

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

ASPECTOS ECOTÓXICOLÓGICOS DOS INSETICIDAS
DIFLUBENZURON E TEFLUBENZURON PARA O PACU
(*Piaractus mesopotamicus*)

Autor: Elissandra Ulbricht Winkaler

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto

Jaboticabal – SP

2008

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ASPECTOS ECOTÓXICOLÓGICOS DOS INSETICIDAS
DIFLUBENZURON E TEFLUBENZURON PARA O PACU
(*Piaractus mesopotamicus*)**

Elissandra Ulbricht Winkaler
Bióloga

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Aquicultura de Águas Continentais.

Jaboticabal
Julho de 2008

Dedico,

Aos meus pais, Paulo Winkaler Filho e Vera Regina
Ulbricht Winkaler, pelo amor, dedicação, compreensão e
ensinamentos de vida e ao meu irmão Markus Leandro
Ulbricht Winkaler, pelo amor e amizade.

Aos peixes, que há muitos
anos têm sido motivo de
alegrias e tristezas!

Ofereço

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto pela orientação, confiança e oportunidade para realização deste trabalho.

A ex-orientadora e amiga Cláudia B.R. Martinez, agradeço pelo seu empenho, amizade e valiosos ensinamentos.

Ao querido amigo e companheiro Alexandre Augusto Oliveira Santos, pela amizade, ajuda e muuuita paciência!

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido para realização deste projeto (proc. 2005/60396-9).

Ao programa de Pós-graduação do Centro de Aqüicultura da UNESP, em especial as secretárias Veralice Cappato e Fátima Barbieri.

Aos meus queridos amigos de laboratório: Maurício de Oliveira Leite, Letícia S. Nociti, Louise de Souza Medeiros, Jaqueline Pérola de Souza, Wilson G. Manrique, Giorge F. G. de Carvalho, Melina Espanhol, Maurício Botti, Artur F. Barreto, Patrícia Carraschi, Daniele Avilez Duó, Bruno B. Avilez Duo e Ângela A. Machado. Dedico a todo vocês que fizeram parte deste trabalho, nos momentos de alegria e agonia!

A todos os funcionários e técnicos do Departamento de Fitossanidade, NEPEAM e Centro de Aqüicultura da Unesp, em especial ao Valdecir Lima, “Seu” Mauro Marcelino, Márcio Reche “Pereca”.

A todos os professores do Caunesp.

Ao químico Fernando G. Tonin, da Unesp de Botucatu, obrigada pelos grandiosos ensinamentos e “contribuições químicas” a este trabalho.

As queridas Cristiane Meldau e Adriana F. de Barros, pelo apoio, amparo e grande amizade que continuam até hoje!

As amigas de república, Marina A. Robles, Melissa Toledo, Marília G. Costa, Anna Paula Roth “Nanica” e Gabriela Primiano “Parasita” e a todos os momentos inesquecíveis do “Sossego da Vovó”!

Aos amigos do Caunesp: Milena, Charles “Giraya”, Raquelzinha, Leozinho, Balboa, Camilo, Jaime, Laurindo, Michelle, Fabiana Garcia, Fabiana Pilarski, Paty “Golinho”, Felipe “Tumor”, Bruno “Mocorongo”, Twin, Cericato, Paraca, Renato e Dudu, Dani.

Ao quarteto fantástico: Milena, Aline, Ariane e Carol! As melhores companheiras do mundo!

A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!

Não há reconhecimento sem esforço.

Índice

LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1. Administração de agroquímicos na aquicultura com fins terapêuticos.....	5
3.2. Utilização e efeitos de agroquímicos na aquicultura.....	7
3.3. Toxicidade e efeitos subletais da exposição aos agroquímicos.....	9
3.4. Bioconcentração de agroquímicos em organismos aquáticos.....	12
3.5. Importância da análise de resíduos e risco alimentar.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1. Testes ecotoxicológicos.....	16
4.1.1. Teste de ecotoxicidade aguda para <i>Piaractus mesopotamicus</i>	17
4.2. Delineamento experimental.....	18
4.2.1. Experimento 1 – Aplicação dos inseticidas DFB e TFB na água.....	18
4.2.1.1. Mesocosmos experimentais e animais.....	18
4.2.1.2. Aplicação dos inseticidas e coleta das amostras.....	20
4.2.2. Experimento 2 – Administração dos inseticidas DFB e TFB na ração.....	22
4.3. Determinação da atividade hepática das enzimas catalase e glutathione-S-transferase do pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>).....	25
4.4. Análises Cromatográficas.....	26
4.4.1. Padronização e validação do método analítico para o DFB e TFB.....	26
4.4.1.1. Condições cromatográficas e calibração do equipamento.....	26
4.4.1.2. Limites de detecção e quantificação de DFB e TFB.....	27
4.4.1.3. Ensaios de recuperação e extração dos analitos.....	28
4.4.1.3.1. Recuperação e extração de DFB e TFB da matriz água.....	28
4.4.1.3.2. Recuperação e extração de DFB e TFB da matriz sedimento.....	31
4.4.1.3.3. Recuperação e extração de DFB e TFB da matriz peixe.....	34
4.5. Risco Alimentar para o consumo humano de resíduos de DFB e TFB.....	37
4.6. Análise estatística.....	37

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1. Teste ecotoxicológicos para <i>Piaractus mesopotamicus</i>	38
5.2. Atividade das enzimas hepáticas glutathione-S-transferase e catalase.....	40
5.3. Padronização e validação do método analítico para DFB e TFB.....	44
5.3.1. Dissipação e acumulação do DFB e TFB na água.....	49
5.3.2. Dissipação e acumulação do DFB e TFB no sedimento.....	52
5.3.3. Dissipação e acumulação do DFB e TFB no filé do pacu.....	54
5.4. Risco alimentar para consumo humano de DFB e TFB.....	57
6. CONCLUSÕES.....	59
7. REFERÊNCIAS.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios de pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido e temperatura da água dos ensaios de toxicidade aguda do diflubenzuron (DFB) e teflubenzuron (TFB) para o pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>).....	18
Tabela 2. Características químicas e físicas do solo utilizado como sedimento nos mesocosmos experimentais. Os valores correspondem a média (n=3) e desvio padrão.....	19
Tabela 3. Média dos valores diários dos parâmetros físico-químicos da água dos tanques entre 0 e 10 dias após a aplicação dos inseticidas diflubenzuron (DFB) e teflubenzuron (TFB).	21
Tabela 4. Média dos valores diários das variáveis físico-químicas da água dos mesocosmos tratados durante 15 dias com ração acrescida dos inseticidas diflubenzuron (DFB) ou teflubenzuron (TFB).....	25
Tabela 5. Valores de toxicidade aguda do diflubenzuron (DFB) para diferentes espécies de peixes.....	39
Tabela 6. Valores de toxicidade aguda do teflubenzuron (TFB) para diferentes espécies de peixes.....	40
Tabela 7. Valores de recuperação (%) e coeficiente de variação (C.V) dos níveis de fortificação dos inseticidas diflubenzuron e teflubenzuron para as matrizes água, sedimento e peixe.....	48
Tabela 8. Valores de recuperação e coeficiente de variação (C.V.) proporcionados pelos solventes diclorometano, acetato de etila, acetonitrila e metanol utilizados na extração dos inseticidas diflubenzuron (DFB) e teflubenzuron (TFB) na matriz água.....	48
Tabela 9. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método padronizado em CLAE para a determinação dos inseticidas DFB e TFB em diferentes matrizes.....	49
Tabela 10. Valores de ingestão diária estimada (IDE) do consumo de filés de pacu coletados 1, 3, 5, 7 e 10 dias após aplicação de 0,4 mg.L ⁻¹ de DFB ou TFB na água.....	58
Tabela 11. Valores de ingestão diária estimada (IDE) do consumo de filés de pacu submetidos a tratamento com ração acrescida de 2 000 mg.kg ⁻¹ de ração de DFB e 10 mg.kg ⁻¹ de ração de TFB durante 1, 5, 10 e 15 dias.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do inseticida diflubenzuron.....	7
Figura 2. Estrutura molecular do inseticida teflubenzuron.....	8
Figura 3. Reservatórios de 1000 L para aclimação dos animais (A) e reservatório de 250 L localizado em sala climatizada (B).....	16
Figura 4. Mesocosmos experimentais no NEPEAM – Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia, da FCAV/Unesp - Campus de Jaboticabal, São Paulo.....	19
Figura 5. Coleta de músculo de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) submetidos a tratamentos com DFB e TFB aplicados diretamente na água.....	21
Figura 6. Diluição de formulação comercial de diflubenzuron para o preparo da ração medicada.....	23
Figura 7. Moedor de carne utilizado para peletizar a ração acrescida dos inseticidas (A) e peletes secos antes do fracionamento (B).....	23
Figura 8. Coleta (A) e armazenamento (B) de fígado para a determinação da atividade enzimática das enzimas catalase e glutathione-S-transferase de pacus submetidos a tratamento com DFB e TFB.....	24
Figura 9. Cromatogramas dos padrões de 1 mg.L ⁻¹ de DFB e TFB.....	26
Figura 10. Curva analítica obtida para o diflubenzuron.....	27
Figura 11. Curva analítica obtida para o teflubenzuron.....	27
Figura 12. Bateria de testes para extração de DFB e TFB nas amostras de água.....	29
Figura 13. Fluxograma do método de extração do DFB e TFB da matriz água.....	30
Figura 14. Bateria de testes com diferentes solventes (A) para extração do DFB e TFB nas amostras de sedimento. (B) Aparelho de ultrassom. (C) Sistema de ultrafiltração.....	32
Figura 15. Sistema de ultra-filtração utilizado na extração das amostras de sedimento fortificadas com os inseticidas DFB e TFB.....	32
Figura 16. Fluxograma do método de extração do DFB e TFB da matriz sedimento.....	33
Figura 17. Homogeneização dos filés de pacu fortificados com os inseticidas DFB e TFB.....	34
Figura 18. Bateria de extração de DFB e TFB das amostras de filés do pacu.....	35

Figura 20. Atividade da enzima hepática glutationa-S-transferase (GST) de <i>P. mesopotamicus</i> alimentados durante 1, 5, 10 e 15 dias com ração acrescida de diflubenzuron (DFB) e teflubenzuron (TFB). Grupo controle (CTR). Nota: As linhas verticais indicam o erro padrão, n= 7-8. (*) Indicam diferença significativa do grupo controle e as letras indicam variações entre os tratamentos, letras iguais representam valores iguais e letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P<0,05$).....	42
Figura 21. Atividade da enzima hepática catalase (CAT) de <i>Piaractus mesopotamicus</i> alimentados durante 1, 5, 10 e 15 dias com ração acrescida de diflubenzuron (DFB) e teflubenzuron (TFB). Grupo controle (CTR). Nota: As linhas verticais o erro padrão, n= 7-8. (*) Indicam diferença significativa do grupo controle e as letras indicam variações entre os tratamentos, letras iguais representam valores iguais e letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P<0,05$).....	43
Figura 22. Cromatogramas de amostra de água coletada após 24 horas após a aplicação de $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de DFB (A) ou TFB (B) na água.....	45
Figura 23. Cromatogramas de amostra de sedimento coletada 24 horas após aplicação de $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de DFB (A) ou TFB (B) na água.....	46
Figura 24. Cromatogramas de amostras de filé do pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) coletada após 24 horas após a aplicação de $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de TFB e na água.....	31
Figura 25. Média dos valores de resíduos (mg.L^{-1}) de diflubenzuron (DFB) e teflubenzuron (TFB) em amostras de água após duas aplicações de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$. Amostras coletadas após 0, 1, 3, 5, 7 e 10 dias após a última aplicação dos inseticidas na água dos mesocosmos. As barras verticais indicam o erro padrão.....	50
Figura 26. Média dos valores de resíduos ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de diflubenzuron (DFB) e teflubenzuron (TFB) em amostras de sedimento após duas aplicações de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$. Amostras coletadas após 1, 3, 5, 7 e 10 dias após a última aplicação dos inseticidas na água dos mesocosmos. As barras verticais indicam o erro padrão.....	53
Figura 27. Média dos valores de resíduos (mg.kg^{-1}) de diflubenzuron (DFB) e teflubenzuron (TFB) em amostras de filés do pacu após duas aplicações de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$. Amostras coletadas após 1, 3, 5, 7 e 10 dias após a última aplicação dos inseticidas na água dos mesocosmos. As barras verticais indicam o erro padrão.	55
Figura 28. Média dos valores de resíduos (mg.kg^{-1}) de diflubenzuron (DFB) e teflubenzuron (TFB) em amostras de filés do pacu alimentados 2000 mg.kg^{-1} de ração de DFB e 10 mg.kg^{-1} de TFB. Amostras coletadas após 1, 5, 10 e 15 dias de alimentação com a ração medicada.....	57

ASPECTOS ECOTOXICOLÓGICOS DOS INSETICIDAS DIFLUBENZURON E TEFLUBENZURON PARA O PACU (*Piaractus mesopotamicus*)

Resumo

Dentre os agrotóxicos comumente utilizados na piscicultura para controle de ectoparasitos e insetos aquáticos, destacam-se o diflubenzuron (Dimilin®) e o teflubenzuron (Nomolt®), inseticidas com ação reguladora do crescimento. Na aquicultura, o tratamento com inseticidas pode ser realizado com a aplicação direta na água, ou administração na ração dos animais. Apesar de muito utilizados, poucos são os trabalhos sobre ecotoxicologia, comportamento e bioacumulação do diflubenzuron (DFB) e teflubenzuron (TFB) na água e seus efeitos em organismos aquáticos de clima tropical. Os objetivos deste trabalho foram: estimar a toxicidade (CL50;96h) do DFB e TFB para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), calcular o risco alimentar para o consumo humano, determinar resíduos de DFB e TFB na água, sedimento e músculo de pacus, após a exposição aos inseticidas na água ou na ração dos peixes e analisar a atividade hepática das enzimas glutathione-S-transferase (GST) e catalase (CAT) em pacus alimentados com ração acrescida de DFB ou TFB. A CL50;96h do DFB para o pacu foi superior a 1200 mg.L⁻¹ e a do TFB, superior a 1000 mg.L⁻¹. Os resíduos de DFB foram detectáveis até 7 dias após a aplicação (com 18,3% de resíduo) e para o TFB, foram detectáveis até o terceiro dia (8% de resíduo). No sedimento, as maiores concentrações de DFB e TFB foram observadas nas primeiras 24 h e em todos os períodos amostrados foram detectados resíduos dos inseticidas. Nos filés dos pacus foram detectados resíduos dos inseticidas após a alimentação com a ração tratada e após aplicação de DFB e TFB na água. A ingestão diária estimada (IDE) de DFB e TFB encontra-se acima dos valores de ingestão diária aceitável (IDA), mesmo para as amostras com menores valores de resíduos detectados nos filés do pacu. Em relação aos biomarcadores bioquímicos, a atividade da CAT não foi afetada significativamente pela presença dos inseticidas na ração, porém, observou-se redução na atividade enzimática da GST após 5 dias de alimentação com a ração acrescida dos inseticidas. Além da importância da avaliação da toxicidade do DFB e TFB para os peixes, a determinação de resíduos e o risco alimentar, poderá subsidiar a determinação de medidas de segurança sanitária, como período de carência, taxa de contaminação do ambiente aquático com inseticidas e o risco de intoxicação que a população está exposta ao consumir peixes contaminados com agrotóxicos, que são indiscriminadamente utilizados na piscicultura.

Palavras-chave: ecotoxicologia, inseticidas, peixes, xenobióticos.

ECOTOXICOLOGICAL ASPECTS THE INSECTICIDES DIFLUBENZURON AND TEFLUBENZURON TO PACU (*Piaractus mesopotamicus*)

Abstract

Diflubenzuron and teflubenzuron are growth regulator inhibitors insecticides, used to control ectoparasites in fish and aquatic insects. In aquaculture these pesticides can be injected directly in the water or in the fish food. Besides their large utilization, there are few works about the effects of these insecticides on the fish metabolism and biomagnification, especially in tropical aquatic organisms. This study aims to: evaluate the acute toxicities ($LC_{(50-96h)}$) in pacu (*Piaractus mesopotamicus*), measure the risk food for human consumption, determinate residues of DFB and TFB in water, sediment and muscle of pacus after the management of the insect-powders on water or in the fish food and to analyze the hepatic activity of the enzymes catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST) in fishes fed with ration plus DFB or TFB. The $LC_{(50-96h)}$ of DFB and TFB for the pacu was higher than 1.200 mg.L^{-1} and 1.000 mg.L^{-1} , respectively. The residues TFB were detected until the third day (8% of residue) and DFB until seventh day after application in the water (18,3% of residue). In the sediment, the highest concentrations of DFB and TFB had been observed in the first 24 h and in all the samplings there were . In muscle of pacus, residues of the insecticides had been detected after the feeding with the ration treated and after application to DFB and TFB in the water. The daily ingestion estimate (DIE) of DFB and TFB meets above of the values of acceptable daily ingestion (DAI), exactly for the samples with lesser values of residues detected in filés of pacu. For the enzymes the CAT activity was not affected by both pesticides, but the GST activity was reduced five days after the feeding. Besides the importance of the evaluation of the toxicity of DFB and TFB for the fish, the determination of residues and the alimentary risk, it can subsidize the determination of measures of sanitary safety, as care period, rate of contamination of the aquatic atmosphere with insecticides and the intoxication risk that the population is exposed related to the consumption of polluted fish with agrochemicals indiscriminately used in the fish farming.

Key-words: ecotoxicology, insecticides, fish, agrochemical

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura continental tem se desenvolvido intensamente no Brasil, principalmente nas regiões Sul e Sudeste. Em 2004, a produção aquícola brasileira foi representada em 67% (179,7 mil toneladas) e 66% (US\$ 640,00 milhões) da receita gerada pela piscicultura (FAO, 2006). A partir da década de 90, a piscicultura no Brasil aumentou devido ao surgimento de grande número de pescueiros. Esse setor é responsável pela maior parte da demanda do pescado, sustentando cerca de 90% da comercialização dos peixes vivos (BORGHETTI et al., 2003).

O aumento da atividade aquícola tem despertado a atenção da comunidade científica e de órgãos de gestão quanto aos riscos relacionados a esta atividade (BOYD e MASSAUT, 1999). Esses riscos incluem os danos ambientais e à saúde dos consumidores. QUEIROZ et al. (2002) alertam para o fato que o aproveitamento racional e otimizado do potencial aquícola brasileiro ainda é incipiente, causando problemas de ordem técnica e ambiental. Além disso, embora a tecnologia de produção de peixes tenha evoluído muito nestes últimos anos, a sobrevivência destes organismos é baixa. Em sistemas de criação, os parasitos e predadores que atacam os peixes, destacam-se como importantes redutores da produtividade, pois provocam atraso no crescimento dos animais e de altas taxas de mortalidade (RANZANI-PAIVA et al., 1997).

Nas informações divulgadas pela Secretaria de Defesa Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, verifica-se que ainda não existe no país nenhum produto registrado para controle de ectoparasitos de peixes, visto que não existe legislação específica para este registro. Além de não existir estudos suficientemente detalhados sobre os efeitos de agroquímicos em espécies de peixes neotropicais, pouco se conhece sobre o comportamento de produtos químicos com variação dos fatores abióticos e como podem interferir no ecossistema aquático tropical (CAMPOS, 2005).

Para o tratamento de parasitos de peixes, é comum a utilização de formulações de uso agrícola ou veterinário, sem especificações técnicas do fabricante para uso no setor aquícola (MABILIA et al., 2004). A solução mais adequada seria a regulamentação do uso de quimioterápicos com indicações

de dose permitidas e períodos de carência mínimos, estipulados por meio de ensaios pré-clínicos.

Entre os agroquímicos utilizados na aquicultura em geral, destacam-se o diflubenzuron e o teflubenzuron, inseticidas com ação reguladora do crescimento de artrópodes e crustáceos. Esses compostos interferem diretamente na biossíntese de quitina, componente fundamental do exoesqueleto dos artrópodes e crustáceos, que são os principais ectoparasitos de peixes (EISLER, 1992).

Atualmente no Brasil, MORAES e MARTINS (2004) citam que o DFB é o xenobiótico mais eficiente para combater a *Lernae* sp. Esse inseticida também é considerado eficiente no controle de diversos parasitos como os copépodes *Lernaea cyprinacea*, *Lernaea* sp., *Lamproglana* sp., *Ergasilus* sp. e *Lepeophtheirus salmonis* (BRANSON et al., 2000) e os branquiurídeos *Argulus* sp. e *Dolops* sp. (VILLEM et al., 1998).

A persistência do diflubenzuron (DFB) e do teflubenzuron (TFB) em ecossistemas aquáticos tropicais ainda não é bem conhecida, mas sabe-se que a sua adsorção está relacionada com a quantidade de matéria orgânica, pH e a temperatura (FISHER e HALL, 1992).

Além da contaminação do ambiente aquático e dos organismos de cultivo, o manejo incorreto de agroquímicos na água pode causar efeitos subletais nos peixes. O uso de parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos como biomarcadores têm apresentado bons resultados na avaliação dos efeitos dos xenobióticos sobre os peixes (MARTINEZ e SOUZA, 2002). Dentre estes, as avaliações bioquímicas são ferramentas imprescindíveis, pois as primeiras alterações causadas por exposições subletais costumam ocorrer em níveis moleculares e bioquímicos, como por exemplo, na ação das enzimas (ADAMS, 1990).

Devido a intensa utilização de agroquímicos na aquicultura, este trabalho foi desenvolvido com objetivo de determinar a toxicidade aguda dos inseticidas diflubenzuron e teflubenzuron, a bioacumulação, os efeitos subletais no pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e o risco alimentar de sua aplicação em tanques de criação dessa espécie de peixe.

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*), espécie que pertence à família Characidae e subfamília Serrasalminae, destaca-se como importante organismo para se realizar teste de avaliação de toxicidade dos agrotóxicos, pois é uma excelente espécie de cultivo. Este animal é onívoro, alimenta-se de folhas e frutas de árvores. Segundo SILVA (1985), é uma espécie rústica, precoce, com carne saborosa e exibe ótimo crescimento. Por se tratar de uma espécie que aceita o arraçoamento, propicia sucesso na criação em sistemas de cultivos intensivos. O pacu é uma espécie de peixe nativa e como ainda são escassos os dados referentes a ensaios toxicológicos e aos efeitos de agrotóxicos em peixes de regiões tropicais os resultados obtidos neste trabalho poderão ser utilizados para comparações com os dados já conhecidos das regiões temperadas (WINKALER et al., 2007).

