

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

**SELEÇÃO DE BIOINDICADORES AQUÁTICOS
PELA TOXICIDADE AGUDA E RISCO
AMBIENTAL DO INSETICIDA FIPRONIL**

Naiara Fernanda Ignácio

Bióloga, Mestranda em Aquicultura pelo Centro de Aquicultura da FCAV/UNESP
(CAUNESP), Campus de Jaboticabal.

Jaboticabal – São Paulo
Julho, 2014

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

**SELEÇÃO DE BIOINDICADORES AQUÁTICOS
PELA TOXICIDADE AGUDA E RISCO
AMBIENTAL DO INSETICIDA FIPRONIL**

Naiara Fernanda Ignácio

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto

Dissertação apresentada ao Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Jaboticabal – São Paulo
Julho, 2014

Ignácio, Naiara Fernanda

I24s

Seleção de bioindicadores aquáticos pela toxicidade aguda e risco ambiental do inseticida fipronil / Naiara Fernanda Ignácio. Jaboticabal. 2014. 65 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da Unesp, 2014.

Orientadores: Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto

Banca examinadora: Claudinei da Cruz e Marco Antônio de Andrade Belo

Bibliografia:

1. fipronil. 2. ecotoxicidade. 3. risco ambiental. 4. biomonitoramento. I. Seleção de bioindicadores aquáticos pela toxicidade aguda e risco ambiental do inseticida fipronil. II. Jaboticabal – Centro de Aquicultura da Unesp.

CDU 591.524.1

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de Jaboticabal.

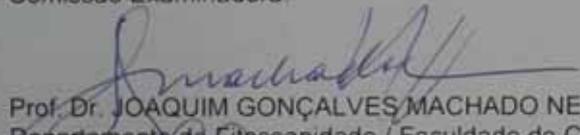
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: SELEÇÃO DE BIOINDICADORES AQUÁTICOS PELA TOXICIDADE AGUDA E RISCO AMBIENTAL DO INSETICIDA FIPRONIL

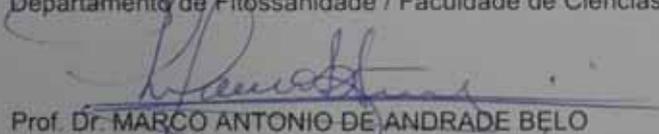
AUTORA: NAIARA FERNANDA IGNÁCIO

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOAQUIM GONÇALVES MACHADO NETO

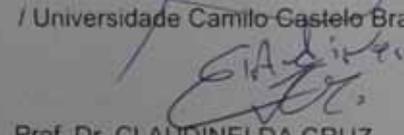
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Aqüicultura , pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOAQUIM GONÇALVES MACHADO NETO

Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO

/ Universidade Camilo Castelo Branco


Prof. Dr. CLAUDINEI DA CRUZ

Defesa Fitossanidade - Fcav / Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Data da realização: 29 de julho de 2014.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto, pela orientação, dedicação e paciência. Obrigada por ter investido seu tempo e atenção em meu interesse de desenvolver este trabalho e por todo o ensinamento durante meu curso.

Agradecimento especial aos meus pais, Shirley Ferreira Ignácio e Luiz Carlos Vieira Ignácio, e minha irmã, Natália Ariele Ignácio, pelo apoio, convivência neste tempo de mestrado e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos amigos, Juliana Heloísa Américo, Cynthia Venâncio Ikefuti, Ana Cristina Fausto Gírio, Taíse Florêncio, Jéssica Servidone, Silvia Patrícia Carraschi, Érica Soares Roncoletta, que acreditaram em mim e me apoiaram em todas as minhas decisões, obrigada pelos bons momentos e pelas boas conversas que sempre me ajudaram a traçar o melhor caminho.

Ao meu namorado, amigo e companheiro Felipe Escudeiro Pavani, que esteve comigo nos dias finais de experimentos e escrita deste trabalho, oferecendo toda ajuda, atenção e carinho que eu poderia receber.

Aos amigos e colegas de laboratório: Maria Amália da Silva, Ângela A. Machado, Ana Carla Coleone e Márcia Macri, pela amizade e colaboração.

Ao Professor Dr Claudinei da Cruz, por estar sempre disposto a ajudar.

A toda equipe NEPEAM, pela ajuda e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Secretária da Pós-graduação do CAUNESP, Veralice Capatto e David Oliveira Lorente pela paciência e amizade.

Ao Centro de Aquicultura da UNESP pelo oferecimento e oportunidade da realização do curso de Mestrado.

Este projeto foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo geral.....	5
2.2. Objetivos específicos	5
3. REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1. Fipronil.....	6
3.2. Ensaio ecotoxicológico com fipronil.....	7
3.3. Risco de intoxicação ambiental.....	8
3.4. Organismos-teste.....	9
3.4.1. Peixes	10
3.4.2. Caramujos.....	11
3.4.3. <i>Daphnia magna</i>	11
3.4.4. Macrófitas.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Local de realização dos ensaios.....	13
4.2. Aclimação e manutenção dos organismos.....	13
4.3. Ensaio de toxicidade aguda para peixes e caramujos	15
4.4. Ensaio de toxicidade aguda para <i>Daphnia magna</i>	16
4.5. Ensaio de toxicidade aguda para <i>Lemna minor</i> e <i>Azolla caroliniana</i>	17
4.6. Classificação do fipronil pela toxicidade aguda.....	18
4.7. Avaliação do risco de intoxicação ambiental do fipronil	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21

5.1. Toxicidade aguda e classificação ecotoxicológica do fipronil para peixes.....	21
5.1.1. Mato-grosso (<i>H. eques</i>).....	21
5.1.2. Pacu (<i>P. mesopotamicus</i>).....	25
5.1.3. Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	27
5.2. Toxicidade aguda e classificação ecotoxicológica do fipronil para caramujos <i>P. canaliculata</i>	30
5.3. Toxicidade aguda e classificação ecotoxicológica do fipronil para <i>Daphnia magna</i>	32
5.4. Toxicidade aguda e classificação ecotoxicológica do fipronil para macrófitas.....	34
5.4.1. <i>Lemna minor</i>	34
5.4.2. <i>Azolla caroliniana</i>	36
5.5. Variação da relação entre as concentrações de fipronil e mortalidade das espécies.....	37
5.6. Avaliação do risco de intoxicação ambiental do fipronil	39
5.7. Seleção das espécies mais adequadas para monitoramento de contaminação de águas com fipronil.....	45
6. CONCLUSÕES	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A) Caixa de aclimatação dos peixes. B) Exemplo de seleção dos animais para utilização no ensaio de toxicidade aguda.....	14
Figura 2. A) H. eques. B) Natação errática e mortalidade durante os ensaios de toxicidade aguda. C e D) Ensaio de toxicidade aguda.....	23
Figura 3. A) Ensaio de toxicidade aguda para o pacu. B) Mortalidade dos peixes na concentração de 0,5 mg L ⁻¹	26
Figura 4. A) Ensaio de toxicidade aguda para tilápia. B) Mortalidade dos peixes em 0,1 mg L ⁻¹	29
Figura 5. A e B) Ensaios de toxicidade aguda do fipronil para o caramujo.....	31
Figura 6. A e B) Ensaio de toxicidade aguda do fipronil para <i>D. magna</i>	33
Figura 7. A e B) Ensaio de toxicidade aguda do fipronil para <i>L. minor</i>	35
Figura 8. A e B) Ensaio de toxicidade aguda do fipronil para <i>A. caroliniana</i>	36
Figura 9. Gráficos da relação entre a concentração de fipronil e porcentagem média de mortalidade de cada espécie avaliada.....	38

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classes de toxicidade aguda para organismos aquáticos (ZUCKER, 1985).....	19
Tabela 2. Classes de risco ambiental de compostos tóxicos de acordo com os valores calculados do quociente Q.	19
Tabela 3. Porcentagem média e desvio padrão de mortalidade dos três ensaios definitivos com fipronil para o mato-grosso.....	21
Tabela 4. Sinais de intoxicação observados em 24 e 48h nos ensaios definitivos com fipronil para o mato-grosso.....	22
Tabela 5. Variáveis de oxigênio dissolvido durante os ensaios de toxicidade aguda do fipronil para os peixes da espécie mato-grosso (0; 24 e 48 horas de exposição).....	24
Tabela 6. Porcentagem média e desvio padrão de mortalidade dos três ensaios definitivos com fipronil para o pacu.....	25
Tabela 7. Sinais de intoxicação observados em 24 e 48h nos ensaios definitivos com fipronil para o pacu.....	26
Tabela 8. Variáveis de oxigênio dissolvido durante os ensaios de toxicidade aguda do fipronil para os peixes da espécie pacu (0; 24 e 48 horas de exposição).....	27
Tabela 9. Porcentagem média e desvio padrão de mortalidade dos três ensaios definitivos com fipronil para a tilápia.....	28
Tabela 10. Sinais de intoxicação observados em 24 e 48h nos ensaios definitivos com fipronil para a tilápia.....	28

Tabela 11. Variáveis de oxigênio dissolvido durante os ensaios de toxicidade aguda do fipronil para os peixes da espécie tilápia (0; 24 e 48 horas de exposição).....	30
Tabela 12. Porcentagem média e desvio padrão de mortalidade dos três ensaios definitivos com fipronil para o caramujo.....	30
Tabela 13. Variáveis de oxigênio dissolvido durante os ensaios de toxicidade aguda do fipronil para o caramujo (0, 24 e 48 horas de exposição).....	32
Tabela 14. Porcentagem média e desvio padrão de mortalidade dos três ensaios definitivos com fipronil para a <i>Daphnia magna</i>	33
Tabela 15. Porcentagem média e desvio padrão de mortalidade dos três ensaios definitivos com fipronil para a <i>Lemna minor</i>	34
Tabela 16. Porcentagem média e desvio padrão de intoxicação dos três ensaios definitivos com fipronil para a <i>Azolla caroliniana</i>	36
Tabela 17. Toxicidade de alguns herbicidas para <i>A. caroliniana</i> (SILVA et al., 2012)	37
Tabela 18. Valores (Q) da relação entre as diluições da CAE para um corpo de água de profundidade de 0,30 m e a CL50 para cada espécie avaliada.....	40
Tabela 19. Classificação do risco de intoxicação ambiental em um corpo de água de 0,3 m de cada diluição da CAE para cada espécie avaliada.....	41
Tabela 20. Valores (Q) da relação entre as diluições da CAE para um corpo de água de profundidade de 2,0 m e a CL50 para cada espécie avaliada.....	42
Tabela 21. Classificação do risco de intoxicação ambiental em um corpo de água de 2,0m de cada diluição da CAE para cada espécie avaliada.....	43

RESUMO

O uso do inseticida fipronil em grandes quantidades pode gerar resíduos no ambiente, principalmente nos ambientes hídricos. Assim, objetivou-se: 1) classificar o fipronil pela toxicidade aguda (CL(I)50 ou CE(I)50) para sete espécies aquáticas; 2) selecionar as espécies não alvos mais adequadas para monitorar a contaminação das águas com fipronil com base em três classificações de risco de intoxicação ambiental; e 3) avaliar as alterações nas variáveis da qualidade de água nos ensaios de toxicidade aguda para peixes e caramujo. Para tanto, foram realizados ensaios de toxicidade aguda para cada espécie de acordo com as normas da ABNT (2011) e os valores de CL50 foram classificados de acordo com Zucker (1985). As espécies avaliadas foram os peixes mato-grosso (*Hyphessobrycon eques*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*); o caramujo (*Pomacea canaliculata*), a *Daphnia magna*, e as macrofitas aquáticas *Lemna minor* e *Azolla caroliniana*. O risco ambiental do fipronil foi classificado de acordo com três tipos de classificação, calculado pela divisão entre o valor da concentração ambiental estimada (mgL^{-1}) pela CL(I)50 ou CE(I)50 (mg L^{-1}) para cada espécie. A CL50;48h do fipronil foi de: 0,28 mg L^{-1} para o mato-grosso; 0,45 mg L^{-1} para o pacu; 0,08 mg L^{-1} para a tilápia; a CE50;48h foi de 2629,08 mg L^{-1} para o caramujo; 0,025 mg L^{-1} para a *D. magna*; a CL50;7d foi de 3283,29 mg L^{-1} para a *L. minor*, e 7855,41 mg L^{-1} para a *A. caroliniana*. O fipronil classifica-se como extremamente tóxico para a tilápia e a *D. magna*; altamente tóxico para o mato-grosso e pacu; e praticamente não tóxico para o caramujo e para as macrófitas. A *D. magna* e os peixes são as espécies mais adequadas para monitorar a contaminação de ambientes aquáticos por fipronil. O fipronil pode causar diferentes níveis de redução do oxigênio dissolvido após 48 horas da diluição.

Palavras-chave: fipronil, ecotoxicidade, risco ambiental, biomonitoramento

ABSTRACT

The use of fipronil pesticide in large quantities can contaminate water resources near areas where it has been used. So, the aim was: 1) classify the fipronil by acute toxicity according to lethal concentration values (LC50 or EC50) for seven aquatic species; 2) select the best non targets species to follow the aquatic contamination by fipronil based in three kinds of environmental risk classification; 3) evaluate changes in water quality caused by fipronil in acute toxicity tests for fishes and snail. For this, acute toxicity tests were performed for each specie according to ABNT (2011) rules, and the LC50 values were classified according to Zucker (1985). Tested species were: mato-grosso (*Hyphessobrycon eques*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*); the snail (*Pomacea canaliculata*), *Daphnia magna*, the macrophytes *Lemna minor* e *Azolla caroliniana*. Environmental risk of fipronil was classified according to three methodologies, calculated by division between estimated environmental concentration of fipronil (mg L^{-1}) and LC50 or EC50 for each specie. LC50 of fipronil was: $0,28 \text{ mg L}^{-1}$ for mato-grosso; $0,45 \text{ mg L}^{-1}$ for pacu; $0,08 \text{ mg L}^{-1}$ for tilápia; EC50;48h was $2629,08 \text{ mg L}^{-1}$ for the snail; $0,025 \text{ mg L}^{-1}$ for *D. magna*; LC50;7d was $3283,29 \text{ mg L}^{-1}$ for *L. minor* and $7855,41 \text{ mg L}^{-1}$ for *A. caroliniana*. Fipronil is classified as extremely toxic to tilapia and *D. magna*; highly toxic to mato-grosso and pacu; and non-toxic to the snail and macrophytes. *D. magna* and fishes are the most suitable species for monitoring the contamination of aquatic environments by fipronil. Fipronil may cause different levels of reduction in oxygen dissolved after 48 hours.

Key-words: fipronil, ecotoxicity, environmental risk, biomonitoring

1. INTRODUÇÃO

A degradação dos ambientes hídricos é uma ocorrência de grandes preocupações, em razão da intensa atividade antropogênica sobre o ambiente, e compromete, principalmente, a qualidade de vida dos organismos aquáticos expostos (CAJARAVILLE et al., 2000).

O aumento do uso de agrotóxicos nas plantações para o combate de pragas agrícolas visa garantir a produtividade e está intimamente ligado ao aumento populacional mundial e a crescente demanda de alimentos (SANCHES et al., 2003).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com a maior área de produção a região centro-sul (SINDAG, 2006). A área cultivada com cana-de-açúcar no país em 2011 foi de 8.368,4 milhões de ha, com 52,2% localizada no Estado de São Paulo (MANRIQUE et al., 2013).

