lemna minor*, *Pomacea canaliculata* and tilapia according to ABNT and OECD. Chronic toxicity tests were conducted with tilapia according to ABNT. After exposing of fishes to sublethal concentrations of pesticides for seven days, blood samples were collected for hematological analysis and organs (gill, liver, kidney and gonad) for histological evaluation. Imidacloprid is slightly toxic to *D. magna* and practically non-toxic to *L. minor*, *P. canaliculata* and *O. niloticus*. The risk of environmental poisoning of imidacloprid is down to the assessed organisms. Carbofuran is highly toxic to *D. magna*, highly toxic to *O. niloticus* and practically non-toxic to *L. minor* and *P. canaliculata*. The risks of environmental poisoning for *L. minor* and *P. canaliculata* due to contamination of water with carbofuran are classified as low. To *D. magna* and *O. niloticus* the risk varies from high to medium. The chronic sublethal exposure to insecticides tilapia change hematological parameters and causes histological changes in gill, liver, kidney and gonad. The presence of imidacloprid and carbofuran in aquatic environments may compromise the survival of non-target organisms and impair the operation of fish organs exposed. The dilution of imidacloprid and carbofuran increases the electrical conductivity of water.

Keywords: pesticides, *Daphnia magna*, tilapia, environmental risk, histology

1 Introdução geral

A produção agrícola baseia-se na utilização intensiva de produtos químicos com a finalidade de se obter maiores valores de produtividade através do controle de pragas que afetam as culturas. O uso destes produtos químicos denominados de agrotóxicos é visto como parte fundamental no sucesso da cadeia produtiva agrícola.

Apesar do expressivo crescimento da área cultivada com sementes transgênicas; tecnologia que poderia substituir e reduzir o uso do controle químico constata-se que as vendas dos agrotóxicos no país aumentaram mais de 72% entre 2006 e 2012 (SINDAG, 2012). No ano de 2013, foram consumidas 495.764,55 toneladas de agrotóxicos no Brasil. Os herbicidas representaram a classe de uso mais consumida no país (61,23%), seguida por inseticidas (11,50%), fungicidas (10,90%), acaricidas (6,40%) e outros (9,97%) (IBAMA, 2014).

O Estado de São Paulo foi considerado o segundo maior consumidor brasileiro de agrotóxicos em 2013, sendo superado apenas pelo Estado do Mato Grosso (IBAMA, 2014). Dentre os grupos de inseticidas mais utilizados no Estado de São Paulo, destacam-se o imidacloprid e carbofuran amplamente utilizados na cultura de cana-de-açúcar para o controle de pragas do solo em diversas etapas do manejo da cultura. Estes inseticidas são utilizados principalmente nas áreas de solo arenoso, onde ocorre a maior incidência de pragas do solo como: *Sphenophorus levis*, Cupins (12 spp), *Migdolus* spp., nematóides, Elaterídeos (larva-aramé), *Naupactus* spp. e Crisomelídeos.

O imidacloprid é um inseticida do grupo químico dos neonicotinóides, introduzido no mercado em 1991, pelas empresas Bayer AG e Nihos Tokushu Noyaku Seizo KK. Desde então, o imidacloprid é cada vez mais utilizado em todo mundo, principalmente para controle de insetos sugadores de culturas (pulgões, cigarrinhas, tripses, mosca branca e cupins) (TOMLIN, 1997; TOMIZAWA e CASIDA, 2005). Esse inseticida sistêmico também pode ser utilizado para o tratamento de sementes e para aplicação diretamente no solo e via foliar, cujo mecanismo de ação tóxica é agonista do receptor de acetilcolina em insetos

(MATSUDA et al., 2001). Em 2013, o imidacloprid destacou-se entre os 10 ingredientes ativos mais vendidos no Brasil (IBAMA, 2014).

O carbofuran é um inseticida, acaricida e nematocida de largo espectro de ação; foi introduzido no mercado pela primeira vez em 1967. Desde então, o uso do carbofuran cresceu rapidamente e é conhecido como um inibidor de colinesterase (SATAR et al., 2005). O Estado de São Paulo foi considerado o maior consumidor de carbofuran (61%) do país no ano de 2013 (IBAMA, 2014). Por se um inseticida muito tóxico para peixes (Bretaud et al., 2000, Campos-Garcia et al., 2015), teve seu registro para uso agrícola cancelado nos Estados Unidos e Europa (USEPA, 2006).

O uso frequente, e muitas vezes incorreto, destes inseticidas ocasiona a contaminação dos solos, da atmosfera, das águas superficiais e subterrâneas, e dos alimentos (SPADOTTO, 2006). A contaminação das águas superficiais e subterrâneas ocorre principalmente pela movimentação das águas da chuva e de irrigação. Os agrotóxicos dissolvidos nas águas podem ser lixiviados com as águas de drenagem que escoam das plantações e dos solos e atingem a rede hidrográfica (CEREJEIRA et al., 2003).

Com a expansão da aquicultura brasileira, a rede hidrográfica de muitas regiões é utilizada para o cultivo de peixes. Nesse cenário, a tilápia destaca-se como a espécie mais cultivada respondendo por 43,1% da produção de peixes no Brasil, seguida pelo tambaqui (22,6%) e pelo grupo tambacu e tambatinga (15,4%) (IBGE, 2013). As águas contaminadas podem resultar em exposição e intoxicação dos peixes de cultivo, organismos da fauna e flora aquáticas, dos animais domésticos e da população (CEREJEIRA et al., 2003).

As intoxicações dos organismos aquáticos com os inseticidas podem ser agudas ou crônicas. As intoxicações crônicas, muitas vezes, são difíceis de serem relacionadas à exposição em baixas concentrações (COOPER et al., 1999). Alguns dos efeitos indesejáveis provocados pela introdução de agrotóxicos no ambiente são: alteração da dinâmica bioquímica natural, mudanças no funcionamento do ecossistema e morte de indivíduos (SPADOTTO, 2006). Para constatar tais alterações nos organismos cronicamente expostos destacam-se os biomarcadores como parâmetros de avaliação da exposição aos compostos

tóxicos, por meio de alterações histológicas, fisiológicas, bioquímicas e hematológicas.

Os biomarcadores podem ser identificados em níveis bioquímico, celular, individual, populacional, de comunidade ou de ecossistema. Porém, nos níveis organizacionais mais básicos de respostas bioquímicas e moleculares, que os efeitos iniciais dos compostos tóxicos são observados. Nestas situações, as alterações provocadas por poluentes podem ser reversíveis e orientar o uso de medidas preventivas que evitem o comprometimento mais severo do ambiente. Entretanto, os marcadores bioquímicos, fisiológicos e histológicos são adequados quando forem suficientes para evidenciar diferentes respostas à presença de concentrações de estressores distintos (HUGGETT et al., 1992).

Assim, devido à frequência e intensidade do uso dos inseticidas imidacloprid e carbofuran, principalmente em cana-de-açúcar, são necessários estudos sobre concentrações letais, risco de intoxicação ambiental, efeitos subagudos e alterações de biomarcadores provocados por esses inseticidas em organismos economicamente importantes para aquicultura como a tilápia (*Oreochromis niloticus*) e em organismos não alvos pertencentes a diferentes níveis tróficos aquáticos.

2 Objetivos

- 1- Avaliar a toxicidade aguda do imidacloprid e do carbofuran para organismos aquáticos não alvos pertencentes a diferentes níveis tróficos (*Lemna minor*, *Daphnia magna*, *Pomacea canaliculata* e *Oreochromis niloticus*) e avaliar as variáveis de qualidade de água durante os ensaios.
- 2- Classificar os inseticidas imidacloprid e carbofuran pelo risco de intoxicação ambiental para cada organismo não alvo com base na toxicidade aguda e na concentração ambiental estimada em diferentes cenários ambientais.
- 3- Avaliar as alterações causadas por concentrações subletais dos inseticidas imidacloprid e carbofuran nos parâmetros hematológicos de *O. niloticus*.

- 4- Verificar as alterações histológicas causadas por concentrações subletais dos inseticidas imidacloprid e carbofuran em brânquias, fígado, rim e gônadas de *O. niloticus*.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Dinâmica e destino ambiental dos agrotóxicos

Em aplicações de agrotóxicos pelas vias sólida, líquida ou gasosa vários processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos podem influenciar o comportamento do ingrediente ativo no ambiente. Os processos dominantes de dissipação em condições específicas de uso dos agrotóxicos podem ser de retenção (adsorção, absorção e sorção), de transformação (degradação biótica e abiótica), de transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial), e por interação desses processos (SPADOTTO, 2006).

O solo é o destino final dos produtos químicos usados na agricultura, sejam eles aplicados diretamente neste ou sob a parte aérea das plantas. Ao entrarem em contato com o solo, os agrotóxicos estão sujeitos à sorção ou retenção da sua molécula no solo. Em alguns casos menos de 0,1% dos agrotóxicos alcançam o alvo, enquanto que o restante (99,9%) tem potencial para se mover para outros compartimentos ambientais, como os mananciais hídricos (SABIK et al., 2000).

A capacidade de sorção de um agrotóxico ao solo é influenciada por diferentes propriedades da molécula como a solubilidade em água, a constante de ionização ácido-base, a pressão de vapor e o coeficiente de partição octanol-água, além das propriedades físicas e químicas do solo. As constantes de ionização ácido-base assumem papel importante no comportamento dos herbicidas sendo que a grande maioria dos fungicidas, inseticidas e acaricidas não é ionizável (REGITANO, 2002).

No processo de absorção, os agrotóxicos penetram em um ou mais organismos através de sua membrana celular e assim sofre alterações enquanto que na adsorção o composto fica aderido à superfície das partículas e pode sofrer influências da solução do solo (SPADOTTO et al., 2010).

A volatilização dos agrotóxicos também é uma importante rota de distribuição desses produtos no ambiente, pois possibilita o carreamento dos compostos para a atmosfera e, posteriormente, sua deposição nas águas superficiais através da precipitação (SILVA FILHO, 2009).

O processo de volatilização pode ocorrer durante e após a aplicação, a partir da superfície das plantas, na superfície e na matriz do solo, assim como na superfície e na coluna d'água. Além disso, as estimativas de resíduos têm de considerar também os processos de transporte na atmosfera e a deposição no solo, na vegetação e em corpos d'água (SPADOTTO et al., 2010). As perdas de herbicidas por volatilização podem variar de menos de 2% até 90% (CARTER 2000).

Os agrotóxicos que são lixiviados são considerados potenciais poluidores das águas subterrâneas. A extensão da contaminação desses ambientes aquáticos depende das propriedades dos agrotóxicos, das características do solo, da velocidade de drenagem e da profundidade do lençol freáticos. O uso do solo, as condições hidrogeológicas do local e o grupo geológico do solo são outros fatores que também podem afetar a concentração dos agrotóxicos nas águas subterrâneas (MULLER et al., 1995).

O carreamento superficial corresponde ao movimento do agrotóxico pela água de enxurrada na superfície do solo, podendo chegar à superfície dos rios, lagos, córregos, açudes e terrenos com declividade baixa (SILVA FILHO, 2009).

O carreamento superficial é uma importante rota de deslocamento dos agrotóxicos, pois em momentos iniciais após a aplicação o composto pode ser carregado para fora da área em solução na água de escoamento ou, ainda pode ser adsorvido fortemente às argilas e à matéria orgânica sendo transportado pelo arraste das partículas do solo (SPADOTTO et al. 2010)

Outro problema muito comum em relação à dinâmica e destino de agrotóxicos no ambiente é o processo de deriva, no qual o composto é transportado através do vento durante sua aplicação nas culturas ou no solo. A ausência de vento também pode ser prejudicial, pois as gotas muito finas podem ficar suspensas no ar devido à estabilidade atmosférica, dispersando-se por

vários quilômetros do local de aplicação, sendo, muitas vezes, somente removida da atmosfera pela ação da chuva (SPADOTTO, 2006).

No ambiente, a transformação de agrotóxicos assim como de qualquer outro composto tóxico pode ocorrer através da degradação abiótica e biótica. A degradação abiótica ocorre através de transformações químicas como fotólise, oxidação/redução, hidrólise e reações de troca iônica enquanto que a degradação biótica ou biodegradação envolve a ação de microrganismos presentes no ambiente, os quais utilizam tais substâncias diretamente como substrato, a fim de obter energia necessária ao seu crescimento e metabolismo (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

A biodegradação de determinado composto tóxico depende da sua disponibilidade no ambiente para os organismos que promoverão a degradação. Muitos dos produtos mais persistentes no ambiente apresentam baixa degradação devida sua hidrofobicidade (MATA-SANDOVAL et al., 2002).

3.2 Inseticidas neonicotinóides

Os inseticidas neonicotinóides constituem uma classe de compostos sintetizados a partir da nicotina natural. Essa classe de inseticidas apresenta excelente ação sistêmica para proteção das culturas contra insetos-pragas sugadores como afídeos, moscas e tripses (TOMIZAWA e CASIDA, 2003). Insetos subterrâneos como cupins, e alguns mastigadores, além de insetos domiciliares, podem ser controlados em seu estágio larval por neonicotinóides (BACEY, 2014). Esses inseticidas também são altamente eficazes para o controle de pulgas em animais domésticos (TOMIZAWA e CASSIDA, 2005).

O amplo espectro de ação sobre insetos-pragas, a baixa taxa de aplicação no campo, a excelente translocação na planta e, principalmente, uma segurança ambiental favorável, em função de doses de aplicação relativamente baixas são características que explicam o sucesso dos inseticidas neonicotinóides. Além de serem produtos com grande flexibilidade em relação ao método de aplicação e bom efeito residual sobre as culturas. A eficiência de controle com os inseticidas neonicotinóides é superior ou equivalente à dos inseticidas organofosforados

registrados (SALLES, 2000; MAIENFISCH et al., 2001a; MAIENFISCH et al., 2001b).

O grupo dos inseticidas neonicotinóides mimetiza o efeito do neurotransmissor excitatório (acetilcolina) e competem com ele pelos receptores nicotinérgicos na membrana pós-sináptica do inseto. Diferente da ligação da acetilcolina com o seu receptor, a ligação com os neonicotinóides é persistente e resiste à ação da enzima acetilcolinesterase (Ache). Assim, a acetilcolinesterase degrada moléculas de acetilcolina, mas não consegue degradar as moléculas de neonicotinóides. A ativação dos receptores de acetilcolina por meio dos neonicotinóides é prolongada e provoca hiperexcitabilidade do sistema nervoso central devido à transmissão contínua de impulsos nervosos. Os sinais resultantes da intoxicação incluem tremores, convulsões e morte (TOMIZAWA e CASIDA, 2003; MARÇON, 2013; MARSHALL e BEGG, 2013).

As moléculas imidacloprid, nitenpyram, acetamiprid, tricloprid e thiamethoxam pertencem ao grupo químico dos neonicotinóides (também chamados de cloronicotinas, nitroguanidinas, clorotiazóis e nitroiminas). Entre os neonicotinóides, o imidacloprid introduzido no mercado em 1991 é um inseticida cada vez mais utilizado mundialmente para o controle de insetos sugares de culturas, tratamento de sementes de plantas cultivadas e aplicado diretamente no solo e via foliar (TOMLIN, 1997; MATSUDA et al., 2001; TOMIZAWA e CASIDA, 2005).

O imidacloprid é registrado para o controle de insetos pragas em culturas como alface, algodão, alho, almeirão, banana, batata, berinjela, cebola, cana-de-açúcar, citros, couve, eucalipto, feijão, goiaba, mamão, milho, amendoim, café, arroz além de ser indicado para controle de cupins (ANVISA, 2015). Na Tabela 1 são apresentadas características gerais e propriedades físico-químicas do inseticida imidacloprid.

Tabela 1. Características gerais e propriedades físico-químicas do inseticida neonicotinóide imidacloprid.

Características gerais	
Nome químico (IUPAC)	1-(6-chloro-pyridin-3-ylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine
CAS	n° 138261-41-3
Propriedades físico-químicas	
Fórmula empírica	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂
Massa molecular	255,66 g mol ⁻¹
Solubilidade em água a 20°C	610 mg L ⁻¹
Ponto de fusão	144°C
Pressão de vapor a 25°C	4,0 x 10 ⁻⁷ mPa

Fonte: Pesticide Properties Data Base (2013).

3.3 Inseticidas carbamatos

Os carbamatos são ésteres derivados do ácido carbâmico. Esse grupo de inseticidas foi introduzido no mercado na década de 1950 para uso agrícola e residencial. A descoberta dos carbamatos com estrutura simples e facilidade de sintetização de diversos análogos, fez com que uma enorme quantidade de moléculas fosse colocada no mercado (CASIDA e QUISTAD, 1998; FERREIRA, 1999).

Os carbamatos estão entre as classes de inseticidas mais utilizadas na agricultura e são reconhecidos por inibir a enzima acetilcolinesterase (Ache), a qual desempenha uma função importante nas sinapses colinérgicas, hidrolisando o neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético (KAVITHA e RAO, 2007). O mecanismo de inibição da acetilcolinesterase por carbamatos ocorre por meio da formação de um complexo enzima-inibidor (reversível) e posterior carbamilação (MAXWELL et al., 2008).

As moléculas aldicarb, carbofuran, carbosulfan, carbaril e propoxur pertencem ao grupo dos carbamatos. Dentre os carbamatos, o carbofuran introduzido no mercado pela primeira vez em 1967 destaca-se como um

inseticida, cupinicida, acaricida e nematicida de largo espectro de ação (SATAR et al., 2005; ANVISA, 2015).

O carbofuran é registrado para aplicação no solo nas culturas de algodão, amendoim, arroz, banana, batata, café, cana-de-açúcar, cenoura, feijão, milho, repolho, tomate e trigo. Além de ser indicado para aplicação em sementes de algodão, arroz, feijão, milho e trigo (ANVISA, 2015). Na Tabela 2 são apresentadas características gerais e propriedades físico-químicas do inseticida carbofuran.

Tabela 2. Características gerais e propriedades físico-químicas do inseticida carbamato carbofuran.

Características gerais	
Nome químico (IUPAC)	2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl methylcarbamate
CAS	n° 1563-66-2
Propriedades físico-químicas	
Fórmula empírica	$C_{12}H_{15}NO_3$
Massa molecular	221,26 g mol ⁻¹
Solubilidade em água a 20°C	322 mg L ⁻¹
Ponto de fusão	153,1°C
Pressão de vapor a 25°C	0,08 mPa

Fonte: Pesticide Properties Data Base (2013).

3.4 Avaliação de risco de intoxicação ambiental

A avaliação de risco é um processo cujo objetivo é calcular ou estimar o risco que possa existir para um determinado sistema alvo em decorrência de sua exposição a uma substância particular. Nessa avaliação devem ser consideradas as características inerentes da substância em questão e do alvo específico (GUILHERME, 2005).

Para a avaliação de risco ambiental são necessários dados ecotoxicológicos e concentrações ambientais estimadas (CAE) da substância a ser analisada. As relações quantitativas entre esses dados são utilizadas para

classificar os riscos ambientais das substâncias tóxicas específicas (URBAN e COOK, 1986; KOKTA e ROTHERT, 1992; SOLOMON, 1996; USEPA, 1996).

Segundo a regulamentação de European Communities (2003), na diretiva 1488/94, para avaliação de risco de substâncias químicas, o adequado é que se realizem ensaios de toxicidade aguda com organismos inseridos em pelo menos três níveis tróficos diferentes. Nestes ensaios, o composto tóxico não deve apresentar risco de intoxicação ambiental para os organismos dos três níveis tróficos.

3.5 Organismos aquáticos utilizados nos ensaios de toxicidade

Os organismos aquáticos são geralmente escolhidos para realização de estudos ecotoxicológicos com substâncias tóxicas devido à alta capacidade que eles apresentam de assimilar contaminantes no ambiente em que vivem e a alta sensibilidade fisiológica decorrente da exposição a concentrações subletais de contaminantes (VALAVANIDIS et al., 2006).

3.5.1 *Daphnia magna*

Daphnia magna é um microcrustáceo planctônico de água doce que pertence à Ordem Cladocera. Os organismos adultos dessa espécie medem de 5 a 6 mm de comprimento e podem ser encontrados em lagos, represas, rios e planícies inundadas (KNIE e LOPES, 2004).

Esses microcrustáceos possuem órgãos sensitivos na cabeça, um grande olho composto, pequenos ocelos, dois pares de apêndices sensoriais: a primeira antena ou antênula, com pelos sensitivos, e a segunda antena se caracteriza como o principal órgão de locomoção (TAVARES e ROCHA, 2002).

Nas cadeias alimentares, as daphnias participam como consumidores primários e se alimentam por filtração de material particulado, principalmente fitoplâncton e detritos. Esses microcrustáceos possuem uma carapaça constituída de quitina que protege o animal e é trocada diariamente (FONSECA, 1998). As daphnias apresentam um papel importante na comunidade zooplanctônica, pois

compõem um elo entre os níveis tróficos inferiores e superiores da cadeia alimentar de um ecossistema (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

A reprodução desses microcrustáceos aquáticos é partenogênética. Os ovos são depositados em uma câmara, onde se desenvolvem. Os organismos recém-nascidos são denominados de neonatos e são morfologicamente similares aos adultos, porém menores (TAVARES e ROCHA, 2002).

Em condições favoráveis as daphnias originam, por partenogênese, uma população constituída apenas por fêmeas geneticamente idênticas à mãe. Em condições desfavoráveis, como superpopulação, falta de alimento ou mudanças de temperatura, a reprodução é sexuada e origina machos chamados de efípios. Os efípios são ovos envolvidos por uma casca escura e altamente resistente, desenvolvida para suportar condições desfavoráveis, como ressecamento, congelamento e até a passagem pelo intestino dos peixes e de outros animais (RUPPERT e BARNES, 1996).

A *D. magna* é um organismo padronizado internacionalmente e indicado pela ABNT NBR 12713:2009 (ABNT, 2009) para avaliação da toxicidade aguda de amostras de efluentes líquidos, águas continentais (superficiais e subterrâneas) e substâncias químicas solúveis ou dispersas em água.

A utilização de *D. magna* pelos órgãos e institutos ambientais de vários países é devido a padronização de seus ensaios. Além disto, é um organismo abundante em meio aquático e sensível a substâncias tóxicas. O manejo e cultivo em condições de laboratório são fáceis uma vez que possuem ciclo de vida curto e padrão reprodutivo assexuado. Assim, seu genótipo padrão garante uniformidade no resultado do ensaio (KNIE e LOPES, 2004).

3.5.2 *Lemna minor*

As macrófitas são encontradas em quase todos os tipos de ambientes aquáticos e desempenham importante papel no ciclo de nutrientes e fluxo de energia (ESTEVES, 1998). Elas constituem a base das cadeias tróficas aquáticas de herbivoria direta assim como das cadeias de detritivoria (THOMAZ, 2002). A importância dessas plantas também está relacionada com a sua capacidade de

estabelecer uma forte ligação entre o sistema aquático e o ambiente terrestre que o circunda (JORGENSEN e LÖFFLER, 1990).

Lemna minor é uma espécie de macrófita aquática flutuante que pertence à família Lemnaceae. Esta espécie de angiosperma se reproduz, principalmente por meios vegetativos, a partir de brotos laterais (frondes) que liberam da planta-mãe (SOUZA et al., 2011).

Essa macrófita é padronizada internacionalmente e indicada pelo OECD Guidelines for the testing of chemicals (OECD, 2002) para avaliação de toxicidade aguda de substâncias químicas. *Lemna minor* é facilmente cultivada, tem taxa de crescimento elevada em condições de laboratório e alta sensibilidade a poluentes. As respostas da planta são geralmente avaliadas pelas alterações nas taxas de crescimento (KISS et al., 2003).

3.5.3 *Pomacea canaliculata*

O gênero *Pomacea* é constituído por cerca de 69 espécies descritas com distribuição na América do Sul, das quais 20 já foram registradas na Amazônia. Dentre estas, se inclui *P. canaliculata*, que apresenta uma ampla distribuição geográfica (SIMONE, 2006).

Os caramujos da espécie *P. canaliculata* apresentam hábito herbívoro além de consumir larvas e ovos de outros gastrópodes (LITSINGER e ESTANO, 1993). Esses moluscos com alta variação interpopulacional em relação ao tamanho, forma e espessura da concha habitam vários ecossistemas, desde pântanos e lagoas até lagos e rios (MARTIN e ESTEBENET, 2002). Como consumidores primários e por estarem em contato direto com o sedimento, os caramujos estão expostos principalmente a contaminantes que se adsorvem ao sedimento que podem ser revolvidos e novamente biodisponibilizados (DUFT et al., 2003).

3.5.4 Tilápia

Tilápia é a denominação comum de uma gama de espécies de peixes ciclídeos do gênero *Oreochromis* que se distribuem originalmente do Centro-Sul da África até o Norte da Síria (POPMA e PHELPS, 1998). O gênero *Oreochromis* foi introduzido na maioria dos países tropicais e subtropicais para utilização em piscicultura (LEE et al., 2005).

Proveniente da Costa do Marfim no Oeste africano, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi introduzida no nordeste do Brasil em 1971 e, então distribuída pelo país. A espécie *O. niloticus* é cultivada desde a bacia do rio Amazonas até o Rio Grande do Sul (LOVSHIN e CIRYNO, 1998).

A espécie *O. niloticus* destaca-se como peixe de potencial para aquicultura, devido ao crescimento rápido, adaptação ao confinamento, tolerância a altas temperaturas, baixa concentração de oxigênio dissolvido e alta concentração de amônia na água (POPMA e PHELPS, 1998).

As tilápias despertam grande interesse na piscicultura e são considerados os peixes de água doce de maior importância na aquicultura mundial (SANTOS et al., 2008). Atualmente, é a espécie mais cultivada no Brasil (IBGE, 2013) com excelente aceitação no mercado consumidor (ZIMMERMANN e HASPER, 2004).

A escolha dos peixes para estudos com substâncias tóxicas deve-se ao fato desse grupo possuir grande representatividade nos ecossistemas aquáticos. Além disso, os peixes abrangem vários níveis tróficos e desempenham importante papel ecológico nas teias alimentares aquáticas devido a sua função como transportadores de energia dos menores para os mais elevados níveis tróficos (VANDER OOST et al., 2003).

A tilápia (*O. niloticus*) apesar de ser uma espécie mais tolerante a exposição à xenobióticos pode ser considerada um potencial organismo teste em ensaios ecotoxicológicos, pois é um peixe abundante e disponível o ano todo, apresenta importância econômica na aquicultura mundial e é facilmente cultivada em laboratório.

3.6 Efeitos dos neonicotinóides e carbamatos em organismos aquáticos

O aumento do volume de agrotóxicos aplicados na agricultura tem trazido uma série de transtornos e modificações para o ambiente, tanto pela contaminação das comunidades de seres vivos que o compõe, quanto pela sua acumulação nos segmentos bióticos e abióticos dos ecossistemas (biota, água, ar, solo, etc.) Um dos efeitos indesejáveis provocado pelos agrotóxicos é a contaminação de organismos não alvos, ou seja, espécies que não interferem no processo de produção (RIBAS e MATSUMURA, 2009).

A assimilação e a retenção de contaminantes pelo organismo podem acarretar a concentração elevada do mesmo, com probabilidade de causar efeitos deletérios. Esse processo pode ocorrer por absorção direta, a partir do ambiente, ou por absorção indireta, através do alimento contaminado. Dessa forma, em uma cadeia alimentar, os contaminantes podem ser transferidos de um nível trófico a outro (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Os agrotóxicos que atingem os corpos d'água podem penetrar nos organismos aquáticos através de diversas vias de absorção e seu grau de acumulação depende do tipo de cadeia alimentar, da disponibilidade e persistência do contaminante na água e especialmente de suas características físicas e químicas (SPACIE e HAMELINK, 1985).

Os efeitos dos agrotóxicos podem ser letais ou subletais e são observados em organismos aquáticos pertencentes a diferentes níveis tróficos como algas, bactérias, macrófitas, microcrustáceos, moluscos, anfíbios e peixes (TISLER et al., 2009; GUILOSKI et al., 2010; SHIOGIRI et al., 2012, FRANÇA-SALGUEIRO, 2013; MANSANO et al., 2013; CARRASCHI-OLIVEIRA, 2014). Para estimar e monitorar os efeitos de agrotóxicos em organismos aquáticos deve-se realizar ensaios de toxicidade em laboratório (RAND e PETROCELLI, 1985).