SCHALCH et al. (2005) alertam para a falta de legislação brasileira para uso de xenobióticos em peixes e outros organismos aquáticos e MAXIMIANO et al. (2005) concluem que há necessidade da elaboração de uma legislação integrada e intersetorial, envolvendo todos os órgãos relacionados com a liberação e utilização de substâncias veterinárias e agrotóxicos. Com os resultados deste trabalho também será possível apresentar medidas de segurança sanitária, como taxas de bioacumulação de xenobióticos em peixes de cultivo de grande importância econômica para o país.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Estimar a concentração letal ($CL_{(50-96h)}$) do diflubenzuron (DFB) e teflubenzuron (TFB) para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*);
2. Validar um método de extração dos resíduos de DFB e TFB em amostras de água, sedimento e peixe;
3. Avaliar a presença e a persistência do DFB e TFB, na água, sedimento e em filés do pacu, após aplicação dos inseticidas na água;
4. Avaliar resíduos na água e em partes comestíveis (filés) do pacu alimentados com ração acrescida dos inseticidas DFB e TFB;
5. Avaliar a bioacumulação de DFB e TFB em filés do pacu;

6. Determinar o risco alimentar para o consumo humano de resíduos dos inseticidas DFB e TFB em filés do pacu, por meio do cálculo da Ingestão Diária Aceitável e da Ingestão Diária Estimada;
7. Avaliar os efeitos tóxicos do DFB ou TFB no fígado dos pacus alimentados com ração acrescida desses inseticidas, por meio da atividade das enzimas hepáticas catalase e glutathione-S-transferase.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Administração de agroquímicos na aquicultura com fins terapêuticos

As novas técnicas de criação de organismos aquáticos em altas densidades populacionais, aliados aos manejos inadequados, podem promover a proliferação de parasitos e doenças nos animais cultivados (VINATEA-ARANA, 1999). A consequência mais grave é a forte dependência de substâncias quimioterápicas utilizadas para o controle dos patógenos.

As parasitoses representam perdas relevantes na piscicultura industrial ou esportiva, principalmente, nos ecossistemas tropicais, devido às características climáticas pertinentes à região, as quais propiciam sua rápida e constante propagação (THATCHER e BRITES NETO, 1994). O ambiente aquático também é propício para a reprodução, dispersão e sobrevivência dos parasitos (CARVALHO et al., 2003).

Dentre os parasitos, os ectoparasitos exercem papel relevante na piscicultura, e são considerados importantes redutores de produtividade, pois causam atraso no crescimento e altas taxas de mortalidade nos organismos cultivados (RANZANI-PAIVA et al., 1997). Os ectoparasitos são capazes de provocar sérios danos ao hospedeiro, através de ações espoliadoras e traumatização de tecidos com seus órgãos de fixação. As lesões provocadas pela presença do ectoparasito podem favorecer o aparecimento de infecções secundárias provocadas por fungos, bactérias oportunistas ou vírus (EIRAS et al., 2000; CARVALHO et al., 2004).

Os ectoparasitos são os agentes patogênicos mais estudados na piscicultura brasileira (PAVANELLI et al., 2000). PIASECKI et al. (2004), ao discutirem a importância de copépodes na aquicultura continental, indicam que para maximizar a produção, as relações entre peixe e crustáceos deste subfiló precisam ser controladas.

Com relação aos parasitos de peixes dulceaquícolas, a família Lernaeidae é considerada o grupo mais importante, com destaque para a única espécie cosmopolita *Lernaea cyprinacea*. No Brasil, a lerneia ocorre em quase todos os estados (GABRIELLI e ORSI, 2000), com registro de parasitismos em

várias espécies de peixes, cultivados ou de ambientes naturais (PAVANELLI, 2000). MORAES e MARTINS (2004) consideram a *Lernaea cyprinacea* o crustáceo parasito mais preocupante, devido aos prejuízos que causa em sistemas de criação de peixes. GABRIELLI e ORSI (2000) verificaram que a incidência de infestações parasitárias vem aumentando ao longo dos anos na região Norte do Estado do Paraná.

Além da *Lernaea cyprinacea*, outros crustáceos parasitos tem ameaçado a produção aquícola brasileira, entre os quais se destacam o copépodo *Ergasilus* sp., e os branquiúros *Dolops* sp. e *Argulus* sp. (MARTINS, 2004).

A administração de agroquímicos com fins terapêuticos na aquicultura ocorre por rotas diferentes das normalmente adotadas para animais terrestres. Para estes, é possível aplicar-se o tratamento isolando o indivíduo ou um grupo de indivíduos. Em sistemas aquaculturais intensivos, estes tratamentos não são possíveis operacionalmente. No tratamento das doenças em peixes, vários protocolos são utilizados, como os banhos terapêuticos com substâncias químicas e o uso de rações suplementadas (FOUZ et al., 2001).

Segundo MIDLEN e REDDING (2000), a administração de terapêuticos por inclusão no alimento é muito praticada em países de produção aquícola intensiva, principalmente nos cultivos em tanques-rede. Esse procedimento é considerado ideal para a administração de um rol de xenobióticos, especialmente aqueles de maior preço, visto que, a perda por esse método é considerada mínima (MIDLEN e REDDING, 2000). No Brasil, o sistema mais adotado é o banho de imersão dos peixes em solução terapêutica. Os banhos são restritos a compostos solúveis na água e devem ser administrados em ambiente fechado (tanque), com suprimento de renovação de água interrompido durante o tratamento (KUBITZA e KUBITZA, 1999).

A principal forma de combater crustáceos ectoparasitos é a utilização de inseticidas, em especial os organofosforados, benzoilfeniluréias, carbamatos e piretróides (LESTER e ROUBAL, 1995; SHEPHERD, 1995). Apesar do uso intensivo de diversas substâncias na atividade aquícola, no Brasil não há legislação específica e produtos com registro para essa finalidade (LOPES, 2005; MAXIMINIANO et al., 2005).

3.2. Utilização e efeitos de agroquímicos na aquicultura

Diferentemente do que ocorre em outros países, produtos utilizados como quimioterápicos na aquicultura brasileira não são desenvolvidos especificamente para combater as enfermidades aquáticas. Apesar da semelhança entre os ingredientes ativos, no Brasil, a maioria dos produtos empregados é de uso agrícola e/ou veterinário.

Publicações nacionais abordam o uso destas substâncias no combate das principais parasitoses que ameaçam a produtividade de organismos aquáticos. Apesar de alguns autores alertarem quanto ao risco potencial relacionado à sua utilização, é comum encontrar recomendações de doses e duração de tratamentos com agroquímicos sem especificações legais (SANTOS, 2005).

O diflubenzuron (DFB), composto difenil clorado (Figura 1), conhecido comercialmente como Dimilin[®], é um inseticida derivado da uréia classificado como regulador de crescimento de insetos. O DFB atua impedindo a formação da quitina, principal constituinte do exoesqueleto dos artrópodes.

Comparado com outras substâncias utilizadas na aquicultura, apresenta baixa toxicidade aos peixes. Segundo ORNE e KEGLEY (2004) a concentração letal média (CL_{50-96h}) do DFB para diferentes espécies de peixes é superior a 200 mg.L⁻¹. Devido a sua baixa toxicidade aos vertebrados (ORNE e KEGLEY, 2004), esse inseticida é amplamente utilizado na aquicultura, principalmente no combate da lemeose e argulose.

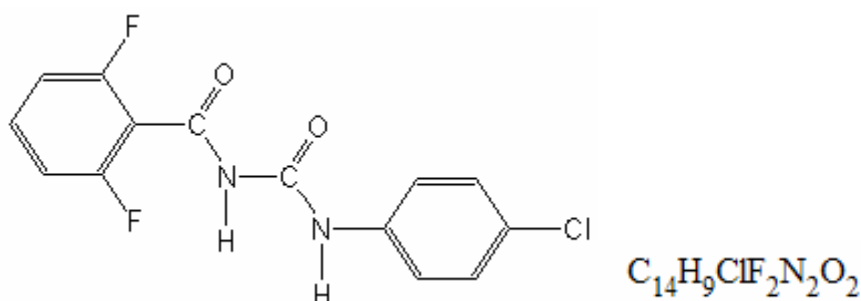


Figura 1. Estrutura molecular do inseticida diflubenzuron.

Em meados de 1999, o DFB passou a ser utilizado no Brasil para controlar infestações causadas por crustáceos ectoparasitos de peixes. Até então, o uso de organofosforados era mais comum para esse controle, porém, depois de certo tempo, havia a reincidência da doença. Nos últimos anos, observaram-se suas vantagens sobre os organofosforados, tais como baixa toxicidade e eficácia de 100% no controle vários parasitos (MARTINS, 2004).

O DFB foi 100% eficiente no controle dos ectoparasitos branquiuros de piauçus (*Leporinus macrocephalus*) quando submetidos a banhos terapêuticos na concentração de 0,5 e 1 mg.L⁻¹ (FUJIMOTO et al., 1999). SCHALCH et al. (2005) também observaram 100% de eficácia no controle de *Dolops carvalhoi* de pacus (*P. mesopotamicus*) naturalmente infestados.

BOUBOULIS et al. (2004) observaram que a dose de 3 mg de DFB.kg⁻¹ de peixe, ministrada na ração do robalo (*Dicentrarchus labrax*), foi suficiente para controlar o isópodo parasito *Ceratothoa oestroides*. Nos estágios pré-adultos e adultos, o controle do parasito foi de 100%, após 14 dias de tratamento, e não foram observados casos de reinfestação do parasito durante os 30 dias de tratamento.

O teflubenzuron (TFB), mais conhecido pelo nome comercial de Nomolt[®] é um inseticida derivado da uréia, e atua de forma semelhante ao DFB, bloqueando a incorporação de quitina no exoesqueleto dos insetos (Figura 2). Este agroquímico é utilizado na aquicultura para o controle de ectoparasitoses de peixes e classificado como pouco tóxico para a maioria dos vertebrados (SEPA, 1999).

De acordo com dados publicados pelo SEPA (1999), a concentração letal média (CL_{50-96h}) do TFB para a carpa (*Cyprinus carpio*) e para a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), é superior a 500 mg.L⁻¹.

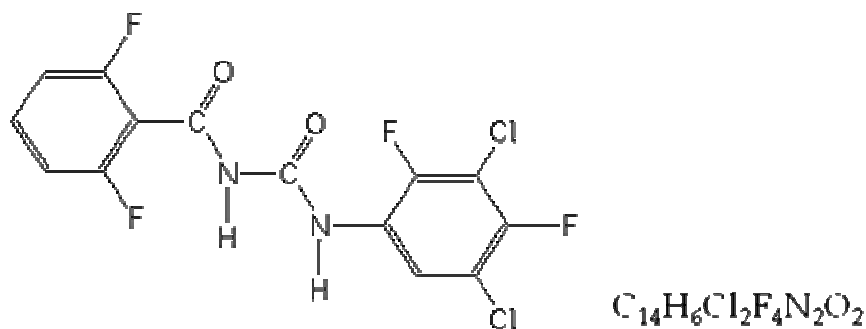


Figura 2. Estrutura molecular do inseticida teflubenzuron.

O TFB adicionado na ração (2 g.kg^{-1} de peixe) é atualmente utilizado na Noruega, Canadá, Chile, Irlanda e Escócia nas criações de salmões, para controlar infestações dos copépodes ectoparasitos *Lepeophtheirus salmonis* e *Caligus elongatus* (MÉNDEZ, 2006). No Brasil, não há registro da utilização do TFB para controle de ectoparasitos de organismos aquáticos.

Segundo BRANSON et al. (2000), a adição de $10 \text{ mg de TFB.kg}^{-1}$ de peso vivo de peixe na ração de salmões (*Salmo salar*) foi eficiente no controle do copépode *Lepeophtheirus salmonis*. Os autores observaram 79% de redução no número de copepoditos que infestavam os peixes aos 7 dias após o tratamento.

Apesar da eficiência e da baixa toxicidade para populações de vertebrados de maneira geral, o uso do DFB e TFB no tratamento de parasitoses deve ser utilizado com precaução. A liberação dos efluentes de piscicultura contaminados com estas substâncias é extremamente perigoso para organismos invertebrados, oferecendo risco para algumas espécies não-alvo, como exemplo, espécies de microcrustáceos (NEBEKER et al., 1983; SEPA, 1999; MABILIA et al., 2004).

Esses inseticidas ainda podem provocar efeitos subletais em peixes. TANNER e MOFFET (1995) constataram redução de 97% na taxa de crescimento das larvas de perca (*Lepomis macrochirus*) expostas a $30 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de DFB. Mesmo em baixas concentrações ($2,5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$) os autores observaram 86% de redução do crescimento larval. Segundo DRAREDJA e SOLTANI (2001), o DFB provocou atraso no crescimento do peixe mosquito (*Gambusia*

affinis), exposto por 24 horas à concentração de 78 ng.L⁻¹. Em relação ao TFB, não foram encontrados na literatura dados referentes a efeitos subletais em peixes.

3.3. Toxicidade e efeitos subletais da exposição a agroquímicos

A toxicologia aquática permite estabelecer limites de concentrações ou quantidades de substâncias químicas aceitáveis no ambiente aquático e estudar os efeitos tóxicos de substâncias químicas e outros materiais antropogênicos sobre os organismos aquáticos. Estes efeitos tóxicos incluem letalidade (mortalidade) e efeitos subletais, tais como alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, respostas patológicas, bioquímicas fisiológicas e comportamentais (RAND e PETROCELLI, 1985).

O ensaio toxicológico de um determinado composto químico inicia-se com os testes de avaliação da toxicidade aguda. O objetivo desse teste é calcular a concentração letal média (CL₅₀) do agente na água onde os organismos estão expostos. A CL₅₀ é a concentração estimada que produz mortalidade em 50% da população teste, no período de 24 a 96 horas de exposição (RAND e PETROCELLI, 1985).

A determinação da letalidade é importante para estimar a concentração e potência de uma substância química e a sensibilidade da espécie alvo. Em seguida, outras respostas que não sejam a mortalidade podem ser observadas quando o animal é exposto a concentrações mais baixas (subletal) que aquelas que causem a morte dos organismos (BERTOLETTI, 1990). Essas respostas biológicas são denominadas de biomarcadores e podem estar relacionadas à exposição ou ao efeito tóxico de um contaminante ambiental (PEAKALL, 1994).

O processo de detoxificação de xenobióticos ocorre nos tecidos de todos os animais, e os maiores níveis ocorrem no fígado, que possui enzimas responsáveis pelas reações de detoxificação de certas substâncias químicas (JOBILING, 1995). Dessa forma, a avaliação de parâmetros bioquímicos, como a atividade de algumas enzimas, pode ser utilizada para identificar sinais iniciais de danos aos peixes (PEAKALL, 1994).

A catalase (CAT), principal enzima do sistema de defesa antioxidante, atua prevenindo a formação de radicais livres. O radical superóxido (O_2^-) é produzido no organismo por células fagocitárias que atuam na destruição de vírus e bactérias, ou acidentalmente, pelo extravasamento de elétrons da cadeia transportadora de elétrons do citocromo P450 (LEMAIRE e LIVINGSTONE, 1993; HALLIWEL et al., 1998; WINSTON et al., 1998). O radical O_2^- é processado pela superóxido dismutase (SOD), que resulta na formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este composto, por sua vez, não é muito reativo, mas pode gerar o radical hidroxila ($OH^\cdot$) que pode se unir a qualquer componente celular, como ácidos nucleicos, lipídeos de membrana e induzir a processos carcinogênicos (RIBEIRO et al., 2000).

Alguns estudos já evidenciaram a capacidade de muitas substâncias químicas de induzirem o estresse oxidativo em diferentes organismos, incluindo os peixes (BAGCHI et al., 1993; HINCAL et al., 1995). GABRYELAK e KLEOT (1985) demonstraram que carpas (*Cyprinus carpio*) expostas por 4, 12, 48 e 96 horas, a 10 mg. L^{-1} de paraquat apresentaram diminuição da atividade da CAT. A quitosana, composto natural extraído do exoesqueleto de crustáceos, também reduziu a atividade hepática da CAT em carpas (*Cyprinus carpio*) expostas durante 4 dias a 300 mg. L^{-1} de quitosana (DAUTREMEPUITS et al., 2004). Dessa forma, alterações na atividade enzimática da CAT, como diminuição ou aumento de sua atividade, indicam situação de estresse.

As reações de transformação de xenobióticos normalmente envolvem oxidação, redução e hidrólise do composto tóxico (reações de fase 1). Nessa fase, os compostos lipofílicos são transformados em hidrofílicos, que são menos tóxicos por serem menos permeáveis às membranas biológicas. Tais resíduos podem ser excretados diretamente ou passar para as reações de fase 2. Nessa fase, ocorre conjugação dos resíduos com substratos endógenos como a glutatona, a fim de serem excretados mais facilmente (HUGGET et al., 1992).

A glutatona-S-transferase (GST) é um exemplo de enzima relacionada com a conjugação e excreção de compostos tóxicos (fase 2), principalmente de origem orgânica (HEATH, 1997; GOKSOYR e FORLIN, 1992). Devido a

sua alta reatividade com componentes eletrofílicos, a GST pode remover os xenobióticos antes que estes se liguem a compostos nucleofílicos dos tecidos, diminuindo seu efeito tóxico (ORUÇ et al., 2000).

Em vários trabalhos foram demonstrados os efeitos da presença de xenobióticos sobre a atividade hepática da GST, como aumento ou redução da atividade dessa enzima (DRAREDJA e SOLTANI, 1998; HAMED et al., 2003; SAYEED et al., 2003; BASTOS et al., 2004).

O aumento da GST foi observado em tilápias da espécie *O. niloticus* expostas por 7 dias ao efluente de indústria têxtil (RIBEIRO et al., 2000) e em tilápias capturadas no rio Nilo, em locais que recebem efluentes contaminados por resíduos de origem industrial e doméstica (HAMED et al., 2003). SAYEED et al. (2003) também observaram aumento da GST no fígado de bagres (*Channa punctatus*) expostos durante 48h ao inseticida piretróide deltametrin.

A redução da atividade da GST hepática foi observada por DRAREDJA e SOLTANI (1998) no fígado do peixe mosquito (*Gambusia affinis*), exposto à concentração de 78 ng.L^{-1} de DFB por 30 dias. BASTOS et al. (2004) observaram redução da atividade da GST em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) expostos durante 25 dias a $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de DFB aplicado na água.

Estudar as defesas antioxidantes juntamente com atividade de enzimas biotransformantes no fígado dos peixes é uma boa estratégia para avaliar os efeitos da presença de xenobióticos na água (ADAMS et al., 1990). Alguns contaminantes ambientais podem causar aumento na oxidação de ácidos graxos e pode levar ao estresse oxidativo.

3.4. Bioconcentração de agroquímicos em organismos aquáticos

A bioconcentração é o processo de acumulação de xenobióticos presentes na água pelos peixes e outros organismos aquáticos através de rotas não alimentares (BARRON, 1990).

Alguns fatores atuam na determinação da bioconcentração como o conteúdo lipídico, controle fisiológico, distribuição, biotransformação, condições

ambientais, diferenças inter e intra-espécies e biodisponibilidade. Geralmente é aceito que o conteúdo lipídico do animal é fator determinante da bioconcentração (HAMELINK et al., 1999).

As moléculas orgânicas apolares (hidrofóbicas) possuem grande afinidade pelo conteúdo lipídico. Altas concentrações de xenobióticos são encontradas no compartimento lipídico dos tecidos de animais aquáticos (BARRON, 1990). Assim, a acumulação de xenobióticos nos peixes, de maneira geral, aumenta de acordo com a taxa de gordura do animal e a biomagnificação é inversamente proporcional à solubilidade do composto na água (HAMELINK et al., 1999).

A absorção do xenobiótico a partir da água, pelo peixe, se dá por uma série de passos fisiológicos que controlam e comandam as taxas de assimilação e a extensão da acumulação (CONNELL, 1997).

A acumulação de xenobióticos hidrofóbicos pode mudar em função de características inter e intra-espécies. Para ORNE e KEGLEI (2004) os fatores de bioconcentração do DFB variam de 5 para a tilápia (*O. niloticus*) a 0,001-0,005 para a perca (*Lepomis macrochirus*). Em relação ao TFB, não foram encontrados informações que comprovem sua acumulação em tecidos e órgãos de peixes.

Segundo COLWELL e SCHAEFER (1980), o DFB pode se acumular em tecidos e órgãos de peixes, após a administração na água. Esses autores observaram acúmulo cerca de 40 vezes maior que a concentração inicial (13 ng.g⁻¹) no primeiro dia pós-aplicação do xenobiótico. SCHAEFER et al. (1980) observaram acumulação de DFB no músculo de peixes de até 160 vezes a concentração inicial e AHMED e EID (1991) observaram acúmulo de DFB, principalmente, nas brânquias de tilápia (*O. niloticus*) expostas a 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹.

Além da importância de determinar os efeitos que os xenobióticos provocam nos organismos aquáticos, é de suma relevância determinar o comportamento e avaliar seus resíduos em peixes destinados ao consumo humano.

3.5. Importância da análise de resíduos e risco alimentar

Em relação à segurança alimentar, risco é definido como um agente ou fator biológico, químico ou físico com potencial de causar efeito adverso a saúde. O consumo de peixes e pescados, em geral, está relacionado a uma variedade de riscos, sendo que alguns destes podem ser potencialmente aumentados sob certas circunstâncias em produtos oriundos da aquicultura, se comparados aos capturados no ambiente (REILLY e KAFERSTEIN, 1997).

As substâncias químicas e os metais podem acumular-se em produtos aquaculturais em níveis que podem causar problemas de saúde pública. Neste caso, destacam-se os inseticidas, herbicidas e fungicidas, que podem estar presentes nos tanques de cultivo, quer seja por contaminação oriunda de áreas agrícolas adjacentes, ou pela aplicação intencional exigida em certas práticas de manejo (REILLY e KAFERSTEIN, 1997).