Para manter a produtividade da cultura de cana-de-açúcar, é necessário utilizar inseticidas para o controle de pragas. O fipronil, derivado do fenilpirazol, está entre os inseticidas mais utilizados no controle de insetos prejudiciais à cultura de cana-de-açúcar, como cupim, besouros e broca-da-cana (OHI et al., 2004).

Em estudos sobre a eficácia do fipronil, o inseticida é utilizado no controle de uma ampla variedade de insetos em cultivo de arroz (BALANÇA e DE VISSCHER, 1997) e de verduras e frutas (ZHAO et al., 1995; STEVENS et al., 1998). Além disso, o fipronil atinge insetos resistentes a outros produtos utilizados como os inseticidas piretróides, organofosforados e carbamatos (BOBE et al., 1997). Isto porque, diferentemente destes inseticidas, mecanismo de ação tóxica é a inibição do ácido gama-aminobutírico (GABA).

A utilização intensa do fipronil e em grandes quantidades na produção agrícola causa a contaminação do ambiente, principalmente, nos recursos hídricos próximos às áreas nas quais foi utilizado. De acordo com Manrique et al. (2013), não existem informações suficientes sobre os impactos que este inseticida pode causar nos sistemas aquáticos.

A contaminação de recursos hídricos com inseticidas pode levar à mortalidade dos peixes, bem como de zooplâncton, além de poder afetar nas taxas de crescimento, reprodução e comportamento dos animais aquáticos (VAN DER OOST et al., 2003). Isto porque, os inseticidas têm ação não-seletiva, intoxicam os organismos alvo de controle e não-alvos que entrarem em contato no ambiente contaminado. Portanto, da contaminação ambiental com o uso do fipronil pode ser avaliada por meio da determinação da toxicidade aguda e do risco de intoxicação ambiental de organismos não-alvos; determinados inicialmente por meio de ensaio de toxicidade aguda em condições de laboratório.

Os ensaios realizados em laboratório em condições controladas e com o uso de organismos vivos (algas, microcrustáceos, moluscos, peixes e outros) são importantes na avaliação da toxicidade de águas contaminadas com substâncias químicas. Além disso, estes bioensaios permitem estimar efeitos dos xenobióticos em determinadas concentrações ou dosagens para uma determinada espécie (RAMDORF, 2007).

Entre os ensaios, os ecotoxicológicos podem ser utilizados para a predição (ESPÍNDOLA et al., 2003), antecipação e diagnóstico de possíveis impactos ecológicos causados pelos compostos tóxicos (CALOW, 1993). Estes ensaios também podem ser utilizados para a classificação, regulação e mapeamento de contaminações ambientais (CAIRNS et al., 1998).

A partir de dados obtidos em ensaios de ecotoxicidade aguda e dos valores de concentração ambiental pode-se calcular o coeficiente de risco ambiental e enriquecer a avaliação do impacto ambiental do fipronil. Goktepe et al. (2004) citam que a avaliação do risco ambiental permite orientar ações de tomada de decisão sobre o manejo dos efeitos adversos do uso de agrotóxicos no ambiente.

Portanto, devido a intensidade e frequência do uso do inseticida fipronil, principalmente na cultura de cana-de-açúcar, destacam-se estudos sobre a avaliação da toxicidade aguda e do risco de intoxicação ambiental de organismos aquáticos e terrestre não-alvos e economicamente importantes para a aquicultura.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Selecionar as espécies não alvos mais adequadas como bioindicadoras da contaminação de águas com fipronil a partir da classificação da toxicidade aguda e do risco de intoxicação ambiental de sete espécies aquáticas.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Classificar o fipronil pela toxicidade aguda a organismos não-alvo, de acordo com os valores da concentração letal CL(I)50 ou CE(I)50 para sete espécies de organismos aquáticos.
- 2) Selecionar as espécies aquáticas não alvos mais adequadas como bioindicadores para monitorar a contaminação das águas com fipronil entre sete de três níveis tróficos, com base em três classificações de risco de intoxicação ambiental.
- 3) Medir as variações causadas pelas concentrações de fipronil no pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica da água nos ensaios de toxicidade aguda para peixes e caramujo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Fipronil

O inseticida fipronil (5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl] [(trifluoromethyl)sulfinyl]-1H-pyrazole-3-carbonitrile) é do grupo químico fenil pirazólico, o mecanismo de ação é no sistema nervoso central do inseto, inibe o receptor do ácido gama aminobutírico (GABA). O sistema receptor-GABA, responsável pela inibição da atividade neural anormal, previne o estímulo excessivo dos nervos. Quando a função desse sistema regulador é bloqueada pelo fipronil, ocorre a hiperexcitação neural e, conseqüentemente, a morte do inseto (RHÔNE-POULENC, 1998; GUNASEKARA e TROUNG, 2007). Este sistema controla a passagem de íons cloreto pelos canais de cloro dos neurônios, processo que é regulado pelo ácido gama aminobutírico (GABA) (MOHLER et al., 2004). Com este mecanismo de ação, o fipronil também causa intoxicação em humanos (OLIVEIRA et.al, 2008).

A utilização do fipronil em ampla escala deve-se à sua eficácia contra insetos resistentes a outros pesticidas (BOBE et al., 1997). O início do uso do fipronil no Brasil foi registrado no ano de 2000 em plantações da região Nordeste (MASUTTI e MERMUT, 2007).

O fipronil é o ingrediente ativo dos inseticidas Frontline[®], Termidor[®], e Top Spot[®]. É um inseticida de baixa a moderada solubilidade na água, com a preferência de matrizes lipofílicas (orgânicas) com lipídeos, óleos, proteínas e solventes orgânicos, e é estável a temperatura ambiente (GUNASEKARA e TROUNG, 2007).

O fipronil também pode ser utilizado em saúde pública, para o controle de vetores de doenças. O fipronil é altamente efetivo contra larvas do mosquito *Culex quinquefasciatus*, com a CL50 estimada de 0,35 µg L⁻¹ (ALI et al., 1999). Para o mosquito *Aedes aegypti* para larvas com 24 e 48 horas de idade, a CL50 foi estimada em 11,7 µg L⁻¹ e 7,14 µg L⁻¹, respectivamente (AAJOURD et al., 2003).

Na formulação granular, o fipronil foi mais persistente que em outras formulações na água; com meia vida ($t_{1/2}$) de 125 horas e no solo, $t_{1/2}$ foi de 438 horas (NGIM e CROSBY, 2001).

A degradação do fipronil forma subprodutos mais tóxicos a organismos aquáticos que o composto parental, como o desulfinilfipronil, o fipronil sulfídio, e o fipronil sulfona. Os subprodutos fipronil sulfídio, e o fipronil sulfona foram 6,6 e 1,9 vezes, respectivamente, mais tóxicos aos invertebrados de água doce que o próprio fipronil (USEPA, 1996).

No país, a formulação Regent[®] 800 WG, com 80% de fipronil, é registrada na cultura de cana-de-açúcar; cuja melhor aplicação é entre os meses de junho e agosto, logo após o plantio, para compor uma barreira contra insetos na subsuperfície. As doses recomendadas variam de 200 g a 500 g ha⁻¹; em função do inseto a ser controlado (MANRIQUE et al., 2013).

3.2. Ensaios ecotóxicológicos com fipronil

No uso de agrotóxicos têm se constatado que menos de 0,1% das quantidades aplicadas atingem os organismos alvos, o restante (99,9%) fica disponível para se mover para outros compartimentos ambientais locais, como águas superficiais e subterrâneas (SABIK et al., 2000).

Em estudos de monitoramento de corpos hídricos com alta probabilidade de contaminação por substâncias tóxicas, o ensaio de avaliação da toxicidade aguda das águas é um dos ensaios mais utilizados, pois proporciona respostas rápidas na estimativa dos efeitos letais de um agente tóxico sobre os organismos aquáticos (LOMBARDI, 2004).

Grützmacher et al. (2008) monitoraram resíduos de agrotóxicos em dois mananciais hídricos localizados no Estado do Rio Grande do Sul. O inseticida fipronil foi 16% dos agrotóxicos encontrados e detectado apenas na primeira data das sete coletas e em todos os pontos de coleta. A máxima concentração do fipronil encontrada foi de 1,14 µg.kg⁻¹; cerca de 380 vezes superior ao limite de detecção do sistema cromatográfico utilizado (0,003 µg.kg⁻¹).

Alguns estudos sobre a ecotoxicidade do fipronil já foram realizados para alguns organismos não-alvos, como para o copépode *Amphiascus tenuiremis* em que a concentração letal 50% estimada após de 96 horas (CL(I)50;96h) foi de 0,0068 mg L⁻¹ (CHANDLER et al., 2004). Para o microcrustáceo *Daphnia pulex*, a

CL50;96h estimada foi de 0,016 mg L⁻¹, e as concentrações crescentes de fipronil causou diminuição da taxa de crescimento da população e mortalidade total com 0,08 mg L⁻¹ (STARK e VARGAS, 2005).

Para o peixe truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) a CL(I)50;96h do fipronil foi de 0,248 mg L⁻¹; 0,083 mg L⁻¹ para o peixe “bluegill” (*Lepomis Macrochirus*); e 0,130 mg L⁻¹ para “sheepshead minnows” (*Cyprinodon variegatus variegatus*) (USEPA, 1996).

Níveis em ng L⁻¹ de fipronil afetam camarões “Mysid” (*Gastrosaccus psammodytes*) e níveis ppb (µg L⁻¹) afetaram *Daphnia* de água doce e o peixe “Bluegill sunfish” (*Lepomis Macrochirus*) (GUNASEKARA e TROUNG, 2007).

A toxicidade aguda do fipronil também foi avaliada para o peixe guarú (*Poecilia reticulata*) na presença e na ausência de sedimento durante a exposição. Os valores da CL50(I);96h estimados foram de 0,09 na ausência do sedimentos e de 0,08 mg L⁻¹, na presença de sedimento (MANRIQUE et al., 2013).

De acordo com o estudo de bioacumulação com peixes da espécie truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), alimentados com ração contaminada com fipronil (10 µg.g⁻¹), o inseticida foi rapidamente eliminado (34 dias após a ingestão) e não causou mortalidade ou alterações de comportamento (KONWICK et al., 2004).

Até o momento, poucos são os estudos conduzidos com peixes de água doce da América do Sul para avaliação de toxicidade (WILHELM FILHO et al., 2001; AKAISHI et al., 2004; RABITTO et al., 2005) e muito menos ainda se conhece a respeito das respostas biológicas das espécies de peixes endêmicas brasileiras.

3.3. Risco de intoxicação ambiental

O risco de intoxicação ambiental de uma substância é definido como a probabilidade da exposição de um organismo a um composto tóxico no ambiente com a probabilidade de causar lesões e efeitos tóxicos. A avaliação de risco ambiental é realizada a partir de dados ecotoxicológicos e das concentrações

ambientais estimadas (CAE) da substância a ser avaliada, cujas relações quantitativas são utilizadas para classificar os riscos ambientais das substâncias tóxicas específicas (URBAN e COOK, 1986; KOKTA e ROTHERT, 1992; SOLOMON, 1996; USEPA, 1996).

Para a avaliação de risco de intoxicação ambiental ser considerada confiável e completa, faz-se necessária a utilização de organismos de pelo menos três diferentes níveis tróficos, como vertebrados, invertebrados e plantas, e não alvos do produto a ser avaliado. Assim, a partir de um representante de cada nível no ecossistema é possível a avaliação da ecotoxicidade e do risco de intoxicação ambiental das substâncias tóxicas (TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT ON RISK ASSESSMENT, 2003).

As CAEs de substâncias tóxicas presentes nos ambientes aquáticos são estimadas para cenários de lâmina de águas e diferentes níveis de contaminações (SOLOMON, 1996; BURNS, 2001). Os cenários para o cálculo da CAE são determinados a partir da coluna de água de 0,30 m, pelo fato de compreender as bases da cadeia alimentar aquática, zooplâncton e o fitoplâncton (BOOCK e MACHADO NETO, 2000). Um segundo cenário a ser considerado é o da coluna de água de 2,0 m, recomendada pela USEPA, para avaliação de risco em ambientes aquáticos (SOLOMON, 1996).

3.4. Organismos-teste

Os principais grupos de organismos testes utilizados nos ensaios laboratoriais são microalgas, microcrustáceos, equinóides, poliquetas, oligoquetas, moluscos, peixes, macrófitas e bactérias (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008).

Os organismos-teste utilizados no Brasil são comumente espécies exóticas, determinadas em normas internacionais aprovadas no país. Entretanto, a realização de estudos ecotoxicológicos com em espécies locais ou autóctones representativas de nossos ecossistemas é extremamente relevante (CAIRNS, 1993). Estes estudos são relevantes principalmente para realizar o monitoramento das contaminações das redes hidrográficas presentes nas áreas agrícolas.

Os critérios de seleção de organismos-teste normalmente são: abundância e disponibilidade; significativa representação ecológica dentro das biocenoses; cosmopolitismo da espécie; profundo conhecimento da biologia, fisiologia e hábitos alimentares; estabilidade genética e uniformidade de suas populações; baixo índice de sazonalidade; sensibilidade constante e apurada; importância comercial; facilidade de cultivo em laboratório e, se possível, a espécie deve ser nativa para a melhor representatividade dos ecossistemas (RAND e PETROCELLI, 1985).

Difícilmente uma única espécie de organismo representará integralmente os efeitos causados em um determinado ecossistema. Assim, é recomendada a utilização de no mínimo três espécies que representem diferentes níveis das cadeias tróficas, para se obter resultados mais precisos de efeitos tóxicos específicos e aumentar a probabilidade de respostas tóxicas a organismos de diferentes sensibilidades (BAUN et al., 1999). Os peixes e as daphnias são os organismos-teste mais importantes do ambiente aquático e indicados para ensaios ecotoxicológicos em normas nacionais (BRIGANTE e ESPÍNDOLA, 2003).

3.4.1. Peixes

Os peixes são os animais mais utilizados como bioindicadores em ensaio ecotoxicológicos (HERRICKS, 2002). Os peixes são ótimos organismos-teste para o monitoramento de ambientes aquáticos, devido às diferentes respostas às contaminações; como mudanças na taxa de crescimento e na maturação sexual (RAMELOW et al., 1989; SCHULZ e MARTINS-JUNIOR, 2001).

O interesse sobre os efeitos provocados por substâncias tóxicas na saúde dos peixes tem aumentado, pois atividades agrícolas geram muitos resíduos que, ao atingirem as bacias hidrográficas, expõem estes animais a altas concentrações de substâncias tóxicas (PARMA DE CROUX et al., 2002).

Uma das principais espécies de cultivo que pode ser utilizada em ensaios é a tilápia (*Oreochromis niloticus*) pelo seu potencial produtivo. Esta espécie é da família Cichlidae; grupo de peixes de água quente e importantes para a

aquicultura (FAO, 2003). Porém, devido à rusticidade e resistência, questiona-se o uso desta espécie como bioindicador.

Outro peixe de produção que pode ser utilizado como bioindicador é o pacu (*Piaractus mesopotamicus*); peixe de água doce e de grande importância para a dieta alimentar brasileira e para a pesca esportiva. É também uma das espécies mais representativas de peixes nativos de pisciculturas brasileiras, pois é utilizada em cerca de 80% dos sistemas de produção comercial de peixes de todos os Estados do Brasil, e 77% da produção de peixes no Estado de São Paulo (LOPES, 2000).

Além de espécies economicamente importantes na aquicultura, espécies ornamentais e nativas também podem ser utilizadas, como o peixe popularmente denominado de mato-grosso (*Hyphessobrycon eques*). Assim como o pacu, é um peixe neotropical da Ordem Characiformes, que caracteriza-se pelos dentes bem desenvolvidos, nadadeira adiposa, linha lateral curvilínea e mandíbula superior não protraída (NELSON, 2006). Vivem em rios e lagos, e se alimentam basicamente de algas e plantas.