Os efeitos letais ou agudos envolvem respostas que interferem intensamente nos processos celulares, causando a morte rapidamente. Frequentemente, esses efeitos podem ocasionar respostas que antecedem a morte, como sufocamento e interferências nos movimentos dificultando a fuga de predadores ou a obtenção de alimento (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

Em ensaio de toxicidade aguda com *Ceriodaphnia silvestrii*, o inseticida carbofuran mostrou-se extremamente tóxico e apresentou uma concentração efetiva que causa imobilidade de 50% dos organismos no período de 48 horas (CE50;48h) de $0,75\mu\text{g L}^{-1}$ (MANSANO et al., 2013). A CL50;96h do carbofuran para carpa (*Cyprinus carpio*) é de $12,25\text{ mg L}^{-1}$ (REGALLA JUNIOR et al., 2002) enquanto que para *Poecilia reticulata* a CL50;48h é de $0,165\text{ mg L}^{-1}$ (FRELLO, 1998). Para girinos de *Lithobates catesbeianus* estimou-se uma CL50;96h de $29,90\text{ mg.L}^{-1}$ (FRANÇA-SALGUEIRO, 2013). Em ensaio de toxicidade aguda, o carbamato carbosulfan mostrou-se mais tóxico para *C. carpio* (CL50;96h de $0,4301\mu\text{g L}^{-1}$) do que o carbofuran (WANG et al., 2015).

Os neonicotinóides como thiamethoxan e imidacloprid são geralmente menos tóxicos que os carbamatos para organismos não alvos. O thiamethoxan se classifica como praticamente não tóxico para *D. magna* (CE50;48 de $107,18\text{ mg L}^{-1}$) e para *L. minor* (CI50;7d > 100 mg L^{-1}); e pouco tóxico para o caramujo *P. canaliculata* (CE50;48h de $87,17\text{ mg L}^{-1}$) e para os peixes *Piaractus mesopotamicus* (CL50;48h de $16,97\text{ mg L}^{-1}$) e *Hyphessobrycon eques* ($49,78\text{ mg L}^{-1}$) (CARRASCHI-OLIVEIRA, 2014).

O imidacloprid é classificado como pouco tóxico para *D. magna* (CE50;48h de 30 mg L^{-1}) e *Vibrio fischeri* (CI50;48h de 56 mg L^{-1}); e praticamente não tóxico para *Danio rerio* (CL50;96h de 214 mg L^{-1}) (TISLER et al., 2009). O neonicotinóide guadipyr mostrou-se mais tóxico para *D. magna* (CE50;48h de $13,01\text{ mg L}^{-1}$) que o imidacloprid (QI et al., 2013).

Efeitos subletais dos agrotóxicos também podem ser observados em ensaios laboratoriais com organismos aquáticos não alvos. Esses efeitos incluem alterações nas atividades fisiológicas e comportamentais, sem mortalidade imediata. A mortalidade pode ocorrer ao longo do tempo devido a interferências na alimentação, crescimento e sistema imunológico, estes efeitos causam mudanças populacionais ou na composição e diversidade de espécies nos ambientes aquáticos. (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

Os inseticidas neonicotinóides e carbamatos são conhecidos por alterarem a atividade da enzima Ache em organismos aquáticos (BRETAUD et al., 2000; GUILOSKI et al., 2010; AZEVEDO-PEREIRA et al., 2011; QI et al., 2013). Em

ensaios de toxicidade crônica com *D. magna* foram observados efeitos subletais do neonicotinóide guadipyr nos microcrustáceos como diminuição significativa no crescimento e na reprodução, além de aumentar a atividade da Ache (QI et al., 2013).

A inibição da atividade da enzima Ache foi observada em cérebro de juvenis de peixes das espécies *Carassius auratus* após 12 horas de exposição a 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de carbofuran (8,6% de inibição em relação ao grupo controle) (BRETAUD et al., 2000).

Os peixes da espécie *Corydoras paleatus* expostos a concentrações subletais de carbaril, inseticida do grupo dos carbamatos apresentaram sinais de intoxicação como perda do equilíbrio e natação irregular. O inseticida também causou inibição da atividade da Ache nos peixes expostos a concentração de 7,2 mg L^{-1} de carbaril em 46%, em relação aos peixes do controle não expostos ao carbaril (GUILOSKI et al., 2010).

Os agrotóxicos, mesmo em doses subletais, podem alterar órgãos de peixes como brânquias (BORAN et al., 2010), fígado (CAPKIN et al., 2010); SHIOGIRI et al., 2012), rim (BORAN et al., 2010) gônada (CUÑA et al., 2011). As brânquias são as mais afetadas pelos agentes químicos, pois possuem grande superfície de contato (SHEPHARD, 1994). Os agentes químicos também atuam sobre o fígado, que desempenha papel fundamental no metabolismo de substâncias tóxicas e sobre o rim, que atua na manutenção da estabilidade interna e na excreção (JOBBLING e SUMPTER, 1993).

O carbaril, nas concentrações subletais de 1,4 mg L^{-1} e 2,6 mg L^{-1} causa alterações nas brânquias como fusão lamelar e necrose das células epiteliais e no fígado, como necrose nos hepatócitos e núcleos picnóticos do peixe truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (BORAL et al., 2010).

Na concentração subletal de 0,2 mg L^{-1} , o carbosulfan é capaz de provocar alterações histológicas em brânquia, fígado, rim e baço de *O. mykiss*. Essas alterações incluem necrose epitelial em brânquia, necrose das células tubulares do rim e edema intracelular no fígado (CAPKIN et al., 2010).

MANUSCRITO 1**RISCO DE INTOXICAÇÃO AMBIENTAL DE ORGANISMOS AQUÁTICOS NÃO ALVOS PELOS INSETICIDAS IMIDACLOPRID E CARBOFURAN**

Juliana Heloisa Pinê Américo^{1*}; Joaquim Gonçalves Machado Neto¹

¹ Centro de Aquicultura da Unesp, Câmpus de Jaboticabal. Via de Acesso Prof. Dr. Paulo Donato Castellane, s/n, Zonal Rural, Jaboticabal (SP), Brasil. Cep: 14884-900. *E-mail: americo.ju@gmail.com

Revista: Chemosphere - Qualis A1 – ISSN: 0045-6535

Resumo

Objetivou-se avaliar a toxicidade aguda dos inseticidas imidacloprid e carbofuran para os organismos aquáticos não alvos *Lemna minor*, *Daphnia magna*, *Pomacea canaliculata* e *Oreochromis niloticus*, classificar os inseticidas pelo risco de intoxicação ambiental e registrar as alterações nas variáveis de qualidade de água durante os ensaios. Para isso, os organismos foram aclimatados em sala de bioensaio e submetidos primeiramente a ensaios de sensibilidade e posteriormente a ensaios de toxicidade aguda com cada inseticida em sistema estático de acordo com as normas da ABNT e OECD. Com os valores obtidos de CE50;48h, CI50;7d e CL50;48h, os inseticidas foram classificados quanto ao potencial tóxico e de periculosidade ambiental. O risco de intoxicação ambiental foi determinado por meio da razão entre a dose dos inseticidas aplicadas em campo e os valores de CE50;48h, CI50;7d e CL50;48h. As variáveis de qualidade de água foram registradas com auxílio de sonda multiparamétrica. Para o imidacloprid a CE50;48h, CI50;7d e CL50;48h para *D. magna*, *L. minor*, *P. canaliculata* e *O. niloticus* foi de 81,13; 348,36; 301,00 e 140,50 mg L⁻¹, respectivamente. O imidacloprid é ligeiramente tóxico para *D. magna* e praticamente não tóxico para *L. minor*, *P. canaliculata* e *O. niloticus*. O risco de intoxicação ambiental do imidacloprid é baixo para os 4 organismos. Para o carbofuran, a CE50;48h, CI50;7d e CL50;48h para *D. magna*, *L. minor*, *P. canaliculata* e *O. niloticus* foi de 0,011; 144,41; 659,60 e 0,44 mg L⁻¹, respectivamente. O carbofuran é extremamente tóxico para *D. magna*, altamente tóxico para *O. niloticus* e praticamente não tóxico para *L. minor* e *P. canaliculata*. Os riscos de intoxicação ambiental do carbofuran para *L. minor* e *P. canaliculata* classificam-se como baixo. Para *D. magna* e *O. niloticus* o risco varia de alto a médio dependendo da diluição da inseticida e da dimensão do corpo d'água. A condutividade da água aumentou enquanto que a concentração de oxigênio diminuiu com o aumento da concentração dos inseticidas. No entanto, esses parâmetros não foram responsáveis pela mortalidade dos animais.

Palavras-chave: ambiente aquático, toxicidade, *Daphnia magna*, tilápia, caramujo, macrófita.

Abstract

The aims were to evaluate the acute toxicity of imidacloprid and carbofuran insecticides for non-target aquatic organisms *Lemna minor*, *Daphnia magna*, *Pomacea canaliculata* and *Oreochromis niloticus*, classify insecticides at risk of environmental poisoning and evaluate the quality variables of water during the tests. For this, the organisms were acclimated in bioassay room and subjected first at sensitivity tests and the acute toxicity tests with each insecticide in static system according to ABNT and OECD. With the values of EC50;48h, IC50; 7d and LC50; 48h, the insecticides were classified according to the toxic potential and environmental hazard. The risk of environmental poisoning was determined by the ratio between the dose of insecticide applied in the field and the EC50;48h, IC50;7d and LC50;48h. The water quality variables were recorded with the aid of multi-parameter probe. For imidacloprid the EC50;48h, IC50;7d and LC50;48h to *D. magna*, *L. minor*, *P. canaliculata* and *O. niloticus* was 81.13; 348.36; 301.00 and 140.50 mg L⁻¹, respectively. Imidacloprid is slightly toxic to *D. magna* and practically non-toxic to *L. minor*, *P. canaliculata* and *O. niloticus*. The risk of environmental poisoning of imidacloprid is down to the 4 organisms. For carbofuran, the EC50;48, IC50;7d and LC50;48h to *D. magna*, *L. minor*, *P. canaliculata* and *O. niloticus* was 0.011; 144.41; 659.60 and 0.44 mg L⁻¹, respectively. Carbofuran is extremely toxic to *D. magna*, highly toxic to *O. niloticus* and practically non-toxic to *L. minor* and *P. canaliculata*. The risks of environmental poisoning of carbofuran for *L. minor* and *P. canaliculata* are classified as low. For *D. magna* and *O. niloticus* the risk varies from high to medium, depending on dilution of the insecticide and the size of the body of water. The conductivity of the water increased while the oxygen concentration decreased during the tests with increasing concentrations of insecticides. However, these parameters were not responsible for animal mortality

Keywords: aquatic environment, toxicity, *Daphnia magna*, tilapia, snail, macrophyte.

1 Introdução

Os ecossistemas aquáticos são contaminados com substâncias químicas proveniente de atividades industriais e agrícolas. Os agrotóxicos constituem umas das principais classes de contaminantes encontrados em ambientes aquáticos (Veiga et al., 2006; Grützmacher et al., 2008; Tang et al., 2013) que podem causar impacto na biota devido a toxicidade que apresentam para organismos aquáticos não alvos (Bretaud et al., 2000; Qi et al., 2013; Wang et al., 2015).

O imidacloprid [1-(6-chloro-pyridin-3-ylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine] é um inseticida da classe dos neonicotinóides cada vez mais utilizado em todo mundo, principalmente para controle de insetos sugadores de culturas (Tomizawa e Casida, 2005). Além de ser uma molécula prospectada para uso aquícola no controle de parasitas em peixes.

O carbofuran (2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl methylcarbamate) é um inseticida, acaricida e nematicida de largo espectro de ação da classe dos carbamatos muito utilizado na agricultura brasileira. No entanto, o uso de carbofuran tem sido banido nos Estados Unidos e Europa (USEPA, 2006) por ser um inseticida muito tóxico para organismos aquáticos especialmente os peixes (Mansano et al., 2013; Campos-Garcia et al., 2015).

Os neonicotinóides e os carbamatos são conhecidos por alterarem a atividade da enzima acetilcolinesterase em organismos não alvos (Guiloski et al., 2010; Qi et al., 2013). No entanto, os carbamatos são geralmente mais tóxicos que os neonicotinóides (Tisler et al., 2009; Mansano et al., 2013).

A classe dos inseticidas neonicotinóides mimetiza o efeito do neurotransmissor excitatório (acetilcolina) e competem com ele pelos seus receptores nicotinérgicos na membrana pós-sináptica do inseto. Diferente da ligação da acetilcolina com o seu receptor, a ligação com os neonicotinóides é persistente, pois esses inseticidas são insensíveis à ação da enzima acetilcolinesterase. Dessa forma, a acetilcolinesterase degrada moléculas de acetilcolina, mas não consegue degradar as moléculas de neonicotinóides (Marçon, 2003; Marshall e Begg, 2003; Tomizawa e Casida, 2003).

O grupo dos inseticidas carbamatos possui mecanismo de ação diferente dos neonicotinóides. Eles inibem a ação da enzima acetilcolinesterase que atua

nas sinapses colinérgicas, hidrolisando o neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético (Kavitha e Rao, 2007). O mecanismo de inibição da acetilcolinesterase por carbamatos ocorre por meio da formação de um complexo enzima-inibidor (reversível) e posterior carbamilação (Maxwell et al., 2008).

A avaliação de risco é um processo que tem por objetivo calcular ou estimar o risco que possa existir para um determinado sistema alvo em decorrência de sua exposição a uma substância tóxica. Nessa avaliação devem ser consideradas as características inerentes da substância em questão e do alvo específico. O processo de avaliação de risco inclui a identificação do perigo, a avaliação da dose-resposta, a avaliação da exposição, a caracterização do risco e sua classificação em aceitável ou não aceitável (Guilherme, 2005). Para os riscos classificados como não aceitáveis, o processo continua com a determinação da necessidade de implementar medidas mitigadoras dos riscos, de modo a reduzi-los a níveis aceitáveis.

A etapa da avaliação da dose-resposta é realizada a partir da condução de ensaios ecotoxicológicos para avaliação da toxicidade aguda para organismos testes selecionados. Os critérios de seleção de organismos teste são: abundância e disponibilidade; significativa representação ecológica dentro das biocenoses; cosmopolitismo da espécie; profundo conhecimento da biologia, fisiologia e hábitos alimentares; estabilidade genética e uniformidade de suas populações; baixo índice de sazonalidade; sensibilidade constante e apurada; importância comercial; facilidade de cultivo em laboratório e, se possível, a espécie deve ser nativa para a melhor representatividade dos ecossistemas (Rand e Petrocelli, 1985).

Segundo a regulamentação de European Communities (2003), na diretiva 1488/94, para avaliação de risco de substâncias químicas, o adequado é que se realizem ensaios de toxicidade aguda com organismos inseridos em pelo menos três níveis tróficos diferentes. Nestes ensaios, a substância em particular não deve apresentar risco de intoxicação ambiental para os organismos dos três níveis tróficos.

Para a avaliação de risco ambiental são necessários dados ecotoxicológicos e concentrações ambientais estimadas (CAE) da substância a ser analisada. A relação quantitativa entre esses dados resulta em um valor puro,

denominado quociente de risco (QR). O QR é utilizado para classificar os riscos ambientais das substâncias tóxicas específicas (Goktepe et al., 2004).

O uso frequente e intensivo de carbofuran e imidacloprid pode ocasionar a contaminação das águas superficiais da rede hidrográfica e, conseqüentemente causar intoxicação dos organismos aquáticos não alvos. Entretanto, estudos sobre essa contaminação das águas ainda não foram realizados no país tampouco a avaliação dos riscos de intoxicação dos organismos aquáticos não alvos de diferentes níveis tróficos dos ecossistemas aquáticos.

Assim, objetivou-se avaliar a toxicidade aguda dos inseticidas imidacloprid e carbofuran para organismos aquáticos não alvos pertencentes a diferentes níveis tróficos (*Lemna minor*, *Daphnia magna*, *Pomacea canaliculata* e *Oreochromis niloticus*), classificar os dois inseticidas pelo risco de intoxicação ambiental para cada organismo com base na toxicidade aguda e na concentração ambiental estimada em diferentes cenários ambientais, e registrar as variáveis de qualidade de água durante os estudos.

2 Material e Métodos

2.1 Local da realização dos ensaios

Os ensaios de toxicidade aguda com os organismos não alvos *D. magna*, *L. minor* e tilápia (*O. niloticus*) foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional do Departamento de Fitossanidade associado ao Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP). Os ensaios com o caramujo de água doce *P. canaliculata* foram conduzidos no Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal – SP.

O presente trabalho foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal – SP (Protocolo n° 021534/14).

2.2 Inseticidas utilizados

Os inseticidas utilizados nos ensaios foram o neonicotinóide imidacloprid (CAS n° 138261-41-3) na formulação comercial Provado SC[®] (200 g L⁻¹) fabricado pela Bayer CropScience AG e o carbamato carbofuran (CAS n° 1563-66-2) na formulação comercial Furadan SC[®] (350 g L⁻¹) fabricado pela FMC Corporation.

2.3 Ensaios de toxicidade aguda

2.3.1 *Daphnia magna*

Os ensaios de toxicidade aguda para *D. magna* (Figura 1A) foram realizados de acordo com os procedimentos da ABNT NBR 12713: 2009 (ABNT, 2009). Os microcrustáceos foram cultivados no laboratório em meio de cultivo básico M4 composto de água destilada reconstituída com nutrientes. As características físico-químicas do meio foram: pH 7,0 ± 1, dureza total de 250 mg L⁻¹ em CaCO₃, condutividade de 600 µs cm⁻¹ e oxigênio dissolvido entre 5,0 e 6,0 mg L⁻¹. O meio de cultivo foi totalmente renovado uma vez por semana.

Os organismos foram cultivados em recipientes de vidro e mantidos em câmaras climatizadas, do tipo BOD (Figura 1B), com temperatura controlada de 20 ± 1°C, intensidade de luz de aproximadamente 3.000 lux e fotoperíodo de 12 horas.

A alimentação diária das daphnias foi constituída por suspensão de algas da espécie *Scenedesmus subspicatus* na concentração de aproximadamente 5x10⁶ células/indivíduo/dia e alimento composto por solução de ração para peixes ornamentais e solução de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) na proporção de 1:1 v/v.

Nos ensaios de toxicidade aguda para *D. magna* foram utilizados neonatos com 2 a 26 horas de vida (Figura 1C). Os ensaios foram realizados em sistema estático (Figura 1D), na ausência de luz e sem alimentação. A sanidade e sensibilidade do lote de organismos teste foram avaliadas por meio de ensaio com a substância de referência cloreto de sódio (NaCl) conforme procedimentos da ABNT NBR 12713: 2009. A concentração efetiva média (CE50;48h) do NaCl para o microcrustáceo foi de 4,06 g L⁻¹, com limite superior (LS) de 4,32 g L⁻¹ e

limite inferior (LI) de $3,82 \text{ g L}^{-1}$ (intervalo de confiança de 95%)//. Dessa forma, os organismos estavam em condições normais de sanidade e sensibilidade de acordo com a carta controle de outros lotes utilizados anteriormente no laboratório.

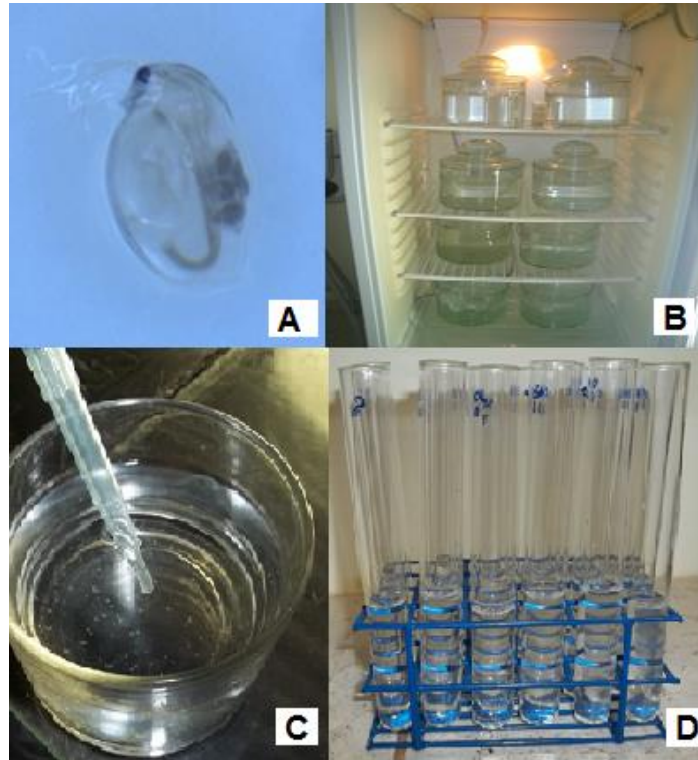


Figura 1. Aspectos do cultivo e da realização dos ensaios com o microcrustáceo. **(A)** Exemplar de *D. magna*. **(B)** Organismos mantidos em câmara climatizada do tipo BOD. **(C)** Separação dos neonatos com 2 a 26 horas de vida para realização dos ensaios. **(D)** Recipientes testes utilizados nos ensaios.

Após a realização dos ensaios com a substância de referência, foram realizados ensaios preliminares com cada inseticida para determinar o intervalo de concentração que causa 0 e 100% de imobilidade no período de 48 horas.

Para os ensaios definitivos foram utilizadas três réplicas para cada concentração, com cinco neonatos por réplica. Cada ensaio definitivo foi repetido três vezes. Nos ensaios definitivos foram utilizadas sete concentrações para cada inseticida e um controle (Tabela 1).

Tabela 1. Concentrações dos inseticidas imidacloprid e carbofuran utilizadas nos ensaios definitivos de toxicidade aguda para *D. magna*.

Inseticidas	Concentrações (mg L ⁻¹)
Imidacloprid	0,0; 40,0; 60,0; 80,0; 100,0; 120,0; 140,0 e 160,0
Carbofuran	0,0; 0,003; 0,006; 0,009; 0,012; 0,015; 0,018 e 0,021

Ao final dos ensaios foi registrada a imobilidade dos organismos em 48 horas de exposição e calculada a concentração efetiva 50% estimada (CE50;48h) para cada inseticida.

2.3.2 *Lemna minor*

Os ensaios de toxicidade aguda para *L. minor* foram realizados de acordo com os procedimentos do Guideline for testing of chemicals – *Lemna minor* Growth Inhibition da OECD (2002).

As macrófitas foram cultivadas em meio Hoagland's composto de água destilada reconstituída com nutrientes e pH 5,8 (Figura 2A). Os organismos foram mantidos em sala com temperatura controlada de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, intensidade de luz de aproximadamente 6.500 lux e fotoperíodo de 12 horas.

Para os ensaios de toxicidade aguda para *L. minor* foram selecionadas espécimes com frondes (folhas) em bom aspecto sanitário, nutricional e de tamanho homogêneo (Figura 2B). Os ensaios foram realizados na sala climatizada com as mesmas condições de cultivo e com duração de sete dias.

A sanidade e sensibilidade do lote de macrófitas foi avaliada por meio de ensaio com a substância de referência NaCl. A concentração de inibição média (CI50;7d) do NaCl para a macrófita foi de $4,22 \text{ g L}^{-1}$, com LS de $4,87 \text{ g L}^{-1}$ e LI de $3,65 \text{ g L}^{-1}$. Este resultado confirma que as macrófitas estavam em condições normais de sanidade e sensibilidade, de acordo com a carta controle de cultivo do laboratório.

Após os ensaios com a substância de referência, foram realizados ensaios preliminares com cada inseticida para determinar o intervalo de concentração que causa 0 e 100% de inibição de crescimento das macrófitas.

Nos três ensaios definitivos foram utilizadas 3 réplicas para cada concentração (Figura 2C). Para cada réplica foram selecionadas 4 colônias de *L. minor* com 3 frondes cada, totalizando 12 frondes por réplica.

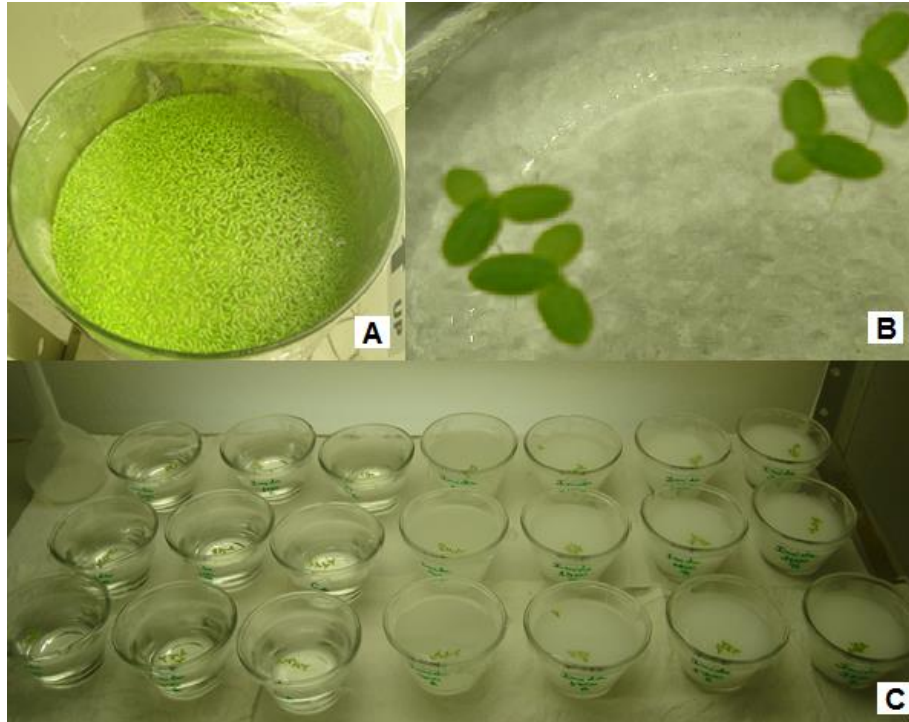


Figura 2. Aspectos do cultivo e da realização dos ensaios com *L. minor*. **(A)** Cultivo das macrófitas em meio Hoagland's. **(B)** Separação das quatro colônias de *L. minor* com três frondes cada **(C)** Recipientes teste dos ensaios com três réplicas por concentração do inseticida.

As avaliações foram realizadas no 3°, 5° e 7° dia de exposição aos inseticidas. Nas três avaliações foram registrados o número de frondes formadas (inibição do crescimento), ocorrência de clorose (perda da clorofila) e de necrose (morte das macrófitas). Nos ensaios definitivos foram utilizadas seis concentrações para imidacloprid e um controle e cinco para carbofuran e um controle (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações dos inseticidas imidacloprid e carbofuran utilizadas nos ensaios definitivos de toxicidade aguda para *L. minor*.

Inseticidas	Concentrações (mg L ⁻¹)
Imidacloprid	0,0; 100,0; 500,0; 900,0; 1300,0; 1700,0 e 2100,0
Carbofuran	0,0; 50,0; 100,0; 200,0; 400,0 e 800,0

Ao final dos ensaios foi registrado o número de frondes em cada réplica e calculada a concentração de inibição de crescimento 50% estimada (CI50;7d) para cada inseticida.

2.3.3 *Pomacea canaliculata*

Os ensaios de toxicidade aguda para *P. canaliculata* foram realizados de acordo com os procedimentos da ABNT NBR 15088: 2011 (ABNT, 2011) para peixes, adaptada para os ensaios com o caramujo garantindo a padronização dos resultados.

Os caramujos com peso entre 1,0 e 1,5 g foram previamente aclimatados por dez dias em sala de bioensaios à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas, com aeração contínua e alimentados diariamente com a macrófita submersa *Hydrilla verticillata* (Figuras 3 A, B e C).

Os parâmetros físico-químicos de água durante o período de aclimação estavam de acordo com o estabelecido pela ABNT NBR 15088: 2011 (ABNT, 2011): pH entre 7,0 e 8,0, oxigênio dissolvido entre 4,0 e 6,0 mg.L⁻¹ e condutividade elétrica entre 170,0 e 180,0 $\mu\text{S.cm}^{-1}$.

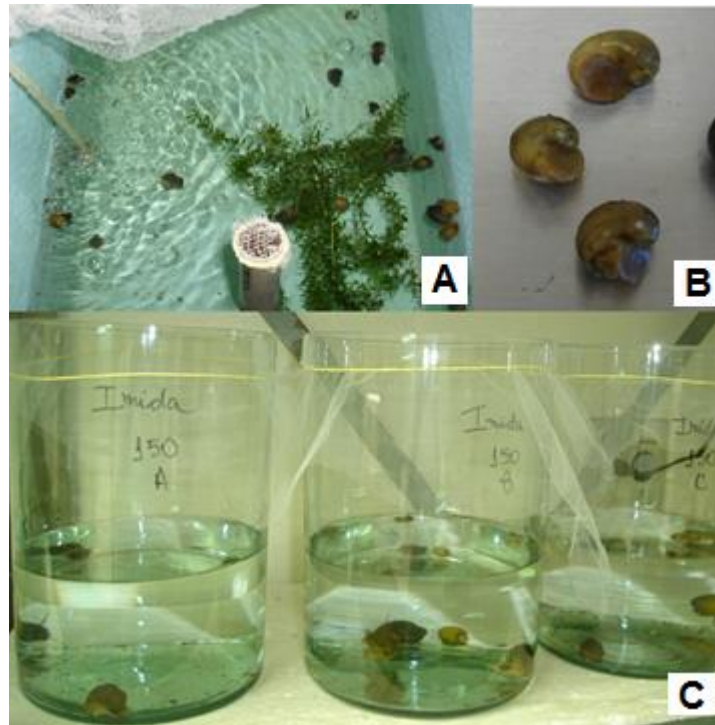


Figura 3. Aspectos do cultivo e da realização dos ensaios com caramujo. **(A)** Aclimação dos caramujos em sala de bioensaios alimentados com *H. verticillata*. **(B)** Exemplares de *P. canaliculata*. **(C)** Recipientes teste com três réplicas por concentração do inseticida.