De acordo com Food and Agriculture Organization United Nations, a presença de resíduos xenobióticos na carcaça de organismos aquáticos oriundos da aquicultura está atraindo atenção mundial (FAO, 2002).

Os países industrializados (União Européia, Estados Unidos, Japão, Nova Zelândia e Austrália entre outros) estão cada vez mais preocupados com a segurança alimentar dos seus consumidores. Este grupo de países, importadores de carne de pescado, tem promovido dentro de suas fronteiras programas de inspeção que contemplam o rastreamento e monitoramento de resíduos xenobióticos considerando o limite máximo de resíduo (LMR) preconizado pelo *Codex Alimentarius*.

Algumas organizações internacionais, como a FAO e World Health Organization (WHO), elaboraram uma série de conceitos através de estudos toxicológicos e ambientais, com a finalidade de orientar os membros do *Codex Alimentarius*, para a previsão dos perigos quando a população está exposta aos xenobióticos.

Dentre estes conceitos está incluída a Ingestão Diária Aceitável (IDA), definida como a quantidade de uma substância que pode ser ingerida, diariamente, sem riscos consideráveis à saúde do consumidor (LAVORENTI e GIANNOTTI, 1990). A IDA é expressa em miligramas de produto químico por

quilograma de peso corpóreo por dia ($\text{mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) e varia de uma substância para outra (GUIMARÃES, 1996).

A IDA é calculada dividindo-se o nível de efeito não observado (NOEL) mais significativo por um fator de segurança de, no mínimo 100, de forma a reduzi-lo a 0,01 do valor inicial. Quando multiplicada pelo peso de uma pessoa, a IDA deve ser sempre maior que o resíduo do agrotóxico encontrado em quantidade equivalente ao fator alimentar (quantidade máxima diária de alimento ingerido em uma determinada região) para que não haja riscos de intoxicação (GUIMARÃES, 1996).

Com os valores de IDAs dos inseticidas, pode-se calcular o consumo diário máximo seguro (CDMS), ou seja, a quantidade máxima que uma pessoa pode ingerir diariamente do resíduo sem dano a saúde. De acordo com o *Codex Alimentarius*, a IDA do DFB é de $0,01 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ de peso corporal, enquanto que, para o TFB não há informações.

Além da IDA, é possível calcular a Ingestão Diária Estimada (IDE) dos inseticidas. Para esse cálculo, multiplica-se o consumo de alimento ($\text{kg.pessoa.dia}^{-1}$), pela quantidade de resíduo encontrado nas amostras de alimento.

BOYD e MASSAUT (1999) citam que a maior parte dos produtos químicos utilizados na aquicultura, atualmente, possui pouco ou nenhum risco à segurança alimentar. Entretanto, ressaltam que o emprego de xenobióticos em unidades de produção intensiva e superintensiva podem provocar a bioacumulação e representar risco à segurança dos consumidores.

Assim, a hipótese deste estudo é que a utilização dos inseticidas diflubenzuron e teflubenzuron nas práticas de manejo da aquicultura, além de causar efeitos subletais nos peixes, pode representar risco à segurança alimentar, devido à presença de resíduos dos inseticidas nos filés dos peixes consumidos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Testes Ecotoxicológicos

Os testes de ecotoxicidade aguda ($CL_{50;96h}$) do DFB e TFB para o pacu (*P. mesopotamicus*) foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal. Todo o material e as metodologias utilizados nos ensaios foram os indicados nas normas de bioensaios estabelecidas pelo IBAMA (1987) - Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos.

Os exemplares de pacu utilizados nesses ensaios foram obtidos em tanques de cultivo do Centro de Aqüicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, e transportados para o Laboratório de Ecotoxicologia.

A aclimação dos animais ocorreu durante 15 dias em reservatórios de fibra de amianto revestidos com resina epóxi, com 1000 L de capacidade (Figura 3A). Os reservatórios foram abastecidos com água de poço artesiano com renovação e aeração constantes, e os animais alimentados com ração comercial (Polinutri[®], 28% de proteína bruta), fornecida 2 vezes ao dia.

Posteriormente, um lote homogêneo de peixes foi transferido para reservatórios de 250 L (Figura 3B) em sala climatizada com a temperatura ajustada em 27° C e fotoperíodo de 12 horas.



Figura 3. Reservatórios de 1000 L para aclimação dos animais (A) e reservatório de 250 L localizado em sala climatizada (B).

4.1.1. Teste de ecotoxicidade aguda para *Piaractus mesopotamicus*

De acordo com as normas do IBAMA (1987), os testes preliminares foram conduzidos em sistema estático durante 96 horas, sem substituição ou sifonagem de água e sem alimentação durante o período de exposição ao DFB ou TFB. O objetivo desse ensaio foi de determinar a menor concentração que provocasse 100% de mortalidade e a maior concentração que causasse 0% de mortalidade nos animais testados.

Foram estabelecidas 6 concentrações para cada produto que constituíram os tratamentos experimentais. Estes foram distribuídos de forma inteiramente casualizada, com 3 repetições. Cada parcela foi conduzida em frascos de vidros de 8 L com 5 animais por tratamento e densidade de $1,75 \text{ g.L}^{-1}$ (massa corporal = $14,54 \pm 1,79 \text{ g}$ e comprimento total = $5,75 \pm 1,01 \text{ cm}$).

As soluções testadas foram: 0, 400, 800, 1200, 1600 e 3200 mg.L^{-1} de DFB e 0, 1000, 2000, 3000, 4000 e 5000 mg.L^{-1} de TFB. A cada 24 horas foi observada a mortalidade dos peixes e determinadas as variáveis físico-químicas da água: pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica (Tabela 1).

No teste preliminar para a determinação da toxicidade do DFB e TFB para o pacu, nenhuma das concentrações testadas foi capaz de causar mortalidade. Ao final do teste, os peixes foram retirados dos aquários, transferidos para aquários com água limpa e observados por mais 48 horas.

Devido a grande concentração dos produtos aplicados aos tratamentos, formou-se uma forte emulsão. Deste modo, foi realizado uma observação isolada em apenas 1 aquário com 5 animais por 96 horas, com finalidade de testar altas concentrações dos inseticidas. Aplicou-se em um aquário de 8 L a concentração de 5000 mg.L^{-1} de DFB e, em outro, 10000 mg.L^{-1} de TFB.

Novamente não foi observada mortalidade. Sendo assim, o experimento de determinação da toxicidade aguda do DFB e TFB para o pacu foi encerrado.

Tabela 1. Valores médios de pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido (OD) e temperatura da água dos ensaios de toxicidade aguda do diflubenzuron (DFB) e teflubenzuron (TFB) para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

DFB	pH	Condutividade ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	O.D. (mg.L^{-1})	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
0	$7,2 \pm 0,5$	$195,7 \pm 7,9$	$6,2 \pm 1,3$	$26,7 \pm 1,2$
400	$8,3 \pm 0,3$	$193,8 \pm 6,4$	$5,8 \pm 1,5$	$26,5 \pm 1,1$
800	$8,5 \pm 0,4$	$191,9 \pm 5,8$	$5,4 \pm 1,1$	$26,5 \pm 1,0$
1200	$8,2 \pm 0,5$	$195,7 \pm 7,9$	$4,6 \pm 1,0$	$27,3 \pm 1,2$
1600	$8,3 \pm 0,3$	$193,8 \pm 6,4$	$3,3 \pm 1,3$	$26,8 \pm 1,0$
3200	$8,5 \pm 0,4$	$199,9 \pm 5,8$	$2,0 \pm 1,2$	$26,3 \pm 1,1$
TFB	pH	Condutividade ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	O.D. (mg.L^{-1})	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
0	$7,2 \pm 0,5$	$193,7 \pm 7,9$	$5,8 \pm 1,0$	$27,3 \pm 1,2$
1000	$8,3 \pm 0,3$	$198,8 \pm 6,4$	$1,0 \pm 1,1$	$27,5 \pm 1,1$
2000	$8,2 \pm 0,4$	$196,9 \pm 5,8$	$1,3 \pm 1,1$	$26,3 \pm 1,0$
3000	$8,1 \pm 0,2$	$201,6 \pm 7,6$	$0,6 \pm 1,2$	$27,1 \pm 1,1$
5000	$8,8 \pm 0,5$	$203,7 \pm 8,4$	$0,3 \pm 1,4$	$26,2 \pm 1,6$

4.2. Delineamento experimental

Para determinação de resíduos e avaliação dos efeitos subletais da exposição do pacu aos inseticidas DFB e TFB, foram realizados 2 experimentos. No primeiro, os inseticidas foram aplicados diretamente na água, simulando a aplicação para controle de ectoparasitos em viveiros de peixes. Após o término destes, os mesocosmos foram esvaziados, lavados e após o período de aproximadamente 1 mês, teve início o segundo experimento. Neste, os animais foram alimentados com ração acrescida dos inseticidas DFB e TFB.

4.2.1. Experimento 1 – Aplicação dos inseticidas DFB e TFB na água

4.2.1.1. Mesocosmos experimentais e animais

Os experimentos para avaliação dos resíduos na água, sedimento e peixe foram conduzidos em sistemas de mesocosmos experimentais localizados no Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM) da UNESP - Campus de Jaboticabal, São Paulo.

Os testes para determinação de resíduos dos inseticidas após aplicação direta na água foram conduzidos em 30 mesocosmos de concreto com volume

de 400 L (Figura 4), com água de abastecimento proveniente de poço do tipo cisterna. Como não ocorreu renovação de água, os tanques foram aerados constantemente com difusores conectados a um soprador de ar.

Em cada mesocosmo foi colocado uma camada de 15 cm de solo, coletado em área livre da aplicação de agrotóxicos, retirada da camada superficial do solo do Horto Florestal do Campus da UNESP de Jaboticabal. Uma amostra deste solo foi utilizada para caracterização química e física, realizada no Laboratório de Análise de Solo e Planta do Departamento de Solos e Adubos da FCAV, UNESP de Jaboticabal e estão apresentados na Tabela 2.



Figura 4. Mesocosmos experimentais no NEPEAM – Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia, da FCAV/Unesp - Campus de Jaboticabal, São Paulo.

Tabela 2. Características químicas e físicas do solo utilizado como sedimento nos mesocosmos experimentais. Os valores correspondem a média (n=3) e desvio padrão.

Características químicas do solo							
pH (CaCl ₂)	M.O. g.dm ⁻³	K (mmol.dm ⁻³)	Ca (mmol.dm ⁻³)	Mg (mmol.dm ⁻³)	H+Al (mmol.dm ⁻³)	T (mmol.dm ⁻³)	V (%)
6,3 ± 0,1	10,3 ± 0,6	1,0 ± 0,1	26,0 ± 1,0	7,3 ± 1,5	12,7 ± 0,6	47,0 ± 1,1	73,0 ± 1,0
Características físicas do solo (g.kg ⁻¹)							
argila	silte	areia		classe textural			
		fina	grossa		média		
480 ± 10,0	53,3 ± 5,7	300 ± 10,0	366,7 ± 25,2				

Os exemplares de pacu foram distribuídos nos 30 mesocosmos experimentais, após realização da biometria. Cada mesocosmo recebeu 5 animais (massa corpórea de $281,2 \pm 64,7$ g e comprimento total de $22,9 \pm 1,8$ cm), que foram alimentados diariamente com ração comercial para peixes (Polinutri[®] com 28% de proteína bruta).

4.2.1.2. Aplicação dos inseticidas e coleta das amostras

Antes da aplicação dos inseticidas na água, foram coletadas amostras de água, sedimento e peixe para análises de resíduos de DFB e TFB, com objetivo de descartar a hipótese de contaminação das matrizes. Durante a condução do experimento um tanque de 400 L serviu como controle (CTR) e, ao término do experimento, novas amostras de água, peixe e sedimento foram coletadas para análise.

Em cada mesocosmo foram realizadas 2 aplicações de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de DFB, com 3 dias de intervalo entre as aplicações (MARTINS, 2004). Para o TFB, não foram encontradas recomendações para sua aplicação na água, porém, devido à semelhança molecular, seguiu-se a mesma recomendação para DFB.

Após a última aplicação dos inseticidas, foram coletadas amostras de água dos mesocosmos e, aos 1, 3, 5, 7 e 10 dias após a segunda aplicação foram coletadas amostras de água, sedimento e filé dos pacus.

Cada tempo experimental foi constituído por 3 réplicas, totalizando 15 mesocosmos para cada inseticida testado.

As amostras de água foram coletadas em frascos plásticos esterilizados e imediatamente congeladas. O sedimento foi coletado com auxílio de tubo coletor (10 cm de diâmetro), sendo cada amostra coletada em 3 pontos aleatórios sobre o fundo dos mesocosmos. Aproximadamente 500 g do sedimento foram acondicionados em sacos plásticos e congelados a 20° negativos até o momento da análise.

Os peixes coletados dos mesocosmos foram imediatamente sacrificados por secção medular e, após a biometria, amostras de músculo foram retiradas da musculatura branca dorsal com auxílio de material cirúrgico (Figura 5). As amostras dos filés foram embaladas em papel alumínio e congeladas.



Figura 5. Coleta de músculo de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a tratamentos com DFB e TFB aplicados diretamente na água.

Durante o período experimental, as variáveis físico-químicas da água dos mesocosmos (pH, condutividade, oxigênio dissolvido e temperatura) foram mensuradas diariamente (Tabela 3).

Tabela 3. Média dos valores diários dos parâmetros físico-químicos da água dos tanques entre 0 e 10 dias após a aplicação dos inseticidas diflubenzuron (DFB) e teflubenzuron (TFB).

Tratamento	pH	Condutividade ($\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$)	O.D. ($\text{mg}.\text{L}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
CTR	$7,5 \pm 0,4$	$191,9 \pm 5,8$	$8,4 \pm 1,2$	$26,5 \pm 1,1$
DFB	$7,2 \pm 0,5^*$	$195,7 \pm 7,9$	$8,0 \pm 1,3$	$26,7 \pm 1,2$
TFB	$7,3 \pm 0,3$	$193,8 \pm 6,4$	$8,3 \pm 1,5$	$26,5 \pm 1,1$

4.2.2. Experimento 2 – Administração dos inseticidas DFB e TFB na ração

Este experimento foi conduzido nos mesmos mesocosmos experimentais localizados no NEPEAM, porém, estes não receberam camada de sedimento e ocorreu renovação de água, com tempo de retenção hidráulica de 2,3 dias em média.

Os peixes foram submetidos à biometria (massa corpórea: $305,84 \pm 20,55$ g e comprimento total: $29,36 \pm 2,04$ cm, $n = 150$) e 5 animais foram distribuídos em cada mesocosmo.

A concentração dos inseticidas utilizada na ração baseou-se em trabalhos científicos que avaliaram a eficiência do uso de ração acrescida de inseticidas para controle de ectoparasitos de peixes. Utilizou-se 2000 mg.kg^{-1} de ração de DFB (ONAKA, 2005) e 10 mg.kg^{-1} de TFB (BRANSON et al., 2000; BOUBOULIS et al., 2004). O cálculo das concentrações de DFB e TFB foi baseado na concentração do ingrediente ativo das formulações comerciais (Dimilin® 25% de DFB e Nomolt® com 15% de TFB).

Para o preparo da ração, utilizou-se a ração comercial Polinutri® (32% de proteína bruta), que foi finamente moída em moinho elétrico, misturada com as soluções de DFB ou TFB (Figura 6) e peletizada em moedor de carne (Figura 7A). A seguir, os peletes foram transferidos para bandejas plásticas, e armazenados em sala climatizada, a 20°C , com condicionadores de ar (Figura 7B). Depois de secos, os peletes foram quebrados em fragmentos menores e armazenados em refrigerador a 4°C . A ração fornecida ao grupo controle passou pelo mesmo processamento, porém, sem a adição dos inseticidas.



Figura 6. Diluição de formulação comercial de diflubenzuron para o preparo da ração fortificada com os inseticidas diflubenzuron ou teflubenzuron.



Figura 7. Moedor de carne utilizado para peletizar a ração acrescida dos inseticidas (A) e peletes secos antes do fracionamento (B).

A ração foi fornecida aos peixes duas vezes ao dia, durante 15 dias, na proporção de 3% da biomassa/dia, de acordo com o determinado no início do experimento em cada mesocosmo.

As coletas foram realizadas aos 1, 5, 10 e 15 dias após o início do tratamento com a ração, com 3 repetições para cada tempo experimental. As amostras do grupo controle (CTR) foram coletadas em 2 épocas (1 dia: CTR inicial e 15 dias: CTR final) com 3 repetições para cada tempo. O grupo CTR serviu de controle para os dois inseticidas testados.

Em cada período experimental foram coletadas amostras de água dos mesocosmos e determinadas as medidas biométricas dos peixes. Amostras de músculo e fígado dos animais foram retirados com auxílio de material cirúrgico (Figura 8A). Os fragmentos do fígado foram pesados, armazenados em microtubos plásticos de 1,5 mL (Figura 8B) e mantidos congelados a -80°C até o momento das análises da atividade hepática das enzimas glutathione-S-transferase (GST) e catalase (CAT).

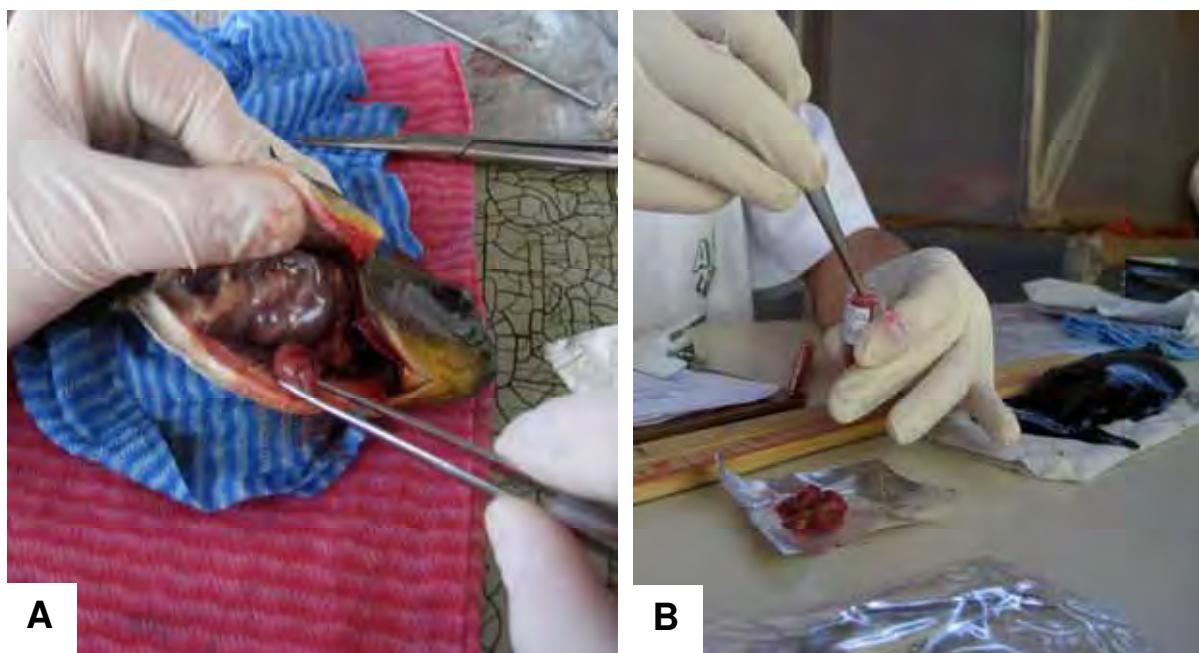


Figura 8. Coleta (A) e armazenamento (B) de fígado para a determinação da atividade enzimática das enzimas catalase e glutathiona-S-transferase de pacus submetidos a tratamento com DFB e TFB.

Durante o período experimental foram mensuradas diariamente as variáveis físico-químicas da água dos mesocosmos: pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido e temperatura (Tabela 4).

Tabela 4. Média dos valores diários das variáveis físico-químicas da água dos mesocosmos tratados durante 15 dias com ração acrescida dos inseticidas diflubenzuron (DFB) ou teflubenzuron (TFB).

Tratamento	pH	Condutividade ($\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$)	O.D. ($\text{mg}.\text{L}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
CTR	$7,4 \pm 0,3$	$191,8 \pm 1,8$	$7,0 \pm 1,7$	$22,5 \pm 1,4$
DFB	$7,5 \pm 0,4^{(*)}$	$195,7 \pm 7,9$	$6,9 \pm 1,5$	$23,7 \pm 1,2$
TFB	$7,6 \pm 0,2$	$189,8 \pm 8,8$	$7,2 \pm 1,3$	$24,5 \pm 1,2$

^(*) Os valores correspondem a média $\pm$ desvio padrão de 225 leituras para cada parâmetro.

4.3. Determinação da atividade hepática das enzimas catalase e glutathiona-S-transferase do pacu

Os fragmentos de fígado, ainda congelados, foram pesados e homogeneizados em solução tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0 (com volume igual a 10x a massa do fígado), e em seguida, centrifugadas durante 20

minutos em centrífuga refrigerada a 4° C e 15000 rpm. O sobrenadante foi separado, transferido para tubos “eppendorf” e utilizado para determinação da atividade das enzimas e da concentração de proteína total hepática. A concentração de proteína total no sobrenadante do homogeneizado do fígado foi determinada utilizando-se kit comercial (Labtest).

A atividade da GST foi quantificada pelo produto formado pela complexação da glutathiona reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), de acordo protocolo descrito por KEEN e WILLIAN (1976).

A determinação da atividade da CAT foi baseada no método descrito por BEUTLER (1975). O método consiste em mensurar a atividade da CAT através do consumo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) exógeno, gerando oxigênio e água, através de espectofotometria.

Os valores da atividade enzimática foram determinados, em duplicata, em espectrofotômetro (Biochrom, Libra S32 PC), com comprimento de onda de 340 nm para a GST e 240 nm para a CAT. Os valores de atividade foram expressos em nmol.min⁻¹.mg de proteínas⁻¹ para a GST e μmol.min⁻¹.mg de proteínas⁻¹ para a CAT.