3.4.2. Caramujos

O caramujo (*Pomacea canaliculata*) é um molusco nativo das regiões tropicais da América do Sul, com alta variação interpopulacional em relação ao tamanho, forma e espessura da concha. Esses moluscos habitam ampla gama de ecossistemas, desde pântanos e lagoas até lagos e rios (MARTIN et al., 2002). De acordo com estas características e os critérios de seleção de organismos-testes, esta espécie destaca-se com grande potencial para ser utilizada como um relevante bioindicador em ensaios ecotoxicológicos.

3.4.3. *Daphnia magna*

As daphnias participam da cadeia alimentar aquática como consumidor primário entre os metazoários e se alimentam por filtração de material orgânico particulado, principalmente algas unicelulares. Como todos os crustáceos, a daphnia tem uma carapaça que sofre muda diária. A carapaça é constituída

praticamente de quitina, que é um polissacarídeo e serve como escudo de proteção do organismo (FONSECA, 1998).

As espécies *Daphnia magna* e a *Ceriodaphnia dubia* são os cladóceros mais utilizadas como organismos-teste em ensaios de ecotoxicologia aquática (MITCHELL et al., 2004).

A *Daphnia magna* é um organismo filtrador utilizado em ensaios ecotoxicológicos devido as seguintes características favoráveis: ciclo de vida curto com elevada taxa reprodutiva, sobrevivência em pequenos espaços, facilidade de adaptação às condições de laboratório e manejo, e alta sensibilidade a grande variedade de produtos químicos (ARAUCO et al., 2005).

3.4.4. Macrófitas

As macrófitas aquáticas possuem grande importância ecológica nas comunidades e sistemas de água doce tropicais; armazenam nutrientes e auxiliam no fluxo de energia do ambiente. As plantas constituem a base das teias alimentares em cadeias tróficas de herbivoria direta bem como em cadeias de detritívoria (THOMAZ, 2002).

A macrófita aquática *Lemna minor*, conhecida pelo nome vulgar de lentilha d'água, é uma angiosperma, do grupo das monocotiledôneas. A planta comumente forma densas massas flutuantes na superfície de lagos e lagoas eutrofizadas em ecossistemas de água doce e salobra de clima temperado (FREEMARK e BOUTIN, 1994).

A utilização de *Lemna sp.* em ensaios ecotoxicológicos é ainda pequena se comparada aos demais organismos. No entanto, essas espécies são indicadas por grandes organizações (EPA e OECD, 2002) como potencial organismo bioindicador pela sua importante função ecológica e serem os primeiros organismos atingidos por poluentes lançados nos ecossistemas aquáticos.

A macrófita *Lemna minor* é uma espécie representativa de corpos de água lânticos, com rápido crescimento e vem sendo bastante utilizada no monitoramento dos metais em recursos hídricos, e também de outros tipos de poluentes. A espécie tem diversas características favoráveis para ser utilizada em

testes ecotoxicológicos, como: pequeno tamanho, estrutura simples e rápido crescimento e propagação vegetativa (CASSIDY, 2010).

A *Lemna minor* é facilmente cultivada, tem taxa de crescimento elevada em condições de laboratório e alta sensibilidade a poluentes. As respostas da planta são geralmente avaliadas pelas alterações nas taxas de crescimento (KISS et al., 2003).

Da mesma forma que a *Lemna minor*, a espécie *Azolla caroliniana* tem potencial como organismo bioindicador, pois também é uma planta aquática flutuante, de fácil manejo, ciclo de vida curto, pequeno porte e cosmopolita (LUMPKIN e PLUCKNEET, 1980).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de realização dos ensaios

Os ensaios de toxicidade aguda do fipronil foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional do Departamento de Fitossanidade associado ao Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), e no Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal.

A formulação comercial utilizada do fipronil é identificada como Regent[®] 800 WG (800g kg⁻¹), fabricada pela empresa BASF The Chemical Company[®] e registrada no Brasil sob o número 05794 (AGROFIT, 2007).

4.2. Aclimação e manutenção dos organismos

Os peixes (*Hyphesobycon eques*, *Piaractus mesopotamicus*, *Oreochromis niloticus*) e caramujos (*Pomacea canaliculata*) foram mantidos em caixas com capacidade de 500 L, em ambiente aberto e sombreado. Em seguida, foram transferidos em um reservatório de aclimação, com 250 L de capacidade, na climatizada (temperatura entre 25 e 27 °C), onde os ensaios foram realizados (Figura 1 A e B).



Figura 1. A) Caixa de aclimação dos peixes. **B)** Exemplo de seleção dos animais para utilização no ensaio de toxicidade aguda.

Os peixes foram alimentados com ração comercial e os caramujos com a macrófita *Hydrilla verticillata*, uma vez ao dia. A água utilizada foi oriunda de poço semi-artesiano, com o fluxo de renovação de 2/3 por dia. A limpeza de restos de ração e fezes dos animais no fundo dos reservatórios de aclimação foi realizada diariamente por sifonamento.

As macrófitas *Lemna minor* e *Azolla caroliniana* foram mantidas em recipientes de plástico de 2,3 L, com uma camada de solo no fundo e água em estufa coberta com sombrite 70% de proteção de luz. Em seguida as plantas foram aclimatadas em cristalizadores de vidro de 3 L contendo meio de cultivo Hoagland's.

As daphnias (*Daphnia magna*) adultas foram mantidas em cristalizadores em sala de bioensaio, com água de cultivo, e alimentadas uma vez ao dia. Os neonatos de um dia de idade (estágio jovem) foram retirados diariamente e utilizados nos ensaios de acordo com a norma 12713:2011 (ABNT, 2011).

O meio de cultivo para a *D. magna* foi preparado para 50 L de água com: 400 mL de solução de CaCl_2 , 100 mL de solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mL de solução de KCl, 50 mL de solução de NaHCO_3 , 5 mL de solução catiônica, 25 mL de solução aniônica, 10 mL de solução de silicato, 250 mL de solução de Fe/EDTA, 25 mL de solução de solução de fosfato e 5 mL de solução vitamínica,

de acordo com a norma 12713:2011 (ABNT, 2011), durante um período de sete dias antes dos ensaios.

4.3. Ensaios de toxicidade aguda para peixes e caramujos

Os ensaios foram realizados de acordo com o procedimento da norma NBR ABNT 15088:2011 (ABNT, 2011). Para o controle de sensibilidade dos peixes e caramujos foram realizados periodicamente ensaios de sensibilidade de 48 horas de exposição ao cloreto de potássio (KCl, 99,9%); utilizado como substância-referência.

Para o peixe mato-grosso, a concentração letal (CL50;48h) de estimada do cloreto de potássio (KCl) foi de $1,65 \text{ g L}^{-1}$, com intervalo de confiança de 95% de $1,38 \text{ g L}^{-1}$ a $1,96 \text{ g L}^{-1}$. Para o pacu, a CL50;48h do KCl foi de $1,37 \text{ g L}^{-1}$, com intervalo de confiança de 95% de $1,14 \text{ g L}^{-1}$ a $1,66 \text{ g L}^{-1}$. Para a tilápia, a CL50;48h do KCl foi de $3,35 \text{ g L}^{-1}$, com intervalo de confiança de 95% de $3,71 \text{ g L}^{-1}$ a $2,84 \text{ g L}^{-1}$. A CE50;48h do KCl para o caramujo *Pomacea canaliculata* foi de $1,62 \text{ g L}^{-1}$, com intervalo de confiança de 95% de $1,35 \text{ g L}^{-1}$ a $1,89 \text{ g L}^{-1}$.

Foram realizados ensaios preliminares de toxicidade aguda do fipronil para determinar os intervalos de concentração que causam zero e 100% de mortalidade (peixes) e imobilidade (caramujos) para, posteriormente, serem utilizadas no ensaio definitivo.

Nos ensaios definitivos foram utilizadas cinco concentrações crescentes e um tratamento controle e com três repetições. Os ensaios definitivos foram repetidos por três vezes e os dados de mortalidade são as médias aritméticas destes ensaios. Estes ensaios foram realizados nas mesmas condições ambientais dos ensaios preliminares: temperatura de 24 a 27 °C e fotoperíodo de 12/12 horas.

No ensaio definitivo para o mato-grosso, foram utilizadas as seguintes concentrações de fipronil: 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 e 0,7 mg L^{-1} . Para o pacu, as concentrações de fipronil foram: 0,1; 0,3; 0,5 e 0,7 mg L^{-1} . Para a tilápia, as concentrações de fipronil foram: 0,03; 0,05; 0,07; 0,1 e 0,3 mg L^{-1} .

No ensaio definitivo para o caramujo, as concentrações de fipronil foram: 1900; 2200; 2500; 2800 e 3100 mg L⁻¹.

Nos ensaios com peixes, foram utilizados três animais por aquário com peso médio de 1,0 g cada, na densidade de 1 g L⁻¹, totalizando nove animais por concentração. Nos ensaios com caramujos, foram utilizados cinco animais por aquário com peso médio de 1,5 g cada, totalizando 15 animais por concentração.

O período de exposição foi de 48 horas em recipientes de vidro contendo três litros no total (água + fipronil), sendo que os animais foram mantidos sem alimentação durante este período.

A avaliação da mortalidade foi realizada diariamente, com a retirada dos animais mortos dos recipientes. As características iniciais da água utilizada nos ensaios foram as seguintes: temperatura de 26,0 ± 2,0 °C; pH 7,00 ± 0,5; oxigênio dissolvido superior a 4,0 mg L⁻¹; condutividade elétrica da água em torno de 0,180 μS.cm⁻¹ e dureza entre 48 e 58 mg de CaCO₃ .L⁻¹. Durante a avaliação da mortalidade, foram registrados os sinais de intoxicação pelo fipronil nos animais.

Em 0, 24 e 48 horas de exposição dos animais, foram registrados os valores de concentração de oxigênio dissolvido (mg L⁻¹), pH, temperatura (°C) e condutividade elétrica (μS.cm⁻¹) das águas das parcelas experimentais com uma sonda, modelo YSI 556 MPS, da marca YellowSpring Co.

A concentração letal 50% (CL50;48h) do fipronil para os peixes e a concentração efetiva (CE50;48h) para o caramujo foram calculadas com os dados dos ensaios definitivos pelo método “Trimmed Spermán Karber” (HAMILTON, 1977).

4.4. Ensaios de toxicidade aguda para *Daphnia magna*

Os ensaios para *D. magna* foram realizados de acordo com o procedimento da norma NBR ABNT 12713:2011 (ABNT, 2011). Inicialmente, foram realizados ensaios periódicos com a substância referência cloreto de sódio (NaCl) para a avaliação da sensibilidade dos organismos.

A CE50;48h do cloreto de sódio (NaCl) para a *D. magna* foi de 4,87 g L⁻¹, com intervalo de confiança de 95% de 5,15 g L⁻¹ a 4,25 g L⁻¹.

Foram realizados ensaios preliminares para a determinação do intervalo de concentrações de fipronil a ser utilizado no ensaio definitivo. Os recipientes utilizados foram tubos de ensaio de vidro com 9,0 mL de solução estoque (fipronil) + água de cultivo para as daphnias e 1,0 mL de água de cultivo contendo cinco animais neonatos. Os ensaios foram compostos por cinco concentrações e o controle, com três repetições.

No ensaio definitivo foram utilizadas as seguintes concentrações de fipronil: 0,002; 0,005; 0,01; 0,05 e 0,1 mg L⁻¹. Os ensaios foram realizados em sala de bioensaio climatizada com temperatura de 20 ± 2 °C, em ambiente escuro. Os tubos de ensaio permaneceram cobertos com pano preto para impedir a incidência da luz interna da estufa incubadora BOD.

Após 48 horas de exposição, os animais imóveis e que não foram capazes de nadar durante 15 segundos foram considerados como mortos. O valor da concentração efetiva CE50;48h foi estimado pelo método “Trimmed Sperm Karber” (HAMILTON, 1977).

4.5. Ensaio de toxicidade aguda para *Lemna minor* e *Azolla caroliniana*

Os ensaios para as macrófitas foram realizados de acordo com a norma nº 221 da OECD (2002). Para a avaliação da sensibilidade dos lotes de plantas foram realizados ensaios periódicos com a substância de referência cloreto de sódio (OECD, 2002). A CL50;7d do cloreto de sódio (NaCl) para a *Lemna minor* foi de 4,1 g L⁻¹, com intervalo de confiança de 95% de 4,4 g L⁻¹ a 3,7 g L⁻¹; e para a *Azolla caroliniana* foi de 5,2 g L⁻¹, com intervalo de confiança de 95% de 3,7 g L⁻¹ a 4,4 g L⁻¹.

A aclimação das macrófitas foi realizada em cristalizadores com 1,0 L de meio de cultivo Hoagland (OECD, 2002) e 1,0 L de água destilada, em sala de bioensaio climatizada com temperatura de 25 ± 2 °C e iluminação constante por lâmpadas fluorescentes modelo LF-20W/RS, com 1000 lux, durante três dias.

Para a realização dos ensaios, as plantas foram previamente desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio 2% e água destilada. Em seguida, quatro

colônias com três frondes (*L. minor*) em cada colônia / cinco plantas completas (*A. caroliniana*) foram transferidas para recipientes com 50,0 mL de Hoagland. As macrófitas permaneceram em sala de bioensaio climatizada por mais 24 horas e, em seguida, foi adicionado 50,0 mL de Hoagland com a solução teste (fipronil).

O período de exposição foi de sete dias, sendo realizada a avaliação de efeito nas macrófitas no 1º, 3º, 5º e último dia de ensaio. Nas avaliações dos ensaios foi observado (a): a presença de novas frondes/plantas, a mudança da coloração, necrose e mortalidade.

Foram realizados ensaios preliminares para a determinação do intervalo de concentrações de fipronil que causa 0 e 100% de efeito/mortalidade nas plantas para a realização dos ensaios definitivos. Para a *Lemna minor*, este intervalo foi de: 600; 1200; 2400; 4800 e 9600 mg L⁻¹, e para a *Azolla caroliniana*, de: 1200; 2800; 4400; 7000 e 9600 mg L⁻¹.

As variações nas porcentagens de inibição de emergência entre as concentrações avaliadas durante os ensaios de toxicidade aguda do fipronil para a *L. minor* foram utilizadas para calcular a média de inibição para cada concentração incluindo o controle.

As variações nas porcentagens de sinais de intoxicação entre as concentrações avaliadas durante os ensaios de toxicidade aguda do fipronil para a *A. caroliniana* foram utilizadas para calcular a média de intoxicação para cada concentração incluindo o controle.

Os valores das concentrações letais 50% de sete dias (CL50;7d) para ambas as plantas foram estimados pelo método “Trimmed Sperm Karber” (HAMILTON, 1977).

4.6. Classificação do fipronil pela toxicidade aguda

Os valores das CL50;48h/ CL50;7d/ CE50;48h obtidos para cada espécie estudada foram utilizados para classificar o fipronil quanto à periculosidade, ou potencial tóxico, de acordo com as classes de toxicidade aguda propostas por Zucker (1985), contidas na Tabela 1.

Tabela 1. Classes de toxicidade aguda para organismos aquáticos (ZUCKER, 1985).