A sanidade e sensibilidade do lote de organismos foram avaliadas por meio de ensaio com a substância de referência cloreto de potássio (KCl). A concentração efetiva média (CE50;48h) do KCl para o caramujo foi de 2,48 g L⁻¹, com LS de 3,16 g L⁻¹ e LI de 1,95 g L⁻¹. Dessa forma, os organismos estavam em condições normais de sanidade e sensibilidade de acordo com a carta controle de outros lotes utilizados anteriormente no laboratório.

Após os ensaios com a substância de referência, foram realizados ensaios preliminares com cada inseticida para determinar o intervalo de concentração que causa 0 e 100% de imobilidade/mortalidade no período de 48 horas.

Após a determinação dos intervalos de concentração nos ensaios preliminares foram realizados os ensaios definitivos com cinco concentrações de imidacloprid e um controle e seis concentrações do carbofuran e um controle (Tabela 3). Em todos os ensaios definitivos foram utilizadas três réplicas para cada concentração testada, com cinco caramujos por réplica. Cada ensaio definitivo foi repetido três vezes em sistema estático com duração de 48 horas e sem alimentação dos animais durante o período de exposição.

Tabela 3. Concentrações dos inseticidas imidacloprid e carbofuran utilizadas nos ensaios definitivos de toxicidade aguda para *P. canaliculata*.

Inseticidas	Concentrações (mg L ⁻¹)
Imidacloprid	0,0; 75,0; 150,0; 250,0; 500,0 e 800,0
Carbofuran	0,0; 300,0; 500,0; 700,0; 900,0; 1100,0 e 1300,0

As variáveis de qualidade de água pH, oxigênio dissolvido (mg L⁻¹), temperatura (°C) e condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$) foram registradas em 0, 24 e 48 horas após exposição aos inseticidas com auxílio de uma sonda multiparamétrica modelo YSI 556 MPS.

Ao final dos ensaios foi registrada a imobilidade/mortalidade em 48 horas de exposição e calculada a concentração efetiva 50% estimada (CE50;48h) para cada inseticida.

2.3.4 *Oreochromis niloticus*

Os ensaios de toxicidade aguda para *O. niloticus* foram realizados de acordo com os procedimentos da ABNT NBR 15088: 2011 (ABNT, 2011). Os peixes foram fornecidos pelo Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP).

Os peixes com peso entre 1 e 1,5 g foram previamente aclimatados por 10 dias em sala de bioensaio em caixas com capacidade de 250 L, fotoperíodo de 12 horas, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com aeração contínua promovida por bombas de ar e alimentados uma vez ao dia *ad libitum* com ração comercial (Figura 4 A, B e C).

Os parâmetros de qualidade de água durante o período de aclimação estavam de acordo com ABNT NBR 15088: 2011 (ABNT, 2011): pH entre 7,0 e 8,0, oxigênio dissolvido entre 4,0 e 6,0 mg L⁻¹ e condutividade elétrica entre 170,0 e 180,0 $\mu\text{S cm}^{-1}$.

A sanidade e a sensibilidade do lote de peixes foram avaliadas em ensaio de toxicidade aguda com a substância de referência KCl. Os ensaios foram realizados periodicamente conforme foram utilizados novos lotes de peixes. A concentração letal média (CL50;48h) do KCl para tilápia foi de 1,17 g L⁻¹, com LS de 1,29 g L⁻¹ e LI de 1,06 g L⁻¹. Dessa forma, os peixes estavam em condições

normais de sanidade e sensibilidade de acordo com a carta controle de outros lotes utilizados anteriormente no laboratório.



Figura 4. Aspectos do cultivo e da realização dos ensaios com tilápia. **(A)** Recipiente de aclimação dos peixes em sala de bioensaio. **(B)** Exemplares de *O. niloticus* com aproximadamente 1 g. **(C)** Recipientes teste com três réplicas por concentração do inseticida.

Após os ensaios com a substância de referência, foram realizados ensaios preliminares com cada inseticida para determinar o intervalo de concentração que causa 0 e 100% de mortalidade para os organismos no período de 48 horas.

De acordo com o intervalo obtido nos ensaios preliminares, foram realizados três ensaios definitivos de toxicidade aguda para cada inseticida. Para os ensaios com imidacloprid foram utilizadas cinco concentrações e um controle, para carbofuran foram sete concentrações e um controle (Tabela 4). Cada ensaio foi conduzido com três réplicas para cada concentração testada dos inseticidas com três peixes por réplica respeitando a densidade máxima de 1 g de peixe para cada litro de água.

Tabela 4. Concentrações dos inseticidas imidacloprid e carbofuran utilizadas nos ensaios definitivos de toxicidade aguda para *O. niloticus*.

Inseticidas	Concentrações (mg L ⁻¹)
Imidacloprid	0,0; 100,0; 130,0; 160,0; 190,0 e 220,0
Carbofuran	0,0; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 e 0,8

Os ensaios foram realizados em sistema estático e sem alimentação dos animais durante o período de exposição de 48 horas. A mortalidade dos peixes foi avaliada diariamente com a retirada dos animais mortos dos aquários, sendo considerados nesse estado os animais que não apresentavam batimento opercular, espasmo ou algum movimento.

As variáveis de qualidade de água pH, oxigênio dissolvido (mg L⁻¹), temperatura (°C) e condutividade elétrica ($\mu\text{s cm}^{-1}$) foram mensuradas em 0, 24 e 48 horas após exposição aos inseticidas com auxílio de uma sonda multiparamétrica modelo YSI 556 MPS.

Ao final dos ensaios foi registrada a mortalidade dos peixes em 48 horas de exposição e calculada a concentração letal 50% estimada (CL50;48h) para cada inseticida.

2.4 Classificação dos inseticidas pela toxicidade aguda

Com os valores obtidos de CE50;48, CI50;7d e CL50;48h para os organismos aquáticos não alvos estudados, os inseticidas imidacloprid e carbofuran foram classificados quanto ao potencial tóxico de acordo com as classes de toxicidade aguda propostas por Zucker (1985) e em relação ao potencial de periculosidade ambiental proposto pelo IBAMA (2015) (Tabela 5).

Tabela 5. Classes de toxicidade aguda propostas por Zucker (1985) e IBAMA (2015), baseadas nos valores de CE50, CI50 e CL50 de agrotóxicos para organismos não alvos.

	Valores de toxicidade aguda (mg L⁻¹)	Classificação ecotoxicológica
Zucker (1985)	CE50/CI50/CL50 < 0,1	Extremamente tóxico
	0,1 < CE50/CI50/CL50 < 1	Altamente tóxico
	1 < CE50/CI50/CL50 < 10	Moderadamente tóxico
	10 < CE50/CI50/CL50 < 100	Ligeiramente tóxico
	CE50/CI50/CL50 > 100	Praticamente não tóxico
IBAMA (2015)	0 ≤ CE50/CI50/CL50 < 1	Altamente tóxico
	1 ≤ CE50/CI50/CL50 < 10	Muito tóxico
	10 ≤ CE50/CI50/CL50 < 100	Medianamente tóxico
	CE50/CI50/CL50 ≥ 100	Pouco tóxico

2.5 Risco de intoxicação ambiental dos inseticidas para os organismos não alvos estudados

O risco de intoxicação ambiental dos inseticidas imidacloprid e carbofuran para os organismos aquáticos não alvos estudados foi determinado pelo método do quociente (Q) de Goktepe et al.(2004). Nesse método o risco é calculado por meio da razão entre a concentração ambiental estimada (CAE), que é a dose do inseticida aplicada em campo, e os valores de CE50;48h, CI50;7d e CL50;48h obtidos nos ensaios de toxicidade aguda.

O valor de Q, também denominado de quociente de risco (RQ), é um número puro, pois as unidades dos parâmetros se anulam na divisão. Assim, o risco é classificado em categorias de acordo com os valores de RQ propostos por Goktepe et al.(2004) (Tabela 6)

Tabela 6. Classes de risco de intoxicação ambiental segundo Goktepe et al. (2004).

Quociente de risco	Classes de risco
RQ > 0,5	Alto risco
0,05 < RQ < 0,5	Médio risco
RQ < 0,05	Baixo risco

Para estimar a CAE foram considerados cenários de contaminação adaptados de procedimento propostos por Kokta e Rothert (1992). Nesses cenários considerou-se que:

A) Os inseticidas (imidacloprid e carbofuran) estejam uniformemente distribuídos no espelho d'água de um reservatório com área de um hectare (10.000 m^2) com as profundidades de 0,30 e 2,0 m.

B) A densidade média da água de $1,0 \text{ g cm}^{-3}$.

C) A quantidade dos inseticidas estudados aplicada na superfície do espelho d'água do reservatório seja equivalente às diluições de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125% da maior dose recomendada para cada inseticida.

D) O cálculo do volume dos supostos reservatórios com 0,30 e 2,0 m de profundidade, assim como as concentrações dos inseticidas aplicados nas diluições mencionadas.

Na avaliação do risco do imidacloprid foi utilizada a maior dose recomendada para citros ($200 \text{ g i.a ha}^{-1}$) de acordo com a bula da formulação comercial Provado 200 SC[®] fabricado pela Bayer CropScience AG que contém 200 g L^{-1} de imidacloprid. Na avaliação do risco do carbofuran foi utilizada a maior dose recomendada para cana-de-açúcar ($1750 \text{ g i.a ha}^{-1}$) conforme a bula da formulação comercial Furadan 350 SC[®] fabricado pela FMC Corporation que contém 350 g L^{-1} de carbofuran. A escolha das doses recomendadas para citros e cana-de-açúcar é devido à representatividade dessas culturas no Estado de São Paulo.

2.6 Análise dos dados

Os valores das concentrações efetiva, de inibição e letal estimados (CE50;48h, CI50;7d e CL50;48h) foram calculados com o auxílio do software Trimmed Spearman Karber (Hamilton et al., 1977).

3 Resultados e Discussão

3.1 Toxicidade aguda dos inseticidas

3.1.1 *Daphnia magna*

A CE50;48h média estimada do imidacloprid para *D. magna* foi de 81,13 mg L⁻¹ (Tabela 7). Com esse valor, o inseticida foi classificado como ligeiramente tóxico de acordo com a classificação de Zucker (1985) e medianamente tóxico segundo o potencial de periculosidade ambiental proposto pelo IBAMA (2015) para o microcrustáceo.

Tabela 7. Concentração efetiva média estimada (CE50;48h) dos inseticidas imidacloprid e carbofuran para o microcrustáceo *Daphnia magna*.

Inseticidas	Limite Inferior	CE50;48h (mg L ⁻¹)	Limite Superior	Equação Linear	R ²
Imidacloprid	71,36	81,13	92,32	y = 0,8178x – 24,314	0,97
Carbofuran	0,010	0,011	0,013	y = 5846,5x – 21,274	0,97

No controle e na concentração de 40,0 mg L⁻¹ de imidacloprid não ocorreu imobilidade dos organismos. Nas concentrações de 60,0; 80,0; 100,0; 120,0; 140,0 e 160,0 mg L⁻¹ a imobilidade foi 24,43%; 51,06%; 64,4%; 73,3%; 91,06% e 100% respectivamente.

O imidacloprid é menos tóxico para *D. magna* do que o neonicotinóide guadipyr (CE50;48h de 13,01 mg L⁻¹) (Qi et al., 2013) e mais tóxico que o thiamethoxan (CE50;48h de 107,18 mg L⁻¹) (Carraschi-Oliveira, 2014).

O imidacloprid é mais tóxico para *D. magna* do que para *Ceriodaphnia dubia* (CE50;48h de 0,0021 mg L⁻¹) (Chen et. al., 2010) e *Daphnia pulex* (CE50;48h de 0,0368 mg L⁻¹) (Hayasaka et al., 2012). Apesar de esses estudos avaliarem a toxicidade de microcrustáceos para o mesmo inseticida, nota-se que *D. magna* é o organismos mais sensível.

A CE50;48h média estimada do carbofuran para *D. magna* foi de 0,011 mg L⁻¹ (Tabela 7). De acordo com esse valor, o inseticida é classificado como extremamente tóxico de acordo com Zucker (1985) e altamente tóxico segundo o

potencial de periculosidade ambiental proposto pelo IBAMA (2015) para o microcrustáceo. Assim, *D. magna* é considerada como um organismo sensível a esse inseticida e pode ser utilizada como um bioindicador em ambientes contaminados com carbofuran.

No controle e na concentração de 0,003 mg L⁻¹ de carbofuran não ocorreu imobilidade dos organismos. Nas concentrações de 0,006; 0,009; 0,012; 0,015; 0,018 e 0,021 mg L⁻¹ a imobilidade foi respectivamente 15,55%; 26,66%; 37,77%; 75,55%; 86,66% e 100%.

Pelos valores de CE50;48h (Tabela 7), o carbofuran é 7375,4 vezes mais tóxico para *Daphnia magna* que o imidacloprid. Porém, é 14,4 vezes menos tóxico para *D. magna* do que para *Ceriodaphnia dubia* (CE50;48h de 0,00075 mg L⁻¹) (Mansano et al., 2013). Portanto, a contaminação das águas com o imidacloprid poderá resultar em menor impacto ambiental negativo na biota aquática, devido à menor toxicidade aguda para os daphnideos em relação à contaminação com o carbofuran.

3.1.2 *Lemna minor*

A CI50;7d média estimada do imidacloprid para *L. minor* foi de 348,36 mg L⁻¹ (Tabela 8). Com o valor obtido, o inseticida se classifica como praticamente não tóxico de acordo com Zucker (1985) e pouco tóxico segundo o potencial de periculosidade ambiental proposto pelo IBAMA (2015) para a macrófita.

Tabela 8. Concentração de inibição média estimada (CI50;7d) dos inseticidas imidacloprid e carbofuran para a macrófita *Lemna minor*.

Inseticidas	Limite Inferior	CI50;7d (mg L ⁻¹)	Limite Superior	Equação Linear	R ²
Imidacloprid	287,37	348,36	424,74	y = 0,0344x + 22,652	0,82
Carbofuran	130,99	144,41	159,18	y = 0,1121x + 18,86	0,81

No controle não ocorreu inibição do crescimento das frondes das macrófitas. Nas concentrações de 100,0; 500,0; 900,0; 1300,0; 1700,0 e 2100,0 mg L⁻¹ de imidacloprid a inibição do crescimento foi 29,4%; 57,4%; 63,5%; 71,1%;

76,2% e 88% respectivamente. A partir da concentração de 900,0 mg L⁻¹ as frondes apresentaram sinais de clorose.

Para *L. minor*, o neonicotinóide thiamathoxan teve a mesma classificação obtida para o imidacloprid (CI50;7d > 100,00 mg L⁻¹) (Carraschi-Oliveira, 2014). O imidacloprid é menos tóxico para *L. minor* do que para a alga *Desmodesmus subspicatus* (CI50;72h de 116 mg L⁻¹) (Tisler et al., 2009). Devido ao mecanismo de ação dos neonicotinóides, a macrófita *L. minor* assim como algumas algas são organismos relativamente tolerantes ao inseticida imidacloprid (Daam et al., 2013).

A CI50;7d média estimada do carbofuran para *L. minor* foi de 144,41 mg L⁻¹ (Tabela 8). De acordo com esse valor, o inseticida foi classificado como praticamente não tóxico de acordo com Zucker (1985) e pouco tóxico segundo o potencial de periculosidade ambiental proposto pelo IBAMA (2015) para a macrófita.

No controle não ocorreu inibição do crescimento das frondes das macrófitas. Nas concentrações de 50,0; 100,0; 200,0; 400,0 e 800,0 mg L⁻¹ de carbofuran a inibição do crescimento foi respectivamente 17%; 36,4%; 53,5%; 86% e 94%. A partir da concentração de 400,0 mg L⁻¹ as frondes apresentaram sinais de clorose.

O inseticida fipronil é menos tóxico para as macrófitas *L. minor* (CI50;7d de 3283 mg L⁻¹) e *Azolla caroliniana* (CI50;7d de 7855,41 mg L⁻¹) (Ignácio, 2014) do que o carbofuran para *L. minor*. No entanto, os dois inseticidas classificam-se como praticamente não tóxicos para as macrófitas.

O elevado valor da CI50;7d do carbofuran e do imidacloprid para *L. minor* (Tabela 8) pode estar relacionado ao mecanismo de ação desses inseticidas que atuam no sistema nervoso dos insetos. Assim, como as macrófitas apresentam fisiologia diferente dos insetos, os dois inseticidas são praticamente não tóxicos para *L. minor*. Entretanto esse inseticida pode ser absorvido pela raiz dessas macrófita e causar impactos negativos nos organismos herbívoros das cadeias tróficas aquáticas.

3.1.3 *Pomacea canaliculata*

A CE50;48h média estimada do imidacloprid para *P. canaliculata* foi de 301,0 mg L⁻¹ (Tabela 9). Com esse valor, o inseticida é classificado como praticamente não tóxico de acordo com a classificação de Zucker (1985) e pouco tóxico segundo o potencial de periculosidade ambiental do IBAMA (2015) para o caramujo.

Tabela 9. Concentração de efetiva média estimada (CE50;48h) dos inseticidas imidacloprid e carbofuran para a macrófita *Pomacea canaliculata*.

Inseticidas	Limite Inferior	CE50;48h (mg L ⁻¹)	Limite Superior	Equação Linear	R ²
Imidacloprid	242,97	301,0	372,98	y = 0,1384x – 3,1681	0,96
Carbofuran	573,91	659,60	758,07	y = 0,0857x – 10,535	0,96

No controle e na concentração de 75,0 mg L⁻¹ não ocorreu imobilidade/mortalidade dos organismos. Nas concentrações de 150,0; 250,0; 500,0 e 800,0 mg L⁻¹ a imobilidade/mortalidade foi respectivamente 15,56%; 31,13%; 80% e 100%.

O imidacloprid é menos tóxico para *P. canaliculata* do que thiamethoxan (CE50;48h de 87,14 mg L⁻¹) (Carraschi-Oliveira, 2014), porém os dois neonicotinóides tem a mesma classificação ecotoxicológica de acordo com Zucker (1985) e IBAMA (2015) para o caramujo.

A temperatura da água em todos os tratamentos durante os ensaios com caramujo mantiveram-se entre 24 e 26 °C e o pH entre 7,0 e 8,0. Esses valores se enquadram nos preconizados pela ABNT NBR 15088:2011 (ABNT, 2011) para início dos ensaios de toxicidade.

O oxigênio dissolvido (OD) variou de 5,0 a 2,3 mg L⁻¹ no controle após 48 horas de exposição enquanto que em 800 mg L⁻¹ variou de 5,1 a 2,0 mg L⁻¹, indicando que a mortalidade do caramujo está relacionada ao aumento da concentração do inseticida e não a redução da concentração de oxigênio dissolvido (Figura 5).

A condutividade elétrica variou de 170,3 a 173,1 μS.cm⁻¹ no controle após 48 horas de exposição enquanto em 800 mg L⁻¹ variou de 180,2 a 248,9 μS.cm⁻¹

(Figura 5). O aumento da condutividade elétrica foi proporcional ao aumento da concentração de imidacloprid. Esse efeito pode ser devido a reações do inseticida e resultar em aumento na concentração de ions dissolvidos na água, ou devido a mais excretas dos animais liberadas na água resultante do processo de intoxicação.

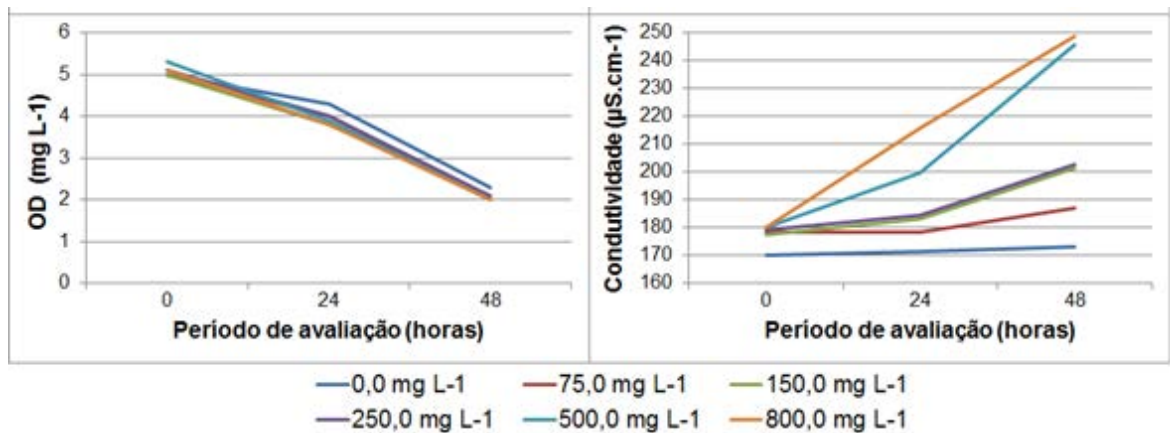


Figura 5. Concentração de oxigênio dissolvido e condutividade elétrica avaliada durante o ensaio de toxicidade aguda em 0, 24 e 48 horas após a exposição do *P. canaliculata* às concentrações de imidacloprid testadas.

A CE50;48h estimada do carbofuran para *P. canaliculata* foi de 659,60 mg L⁻¹ (Tabela 9). Com o valor obtido, o inseticida se classifica como praticamente não tóxico, de acordo com a classificação de Zucker (1985), e pouco tóxico, segundo o potencial de periculosidade ambiental do IBAMA (2015) para o caramujo.

Não ocorreu imobilidade/mortalidade dos caramujos no controle e na concentração de 300,0 mg L⁻¹ do carbofuran. Nas concentrações de 500,0; 700,0; 900,0; 1100,0 e 1300,0 mg L⁻¹ a imobilidade/mortalidade dos animais foi respectivamente 28,9%; 53,3%; 71,1%; 84,4% e 100%.

Após 24 horas de exposição ao carbofuran, os caramujos da concentração de 300 mg L⁻¹ estavam com comportamento similares aos animais do controle, ou seja, movimentando no fundo e na parede dos aquários. Nas demais concentrações todos os caramujos estavam no fundo dos aquários sem movimentação.

A temperatura da água em todos os tratamentos durante os ensaios com caramujo mantiveram-se entre 24,5 e 26 °C e o pH entre 7,3 e 8,0. Esses valores

se enquadram nos preconizados pela ABNT NBR 15088:2011 (ABNT, 2011) para início dos ensaios de toxicidade.

O OD variou de 5,0 a 2,2 mg L⁻¹ no controle após 48 horas de exposição enquanto que em 1300,0 mg L⁻¹ variou de 5,0 a 1,8 mg L⁻¹, indicando que a mortalidade de *P. canaliculata* está associada ao aumento da concentração de carbofuran na água (Figura 6).

A condutividade elétrica variou de 173,1 a 178,0 μS.cm⁻¹ no controle após 48 horas de exposição enquanto em 1300,0 mg L⁻¹ variou de 173,5 a 244,3 μS.cm⁻¹ (Figura 6). O aumento da condutividade elétrica foi proporcional ao aumento da concentração de imidacloprid. Esse efeito pode ser devido a reações do inseticida e resultar em aumento na concentração de ions dissolvidos na água, ou devido a mais excretas dos animais liberadas na água resultante do processo de intoxicação.

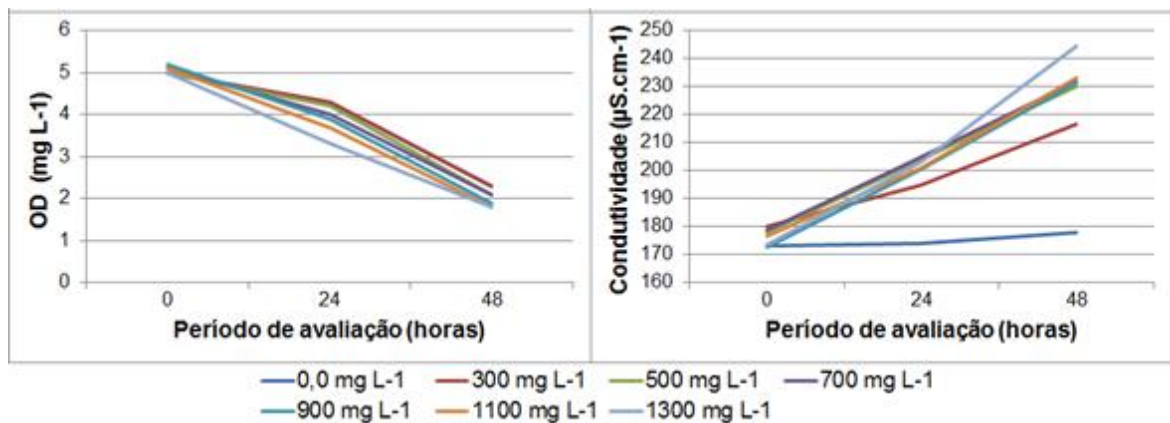


Figura 6. Concentração de oxigênio dissolvido e condutividade elétrica avaliada durante o ensaio de toxicidade aguda em 0, 24 e 48 horas após a exposição do *P. canaliculata* às concentrações de carbofuran testadas.

De acordo com os resultados obtidos para os inseticidas, *P. canaliculata* é um organismo tolerante aos inseticidas estudados quando exposto a elevadas concentrações por curto período de tempo. No entanto, as CE50;48h encontrada nesse estudo pode nortear futuros trabalhos que investiguem a toxicidade desses inseticidas por períodos mais longos de exposição.

3.1.4 *Oreochromis niloticus*

A CL50;48h média estimada do imidacloprid para *O. niloticus* foi de 140,50 mg L⁻¹ (Tabela 10). De acordo com esse valor, o inseticida é classificado como praticamente não tóxico de acordo com Zucker (1985) e pouco tóxico segundo o potencial de periculosidade ambiental do IBAMA (2015).

Tabela 10. Concentração letal média estimada (CL50;48h) dos inseticidas imidacloprid e carbofuran para tilápia (*Oreochromis niloticus*).

Inseticidas	Limite Inferior	CL50;48h (mg L ⁻¹)	Limite Superior	Equação Linear	R ²
Imidacloprid	124,94	140,50	158,07	y = 0,4981x – 16,423	0,83
Carbofuran	0,41	0,44	0,51	y = 138,95x – 14,036	0,95

No controle e na concentração de 100,00 mg L⁻¹ de imidacloprid não ocorreu mortalidade de peixes. Nas concentrações de 130,0; 160,0; 190,0 e 220,0 mg L⁻¹ a mortalidade dos animais foi 48,14%; 66,66%; 85,17% e 100% respectivamente.

Apesar da CL50;48h desse inseticida ser alta para tilápia e esse peixe ser considerado tolerante, foram observados sinais de intoxicação como perda da capacidade de arfagem e letargia após 24 e 48 horas de exposição ao imidacloprid a partir da concentração de 130,0 mg L⁻¹.

O imidacloprid é menos tóxico para o peixe *Danio rerio* com CL50;96h de 214 mg L⁻¹ (Tisler et al., 2009) do que para *O. niloticus*. Essa diferença de toxicidade entre as espécies pode estar associada à idade dos peixes, pois no estudo de Tisler et al. (2009) foram utilizados animais adultos enquanto que no presente estudo foram utilizados animais jovens que geralmente são mais sensíveis.

A temperatura da água e o pH durante os ensaios mativeram-se entre os valores preconizados pela ABNT NBR 15088:2011 (ABNT 2011) para início dos ensaios de toxicidade.

O OD variou de 5,3 a 2,7 mg L⁻¹ no controle após 48 horas de exposição enquanto que em 220,0 mg L⁻¹ de imidacloprid variou de 4,7 a 1,9 mg L⁻¹ (Figura 7). De acordo com Macêdo (2004), *O. niloticus* tolera concentrações muito baixas

de oxigênio dissolvido na água e vive bem com concentrações de até $1,2 \text{ mg L}^{-1}$. Portanto, essa variável não influenciou nos resultados de mortalidade.

A condutividade elétrica variou de $173,0$ a $175,7 \mu\text{S.cm}^{-1}$ no controle durante o ensaio enquanto que em 220 mg L^{-1} a variação foi de $175,9$ a $189,8 \mu\text{S.cm}^{-1}$ (Figura 7). O aumento da condutividade elétrica foi proporcional ao aumento da concentração de imidacloprid. Esse efeito pode ser devido a reações do inseticida e resultar em aumento na concentração de ions dissolvidos na água, ou devido a mais excretas dos animais liberadas na água resultante do processo de intoxicação.