4.4. Análises Cromatográficas

4.4.1. Padronização e validação do método analítico para o DFB e TFB

4.4.1.1. Condições cromatográficas e calibração do equipamento

A determinação do DFB e TFB foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se cromatógrafo (Thermo Finnigan), equipado com detector de arranjo de diodos e *loop* de 20 μL. Utilizou-se uma coluna ACER 5 C18 de fase reversa com 250 mm de comprimento, diâmetro interno de 4,5 mm e tamanho de partícula de 5 μm.

A fase móvel empregada foi uma solução de acetonitrila e água (80:20; v/v), em sistema isocrático com fluxo da fase móvel de 1,0 mL.min⁻¹ e comprimento de onda do detector ajustado para 256 nm. Os tempos de retenção dos analitos foram de 4,5 minutos para o DFB e 6,6 min para o TFB (Figura 9).

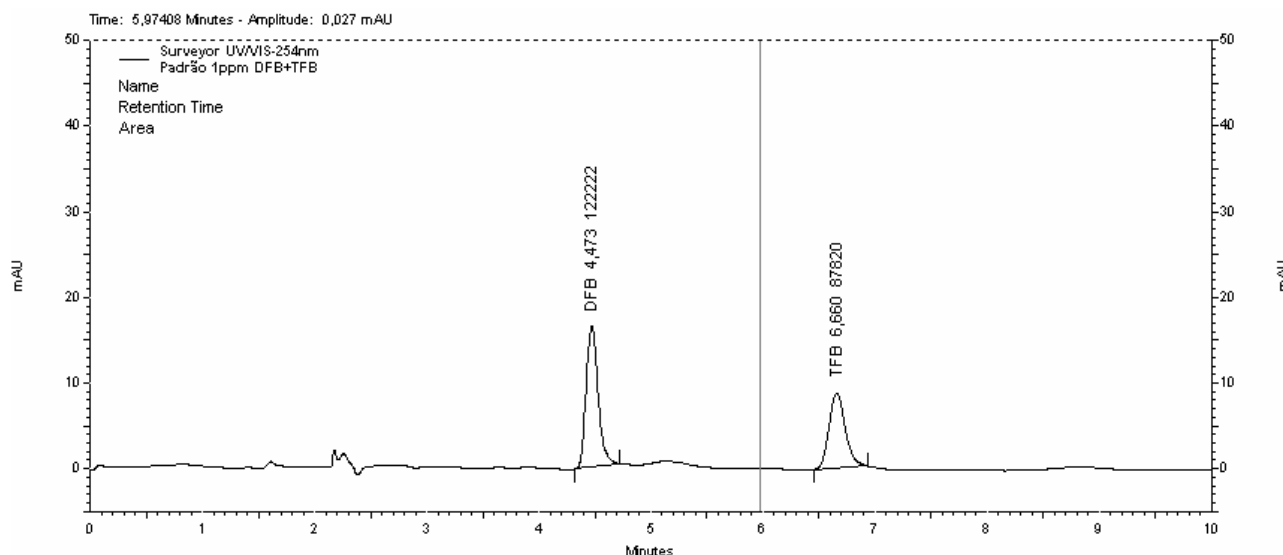


Figura 9. Cromatogramas dos padrões de 1 mg.L⁻¹ de DFB e TFB.

Uma curva analítica foi construída com os resultados obtidos das áreas dos picos dos cromatogramas após injeção das soluções-padrão de: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹ de DFB e 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg.L⁻¹ de TFB (Figura 10 e 11). As soluções-padrão foram obtidas após diluições de uma solução-padrão estoque de 100 mg.L⁻¹, preparada a partir de padrões analíticos de DFB (pureza de 99,2%) e TFB (pureza de 99,5%) diluídos em acetonitrila (grau HPLC).

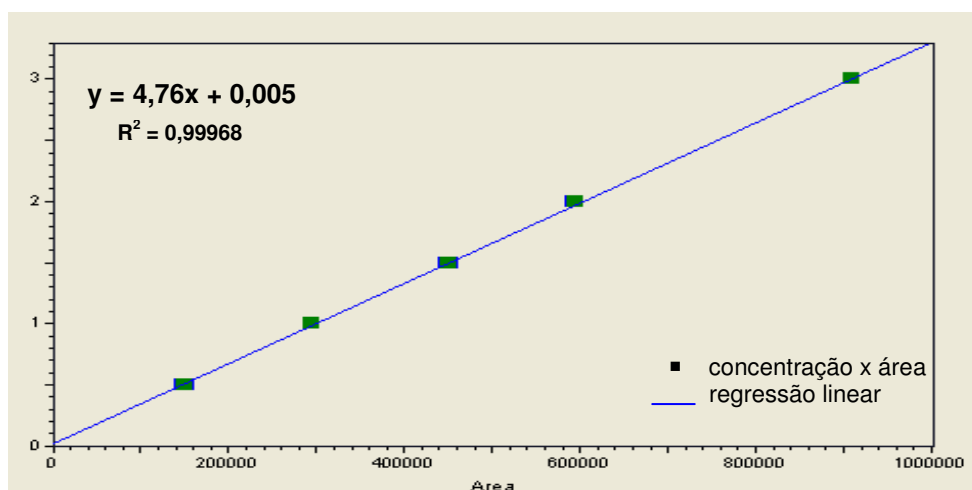


Figura 10. Curva analítica obtida para o difluzuron.

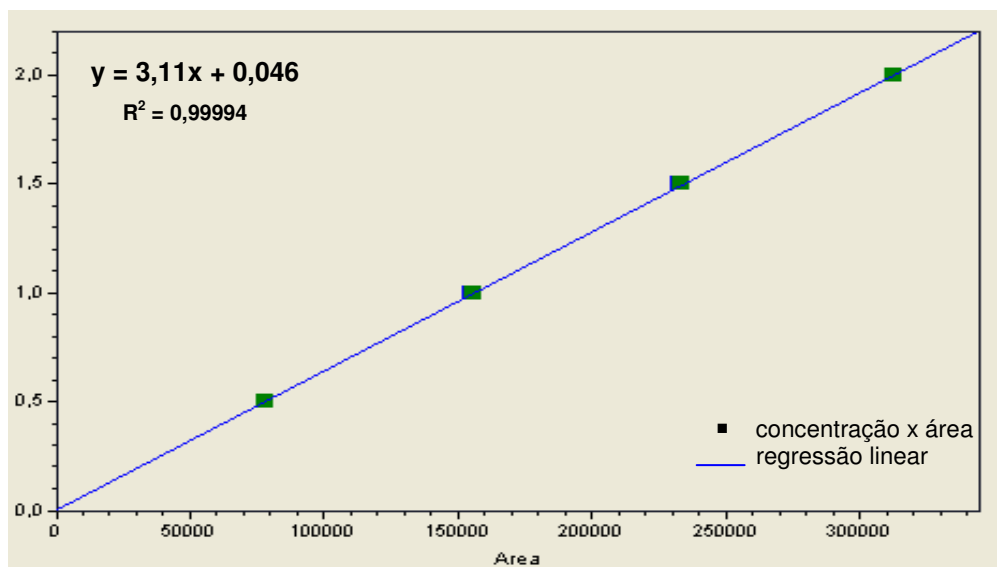


Figura 11. Curva analítica obtida para o teflubenzuron.

4.4.1.2. Limites de detecção e quantificação de DFB e TFB

O limite de detecção (LD) é determinado como a menor concentração do analito que pode ser diferenciada, com segurança, do ruído do sistema. O LD foi determinado como sendo o valor estimado de concentração do analito que produz um sinal 3 X superior ao ruído da linha de base, medido após a injeção do branco (n=10).

O limite de quantificação (LQ) corresponde a menor concentração do analito que pode ser quantificada com exatidão e com fidelidade (n=10) após a injeção do branco (LANÇAS, 2004).

4.4.1.3. Ensaios de recuperação e extração dos analitos

Os ensaios de recuperação foram realizados com a fortificação (adição de padrão analítico dos inseticidas) das amostras de água, sedimento e músculo de peixes coletadas nos mesocosmos antes da aplicação dos inseticidas na água.

Cada nível de fortificação nas diferentes matrizes foi realizado em triplicata, e as amostras armazenadas em frascos âmbar e mantidas e congeladas (-20°C) até o momento das injeções no sistema de cromatografia líquida.

A extração dos analitos nas amostras de água e filés dos pacus coletados nos mesocosmos nos experimentos foi realizada de acordo com a metodologia determinada nos ensaios de recuperação.

4.4.1.3.1. *Recuperação e extração de DFB e TFB da matriz água*

As amostras de água (25 mL) foram fortificadas com soluções-padrão de 0,1 e 0,5 mg.L⁻¹ de DFB e TFB e imediatamente transferidas para funis de separação de 125 mL (Figura 12A). Em seguida, foram adicionados 25 mL de diclorometano (DCM) e agitadas manualmente por aproximadamente 2 minutos, até a separação das fases orgânica (solvente) e aquosa (Figura 12B).

Em cada amostra, foram realizadas 3 partições com DCM, sendo a fração aquosa descartada e as frações orgânicas (camada inferior) filtradas em papel filtro (0,47 µm de porosidade) com sulfato de sódio anidro, e avolumadas em balão de fundo chato.

O balão contendo as partições do solvente foi levado ao evaporador rotativo a 40 °C (Fisatom) e após a secagem completa do balão, ressuspensas em 2 mL de acetonitrila. Para facilitar o descolamento do eluato da parede dos balões, foi utilizado um aparelho de ultrassom (Cleaner, Odontobrás) durante 2 minutos.

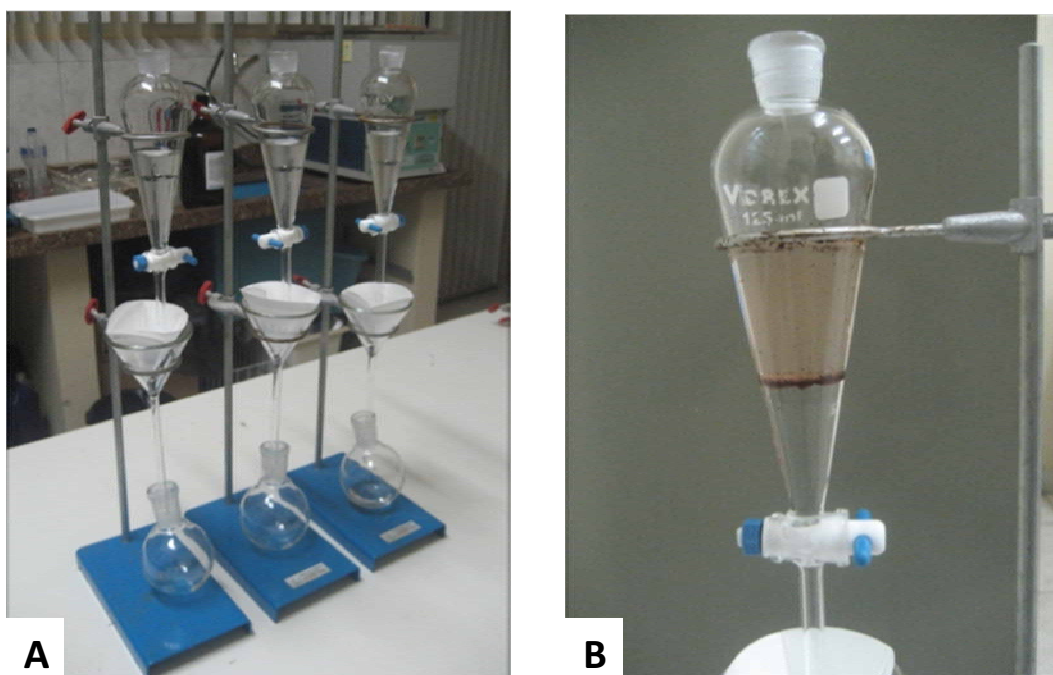


Figura 12. Bateria de testes para extração de DFB e TFB nas amostras de água (A) e separação das fases orgânica (solvente) e aquosa (B).

A metodologia empregada para extração dos analitos DFB e TFB na matriz água está representado no fluxograma a seguir.

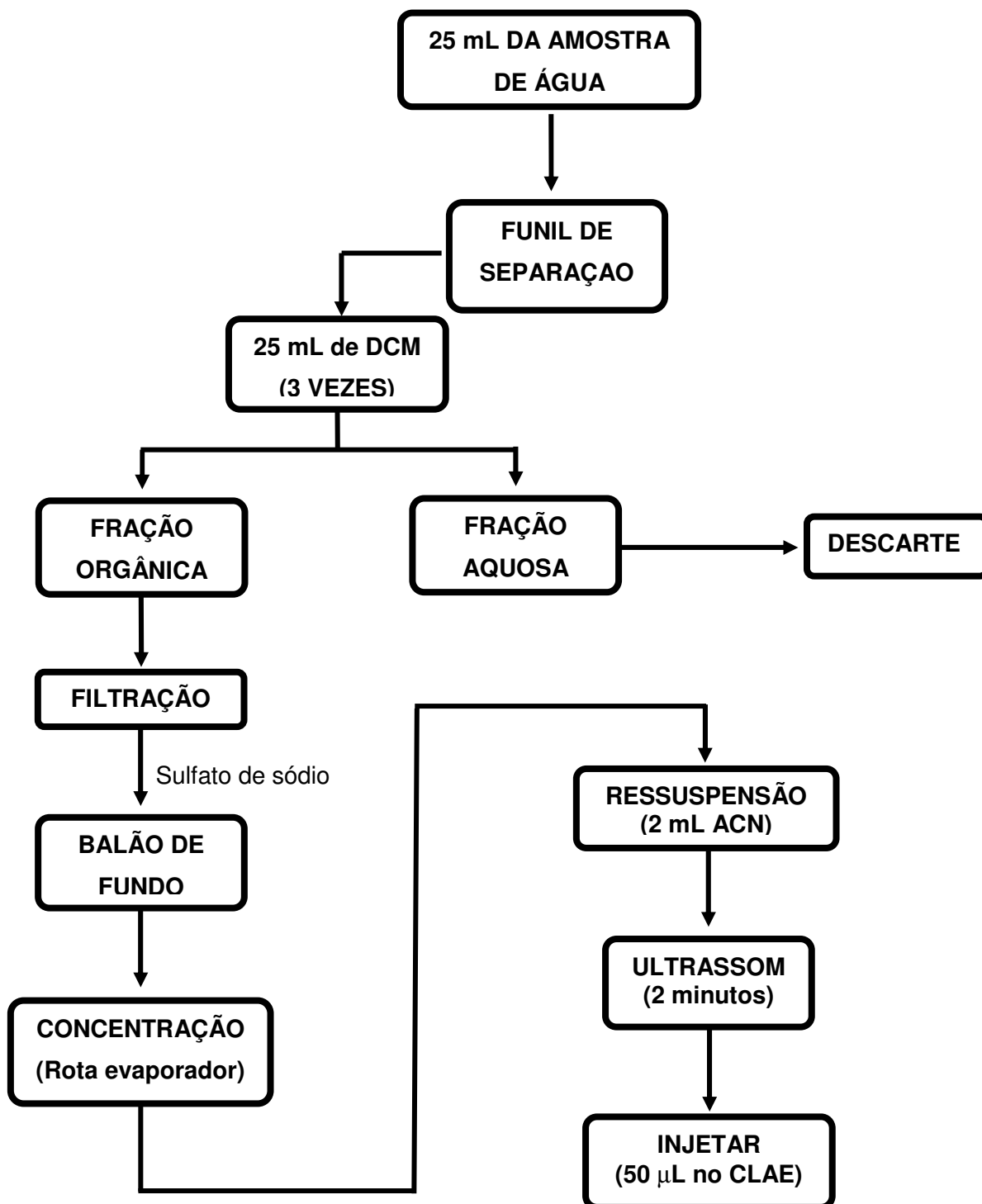


Figura 13. Fluxograma do método de extração do DFB e TFB da matriz água.

4.4.1.3.2. Recuperação e extração de DFB e TFB da matriz sedimento

Para as amostras de sedimento, inicialmente, foi testada a eficiência de recuperação de solventes orgânicos (diclorometano, acetato de etila, acetonitrila e metanol) para extração dos analitos da matriz.

As amostras de sedimento foram descongeladas em temperatura ambiente, distribuídas em placas de Petri e levadas a estufa (50° C). Após a secagem, o sedimento foi peneirado com auxílio de peneira plástica e uma alíquota de 10 g do sedimento foi transferida para frascos de vidro.

As amostras foram fortificadas com concentrações de 0,1 e 0,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ dos inseticidas e permaneceram por aproximadamente 4 horas em temperatura ambiente, para total evaporação do solvente proveniente das soluções-padrão.

Posteriormente, foram adicionados 100 mL de cada solvente testado (Figura 14A). As soluções foram agitadas em agitador orbital (Dubnoff, Marconi) por 40 minutos e levadas ao ultrassom durante 30 minutos (Figura 14B), com renovação de água a cada 10 minutos. Após essa etapa, as amostras de sedimento foram filtradas sob pressão negativa num sistema de ultrafiltração (Sartorius) utilizando-se membranas de celulose regenerada de 0,45 μm de porosidade (Figura 15). O volume filtrado foi transferido para balões de vidro e levados ao evaporador rotativo a 40° C até a total evaporação do solvente. Em seguida, as amostras foram ressuspensas com 2 mL de acetonitrila e levadas ao ultrassom por 2 minutos.

Após a definição do melhor solvente extrator, os analitos foram extraídos da matriz seguindo a mesma metodologia empregada nos ensaios de recuperação descritos anteriormente (Figura 16).



Figura 14. Bateria de testes com diferentes solventes (A) para extração do DFB e TFB nas amostras de sedimento. (B) Aparelho de ultrassom. (C) Sistema de ultrafiltração.



Figura 15. Sistema de ultrafiltração utilizado no processo de extração das amostras de sedimento fortificadas com os inseticidas DFB e TFB.

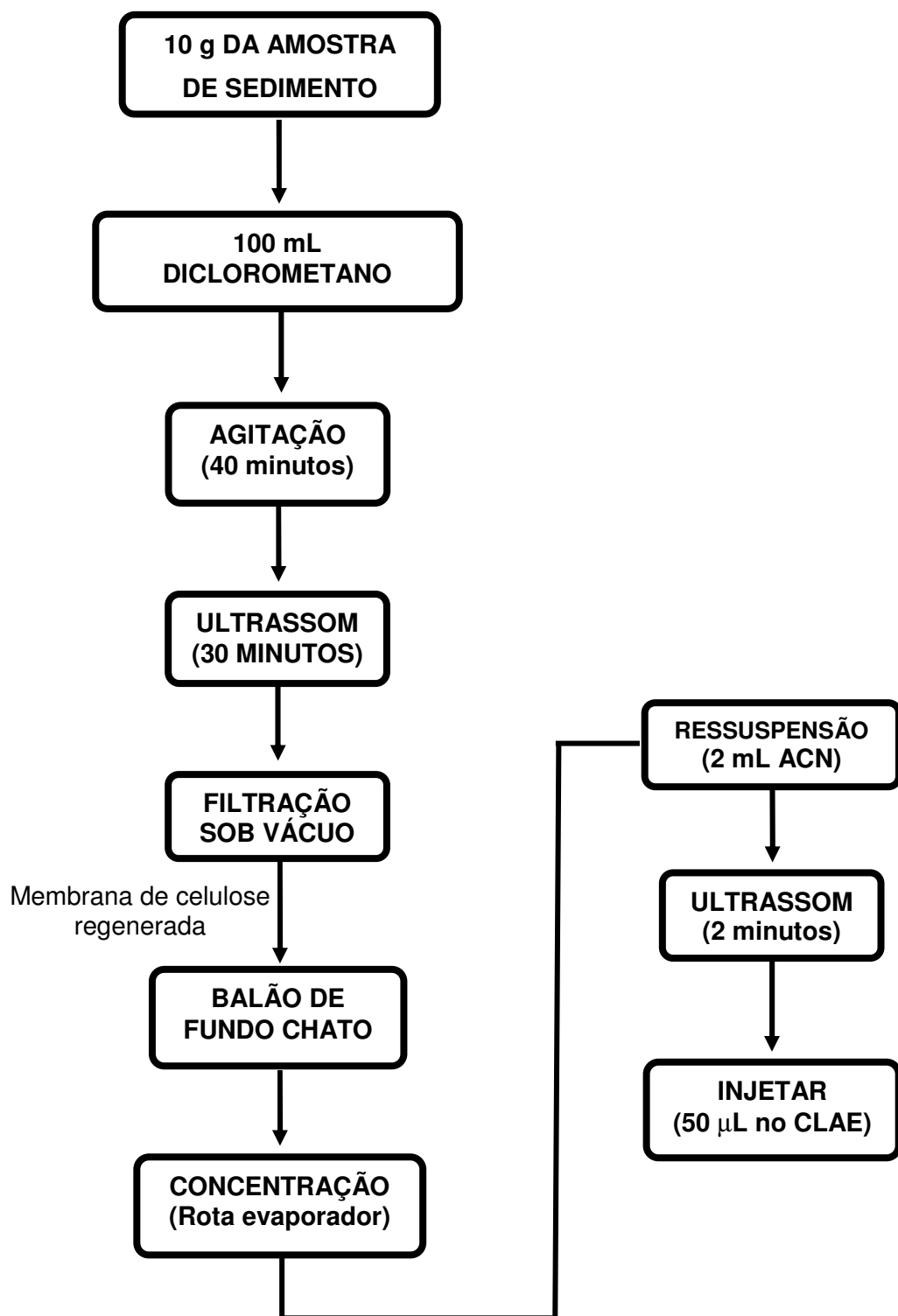


Figura 16. Fluxograma do método de extração do DFB e TFB da matriz sedimento.

4.4.1.3.3. *Recuperação e extração de DFB e TFB da matriz peixe*

Os filés de peixe, livres de espinhos e escamas, foram triturados ainda congelados por aproximadamente 1 minuto com auxílio de triturador (Turrax, Marte) (Figura 17).

Alíquotas de 5 g dos filés homogeneizados foram fortificadas com 0,5 e 1,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$ das soluções padrões de DFB e TFB e armazenadas em temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, foram transferidas para envelopes de papel filtro (250 μm) e levadas ao extrator Soxhlet com 200 mL de acetonitrila (ACN) durante 8 horas (Figura 18), com temperatura de 100°C. Após esse período, o ACN foi transferido para erlenmeyers de 500 mL e particionado 2 vezes com 100 mL de hexano, sob forte agitação mecânica.