Classe de toxicidade	CL50 ou CE50 (mg L⁻¹)
Extremamente tóxico	< 0,1
Altamente tóxico	0,1 a 1,0
Moderadamente tóxico	> 1,0 a > 10
Ligeiramente tóxico	> 10 a > 100
Praticamente não-tóxico	> 100

4.7. Avaliação do risco de intoxicação ambiental do fipronil

O fipronil foi classificado pelo risco de intoxicação ambiental das sete espécies aquáticas nas classes de quocientes de risco estabelecidas pela USEPA – SW 846 (1987); por Goktepe et al. (2004); e por Urban e Cook (1986) (Tabela 2).

Tabela 2. Classes de risco ambiental de compostos tóxicos de acordo com os valores calculados do quociente Q.

Referência	Q (CAE/CL50)	Classes
USEPA (1987)	<0,1	Sem risco
	0,1 -1,0	Risco baixo
	1,0 - 10,0	Risco moderado
	>10,0	Risco alto
Goktepe et al.(2004)	<0,05	Baixo risco
	0,05 - 0,5	Médio risco
	>0,5	Alto risco
Urban e Cook (1986)	< 0,1	Risco com nenhum efeito adverso
	0,1 - 10	Risco com possibilidade de efeito adverso
	> 10	Risco com probabilidade de efeito adverso

Os quocientes de risco foram calculados pela divisão da concentração ambiental estimada (CAE) pela CL50 ou CE50 calculadas nos ensaios de toxicidade aguda com cada espécie (USEPA – SW 846 (1987); Goktepe et al., 2004; e Urban e Cook, 1986).

Para o cálculo das CAE, foi considerada diluição homogênea de contaminações das águas com concentração crescente de fipronil, com base na maior dose agrícola recomendada de 400 g ha⁻¹ (ANDREI, 1999).

As contaminações consideradas das águas foram com 100,0% (400 g de fipronil), 50,0% (200 g), 25,0% (100 g), 12,5% (50 g), 6,25% (25 g), 3,12% (12,5 g) e 1,56% (6,25g) diluídas uniformemente no espelho de água de um reservatório de um hectare (10.000 m²) de área de área e com 0,3 m de profundidade (BOOCK e MACHADO-NETO, 2000) e 2,0 m de profundidade (SOLOMON, 1996).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Toxicidade aguda e classificação ecotoxicológica do fipronil para peixes

5.1.1. Mato-grosso (*H. eques*)

A concentração letal média 50% (CL50;48h) do fipronil estimada para o mato-grosso foi de 0,28 mg L⁻¹, com limite inferior de 0,20 mg L⁻¹ e limite superior de 0,40 mg L⁻¹. Portanto, o fipronil classifica-se como altamente tóxico para o mato-grosso (ZUCKER, 1985).

Nos ensaios definitivos de toxicidade aguda do fipronil para o mato-grosso ocorreram variações nas porcentagens de mortalidade nas concentrações avaliadas (Tabela 3).

O toxicidade aguda do fipronil para o mato-grosso foi similar ao peixe truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), em que a CL50;96h do fipronil foi de 0,248 mg L⁻¹ e para a espécie *Cyprinodon variegatus variegatus* com CL50;96h foi de 0,13 mg L⁻¹ (USEPA, 1996).

Tabela 3. Porcentagem média e desvio padrão de mortalidade dos três ensaios definitivos com fipronil para o mato-grosso.

Concentração (mg L ⁻¹)	Mortalidade média (%)
0,00	0,0
0,05	0,0
0,10	11,1 ± 2,6
0,30	44,4 ± 13,8
0,50	66,6 ± 14,8
0,70	100,0

Não ocorreram sinais de intoxicação nos animais do controle. Entre 0 e 24 horas de exposição ao fipronil, foi observado agitação em todos os animais expostos ao fipronil. Após 24 horas a mortalidade foi de 100% em 0,70 mg L⁻¹, e

foi observada natação errática nos peixes expostos a 0,05, 0,1, 0,3 e 0,5 mg L⁻¹ (Tabela 4).

Entre 24 e 48 horas, nas concentrações de 0,1, 0,3 e 0,5 mg L⁻¹, foi observado perda da capacidade de arfagem dos peixes. Após 48 horas de exposição, em 0,3 e 0,5 mg L⁻¹ ocorreram constantes espasmos musculares e natação errática (Figura 2 A e B, seta) (Tabela 4).

Tabela 4. Sinais de intoxicação em 24 e 48h nos ensaios definitivos com fipronil para o mato-grosso.

Concentração (mg L ⁻¹)	24 horas	48 horas
0,00	-	-
0,05	A, B	A, B
0,10	A, B, M	B, C, D, M
0,30	A, B, M	B, C, D, M
0,50	A, B, M	B, C, D, M
0,70	M	-

A = Agitação; B = Natação errática; C = Espasmos musculares; D = Perda da capacidade de arfagem; e M = Mortalidade.

Os sinais de intoxicação são causados devido ao fechamento dos canais de cloreto dos neurônios causados pela inibição do GABA pelo fipronil (BOBE et al., 1998). Sinais de intoxicação similares podem ser constatados em estudos com outros inseticidas neurotóxicos como os organofosforados trichlorfon e o methyl parathion, que inibem a ação da enzima acetilcolinesterase (TIERNEY et al., 2010).

Os inseticidas neurotóxicos, que causam intoxicação nos diversos pontos do sistema nervoso, alteram a transmissão do impulso nervoso, que resulta em diversos efeitos nos organismos, como espasmos musculares e redução das respostas do sistema olfativo dos peixes, o qual é de extrema importância na sobrevivência (TIERNEY et al., 2010).

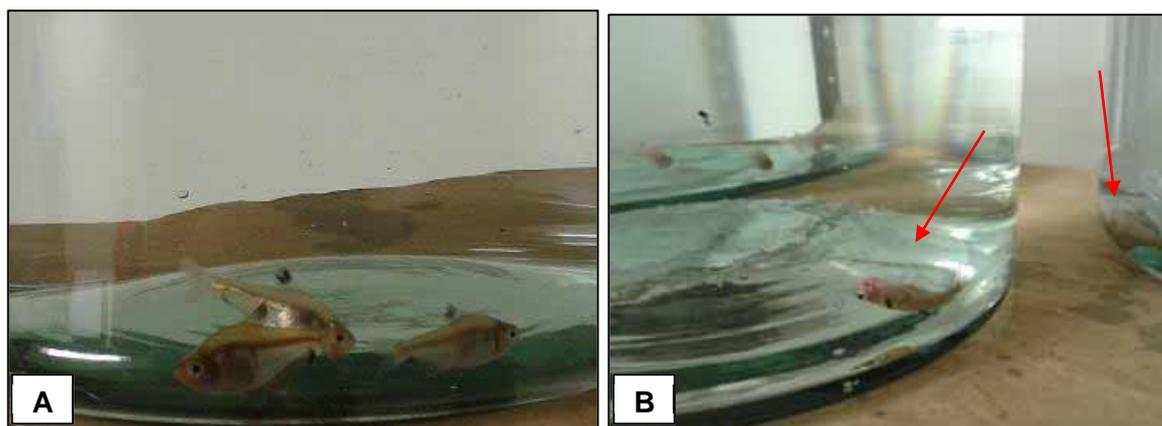


Figura 2. A) *H. eques*. B) Natação errática e mortalidade durante os ensaios de toxicidade aguda.

Organofosforados também afetam o sistema nervoso em baixas concentrações e causam sinais de intoxicação similares em peixes como, por exemplo, o trichlorfon. Feng et al. (2007) utilizaram concentrações baixas de trichlorfon como às utilizadas neste trabalho com fipronil, e verificaram que o trichlorfon incubado com homogeneizado de fígado e músculo de *Tilapia nilotica* por 0, 30, 60 e 90 minutos nas concentrações de 0,0001; 0,001; 0,1 e 1 g L⁻¹ causa inibição significativa da atividade da AChE. Ainda para Aguiar et al. (2004), o matrinxã (*Brycon cephalus*) exposto ao methyl parathion por 96 horas apresenta inibições significativas na atividade da AChE plasmática e cerebral (64% e 87%, respectivamente).

Portanto, mesmo que outros xenobióticos sejam tão tóxicos quanto o fipronil, são necessários estudos para aprimorar o conhecimento sobre os efeitos deste inseticida no ambiente e prever danos em casos de contaminação aquática.

Com relação à análise das variáveis de qualidade de água durante os ensaios de toxicidade aguda do fipronil para o mato-grosso, foram registradas pequenas alterações em todas as variáveis.

Após o período de 48 horas, a condutividade elétrica variou de 175,5 ± 2,02 μS cm⁻¹ no controle para 176,1 ± 1,87 μS cm⁻¹ na concentração de 0,5 mg L⁻¹. A variação média do pH foi de 8,23 ± 0,15 no controle para 7,97 ± 0,12 na concentração de 0,5 mg L⁻¹. A temperatura manteve-se praticamente constante.

O oxigênio dissolvido variou de $3,1 \pm 0,57 \text{ mg L}^{-1}$ no controle para $1,9 \pm 1,1 \text{ mgL}^{-1}$ na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, sendo considerada uma variação grande causada pelo fipronil (Tabela 5).

Tabela 5. Variáveis de oxigênio dissolvido durante os ensaios de toxicidade aguda do fipronil para os peixes da espécie mato-grosso (0; 24 e 48 horas de exposição).

Concentração (mg L^{-1})	Oxigênio Dissolvido (mg L^{-1})		
	0h	24h	48h
0,00	4,2	3,9	3,1
0,05	4,0	3,3	2,8
0,10	4,2	3,8	2,4
0,30	4,3	3,1	2,6
0,50	4,1	3,0	1,9
0,70	4,2	2,7	-

- ausência das parcelas – todos os peixes morreram em 24h.

Essa avaliação é essencial para registrar o efeito do fipronil na qualidade da água, que por sua vez, pode afetar a sobrevivência do organismo exposto. Após 48 horas de exposição, a concentração do oxigênio dissolvido na água foi reduzida para 1,9 na maior concentração de fipronil avaliada ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$).

De acordo com a CETESB (2002), o valor mínimo de oxigênio dissolvido (OD) para a preservação da vida aquática, estabelecido pela Resolução CONAMA 357/05(2) é de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$, mas existe uma variação na tolerância de espécie para espécie.

De maneira geral, valores de oxigênio dissolvido menores que $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ pertencem a uma condição perigosa, denominado hipoxia, ou seja, baixa concentração de oxigênio dissolvido na água (CETESB, 2002) que pode ser causado tanto pelo consumo dos organismos e decomposição de matéria orgânica quanto pela ação de produtos tóxicos no ambiente aquático.

Goulart e Callisto (2003) citam que o monitoramento de variáveis físicas e químicas apresenta vantagens na avaliação de impactos ambientais em ecossistemas aquáticos, tais como: identificação imediata de modificações nas

propriedades físicas e químicas da água; detecção precisa da variável modificada, e determinação destas concentrações alteradas.

Porém, há também algumas desvantagens, tais como a descontinuidade temporal e espacial das amostragens, pois as avaliações não são realizadas em um longo período de tempo. A amostragem de variáveis físicas e químicas fornece somente valores estáticos do que pode ser uma situação altamente dinâmica (WHITFIELD, 2001).

5.1.2. Pacu (*P. mesopotamicus*)

A concentração letal média (CL50;48h) do fipronil estimada para o pacu foi de 0,45 mg L⁻¹, com limite inferior de 0,36 mg L⁻¹ e limite superior de 0,56 mg L⁻¹. O fipronil é classificado como altamente tóxico para o pacu (ZUCKER, 1985).

Nos ensaios definitivos de toxicidade aguda do fipronil para o pacu ocorreram variações nas porcentagens de mortalidade nas concentrações avaliadas (Tabela 6).

Tabela 6. Porcentagem média e desvio padrão de mortalidade dos três ensaios definitivos com fipronil para o pacu.

Concentração (mg L ⁻¹)	Mortalidade média (%)
0,00	0,0
0,05	0,0
0,10	0,0
0,30	11,1 ± 2,5
0,50	44,4 ± 10,1
0,70	100,0

Durante o período dos ensaios de toxicidade aguda não foram observados sinais de intoxicação nos animais do controle e em 0,05 mg L⁻¹. Entre 0 e 24 horas de exposição ao fipronil, os animais expostos em 0,1 mg L⁻¹ somente permaneceram na superfície da coluna d'água sem a busca por oxigênio, enquanto que os peixes expostos às demais concentrações apresentaram perda da capacidade de arfagem. Após 24 horas a mortalidade foi de 100% em 0,70 mg L⁻¹ (Tabela 7).

Tabela 7. Sinais de intoxicação observados em 24 e 48h nos ensaios definitivos com fipronil para o pacu.

Concentração (mg L ⁻¹)	24 horas	48 horas
0,00	-	-
0,05	-	-
0,10	P	B, C, D
0,30	C, M	B, C, D, M
0,50	C, M	B, C, D, M
0,70	M	-

A = Agitação; B = Natação errática; C = Espasmos musculares;
 D = Perda da capacidade de arfagem;
 P = Permanência na superfície da coluna d'água e M = Mortalidade.

Entre 24 e 48 horas, nas concentrações de 0,1, 0,3 e 0,5 mg L⁻¹, foi observado sinais de intoxicação como natação errática e perda da capacidade de arfagem. Após 48 horas de exposição, em 0,3 e 0,5 mg L⁻¹ ocorreram espasmos musculares constantes, natação errática e permanência na superfície da coluna d'água (Figura 3 A e B) (Tabela 7).

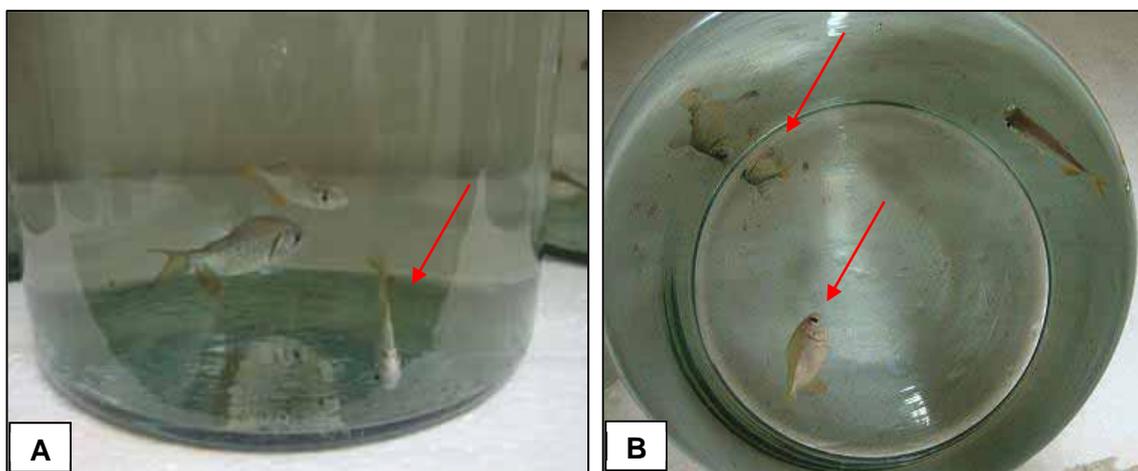


Figura 3. A) Natação errática durante os ensaios de toxicidade aguda. B) Mortalidade dos peixes na concentração de 0,5 mg L⁻¹.

Na análise das variáveis de qualidade de água durante os ensaios de toxicidade aguda do fipronil para o pacu, ocorreram alterações em todas as variáveis. Ao final dos ensaios, a condutividade elétrica variou de $178,5 \pm 3,90 \mu\text{S}$

cm^{-1} no controle para $179,6 \pm 4,16 \mu\text{S cm}^{-1}$ na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. A variação média do pH foi de $8,2 \pm 0,15$ no controle para $7,85 \pm 0,17$ na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. A temperatura manteve-se praticamente constante.