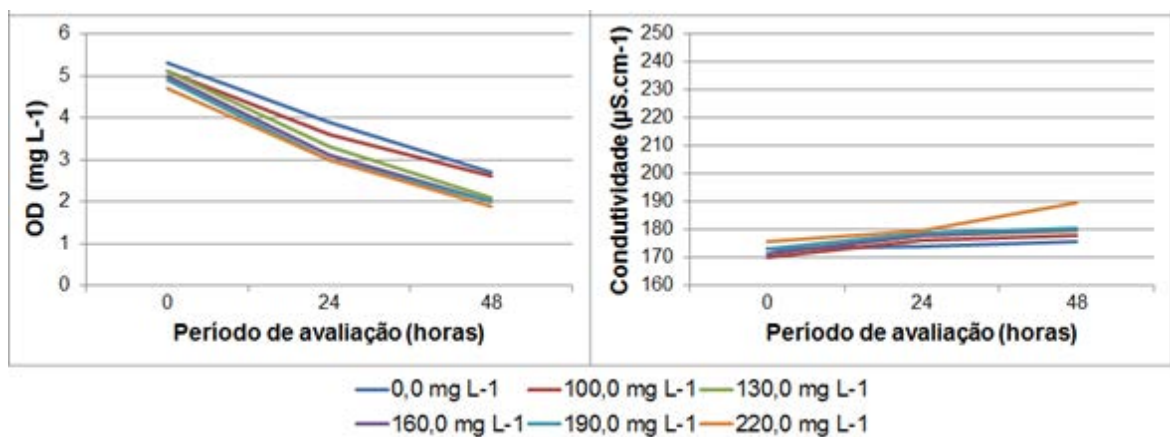


Figura 7. Concentração de oxigênio dissolvido e condutividade elétrica avaliada durante o ensaio de toxicidade aguda em 0, 24 e 48 horas após a exposição de *O. niloticus* às concentrações de imidacloprid testadas.

A CL₅₀;48h média estimada do carbofuran para *O. niloticus* foi de $0,44 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 10). Com o valor obtido, o inseticida é classificado como altamente tóxico segundo Zucker (1985) e IBAMA (2015). Dessa forma, a tilápia pode ser utilizada como excelente organismo bioindicador de ambientes contaminados com carbofuran.

Não ocorreu mortalidade dos peixes no controle e na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. Nas concentrações de $0,3$; $0,4$; $0,5$; $0,6$; $0,7$ e $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ a mortalidade dos animais foi $18,51\%$; $44,44\%$; $55,55\%$; $70,36\%$; $85,17\%$ e 100% respectivamente. Após 24 horas de exposição, ocorreu 100% de mortalidade dos peixes na concentração de $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ de carbofuran.

Os principais sinais de intoxicação em *O. niloticus* foram observados após 24 e 48 horas de exposição ao carbofuran a partir da concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$

que incluem: perda da capacidade de arfagem e letargia. Assim como no presente estudo com *O. niloticus*, peixes da espécie *Corydoras paleatus* apresentaram perda da capacidade de arfagem quando expostos a concentrações subletais de carbaril (Guiloski et al., 2010).

Os carbamatos são inseticidas extremamente tóxicos para peixes (Guiloski et al., 2010; Wang et al., 2015). O carbofuran é mais tóxico para *O. niloticus* do que para *Cyprinus carpio* (CL50;96h de 12,25 mg L⁻¹) (Resgalla Junior et al., 2002). Essa diferença na toxicidade pode ser devido à idade dos animais utilizados, pois no presente estudo foram utilizados peixes jovens com peso médio entre 1,0 e 1,5 g e no estudo de Resgalla Junior et al. (2002) foram utilizadas carpas com 8,0 cm de comprimento.

De acordo com Mallat (1985), a toxicidade de uma determinada substância varia com a espécie, a idade dos indivíduos, o peso e o nível trófico. Assim, as diferenças de toxicidade entre os estudos podem ser devidas a esses aspectos.

A temperatura, o pH, e a condutividade da água durante os ensaios com carbofuran mantiveram-se entre os valores estabelecidos pela ABNT NBR 15088:2011 (ABNT, 2011) para início dos ensaios de toxicidade.

O OD variou de 5,4 a 2,3 mg L⁻¹ no controle durante o ensaio enquanto que em 0,8 mg L⁻¹ variou de 5,1 a 2,9 mg L⁻¹ após 24 horas de exposição (Figura 8).

A mortalidade dos peixes não está relacionada com a concentração de OD, pois após 24h de exposição ao inseticida ocorreu mortalidade de 100% dos peixes expostos a 0,8 mg L⁻¹ e a concentração de OD registrada foi de 2,9 mg L⁻¹ (Figura 8).

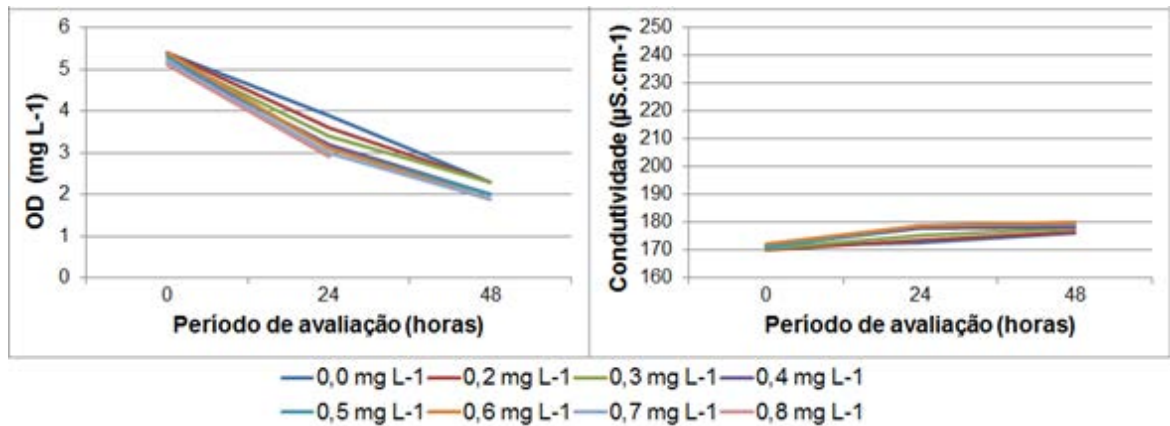


Figura 8. Concentração de oxigênio dissolvido e condutividade elétrica avaliada durante o ensaio de toxicidade aguda em 0, 24 e 48 horas após a exposição de *O. niloticus* às concentrações de carbendazim testadas .

3.2 Risco de intoxicação ambiental

De acordo com os valores do quociente de risco obtidos e com a classificação proposta por Goktepe et al. (2004), o imidacloprid classifica-se como um inseticida de baixo risco de intoxicação ambiental para *D. magna*, *L. minor*, *P. canaliculata* e *O. niloticus* mesmo que 100% da sua maior dose recomendada alcance um corpo d'água de 1 ha com as profundidades de 0,3 m e 2,0 m (Tabela 11 e 12). O baixo risco do imidacloprid é devido a sua baixa dose de aplicação recomendada e por ser um inseticida pouco tóxico para os organismos aquáticos avaliados.

Tabela 11. Valores do quociente de risco (RQ) e suas respectivas classificações de risco para imidacloprid, representados pela razão entre as diluições da CAE e a CE/CI/CL50 dos organismos aquáticos avaliados, considerando-se a maior dose recomendada para citros (200 g i.a ha⁻¹) em um corpo de água com área de 1 ha e profundidade de 0,3 m.

Diluições da CAE	Espécies / CE, CI e CL50			
	<i>D. magna</i> 81,13 mg L ⁻¹	<i>L. minor</i> 348,36 mg L ⁻¹	<i>P. canaliculata</i> 301,00 mg L ⁻¹	<i>O. niloticus</i> 140,50 mg L ⁻¹
100% CAE 0,0666 mg L ⁻¹	0,00082 Baixo	0,00019 Baixo	0,00022 Baixo	0,00047 Baixo
50% CAE 0,0333 mg L ⁻¹	0,00041 Baixo	0,00009 Baixo	0,00011 Baixo	0,00023 Baixo
25% CAE 0,0166 mg L ⁻¹	0,00020 Baixo	0,00004 Baixo	0,00005 Baixo	0,00011 Baixo
12,5% CAE 0,0083 mg L ⁻¹	0,00010 Baixo	0,00002 Baixo	0,00002 Baixo	0,00005 Baixo
6,25% CAE 0,0041 mg L ⁻¹	0,00005 Baixo	0,00001 Baixo	0,00001 Baixo	0,00002 Baixo
3,12% CAE 0,0020 mg L ⁻¹	0,00002 Baixo	0,000005 Baixo	0,000006 Baixo	0,00001 Baixo

Tabela 12. Valores do quociente de risco (RQ) e suas respectivas classificações de risco para imidacloprid, representados pela razão entre as diluições da CAE e a CE/CI/CL50 dos organismos aquáticos avaliados, considerando-se a maior dose recomendada para citros (200 g i.a ha⁻¹) em um corpo de água com área de 1 ha e profundidade de 2,0 m.

Diluições da CAE	Espécies / CE, CI e CL50			
	<i>D. magna</i> 81,13 mg L ⁻¹	<i>L. minor</i> 348,36 mg L ⁻¹	<i>P. canaliculata</i> 301,00 mg L ⁻¹	<i>O. niloticus</i> 140,50 mg L ⁻¹
100% CAE 0,01 mg L ⁻¹	0,000123 Baixo	0,000028 Baixo	0,000033 Baixo	0,000071 Baixo
50% CAE 0,005 mg L ⁻¹	0,000061 Baixo	0,000014 Baixo	0,000016 Baixo	0,000035 Baixo
25% CAE 0,0025 mg L ⁻¹	0,000030 Baixo	0,000007 Baixo	0,000008 Baixo	0,000017 Baixo
12,5% CAE 0,00125 mg L ⁻¹	0,000015 Baixo	0,000003 Baixo	0,000004 Baixo	0,000008 Baixo
6,25% CAE 0,000625 mg L ⁻¹	0,000007 Baixo	0,000001 Baixo	0,000002 Baixo	0,000004 Baixo
3,12% CAE 0,000312 mg L ⁻¹	0,000003 Baixo	0,0000008 Baixo	0,000001 Baixo	0,000002 Baixo

O carbofuran classifica-se como de alto risco de intoxicação ambiental para *D. magna* mesmo que 3,12% da sua maior dose de aplicação recomendada alcance um corpo d'água de 1 ha com profundidade de 0,3 m. Para a mesma situação com *O. niloticus*, o inseticida também classifica-se como de alto risco de intoxicação ambiental se no mínimo 50% da sua maior dose recomendada atingir o ambiente aquático considerado. No caso da macrófita e do caramujo, o carbamato classifica-se como de baixo risco de intoxicação ambiental independente da dose (Tabela 13).

Tabela 13. Valores do quociente de risco (RQ) e suas respectivas classificações de risco para carbofuran, representados pela razão entre as diluições da CAE e a CE/CI/CL50 dos organismos aquáticos avaliados, considerando-se a maior dose recomendada para cana-de-açúcar (1750 g i.a ha⁻¹) em um corpo de água com área de 1 ha e profundidade de 0,3 m.

Diluições da CAE	Espécies / CE, CI e CL50			
	<i>D. magna</i> 0,011mg L ⁻¹	<i>L. minor</i> 144,41mg L ⁻¹	<i>P. canaliculata</i> 659,60 mg L ⁻¹	<i>O. niloticus</i> 0,44 mg L ⁻¹
100% CAE 0,583 mg L ⁻¹	53 Alto	0,00403 Baixo	0,00088 Baixo	1,325 Alto
50% CAE 0,291 mg L ⁻¹	26,45 Alto	0,00201 Baixo	0,00044 Baixo	0,661 Alto
25% CAE 0,145 mg L ⁻¹	13,18 Alto	0,00100 Baixo	0,00022 Baixo	0,329 Médio
12,5% CAE 0,072 mg L ⁻¹	6,54 Alto	0,00049 Baixo	0,00011 Baixo	0,163 Médio
6,25% CAE 0,036 mg L ⁻¹	3,27 Alto	0,00024 Baixo	0,00005 Baixo	0,081 Médio
3,12% CAE 0,018 mg L ⁻¹	1,63 Alto	0,00012 Baixo	0,00002 Baixo	0,040 Baixo

Na avaliação de risco do carbofuran para os organismos aquáticos considerando um corpo d'água de 1 ha com 2,0 m de profundidade, o inseticida classifica-se como de alto risco de intoxicação ambiental para *D. magna* mesmo que 12,5% da dose recomendada alcance o ambiente aquático. Para *O. niloticus* classifica-se como de médio risco em valores acima de 50% da CAE. Para *L. minor* e *P. canaliculata* classifica-se como de baixo risco independente da CAE (Tabela 14).

Tabela 14. Valores do quociente de risco (RQ) e suas respectivas classificações de risco para carbofuran, representados pela razão entre as diluições da CAE e a CE/CI/CL50 dos organismos aquáticos avaliados, considerando-se a maior dose recomendada para cana-de-açúcar (1750 g i.a ha⁻¹) em um corpo de água com área de 1 ha e profundidade de 2,0 m.

Diluições da CAE	Espécies / CE, CI e CL50			
	<i>D. magna</i>	<i>L. minor</i>	<i>P. canaliculata</i>	<i>O. niloticus</i>
	0,011mg L ⁻¹	144,41mg L ⁻¹	659,60 mg L ⁻¹	0,44 mg L ⁻¹
100% CAE 0,0875 mg L ⁻¹	7,95 Alto	0,00060 Baixo	0,000132 Baixo	0,1988 Médio
50% CAE 0,0437 mg L ⁻¹	3,97 Alto	0,00030 Baixo	0,000066 Baixo	0,0993 Médio
25% CAE 0,0218 mg L ⁻¹	1,98 Alto	0,00015 Baixo	0,000033 Baixo	0,0495 Baixo
12,5% CAE 0,0109 mg L ⁻¹	0,99 Alto	0,00007 Baixo	0,000016 Baixo	0,0247 Baixo
6,25% CAE 0,0054 mg L ⁻¹	0,49 Médio	0,00003 Baixo	0,000008 Baixo	0,0122 Baixo
3,12% CAE 0,0027mg L ⁻¹	0,24 Médio	0,00001 Baixo	0,000004 Baixo	0,0061 Baixo

4 Conclusões

Os riscos de intoxicação ambiental para os organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos devido à contaminação da água por imidacloprid nas condições do presente estudo classificam-se como baixos. Assim, essa molécula de amplo uso agrícola pode ser prospectada para uso aquícola no controle de ectoparasitas, desde que sejam realizados ensaios de eficácia e de exposição crônica com valores abaixo de 40 mg L⁻¹ que não causam imobilidade do organismo mais sensível ao imidacloprid (*D. magna*).

Os riscos de intoxicação ambiental para *L. minor* e *P. canaliculata* devido à contaminação da água com carbofuran nas condições expostas no presente estudo classificam-se como baixo. Entretanto para *D. magna* e *O. niloticus* o risco

varia de alto a médio dependendo da diluição da CAE e da dimensão do corpo d'água. Assim, deve-se tomar cautela na utilização de carbofuran, pois concentrações acima de 0,003 mg L⁻¹ provocam imobilidade do organismo mais sensível (*D. magna*).

A presença de imidacloprid e carbofuran em um corpo hídrico causa aumento na condutividade elétrica da água. Essa alteração pode estar associada a maior disponibilidade de íons devido à presença dos inseticidas na água ou ser resultado da maior liberação de excretas dos animais aquáticos provocada pelo processo de intoxicação.

5 Referências

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR 12713. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp** (Crustacea, Cladocera). Terceira Edição, 23 p. 2009.

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR 15088. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes**. Segunda Edição, 22p. 2011.

Bretaud, S.; Toutant, J. E.; Saglio, E. Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, n.2, p.117-124, 2000.

Carraschi-Oliveira, S. P. **Ecotoxicidade, segurança clínica e eficácia de fármacos em jovens de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2014. 101f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, 2014.

Chen, X. D.; Culbert, E.; Hebert, V.; Stark, J. D. Mixture effects of the nonylphenyl polyethoxylate, R-11 and the insecticide, imidacloprid on population growth rate and other parameters of the crustacean, *Ceriodaphnia dubia*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.73, p.132–137, 2010.

European Communities (EC), **Technical guidance document in support of Commission Directive 1488/94 EEC on risk assessment for existing substances**. Part II, environmental risk assessment. Luxembourg: Office for official publication of the European Communities, 2003. 337p.

Campos-Garcia, J.; Martinez, D. S. T.; Alvez, O. L.; Leonardo, A. F. G.; Barbieri, E. Ecotoxicological effects of carbofuran and oxidized multiwalled carbon

nanotubes on the freshwater fish Nile tilapia: nanotubes enhance pesticide ecotoxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.111, p. 131-137, 2015.

Daam, M. A.; Pereira, A. C. S.; Silva, E.; Caetano, L.; Cerejeira, M. J. Preliminary aquatic risk assessment of imidacloprid after application in an experimental rice plot. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.97, p. 78-95, 2013.

Guilherme, L. R. G. Fundamentos da análise de risco: conceitos em análise de risco ecológica e para saúde humana. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. v.34, p.44-55, 2005.

Guiloski, I. C.; Silva, E. G.; Nishikawa, C. M.; Assis, H. C. S. Atividade da colinesterase em cérebro e músculo de *Corydoras paleatus* (Pisces, Teleostei) expostos ao carbaril. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v.8, n.4, p. 461-468, 2010.

Goktepe, I.; Portier, R.; Ahmedna, M. Ecological risk assessment of Neem-based pesticides. **Journal of Environmental Science Health Part B**, v.39, n.2, p. 311-320, 2004.

Grützmacher, D. D.; Grützmacher, A. D.; Agostinetto, D.; Loeck, A. E.; Roman, R.; Peixoto, S. C.; Zanella, R. Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.12, n.6, p. 632-637, 2008.

Hamilton, M.A.; Russo, R.C.; Thurston, V. Trimed Sperman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicology bioassays. **Environmental Science & Technology**, v.7, p.714-719, 1977.

Hayasaka, D.; Korenaga, T.; Suzuki, K.; Sánchez-Bayo, F.; Gpka, K. Differences in susceptibility of five cladoceran species to two systemic insecticides, imidacloprid and fipronil. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 421-427.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Sistema de classificação quanto ao potencial de periculosidade ambiental – PPA, 2015. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/qualidade-ambiental/classificacao_ppa> Acesso em: 20 jan. 2015.

Ignácio, N. F. **Seleção de bioindicadores aquáticos pela toxicidade aguda e risco ambiental do inseticida fipronil**. 2014. 65f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, 2014.

Kavitha, P.; Rao, J. V. Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after

lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 87, n.2, p.182-188, 2007.

Kokta, C.; Rothert, H. A. **Hazard and risk assessment scheme for evaluating effects on earthworms**: the approach in the Federal Republic of Germany. In: Greig-Smith, P. W.; Becker, H.; Edwards, P. J.; Heimbach, F. (Eds.) *Ecotoxicology of earthworm*, 1992. p.169 -176.

Macêdo, J.A.B. (Ed). **Águas e Águas**. Belo Horizonte: CRQ-MG, 2004. 977p.

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

Mansano, A. S.; Moreira, R. A.; Rocha, O. Toxicidade aguda do agrotóxico carbofuran ao cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii daday*. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v.9, n.11, p.91-103, 2013.

Marçon, P. G. **Modo de Ação de Inseticidas e Acaricidas**. Comitê Brasileiro de Ação a Resistência a Inseticidas. Disponível em: <<http://www.iracbr.org.br/arquivos/mododeacao.doc>>. Acesso em: 10 set. 2013.

Marshall, I.; Begg, S. **Health Investigation Level for Imidacloprid in Soil**. In: Proceedings of the Fifth National Workshop on the Assessment of Site Contamination.p211. Disponível em:<http://www.ephc.gov.au/pdf/cs/workshopdocs/14_Pest_Marshall_HIL_Imidacloprid.pdf>. Acesso em 14 out. 2013.

Maxwell, D. M.; Koplovitz, I.; Worek, F.; Sweeney, R. E. A structure-activity analysis of the variation in oxime efficacy against nerve agents. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 231, n. 2, p. 57-164, 2008.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). **Lemna sp. Growth Inhibition Test**. In: GUIDELINE for testing of chemicals, 2002.

Qi, S.; Wang, C.; Chen, X.; Qin, Z.; Li, X.; Wang, C. Toxicity assessments with *Daphnia magna* of guadipyr, a new neonicotinóide insecticide and studies of its effect on acetylcholinesterase (AChE), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and chitobiase activities. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.98, p. 339-344, 2013.

Rand, G. M.; Petrocelli, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington: Hemisphere, 1985. 665p.

Resgalla Junior, C.; Noldin, J.A.; Santos, A.L.; Sato, G.; Eberhardt, D.S. Toxicidade aguda de herbicidas e inseticidas utilizados na cultura do arroz irrigado sobre juvenis de carpa (*Cyprinus carpio*). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.12, p.59-68, 2002.

Tang, Z.; Huang, Q.; Yang, Y.; Zhu, X.; Haihui, F. Organochlorine pesticides in the lower reaches of Yangtze River: Occurrence, ecological risk and temporal trends. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.87, p. 89-97, 2013.

Tisler, T.; Jemec, A.; Mozetic, B.; Trebse, P. Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. **Chemosphere**, v.76, p. 907-914, 2009.

Tomizawa, M.; Casida, J. E. Selective Toxicity of Neonicotinoids Attributable to Specificity of Insect and Mammalian Nicotinic Receptors. **Annual Review of Entomology**, v.48, p. 339-364, 2003.

Tomizawa, M.; Casida, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, v.45, p. 247–268, 2005.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Interim Reregistration Eligibility Decision – Carbofuran, 2006. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/reregistration/carbofuran/carbofuran_noic.htm> Acesso em: 15 jan. 2015.

Veiga, M. M.; Silva, D. M.; Veiga, L. B. E; Faria, M. V. C. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.22, n.11, p.2391-2399, 2006.

Zucker, E. **Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure - Acute Toxicity Test for Freshwater Fish**. Washington: USEPA PUBLICATION, 1985. 167p.

Wang, Y.; Chen, C.; Zhao, X.; Wang, Q.; Qian, Y. Assessing joint toxicity of four organophosphate and carbamate insecticides in common carp (*Cyprinus carpio*) using acetylcholinesterase activity as an endpoint. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, article in press, 2015.

MANUSCRITO 2

ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E HISTOLÓGICAS EM TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) EXPOSTA A CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DE IMIDACLOPRID E CARBOFURAN

Juliana Heloisa Pinê Américo^{1*}; Joaquim Gonçalves Machado Neto¹

¹ Centro de Aquicultura da Unesp, Câmpus de Jaboticabal. Via de Acesso Prof. Dr. Paulo Donato Castellane, s/n, Zonal Rural, Jaboticabal (SP), Brasil. Cep: 14884-900. *E-mail: americo.ju@gmail.com

Revista: Science of the Total Environment - Qualis A1 – ISSN: 0048-9697

Resumo

Objetivou-se avaliar alterações hematológicas e histológicas em órgãos alvo de tilápias (*O. niloticus*) expostas a concentrações subletais dos inseticidas imidacloprid e carbofuran e avaliar as variáveis de qualidade de água durante os ensaios de toxicidade crônica. Peixes com peso médio entre 65 e 70 g foram aclimatados por dez dias em sala de bioensaio e depois submetidos a ensaios de toxicidade crônica conforme procedimentos da ABNT NBR 15499:2007. As concentrações utilizadas nos ensaios de toxicidade crônica para imidacloprid foram 1,405; 2,810; 14,050 e 28,100 mg L⁻¹ e para carbofuran foram 0,0044; 0,0088; 0,0440 e 0,0880 mg L⁻¹. As variáveis de qualidade de água foram registradas em 1, 3, 5 e 7 dias após exposição com auxílio de sonda multiparâmetro. Ao final dos ensaios (sete dias), foram coletadas amostras de sangue por punção da veia caudal e de órgãos (brânquia, fígado, rim e gônada) para avaliação histológica. A exposição de *O. niloticus* às concentrações de imidacloprid acima 14,050 mg L⁻¹ reduziram o número de eritrócitos e o teor de proteínas plasmáticas totais. O carbofuran na concentração de 0,0880 mg L⁻¹ aumentou o número trombócitos, reduziu o número de eritrócitos e causou leucocitose nos peixes. Concentrações subletais de imidacloprid e carbofuran causaram congestão sanguínea, aumento do epitélio interlamelar e desestruturação da lamela secundária nas brânquias. A necrose foi uma das principais alterações histológicas causadas pelos inseticidas no fígado, rim e gônada dos peixes. A diluição de imidacloprid e carbofuran aumenta a condutividade elétrica da água. A presença dos inseticidas imidacloprid e carbofuran em ambientes aquáticos pode comprometer o funcionamento dos órgãos, prejudicar a saúde e a sobrevivência de *O. niloticus*.

Palavras-chave: toxicidade, sangue, estresse, necrose, neonicotinóide, carbamato.

Abstract

The aims were to evaluate hematological and histological changes in different target organs of tilapia (*O. niloticus*) exposed to sublethal concentrations of imidacloprid and carbofuran and evaluate the quality variables of water during the chronic toxicity tests. Fish with an average weight between 65 and 70 g were acclimated for ten days in bioassay room and then subjected to chronic toxicity testing procedures as ABNT NBR 15499: 2007. The concentrations used in chronic toxicity tests for imidacloprid were 1,405; 2,810; 14,050 and 28,100 mg L⁻¹ and for carbofuran were 0.0044; 0.0088; 0.0440 and 0.0880 mg L⁻¹. The water quality variables were recorded at 1, 3, 5 and 7 days after exposure with the help of multi-parameter probe. At the end of experiment (seven days), blood samples were collected by caudal vein puncture and organs (gill, liver, kidney and gonads) were collected for histological evaluation. The exposure to *O. niloticus* at the imidacloprid concentrations above 14,050 mg L⁻¹ reduced the number of erythrocytes and the level of total plasma proteins. Carbofuran at a concentration of 0.0880 mg L⁻¹ increased the thrombocyte number, reduced the number of erythrocytes and caused a leukocytosis fish. Sublethal concentrations of imidacloprid and carbofuran caused blood congestion, increased interlayer epithelium and disruption of the secondary lamella gills. Necrosis was one of the main hitopathological changes caused by insecticides in the liver, kidney and gonad of fishes. The dilution imidacloprid and carbofuran increases the electrical conductivity of water. The presence of imidacloprid and carbofuran in aquatic environments can caused damage in the functioning of the organs, impair the health and survival of *O. niloticus*.

Keywords: toxicity, blood, stress, necrosis, neonicotinoid, carbamate.

1 Introdução

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie de peixe mais cultivada no Brasil, representando 43,1% da produção de peixes no país (IBGE, 2013) com excelente aceitação no mercado consumidor (Zimmermann e Hasper, 2004). Apesar de ser originária da África, a tilápia foi introduzida na maioria dos países tropicais e subtropicais para utilização em pisciculturas e tornou-se o peixe de água doce de maior importância na aquicultura mundial (Santos et al., 2008).

A utilização de agrotóxicos nas áreas agrícolas pode resultar em contaminações de ambientes aquáticos adjacentes por resíduos desses compostos tóxicos (Veiga et al., 2006, Tang et al., 2013, Kuzmanović et al, 2015). As águas contaminadas por agrotóxicos podem intoxicar ou comprometer a saúde de espécies de peixes de cultivo e de outros organismos aquáticos não alvos (Boran et al., 2010, Qi et al., 2013, Harabawy e Ibrahim, 2014).

O imidacloprid [1-(6-chloro-pyridin-3-ylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine] é um inseticida do grupo químico dos neonicotinóides e é utilizado mundialmente para controle de insetos sugadores de culturas (Tomizawa e Casida, 2005). Por ser um inseticida pouco tóxico para peixes e outros organismos aquáticos (Tisler et al., 2009, Qi et al., 2013), o imidacloprid é um inseticida com potencial de uso aquícola para o controle de parasitas em peixes.

O carbofuran (2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl methylcarbamate) é um inseticida, acaricida e nematicida de largo espectro de ação do grupo químico dos carbamatos muito utilizado na agricultura brasileira. Por se um inseticida muito tóxico para peixes (Bretaud et al., 2000, Campos-Garcia et al., 2015), teve seu registro para uso agrícola cancelado nos Estados Unidos e Europa (USEPA, 2006).