Após a formação das fases orgânicas, o hexano (fase superior) foi descartado com auxílio de bomba á vácuo, e as partes de ACN (fase inferior) foram avolumadas em balão de vidro e levadas ao rotaevaporador (40° C). Após a completa evaporação do solvente, as amostras foram ressuspensas em 2 mL de ACN e levadas ao ultrassom durante 2 minutos.



Figura 17. Homogeneização dos filés de pacu.



Figura 18. Bateria de extração de DFB e TFB das amostras de filés do pacu.

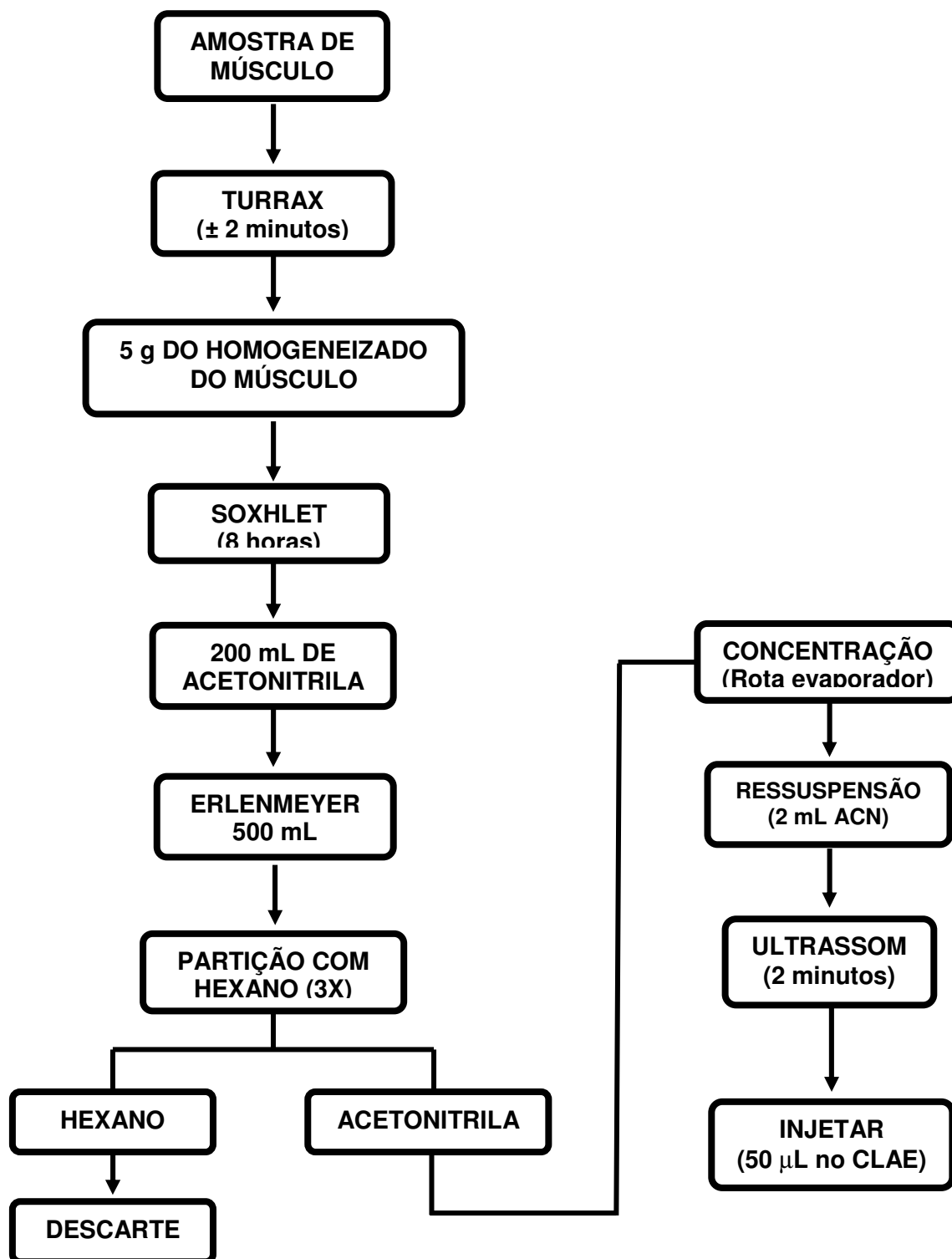


Figura 19. Fluxograma do método de extração do DFB e TFB da matriz peixe.

4.5. Risco alimentar para o consumo humano de resíduos de DFB e TFB

Com os resíduos de DFB e TFB quantificados nos filés do pacu deste experimento, foram calculados os valores de ingestão diária estimada (IDE) de resíduos para cada inseticida. Estes valores foram comparados com os de ingestão diária aceitável (IDA) de cada um dos produtos fornecido pelo *Codex Alimentarius*.

A IDE foi calculada multiplicando-se o consumo (C) de filés de peixe ($\text{kg/pessoa}\cdot\text{dia}^{-1}$), pela quantidade de resíduo (Res) encontrado nas amostras analisadas ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), levando-se em consideração a ingestão hipotética diária de 250 g de peixe. A IDA foi expressa em miligramas da substância por quilograma de peso corpóreo (padrão humano adulto = 70 kg).

Assim, os valores das IDEs e IDAs foram calculados com as seguintes fórmulas:

$$\text{IDEstimada} = \text{Res} \times \text{C} \text{ (mg. dia}^{-1}\cdot\text{pessoa}^{-1}\text{), e}$$

$$\text{IDAceitável} = \text{IDA} \times 70 \text{ (mg. dia}^{-1}\cdot\text{pessoa}^{-1}\text{)}$$

Res: quantidade de resíduo

C: consumo

4.6. Análise estatística

Os valores de resíduos de DFB e TFB nas matrizes foram analisados estatisticamente em um delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 3 repetições para cada inseticida. Para a análise estatística, utilizou-se o teste de Tukey, com 5% de probabilidade.

O delineamento estatístico para a análise dos valores dos parâmetros bioquímicos também foi ao acaso, com 5 tratamentos e 3 repetições para cada inseticida. Após análise de normalidade e homogeneidade de variância, foram analisados pelo teste de variância (ANOVA). Com a indicação de valores significativos de F, foi aplicado o teste Student-Newman-Keuls para a localização das diferenças entre as médias. Os valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Testes ecotoxicológicos para *Piaractus mesopotamicus*

A concentração de oxigênio dissolvido na água dos testes para determinação da toxicidade aguda é fator limitante durante a realização dos experimentos ecotoxicológicos para peixes. O limite mínimo de oxigênio dissolvido na água dos testes não deve ser inferior a 4 mg.L⁻¹ (EPA, 2002). Neste trabalho, com o aumento da concentração dos inseticidas na água observou-se diminuição da concentração de oxigênio dissolvido (Tabela 1), chegando a valores inferiores ao recomendado pela EPA.

Mesmo em altas concentrações testadas, não foi observada mortalidade dos animais expostos aos inseticidas. Dessa forma, utilizou-se a concentração de oxigênio dissolvido como fator limitante. A CL₅₀;96h do DFB para o pacu foi superior a 1200 mg.L⁻¹, enquanto que, a do TFB foi superior a 1000 mg.L⁻¹. Com esses valores de CL₅₀, os inseticidas testados podem ser classificados como praticamente não tóxico para o pacu.

LOPES (2005) também observou baixa toxicidade do DFB para o pacu. Segundo o autor, a CL₅₀;96h do DFB para o pacu (*P. mesopotamicus*) foi superior a 2000 mg.L⁻¹. Mesmo em altas doses (5 g.L⁻¹), não foi observada mortalidade dos animais expostos ao inseticida.

Comparados com outros grupos de inseticidas utilizados no controle de ectoparasitos de peixes, como o triclorfon e paration metílico, o DFB e TFB são muitas vezes menos tóxico. LOPES (2005) avaliou a toxicidade aguda do triclorfon para o pacu (*P. mesopotamicus*) e estimou uma CL₅₀;96h de 0,23 mg.L⁻¹. A CL_(50-96h) estimada do paration metílico para exemplares jovens de pacu foi 9,89 mg.L⁻¹ e para alevinos, de 3,97 mg.L⁻¹ (CRUZ et al.; 2004).

A toxicidade dos inseticidas DFB e TFB para o pacu foi muitas vezes menor quando comparada com a toxicidade de extratos naturais de folhas de nim (*Azadiractha indica*), que podem ser utilizados em substituição de agrotóxicos no controle de ectoparasitoses. A CL_(50-96h) desse extrato para exemplares jovens de *P. mesopotamicus* foi de 1,18 mg.L⁻¹ e para alevinos foi de 1,30 mg.L⁻¹ (CRUZ et al. 2004).

A grande diferença entre a toxicidade dos xenobióticos para organismos de mesma espécie depende da exposição, da suscetibilidade do organismo,

das características químicas do agente e de fatores ambientais TOMITA e BEYRUTH (2002).

Na Tabela 7 estão apresentados valores de $CL_{(50-96h)}$ do DFB para diferentes espécies de peixes de clima temperado. Comparando-se com os dados encontrados na literatura, o DFB é menos tóxico para o pacu (*P. mesopotamicus*) em relação a outras espécies de peixes.

Na literatura, são poucos os trabalhos de toxicidade de DFB com espécies nativas. A maior parte dos dados referentes à toxicidade de xenobióticos em peixes é proveniente de regiões temperadas, o que dificulta a comparação dos resultados entre as espécies de peixes. As espécies têm suscetibilidades diferentes de acordo com seu aparato metabólico, seus hábitos alimentares, comportamento, fase de desenvolvimento, dentre outros aspectos. Dessa forma, a toxicidade de determinada substância pode variar entre as espécies.

Tabela 5. Valores de toxicidade aguda do diflubenzuron (DFB) para diferentes espécies de peixes.

Espécie	Exposição (horas)	CL50 (mg.L ⁻¹)	Sistema	Referência
<i>Cyprinus carpio</i>	96	339-447	estático	USEPA (2000)
<i>Fundulus heteroclitus</i>	96	220-296	contínuo	USEPA (2000)
<i>Ictalurus punctatus</i>	96	280-499	estático	Julian e Sanders (1978)
<i>Lepomis macrochirus</i>	96	100	estático	USEPA (2000)
<i>Oncorhynchus clarki</i>	96	48,2-67,4	estático	Mayer e Ellersiek (1986)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96	200-290	estático	Julian e Sanders (1978)
<i>Perca flavescens</i>	96	50	estático	Mayer e Ellersiek (1986)
<i>Pimephales promelas</i>	96	100	estático	Johnson e Finley (1980)
<i>Salmo salar</i>	96	50	estático	Mayer e Ellersiek (1986)
<i>Salvelinus fontinalis</i>	96	100	estático	Schoettger e Mauck (1978)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	96	> 2000	estático	Lopes (2005)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	96	> 1200	estático	Presente trabalho

Fonte: Orne e Kegley (2004)

Em relação ao TFB, poucos trabalhos foram encontrados sobre a toxicidade aguda para os peixes. Comparando-se as espécies de peixes de clima temperado (Tabela 8), o TFB é menos tóxico para o pacu do que para a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e a carpa comum (*Cyprinus carpio*) (SEPA, 1999).

Tabela 6. Valores de toxicidade aguda do teflubenzuron (TFB) para diferentes espécies de peixes.

Espécie	Exposição (horas)	CL50 (mg.L ⁻¹)	Sistema	Referência
<i>Cyprinus carpio</i>	96	>500	estático	(SEPA, 1999)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96	>500	estático	(SEPA, 1999)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	96	>10000	estático	Presente trabalho

Apesar da baixa toxicidade do DFB e TFB para populações de vertebrados de maneira geral, ele é extremamente tóxico para organismos invertebrados (FISHER e HALL, 1992; SEPA, 1999).

NECEKER et al. (1983) calcularam o valor de CE50;48h de 2 µg.L⁻¹ de DFB para a *Daphnia magna*. Estes autores citam que o DFB pode eliminar totalmente as populações de daphnias expostas por períodos prolongados. MABILIA et al. (2004) utilizaram organismos zooplancônicos para avaliar a ecotoxicidade de DFB em efluentes de pisciculturas. Os valores de CE50-48h calculados foram de: 0,18 µg.L⁻¹ para a *Daphnia similis*; 0,51 µg.L⁻¹ para a *Ceriodaphnia dubia*; 0,05 µg.L⁻¹ para a *Ceriodaphnia silvestrii* e de 0,039 µg.L⁻¹ para *Simocephalus serrulatus*. A CE50 do DFB para essas espécies não-alvo são, portanto, muitas vezes menores que as doses recomendadas para o tratamento de ectoparasitos dos peixes.

Assim como o DFB, o TFB também apresenta alta toxicidade para organismos não-alvos. A CE50;48h do TFB para *Daphnia magna* variou de 0,47 µg.L⁻¹ a 0,28 µg.L⁻¹ (SEPA, 1999).

5.2. Atividade das enzimas hepáticas glutathione-S-transferase e catalase

As reduções significativas na atividade da GST foram observadas no fígado dos animais alimentados durante 10 dias com ração acrescida de TFB e após 15 dias com a ração acrescida de DFB (Figura 20), quando comparado

com os grupos controle (CTR inicial e final). Após 15 dias de alimentação com as rações medicadas, a atividade enzimática da GST foi menor para os animais tratados com TFB, em relação ao tratamento com DFB (Figura 20).

BASTOS et al. (2004) também observaram redução da atividade enzimática da GST em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) expostos durante 25 dias a 0,2 mg.L⁻¹ de DFB aplicado na água.

DRAREDJA e SOLTANI (2001) também observaram redução na atividade hepática da GST em peixe mosquito (*Gambusia affinis*) exposto à concentração de 78 ng.L⁻¹ de DFB por 30 dias. Neste trabalho, a redução da atividade da GST no fígado dos pacus expostos ao DFB foi observada mais rapidamente (15 dias), provavelmente devido a quantidade ingerida do inseticida junto com a ração (ingestão diária média de 0,02 mg.kg⁻¹ de DFB x peixe).

A atividade da GST pode ser indiretamente associada ao estresse oxidativo, uma vez que ela utiliza como co-fator a glutathiona reduzida (GSH), que por sua vez, participa da degradação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), juntamente com a enzima glutathiona peroxidase (GPx) (TEW e RONA, 1999). Porém, a explicação mais provável para a redução da GST no fígado dos pacus expostos ao DFB e TFB, pode ser devido à alta capacidade que as enzimas têm de se ligarem fortemente aos xenobióticos. Como não foram observadas alterações significativas na atividade hepática da CAT (enzima relacionada ao estresse oxidativo), as reduções da GST indicam um possível comprometimento da atividade de metabolização desses compostos químicos no fígado dos animais (BAINY et al., 1996).

Na literatura não foram encontrados trabalhos relacionando a atividade da GST com a exposição ao TFB, mas de acordo com os resultados deste trabalho, a exposição ao TFB parece interferir na atividade hepática da GST de forma semelhante ao DFB.

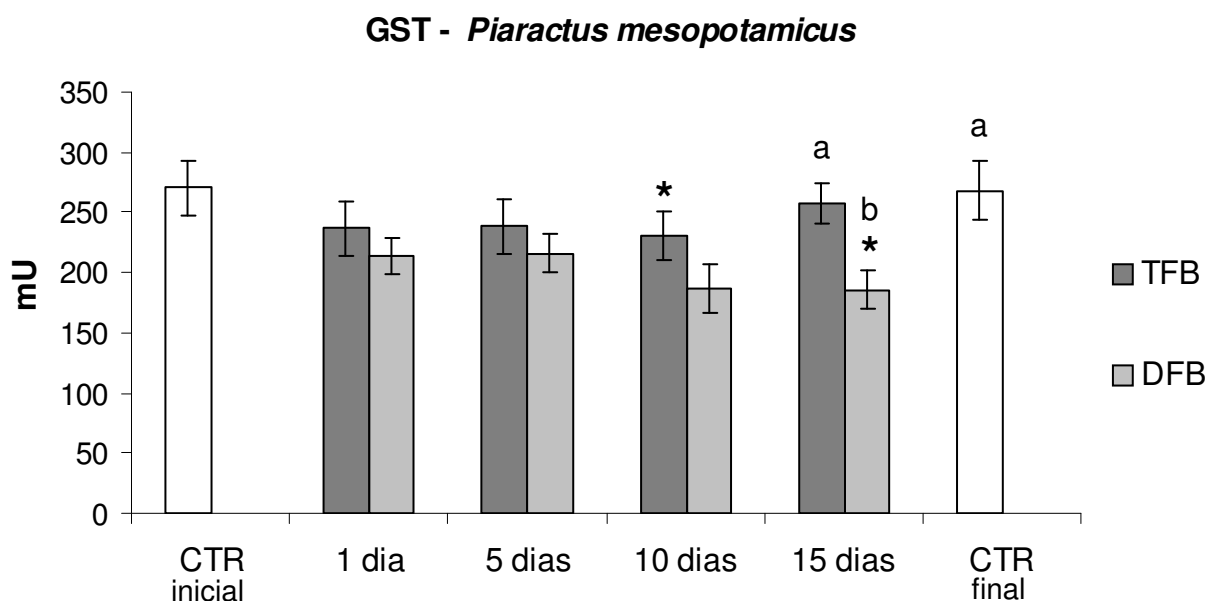


Figura 20. Atividade da enzima hepática glutationa-S-transferase (GST) de *P. mesopotamicus* alimentados durante 1, 5, 10 e 15 dias com ração acrescida de diflubenzuron (DFB) e teflubenzuron (TFB). Grupo controle (CTR). **Nota:** As linhas verticais indicam o erro padrão, n= 7-8. (*) Indicam diferença significativa do grupo controle e as letras indicam variações entre os tratamentos, letras iguais representam valores iguais e letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Acredita-se que o estresse oxidativo provocado pela exposição química resulta na formação de compostos como radicais livres ou oxiradicais (O_2^- , H_2O_2 e $OH^\cdot$) que normalmente reagem com macromoléculas celulares. Estas reações podem resultar em inativação de enzimas, peroxidação de lipídeos, danos no DNA e até morte celular (SWANN et al., 1991; KEHRER, 2000).

A CAT é uma enzima que atua exclusivamente sobre H_2O_2 e facilita a sua remoção das células pela formação de O_2 e H_2O (RONISZ et al., 1999). As alterações da atividade específica da CAT têm sido relatadas como indicador de estresse oxidativo (VAN DER OOST, 2002).

A diminuição da atividade da CAT pode ser atribuída ao comprometimento das vias de tomada de oxigênio ou à alta produção do radical superóxido, visto que o excesso desse ânion pode inibir a atividade da CAT (ARRILLO e MELODIA, 1991; BAINY et al., 1996).

Situações em que o metabolismo está aumentado, principalmente por exposição a xenobióticos, podem causar aumento nos níveis de espécies

reativas podendo levar ao estresse oxidativo, como consequência, em situações normais, seria esperado que os sistemas antioxidantes fossem mais ativados (VAN DER OOST, 2002). Essa resposta não foi observada neste trabalho, visto que a presença dos inseticidas DFB e TFB na ração dos pacus não interfere na atividade da CAT (Figura 21). A atividade da CAT foi significativamente menor somente nos animais alimentados com ração acrescida de TFB, quando comparados com o tratamento com DFB, após 10 dias de alimentação (Figura 25).

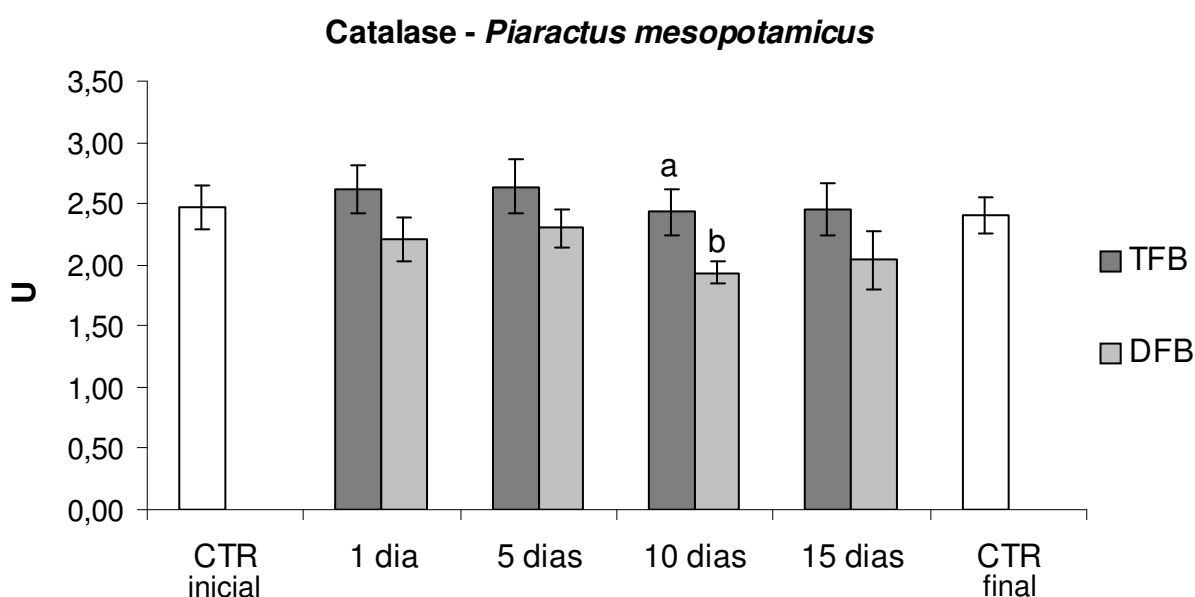


Figura 21. Atividade da enzima hepática catalase (CAT) de *Piaractus mesopotamicus* alimentados durante 1, 5, 10 e 15 dias com ração acrescida de diflubenzuron (DFB) e teflubenzuron (TFB). Grupo controle (CTR). **Nota:** As linhas verticais o erro padrão, n= 7-8. (*) Indicam diferença significativa do grupo controle e as letras indicam variações entre os tratamentos, letras iguais representam valores iguais e letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$).