O oxigênio dissolvido variou de $3,3 \pm 0,52 \text{ mg L}^{-1}$ no controle para $2,24 \pm 1,28 \text{ mg L}^{-1}$ na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, sendo considerada uma variação grande causada pelo fipronil (Tabela 8).

Tabela 8. Variáveis de oxigênio dissolvido durante os ensaios de toxicidade aguda do fipronil para os peixes da espécie pacu (0; 24 e 48 horas de exposição).

Concentração (mg L^{-1})	Oxigênio Dissolvido (mg L^{-1})		
	0h	24h	48h
0,00	4,2	4,2	3,3
0,05	4,1	3,2	2,1
0,10	4,1	3,4	2,8
0,30	4,2	2,3	2,2
0,50	4,1	1,6	2,4
0,70	4,1	2,9	-

- ausência das parcelas – todos os peixes morreram em 24h.

5.1.3. Tilápia (*O. niloticus*)

A concentração letal média (CL50;48h) do fipronil estimada para a tilápia foi de $0,08 \text{ mg L}^{-1}$, com limite inferior de $0,06 \text{ mg L}^{-1}$ e limite superior de $0,11 \text{ mg L}^{-1}$. O fipronil é classificado como extremamente tóxico para a tilápia (ZUCKER, 1985).

Ocorreram variações nas porcentagens de mortalidade nas concentrações avaliadas durante os ensaios de toxicidade aguda do fipronil para a tilápia, portanto foi calculada a média de mortalidade para cada uma incluindo o controle (Tabela 9).

Não foram observados sinais de intoxicação nos peixes do controle e em $0,03 \text{ mg L}^{-1}$. No intervalo de 0 a 24 horas de exposição ao fipronil, os animais apresentaram agitação e perda da capacidade de arfagem. Após 24 horas a mortalidade foi de 100% em $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 10).

Tabela 9. Porcentagem média e desvio padrão de mortalidade dos três ensaios definitivos com fipronil para a tilápia.

Concentração (mg L ⁻¹)	Mortalidade média (%)
0,00	0,0
0,03	0,0
0,05	33,3 ± 12,8
0,07	44,4 ± 13,5
0,10	66,6 ± 11,3
0,30	100,0

No intervalo de 24 a 48 horas, nas concentrações de 0,05, 0,07 e 0,10 mg L⁻¹, ocorreu natação errática e perda da capacidade de arfagem. Após 48 horas de exposição, em 0,07 e 0,1 mg L⁻¹ ocorreram espasmos musculares constantes e natação errática (Figura 4 A e B) (Tabela 10).

Tabela 10. Sinais de intoxicação observados em 24 e 48h nos ensaios definitivos com fipronil para a tilápia

Concentração (mg L ⁻¹)	24 horas	48 horas
0,00	-	-
0,03	-	-
0,05	A, D	B, C, D, M
0,07	A, D, M	B, C, D, M
0,10	A, D, M	B, C, D, M
0,30	M	-

A:= Agitação: B = Natação errática: C = Espasmos musculares:

D = Perda da capacidade de arfagem;

P = Permanência na superfície da coluna d'água e M = Mortalidade.

O valor da CL50;48h do fipronil para a tilápia foi igual ao valor da CL50;96h para a espécie popularmente chamada de guarú (*Poecilia reticulata*) na ausência de sedimento (MANRIQUE et al, 2013) e para o peixe “bluegill” (*Lepomis Macrochirus*) (USEPA, 1996).

Além disso, esse valor foi similar ao valor de CL50;96h para o guarú (*Poecilia reticulata*) na presença de sedimento (0,09 mg L⁻¹), sendo também

classificado como extremamente tóxico para esta espécie (MANRIQUE et al, 2013).

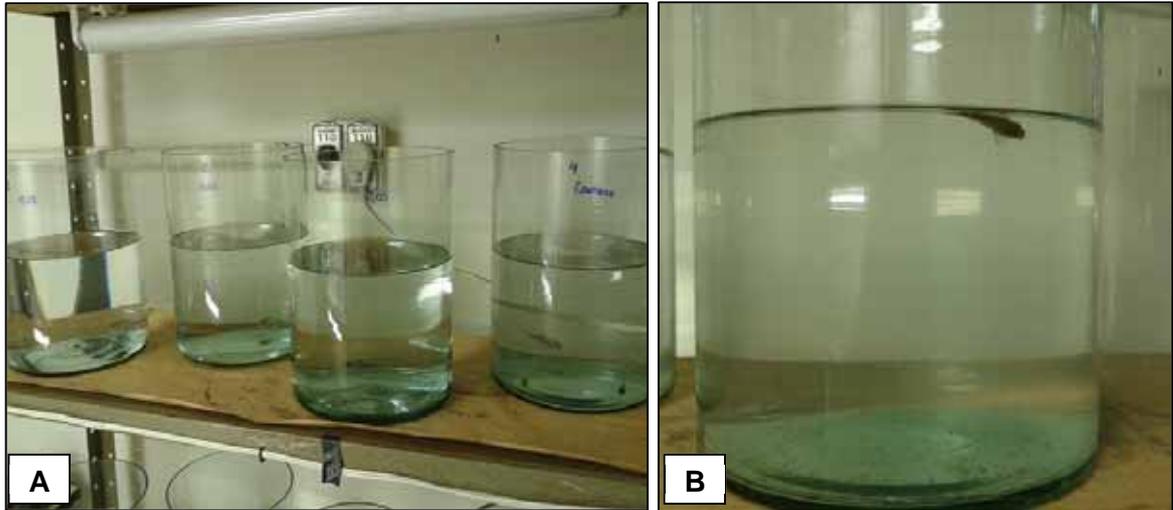


Figura 4. A) Ensaio de toxicidade aguda para tilápia. B) Mortalidade dos peixes em 0,1 mg L⁻¹.

A partir da análise das variáveis de qualidade de água durante os ensaios de toxicidade aguda do fipronil para a tilápia, ocorreram variações em todas as variáveis.

Ao término dos ensaios, a condutividade elétrica variou de $176,9 \pm 0,56 \mu\text{S cm}^{-1}$ no controle para $176,6 \pm 1,55 \mu\text{S cm}^{-1}$ na concentração de 0,1 mg L⁻¹. A variação média do pH foi de $7,7 \pm 0,14$ no controle para $7,83 \pm 0,05$ na concentração de 0,1 mg L⁻¹. A temperatura manteve-se praticamente constante.

O oxigênio dissolvido variou de $1,77 \pm 1,36 \text{ mg L}^{-1}$ no controle para $1,2 \pm 1,73 \text{ mgL}^{-1}$ na concentração de 0,1 mg L⁻¹, sendo considerada uma variação grande causada pelo fipronil (Tabela 11).

Tabela 11. Variáveis de oxigênio dissolvido durante os ensaios de toxicidade aguda do fipronil para os peixes da espécie tilápia (0; 24 e 48 horas de exposição).

Concentração (mg L ⁻¹)	Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)		
	0h	24h	48h
0,00	4,4	3,4	1,7
0,03	4,5	3,1	2,0
0,05	4,2	3,0	2,2
0,07	4,3	2,9	1,8
0,10	4,6	3,1	1,2
0,30	4,2	3,5	-

- ausência das parcelas – todos os peixes morreram em 24h.

5.2. Toxicidade aguda e classificação ecotoxicológica do fipronil para caramujos *P. canaliculata*

A concentração efetiva média (CE50;48h) do fipronil estimada para o caramujo foi de 2629,08 mg L⁻¹, com limite inferior de 2516,53 mg L⁻¹ e limite superior de 2746,67 mg L⁻¹. O fipronil é classificado como praticamente não-tóxico para o caramujo *P. canaliculata* (ZUCKER, 1985).

A partir das variações nas porcentagens de mortalidade nas concentrações avaliadas durante os ensaios de toxicidade aguda do fipronil para o caramujo, a média de mortalidade foi calculada para cada uma incluindo o controle (Tabela 12).

Tabela 12. Porcentagem média e desvio padrão de mortalidade dos três ensaios definitivos com fipronil para o caramujo.

Concentração (mg L ⁻¹)	Mortalidade média (%)
0	0,00
1900	0,00
2200	6,66 ± 2,10
2500	33,33 ± 12,57
2800	60 ± 14,54
3100	100,00

A OECD (2008) estipula que os ensaios de toxicidade aguda devem ser realizados com concentrações de no máximo $100,0 \text{ mg L}^{-1}$, pois a ausência de mortalidade nesta concentração indica que o organismo não é do grupo dos mais sensíveis para a substância em exposição à curto prazo.

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas concentrações maiores, com o valor máximo de $10.000,0 \text{ mg L}^{-1}$, ou seja, cem vezes a recomendada pela OECD (2008).

Não foram observados sinais de intoxicação nos caramujos após 24 horas de exposição ao fipronil. Durante os ensaios os animais subiam nas bordas dos aquários por um curto período de tempo, o que é considerado comportamento normal desta espécie. No intervalo de 24 a 48 horas de exposição, os caramujos apresentaram sinais de intoxicação como a permanência dentro da concha e a diminuição da locomoção dentro do aquário (Figura 5 A e B).

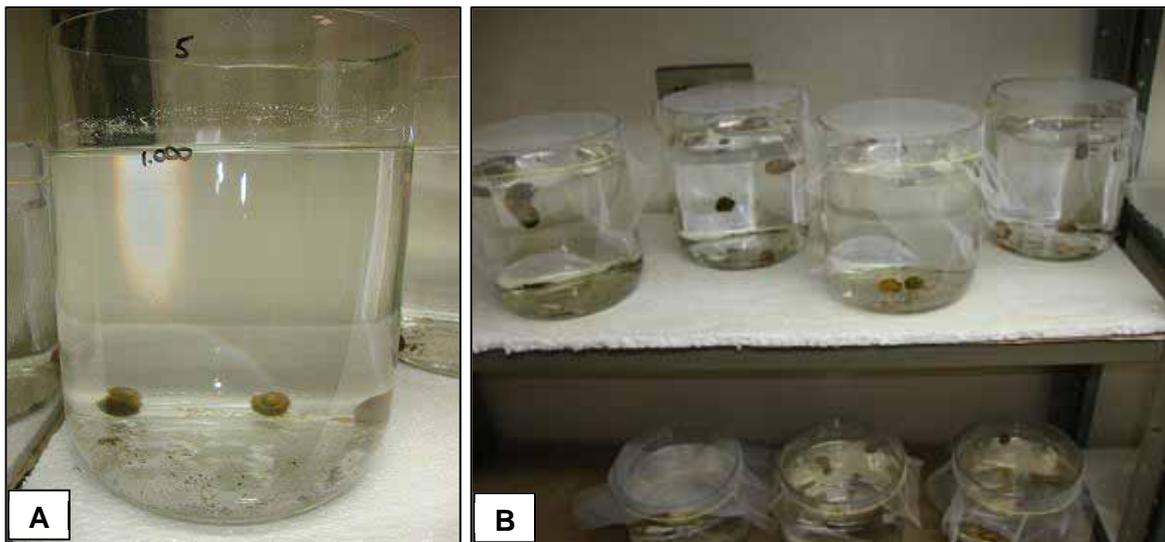


Figura 5. A e B) Ensaios de toxicidade aguda do fipronil para o caramujo.

Após 48 horas de exposição, os animais também apresentaram o comportamento de letargia na resposta ao estímulo de toque durante a avaliação da mortalidade/imobilidade nas concentrações de $2500, 2800$ e 3100 mg L^{-1} .

Pela baixa sensibilidade destes organismos ao fipronil, considera-se que não sejam bons bioindicadores para este inseticida. Porém, não é possível generalizar, pois podem ser sensíveis a outras substâncias. Washington (1984)

explica que indicadores biológicos são úteis devido a sua especificidade a certos tipos de impacto, pois inúmeras espécies são comprovadamente sensíveis a um tipo de poluente, mas tolerantes a outros (WASHINGTON, 1984).

Na análise das variáveis de qualidade de água durante os ensaios de toxicidade aguda do fipronil para o caramujo ocorreram alterações em todas as variáveis.

Após o período de exposição, a temperatura variou de $24,8 \pm 0,91$ °C no controle para $24,3 \pm 1,15$ °C na concentração de 3100 mg L^{-1} . A condutividade elétrica variou de $192,3 \pm 3,48 \mu\text{S cm}^{-1}$ no controle para $191,8 \pm 3,98 \mu\text{S cm}^{-1}$ na concentração de 3100 mg L^{-1} . A variação média do pH foi de $7,83 \pm 0,14$ no controle para $7,81 \pm 0,23$ na concentração de 3100 mg L^{-1} .

O oxigênio dissolvido variou de $3,8 \pm 0,65 \text{ mg L}^{-1}$ no controle para $12,8 \pm 1,19 \text{ mg L}^{-1}$ na concentração de 3100 mg L^{-1} , sendo considerada uma variação grande causada pelo fipronil (Tabela 13).

Tabela 13. Variáveis de oxigênio dissolvido durante os ensaios de toxicidade aguda do fipronil para o caramujo (0; 24 e 48 horas de exposição).

Concentração (mg L^{-1})	Oxigênio dissolvido (mg L^{-1})		
	0h	24h	48h
0,0	5,0	4,3	3,8
1900	4,9	4,0	3,2
2200	4,9	3,9	3,0
2500	4,8	4,0	3,1
2800	5,0	4,6	3,0
3100	5,1	4,5	2,8

5.3. Toxicidade aguda e classificação ecotoxicológica do fipronil para *Daphnia magna*

A concentração efetiva média (CE50;48h) do fipronil estimada para a *Daphnia magna* foi de $0,025 \text{ mg L}^{-1}$, com limite inferior de $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ e limite superior de $0,035 \text{ mg L}^{-1}$. O fipronil é classificado como extremamente tóxico para a *D. magna* (ZUCKER, 1985).

A CL50;48h do fipronil para *D. magna* foi similar à CL50;96h estimada para a *D. pulex*, com o valor de 0,016 mg L⁻¹, mas a concentração de 0,08 mg L⁻¹ de fipronil causou mortalidade total durante os ensaios de toxicidade aguda (STARK e VARGAS, 2005).

Ocorreram variações nas porcentagens de mortalidade nas concentrações avaliadas (Tabela 14) durante os ensaios de toxicidade aguda do fipronil para a *Daphnia magna* (Figura 6 A e B).

Tabela 14. Porcentagem média e desvio padrão de mortalidade dos três ensaios definitivos com fipronil para a *Daphnia magna*.