A exposição de peixes a substâncias químicas pode induzir alterações hematológicas e histológicas nesses organismos (Nandan e Nimila, 2012, Harabawy e Ibrahim, 2014). Os parâmetros sanguíneos são considerados indicadores fisiohistopatológicos e são importantes no diagnóstico do estado estrutural e funcional de peixes expostos a situações de estresse. A avaliação hematológica é um dos métodos mais comuns que permitem a determinação de efeitos subletais de contaminantes em peixes (Adhikari et al., 2004, Ural, 2013).

Os parâmetros histopatológicos são muito sensíveis e cruciais para determinação de alterações celulares que podem ocorrer em peixes, uma vez que as características histológicas de órgãos alvo podem expressar diferentes alterações decorrentes de condições ambientais adversas. Essas análises podem identificar os órgãos mais afetados e diferenças na sensibilidade dos organismos em relação aos níveis de substâncias tóxicas (Dutta, 1996, Guimarães et al., 2007, Nandan e Nimila, 2012). Os principais órgãos afetados pelos compostos tóxicos são brânquias, fígado, rim e gônadas (Cuña et al., 2011, Shiogiri et al., 2012, Husak et al., 2014).

As brânquias são os órgãos primeiramente afetados por substâncias tóxicas por estarem em contato direto com a água do meio e serem ricamente vascularizadas, sendo sensível o bastante para indicar efeitos iniciais de baixas concentrações de xenobióticos (Pawert et al., 1998). As principais alterações observadas nas brânquias de peixes submetidos a concentrações de agrotóxicos

são fusão das lamelas, hiperplasia lamelar e necrose das células epiteliais (Boral et al., 2010, Shiogiri et al., 2012).

O fígado é o principal órgão envolvido na detoxificação e metabolismo, compostos tóxicos podem afetar o metabolismo de lipídeos e carboidratos e indiretamente afetar o funcionamento de outros órgãos (Jimenez e Stegman, 1990). O inseticida carbosulfan, em concentrações subletais, causa necrose dos hepatócitos e edema intercelular no fígado de peixes (Capkin et al., 2010).

O rim é um órgão vital que atua na manutenção da homeostase. Esse órgão está envolvido na remoção de impurezas do sangue, além de ajudar a manter o volume e o pH do sangue e dos fluidos corpóreos (Iqbal et al., 2004). Uma das principais alterações provocadas por agrotóxicos em peixes é a necrose das células tubulares (Nadam e Nimila, 2012).

As gônadas são órgãos indispensáveis para reprodução dos peixes e muitos contaminantes aquáticos atuam como desreguladores endócrinos. Os contaminantes são capazes de inibir ou mimetizar a função de hormônios naturais nos seres vivos e alterar as funções e as estruturas do sistema endócrino (Johnson et al., 1993).

Não obstante esses conhecimentos citados, existem informações limitadas a respeito dos efeitos da exposição de peixes a concentrações subletais dos inseticidas imidacloprid e carbofuran nos parâmetros hemato-histológicos dos peixes. Os estudos existentes normalmente avaliam os efeitos dos agrotóxicos em um único órgão alvo, mas a saúde do animal depende do funcionamento adequado de um conjunto de órgãos que podem ser afetados por meio da exposição a esses inseticidas.

Objetivou-se avaliar alterações hematológicas e histológicas em diferentes órgãos alvo de tilápias (*O. niloticus*) expostas a concentrações subletais dos inseticidas imidacloprid e carbofuran e avaliar as variáveis de qualidade de água durante os ensaios de toxicidade crônica.

2 Material e Métodos

O projeto de pesquisa desse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal – SP (Protocolo n° 021534/14).

Os ensaios de toxicidade crônica com *O. niloticus*, coleta de material biológico e análises hematológicas foram realizados no Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal – SP. Os peixes revertidos sexualmente (machos) foram fornecidos pelo Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP).

As rotinas histológicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal – SP.

Nos ensaios, foi utilizado o inseticida neonicotinóide imidacloprid (CAS n° 138261-41-3) na formulação comercial Provado SC® (200 g L⁻¹) e o carbamato carbofuran (CAS n° 1563-66-2) na formulação comercial Furadan SC® (350 g L⁻¹).

2.1 Ensaios de toxicidade crônica

Os exemplares de *O. niloticus*, com peso médio entre 65 e 70 g foram previamente aclimatados por dez dias em sala de bioensaio em caixas com capacidade de 250 L, fotoperíodo de 12 horas, à temperatura de 25 ± 2°C, com aeração contínua promovida por bombas de ar e alimentados uma vez ao dia, *ad libitum*, com ração comercial com teor de 40% de proteína.

As caixas de aclimação foram sifonadas uma vez ao dia para remoção de matéria orgânica em decomposição (restos de ração e excretas dos animais). O pH foi mantido entre 6,5 e 7,5, o oxigênio dissolvido permaneceu acima de 5,0 mg L⁻¹ e a condutividade entre 170,0 e 180,0 µS.cm⁻¹ (ABNT NBR 15499: 2007). Os peixes não foram alimentados 24 horas antes da realização dos ensaios.

As concentrações utilizadas nos ensaios de toxicidade crônica com *O. niloticus* foram baseadas no valor estimado da CL50;48h de 140,50 mg L⁻¹ para imidacloprid e de 0,44 mg L⁻¹ para carbofuran, determinadas nos ensaios de

toxicidade aguda. Os peixes foram expostos a concentrações subletais dos inseticidas de acordo com os seguintes quocientes: CL50/100, CL50/50, CL50/10, CL50/5 e um controle conforme ABNT NBR 15499:2007 (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de quociente e respectivas concentrações utilizadas nos ensaios de toxicidade crônica do imidacloprid e carbofuran para tilápia, *O. niloticus*

Inseticidas	Concentrações testadas dos inseticidas (mg L ⁻¹)			
	CL50/100	CL50/50	CL50/10	CL50/5
Imidacloprid	1,405	2,810	14,050	28,100
Carbofuran	0,0044	0,0088	0,0440	0,0880

O delineamento experimental utilizado nos ensaios foi inteiramente ao acaso com cinco tratamentos e nove repetições. Cada repetição foi composta por um aquário com um peixe.

As variáveis de qualidade de água pH, oxigênio dissolvido (mg L⁻¹), temperatura (°C) e condutividade elétrica ($\mu\text{s cm}^{-1}$) foram mensuradas em 1, 3, 5 e 7 dias após exposição aos inseticidas com auxílio de uma sonda multiparamétrica modelo YSI 556 MPS. Os valores das variáveis de qualidade de água nos ensaios com imidacloprid e carbofuran se enquadram nos estabelecidos pela ABNT NBR 15499:3007 para início dos ensaios de toxicidade crônica.

Ao final do período de exposição (sete dias) aos inseticidas foram realizadas coletas de amostras de sangue para análises hematológicas e de tecidos (brânquia, fígado, rim e gônada) para avaliação histológica.

2.2 Análises hematológicas

Ao final do período experimental de sete dias foram coletadas amostras de sangue por meio de venopunção caudal de todos os peixes, com auxílio de seringas heparinizadas. As amostras de sangue foram utilizadas para determinar o número de eritrócitos (RBC: *red blood cells*), a taxa de hemoglobina (Hb), o hematócrito (Ht), o teor de proteínas plasmáticas totais, a contagem total e diferencial de leucócitos (Lc) e contagem de trombócitos.

O número de eritrócitos foi determinado por meio de contagem visual em câmara de Neubauer utilizando-se como diluente uma solução salina a 0,7%. A

taxa de hemoglobina foi obtida pelo método de cianometahemoglobina com leitura realizada em espectrofotômetro (Ranzani-Paiva et al., 2013).

O hematócrito foi determinado pela técnica do microhematócrito validada por Goldenfarb et al. (1971). O microcapilar heparinizado foi preenchido com sangue em 2/3 do seu volume total e vedado em uma das suas extremidades com massa de modelar. Após a vedação, o capilar foi levado a microcentrifuga própria e centrifugado a 12.000 rpm durante cinco minutos. Os dados foram obtidos por meio de cartela de aferição dos valores de hematócrito.

Após a medida do hematócrito, foi determinado o parâmetro de proteínas plasmáticas totais (PPT) a partir do plasma remanescente no microcapilar após a centrifugação. Para esse procedimento, o microcapilar foi quebrado acima da capa leucocitária e o plasma, colocado sobre o prisma do refratômetro no qual foi realizada a leitura (Ranzani-Paiva et al., 2013).

A partir dos valores obtidos para número de eritrócitos, taxa de hemoglobina e hematócrito foram calculados os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). O VCM foi determinado por meio da relação entre o hematócrito e o número de eritrócito, o que permite avaliar o volume dos eritrócitos. O CHCM foi obtido pela relação entre a taxa de hemoglobina e o hematócrito que se refere à concentração de pigmento hemático nos eritrócitos (Wintrobe, 1934).

Duas lâminas de extensão sanguínea para cada peixe foram confeccionadas e coradas com May Grünwald-Giemsa-Wright (MGGW) pelo método de Rosenfeld (1947). Nessas lâminas foram realizadas as contagens total e diferencial de leucócitos (Leuc) em monócitos (Mono), neutrófilos (Neut), eosinófilos (Eos), basófilo (Bas), linfócitos (Linf) e de trombócitos (Tr)). O número absoluto de Leuc e Tr foi determinado pelo método indireto.

2.3 Análises histológicas

Após a coleta das amostras de sangue, três peixes do controle e das demais concentrações testadas dos inseticidas foram eutanasiados por descerebração para coleta de amostras dos órgãos.

As amostras coletadas de brânquias, fígado, rim e gônadas foram imersas em solução aquosa fixadora de formaldeído a 10%, por 24 horas. Após a fixação,

as amostras dos tecidos foram submetidas à desidratação (em séries crescentes de etanol/água), diafanização e inclusão em parafina plástica (Histosec[®] - Merck). Na sequência, foram realizados cortes de 5 µm de espessura em micrótomo automático (Leica RM-2155). Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS) de acordo com metodologia proposta por Behmer et al. (1976).

2.4 Análise estatística dos dados

Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 9 peixes por tratamento. Para determinação das variáveis hematológicas foram coletados sangue dos 9 peixes de cada tratamento. Para a avaliação das alterações histológicas foram coletados brânquias, fígado, rim e gônadas de 3 peixes por tratamento escolhidos de forma aleatória.

Os dados hematológicos foram submetidos à análise de variância utilizando o procedimento estatístico *Statistical Analysis* (SAS, 2002). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. O modelo matemático utilizado para avaliação hematológica foi:

$$Y_{ij} = m + T_i + e_{ij}, \text{ sendo:}$$

Y_{ij} = valor observado para a característica analisada;

m = média geral;

T_i = efeito das concentrações dos inseticidas i , com i variando de 1 a 5 e

e_{ij} = erro experimental.

3 Resultados e Discussão

3.1 Imidacloprid

3.1.1 Ensaio de toxicidade crônica

A temperatura da água, pH e concentração de oxigênio dissolvido (OD) durante os sete dias do ensaio manteve-se entre os valores preconizados pela ABNT NBR 15499:2007 para início dos ensaios.

Durante o período do ensaio, a condutividade elétrica variou de 201 a 278 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ no controle enquanto que em 28,100 mg L^{-1} variou de 220 a 295 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Figura 1). O aumento da condutividade elétrica foi proporcional ao aumento da concentração de imidacloprid, isso indica que o inseticida pode estar proporcionando um aumento no número de íons dissolvidos na água ou devido ao processo de intoxicação os animais estejam liberando mais excretas.

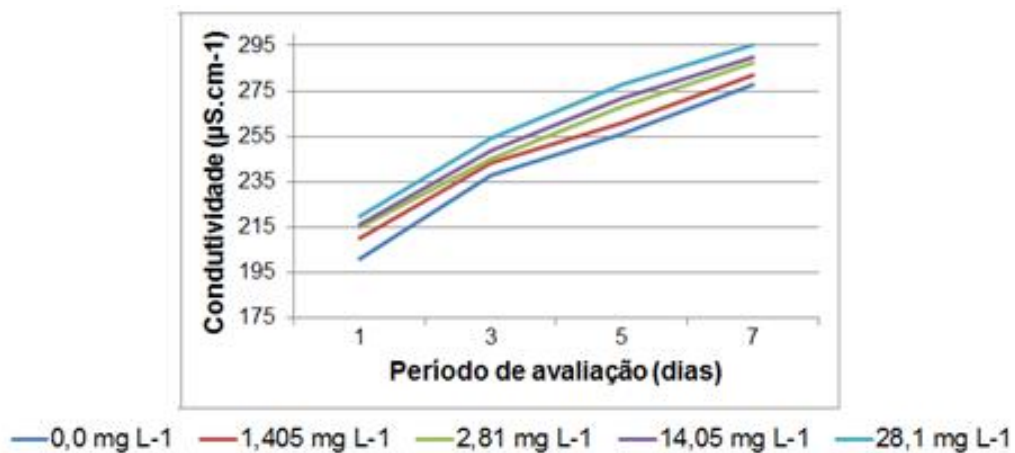


Figura 1. Condutividade elétrica avaliada durante o período de exposição no ensaio de toxicidade crônica do imidacloprid para *O. niloticus*.

Após 24 horas de exposição ao imidacloprid, todos os peixes expostos a maior concentração testada ($\text{CL}_{50/5} = 28,100 \text{ mg L}^{-1}$) ficaram com a coloração mais escura até o final do período experimental. As mudanças na coloração externa dos peixes podem indicar situações de estresse (Vaz et al., 2007).

Após 96 horas (4 dias), os peixes expostos a 28,100 mg L⁻¹ do inseticida apresentaram sinais de intoxicação como letargia e perda da capacidade de arfagem. Após 120 horas (5 dias) ocorreu mortalidade de 33,33% dos animais

3.1.2 Parâmetros hematológicos

O percentual de hematócrito e a taxa de hemoglobina não foram alterados nos peixes expostos por sete dias a concentrações subletais do imidacloprid em relação aos peixes não expostos ao inseticida (Tabela 2).

De acordo com Ranzani-Paiva et al. (2013), o percentual de hematócrito reflete a proporção de eritrócitos no sangue em relação à quantidade de leucócitos, trombócitos e plasma sanguíneo. Devido a pouca variabilidade e baixa margem de erros durante a sua determinação, é considerado como uma das variáveis hematológicas mais confiáveis.

Nos peixes expostos a 14,050 e 28,100 mg L⁻¹ de imidacloprid ocorreu redução significativa no número de eritrócitos (RBC) em relação aos peixes não expostos ao inseticida (Tabela 2). Os eritrócitos são as células mais abundantes na circulação; sua principal função é transportar oxigênio e gás carbônico, por meio da combinação da hemoglobina com oxigênio, formando a oxihemoglobina nos órgãos respiratórios e ocorrendo a posterior troca pelo gás carbônico tecidual (Ranzani-Paiva, 2007).

A redução do número de eritrócitos é um indicativo de agravamento do estado de saúde do peixe. Esse tipo de alteração afeta o transporte de oxigênio e pode estar relacionada com o processo de inflamação das lamelas branquiais provocado por intoxicações (Vosylienė, 1999). O decréscimo no número dessas células em peixes expostos a substâncias tóxicas indica uma inibição na produção das mesmas ou aumento da sua destruição (Tavares-Dias et al., 2002)

No catfish europeu (*Silurus glanis*) em exposição aguda (96 horas) a 4,0 mg L⁻¹ do inseticida organofosforado diazinon também ocorreu redução do número de eritrócitos (Köprücü et al., 2006). Os organofosforados assim como os neonicotinóides atuam no sistema nervoso, assim mesmo comparando-se espécies diferentes observa-se que o tipo de alteração foi semelhante para esses inseticidas.

Tabela 2. Valores médios e erro padrão das variáveis hematológicas de tilápias, *O. niloticus*, expostas a concentrações subletais do inseticida imidacloprid durante sete dias.

Concentrações (mg L ⁻¹)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g dL ⁻¹)	Eritrócitos (10 ⁶ células mm ⁻³)
Controle	22,50 ± 1,44	7,56 ± 0,59	1,39 ± 0,07 A
1,405	23,50 ± 0,79	8,39 ± 0,43	1,38 ± 0,04 A
2,810	22,61 ± 1,25	8,31 ± 0,43	1,36 ± 0,05 A
14,050	21,16 ± 1,26	7,49 ± 0,34	1,19 ± 0,03 B
28,100	21,16 ± 0,46	7,73 ± 0,22	1,20 ± 0,02 B
F	0,83 ^{ns}	0,99 ^{ns}	3,78 ^{**}
CV (%)	14,96	16,16	11,71
DMS	4,47	1,72	0,16

^{ns} : Não significativo. ^{**}: Significativo a 0,01%.

A,B: letras distintas na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo teste Tukey (p<0,05). Controle: peixes não expostos ao inseticida. Eritrócitos: RBC (*red blood cells*). CV: coeficiente de variação. DMS: diferença mínima significativa.

Os índices hematimétricos (VCM e CHCM) dos peixes expostos às concentrações de imidacloprid não foram alterados significativamente em relação aos peixes não expostos (Tabela 3). Os valores de VCM e CHCM são utilizados para avaliar o estresse e demonstram o estado fisiológico do animal (Matos e Matos, 1995, Tavares-Dias e Moraes, 2004).

Tabela 3. Valores médios e erro padrão dos índices hematimétricos de tilápias, *O. niloticus*, expostas a concentrações subletais do inseticida imidacloprid durante sete dias.

Concentrações (mg L ⁻¹)	Volume corpuscular médio (fL)	Concentração de hemoglobina corpuscular média (g dL⁻¹)
Controle	166,82 ± 7,16	35,81 ± 2,23
1,405	171,42 ± 6,12	35,64 ± 1,20
2,810	165,94 ± 8,09	37,02 ± 1,30
14,050	176,52 ± 7,94	36,30 ± 2,33
28,100	176,77 ± 4,12	36,52 ± 0,50
F	0,32 ^{ns}	0,04 ^{ns}
CV (%)	15,91	22,27
DMS	36,74	10,87

^{ns}: Não significativo.

Controle: peixes não expostos ao inseticida. CV: coeficiente de variação e DMS: diferença mínima significativa.

Nas tilápias expostas a 28,100 mg L⁻¹ ocorreu um aumento significativo do número de trombócitos em relação ao grupo controle não exposto ao inseticida (Tabela 4). Os trombócitos são células de defesa orgânica responsáveis pela coagulação sanguínea e muitas vezes desempenham função fagocítica (Matushima e Mariano, 1996; Tavares-Dias et al., 2007).

Esse efeito também foi observado em pacu (*P. mesopotamicus*) tratado durante cinco dias com 50 mg L⁻¹ do inseticida teflubenzuron (Ikefuti, 2012).

Nos peixes expostos a 14,050 e 28,100 mg L⁻¹ de imidacloprid observou-se uma redução significativa no teor de proteínas plasmáticas totais em relação aos peixes não expostos (Tabela 4). De acordo com Swenson (1996), a redução de proteínas plasmáticas como albumina, globulina e fibrinogênio estão associadas a alterações hepáticas graves.

As proteínas do sangue são consideradas excelentes ferramentas para avaliação da condição ecológica, bioquímica e fisiológica do peixe, pois atuam no transporte de vários metabólitos além de proteger o organismo contra infecções e ação de xenobióticos (Kovyrshina e Rudneva, 2012). A determinação dessas proteínas representa um dos mais importantes indicadores de efeitos negativos

provocados por estresse e contaminação aquática em peixes (Tayel et al., 2007, Saravanan et al., 2011).

Tabela 4. Valores médios e erro padrão do trombograma e do teor de proteínas plasmáticas de tilápias, *O. niloticus*, expostas a concentrações subletais do inseticida imidacloprid durante sete dias.

Concentrações (mg L ⁻¹)	Trombócitos (células µL ⁻¹)	Proteínas plasmáticas totais (g dL ⁻¹)
Controle	20762,26 ± 2686,62 B	2,84 ± 0,05 AB
1,405	38467,11 ± 4929,78 AB	3,09 ± 0,17 A
2,810	30373,58 ± 4865,94 AB	2,55 ± 0,09 BC
14,050	30428,37 ± 3049,86 AB	2,11 ± 0,12 C
28,100	41388,24 ± 3866,41 A	2,11 ± 0,04 C
F	5,08**	1515,53***
CV (%)	26,14	13,02
DMS	1610,10	0,44

** : Significativo a 0,01%. ***: Significativo a 0,001%

A,B,C: letras distintas na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (P<0,05). Controle: peixes não expostos ao inseticida. CV: coeficiente de variação e DMS: diferença mínima significativa.

No peixe asiático *Monopterus albus* em exposição aguda (96 horas) ao inseticida endossulfan (0,0007 mg L⁻¹) não foi observado alteração no teor de proteínas plasmáticas (Siang et al., 2007). Mesmo com o endossulfan, sendo um inseticida mais tóxico que o imidacloprid (Siang et al., 2007), os resultados do presente estudo diferem dos encontrados em *M. albus*; possivelmente devido ao maior tempo de exposição (sete dias) de *O. niloticus* ao inseticida.

Nas tilápias expostas a todas as concentrações subletais testadas de imidacloprid ocorreu aumento significativo no número de leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos em relação ao grupo controle. O número de monócitos aumentou significativamente apenas nos peixes expostos a 28,100 mg L⁻¹ em relação aos peixes do controle (Tabela 5).

Quando a qualidade da água é alterada por substâncias tóxicas, ocorre a leucocitose, uma reação fisiológica normal do peixe contra substâncias estranhas

(Nussey et al., 1995). O aumento no número de leucócitos também auxilia na remoção de detritos celulares, tecidos necrosados e estimulam os parâmetros imunológicos de defesa (John, 2007).

Não foram observadas a presença de eosinófilos e basófilos no sangue dos peixes de todos os tratamentos inclusive do grupo controle. De acordo com Thrall 2007, raramente há relatos de eosinófilos e basófilos em extensões sanguíneas de osteíctes.

Tabela 5. Valores médios e erro padrão do leucograma de tilápias, *O. niloticus*, expostas a concentrações subletais do inseticida imidacloprid durante sete dias.

Concentrações (mg L ⁻¹)	Células (células µL ⁻¹)			
	Leucócitos	Monócitos	Neutrófilos	Linfócitos
Controle	24036,27 B (±2539,25)	2274,92 B (±298,04)	5048,07 B (±555,38)	16058,43 B (±1612,66)
1,405	48423,41 A (±3496,92)	3697,81 AB (±651,00)	7594,77 A (±746,87)	37026,34 A (±2621,88)
2,810	53263,09 A (±3550,87)	3543,46 AB (±395,49)	7171,22 A (±750,31)	43103,08 A (±2780,04)
14,050	50369,11 A (±3791,08)	3110,51AB (±136,58)	7438,26 A (±468,37)	38747,28 A (±2852,36)
28,100	56337,32 A (±3495,92)	4229,10 A (±244,61)	6369,09 A (±364,99)	45939,51 A (±2672,89)
F	12,48***	5,12**	14,75***	14,42***
CV (%)	25,65	22,35	29,68	25,73
DMS	1771,52	1578,64	1421,02	1253,31

** : Significativo a 0,01%. ***: Significativo a 0,001%

A,B: letras distintas na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (P<0,05). Controle: peixes não expostos ao inseticida. CV: coeficiente de variação. DMS: diferença mínima significativa.

3.1.3 Histologia

3.1.3.1 Brânquias

As brânquias de *O. niloticus* do grupo controle apresentaram constituição característica de peixes teleósteos, compostas por lamelas primárias e lamelas secundárias. As lamelas primárias foram constituídas por cartilagem que as sustenta, no seu interior encontra-se um vaso sanguíneo de onde partem as lamelas secundárias. As lamelas secundárias são formadas por células mucosas e células pilares. Entre as lamelas secundárias encontra-se o espaço interlamelar constituído por células mucosas, células de revestimento e células cloreto (Figura 2A). Estas características foram similares às observadas por Henares et al. (2008) em *O. niloticus* e por Carraschi-Oliveira et al. (2014) em *P. mesopotamicus*.

Nos peixes expostos a todas as concentrações subletais do imidacloprid ocorreu congestão sanguínea no interior da lamela secundária, aumento do epitélio interlamelar (Figura 2B) e desestruturação da lamela secundária (Figura 2C). Apenas nos peixes expostos a 28,100 mg L⁻¹ de imidacloprid ocorreu edema subepitelial na lamela secundária (Figura 3D e Tabela 6)

Tabela 6. Alterações histológicas em brânquias de tilápias, *O. niloticus*, após 7 dias de exposição a concentrações subletais de imidacloprid.

Alterações	Concentrações (mg L ⁻¹)				
	Controle	1,405	2,810	14,050	28,100
Congestão sanguínea	X	X	X	X	X
Aumento do epitélio interlamelar	X	X	X	X	X
Edema subepitelial	--	--	--	--	X
Desestruturação da LS	X	X	X	X	X

Controle: peixes não expostos ao inseticida. X: presença da alteração. --: ausência de alteração. LS: lamela secundária.

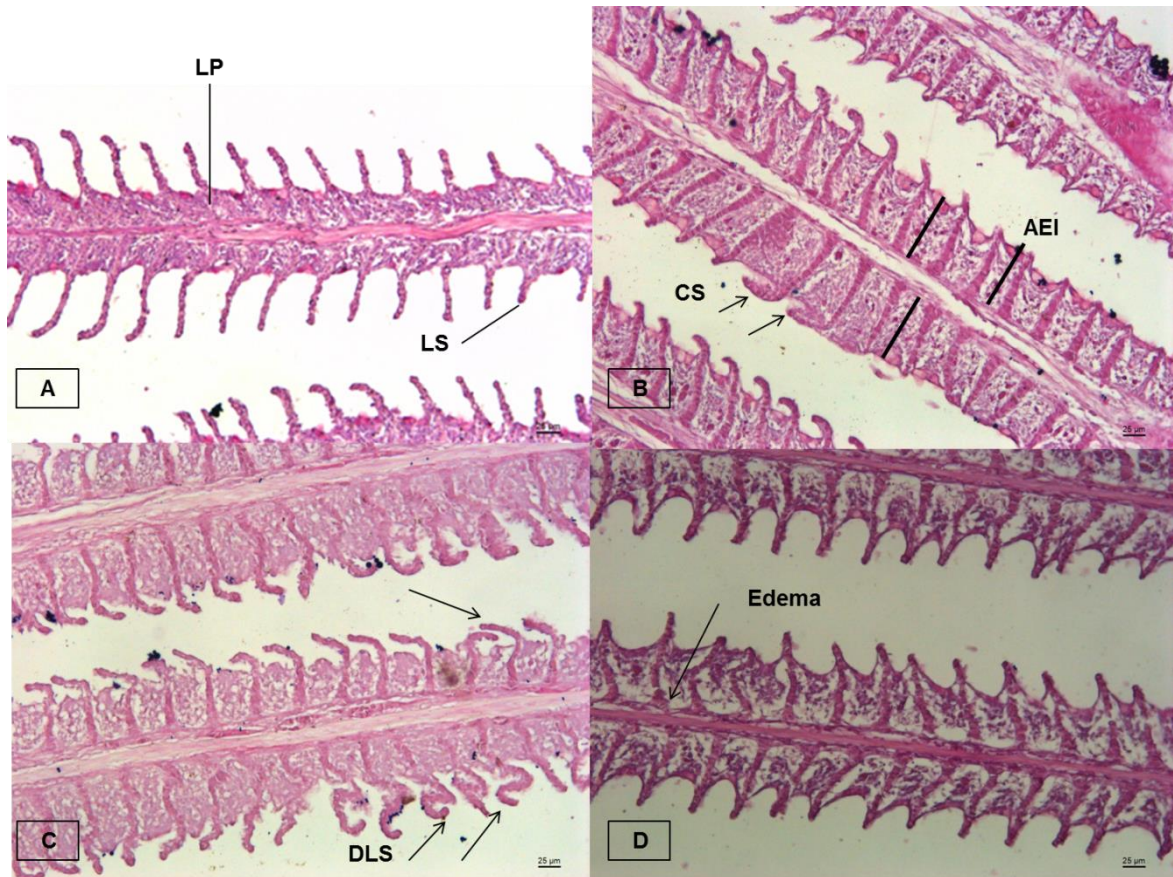


Figura 2. Fotomicrografias de brânquias de *Oreochromis niloticus*. **(A)** Controle não exposto ao imidacloprid. **(B)** Congestão sanguínea (CS) e aumento do epitélio interlamelar (AEI) em peixe exposto a $2,810 \text{ mg L}^{-1}$ de imidacloprid. **(C)** Desestruturação da lamela secundária (DLS) em peixe exposto a $2,810 \text{ mg L}^{-1}$ de imidacloprid. **(D)** Edema em peixe exposto a $28,100 \text{ mg L}^{-1}$ de imidacloprid. LP: lamela primária e LS: Lamela secundária. Coloração PAS.

Em brânquias do peixe *Cirrhinus mrigala* exposto a concentrações subletais do piretróide lambda-cyhalotrin ($0,0003 \text{ mg L}^{-1}$) durante dez dias foi observado alterações semelhantes a desse estudo como aumento do epitélio lamelar e edema (Velmurugan et al., 2007).