O aumento da atividade da CAT sugere uma defesa do organismo na tentativa de eliminar espécies reativas de oxigênio. GABRYELAK E KLEOT (1985) observaram aumento dessa enzima no fígado de carpas expostas ao paraquat e ao sedimento contendo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) e bifenilas policloradas (PCBs).

A CAT também pode ter sua atividade diminuída. Segundo DAUTREMEPUITS et al. (2004), a quitosana, composto natural extraído do

exoesqueleto de crustáceos, reduziu a atividade hepática da CAT em carpas (*Cyprinus carpio*) expostas durante 4 dias a 300 mg. L⁻¹ do composto. PANDEY et al. (2003), comparando a atividade de enzimas do sistema detoxificante em peixes siluriformes (*Wallago attu*), também observaram menor atividade da CAT no fígado de animais coletados no rio Yamuna (Índia), que atravessa a área urbana da capital do país e recebe dejetos de origem doméstica e industrial.

Neste trabalho, os inseticidas DFB e TFB administrados na ração dos pacus, não interferiram nos mecanismos de defesa antioxidante desses peixes, indicando que, os biomarcadores bioquímicos utilizados neste trabalho, não foram ferramentas eficientes para se avaliar os efeitos subletais da exposição do pacu a estes inseticidas.

5.2. Padronização e validação do método analítico para DFB e TFB

O método analítico para quantificação de DFB e TFB desenvolvido neste estudo baseou-se na premissa da necessidade de se padronizar um método abrangente para extração e purificação dos dois analitos ao mesmo tempo. Também foi considerado o fato de proporcionar maior segurança ao analista e ao ambiente, por meio do uso de menores volumes de solventes, menores custos e menor tempo de análise.

Os métodos de extração dos inseticidas foram considerados satisfatórios. São simples, rápidos e não foi verificada interferência significativa da matriz durante o processo de extração. A coluna C18 do sistema de cromatografia líquida de alta eficiência foi adequada para determinação e separação analítica do DFB e TFB para as matrizes água (Figura 22), sedimento (Figura 23) e peixe (Figura 24).

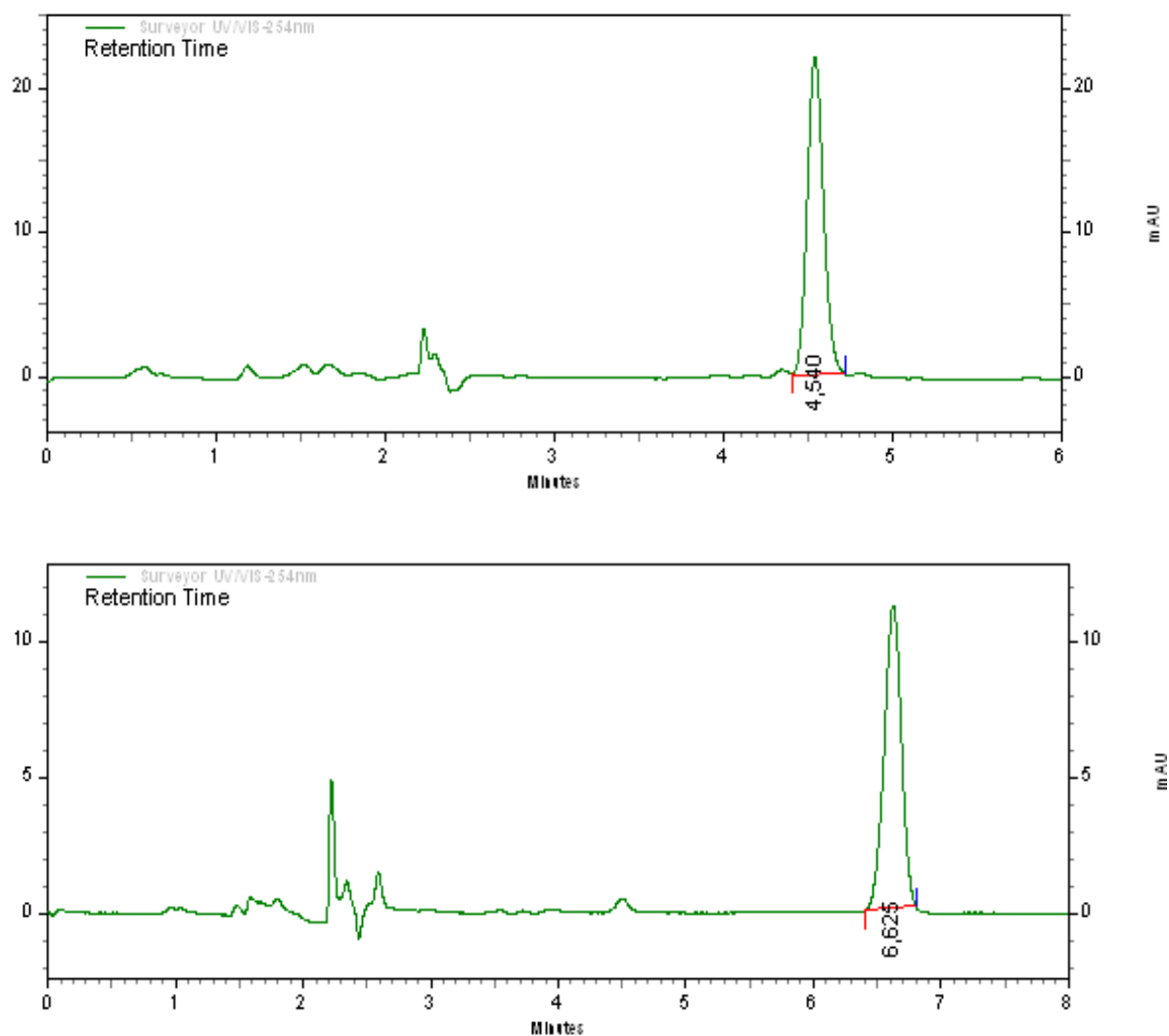


Figura 22. Cromatogramas de amostra de água coletada 24 horas após aplicação de $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de DFB (A) ou TFB (B) na água.

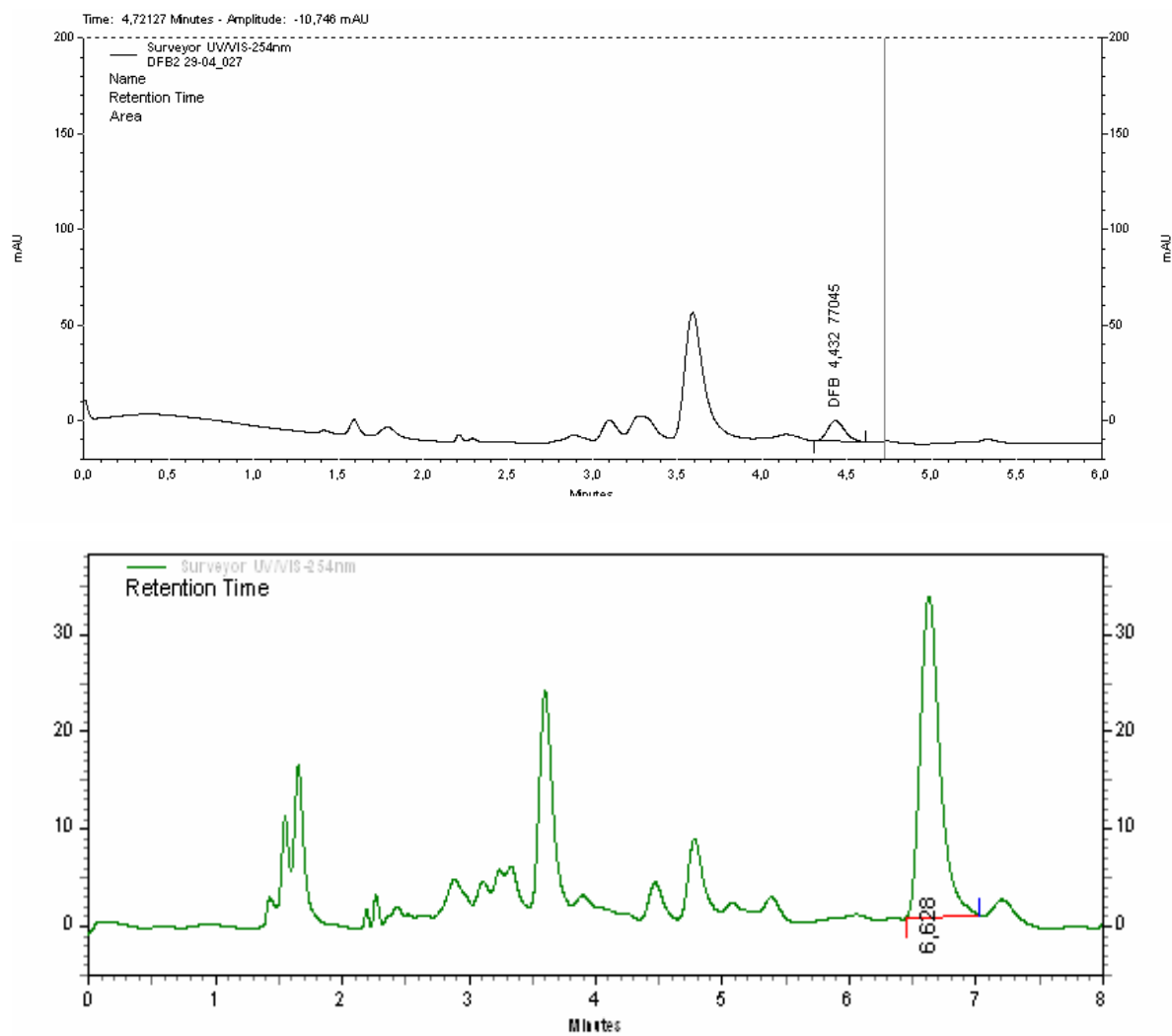


Figura 23. Cromatogramas de amostra de sedimento coletada 24 horas após aplicação de 0,4 mg.L⁻¹ de DFB (A) ou TFB (B) na água.

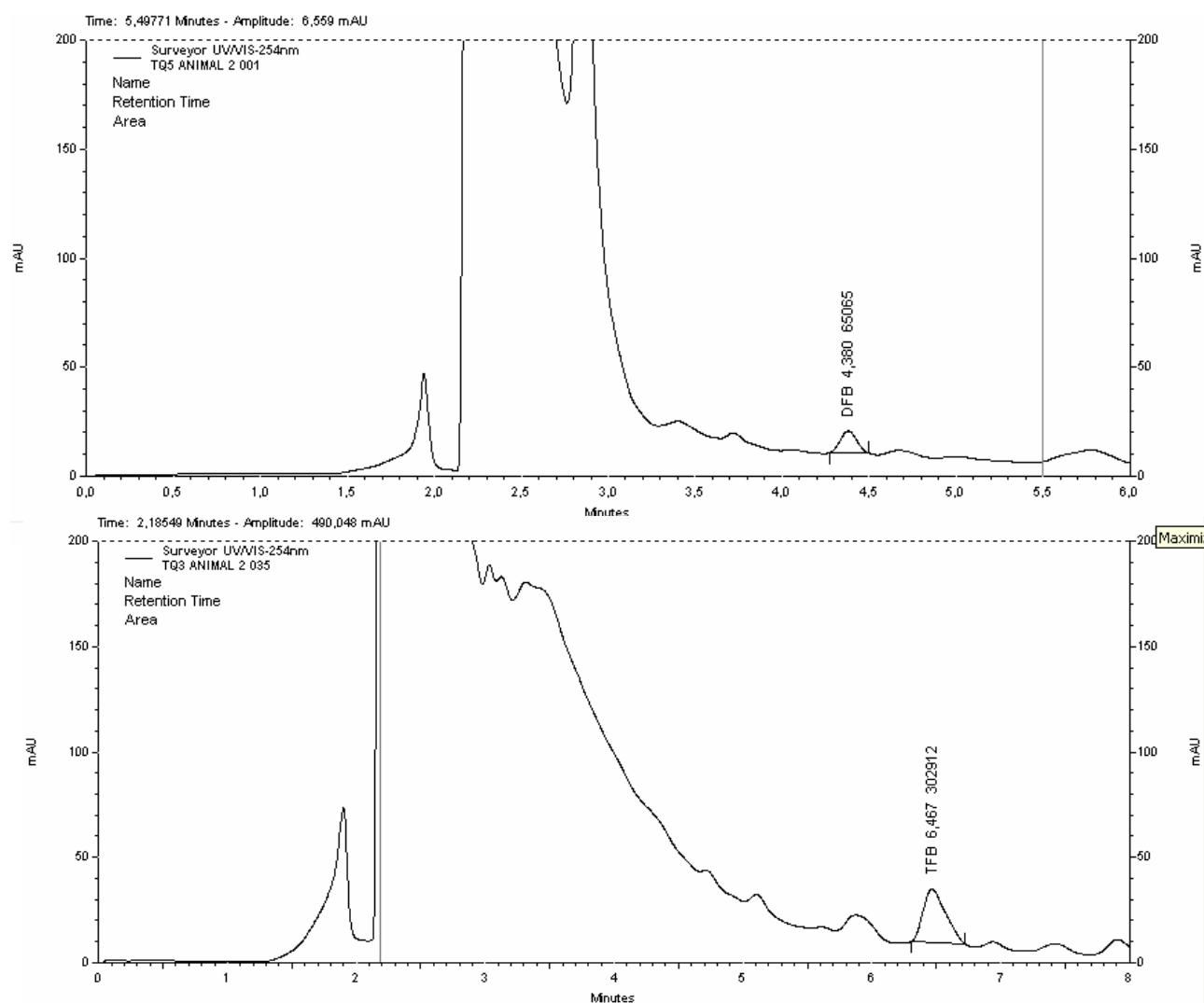


Figura 24. Cromatogramas de amostra de filé do pacu (*P. mesopotamicus*) coletada 24 horas após aplicação de $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de DFB ou TFB na água.

Os valores de recuperação dos inseticidas estão dentro da faixa de aceitabilidade de recuperação definida na norma de boas práticas de laboratório estabelecida pela ANVISA (2005). Os coeficientes de variação dos dois inseticidas foram inferiores a 3,5%, indicando que, os métodos de extração desenvolvidos foram adequados para as matrizes analisadas (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de recuperação (%) e coeficiente de variação (C.V) dos níveis de fortificação dos inseticidas diflubenzuron e teflubenzuron para as matrizes água, sedimento e peixe.

Diflubenzuron			
matriz	nível de fortificação	CV	Recuperação (%)
água	0,1 mg.L ⁻¹	0,1	99,5
	0,5 mg.L ⁻¹	0,0	100,6
sedimento	0,1 µg.g ⁻¹	0,2	97,5
	0,5 µg.g ⁻¹	0,5	96,3
peixe	0,5 µg.g ⁻¹	2,5	78,2
	1,0 µg.g ⁻¹	1,8	79,1
Teflubenzuron			
matriz	nível de fortificação	CV	Recuperação (%)
água	0,1 mg.L ⁻¹	0,2	98,3
	0,5 mg.L ⁻¹	0,1	100,9
sedimento	0,1 µg.g ⁻¹	0,1	101,1
	0,5 µg.g ⁻¹	0,2	100,9
peixe	0,5 µg.g ⁻¹	3,2	76,3
	1,0 µg.g ⁻¹	2,8	79,8

Na literatura foram encontradas metodologias de extração de DFB e TFB em matrizes como solo e sedimento utilizando diferentes solventes na fase de extração. Assim, foram necessários testes para definição do melhor solvente extrator. Dentre os solventes testados para extração dos analitos do sedimento (Tabela 8), o solvente extrator mais eficiente foi o diclorometano, com 104,98% de recuperação para o DFB e 94,1% para o TFB.

Tabela 8. Valores de recuperação e coeficiente de variação (C.V.) proporcionados pelos solventes diclorometano, acetato de etila, acetonitrila e metanol utilizados na extração dos inseticidas diflubenzuron (DFB) e teflubenzuron (TFB) na matriz água.

Solvente	DFB (1 mg.L ⁻¹)		TFB (1 mg.L ⁻¹)	
	Recuperação (%)	C.V. (%)	Recuperação (%)	C.V. (%)
Diclorometano	104,98	1,1	94,1	2,6
Acetato de Etila	58,73	2,0	62,4	3,1
Acetonitrila	60,40	1,4	65,8	2,4
Metanol	79,52	1,6	85,6	2,8

O menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis, denominado LD, obtido para DFB e TFB foi 0,007 mg.L⁻¹. O limite de quantificação (LQ) para os dois inseticidas foi 0,02 mg.L⁻¹, e encontra-se dentro do recomendado pela ANVISA (2005), que determina que o LQ seja 3 vezes maior que o LD (Tabela 9).

Tabela 9. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método padronizado em CLAE para a determinação dos inseticidas DFB e TFB em diferentes matrizes.

Inseticidas	LD (mg.L ⁻¹)	LQ (mg.L ⁻¹)
Diflubenzuron	0,007	0,02
Teflubenzuron	0,007	0,02

5.2.1. Dissipação e acumulação do DFB e TFB na água

Os resíduos de DFB e TFB foram detectados somente nas amostras de água do primeiro experimento, onde os inseticidas foram aplicados diretamente na água dos mesocosmos. No segundo, onde os inseticidas foram acrescidos na ração dos peixes e fornecidos aos animais diariamente, não foram detectados resíduos de DFB e TFB na água dos mesocosmos. Esse resultado pode estar relacionado com a renovação da água, que foi de 2,3 dias. Nas amostras de água coletadas imediatamente após a segunda aplicação dos inseticidas nos mesocosmos, a concentração média foi de 0,2 ± 0,01 mg.L⁻¹ de

DFB e de $0,18 \pm 0,00 \text{ mg.L}^{-1}$ de TFB. Esses valores encontrados correspondem a metade da concentração total ($0,4 \text{ mg.L}^{-1}$) aplicada na água, indicando que os inseticidas sofreram dissipação durante o período de 3 dias de intervalo entre as duas aplicações.

Em relação ao DFB, os resíduos foram detectáveis até 7 dias após a última aplicação na água (Figura 25). Observa-se que 1 dia após a última aplicação ocorreu a dissipação média de aproximadamente 52%, em relação ao total das aplicações na água ($0,4 \text{ mg.L}^{-1}$). A partir do terceiro dia ocorreu aumento na dissipação do inseticida na água, com redução de 85% da concentração total aplicada. A concentração do DFB na água dos mesocosmos permaneceu estável do terceiro ao sétimo dia e os resíduos não foram detectados ao décimo dia (Figura 20).

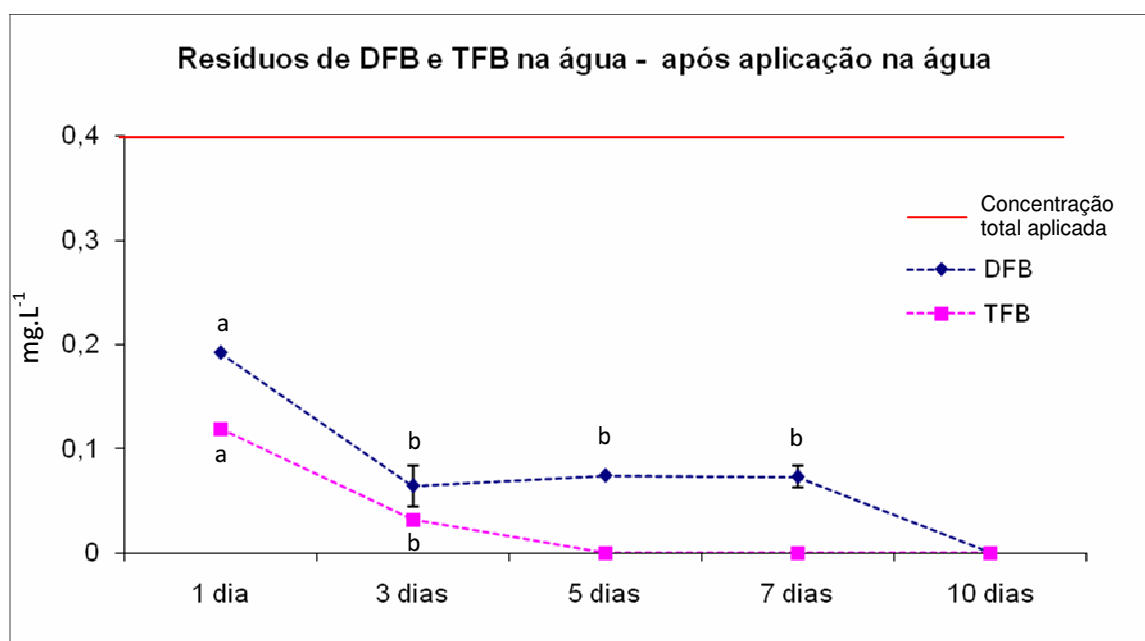


Figura 25. Média dos valores de resíduos (mg.L^{-1}) de diflubenzuron (DFB) e teflubenzuron (TFB) em amostras de água após duas aplicações de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$. Amostras coletadas 1, 3, 5, 7 e 10 dias após a última aplicação dos inseticidas na água. As barras verticais indicam o erro padrão e letras diferentes diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$).

Alguns fatores ambientais devem ser levados em consideração quando se avalia o destino e a persistência de produtos químicos na água. Em muitos estudos têm se avaliado os efeitos de fatores como pH, temperatura, luminosidade e microorganismos no destino e persistência do DFB e TFB no ambiente aquático.

De acordo com METCALF et al. (1975) e SCHAEFER e DUPRAS (1976), a luz solar parece não afetar diretamente a persistência do DFB na água. Da mesma forma, a presença de microorganismos parece ter pouco efeito sobre a concentração de DFB no solos e na água. Em contrapartida, a estabilidade do DFB é influenciada diretamente pelos valores de pH e temperatura.

SCHAEFER e DUPRAS (1976) verificaram que o DFB é menos persistente na água em condições de pH e temperatura altos. FISCHER e HALL (1992) estimaram que a meia vida do DFB na água doce é de aproximadamente 3 dias sob condições de pH 10 e 36°C. Entretanto, na mesma temperatura e em pH 6, o DFB persistiu por aproximadamente 9 dias.