Concentração (mg L ⁻¹)	Mortalidade média (%)
0,000	0,0
0,002	0,0
0,005	4,4 ± 3,1
0,010	15,5 ± 11,3
0,050	66,6 ± 14,3
0,100	100,0

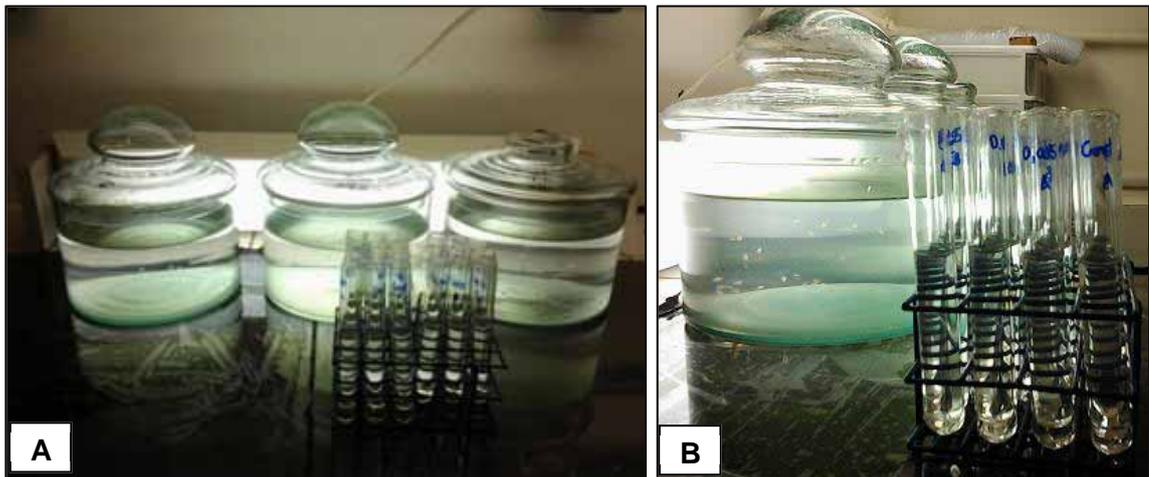


Figura 6. A e B) Ensaio de toxicidade aguda do fipronil para *D. magna*.

Baixas concentrações de fipronil já são suficientes para a ocorrência de mortalidade na população de *D. magna*. Além disso, o fipronil pode manter-se no ambiente por um longo tempo.

No estudo de Scott et al. (2008), o fipronil permaneceu no ambiente após seis meses de uma única aplicação de $0,005 \text{ mg L}^{-1}$ em um cultura de arroz, e causou a diminuição da população de macroinvertebrados aquáticos do local.

A diminuição da população de macroinvertebrados pode levar ao desequilíbrio do ecossistema aquático, pois estes animais são alimento para invertebrados e peixes na cadeia alimentar, afetando, portanto, diversas outras espécies presentes no local.

5.4. Toxicidade aguda e classificação ecotoxicológica do fipronil para macrófitas

5.4.1. *Lemna minor*

A concentração letal 50% média (CL₅₀;7d) do fipronil estimada para a *Lemna minor* foi de $3283,79 \text{ mg L}^{-1}$, com limite inferior de $2497,33 \text{ mg L}^{-1}$ e limite superior de $4317,93 \text{ mg L}^{-1}$. O fipronil é classificado como praticamente não-tóxico para a *L. minor* (ZUCKER, 1985).

Ocorreram variações nas porcentagens de inibição de emergência nos ensaios de toxicidade aguda para *L. minor* (Figura 7 A e B) entre as concentrações avaliadas, sendo que a máxima concentração ($9600,0 \text{ mg L}^{-1}$) causou o valor médio máximo de 88,67% de inibição de emergência nas plantas (Tabela 15).

Tabela 15. Porcentagem média e desvio padrão de mortalidade dos três ensaios definitivos com fipronil para a *Lemna minor*.

Concentração (mg L^{-1})	Inibição de emergência média (%)
0,0	0,00
600,0	$29,24 \pm 8,47$
1200,0	$30,18 \pm 10,03$
2400,0	$46,22 \pm 9,54$
4800,0	$50,00 \pm 12,22$
9600,0	$88,67 \pm 21,30$

Sendo a inibição do GABA no sistema nervoso dos animais o principal mecanismo de ação do fipronil, este não afetará macrófitas devido à diferença na fisiologia das mesmas.

Mesmo que altas concentrações não causem intoxicação à *L. minor*, estas podem levar à mortalidade de outras espécies já em baixas concentrações, ou ainda causarem efeitos não externalizados no organismo dos animais presentes no ecossistema aquático. Como é possível observar nos resultados anteriores, em que concentrações menores que $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de fipronil são capazes de causar a morte dos peixes e daphnias.

Além disso, apesar de não causar mortalidade à macrófita *L. minor*, o fipronil pode se acumular em suas raízes ou até ser absorvido pela planta. Neste caso, espécies de peixes herbívoras poderão se contaminar indiretamente com o inseticida no momento em que consumirem estas macrófitas contaminadas. No caso de sobrevivência destes peixes, estes servirão de alimento para espécies carnívoras e para o homem, causando risco de contaminação indireta com fipronil.

Por exemplo, a bioacumulação de fipronil determinada no músculo ($42,3 \text{ ng g}^{-1}$) e no fígado ($58,6 \text{ ng g}^{-1}$) de parte (30%) dos peixes (*Hoplias malabaricus*) de um lago no Estado do Paraná, Brasil (MIRANDA et al., 2008). Esta espécie é considerada carnívora e pode se contaminar pelo inseticida diluído na água onde vive ou pelas espécies contaminadas das quais se alimentou.

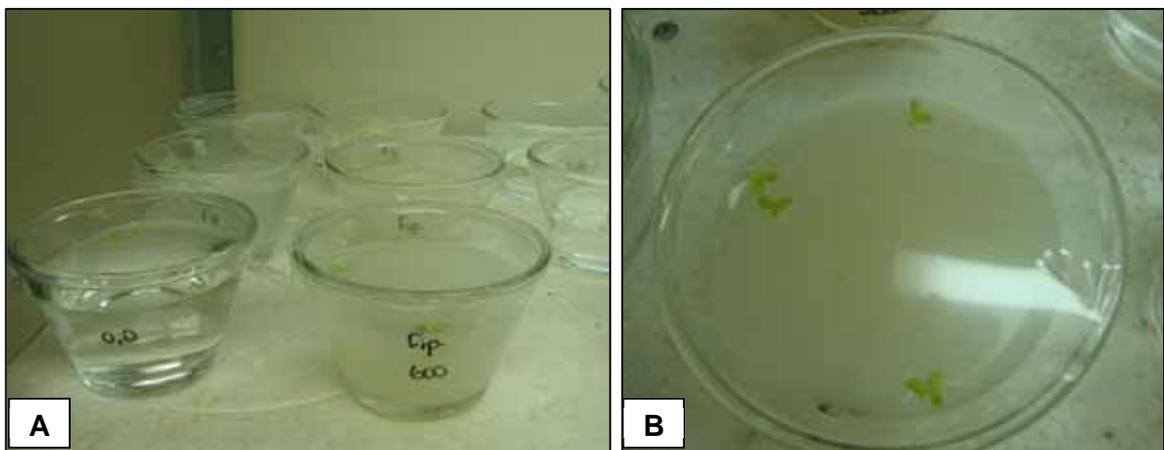


Figura 7. A e B) Ensaio de toxicidade aguda do fipronil para *L. minor*.

5.4.2. *Azolla caroliniana*

A concentração letal 50% média (CL50;7d) do fipronil estimada para a *Azolla caroliniana* foi de 7855,41 mg L⁻¹, com limite inferior de 6547,12 mg L⁻¹ e limite superior de 8266,33 mg L⁻¹. O fipronil é classificado como praticamente não-tóxico para a *A. caroliniana* (ZUCKER, 1985).

Ocorreram variações nas porcentagens de sinais de intoxicação para *Azolla caroliniana* nas maiores concentrações de fipronil avaliadas, sendo a maior porcentagem média (95%) na maior concentração (9600,0 mg L⁻¹) (Tabela 16).

Tabela 16. Porcentagem média e desvio padrão de intoxicação dos três ensaios definitivos com fipronil para a *Azolla caroliniana*.

Concentração (mg L ⁻¹)	Sinais de fitotoxicidade (%)
0,0	0,00
1200,0	0,00
2800,0	0,00
4400,0	10,00 ± 5,00
7000,0	50,00 ± 10,00
9600,0	95,00 ± 10,00

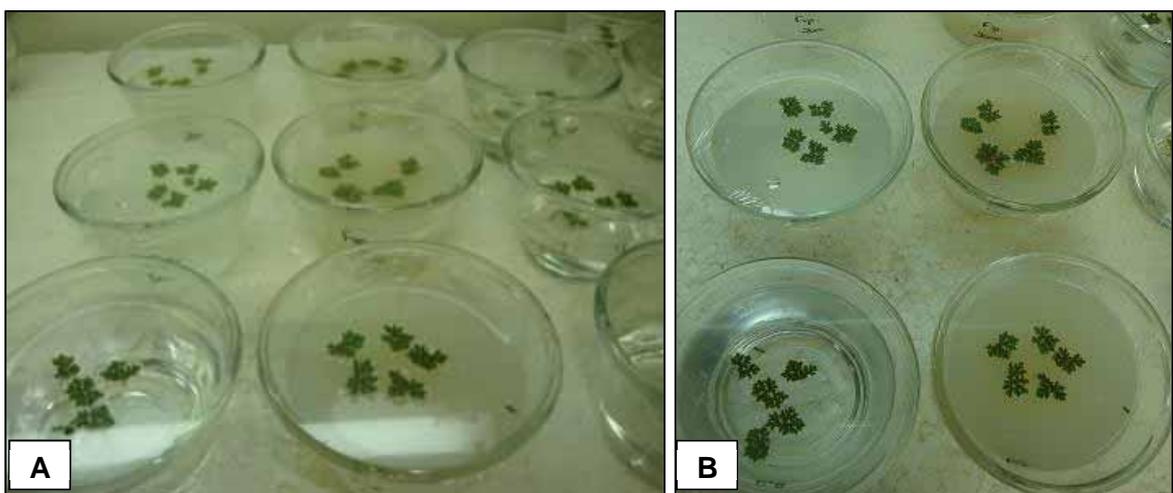


Figura 8. A e B) Ensaio de toxicidade aguda do fipronil para *A. caroliniana*.

A *A. caroliniana* é considerada um bom bioindicador de contaminação de água por herbicidas, pois é sensível a baixas concentrações desta classe de agrotóxicos (Tabela 17). O alto valor de CL50;7d obtido se justifica pelo fato de que o fipronil não tem ação herbicida, somente de inseticida. Este efeito pode ser observado nos resultados obtidos neste estudo (Tabela 17).

Tabela 17. Toxicidade de alguns herbicidas para *A. caroliniana* (SILVA et al., 2012)

HERBICIDA	CL50;7d (mg L ⁻¹)
Glyphosate (Scout[®])	23,66
Glyphosate (Trop[®])	38,91
Oxyfluorfen	80,50
Clomazone	129,63
2,4-D	708,35

Da mesma forma que para a *L. minor*, o fipronil pode se acumular em suas raízes ou ser absorvido. Sendo as macrófitas, a base da cadeia alimentar aquática, há um risco de contaminação pelo fipronil de todas as espécies dependentes destas plantas.

5.5. Variação da relação entre as concentrações crescentes de fipronil e mortalidade das espécies

Nas equações ajustadas entre as concentrações crescentes de fipronil e a mortalidade das espécies estudadas observa-se padrões de respostas diferenciadas (Figura 9). Para as espécies de peixes, ocorreram diferenças nas respostas. A intoxicação do mato-grosso é linear ao aumento da concentração do fipronil na água e quadrática para as espécies pacu e tilápia.

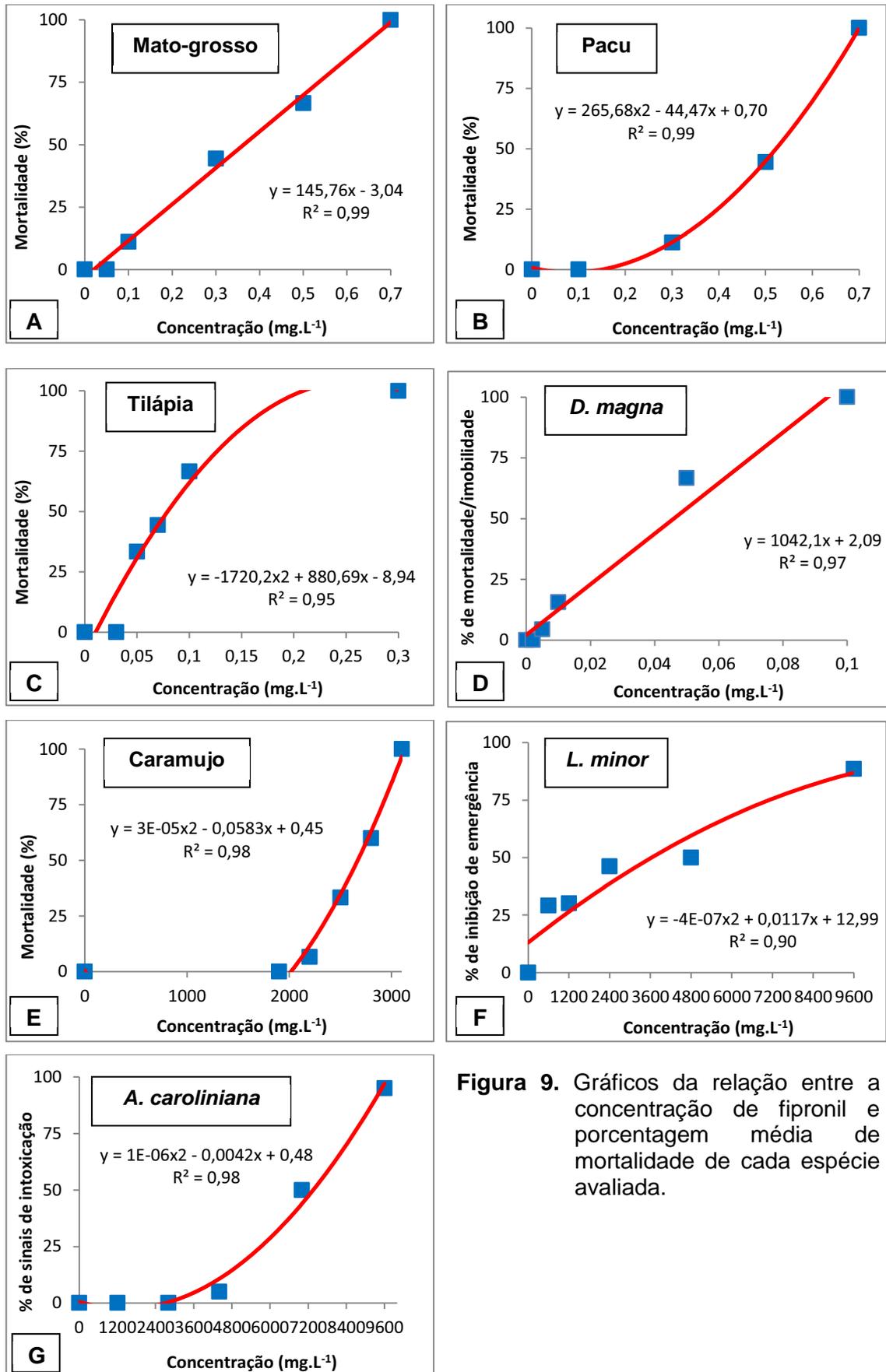


Figura 9. Gráficos da relação entre a concentração de fipronil e porcentagem média de mortalidade de cada espécie avaliada.

Em menores concentrações, espera-se que o pacu responda de forma mais lenta à contaminação por fipronil. Os efeitos da contaminação por fipronil nas espécies matogrosso e tilápia serão mais rápidos no mesmo intervalo de tempo.

Este efeito pode ser importante para o manejo destes peixes em condições de contaminações com o fipronil das águas de pisciculturas. A morte dos peixes não será imediata, mas a partir de determinada concentração a mortalidade se torna muito rápida.

É possível observar que determinados intervalos de concentração de fipronil causam porcentagens similares de mortalidade, como para a *D. magna* entre 0,002 e 0,02 mg L⁻¹; para o caramujo entre 2000 e 2800 mg L⁻¹; para a *L. minor* e para a *A. caroliniana* entre 1200 e 4800 mg L⁻¹ (Figura 9).