A exposição de *O. niloticus* a concentrações subletais do organofosforado trichlorfon ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$) também provocou congestão sanguínea e edema nas brânquias dos peixes após 72 horas de exposição (Guimarães et al, 2007). Congestão sanguínea nas lamelas secundárias e edema subepitelial também ocorreram nas brânquias de *O. niloticus* expostas a 50 mg L^{-1} do herbicida diquat em ensaios de toxicidade aguda com duração de 96 horas (Henares et al., 2008).

As brânquias são os indicadores mais apropriados de exposição à xenobióticos, pois são muito vulneráveis a substâncias tóxicas e estão em contato direto com a água do meio (Alazemi et al., 1996). Alterações no tecido branquial dos peixes como congestão sanguínea, aumento do epitélio lamelar e edema comprometem o fluxo sanguíneo e dificultam as trocas gasosas nas brânquias, além de alterar a homeostase dos animais (Melletti, 2004).

A ocorrência de congestão sanguínea nas lamelas secundárias podem ser uma tentativa do peixe em diminuir as trocas gasosas e assim reduzir a absorção de substâncias tóxicas pela estrutura branquial (Henares et al., 2008).

Apesar de o imidacloprid ser considerado um inseticida praticamente não tóxico para peixe (Tisler et al., 2009), observou-se que peixes expostos a concentrações subletais desse neonicotinóide por um período de sete dias podem sofrer alterações histopatológicas nas brânquias que comprometem a saúde e o bem estar do animal.

3.1.3.2 Fígado

O fígado de *O. niloticus* do controle apresentou organização cordonal do arranjo dos hepatócitos, formando um conjunto de células em contato direto com os capilares sinusóides. Os hepatócitos apresentaram formato hexagonal levemente arredondado, com núcleo (basófilo) centralizado e citoplasma acidófilo com a presença de grânulos de glicogênio (Figura 3A).

No fígado dos peixes expostos a todas as concentrações de imidacloprid ocorreu hipertrofia dos hepatócitos com núcleos deslocados para a periferia das células e estase no interior dos capilares sinusóides (Figura 3B e Tabela 7)

Os grânulos de glicogênio ocorreram nos hepatócitos de *O. niloticus* expostos a 2,810 e 28,100 mg L⁻¹ de imidacloprid, enquanto que pontos de necrose ocorreram em tilápias expostas a 28,100 mg L⁻¹ (Figura 3B e Tabela 7). A redução do estoque de glicogênio é um tipo de alteração provocada em resposta ao estresse ambiental (Teh et al., 1997).

O fígado é o principal reponsável pela desintoxicação sendo um dos órgãos que mais apresenta alterações morfológicas em peixes expostos a agrotóxicos (Dutta et al., 1993). Alterações no fígado podem ser úteis como biomarcadores de exposição a agentes estressores (Velmurugan et al., 2007).

Pontos de necrose no fígado também foram observados em *Gambusia affinis* expostos durante 20 dias a 0,00025 mg L⁻¹ de deltametrina (Cengiz e Unlu, 2006) .

Tabela 7. Alterações histológicas em fígado de tilápias, *O. niloticus*, após sete dias de exposição a concentrações subletais de imidacloprid.

Alterações	Concentrações (mg L ⁻¹)				
	Controle	1,405	2,810	14,050	28,100
Grânulos de glicogênio	X	--	X	--	X
Hipertrofia dos hepatócitos	--	X	X	X	X
Núcleos deslocados*	--	X	X	X	X
Estase no capilar sinusóide		X	X	X	X
Pontos de necrose					X

Controle: peixes não expostos ao inseticida.*Núcleos deslocados para periferia da célula.

X: presença da alteração. --: ausência de alteração

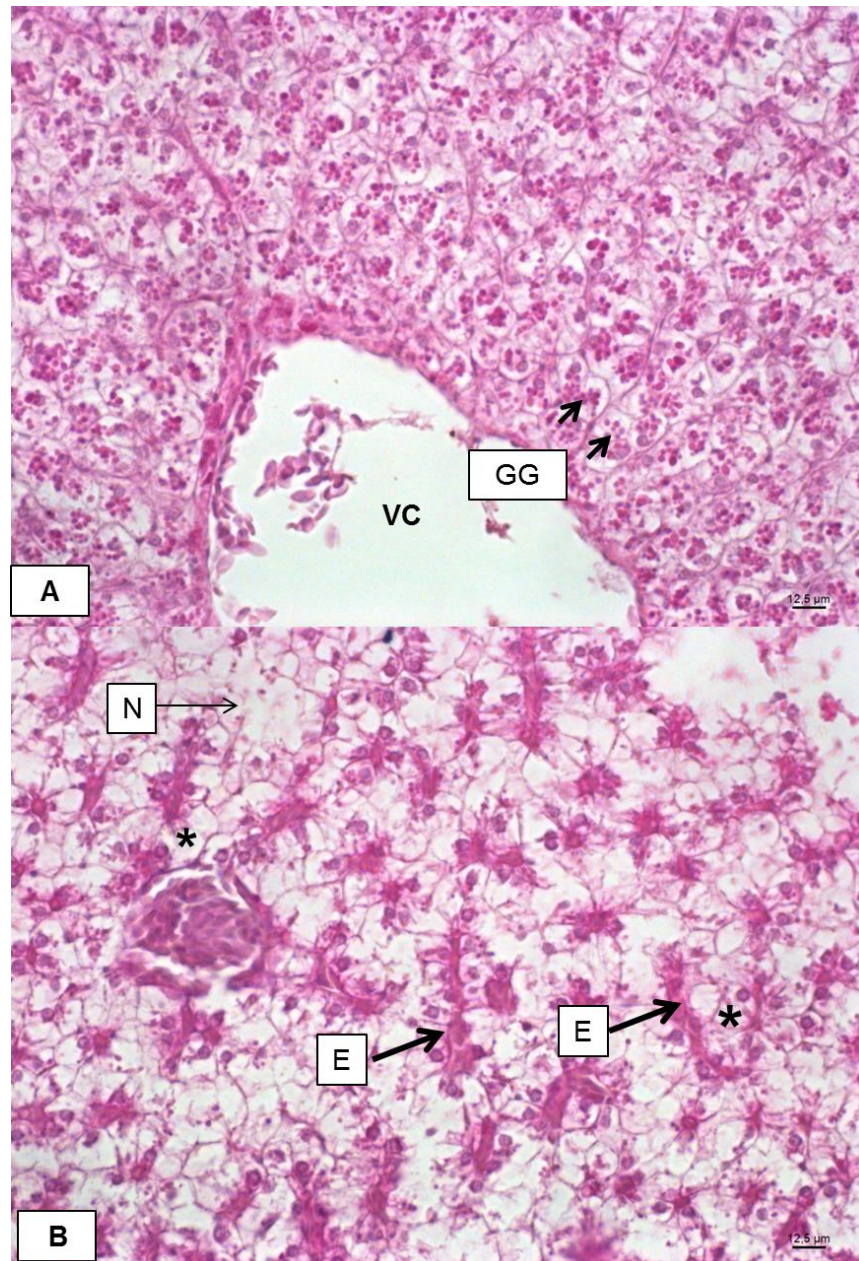


Figura 3. Fotomicrografias de fígado de *Oreochromis niloticus*. **(A)** Controle não exposto ao imidacloprid com muitos grânulos de glicogênio (GG) no interior dos hepatócitos. **(B)** Hipertrofia dos hepatócitos, deslocamento do núcleo para periferia da célula (asterisco), estase no capilar sinusóide (E) e ponto de necrose (N) em peixe exposto a 28,100 mg L⁻¹ de imidacloprid. VC: veia central. Coloração PAS.

3.1.3.3 Rim

O rim das tilápias é constituído por glomérulos dentro da cápsula glomerular, túbulos proximais e distais envolvidos por tecido hematopoiético. Os peixes do controle apresentaram rim normal característico da espécie sem alterações histológicas (Figura 4A).

Nos peixes expostos a 1,405 mg L⁻¹ de imidacloprid observou-se necrose nos túbulos proximais e distais e ausência do espaço intercelular. Nas demais concentrações ocorreram desprendimento da cápsula glomerular, necrose dos túbulos proximais e distais e ausência do espaço intercelular (Figura 4B e Tabela 8).

O rim é um importante órgão responsável pela manutenção da estabilidade do balanço hídrico e de sais nos organismos, assim como a excreção e metabolismo de xenobióticos. A intoxicação com agrotóxicos pode potencialmente induzir alterações na estrutura e função renal em peixes de água doce (Boran et al., 2010, Husak et al., 2014). Assim, essas alterações no rim podem ser bons indicadores de poluição ambiental (Gunkel, 1981).

Cirhinus mrigala expostos a 0,0003 mg L⁻¹ do inseticida lambda-cyhalothrin apresentaram necrose dos túbulos e desprendimento da cápsula glomerular (Velmurugan et al., 2007).

A necrose é um estado morfológico regressivo de uma célula que ocorre após a perda irreversível da sua função, e pode ser utilizada como um indicador histopatológico de exposição à xenobióticos (Bernet et al., 1999).

Tabela 8. Alterações histológicas em rim de tilápias, *O. niloticus*, após sete dias de exposição a concentrações subletais de imidacloprid.

Alterações	Concentrações (mg L ⁻¹)				
	Controle	1,405	2,810	14,050	28,100
Desprendimento da CG	--	--	X	X	X
Necrose nos túbulos	--	X	X	X	X
Ausência de espaço intercelular	--	X	X	X	X

Controle: peixes não expostos ao inseticida. CG: capsula glomerular. X: presença da alteração. --: ausência de alteração

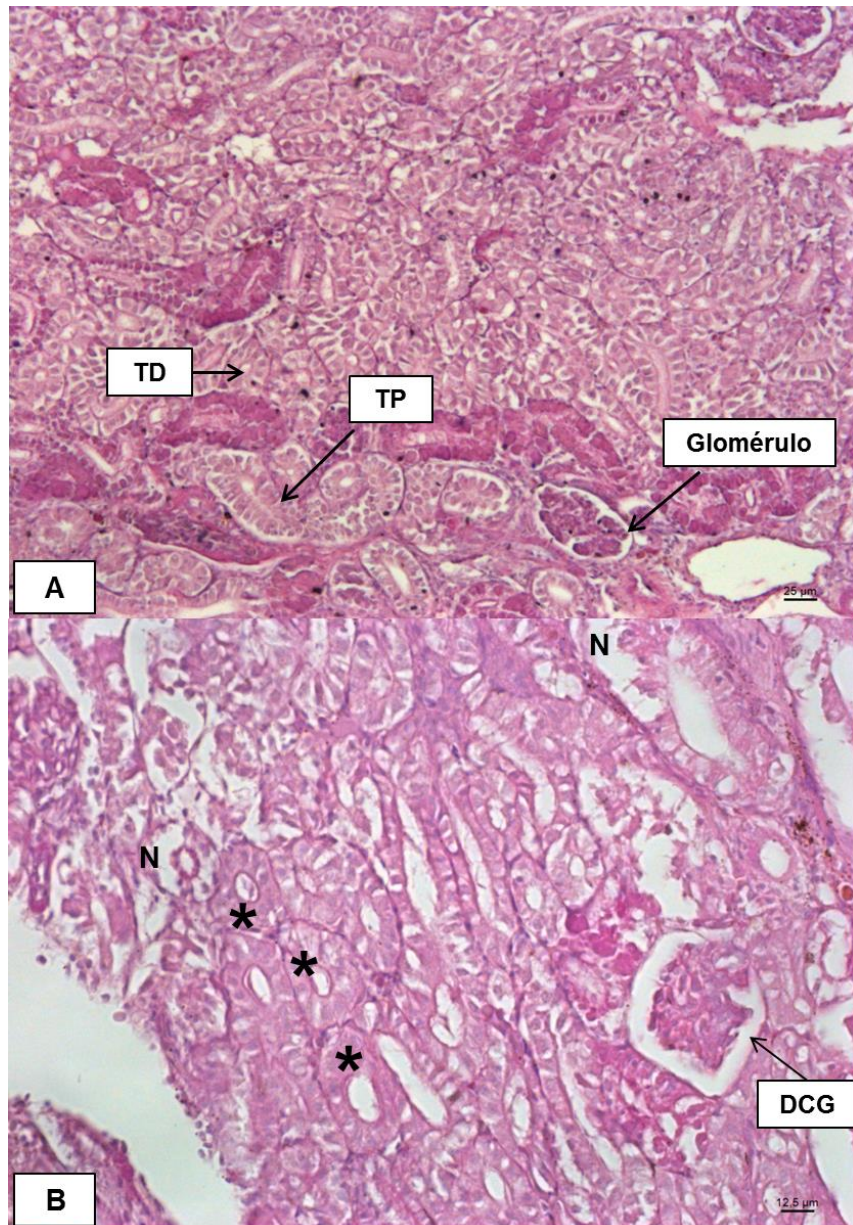


Figura 4. Fotomicrografias de rim de *Oreochromis niloticus*. **(A)** Controle não exposto ao imidacloprid. **(B)** Pontos de necrose nos túbulos proximal e distal (N), ausência de espaço intercelular (asterisco) e desprendimento da cápsula glomerular (DCG) em peixe exposto a $2,810 \text{ mg L}^{-1}$ de imidacloprid. TD: túbulo distal. TP: túbulo proximal. Coloração PAS.

3.1.3.4 Gônadas

As gônadas masculinas dos peixes não expostos ao imidacloprid apresentaram histologia normal, constituídas por lóbulos seminíferos e células reprodutivas sem alterações (Figura 5A)

Nos peixes expostos a 1,405 mg L⁻¹ do inseticida observou-se algumas regiões do tecido gonadal com necrose das espermatogônias (Tabela 9). Nos peixes expostos as demais concentrações de imidacloprid, foi observado desarranjo na parede do lóbulo seminífero e necrose das espermatogônias em algumas regiões (Figura 5B).

A exposição a substâncias tóxicas pode provocar alterações histopatológicas nas gônadas de peixes. Essas substâncias atuam indiretamente sobre o equilíbrio dos hormônios, o que refletirá na diferenciação, maturação, morfologia e fisiologia gonadal (Adams, 1990), podendo, entretanto interferir diretamente nas divisões do tecido germinativo (Badre e Kumar, 1987).

O desarranjo no lóbulo seminífero também foi observado em *Oreochromis mossambicus* expostos à 0,005 mg L⁻¹ do inseticida dicloro difenil tricloroetano (DDT) por 40 dias (Mlambo et al., 2009) e em *Cichlasoma dimerus* expostos a 0,004 mg L⁻¹ de endosulfan por 96 horas (Cuña et al., 2011).

Tabela 9. Alterações histológicas em gônadas masculinas de tilápias, *O. niloticus*, após sete dias de exposição a concentrações subletais de imidacloprid.

Alterações	Concentrações (mg L ⁻¹)				
	Controle	1,405	2,810	14,050	28,100
Necrose das espermatogônias	--	X	X	X	X
Desarranjo da parede do lóbulo seminífero	--	--	X	X	X

Controle: peixes não expostos ao inseticida. X: -presença da alteração. --: ausência de alteração

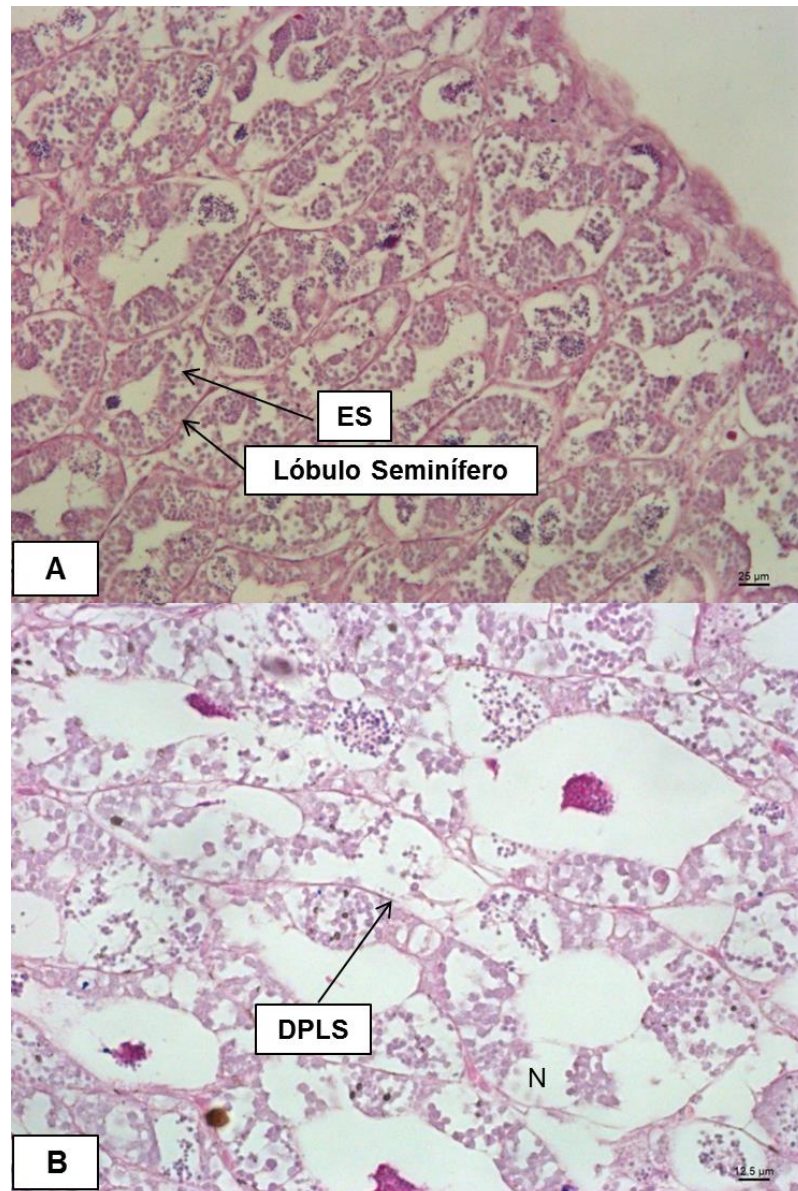


Figura 5. Fotomicrografias de gônada masculina de *Oreochromis niloticus*. **(A)** Controle não exposto ao imidacloprid. **(B)** Pontos de necrose nas espermatogônias (N) e desarranjo da parede do túbulo seminífero (DPLS) em peixe exposto a 14,050 mg L⁻¹ de imidacloprid. ES: espermatogônias. Coloração PAS.

3.2 Carbofuran

3.2.1 Ensaio de toxicidade crônica

A temperatura da água, pH e concentração de oxigênio dissolvido (OD) durante os sete dias do ensaio manteve-se entre os valores preconizados pela ABNT NBR 15499:2007 para início dos ensaios.

Durante o período do ensaio, a condutividade elétrica da variou de 190 a 265 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ no controle enquanto que em 0,0880 mg L^{-1} variou de 197 a 308,1 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Figura 6). O aumento da condutividade elétrica foi proporcional ao aumento da concentração de carbofuran, isso indica que o inseticida pode estar proporcionando um aumento no número de íons dissolvidos na água ou devido ao processo de intoxicação os animais estejam liberando mais excretas.

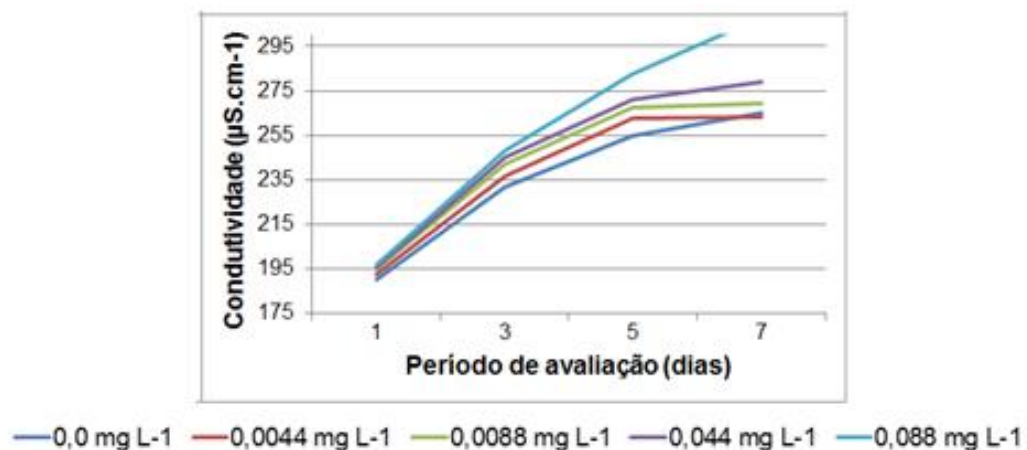


Figura 6. Condutividade elétrica avaliada durante o período de exposição no ensaio de toxicidade crônica do carbofuran para *O. niloticus*.

Após a aplicação da maior concentração do carbofuran, ocorreu mudança na coloração dos peixes (escurecimento) que se manteve até o final do ensaio. As mudanças na coloração externa dos peixes podem indicar situações de estresse (Vaz et al., 2007), no caso a exposição ao inseticida.

A concentração de 0,088 mg L^{-1} do carbofuran causou letargia em 33,33% dos peixes a partir das 48 horas de exposição até o sétimo dia.

3.2.2 Parâmetros hematológicos

O percentual de hematócrito e a taxa de hemoglobina não foram alterados significativamente nas tilápias expostas durante os sete dias de exposição às concentrações subletais do carbofuran, em relação às tilápias não expostas ao inseticida (Tabela 10). Esses resultados diferem dos encontrados em catfish (*S. glanis*) que após exposição aguda ao diazinon apresentaram redução significativa no percentual de hematócrito e na taxa de hemoglobina (Köprücü et al., 2006).

Tabela 10. Valores médios e erro padrão das variáveis hematológicas de tilápias, *O. niloticus*, expostas a concentrações subletais do inseticida carbofuran durante sete dias.

Concentrações (mg L ⁻¹)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g dL ⁻¹)	Eritrócitos (10 ⁶ células mm ⁻³)
Controle	25,66 ± 0,97	9,22 ± 0,63	1,50 ± 0,05 A
0,0044	27,50 ± 0,81	9,39 ± 0,37	1,56 ± 0,06 A
0,0088	25,50 ± 0,84	9,43 ± 0,42	1,43 ± 0,03 AB
0,0440	26,16 ± 1,24	8,82 ± 0,43	1,37 ± 0,06 AB
0,0880	26,72 ± 0,75	9,45 ± 0,31	1,28 ± 0,03 B
F	0,75 ^{ns}	0,34 ^{ns}	4,13 ^{**}
CV (%)	10,77	14,62	11,25
DMS	3,81	1,82	0,21

^{ns}: Não significativo. ^{**}: Significativo a 0,01%

A,B: letras distintas na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo teste Tukey (p<0,05). Controle: peixes não expostos ao inseticida. Eritrócitos: RBC (*red blood cells*). CV: coeficiente de variação. DMS: diferença mínima significativa.

Os peixes expostos a maior concentração de carbofuran (0,0880 mg L⁻¹) tiveram uma redução significativa no número de eritrócitos em relação aos peixes não expostos ao carbamato (Tabela 10). Esse tipo de alteração é causado por intoxicações e pode comprometer o transporte de oxigênio nos tecidos do animal (Vosylienė, 1999). A redução do número de eritrócitos em peixes expostos a xenobióticos pode causar a inibição da produção dessas células ou aumento da sua destruição (Tavares-Dias et al., 2002).

O peixe da espécie *Labeo rohita* exposto durante 28 dias a 0,3 mg L⁻¹ de carbofuran também apresentou redução significativa no número de eritrócitos (Adhikari et al., 2004). A mesma alteração no número de eritrócitos ocorreu no peixe *Clarias gariepinus* exposto durante 35 dias a concentração de 0,16 mg L⁻¹ do inseticida (Harabawy e Ibrahim, 2014). No entanto, no presente estudo indica observa-se que menores concentrações de carbofuran (0,0880 mg L⁻¹) por um menor período de exposição (sete dias) são suficientes para reduzir o número de eritrócitos em peixes.

Os índices hematimétricos (VCM e CHCM) dos peixes expostos às concentrações de carbofuran não foram alterados significativamente em relação aos peixes não expostos (Tabela 11).

Tabela 11. Valores médios e erro padrão dos índices hematimétricos de tilápias, *O. niloticus*, expostas a concentrações subletais do inseticida carbofuran durante sete dias.

Concentrações (mg L ⁻¹)	Volume corpuscular médio (fL)	Concentração de hemoglobina corpuscular média (g dL⁻¹)
Controle	171,80 ± 5,81	35,62 ± 1,24
0,0044	177,53 ± 6,09	34,13 ± 0,82
0,0088	178,74 ± 7,54	36,96 ± 0,88
0,044	209,72 ± 6,80	34,18 ± 2,02
0,088	195,17 ± 4,95	35,42 ± 0,94
F	2,40 ^{ns}	0,85 ^{ns}
CV (%)	16,17	10,78
DMS	40,63	5,11

^{ns}: Não significativo.

Controle: peixes não expostos ao inseticida. CV: coeficiente de variação. DMS: diferença mínima significativa.

Nos peixes expostos a 0,0880 mg L⁻¹ ocorreu um aumento significativo do número de trombócitos em relação ao grupo controle não exposto ao inseticida (Tabela 12).

Tabela 12. Valores médios e erro padrão do trombograma e do teor de proteínas plasmáticas de tilápias, *O. niloticus*, expostas a concentrações subletais do inseticida carbofuran durante 7 dias.

Concentrações (mg L ⁻¹)	Trombócitos (células μL ⁻¹)	Proteínas plasmáticas totais (g dL ⁻¹)
Controle	26715,21 ± 1940,90 B	3,13 ± 0,19
0,0044	31524,92 ± 2102,46 B	2,80 ± 0,17
0,0088	34788,43 ± 2515,06 AB	3,01 ± 0,10
0,0440	38588,03 ± 4520,80 AB	2,98 ± 0,21
0,0880	44539,13 ± 3278,32 A	2,79 ± 0,18
F	5,04**	0,66 ^{ns}
CV (%)	25,74	18,37
DMS	12211,54	0,72

^{ns}: Não significativo. **: Significativo a 0,01%

A,B: letras distintas na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo teste Tukey (p<0,05). Controle: peixes não expostos ao inseticida. CV: coeficiente de variação. DMS: diferença mínima significativa.

A exposição de *O. niloticus* às concentrações subletais testadas de carbofuran não alteraram significativamente o teor de proteínas plasmáticas totais em relação aos peixes não expostos ao inseticida (Tabela 8). No peixe *C. gariepinus* exposto durante 35 dias à concentração de 0,16 mg L⁻¹ de carbofuran foi observado redução significativa no teor de proteínas plasmáticas (Harabawy e Ibrahim, 2014).

Nas tilápias expostas a 0,0880 mg L⁻¹ ocorreu aumento significativo no número de leucócitos totais e monócitos em relação ao grupo controle. Nas tilápias expostas a maior concentração de carbofuran ocorreu aumento significativo no número de linfócitos em relação ao grupo controle. O número de neutrófilos reduziu significativamente nos peixes expostos à maior concentração de carbofuran em relação aos peixes não expostos ao inseticida. (Tabela 13).

Tabela 13. Valores médios e erro padrão do leucograma de tilápias, *O. niloticus*, expostas a concentrações subletais do inseticida carbofuran durante sete dias.

Concentrações (mg L ⁻¹)	Células (células µL ⁻¹)			
	Leucócitos	Monócitos	Neutrófilos	Linfócitos
Controle	32298,32 B (±2279,69)	2827,05 B (±236,08)	5466,00 AB (±312,64)	23034,34 B (±1707,71)
0,0044	37540,06 AB (±3151,15)	3496,90 B (±353,80)	6102,11 A (±547,13)	27077,34 B (±2166,45)
0,0088	37815,14 AB (±2770,27)	3400,03 B ±250,58	5660,42 AB (±426,32)	27856,07 AB ±2086,87
0,0440	40729,61 AB (±3846,13)	3687,28 B (±341,14)	4328,01 BC (±346,25)	31457,42 AB (±3099,17)
0,0880	47450,49 A (±3240,70)	5271,12 A (±483,28)	3998,53 C (±375,91)	36711,73 A (±2414,96)
F	3,19*	0,06***	4,85**	4,83**
CV (%)	23,75	20,66	18,05	21,02
DMS	12527,08	1391,82	1655,64	9455,70

*: Significativo 0,05%. **: Significativo a 0,01%. ***: Significativo a 0,001%.

A,B,C: letras distintas na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Controle: peixes não expostos ao inseticida. CV: coeficiente de variação. DMS: diferença mínima significativa.

O aumento no número de leucócitos é comumente observado como reação durante os primeiros dias de exposição ao estresse quando os peixes tentam restaurar a homeostasia. No entanto, se o fator estressante persiste os decréscimos são observados e demonstram a debilidade do sistema imune do animal (Vosyliené, 1999).