No trabalho conduzido por NIMMO e WILDE (1975), os autores observaram uma relação inversa entre pH e a persistência do DFB na água. A meia vida estimada do DFB na água a 36° C e pH 10 foi de 2,6 dias e em pH 6, de 8,7 dias. SCHAEFER e DUPRAS (1977) encontraram valores semelhantes, com a meia vida do DFB na água a 38° C e pH 10 de 2,1 dias e em pH 7,7, de 7,9 dias.

Neste trabalho, a meia vida do DFB na água foi de 1 dia, em condições de pH $7,2 \pm 0,5$ e temperatura de $26,7 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$ (Tabela 3). Estes resultados encontram-se bem abaixo dos resultados observados na literatura, porém, calculados para ambientes de clima temperado. A redução em 50% de DFB determinada neste trabalho, está abaixo da observada por IVIE et al. (1980), que estimaram uma meia-vida de 7 dias. BOYLE et al. (1996) calcularam uma meia-vida de 2,3 dias do DFB no sedimento em sistemas de mesocosmos.

Em relação ao TFB, na literatura específica são poucos os trabalhos sobre seu comportamento no ambiente aquático, porém, devido à semelhança molecular com o DFB, o TFB provavelmente comporta-se de maneira similar nos compartimentos ambientais.

Em uma publicação da SEPA (1999) foi citado que o TFB não é prontamente biodegradável e se dissolve continuamente na coluna d'água. Devido a sua baixa solubilidade na água, o TFB tende a permanecer no sedimento e na matéria orgânica e é continuamente liberado na água.

Comparado com a concentração inicial aplicada na água, observa-se redução de 70% de TFB nas primeiras 24 horas (Figura 20), sendo que, 3 dias

após a última aplicação foi detectado apenas 8% de resíduo de TFB na água. De acordo com estes resultados, a meia vida do TFB na água foi calculada em 16,8 horas sob as condições de pH $7,3 \pm 0,3$ e temperatura média de $26,5 \pm 1,1^{\circ}\text{C}$ (Tabela 3).

Considerando-se a quantidade de ingredientes ativos aplicados na água dos mesocosmos experimentais no início do experimento, é possível observar que menos de 50% de DFB e 30% de TFB estavam presentes na água 1 dia após a última aplicação dos inseticidas.

No experimento conduzido por SCHAEFER et al. (1980), foi observado que menos de 50% do DFB aplicado permaneceu em fase aquosa, indicando que as características de cristalização própria das benzamidas, limitam a solubilidade deste ingrediente ativo, favorecendo a formação de pequenos cristais e precipitados.

SCHAEFER e DUPRAS (1973) verificaram o efeito da presença de matéria vegetal na concentração de DFB na água e observaram que os processos de adsorção (solo, sedimento, matéria orgânica) podem representar uma grande parcela de perda do DFB da água, sendo comparável com os processos de hidrólise.

Considerando que a ligação dos xenobióticos ao sedimento depende do conteúdo de carbono orgânico, tipo e quantidade de argila, capacidade de troca catiônica, pH e área superficial da partícula dos sedimentos (CONNEL, 1997), e que uma vez concentrados nos sedimentos dos tanques de piscicultura podem funcionar como depósitos destas substâncias (AMARANENI, 2002), a caracterização dos sedimentos passa a ser ponto crítico para conhecimento da dinâmica dos inseticidas nos tanques de piscicultura.

5.2.2. Dissipação e acumulação do DFB e TFB no sedimento

Na Figura 14 está representado o cromatograma da extração de uma amostra do sedimento coletada 24 horas após a aplicação de $0,4\text{ mg.L}^{-1}$ de DFB na água do mesocosmo.

Nas amostras de sedimento, foram detectados resíduos dos inseticidas em todos os tempos experimentais. Comparando-se os dois inseticidas, a acumulação do TFB no sedimento foi maior que o DFB (Figura 26).

Para o DFB, o valor médio de resíduo no sedimento dos mesocosmos no primeiro dia de coleta foi $0,8 \pm 0,28 \mu\text{g.g}^{-1}$. No décimo dia de coleta, a concentração média foi $0,23 \pm 0,01 \mu\text{g.g}^{-1}$, indicando redução de 68,7% em relação ao primeiro dia (Figura 26).

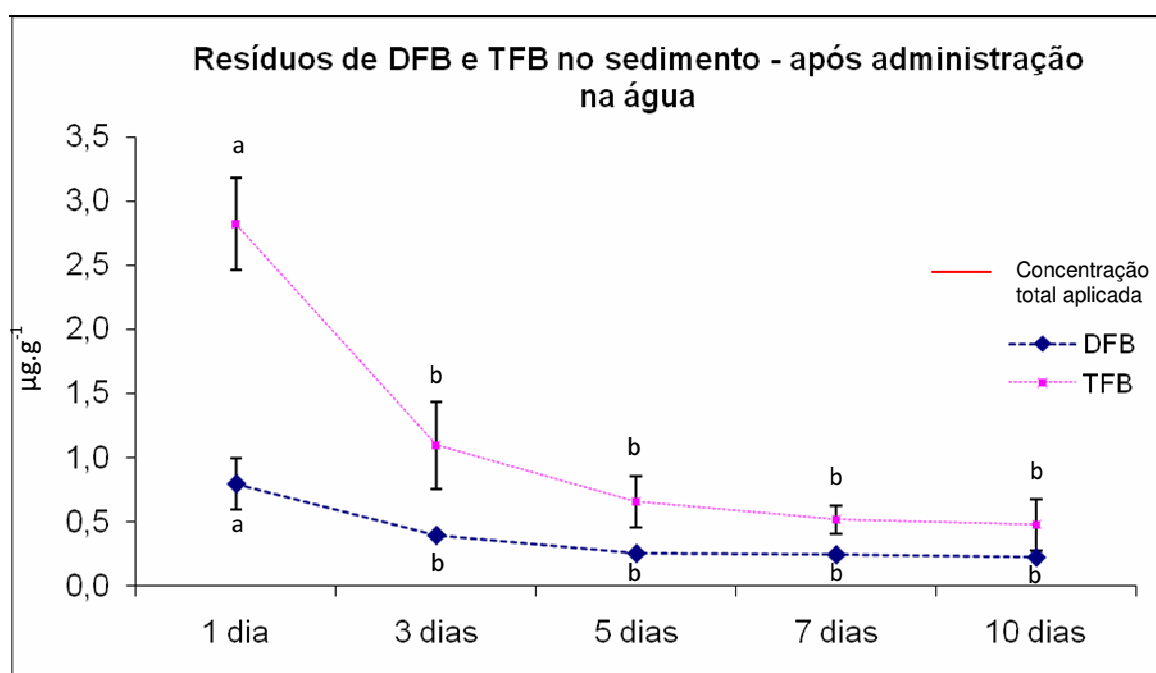


Figura 26. Média dos valores de resíduos ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de diflubenzuron (DFB) e teflubenzuron (TFB) em amostras de sedimento após duas aplicações de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$. Amostras coletadas após 1, 3, 5, 7 e 10 dias após a última aplicação dos inseticidas na água dos mesocosmos. As barras verticais indicam o erro padrão e letras diferentes diferenças significativas entre as médias ($P<0,05$).

Em relação ao TFB, foram observadas altas concentrações do produto ($2,82 \pm 0,87 \mu\text{g.g}^{-1}$), principalmente nas primeiras 24 horas e redução de 81,6% em relação ao décimo dia ($0,48 \pm 0,2 \mu\text{g.g}^{-1}$). De acordo SEPA (1999) e TROUW (1999), a meia vida do TFB calculada no sedimento varia de 104 e 123 dias. No presente estudo, a redução de 50% do TFB foi observada aos 2,3 dias.

SCHAEFER et al. (1980) verificaram que, em ambientes lênticos, menos de 50% do DFB aplicado permanece em fase aquosa, sendo o restante aparentemente adsorvido e precipitado.

Neste trabalho, as concentrações de DFB e TFB determinadas no sedimento foram maiores do que os obtidos nas amostras de água dos mesocosmos, indicando que, apesar dos processos de degradação e hidrólise, resíduos de inseticidas podem ficar adsorvido nas partículas suspensas na água, e essas partículas são sedimentadas ao longo do tempo na coluna d'água.

Na literatura foram observados vários valores de meia vida do DFB no sedimento, indicando a importância da relação entre persistência e as características físico-químicas do solo e da água.

CUNNINGHAM e MYERS (1996) indicaram que os sedimentos da porção supralitoral de pântanos salgados foram o principal compartimento de deposição de DFB, com meia vida calculada de 10 dias. Em outro trabalho, a meia vida do DFB no sedimento de mesocosmos foi de 5,6 (KNUTH e HEINIS, 1995). Entretanto, SELVIK et al. (2002) não observaram redução significativa na concentração do DFB durante 204 dias de experimento, independente da temperatura testada (4 e 14°C) e do tipo de sedimento (lama ou areia). No presente trabalho, foi observada redução de 50% da concentração de DFB no sedimento após 3 dias (Figura 26).

A característica do DFB e TFB de acumular-se no sedimento é extremamente relevante do ponto de vista da exposição à biota ao longo do tempo. Os sedimentos dos tanques de piscicultura podem funcionar como reservatórios de xenobióticos (AMARANENI, 2002) e essas substâncias depositadas nos sedimentos podem, após processos mecânicos, físicos e químicos, ou mesmo biológicos, serem disponibilizados novamente aos peixes.

Dessa forma, deve-se considerar o período de exposição dos peixes ao sedimento após a aplicação de inseticidas na água. Mesmo havendo renovação de água do tanque, lotes mantidos em nos mesmos tanques que receberam inseticidas necessitarão de um maior tempo para que os resíduos sejam eliminados ou metabolizados.

5.2.3. Dissipação e acumulação do DFB e TFB no filé do pacu

Nos ensaios de acumulação de DFB e TFB em filés de pacus, foram detectados resíduos dos inseticidas após a aplicação na água e também nos peixes que foram alimentados com ração acrescida de DFB e TFB.

Em relação ao TFB, nos ensaios com aplicação direta na água, a concentração nos filés diminuiu significativamente ao longo do tempo (Figura 27). semelhante ao observado nas amostras de sedimento e água. Nas primeiras 24 horas após a aplicação, o valor médio resíduo observado foi de $3,5 \pm 1,02 \text{ mg.Kg}^{-1}$, sendo reduzido a $0,28 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ao terceiro dia e não sendo mais detectado a partir do quinto dia (Figura 27). O fator de bioconcentração do TFB nos filés do pacu foi de aproximadamente 8,5 vezes, após 1 dia da última aplicação do TFB na água dos mesocosmos.

Para o TFB, a concentração detectada nos filés foi 17 vezes maior do que a concentração aplicada na água. Na literatura, não foram encontrados dados científicos relativos a bioacumulação do TFB no músculo e órgãos de peixes, após a aplicação do inseticida na água, dificultando a comparação dos dados obtidos neste trabalho.

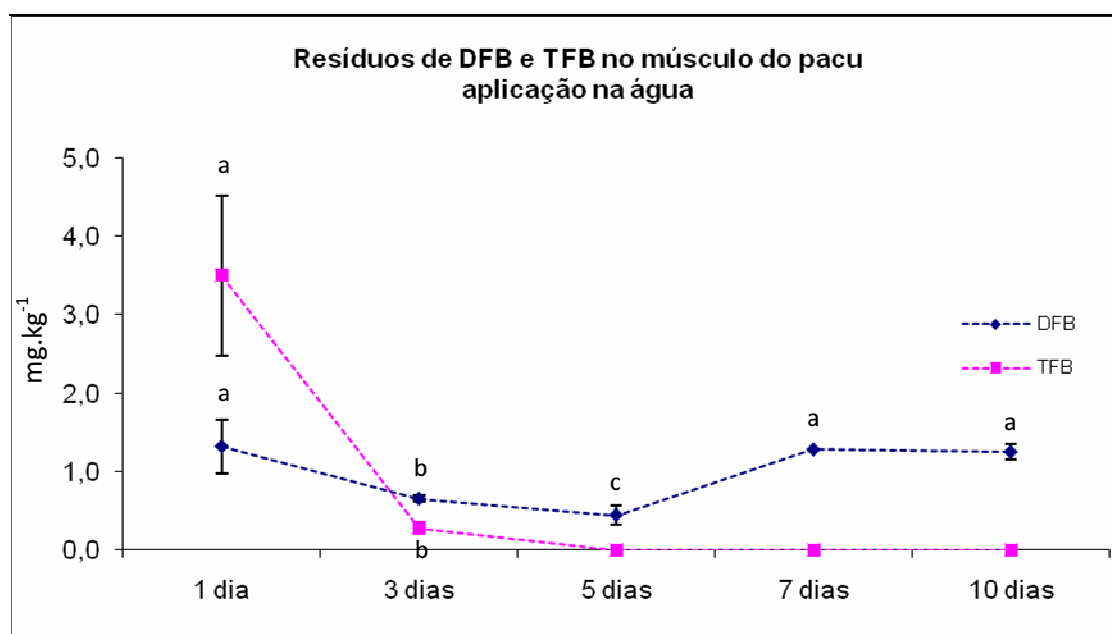


Figura 27. Média dos valores de resíduos (mg.kg^{-1}) de diflubenzuron (DFB) e teflubenzuron (TFB) em amostras de filés do pacu após duas aplicações de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$. Amostras coletadas após 1, 3, 5, 7 e 10 dias após a última aplicação dos inseticidas na água dos mesocosmos. As barras verticais indicam o erro padrão e letras diferentes diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$).

No único trabalho encontrado sobre bioacumulação de DFB em tecidos do pacu (*P. mesopotamicus*), a bioacumulação do inseticida no músculo foi de 17 vezes, nas primeiras 5 horas de exposição. Após esse período não foram observados resíduos nas amostras dos filés dos peixes (LOPES, 2005).

No presente trabalho, a bioacumulação do DFB no músculo do pacu foi apenas 3,3 vezes maior que a concentração aplicada na água. Esses valores encontram-se bem abaixo dos valores encontrados na literatura para outras espécies de peixes.

Segundo ORNE e KEGLEI (2004), a bioconcentração de xenobióticos hidrofóbicos pode mudar em função de características inter e intra-espécies. Essa premissa pode explicar a grande diferença entre os valores de bioconcentração determinados em nosso trabalho e nos valores reportados na literatura.

METCALF et al. (1975) verificaram o acúmulo de DFB em percas (*Pomoxis annularis*) variando de 49 a 123 vezes em relação à concentração na água. SCHAEFER et al. (1980), ao estudarem a dinâmica e o destino do DFB após aplicações em ambientes natural e experimental, verificaram acúmulo de DFB variando de 52 e 113 vezes após 5 dias da aplicação, sendo que, o valor máximo encontrado foi no início do experimento (113 vezes).

Segundo COLWELL e SCHAEFER (1980), o DFB pode se acumular em tecidos e órgãos de peixes, após a administração na água. Esses autores observaram um acúmulo cerca de 40 vezes maior no músculo de peixes (*Ictalurus nebulosus* e *Pomoxis nigromaculatus*) que a concentração inicial ($13 \mu\text{g.kg}^{-1}$) aplicada na água. Altas concentrações de DFB em peixes também foram observados por HAAS-JOBULIUS (1991), que determinou a bioacumulação de DFB na ordem de 95,9 e 119,4 vezes em carpas capim (*Ctenopharyngodon idella*) expostas por 5 dias a 5 e $50 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Nos animais alimentados com as rações medicadas, a maior concentração de resíduos de TFB foi detectada nos filés após 10 dias ($1,42 \pm 0,23 \text{ mg.Kg}^{-1}$), com fator de bioconcentração de 0,14 vezes (Figura 28).

Pouco se conhece sobre a bioacumulação do TFB em espécies de peixes tropicais. De acordo RITCHIE e BAARDSSEN (1997), cerca de 90% do TFB administrado na ração do salmão do atlântico (*Salmo salar*) é eliminada

pelo trato intestinal, imediatamente após o período de tratamento com o inseticida, não sendo observados resíduos na musculatura dos peixes.

Para o DFB, o valor máximo de resíduo ($0,29 \pm 0,43 \text{ mg.kg}^{-1}$) foi observado nos primeiros 5 dias de alimentação, com fator de bioconcentração de 0,07 vezes. Os valores de resíduos não foram significativamente diferentes ao longo dos períodos experimentais (Figura 28).

Nas amostras de músculo dos pacus alimentados com a ração acrescida dos inseticidas DFB ou TFB, a taxa de bioacumulação foi menor comparado com o ensaio da aplicação dos inseticidas diretamente na água dos mesocosmos.

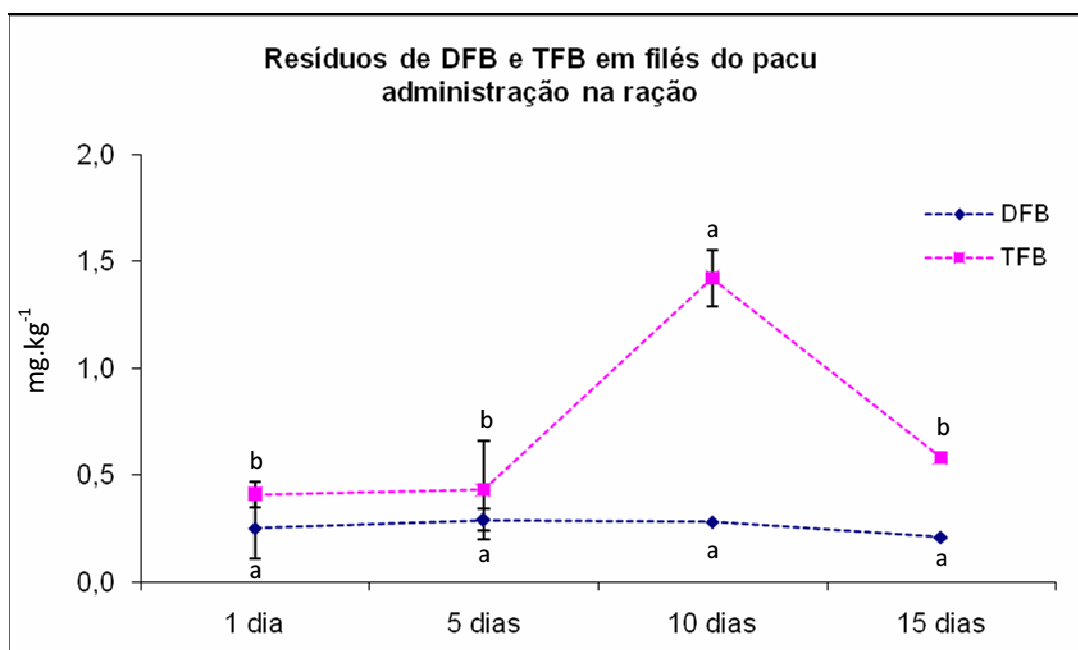


Figura 28. Média dos valores de resíduos (mg.kg^{-1}) de diflubenzuron (DFB) e teflubenzuron (TFB) em amostras de filés do pacu alimentados 2000 mg.kg^{-1} de ração de DFB e 10 mg.kg^{-1} de TFB. Amostras coletadas após 1, 5, 10 e 15 dias de alimentação com a ração medicada. As barras verticais indicam o erro padrão e letras diferentes diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$).

5.3. Risco alimentar para consumo humano de DFB e TFB

De acordo com o *Codex Alimentarius*, níveis de resíduos para diversos alimentos são recomendados aos órgãos governamentais. Entretanto, a exposição humana aos riscos associados ao consumo de produtos provenientes da aquicultura nunca foi claramente determinada pelo Codex. A

quantidade limitada de dados disponíveis sugere a necessidade de mais estudos.

Os limites máximos de resíduos (LMR) de DFB em carnes, recomendadas pelo *Codex Alimentarius*, são: 0,1 mg.kg⁻¹ para vísceras comestíveis e carnes de mamíferos e 0,05 mg.kg⁻¹ para carne de aves domésticas. Para derivados de pescado não há recomendação, assim como não há recomendação do LMR do TFB para alimentos de origem animal.

Considerando os valores de LMR para o DFB, a quantidade de resíduos de detectados nos filés dos pacus submetidos aos tratamentos com o inseticida está acima do limite máximo determinado pelo *Codex* (Tabela 10). O mesmo foi observado para resíduos do TFB (Tabela 11).

Tabela 10. Valores de ingestão diária estimada (IDE) do consumo de filés de pacu coletados 1, 3, 5, 7 e 10 dias após aplicação de 0,4 mg.L⁻¹ de DFB ou TFB na água.

Ingestão Diária Estimada				
dias após aplicação	DFB (IDA = 0,7 mg.kg ⁻¹)		TFB (IDA = 0,7 mg.kg ⁻¹)	
	resíduo músculo (mg.kg ⁻¹)	IDE (mg.dia.pessoa ⁻¹)	resíduo músculo (mg.kg ⁻¹)	IDE (mg.dia.pessoa ⁻¹)
1	1,32	330,0	3,50	875,0
3	0,65	162,5	0,28	70,0
5	0,44	110,0	-	-
7	1,28	320,0	-	-
10	1,25	312,5	-	-

Tabela 11. Valores de ingestão diária estimada (IDE) do consumo de filés de pacu submetidos a tratamento com ração acrescida de 2 000 mg.kg⁻¹ de ração de DFB e 10 mg.kg⁻¹ de ração de TFB durante 1, 5, 10 e 15 dias.

Ingestão Diária Estimada				
dias/tratamento	DFB (IDA = 0,7 mg.kg ⁻¹)		TFB (IDA = 0,7 mg.kg ⁻¹)	
	resíduo músculo (mg.kg ⁻¹)	IDE (mg.dia.pessoa ⁻¹)	resíduo músculo (mg.kg ⁻¹)	IDE (mg.dia.pessoa ⁻¹)
1	0,25	62,5	0,41	102,5
5	0,29	72,5	0,43	107,5
10	0,28	70,0	1,42	355,0
15	0,21	52,5	0,58	145,0

Para os menores valores de resíduos detectados nos filés, numa situação hipotética, o consumo de 250 g de filé com $0,21 \text{ mg.kg}^{-1}$ de DFB corresponderia a 75 vezes mais que a ingestão diária aceitável de DFB. Para o TFB, a ingestão seria mais de 200 vezes maior, ingerindo-se 250 g de filés com $0,58 \text{ mg.kg}^{-1}$ de TFB (Tabela 10 e 11).