Em casos como para o caramujo, a regressão linear apresenta-se crescente de tal modo devido às altas concentrações de fipronil avaliadas, ou seja, o intervalo de concentrações que causa 0 e 100% de mortalidade é grande (2000 a 3000 mg L⁻¹) (Figura 9 E).

Portanto, as macrófitas e o caramujo não seriam bons indicadores no caso de uma contaminação por fipronil. Além de não serem sensíveis a este inseticida, demonstram sinais de intoxicação somente em concentrações muito elevadas, as quais dificilmente seriam encontradas no ambiente aquático.

5.6. Avaliação do risco de intoxicação ambiental do fipronil

Dentre as classificações de risco de intoxicação ambiental utilizadas, a de Goktepe et al. (2004) é mais rígida, pois é uma classificação ecológica enquanto que as demais são classificações técnicas utilizadas principalmente na regulamentação de produtos por empresas.

Os valores dos quocientes de risco (Q) do fipronil para um corpo d'água de 0,3m de profundidade encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18. Valores (Q) da relação entre as diluições da CAE para um corpo de água de profundidade de 0,30 m e a CL50 para cada espécie avaliada.

Espécie	CL50 ou CE50	Q para 100% CAE (0,133 mg L ⁻¹)	Q para 50% CAE (0,066 mg L ⁻¹)	Q para 25% CAE (0,033 mg L ⁻¹)	Q para 12,5% CAE (0,016 mg L ⁻¹)	Q para 6,25% CAE (0,008 mg L ⁻¹)	Q para 3,12% CAE (0,004 mg L ⁻¹)	Q para 1,56% CAE (0,002 mg L ⁻¹)
Mato-grosso	0,28	0,475	0,235	0,117	0,057	0,028	0,014	0,007
Pacu	0,45	0,295	0,146	0,073	0,035	0,017	0,008	0,004
Tilápia	0,08	1,662	0,825	0,412	0,2	0,1	0,05	0,025
Caramujo	2629,08	0,000051	0,000025	0,000013	0,000006	0,000003	0,000002	0,000001
<i>D. magna</i>	0,025	5,32	2,64	1,32	0,64	0,32	0,16	0,08
<i>L. minor</i>	3283,79	0,000041	0,000020	0,000010	0,000005	0,000002	0,000001	0,000001
<i>A. caroliniana</i>	7855,41	0,000017	0,000008	0,000004	0,000002	0,000001	0,000001	0,0000003

De acordo com a classificação de risco de intoxicação ambiental proposta pela USEPA (1987), o fipronil classifica-se como de baixo risco para o mato-grosso nas concentrações de 0,133; 0,066 e 0,033 mg L⁻¹, e classifica-se como sem risco para as demais proporções da CAE avaliadas (Tabela 19).

Para o pacu, o fipronil classifica-se como de baixo risco nas concentrações de 0,133 e 0,066 mg L⁻¹; e como sem risco nas demais concentrações de fipronil. Para a tilápia, o fipronil classifica-se como de risco moderado na concentração de 0,133 mg L⁻¹; de baixo risco para 0,066; 0,033; 0,016 e 0,008 mg L⁻¹; e sem risco para 0,004 e 0,002 mg L⁻¹.

Para a *D. magna*, o fipronil classifica-se como de risco moderado nas concentrações de 0,133; 0,066 e 0,033 mg L⁻¹; de baixo risco para 0,016; 0,008 e 0,004 mg L⁻¹; e sem risco para 0,002 mg L⁻¹.

Para as demais espécies (*P. canaliculata*, *L. minor*, *A. caroliniana*), o fipronil classifica-se como sem risco em todas as concentrações de fipronil avaliadas.

Tabela 19. Classificação do risco de intoxicação ambiental em um corpo de água de 0,3 m de cada diluição da CAE para cada espécie avaliada.

Espécie	USEPA (1987)			Goktepe et al. (2004)			Urban e Cook (1986)	
	Sem risco	Risco baixo	Risco moderado	Baixo risco	Médio risco	Alto risco	Risco com nenhum efeito adverso	Risco com possibilidade e de efeito adverso
Mato-grosso	1,56% - 12,5%	25% - 100%		1,56% - 6,25%	12,5% - 100%		1,56% - 12,5%	25%-100%
Pacu	1,56% - 25%	50%- 100%		1,56% - 12,5%	25% - 100%		1,56% - 12,5%	25% - 100%
Tilápia	1,56% - 3,12%	6,25% - 50%	100%	1,56%	3,12% - 25%	50% - 100%	1,56% - 6,25%	12,5% - 100%
Caramujo	Todas			Todas			Todas	
<i>D. magna</i>	1,56%	3,12% - 12,5%	25% - 100%	1,56%	3,12% - 6,25%	12,5% - 100%	1,56%	3,12% - 100%
<i>L. minor</i>	Todas			Todas			Todas	
<i>A. caroliniana</i>	Todas			Todas			Todas	

100,0% (0,133 mg L⁻¹), 50,0% (0,066 mg L⁻¹), 25,0% (0,033 mg L⁻¹), 12,5% (0,016 mg L⁻¹), 6,25% (0,008 mg L⁻¹), 3,12% (0,004 mg L⁻¹) e 1,56% (0,002 mg L⁻¹)

De acordo com a classificação de risco de intoxicação ambiental proposta por Goktepe et al. (2004), o fipronil classifica-se como de médio risco para o mato-grosso nas concentrações de 0,133; 0,066; 0,033 e 0,016 mg L⁻¹; e de baixo risco para as demais concentrações avaliadas.

Para o pacu, o fipronil classifica-se como de médio risco em 0,133; 0,066 e 0,033 mg L⁻¹; e de baixo risco nas demais concentrações avaliadas.

Para a tilápia, o fipronil classifica-se como de alto risco nas proporções de 0,133 e 0,066 mg L⁻¹; de médio risco para 0,003; 0,016; 0,008 e 0,004 mg L⁻¹; e de baixo risco para 0,002 mg L⁻¹.

Para a *D. magna*, o fipronil classifica-se como de alto risco nas proporções de 0,133; 0,066; 0,033 e 0,016 mg L⁻¹; de médio risco para 0,008 e 0,004 mg L⁻¹; e de baixo risco para 0,002 mg L⁻¹.

Para as demais espécies (*P. canaliculata*, *L. minor*, *A. caroliniana*), o fipronil classifica-se como sem risco em todas as concentrações avaliadas.

De acordo com a classificação de risco de intoxicação ambiental proposta por Urban e Cook (1986), o fipronil classifica-se como de risco com a possibilidade de efeito adverso para o mato-grosso e para o pacu nas proporções de 0,133; 0,066 e 0,033 mg L⁻¹; e de risco com nenhum efeito adverso para as demais concentrações avaliadas.

Para a tilápia, o fipronil classifica-se como de risco com a possibilidade de efeito adverso em 0,133; 0,066; 0,033 e 0,016 mg L⁻¹; e de risco com nenhum efeito adverso nas demais concentrações avaliadas.

Para a *D. magna*, o fipronil classifica-se como de risco com a possibilidade de efeito adverso em todas as proporções da CAE, exceto para 0,002 mg L⁻¹, na qual se classifica como de risco com nenhum efeito adverso.

Para as demais espécies (*P. canaliculata*, *L. minor*, *A. caroliniana*), o fipronil classifica-se como de risco com nenhum efeito adverso em todas as concentrações avaliadas (Tabela 19).

Os valores dos quocientes de risco (Q) do fipronil para um corpo d'água de 2,0m de profundidade encontram-se na Tabela 20.

Tabela 20. Valores (Q) da relação entre as diluições da CAE para um corpo de água de profundidade de 2,0 m e a CL50 para cada espécie avaliada.

Espécie	CL50 ou CE50	Q para 100% CAE (0,02 mg L ⁻¹)	Q para 50% CAE (0,01 mg L ⁻¹)	Q para 25% CAE (0,005 mg L ⁻¹)	Q para 12,5% CAE (0,0025 mg L ⁻¹)	Q para 6,25% CAE (0,0012 mg L ⁻¹)	Q para 3,12% CAE (0,0006 mg L ⁻¹)	Q para 1,56% CAE (0,0003 mg L ⁻¹)
Mato-grosso	0,28	0,071	0,035	0,017	0,008	0,004	0,002	0,001
Pacu	0,45	0,044	0,022	0,011	0,005	0,002	0,001	0,0006
Tilápia	0,08	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015	0,0075	0,00375
Caramujo	2629,08	0,000007	0,000003	0,000001	0,000009	0,000000 4	0,000000 2	0,000000 1
<i>D. magna</i>	0,025	0,8	0,4	0,2	0,1	0,048	0,024	0,012
<i>L. minor</i>	3283,79	0,000006	0,000003	0,000001	0,0000007	0,000000 3	0,000000 1	0,000000 09
<i>A. caroliniana</i>	7855,41	0,000002	0,000001	0,000000 6	0,0000003	0,000000 1	0,000000 07	0,000000 03

De acordo com a classificação de risco de intoxicação ambiental proposta pela USEPA (1987), o fipronil classifica-se como de baixo risco para o mato-grosso e para o pacu em todas as proporções da CAE avaliadas (Tabela 21).

Para a tilápia, o fipronil classifica-se como de baixo risco em 0,02 e 0,01 mg L⁻¹; e sem risco nas demais concentrações avaliadas.

Para a *D. magna*, o fipronil classifica-se como de baixo risco nas concentrações de 0,02; 0,01; 0,005 e 0,0025 mg L⁻¹; e sem risco para 0,0012; 0,0006 e 0,0003 mg L⁻¹.

Tabela 21. Classificação do risco de intoxicação ambiental em um corpo de água de 2,0m de cada diluição da CAE para cada espécie avaliada.

Espécie	USEPA (1987)		Goktepe et al. (2004)			Urban e Cook (1986)	
	Sem risco	Risco baixo	Baixo risco	Médio risco	Alto risco	Risco com nenhum efeito adverso	Risco com possibilidade de efeito adverso
Mato-grosso	Todas		1,56% - 50%	100%		Todas	
Pacu	Todas		Todas			Todas	
Tilápia	1,56% - 25%	50% - 100%	1,56% - 12,5%	25% - 100%		1,56 - 25%	50% - 100%
Caramujo	Todas		Todas			Todas	
<i>D. magna</i>	1,56% - 6,25%	12,5% - 100%	1,56% - 6,25%	12,5% - 50%	100%	1,56% - 6,25%	12,5% - 100%
<i>L. minor</i>	Todas		Todas			Todas	
<i>A. caroliniana</i>	Todas		Todas			Todas	

100,0% (0,02 mg L⁻¹), 50,0% (0,01 mg L⁻¹), 25,0% (0,005 mg L⁻¹), 12,5% (0,0025 mg L⁻¹), 6,25% (0,0012 mg L⁻¹), 3,12% (0,0006 mg L⁻¹) e 1,56% (0,0003 mg L⁻¹)

Para as demais espécies (*P. canaliculata*, *L. minor*, *A. caroliniana*), o fipronil classifica-se como sem risco em todas as concentrações avaliadas.

De acordo com a classificação de risco de intoxicação ambiental proposta por Goktepe et al. (2004), o fipronil classifica-se como de médio risco para o mato-grosso na concentração de 0,02 mg L⁻¹; e de baixo risco para as demais concentrações avaliadas (Tabela 21).

Para a tilápia, o fipronil classifica-se como de médio risco nas proporções de 0,02; 0,01 e 0,005 mg L⁻¹; e de baixo risco para as demais concentrações avaliadas.

Para a *D. magna*, o fipronil classifica-se como de alto risco para 0,02 mg L⁻¹; de médio risco para 0,01; 0,005 e 0,0025 mg L⁻¹; e de baixo risco para 0,0012; 0,0006 e 0,0003 mg L⁻¹.

Para as demais espécies (*P. mesopotamicus*, *P. canaliculata*, *L. minor*, *A. caroliniana*), o fipronil classifica-se como sem risco em todas as concentrações avaliadas.

De acordo com a classificação de risco de intoxicação ambiental proposta por Urban e Cook (1986), o fipronil classifica-se como de risco com a possibilidade de efeito adverso para a tilápia nas concentrações de 0,02 e 0,01 mg L⁻¹; e de risco com nenhum efeito adverso para as demais concentrações avaliadas (Tabela 21).

Para a *D. magna*, o fipronil classifica-se como de risco com a possibilidade de efeito adverso nas concentrações de 0,02; 0,01; 0,005 e 0,0025 mg L⁻¹; e para 0,0012; 0,0006 e 0,0003 mg L⁻¹ como de risco com nenhum efeito adverso.

Para as demais espécies (*H. eques*, *P. mesopotamicus*, *P. canaliculata*, *L. minor*, *A. caroliniana*), o fipronil classifica-se como de risco com nenhum efeito adverso em todas as concentrações avaliadas.

O risco de intoxicação do fipronil ao ambiente é importante na realização de monitoramento de contaminação ambiental de espelhos d'águas. Na avaliação de risco ambiental é necessário conhecimento sobre os possíveis efeitos que um determinado agrotóxico oferece ao ambiente como um todo. Estes efeitos dependem da sua ecotoxicidade a organismos terrestres e aquáticos (SILVA et al., 2013).

Estes efeitos dependem, ainda, das concentrações dos compostos tóxicos nos diferentes compartimentos ambientais (solo, água, planta e atmosfera) que, por sua vez, dependem da forma e das condições de aplicação, da quantidade ou dose usada e do comportamento e destino do agrotóxico no meio ambiente (SPADOTTO et al., 2004).

Altas concentrações de fipronil dificilmente atingiram o meio aquático, porém, como é possível observar após a análise de risco ambiental, doses muito baixas já são suficientes para causar intoxicação em organismos aquáticos como os peixes e o microcrustáceo *D. magna*.

Silva et al. (2007) estudaram a distribuição de alguns fungicidas (2,4-D, dicloreto de paraquate, clomazone, propanil, quincloraque, bispiribaque-sódico e metsulfuron-metílico) e inseticidas (carbofurano, permetrina, fipronil e paration metílico) em diferentes compartimentos ambientais na cultura de arroz. A água foi o compartimento de maior contaminação com os agrotóxicos. Portanto, baixas concentrações de fipronil podem chegar ao ambiente aquático facilmente.

5.7. Seleção das espécies mais adequadas para monitoramento da contaminação de águas com fipronil

A espécie *D. magna* foi selecionada como a mais adequada como bioindicador, pois apresenta o menor valor de CE₅₀;48h do fipronil (0,025 mg L⁻¹). Além disso, sendo a relação concentração-mortalidade linear, esta espécie demonstra uma resposta padrão com o aumento das concentrações de fipronil na água, o que facilita a observação e avaliação destes organismos no meio ambiente aquático.

As espécies de peixes também foram consideradas adequadas pela alta sensibilidade ao fipronil, sendo a tilápia mais sensível, seguida pelo pacu e matogrosso. Peixes são importantes organismos-teste no monitoramento de contaminação aquática, pois respondem de modo diferente às substâncias (RAMELOW et al., 1989; SCHULZ e MARTINS-JUNIOR, 2001). Além disso, outros estudos também comprovam que os peixes e daphnias são os principais bioindicadores de contaminação aquática (BRIGANTE e ESPÍNDOLA, 2003).