A redução no número de neutrófilos e aumento de linfócitos também ocorreu em pacus (*P. mesopotamicus*) expostos durante 96 horas a concentração

de 0,0011 mg L⁻¹ de endosulfan (Bacchetta et al., 2014). Em pacus após 1 dia de exposição a 0,5 mg L⁻¹ de sulfato de cobre também foi observado redução de neutrófilos (Tavares-Dias et al., 2002). O inseticida carbofuran na concentração de 0,16 mg L⁻¹ também provocou monocitose em *C. gariepinus* após 35 dias de exposição (Harabawy e Ibrahim, 2014).

Não foram observadas a presença de eosinófilos e basófilos no sangue dos peixes de todos os tratamentos com carbofuran inclusive no grupo controle. De acordo com Thrall et al. (2007), raramente há relatos de eosinófilos e basófilos em extensões sanguíneas de osteócitos.

3.2.3 Histologia

3.2.3.1 Brânquias

As brânquias de *O. niloticus* do grupo controle apresentaram constituição característica de peixes teleósteos, compostas por lamelas primárias e lamelas secundárias. As lamelas primárias são constituídas por cartilagem que as sustenta e reveste, no seu interior encontram-se um vaso sanguíneo de onde partem as lamelas secundárias. As lamelas secundárias são formadas por células mucosas e células pilar. Entre as lamelas secundárias encontra-se o espaço interlamelar constituído por células mucosas, células de revestimento e células cloreto (Figura 7A). Estas características foram similares às observadas por Henares et al. (2008) em *O. niloticus* e por Carraschi-Oliveira et al. (2014) em *P. mesopotamicus*.

Nas brânquias dos peixes expostos à 0,0044 mg L⁻¹ de carbofuran ocorreu aumento do epitélio interlamelar e desestruturação da lamela secundária (Tabela 14 e Figura 7B e 7C).

Nos peixes expostos as demais concentrações subletais (0,0088; 0,0440 e 0,0880 mg L⁻¹) ocorreu congestão sanguínea nas lamelas secundárias (Figura 7D) e as mesmas alterações observadas nas brânquias dos peixes exposto a concentração de 0,0044 mg L⁻¹ do inseticida exceto desestruturação da lamela secundária.

Tabela 14. Alterações histológicas em brânquias de tilápias, *O. niloticus*, após sete dias de exposição a concentrações subletais de carbofuran

Alterações	Concentrações (mg L ⁻¹)				
	Controle	0,0044	0,0088	0,0440	0,0880
Congestão sanguínea	--	--	X	X	X
Aumento epitélio interlamelar	--	X	X	X	X
Desestruturação da LS	--	X	--	--	--

Controle: peixes não expostos ao inseticida. LS: lamela secundária. X: presença da alteração. --: ausência de alteração

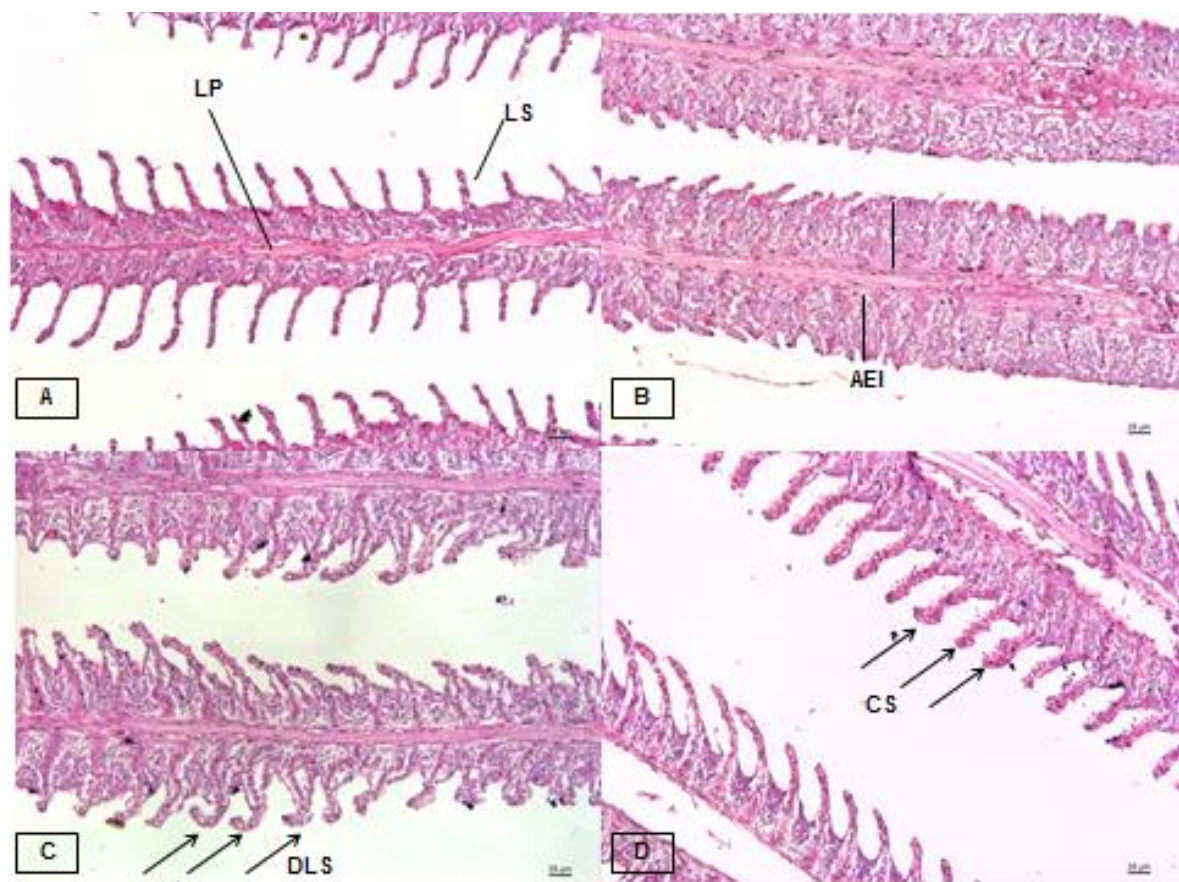


Figura 7. Fotomicrografias de brânquias de *Oreochromis niloticus*. **(A)** Controle não exposto ao carbofuran. **(B)** Aumento do epitélio interlamelar (AEI) em peixe exposto a 0,0880 mg L⁻¹ de carbofuran. **(C)** Desestruturação da lamela secundária (DLS) em peixe exposto a 0,0044 mg L⁻¹ de carbofuran. **(D)** Congestão sanguínea em peixe exposto a 0,0088 mg L⁻¹ de carbofuran. LP: lamela primária e LS: Lamela secundária. Coloração PAS.

As brânquias são importantes indicadores de qualidade de água em estudos de contaminação ambiental. Esses órgãos são considerados a primeira rota de entrada de agrotóxicos nos peixes (Velmurugan et al., 2007). Em peixes, as brânquias são essenciais para respiração e exercem função osmorregulatória (Mcdonald, 1993).

Alterações nas brânquias prejudicam o fluxo sanguíneo, comprometem as trocas gasosas e a homeostase dos peixes (Melletti, 2004). O desconforto respiratório é um dos primeiros sintomas de intoxicação por agrotóxicos (Mcdonald, 1993).

O aumento do epitélio interlamelar e a desorganização da estrutura branquial aumenta a distância de difusão do oxigênio da água para o sangue do peixe. Essa alteração, de forma crônica dificulta ou impossibilita a absorção de oxigênio (Roberts, 2001, Fanta et al., 2003).

A congestão sanguínea raramente ocorre em condições normais, em razão dos diâmetros dos capilares serem pequenos. Em condições severas, em que muitos eritrócitos permanecem estagnados no lúmen dos capilares, pode culminar em aneurismas, onde há rompimento epitelial (Meletti, 2004).

Em juvenis de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostos a 3,75 e 7,5 mg L⁻¹ de methiocarb (inseticida da mesma classe do carbofuran) por 96 horas foi observado edema lamelar, separação do epitélio de lamelas, fusão lamelar e aumento da granularidade citoplasmática (Altinok et al., 2006). O inseticida carbamato carbosulfan causou hiperplasia lamelar, fusão lamelar e necrose epitelial em brânquias de *O. Mykiss* expostos a 0,2 mg L⁻¹ do inseticida durante 14 dias (Capkin et al., 2010).

As alterações descritas nas brânquias de *O. Mykiss* expostas a carbamatos (Altinok et al., 2006, Capkin et al., 2010) diferem das observadas em *O. niloticus* expostos à concentrações subletais de carbofuran. A diferença nas alterações provocadas no tecido branquial pode estar relacionada com a concentração utilizada e o período de exposição. No entanto, no presente estudo observa-se que a exposição de peixes a concentrações muito baixas de carbofuran (0,0044 mg L⁻¹) por sete dias compromete a estrutura do tecido branquial e conseqüentemente as trocas gasosas.

3.2.3.2 Fígado

O fígado de *O. niloticus* do grupo controle apresentou organização cordonal do arranjo dos hepatócitos, formando um conjunto de células em contato direto com os capilares sinusóides. Os hepatócitos apresentaram formato hexagonal levemente arredondado, com núcleo (basófilo) centralizado e citoplasma acidófilo com a presença de grânulos de glicogênio (Figura 8A).

No fígado das tilápias expostas a todas as concentrações de carbofuran ocorreu hipertrofia dos hepatócitos com núcleos deslocados para a periferia das células, estase no interior dos capilares sinusóides e pontos de necrose (Figura 8B e 8C).

A hipertrofia dos hepatócitos pode ser um é indicativo de aumento da atividade enzimática para metabolizar o inseticida. A hipertrofia dos hepatócitos foi uma das alterações observadas em *O. niloticus* expostos a 40 mg L^{-1} de diquat durante 96 horas (Henares et al., 2008).

Grânulos de glicogênio foram observados nos hepatócitos dos peixes expostos a todas as concentrações de carbofuran (Figura 8A e Tabela 15) exceto em $0,0880 \text{ mg L}^{-1}$. A redução ou ausência do estoque de glicogênio é um tipo de alteração provocada em resposta ao estresse ambiental (Teh et al., 1997). A ausência de grânulos de glicogênio pode ser um indicativo que os peixes submetidos ao estresse da exposição ao inseticida estejam utilizando esse material de reserva.

Nos peixes expostos a $0,0044$ e $0,0088 \text{ mg L}^{-1}$ de carbofuran observou-se algumas regiões do fígado com fusão celular (Figura 8D).

Necrose dos hepatócitos também foi uma alteração observada em truta arco-íris (*O. mykiss*) exposta por 4 dias a $1,4 \text{ mg L}^{-1}$ do carbaril (Boran et al., 2010). O inseticida carbosulfan também causou necrose nas células do fígado de *O. mykiss* após 14 dias de exposição a $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ do carbamato (Capkin et al., 2010). A necrose é um estado morfológico irreversível das células, que perdem a sua função e pode afetar o funcionamento do órgão atingido (Bernet et al., 1999).

Tabela 15. Alterações histológicas em fígado de tilápias, *O. niloticus*, após sete dias de exposição a concentrações subletais de carbofuran

Alterações	Concentrações (mg L ⁻¹)				
	Controle	0,0044	0,0088	0,0440	0,0880
Grânulos de glicogênio	X	X	X	X	--
Hipertrofia do hepatócito	--	X	X	X	X
Núcleos deslocados*	--	X	X	X	X
Estase no capilar sinusóide	--	X	X	X	X
Pontos de necrose	--	X	X	X	X
Fusão celular	--	X	X	--	--

Controle: peixes não expostos ao inseticida.*Núcleos deslocados para periferia da célula.

X: presença da alteração. --: ausência de alteração

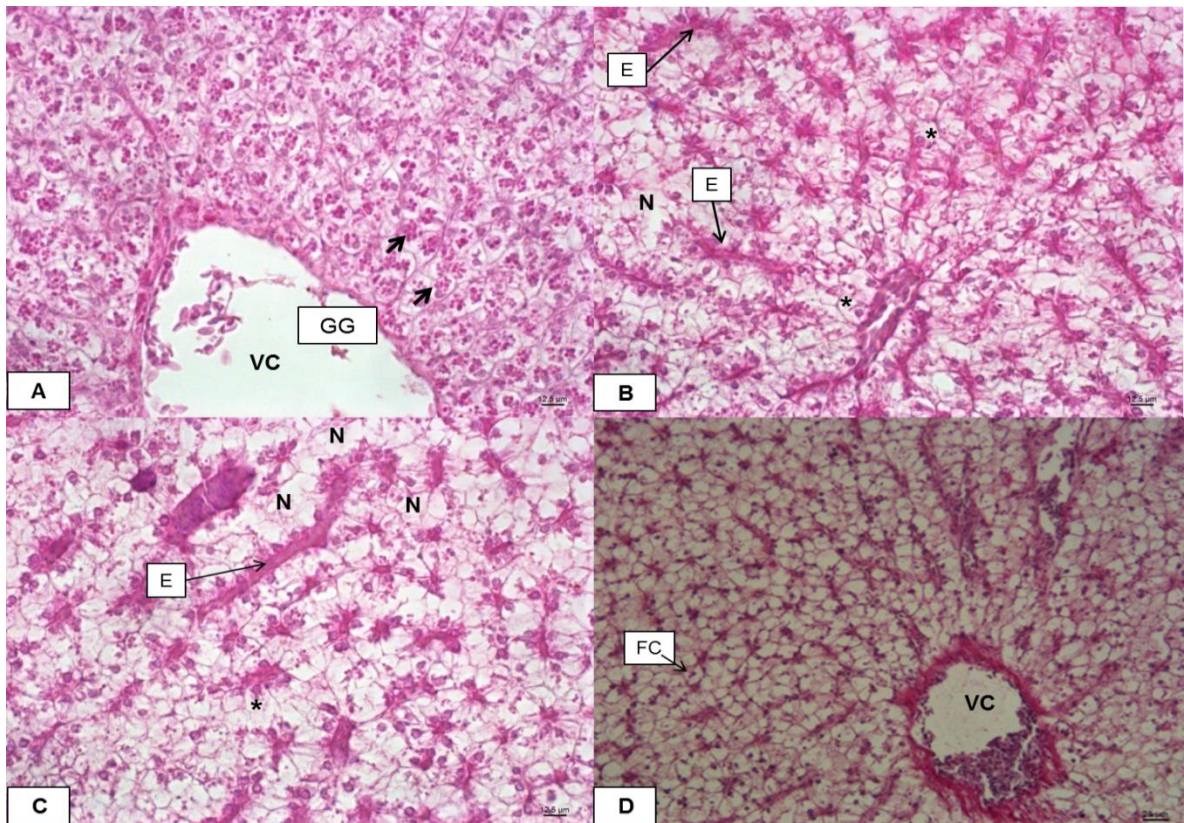


Figura 8. Fotomicrografias de fígado de *Oreochromis niloticus*. **(A)** Controle não exposto ao carbofuran com muitos grânulos de glicogênio (GG) no interior dos hepatócitos. **(B)** e **(C)** Hipertrofia dos hepatócitos, deslocamento do núcleo para periferia da célula (asterisco), estase no capilar sinusóide (E) e ponto de necrose (N) em peixe exposto a 0,0880 mg L⁻¹ de carbofuran. **(D)** Fusão celular em peixe exposto a 0,0044 mg L⁻¹. VC: veia central. Coloração PAS.

3.2.3.3 Rim

O rim de *O. niloticus* é constituído por glomérulos dentro da cápsula glomerular, túbulos proximais e distais envolvidos por tecido hematopoiético. Os peixes do controle apresentaram rim normal característico da espécie sem alterações histológicas (Figura 9A).

Todas as concentrações subletais de carbofuran testadas causam desprendimento da cápsula glomerular, necrose nos túbulos proximais e distais e ausência de espaço intercelular no rim das tilápias (Figura 9B, 9C, 9D e Tabela 16)

O rim é um órgão alvo de substâncias tóxicas que podem prejudicar sua função e causar danos temporários ou permanentes na homeostase dos organismos (Miller, 2002).

Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) exposta a 1,4 mg L⁻¹ de carbaril por 4 dias foi observado degeneração túbulo renal (Boran et al., 2010), enquanto que na mesma espécie, exposta 14 dias a 0,2 mg L⁻¹ de carbosulfan, ocorreu separação do epitélio tubular e necrose das células tubulares (Capkin et al., 2010).

Tabela 16. Alterações histológicas em rim de tilápias, *O. niloticus*, após sete dias de exposição a concentrações subletais de carbofuran.

Alterações	Concentrações (mg L ⁻¹)				
	Controle	0,0044	0,0088	0,0440	0,0880
Desprendimento da CG	--	X	X	X	X
Necrose nos túbulos	--	X	X	X	X
Ausência espaço intercelular	--	X	X	X	X

Controle: peixes não expostos ao inseticida. CG: capsula glomerular. X: presença da alteração. --: ausência de alteração

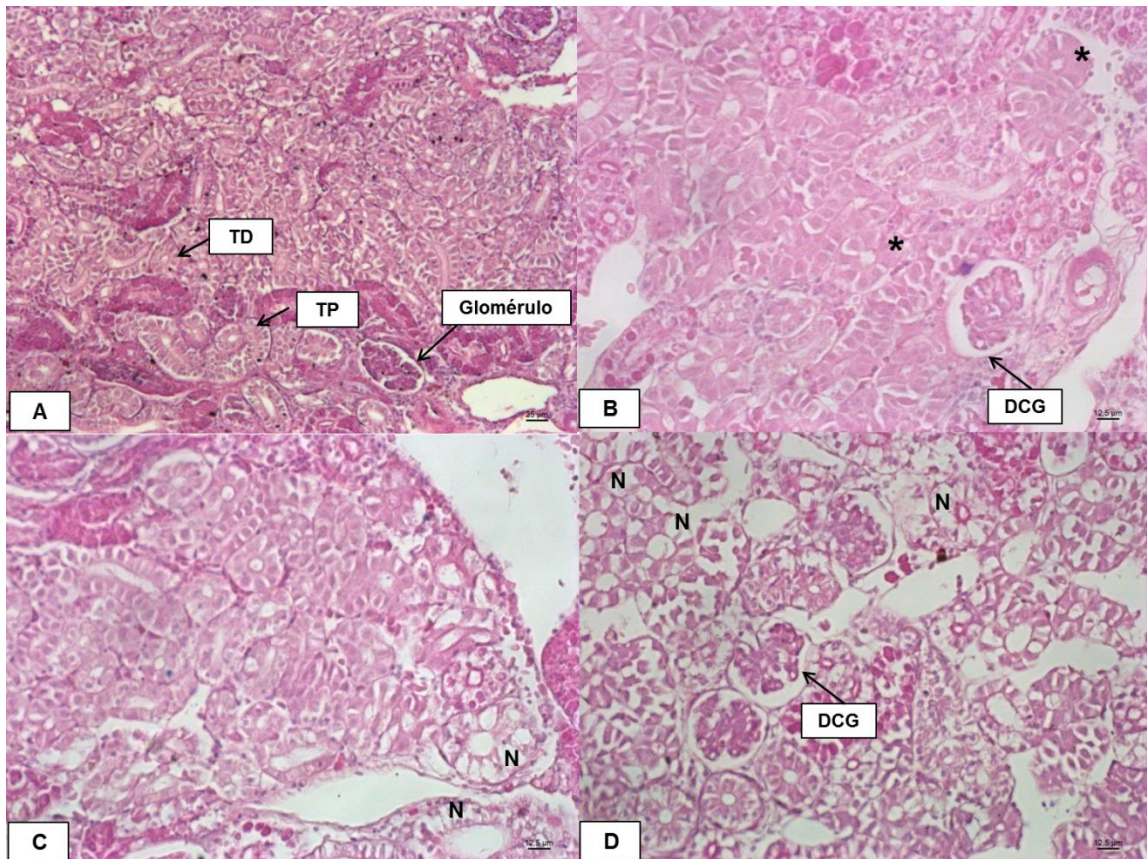


Figura 9. Fotomicrografias de rim de *Oreochromis niloticus*. **(A)** Controle não exposto ao carbofuran. **(B)** Ausência de espaço intercelular (asterisco) e desprendimento da cápsula glomerular (DCG) em peixe exposto a $0,0088 \text{ mg L}^{-1}$ de carbofuran. **(C)** Pontos de necrose (N) nos túbulos distal e proximal em peixe exposto a $0,0440 \text{ mg L}^{-1}$ de carbofuran. **(D)** Desprendimento da cápsula glomerular (DCG) e pontos de necrose (N) nos túbulos $0,0880 \text{ mg L}^{-1}$. TD: túbulo distal. TP: túbulo proximal. Coloração PAS.

3.2.3.4 Gônadas

As gônadas masculinas dos peixes não expostos ao carbofuran apresentaram histologia normal; constituída por lóbulos seminíferos e células reprodutivas sem alterações (Figura 10A).

Nos peixes expostos a todas as concentrações subletais de carbofuran observaram-se algumas regiões do tecido gonadal com necrose das espermatogônias e desarranjo na parede dos lóbulos seminíferos (Figura 10B e Tabela 17) (Foto). Em *Cichlasoma dimerus* expostos a $0,004 \text{ mg L}^{-1}$ de

endossulfan por 96 horas também foi observado desarranjo na parede do lóbulo seminífero (Cuña et al., 2011).

A maioria dos xenobióticos que atingem os ambientes aquáticos podem afetar os testículos de peixes durante a espermatogênese. Esses efeitos resultam em espermatozoides anormais, malformados e com motilidade reduzida (Kime, 1999).

Tabela 17. Alterações histológicas em gônadas masculinas de tilápias, *O. niloticus*, após sete dias de exposição a concentrações subletais de carbofuran.

Alterações	Concentrações (mg L ⁻¹)				
	Controle	0,0044	0,0088	0,0440	0,0880
Necrose das espermatogônias	--	X	X	X	X
Desarranjo da parede do lóbulo seminífero	--	X	X	X	X

Controle: peixes não expostos ao inseticida. X: presença da alteração. --: ausência de alteração

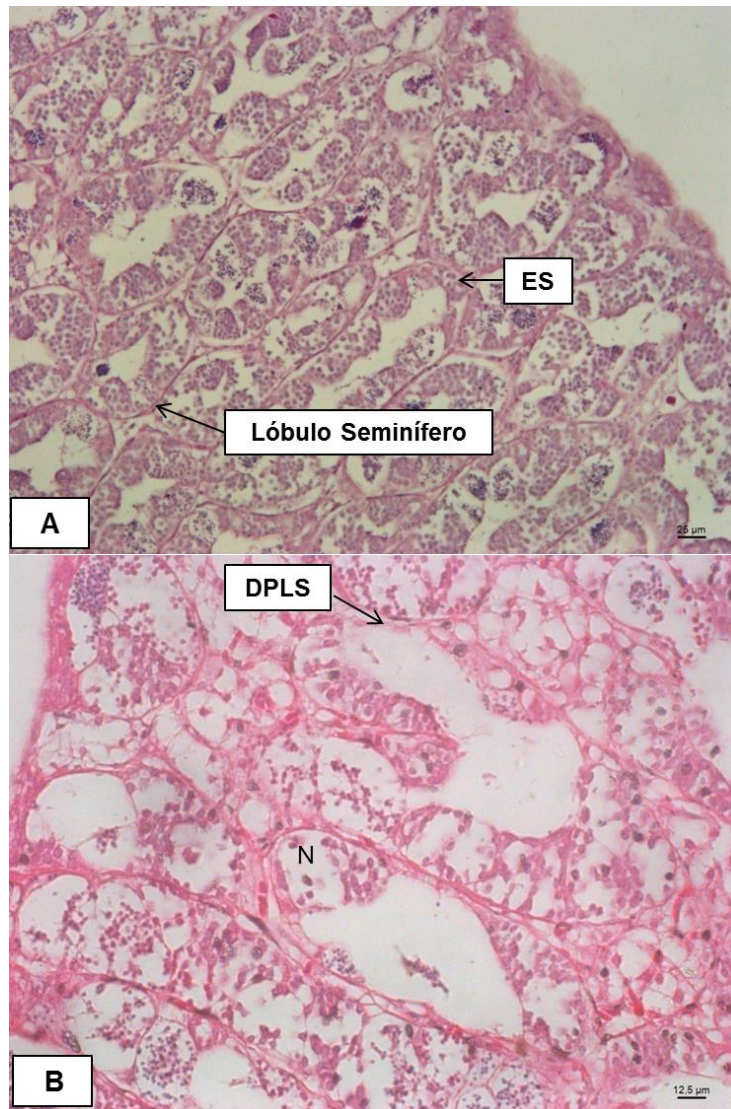


Figura 10. Fotomicrografias de gônada masculina de *Oreochromis niloticus*. **(A)** Controle não exposto ao imidacloprid. **(B)** Pontos de necrose nas espermatogônias (N) e desarranjo da parede do túbulo seminífero em peixe exposto a 0,0440 mg L⁻¹ de carbofuran. ES: espermatogônias. Coloração PAS em **A** e HE em **B**.

4 Conclusões

A exposição de *O. niloticus* por sete dias a concentrações de imidacloprid acima 14,050 mg L⁻¹ reduzem o número de eritrócitos e o teor de proteínas plasmáticas totais. Todas as concentrações subletais de imidacloprid avaliadas nesse estudo provocam alterações no leucograma e na histologia de brânquia, fígado, rim e gônada.

Apesar de esse inseticida ser considerado pouco tóxico para peixes, concentrações subletais de imidacloprid em ambientes aquáticos, mesmo que não cause mortalidade imediata, pode comprometer o funcionamento de diferentes órgãos de *O. niloticus* prejudicando sua saúde e sobrevivência em longo prazo. Dessa forma, mesmo sendo uma molécula prospectada para uso aquícola, o seu uso fica restrito a concentrações abaixo de 1,405 mg L⁻¹ por curto período de tempo (inferior a sete dias), pois nessa concentração é possível a ocorrência de alterações histológicas irreversíveis como necrose em rim e gônadas dos peixes..

A contaminação de ambientes aquáticos por concentrações subletais de carbofuran acima de 0,0044 mg L⁻¹ por mais de sete dias, apesar de não provocar mortalidade imediata e alteração dos parâmetros hematológicos de *O. niloticus*, pode comprometer o funcionamento do fígado, rim e gônada dos peixes devido a ocorrência de necrose nesses órgãos. Assim, deve-se se tomar cautela na utilização de carbofuran devido a sua toxicidade para peixes.

Mesmo em concentrações subletais, a presença de imidacloprid ou carbofuran em corpos d'água causa aumento da condutividade elétrica da água.

5 Referências

Adams, S. M. **Biological indicators of stress in fish**. American Fisheries Society Symposium 8, 190 p. 1990.

Adhikari, S.; Sarkar, B.; Chatterjee, S.; Mahapatra, C. T.; Ayyappan, S. Effects of cipermetrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.58, p. 220-226, 2004.

Alazemi, B. M.; Lewis, J. W.; Andrews, E. B. Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study. **Environmental Technology**, v.17, n.3, p.225–238, 1996.

Altinok, I.; Capkin, E.; Karaham, S.; Boran, M. Effects of water quality and fish size on toxicity of methiocarb, a carbamate pesticide, to rainbow trout. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.22, p. 20-26, 2006.

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR 15499. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com peixes**. Primeira edição, 21 p. 2007.

Bacchetta, C.; Rossi, A.; Ale, A.; Campana, M. Combined toxicological effects of pesticides: a fish multi-biomarker approach. **Ecological Indicators**, v.36, p. 532-538, 2014.

Behmer, A. O.; Tolosa, E. M. C.; Freitas-Neto, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart, 1976. 239p.

Bernet, D.; Schmidt, H.; Meier, W. Burkhardt-Holm, P., Wahli, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v.22, p.25–34, 1999.

Boran, H.; Altinok, I.; Capkin, E. Histopathological changes induced by maneb and carbaril on some tissues of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Tissue and Cell**, v.42, p. 158-164, 2010.

Brethead, S.; Toutant, J. E.; Saglio, E. Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, n.2, p.117-124, 2000.

Campos-Garcia, J.; Martinez, D. S. T.; Alvez, O. L.; Leonardo, A. F. G.; Barbieri, E. Ecotoxicological effects of carbofuran and oxidized multiwalled carbon nanotubes on the freshwater fish Nile tilapia: nanotubes enhance pesticide ecotoxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.111, p.131-137, 2015.

Capkin, E.; Terzl, E.; Boran, H.; Yandi, I.; Altinok, I. Effects of some pesticides on the vital organs of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Tissue and Cell**, v.42, p. 376-382, 2010.

Carraschi-Oliveira, S. P. **Ecotoxicidade, segurança clínica e eficácia de fármacos em jovens de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2014. 101f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, 2014.