Com esses cálculos pode-se observar que a ingestão diária estimada (IDE) de DFB e TFB encontra-se muitas vezes acima dos valores de ingestão diária aceitável (IDA). Mesmo para as amostras com menores valores de resíduos detectados nos filés do pacu os valores são maiores que a ingestão diária aceitável. Dessa forma, o uso desses inseticidas deve ser realizado com cautela, devendo ser estabelecido o período de carência antes da comercialização do produto.

6. CONCLUSÕES

Os inseticidas testados neste trabalho foram considerados praticamente não tóxicos para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), visto que, a $CL_{(50-96h)}$ do DFB foi superior a 2000 mg.L^{-1} e a do TFB foi superior a 1200 mg.L^{-1} .

As metodologias validadas para a extração dos analitos nas matrizes são simples e rápidas. A coluna de superfície interna de fase reversa (C18) do sistema de CLAE é adequada para determinação analítica do DFB e TFB e os solventes utilizados são eficientes no processo de extração.

Comparando-se os inseticidas testados, o TFB foi mais persistente na água, no sedimento e nos pacus alimentados com a ração acrescida desse inseticida. Na aplicação direta dos inseticidas na água, o DFB foi mais persistente nos filé do pacu, sendo detectado em todos os períodos amostrados.

A presença de resíduos de inseticidas nos peixes analisados neste trabalho comprova a importância que a utilização de agroquímicos e drogas veterinárias seja utilizada nas dosagens estabelecidas pelos fabricantes e o período de carência seja respeitado antes da comercialização do produto. A implementação nas atividades aquícolas de sistemas de controle e análise de risco alimentar vem sendo discutida como uma importante ferramenta de

manejo para garantia de segurança alimentar ao consumidor. Países que declinarem da adoção desses sistemas de garantia poderão comprometer suas exportações de pescado, resultando em significativas perdas econômicas.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, S. M. **Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress**. In: MCCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. (Ed.). **Biomarkers of enviromental contamination**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1990.

AHMED, M.T.; EID, A.H. Accumulation of diflubenzuron in bolti fish (*Oreochromis niloticus*). **Nahrung**, Berlin, v.35,n.1,p. 27-31, 1991.

AMARENENI, S. R. Persistence of pesticides in wtaer, sediment and fish from fish farms in Kolleru Lake in Índia. **J. Sci. Food Agric.**, Easton, v.82,p.919-923. 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para validação de métodos analíticos. Resolução nº 475, de 19 de março de 2002. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 20 de mar.2002. Disponível em : <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/475_02re.htm> .Acesso em: 01 jun. 2005.

ARRILLO, A.; MELODIA, F. Nitrite oxidation in *Eisema foetida* (Savigny): ecological implications. **Func. Ecol. Oxford**, v.5, p.629-634, 1991.

BAGCHI, M.; HASSOUN, E.A.; AKUBUE, P.; BAGCHI, D.; STOHS, S.J. Comparative effects of endrin on hepatic lipid peroxidation and DNA damage, and nitric oxide production by peritoneal macrophages from C57BL/6J and DBA/2 mice. **Comp. Biochem. Physiol. C**, New York ,v.105, p.525-529, 1993.

BAINY, A. C. D.; SAITO, E.; CARVALHO, P. S. M.; JUNQUEIRA, V. B. C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aqua. Toxicol.** Amsterdam, v. 34,p. 151-162, 1996.

BARRON, M.G. Bioconcentration: will water-borne organic chemicals accumulate in aquatic animals? **Environ. Sci. Techol.**, Easton,v. 24 n.11, p.1612-1618, 1990.

BASTOS, F. F.; LIMA, L. M.; CUNHA BASTOS V. L. F.; VALENTE L. F.; FRAGA, A. S.; DANTAS R. F.; LOPES R. B.; CUNHA BASTOS, J. Efeito de Dimilin e de Masoten sobre enzimas hepáticas da metabolização de

xenobióticos em pacus. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 8. 2004, Laguna. **Anais...** Laguna: Associação Brasileira de Patologistas de Organismos Aquáticos, 2004.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. 2nd ed., New York. Grune and Stratton, 1975.

BORGHETTI, N.R.B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R. **Aqüicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 1998. 23p.

BOUBOULIS, D.; ATHANASSOPOULOU, F.; TYRPENOU, A. Experimental treatments with diflubenzuron and deltamethrin of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., infected with the isopod, *Ceratothoa oestroides*. **J. Appl. Ichthyol.**, Berlin, v. 20, p.314-317, 2004.

BOYD, C.E.; MASSAUT, L. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. **Aquacul. Eng.**, Essex, v.20, p.113-132, 1999.

BOYLE, T.P.; FAIRCHID, J.F.; ROBSON-WILSON, E.F. Ecological restructuring in experimental aquatic mesocosms due to the application of diflubenzuron. **Environ. Toxic. Chem.**, New York, v.15, n.10, p.1806-1914. 1996.

BRANSON, E. J.; RONSBERG, S. S; RITCHIE, G. Efficacy of teflubenzuron (Calicide®) for the treatment of sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer 1838), infestations of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquac. Res.**, Oxford, v.31, p.861-867, 2000.

CAMPOS, J. L. A falta de produtos registrados para uso em aqüicultura no Brasil – Uma brecha para a imposição de barreiras comerciais e risco para os consumidores. **Panor. Aqüic.**, Rio de Janeiro, Jan-Fev 2005.

CARVALHO, L. N.; ARRUDA, R.; DEL-CASTRO, K. Host-parasite interactions between the piranha *Pygocentrus nattereri* (Characiformes: Characidae) and isopods and branchiurans (CRUSTACEA) in the rio Araguaia basin, Amazônia. **Neotrop. ichthyol.** Porto Alegre, v.2, n.2, p.93-98, 2004.

CARVALHO, L.N.; DEL-CLARO, K.; TAKEMOTO, R.M. Host-parasite interaction between branchiurans (Crustacea: Argulidae) and piranhas (Osteichthyes: Serrasalminae) in the Pantanal wetland of Brazil. **Environm. Biol. of Fishes.**, Dordrecht, v.67, p.289-296, 2003.

Food and Agriculture Organization. Codex Alimentarius. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/web/index_en.jsp>. Acesso em: 20 maio 2007.

COLWELL, A. E.; SCHAEFER, C. H. Diets of *Ictalurus nebulosus* and *Pomoxis nigromaculatus* by diflubenzuron. **Can J. Fish. Aquat. Sci.**, Ottawa, v.37, p.632-639, 1980.

CONNELL, D.W. **Basic concepts of environmental chemistry**. Boca Raton: Lewis, 1997. 506p.

CRUZ, C.; MACHADO-NETO, J.G.; MENEZES, M.L. Toxicidade aguda do inseticida paration metílico e do biopesticida azadiractina de folhas de neem (*Azadirachta indica*) para alevino e juvenil de pacu (*Piaractus mesopotamiscu*). **Pesticidas: ecotoxicologia e meio ambiente**, Curitiba, v.14, p.93-102, 2004.

CUNNINGHAM, P.A.; MYERS, L. E. Dynamics of diflubenzuron (Dimilin) concentrations in water and sediment of a supratidal salt marsh site following repetitive aerial application for mosquito control. **Environ. Pollut. Ser. A, Ecol. Biol.**, v. 41, p. 63-88. 1996.

DAUTREMEPUITS, C.; PARIS-PALACIOS. A.,S.; STÉPHANE BETOULLE, S.; VERNET, G. Modulation in hepatic and head kidney parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.) induced by copper and chitosan. **Comp. Biochem. Physiol. C**, New York, v.137,n.4,p.325-333, 2004.

DRAREDJA, B. H.; SOLTANI, N. Effects of diflubenzuron on growth and glutathione in mosquito fish (*Gambusia affinis*). **Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwk Toegep Biol Wet**, v.66,n.2b,p. 857-62. 2001.

EIRAS, J.C. **Elementos de ictioparasitologia**. Porto Portugal: Fundação Eng. Antônio de Almeida, 1994. 339p.

EISLER, R. Diflubenzuron hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. U.S. **Fish Wildlife service and biological report**, Shepherdstown, v.4, n.25, p.1-36. 1992.

Food and Agriculture Organization. **Pesticides residues in food-1981: report 1981**. Roma, 1981. 69p.

FISHER, S. A.; HALL, L. W. Environmental concentrations and aquatic toxicity data on diflubenzuron (Dimilin). **Crit. Rev. Toxicol.**, New York, v.22,n.1, p.45-79. 1992.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/009/A0699e/A0699E04.htm#4.1.3>> Acesso em: 02 fev. 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura**. Rome: Departamento de pesca de la FAO, 2002.

FOUZ, B.; ESTEVE-GASSENT, M. D.; BARRERA, R.; LARSEN, J. L.; NIELSEN, M. E.; AMARO, C. Field testing of a vaccine against eel diseases caused by *Vibrio vulnificus*. **Dis. Aqua. Org.**,[S.I.], v.45, p.183-189, 2001.

FUJIMOTO, R. Y.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; ONAKA, E. M. Utilização do diflubenzuron no controle de crustáceos parasitos de piaçu, *Leporinus macrocephalus*. Efeitos paraticida e parâmetros hematológicos. In: **SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA**, 11, 133. 1999.

GABRIELLI, M.A.; ORSI, M.L. Dispersão de *Lernaea cyprinacea* (Linneus) (Crustacea, Copepoda) na região norte do estado de Paraná, Brasil. **Rev. Bras. Zool.**, Curitiba, v.17, n.2, p.395-399, 2000.

GABRYELAK, T.; KLEOKOT, J. the effect paraquat on the peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. **Comp. Biochem. Physiol C**, New York, v.81, p.415-418. 1985.

GOKSOYR, A.; FORLIN, L. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. **Aquat. Toxicol.** Amsterdam, v.22, p.287-312, 1992.

GUIMARÃES, G.L. Toxicologia e meio ambiente e legislação específica. In: AREAS. **Curso de proteção de plantas**. Brasília, p.1 – 41, v.8, 1996.

HAAS-JOBULIUS, M. Comparative study on the fate of diflubenzuron and 1-(4-chlorophenyl)-3-(2-chlorobenylcol) urea in laboratory water and fish. **Acta Hydrobiol.**, Krakow, v.15, n.3, p.207-211. 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. Oxford: Clarendon Press, 1998.

HAMED, R.R; FARID, N.M.; ELOWA, SH.E.; ABDALLA, A.M. Glutathione related enzyme levels of freshwater fish as bioindicators of pollution. **Environmentalist**, Hampshire, v.23, p. 313 – 322, 2003.

HAMELINK, J. L.; SPACIE, A. Fish and chemicals: The process of accumulation. **Annual Rev. of Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, v.17, p.167-177, 1999.

HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. Florida: CRC Press, 1997.

HINCAL, F.; GURBAY, A.; GIRAY, B., Induction of lipid peroxidation and alteration of glutathione redox status by endosulfan. **Biol. Trace Elemen. Res.**, Clifton, v.47, p.321-326, 1995.

HUGGET, R. J.; KIMERLE, R. A.; MEHRLE, J. R.; BERGEMAN, H. L. **Biomarkers:** biochemical, physiological and hystological markers of antropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Avaliação da toxicidade aguda para peixes.** In:_____.Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos. Brasília, p.20 – 32, 1987.

IVE, G.W.; BULL, D.I.; VEECH, I.A. Fate of diflubenzuron in water. **J Agric. Food Chem.**, Easton, v.28, p.330-337, 1980.

JOBLING, M. Osmotic and ionic regulation – water and salt balance. **Environ. Biol. Fishes**, Dordrecht, v.16, p.211-249. 1995.

KEEN, J. H.; WILLIAN, B. J. Mechanism for the several activies of the glutationa-S-transferases. **J. Biol. Chem.**, [S.I.], v.20, n.251, p.6183-6188, 1976.

KEHRER, J. P. The Harber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicol.**, Limerick, v.149, p.43-50. 2000.

KNUTH, M.; HEINIS, L. Distribution and persistence of diflubenzuron within littoral enclosure mesocosm. **J. Agric. Foof Chem.**, Easton, v.43, p.1087-1097, 1995.

LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise.** São Carlos: RiMA, 2004. 62p.

LAVORENTI, A.; GIANNOTTI, O. Resíduos de pesticidas em alimentos e segurança dos consumidores. **Rev. Agricul.**, [S.I.], v.65, n.1, p.15-35. 1990.

LEMAIRE, P.; LIVINGSTONE, D.R. Pro-oxidante/antioxidante processes and organcic xenobiótico interations in marine organisms, in particular the flowder *Platichrys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. **Trends. Com. Biochem.** [S.I.], v.1, p.1119-1150, 1993.

LESTER, R.J.G.; ROUBAL, F.R. Phylum Arthropoda. In: **WOO, P.T.K. (ed) Fish Disease and Disorders, 1. CAB International**, University Press, Cambridge, 808p. 1995.

LOPES, R. B. **Análise ecotoxicológica dos xenobióticos triclórforon e diflubenzuron empregados na aquicultura continental.** 2005. 104 p. Tese (Doutorado em Ciências) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MABILIA, R. G; SOUZA, S. M. G; SCHIFFINO, L. Uso do Diflubenzuron na aquacultura no tratamento de ectoparasitoses – restrições de uso. In: **CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA**, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2004.

MARTINEZ, C. B. R.; SOUZA, M. M. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. **Comp. Biochem. Physiol.**, New York, A. v.133, p.151-160. 2002.

MAXIMIANO, A.A.; FERNADES, R. O. NUNES, F.P. ASSIS, M.P.; MATOS, R.V.; BARBOSA, C.G.S.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicas e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos a saúde humana e ambiental. **Ciencia e saúde coletiva**, v.10,n.2, p.483-491. 2005.

MÉNDEZ, N. Effects of teflubenzuron on larvae and juveniles of the polychaete *capitella* sp. B from Barcelona, Spain. **Water, Air, and Soil Pollution**, Dordrecht, v.160, p.259–269, 2006.

METCALF, R. L.; LU, P. Y.; BOWLUS, S. Degradation and environmental fate of 1-(2,6-diflubenzoyl)-3-(4-chlorophenyl) urea. **J Agric. Food Chem.**, Easton, v.23, n.3, p.359–364, 1975.

MIDLEN, A.; REDING, T.A. **Environmnetal management for aquaculture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000, 223p.

MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRANCALOSSI, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, 2004. p.343-386.

NECEKER, A. V.; McKINNEY, P.; CAIRNS, M.A. Acute and chronic effects of Diflubenzuron (dimilin) on freshwater fish and invertebrates. **Environ. Toxicol. Chem.**, New York, v.2, p.239, 1983.

NIMMO, W. B.; WILDE, P. C. **Degradation of diflubenzuron in soil and natural water, in diflubenzuron**: Decision Document, EPA, Office of Pesticides Programs, Washington, D.C.: Office of Pesticides Programs, 1975.

ORNE, S.; KEGLEY, S. **Pesticide database**. San Francisco, CA. 2007. Disponível em: <<http://www.pesticideinfo.org>>. Acesso em 10 ago. 2007.

ORUÇ, E. Ö.; ÜNER, N. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, New York, v.127, p. 291-296. 2000.

PAVANELLI, G.C. EIRAS, J.C. TAKEMOTO, R.M. **Doenças de peixes:** profilaxia, diagnóstico e tratamento. Ed. UEM: Maringá, 1998, 264p.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; MAGALHÃES, A.R.M. Sanidade de peixes, rãs, crustáceos e moluscos. In: **VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.R. (Eds.) Aquicultura no Brasil.** Bases para um desenvolvimento sustentável. Brasília, CNPq/MCT, 399p, 2000.

PEAKALL, D. B. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. **Toxicol. Ecotoxicol.** [S.l.], p.50-60. 1994.

PIASECKI, W.; GOODWIN, A.E.; EIRAS, J.C.; NOWAK, B.F. Importance of Copepoda in freshwater aquaculture. **Zool. Stud.**, v.43, n.2, p.193-205, 2004.

QUEIROZ, J.F.; LOURENÇO, J.N.P.; KITAMURA, P.C. A EMBRAPA e a aquicultura: demandas e prioridade de pesquisa.,Brasília.Disponível: <http://www22.sede.embrapa.br/unidas/uc/sge/texto11.pdf>. 2002. Acesso em: 05 ago. 2007.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications.** Whashington: Hemisphere Publishing Corporation, 1985.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; RODRIGUES, E.L.; EIRAS, A.C.; VEIGA, M.L.; PACHECO, F.J. Alterações hematológicas em curimatá, *Prochilodus scrofa* STEINDACHNER, 1881, exposto ao Dipterex 500 (trichlorfon). **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v.24, p.187-196. 1997.

REILLY,A.; KÄFERSTEIN, F. Food safety hazards and the application of the principles of the hazard analysis and critical control point (HACCP) system for their control in aquaculture production. **Aqua. Res.**, Oxford, v.28, p.735-752. 1997.

RIBEIRO, L.; TRIBESS, T.; TORRES, M.A.; SOARES, C.H.L; PEDROSA, R.C.; AGOSTINI, J.; BUENO, A.; WILHELM-FILHO, D.. Estresse oxidativo em tilápia (*Oreochromis niloticus*) exposta ao efluente de indústria têxtil. In: Espíndola, E.L.G. (Ed.). **Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI.** São Carlos: Rima Editora, 2000.

RITCHIE, G.; BAARDSEN, G. Digestibilidade of teflubenzuron in Atlantic salmon (*Salmo salar*), p. 187-97. 1997.

RONISZ, D.; LARSSON, J. D. G.; FÖRLIN, L. Seasonal variations in the activities of selected hepatic biotransformation and antioxidant enzymes in eelpout (*Zoarces viviparus*). **Comp. Biochem. Physiol. C**, New York, v.124, p.271-279. 1999.

SANTOS, R.L. **O uso de praguicidas nas atividades aquícolas: destino e efeitos após aplicações em tanques experimentais e avaliação nas pisciculturas e pesqueiros da bacia do rio Mogi-Guaçu.** 2007. 158p, Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2007.

SAYEED, I.; PARVEZ, S.; PANDEY, S.; BIN-HAFEEZ, B.; HAQUE, R.; RAISUDDIN, S., Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa Punctatus* Bloch. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v.56, p. 295-301, 2003.

SCHAEFER, C. H.; DUPRAS, E. F. Factors affecting the stability of dimilin in water and the persistence of dimilin in field waters. **J. Agric. Food Chem** , Easton, v.24, p. 733. 1976.

SCHAEFER, C. H.; DUPRAS, E. F. Residues of diflubenzuron [1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea] in pastures soil, vegetation and water following aerial applications **J. Agric. Food. Chem.**, Easton, v.25, p.1026. 1977.

SCHAEFER, C.H.; COLWELL, A.E.; DUPRAS JR., E.F. The occurrence of p-chloroaniline and p-chlorofenylurea from the degradation of diflubenzuron and water and fish. California Mosquito and vector control association. In: **ANNUAL CONFERENCE**, 48., p.84-89. 1980.

SCHAEFER, C.H.; COLWELL, A.E.; DUPRAS JR., E.F. The outlook for new, chemical, mosquito control agents. **Proc. Utah Mosq. Abate. Assoc.** [S.I.], v.26, 13p. 1973.

SCHALCH, S.H.C.; BELO, M.A.A.A; SOARES, V.E.; MORAES, J.R.E; MORAES, F.R. Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustácea: Brachiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infectados. *Acta Sci. Anim. Sci.* [S.I.], v.27, n.2, p.297-302, 2005.

SELVIK, A.; HANSEN, P.K.; ERVIK, A.; SAMUELSEN, O.B. The stability and resistance of diflubenzuron in marine sediments studied under laboratory conditions and dispersion to the sediment under a fish farm following medication. **Sci. Total Environ.**, Amsterdam, v.285, p.237-254. 2002.

SCOTTISH ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Calicide (teflubenzuron) – Authorisation for use as an in-feed sea loach treatment in marine cage salmon farms.** Risk assessment, EQS and recommendations. 1999.(Policy, 29).

SHEPHERD, J. fish health and disease. In: **SHEPHERD, J.; BROMAGE, N.R. (eds) Intensive Fish Farming.** Oxford, Blackwell Science, 404p. 1993.

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

SPRAGUE, J.B. Measuring of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. **Water Res.**, Exeter, v.4, n.3, p.793-821, 1969.

SWANN, J.D.; SMITH, M.W.; PHELPS, P.C.; MAKIL, A.; BEREZESKY, I.K.; Trump, B.F., Oxidative injury induces influx-independent changes in intracellular calcium homeostasis. **Exp. Toxicol. Pathol.**, Jena, v.19, p.128-137, 1991.

TANNER, D. K; MOFFET, M. F. Effects of diflubenzuron on the reproductive success of bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. **Environ. Toxicol. Chem.**, New York, v.14, n.8, p. 1345-1355. 1995.

THATCHER, V.E.; BRITES-NETO, J.B. Diagnóstico, Prevenção e Tratamento de Enfermidades de peixes neo tropicais de água doce. **Rev. Bras. Med. Vet.**, Rio de Janeiro, v.16, n.3, p.111-128. 1994.

TOMITA, R.Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.135-142, 2002.

VAN DER OOST, R; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, Amsterdam, v.13, p.57-149. 2002.

VILLEM, R. DEL-CARRATORE, C. R.; MACHADO, J. H. Eficácia do tratamento terapêutico com dimetil-paration e acículas de pinus (*Pinus Elliot*) em peixes acometidos por lernioses (*Lernaeae sp.*) **Anais Aquicultura Brasil**, v.98, n.2, p.639-695. 1998.

VINATEA-ARANA, L.A. **Aqüicultura e desenvolvimento sustentável: subsídios para a formulação de políticas de desenvolvimento da aqüicultura brasileira.** Florianópolis: Ed. UFSC, 1999. 310p.

WINKALER, E. U.; SANTOS, T. R.M.; MACHADO-NETO, J.G.; C. B.R. MARTINEZ. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comp. Biochem. Physiol.C**, New York, v.145, n.2, 2007.

WINSTON, G.W.; REGOLLI, F.; DUGAS, A.J.; FONG J.H.; BLACHARDL, K.A. A rapid gas-chromatographic assay for determination oxyradical scavenging of antioxidants and biological fluids. **Adv. Free Radic. Biol. Med**, New York, v.24, p.480-493. 1998.