O caramujo *P. canaliculata* e as macrófitas *Lemna minor* e *Azolla caroliniana* são inadequados como bioindicadores para o monitoramento do risco ambiental de contaminações de águas com o fipronil, pois obtiveram altos valores de CL₅₀ e CE₅₀; 48h e baixa sensibilidade a este produto.

6. CONCLUSÕES

O fipronil classifica-se como extremamente tóxico para o peixe da espécie tilápia e para a *D. magna*; como altamente tóxico para mato-grosso e pacu; e como praticamente não tóxico para o caramujo *P. canaliculata*, e para as macrófitas *L. minor* e *A. caroliniana*.

A *D. magna* é a espécie mais adequada como bioindicador para monitorar a contaminação de ambientes aquáticos com fipronil, seguida pela tilápia, pacu e mato grosso. As macrófitas *Lemna minor* e *Azolla caroliniana* e o caramujo são inadequados como bioindicadores para o monitoramento do risco ambiental de contaminações de águas com o fipronil.

O fipronil não causa alterações na temperatura, condutividade elétrica e pH da água, mas pode causar diferentes níveis de redução do oxigênio dissolvido após 48 horas da diluição.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 15088: **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes**. São Paulo, 19p. 2011.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12713: **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera)**. São Paulo, 23p. 2011.

AAJOUND, A., RAVANEL, P., TISSUT, M. Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. **J. Agric. Food. Chem.** v. 51, p. 1347-1352, 2003.

ALI, A., CHOWDHURY, M. A., HOSSAIN, M. I., AMEEN, M-U., HABIBA, D. B., ASLAM, A. F. M. 1999. Laboratory evaluation of selected larvicides and insect growth regulators against field-collected *Culex quinquefasciatus* larvae from urban Dhaka, Bangladesh. **J. Am. Mos. Control Assoc.** v. 15, p. 43-47.

AKAISHI, K. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; JACOBI, S. C. G.; EIRAS-STOFELLA, D. R.; STJEAN, S.; COURTENEY, S. C.; LIMA, E. F.; WAGENER, A. L.; SCOFIELD, A. L.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Arch. of Environ. Cont. Toxicol.**, v. 46, n. 2, p. 244-253, 2004.

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. **Regent 800 WG: Relatório de produtos formulados**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2007. 3p.

AGUIAR, L. H. MORAES, G. AVILEZ, I. M. ALTRAN, A. E. CORRÊA, C. F. Metabolic effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus* **Environ. Res.**, n. 95, p. 224-230, 2004.

ANDREI, E. (Ed.). **Compêndio de defensivos agrícolas: Guia prático de produtos fitossanitários**. 6ª. ed. São Paulo. 1999. 672p.

ARAUCO, L. R. R.; CRUZ, C.; MACHADO-NETO, J. G. Efeito da presença de sedimento na toxicidade aguda do sulfato de cobre e do triclorfon para três espécies de *Daphnia*. **Pest.: Rev. Ecotox. Meio Amb.**, v. 15, p. 55-64, 2005.

BALANÇA, G.; DE VISSCHER, M. Impacts on non-target insects of a new insecticide compound used against the desert locust *Schistocerca gregaria* (Forskål 1775). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 32, p. 58–62, 1997.

BAUN, A.; KLOEFT, L.; BJERG, P.L. & NYHOLM, N. Toxicity testing of organic chemicals in groundwater polluted with land fill leached. **Environ. Toxicol. and Chem.**, v. 18, n. 9, p. 2046-2053, 1999.

BOBE, A., COOPER, J. F., COSTE, C. M. Factors Influencing the adsorption of fipronil on soils. **J. Agricul. and Food Chem.**, v. 45, p. 4861-4865, 1997.

BOBÉ, A.; COOPER, J. F.; COSTE, C. M.; MULLER, M. A. Behavior of Fipronil in Soil under Sahelian Plain Field Conditions. **Pestic Sci.**, v. 52, p. 275-281, 1998.

BOOCK, M.V; MACHADO-NETO, J.G. Estudos toxicológicos do oxicloreto de cobre para tilápia vermelha (*Oreochromis* sp.). **Arq. Inst. Biol.**, v. 67, p. 215-221, 2000.

BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E. L. G. **Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu**. São Carlos: Rima, 2003. 255p.

BURNS, L. **Probabilistic aquatic exposure assessment for pesticides**. Athens, Environmental Protection Agency. EPA/600/R-01/071. 2001, 43p.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Scien. Total Environ.**, v. 247, p. 201-212, 2000.

CAIRNS, J. R, J.; NIEDERLEHNER, B., BIDWELL, J. R. **Ecological toxicity testing**. In: MEYERS, R. A. (Ed.). Encyclopedia of environmental analysis and remediation., New York: John Wiley & Sons, 1998. 455p.

CALOW, P. **Handbook of ecotoxicology**. Oxford: Blackwell Sciences. 1993, v. 1, p. 478.

CASSIDY, J. S. **Avaliação da qualidade da água do rio Cértima através de ensaios cotoxicológicos**. 2010. Dissertação (Mestre em Engenharia do Ambiente) - Universidade de Aveiro, Aveiro, 2010. 90 p.

CHANDLER, G. T.; CARY, L. T.; VOLZ C. D.; WALSE, S. S.; FERRY, I. J.; KLOSTERHAUS, I.S. Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: a rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. **Enviro. Toxicol. Chem.**, v.23, n.1, p.117–124, 2004.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO – CETESB. **Proposta de Índices e Qualidade de Água para o Estado de São Paulo**. Coletânea de textos da Cetesb. 2002.

ESPÍNDOLA, E. L. G.; BRIGANTE, J.; DORNFELD, C. B. **Estudos ecotoxicológicos no rio Mogi-Guaçu**. In: BRIGANTE, J., ESPÍNDOLA, E. L. G. Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu. São Carlos: Rima, 2003. p.129–148.

FAO, 2003. **Etat de l'Aquaculture dans le monde**. Circulaire sur les pêches 2, 114.

FENG, T., LI, Z. B., GUO, X. Q., GUO, J. P. Effects of trichlorfon and sodium dodecyl sulfate on antioxidant defense system and acetylcholinesterase of *Tilapia nilotica* in vitro. **Pest. Biochem. Physiol.**, doi: 10.1016/j.pestbp.2007.10.002, 2007.

FREEMARK, K.; BOUTIN, C. Impacts of agricultural herbicide use on terrestrial wildlife in temperate landscapes: A review with special reference to North America. **Agri. Ecosyst. Environ.**, v. 18, p. 841-854, 1994.

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

GOKTEPE, I.; PORTIER, R. e AHMEDNA, M. Ecological Risk Assessment of Neem-Based Pesticides, **J. Environ. Scien. Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 39, n.2, p.311-320, 2004.

GOULART, M. e CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, ano 2, n. 1, 2003.

GRÜTZMACHER, D. D.; GRÜTZMACHER A. D.; AGOSTINETTO, D.; LOECK, A. E., ROMAN, R.; PEIXOTO, S. C.; ZANELLA, R. Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. **Rev. Brasil. Eng. Agr. e Amb.**, v. 12, n. 6, p. 632–637, 2008.

GUNASEKARA, A. S.; TROUNG, T. Environmental fate of Fipronil. **Environmental Monitoring Branch. Department of Pesticide Regulation. California Environmental Protection Agency. USA**, 2007.

HERRICKS, E. **Princípios gerais de toxicologia**. In: MATSUI, S.; BARRETT, B. F. D.; BANERJEE, J. Gerenciamento de substâncias tóxicas em lagos e reservatórios. (Série Diretrizes para o gerenciamento de lagos). São Carlos: ILEC -IIE. v. 4, p. 9 – 30, 2002.

HAMILTON, M.A. RUSSO, R.C. THURSTON, V. Trimed Sperm-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicology bioassays. **Environ. Scien. Technol.**, v. 7, p. 714-719, 1977.

KISS, I.; KOVÁTS, N.; SZALAY, T. Evaluation of some alternative guideline for risk assessment of various habitats. **Toxicology Letters**, v.140-141, p.411-417, 2003.

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

KONWICK, B. J., FISK, A. T., AVANTS, J. K., LONG J. M., & GARRISON, A. W. (2004). Bioaccumulation and enantioselective biotransformation of fipronil by rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*). **Fish Physiology, Toxicology, and Water Quality**. In Proceedings of the Eighth International Symposium in China. U.S. Environmental Protection Agency.

LOMBARDI, J. L. Fundamentos de Toxicologia Aquática. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. A. P. (eds.). **Sanidade de Organismos Aquáticos**. Editora Varela. São Paulo – SP, p. 263-272, 2004.

LOPES, R. B. **Caracterização dos lagos de pesca esportiva frente à qualidade de água e ao manejo empregado.** Dissertação mestrado SP. Unesp - Ilha Solteira, 2000.

LUMPKIN, T. A.; PLUCKNEET, D. L. Azolla: botany, physiology and use as green manure. **Soc. Econ. Bot.**, v. 34, p. 111-113, 1980.

MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MANRIQUE, W. G.; FIQUEIREGO, M. A. P.; MACHADO-NETO, J. G. Dissipation and environmental risk of fipronil on aquatic environment. **The Biologist (Lima)**, v. 11, n. 1, p. 107-117, 2013.

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

MITCHELL, S. E., HALVES, J., LAMPERT, W. Coexistence of similar genotypes of *Daphnia magna* in intermittent populations: response to thermal stress. **Oikos**, v. 106, n. 3, p. 469–478, 2004.

MIRANDA, A. L., ROCHE, H. B., RANDI, M. A. F., MENEZES, M. L., & OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings. **Environ. Intern.**, v. 34, p. 939–949, 2008.

MOHLER, H.; FRITSCHY, J. M.; CRESTANI, F.; HENSCH, T.; RUDOLPH, U. Specific GABA(A) circuits in brain development and therapy. **Biochem. Pharmacol.**, v.15, n.8, p.1685-1690, 2004.

NELSON, J. S. **Fishes of the world.** 4th ed. New Jersey: John Wiley e Sons, Inc. 601p., 2006.

NGIM, K. K.; CROSBY, D. G. Fate and kinetics of carfentrazone-ethyl herbicide in California, USA, flooded rice fields. **Environ. Toxic. Chem.**, v.20, p.485-490, 2001.

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

OECD, **Guideline for testing of chemicals draft revised guideline 203: Fish, Acute Toxicity Test**, 5p, 2008.

OHI, M.; DALSENER, P. R.; ANDRADE, A. J. M.; NASCIMENTO, A. J. Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats. **Toxic. Letters**, v. 146, p.121-127, 2004.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Evaluation of cytotoxic effects of Fipronil on ovaries of semi-engorged *Hipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female, **Food and Chem. Toxic.**, v. 46, p. 2459-2465, 2008.

PARMA DE CROUX, M. J.; LOTESTE, A.; CAZENAVE, J. Inhibition of plasma cholinesterase and acute toxicity and monocrotophos in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 69, p. 356-363, 2002.

RABITTO, I. S.; ALVES COSTA, J. R. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; PELLETIER, E.; AKAISHI, F. M.; ANJOS, A.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotox. Environ. Safety**, v. 60, p. 147-156, 2005.

RAMDORF, W. A. **Utilização de duas species de *Astyanax* (*Astyanax* sp e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico** (Fazenda Canguiri – UFPR). Dissertação de Mestrado, Curitiba, 2007.

RAMELOW, G.J.; WEBRE, C.L.; MUELLER, C.L.; BECK, J.N; YOUNG, J.C.; LANGLEY, M.P. Variations of heavy metals and arsenic in fish and other organisms from the Calcasien River and Lake, Louisiana. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 18, p. 804-818, 1989.

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

RHÔNE-POULENC AG COMPANY. 1998. **Application for Registration**. Volume No. 52062-071. Vol 1. Department of pesticide regulation, California Environmental Protection Agency, Sacramento, CA.

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

SANCHES, S. M.; SILVA, C. H. T. P.; CAMPOS, S. X.; VIEIRA, E. M. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 13, p. 53-58, 2003.

SCOTT, V. M.; STEPHEN, D. P.; DENNIS, K. D. Influence of fipronil compounds and rice-cultivation land-use intensity on macroinvertebrate communities in streams of southwestern Louisiana, USA. **Environ. Poll.**, v.152, p.497-503, 2008.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. 2004. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. **Embrapa Meio Ambiente, Documentos No. 42**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, 2004.

SILVA, C. L.; FOLONI, L. L.; PARAÍBA, L. C.; PLESE, L.P.M. Previsão ambiental da distribuição dos pesticidas aplicados na cultura de arroz. Pesticidas: **Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 17. p. 75-86, 2007.

SILVA, A. F.; CRUZ, C; NETO, A. N., PITELLI, R. A. Ecotoxicidade de herbicidas para a macrófita aquática (*Azolla caroliniana*). **Planta Daninha**, v.30, n.3, p.541-546, 2012.

SILVA, M. R.; CAMPOS, A. C. E.; BOHM, F. Z. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.8, n.2, p.46-58, 2013.

SINDAG. **Sindicato da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola**. Vendas de defensivos agrícolas por cultura de destinação e classes. SINDAG. p.1, 2006.

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

STARK, D. J.; VARGAS, I. R. Toxicity and hazard assessment of fipronil to *Daphnia pulex*. **Ecotox. Environ. Safety**. v. 62, p. 11–16, 2005.

STEVENS, M. M.; HELLIWELL S. S.; WARREN, G. N. Fipronil seed treatments for the control of chironomid larvae (*Diptera: Chironomidae*) in aerially-sown rice crops. **Field Crops Res.**, v. 57, p. 195–207, 1998.

SCHULZ, U.H. & MARTINS-JUNIOR, H. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brasil. **Brazilian Journal Biology**, v. 61, n. 4, p. 1-8, 2001.

TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT ON RISK ASSESSMENT, Part II, 2003, **Institute for Health and Consumer Protection**, European Chemicals Bureau, 337p.

TIERNEY, K. B., BALDWIN, D. H., HARA, T. J., ROSS, P. S., SCHOLZ, N. L., KENNEDY, C.J. Olfactory toxicity in fishes **Aquat. Toxicol.** n. 96, p. 2-26, 2010.

THOMAZ, S. M. Fatores Ecológicos Associados à Colonização e ao Desenvolvimento de Macrófitas Aquáticas e Desafios de Manejo. **Planta Daninha**, v. 20, p. 21-33, 2002. Edição Especial.

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

USEPA. **Proposed guidelines for ecological risk assessment**. Washington, D C, 1987. Risk Assessment Forum (EPA 630-R95-002B).

USEPA. Environmental Protection Agency. New Pesticide Fact Sheet. PB96-181516.EPA737-F-96-005. U.S.EPA. **Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances**, p1-10, 1996.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxic. Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

ZHAO, J. Z.; WU, S. C.; ZHU, G. R. Bioassays with recommended field concentrations of several insecticides for resistance monitoring in *Plutella xylostella*. **Res. Pest. Manag.**, v. 7, n. 1, p. 13–14, 1995.

WASHINGTON, H. G. Diversity, biotic and similarity indices. A review with special relevance to aquatic ecosystems. **Water Res.**, n. 18, p. 653-694, 1984.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M. A.; TRIBESS, T. B.; PEDROSA, R. C.; SOARES, C. H. L. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). **Brazil. J. Medical Biol. Res.**, v. 34, p. 719-726, 2001.

WHITFIELD, J. Vital signs. **Nature**, v. 411, n. 28, p. 989-990, 2001.

ZUCKER, E. Hazard evaluation division. **Standard evaluation procedure. Acute toxicity test for freshwater fish**. USEPA publication 540/9-85-006, Washington, 17p. 1985. Disponível em:<www.epa.gov>. Acesso em: 18 de junho de 2014.