Cengiz, E. I.; Unlu, E. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: a microscopic study. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, p. 246-253, 2006.

Cuñá, R. H.; Vázquez, G. R.; Piol, M. N.; Guerrero, N. V.; Maggese, M. C.; LO Nostro, F. L. Assessment of the acute toxicity of the organochlorine pesticide endosulfan in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p.1065-1073, 2011.

Dutta, H. M.; Adhikari, N. K.; Singh, P. K.; Munshi, J. S. Histopathological changes induced by malathion in the liver of a freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*

(Bloch). **Bulletin of Environmental and Contamination and Toxicology**, v.51, p.895-900, 1993.

Dutta, H. M. A composite approach for evaluation of the effects of pesticides on fish. In: Munshi, J.S.D., Dutta, H. M. **Fish Morphology. Horizon of New Research**, Lebanon. New Hampshire Science Publishers, Oxford IBH, p. 249–269. 1996.

Fanta, E.; Rios, F. S. Romão, S.; Vianna, A. C. C.; Freiburger, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.54, p.119-130, 2003.

Goldenfarb, P. B.; Bowyer, F. P.; Hall, E.; Brosious, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. **American Journal of Clinical Pathology**, v.56, n.1, p.35-39, 1971.

Guimaraes, A. T. B.; Silva De Assis, H. C.; Boeger, W. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.68. p.57-62, 2007.

Gunkel, V. G. Bioaccumulation of a herbicide (Atrazine, s-triazine) in the whitefish (*Coregonus fera* J.): uptake and distribution of the residue in fish. **Archives of Hydrobiology**, v,59, p.252-287, 1981.

Harabawy, A. S. A.; Ibrahim, A. T. A. Sublethal toxicity of carbofuran pesticide on the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822): hematological, biochemical and cytogenetic response. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.103, p. 61-67, 2014.

Henares, M. N. P.; Cruz, C.; Gomes, G. R.; Pitelli, R. A.; Machado, M. R. F. Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do herbicida diquat na brânquia e no fígado da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.30, n.1, p. 77-82, 2008.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v.41, 2013. 108p.

Iqbal, F.; Qureshi, I. Z.; Ali, M., Histopathological changes on the Kidney of common Carp, *Cyprinus carpio* following nitrate exposure. **Journal of Research in Science**, v.15, p.411-418, 2004.

Ikefuti, C. V. **Hematologia e ecotoxicidade do teflubenzuron no controle de *Thichodina* sp. em peixes**. 2012. 76f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, 2012.

Jimenez, B. D.; Stegman, J. **Detoxification enzymes as indicators of environmental stress on fish**. In: Adams, M. S. Biological Indicators of Stress in Fish. American Fisheries Symposium, American Fisheries Society, Bethesda, p. 67–79, 1990.

John, P. J. Alteration of certain blood parameters of freshwater teleost *Mystus vittatus* after chronic exposure to Metasystox and Sevin. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.33, p.15–20, 2007.

Johnson, L. L.; Casillas, E.; Sol, S.; Collier, T.; Stein, J.; Varanasi, U. Contaminant effects on reproductive success in selected benthic fish. **Marine Environmental Research**, v.35, p.165-170, 1993.

Köprücü, S. S.; Köprücü, K., Ural, M. S.; Ispir, U.; Pala, M. Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.86, p. 99-105, 2006.

Kovyrshina, T. B.; Rudneva, I. I. Seasonal dynamics of activity of oxidative modification of proteins and oxidation-inhibiting enzymes in the blood of goby *Neogobius melanostomus* inhabiting the black sea and the sea of azov. **Journal of Ichthyology**, v.52, p. 277–283, 2012.

Kuzmanović, M.; Ginebreda, A.; Petrović, M.; Barceló, D. Risk assessment based prioritization of 200 organic micropollutants in 4 Iberian rivers. **Science of the Total Environment**, v.503/504, p.289-299, 2015.

Matos, M. A.; Matos, P. F. **Laboratório clínico médico veterinário**. 2ª edição, São Paulo: Atheneu, 1995. 320p.

Matushima, E. R.; Mariano, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.33, n.1, p.5-10, 1996.

McDonald, D. G. The effects of H⁺ upon the gill of fresh water fish. **Canadian Journal of Zoology**, v.61, p.691–703, 1983.

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. Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu. 1 ed. Editora Rima, p. 249-280, 2004.

Miller, D. S. Xenobiotic export pumps, endothelin signaling, and tubular nephrotoxicants – a case of molecular hijacking. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v.16, p.121–127, 2002.

Mlambo, S. S.; Van Vuren, J. H. J.; Barnhoorn, I. E. J.; Bornman, M. S. Histopathological changes in the reproductive system (ovaries and testes) of *Oreochromis mossambicus* following exposure to DDT. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.28, p. 133-139, 2009.

Nandan, S. B.; Nimila, P. J. Lindane toxicity: histopathological, behavioural and biochemical changes in *Etroplus maculatus* (Bloch, 1795). **Marine Environmental Research**, v.76, p. 63-70, 2012.

Nussey, G.; Van Vuren, J. H. J.; Du Preez, H. H. Effects of copper on the differential white cell counts of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 111, n. 3, p.381-388, 1995.

Pawert, M.; Muller, E.; Triebkor N, R. Ultrastructural changes in fish gills as biomarker to assess small stream pollution . **Tissue & Cell**, v.30, n.6, p.617-626, 1998.

Qi, S.; Wang, C.; Chen, X.; Qin, Z.; Li, X.; Wang, C. Toxicity assessments with *Daphnia magna* of guadipyr, a new neonicotinóide insecticide and studies of its effect on acetylcholinesterase (AChE), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and chitinase activities. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.98, p. 339-344, 2013.

Rand, G. M.; Petrocelli, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington: Hemisphere, 1985. 665 p.

Ranzani-Paiva, M. J. T. Hematologia como ferramenta para a avaliação da saúde de peixes. In: Barros, M. M.; Pezzato, L. E. SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES, 2, 2007, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Universidade Estadual Paulista, p.47-51, 2007.

Ranzani-Paiva, M. J.; Pádua, S. B.; Tavares-Dias, M.; Egami, M. I. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Maringá: Eduem, 2013. 140p.

Roberts, R.J. **Fish Pathology**. London: W.B. Saunders, 2001. 472 p.

Rosenfeld, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancreômicos e estudo de diversos fatores. **Memórias do Instituto Butantã**, v.20, p. 315-328, 1947.

Santos, E. L.; Winterle, W. M. C.; Ludke, M. C. M. M.; Barbosa, J. M. Digestibilidade de ingredientes alternativos para tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*): revisão. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 3, n.2, p. 135-149, 2008.

Saravanan, M.; Kumar, K. P.; Ramesh, M. Haematological and biochemical responses of freshwater teleost fish *Cyprinus carpio* (actinopterygii, Cypriniformes) during acute and chronic sublethal exposure to lindane. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.100, p. 206-211, 2011.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM (SAS). **User's guide**. Cary: SAS Institute, 2002. 525p.

Shiogiri, N. S.; Paulino, M. G.; Carraschi, S. P.; Baraldi, F. G.; Cruz, C.; Fernandes, M. N. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.34, p. 388-396, 2012.

Siang, H. Y.; Yee, L. M.; Seng, C. T. Acute toxicity of organochlorine insecticide endosulfan and its effect on behavior and some hematological parameters of Asian swamp eel (*Monopterus albus*, Zuiew). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.89, p. 46-53, 2007.

Swenson, M.J. Propriedades fisiológicas e constituintes químicos e celulares do sangue. In: Dukes, H.H.; Swenson, M.J.; Reece, W.O.(Eds.) Dukes fisiologia dos animais domésticos. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.19-43.

Tang, Z.; Huang, Q.; Yang, Y.; Zhu, X.; Haihui, F. Organochlorine pesticides in the lower reaches of Yangtze River: Occurrence, ecological risk and temporal trends. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.87, p. 89-97, 2013.

Tavares-Dias, M.; Morais, F. P. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Villimpress, 2004. 144p.

Tavares-Dias, M.; Ono, E. A.; Pilarski, F.; Moraes, F. R. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. **Journal of Applied Ichthyology**, v.23, p.709-712, 2007.

Tayel, S. I.; Ibrahim, S. A.; Authman, M. M. N.; El-Kashef, M. A. Assessment of Sabal drainage canal water quality and its effect on blood and spleen histology of *Oreochromis niloticus*. **African Journal of Biological Science**, v.3, n.1, p.97-107, 2007.

Teh, S. J.; Adams, S. M.; Hinton, D. E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquatic Toxicology**, v.37, p.51–70, 1997.

Tisler, T.; Jemec, A.; Mozetic, B.; Trebse, P. Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. **Chemosphere**, v. 76, p. 907-914, 2009.

Tomizawa, M.; Casida, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, v.45, p. 247–268, 2005.

Thrall, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 582 p. 2007.

Ural, M. S. Chlorpyrifos-induced changes in oxidant/antioxidant status and haematological parameters of *Cyprinus carpio carpio*: ameliorative effect of lycopene. **Chemosphere**, v.90, p. 2059-2064, 2013.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Interim Reregistration Eligibility Decision – Carbofuran, 2006. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/reregistration/carbofuran/carbofuran_noic.htm> Acesso em: 15 jan. 2015.

Vaz, B. S.; Lopes, P. R. S.; Enke, D. B. S.; Pouey, J. L. F. O. Aspectos sobre bem-estar em peixes cultivados. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, n.4, p. 419-422, 2007.

Veiga, M. M.; Silva, D. M.; Veiga, L. B. E; Faria, M. V. C. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.22, n.11, p.2391-2399, 2006.

Velmurugan, B.; Selvanayagam, M.; Cengiz, E. I.; Unlu, E. Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 24, p. 286-291, 2007.

Vosylienié, M.Z. The effects of heavy metals on haematological indices of fish (Survey). **Acta Zoologica Lituanica**, v. 9, p.76-82, 1999.

Zimmermann, S.; Hasper, T.O.B. Piscicultura no Brasil: processo de intensificação da tilapicultura. In: 41º REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, 2004.

Wintrobe, M. M. Variations in the size and hemoglobina content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**, v.51, p.32-49, 1934.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os ensaios de toxicidade aguda, o imidacloprid é considerado um inseticida de baixo risco de intoxicação ambiental para organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos. Isto por que as doses recomendadas de aplicação na agricultura são baixas e a concentração necessária para causar mortalidade em curto período de tempo de organismos aquáticos é elevada.

O carbofuran, diferentemente do imidacloprid, é um inseticida que pode apresentar alto risco de intoxicação ambiental para *Daphnia magna* e para *Oreochromis niloticus*. Esse inseticida é recomendado em altas doses de aplicação em campo e em baixas concentrações na água causa mortalidade desses organismos em curto período de tempo (48 horas). No entanto, é necessária e indispensável uma avaliação mais completa na qual sejam considerados os dados de toxicidade aguda e crônica de produtos tóxicos. Os resultados de toxicidade aguda avaliados isoladamente são muito limitados, pois não são avaliados os efeitos subletais em organismos expostos durante um maior período de tempo e possíveis prejuízos em longo prazo. Assim, nesse estudo foram considerados os ensaios com os dois tipos de exposições para melhor avaliação do risco e da toxicidade dos inseticidas.

No caso do imidacloprid, que é uma molécula prospectada para uso aquícola, para futuros ensaios de eficácia e sua possível utilização no controle de parasitas, devem ser realizados testes de eficácia com exposição por curto período de tempo dos peixes a concentrações abaixo de 14,050 mg L⁻¹ para evitar alterações irreversíveis nos órgãos dos peixes, como a necrose.

Considerando-se os resultados de imidacloprid para os parâmetros hematológicos e a histologia de *O. niloticus*, observa-se que os dados se completam e evidenciam que as alterações hematológicas estão relacionadas às alterações histológicas.

Nos peixes expostos a concentrações a partir de 14,050 mg L⁻¹ de imidacloprid ocorreu diminuição no número de eritrócitos e no teor de proteínas plasmáticas. Esse efeito nos eritrócitos e nas proteínas plasmáticas em conjunto evidencia alteração no equilíbrio líquido-eletrolítico, e está associada à

hepatotoxicidade do imidacloprid. As proteínas plasmáticas como albumina, globulina e fibrinogênio são produzidas no fígado, e a partir do momento que esse órgão é prejudicado a produção das mesmas pode ser comprometida. Por meio das avaliações histológicas, observa-se alterações no fígado que podem comprometer a produção das proteínas.

A presença de carbofuran em ambientes aquáticos em concentrações a partir de 0,0880 mg L⁻¹ por sete dias altera os parâmetros hematológicos em *O. niloticus*. No entanto, concentrações mais baixas (a partir de 0,0044 mg L⁻¹) e no mesmo período de exposição alteram a histologia de brânquia, fígado, rim e gônadas dos peixes. Assim, tais alterações histológicas são biomarcadores de contaminação ambiental por carbofuran mais sensíveis do que os parâmetros hematológicos. Portanto, recomenda-se maior cuidado na utilização de carbofuran na agricultura devido ao risco que esse inseticida representa para peixes.

Em uma avaliação mais ampla, considerando-se as variáveis de qualidade de água nos ensaios agudos e crônicos, constatou-se que a concentração de oxigênio dissolvido diminuiu e a condutividade elétrica aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração dos inseticidas nos ensaios agudos. No entanto, nos ensaios crônicos onde se utilizou aeração artificial apenas a condutividade elétrica teve alteração similar ao observado no ensaio agudo. Isso indica que a presença de concentrações mesmo que subletais dos inseticidas em ambientes aquáticos altera a condutividade elétrica. No caso do oxigênio, a diminuição ocorreu devido ao consumo pelos peixes, uma vez que os ensaios de exposição foram estáticos.

REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). BRASIL. Monografias autorizadas. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia?cat=Monografias+de+Agrotóxicos&cat1=com.ibm.>>. Acesso em: 21 jan. 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 12713. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp*** (Crustacea, Cladocera). Terceira Edição, 23 p. 2009.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2003, 340p.

AZEVEDO-PEREIRA, H. M. V. S.; LEMOS, M. F. L.; SOARES, A. M. V. M. Effects of imidacloprid exposure on *Chironomus riparius* meigen larvae: linking acetylcholinesterase. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1210-1215, 2011.

BACEY, J. *Environmental Fate of Imidacloprid*. Department of Pesticide Regulation. Disponível em: <<http://www.cdpr.ca.gov/docs/emppm/pubs/fatememo/imid.pdf>>. Acesso em: 05 Ago. 2014.

BRETAUD, S.; TOUTANT, J. E.; SAGLIO, E. Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, n.2, p.117-124, 2000.

BORAN, H.; ALTINOK, I.; CAPKIN, E. Histopathological changes induced by maneb and carbaril on some tissues of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Tissue and Cell**, v.42, p. 158-164, 2010.

CAPKIN, E.; TERZI, E.; BORAN, H.; YANDI, I.; ALTINOK, I. Effects of some pesticides on the vital organs of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Tissue and Cell**, v.42, p. 376-382, 2010.

CARRASCHI-OLIVEIRA, S. P. **Ecotoxicidade, segurança clínica e eficácia de fármacos em jovens de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2014. 101f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, 2014.

CARTER, A. D. Herbicide movement in soils: principles, pathways and processes. **Weed Research**, v. 40; p. 113-122, 2000.

CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide research: past, present or future? **Annual Review Entomology**, v. 43, p. 1-16, 1998.

CEREJEIRA, M. J.; VIANA, P.; BATISTA, S.; PEREIRA, T.; SILVA, E.; VALÉRIO, M. J.; SILVA, A.; FERREIRA, M.; SILVA-FERANDES, A. M. Pesticides in

Portuguese surface and ground waters. **Water Research**, v.37, n.5, p. 1055-1063, 2003.

COOPER, R. L.; GOLDMAN, J. M.; STOKER, T. E.. Neuroendocrine and reproductive effects of contemporary-use pesticides. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, n. 1/2, p. 26-36, 1999.

CUÑA, R. H.; VÁZQUEZ, G. R.; PIOL, M. N.; GUERRERO, N. V.; MAGGESE, M. C.; LO NOSTRO, F. L. Assessment of the acute toxicity of the organochlorine pesticide endosulfan in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p.1065-1073, 2011.

DUFT, M.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; TILLMANN, M.; MARKERT, B.; OEHLMANN, J. Toxicity of triphenyltin and tributyltin to the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* in a new sediment biotest. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.22, n.1, p.145–152, 2003.

EUROPEAN COMMUNITIES (EC), **Technical guidance document in support of Commission Directive 1488/94 EEC on risk assessment for existing substances**. Part II, environmental risk assessment. Luxembourg: Office for official publication of the European Communities, 2003. 337p.

ESTEVEES, F.A. **Fundamentos de Limnologia**. 2ª ed. Interciência/FINEP. Rio de Janeiro. 1998. 602p

FRANÇA-SALGUEIRO, F. M. **Avaliação da toxicidade de agrotóxicos utilizados na cultura do arroz irrigado para girinos de *Lithobates catesbeianus***. 2013. 101f. Tese (Doutorado em Ciência) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

FERREIRA, W. L. B. Inseticidas de uso domiciliar e controle de vetores de doenças. In: MARICONI, F. A. M. (Ed.) **Insetos e outros invasores de residências**. Piracicaba: FEALQ, v. 6, p.403-452. 1999.

FONSECA, A. L. **A biologia das espécies *Daphnia laevis* e *Ceriodaphnia silvestres* (Crustácea, Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Pisces, Poeciliidae), e o comportamento destes em testes de toxicidade aquática com efluentes industriais**. 1998. 210f. Dissertação (Mestrado em Energia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1998.

FRELLO, C. P. **Avaliação da toxicidade aguda do agrotóxico carbofuran utilizando reativos biológicos: *Poecila reticulata* e *Daphnia magna***. 1998. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1998.

GUILHERME, L. R. G. Fundamentos da análise de risco: conceitos em análise de risco ecológica e para saúde humana. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. v.34, p.44-55, 2005.

GUILOSKI, I. C.; SILVA, E. G.; NISHIKAWA, C. M.; ASSIS, H. C. S. Atividade da colinesterase em cérebro e músculo de *Corydoras paleatus* (Pisces, Teleostei) expostos ao carbaril. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v.8, n.4, p. 461-468, 2010.

HUGGETT, R. J.; KIMERIE, R. A.; MEHRIE JR., P. M.; BERGMAN, H.L. **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v.41, 2013. 108p.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). Relatórios de comercialização de agrotóxicos – Boletim anual de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil. 2014. Disponível em: <<http://ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>> Acesso em: 10 jan. 2015.

JOBLING, S.; SUMPTER, J. P. Detergent components in seware effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 27, p. 361-372, 1993.

JORGENSEN, S. E.; LÖFFLER, H. 1990. **Guidelines of Lake Managment. International lake**. Environment Comittee. Unted Nations Envorounment Programme.v.3, 174p.

KAVITHA, P.; RAO, J. V. Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 87, n.2, p.182-188, 2007.

KNIE, J.L.W.; LOPES, B.W.E. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004. 289p.

KOKTA, C.; ROTHERT, H. A. **Hazard and risk assessment scheme for evaluating effects on earthworms**: the approach in the Federal Republic of Germany. In: GREIG-SMITH, P. W.; BECKER, H.; EDWARDS, P. J.; HEIMBACH, F. (Eds.) *Ecotoxicology of earthworm*, 1992. p.169 -176.

LEE, B. Y.; LEE, W. J.; STREELMANT, J. T.; CARLETON, K. L.; HOWE, A. E.; HULATA, G.; SLETTAN, A.; STERN, J. E.; TERAJ, Y.; KOCHER, T. D. A seconde generation genetic linkage map of tilápia (*Oreochromis spp.*). **Genetics**, v. 170, n.1, p. 237-244, 2005.

LOVSHIN, L. L.; CYRINO, J. E. P. Status of commercial fresh water fish culture in Brazil. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 2., 1998, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: CBNA, 1998. p.1-20.

LITSINGER, J. A.; ESTANO, D.B. Management of the golden apple snail *Pomacea canaliculata* (Lamarck) in rice. **Crop Protection**, v.12, n. 5, p.363-370, 1993.

MAIENFISCH, P.; ANGST, M.; BRANDIL, F.; FISHER, W.; HOFER, D.; KAYSER, H.; KOBEL, W.; RINDLISBACHER, A.; SENN R.; STEINEMANN, A.; WIDMER, H. Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. **Pest Management Science**, v. 57, p. 906-913, 2001a.

MAIENFISCH, P.; HUERLIMANN, H.; RINDLISBACHER, A.; GSELL, L.; DETTWILER, H.; HAETTENSCHWILER, J.; SIEGER, E.; WALTI, M. The Discovery of thiamethoxam: a second-generation neonicotinoid. **Pest Management Science**, v. 57, p.165-176, 2001b.

MANSANO, A. S.; MOREIRA, R. A.; ROCHA, O. Toxicidade aguda do agrotóxico carbofuran ao cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii daday*. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v.9, n.11, p.91-103, 2013.

MARÇON, P. G. Modo de Ação de Inseticidas e Acaricidas. Comitê Brasileiro de Ação a Resistência a Inseticidas. Disponível em: <<http://www.iracbr.org.br/arquivos/mododeacao.doc>>. Acesso em: 10 set. 2013.

MARSHALL, I.; BEGG, S. **Health Investigation Level for Imidacloprid in Soil**. In: Proceedings of the Fifth National Workshop on the Assessment of Site Contamination.p211. Disponível em:<http://www.ephc.gov.au/pdf/cs/workshopdocs/14_Pest_Marshall_HIL_Imidacloprid.pdf>. Acesso em 14 out. 2013.

MARTIN, P.R., ESTEBENET, A.L. Interpopulation variation in life-history traits of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) in southwestern Buenos Aires Province, Argentina. **Malacologia**, v. 44, n.1 p. 153-163, 2002.

MATA-SANDOVAL, T.; KANS, J.; TORRENTS, A. Influence of rhamnolipids and triton X-100 on the desorption of pesticides from soils. **Environmental Science and Technology**, v. 36, p. 4669-4675, 2002.

MATSUDA, K.; BUCKINGHAM, S. D.; KLEIER, D.; RAUH, J. J., GRAUSO, M.; SATTELLE, D. B. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, p.573–580, 2001.

MAXWELL, D. M.; KOPLOVITZ, I.; WOREK, F.; SWEENEY, R. E. A structure-activity analysis of the variation in oxime efficacy against nerve agents. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 231, n. 2, p. 57-164, 2008.

MULLER, D. K.; HAMILTON, P. A.; HELSEL, D. R.; HITT, K. J.; RUDDY, B. C. **Nutrients in groundwater and surface water of the United States**: an analysis of data through 1992. Denver: United States Geological Survey, 1995. (Water Resource Inventory Report, 95- 4031).

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Lemna sp. Growth Inhibition Test**. In: GUIDELINE for testing of chemicals, 2002.

POPMA, T. J.; PHELPS, R. P. Status report to commercial tilápia producers on monose x fingerling productions techniques. In: AQUICULTURA BRASIL, 1., 1998, Recife. **Anais...** Recife: Simbraq, 1998. p.127-145.

Pesticide Properties Data Base (PPDB). Agriculture & Environment Research United (AERU), University of Hertfordshire, 2013. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz.htm>> Acesso em: 05 jan. 2015.

QI, S.; WANG, C.; CHEN, X.; QIN, Z.; LI, X.; WANG, C. Toxicity assessments with *Daphnia magna* of guadipyr, a new neonicotinóide insecticide and studies of its effect on acetylcholinesterase (AChE), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and chitobiase activities. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.98, p. 339-344, 2013.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington: Hemisphere, 665 p, 1985.

REGITANO, J. B. Propriedades físico-químicas dos defensivos e seu destino no ambiente. In: SIMPÓSIO SOBRE A DINÂMICA DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NO SOLO – ASPECTOS PRÁTICOS E AMBIENTAIS, 2002, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, 2002. p. 40-50.

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

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, v.10, n.14, p. 149-158, 2009.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6ª ed. São Paulo: Roca, 1996. 1029p.

SABIK, H.; JEANNOT, R.; RONDEAU, B. Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. **Journal of Chromatography**, v. 885, n. 1-2, p. 217-236, 2000.

SALLES, L. A. Eficiência do inseticida thiamethoxam (Actara) no controle das pragas de solo da batata, *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) e *Heteroderes* spp. (Coleoptera: Elateridae). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 6, n. 2, p. 149-151, 2000.

SANTOS, E. L.; WINTERLE, W. M. C.; LUDKE, M. C. M. M.; BARBOSA, J. M. Digestibilidade de ingredientes alternativos para tilápia-do-nilo (*Oreochromis*

niloticus): revisão. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 3, n.2, p. 135-149, 2008.

SATAR, S. SATAR, S.; SEBE, A.; YESILAGAC, H. Carbofuran poisoning among farm workers. **Mount Sinai Journal of medicine**, v.72, n.6, p.389-392, 2005.

SHEPHARD, K. L. Functions for fish mucus. **Review in fish biology and fisheries**, v. 4, p. 401-429, 1994.

SHIOGIRI, N. S.; PAULINO, M. G.; CARRASCHI, S. P.; BARALDI, F. G.; CRUZ, C.; FERNANDES, M. N. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.34, p. 388-396, 2012.

SILVA FILHO, C. F. **Determinação de resíduos dos pesticidas pirimetanil, pirimicarbe e buprofezina em águas ambientais por SPME e GC-MS**. 2009. 101f. Dissertação (Mestrado em Química) – Núcleo de pós-graduação em Química, Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, 2009.

SIMONE, L.R.L. 2006. **Land and Freshwater Molluscs of Brazil**. FAPESP. São Paulo, 390p.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA (SINDAG). 2012. Disponível em: < <http://www.sindag.com.br/>> Acesso: 20 ago. 2012.

SOLOMON, K. R. **Avaliação de riscos ecotoxicológicos dos produtos fitossanitários**. Relatório técnico. Centro de Toxicologia. Universidade de Guelph, Canadá. 1996. 52p.

SOUZA, J. P.; MEDEIRO, L. S.; WINKALER, E. U.; MACHADO-NETO, J. G. Acute toxicity and environmental risk of diflufenzuron to *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* and *Lemna minor* in the absence and presence of sediment. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.21, p. 1-12. 2011.

SPACIE, A.; HAMELINK, J.L. Bioaccumulation. In: RAND, G. M. & PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**, New York: Hemisphere, 1985. p.495-525.

SPADOTTO, C. A. **Avaliação de riscos ambientais de agrotóxicos em condições brasileiras**. Documentos 58. EMBRAPA:CNPMA, Jaguariúna, 20p., 2006.

SPADOTTO, C. A.; SCORZA JUNIOR, R. P.; DORES, E. F. G. C.; GEBLER, L.; MORAES, D. A. C. **Fundamentos e aplicações da modelagem ambiental de agrotóxicos**. Documento 78. EMBRAPA:CNPMA, Jaguariúna, 46p., 2010.

TAVARES, L. H. S.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. São Carlos: Rima, 2002. 222p.

THOMAZ, S. M. Fatores ecológicos associados à colonização e ao desenvolvimento de macrófitas aquáticas e desafios de manejo. **Planta Daninha**, v. 20, p. 21-33, 2002.

TISLER, T.; JEMEC, A.; MOZETIC, B.; TREBSE, P. Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. **Chemosphere**, v. 76, p. 907-914, 2009.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Selective Toxicity of Neonicotinoids Attributable to Specificity of Insect and Mammalian Nicotinic Receptors. **Annual Review of Entomology**, v.48, p. 339-364, 2003.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, v.45, p. 247–268, 2005.

TOMLIN, C. D. S. **The Pesticide Manual**. 11th. The British Crop Protection Council, UK: Farnham Surrey, 1997, 1250p.

URBAN, D. J; COOK, N. J. Hazard Evaluation Division - **Standard Evaluation Procedure Ecological risk assessment**. Washington. 1986. 96p. (USEPA Publication EPA/540/09-88-035).

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. New Pesticide Fact Sheet (USEPA). PB96-181516.EPA737-F-96-005. U.S.EPA. **Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances**, p1-10, 1996.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Interim Reregistration Eligibility Decision – Carbofuran, 2006. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/reregistration/carbofuran/carbofuran_noic.htm> Acesso em: 15 jan. 2015.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M., SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n.2, p.178-189, 2006.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, n.13, p.7-149, 2003.

WANG, Y.; CHEN, C.; ZHAO, X.; WANG, Q.; QIAN, Y. Assessing joint toxicity of four organophosphate and carbamate insecticides in common carp (*Cyprinus carpio*) using acetylcholinesterase activity as an endpoint. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, article in press, 2015.

ZAGATTO, P.A; BERTOLETTI, **Ecotoxicologia aquática: Princípio e aplicações**. 2^a ed. São Carlos. Rima, 2008. 472p.

ZIMMERMANN, S.; HASPER, T.O.B. Piscicultura no Brasil: processo de intensificação da tilapicultura. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, 2004.