



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Centro de Aqüicultura – CAUNESP



TOXICIDADE AGUDA E RISCO AMBIENTAL DO DIFLUBENZURON PARA
Daphnia magna, *Poecilia reticulata* E *Lemna minor* NA AUSÊNCIA E
PRESENÇA DE SEDIMENTO

Bióloga: Jaqueline Pérola de Souza

Orientador: Joaquim Gonçalves Machado Neto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Aqüicultura, como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal – São Paulo
2008

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Inseticida diflubenzuron (DFB).....	5
2.2. Os ectoparasitas e a piscicultura	7
2.3. Testes ecotoxicológicos.....	9
2.4. Organismos-teste	12
2.4.1. <i>Daphnia magna</i>	12
2.4.2. <i>Poecilia reticulata</i>	14
2.4.3. <i>Lemna minor</i>	16
2.5. Influência do sedimento	19
2.6. Classificação quanto à toxicidade aguda e ao risco ambiental.....	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Local de realização dos bioensaios	25
3.2. Testes ecotoxicológicos.....	25
3.3. Produto químico.....	25
3.4. Cultivo dos organismos-teste.....	26
3.4.1. <i>Daphnia magna</i>	26
3.4.2. <i>Poecilia reticulata</i>	29
3.4.3. <i>Lemna minor</i>	30
3.5. Teste de toxicidade aguda para <i>Daphnia magna</i>	32
3.6. Teste de toxicidade aguda para <i>Poecilia reticulata</i>	33
3.7. Teste de toxicidade aguda para <i>Lemna minor</i>	35
3.8. Testes na presença do sedimento	36
3.9. Controle de sensibilidade dos organismos-teste	38
3.9.1. <i>Daphnia magna</i>	38

3.9.2. <i>Poecilia reticulata</i>	39
3.9.3. <i>Lemna minor</i>	40
3.10. Classificação do DFB quanto à toxicidade aguda e ao risco ambiental...	41
3.11. Análise estatística	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. Concentração efetiva média (CE _{50-48h}) para <i>Daphnia magna</i> na ausência e presença do sedimento	43
4.2. Concentração letal média (CL _{50-96h}) para <i>Poecilia reticulata</i> na ausência e presença de sedimento	46
4.3. Concentração efetiva média (CE _{50-7dias}) para <i>Lemna minor</i> na ausência e presença de sedimento	49
4.4. Taxa de crescimento relativo para <i>Lemna minor</i> na ausência e presença de sedimento	50
4.5. Desenvolvimento da macrófita <i>Lemna minor</i>	53
4.6. Classificação quanto à toxicidade aguda e ao risco ambiental	54
4.7. Influência do sedimento na biodisponibilidade	58
5 CONCLUSÃO	60
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Exemplar do microcrustáceo <i>Daphnia magna</i>	13
Figura 2. Exemplar do peixe <i>Poecilia reticulata</i>	15
Figura 3. Representante da macrófita aquática <i>Lemna minor</i>	17
Figura 4. Procedimento de classificação quanto à toxicidade aguda e risco ambiental dos contaminantes ambientais.....	24
Figura 5. Aclimação dos peixes a 25° C para realização dos ensaios ecotoxicológicos.....	30
Figura 6. (A) Cultivo de <i>Lemna minor</i> mantido em reservatório do laboratório; (B) Sala climatizada a 24° C do laboratório; (C) Cultivo em Meio de Hoagland.....	31
Figura 7. (A) Teste de toxicidade aguda com diflubenzuron para <i>Daphnia magna</i> . (B) Receipientes-teste. (C) Testes mantidos no escuro.....	33
Figura 8. Teste de toxicidade aguda com diflubenzuron para <i>Poecilia reticulata</i> . (A e C) Aclimação dos peixes aos aquários-teste na ausência e presença de sedimento; (B e D) Teste com diflubenzuron na ausência e presença de sedimento.....	34
Figura 9. A e B Teste de toxicidade aguda com diflubenzuron para <i>Lemna minor</i> na ausência e presença de sedimento.....	35
Figura 10. Teste de toxicidade aguda com diflubenzuron na presença de sedimento, (A) teste com o peixe <i>P. reticulata</i> e (B) teste com a macrófita <i>L. minor</i>	37

Figura 11. Carta-control de do organismo <i>D. magna</i> para a substância referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). Médias das CE_{50-24h} e limites superior e inferior.....	39
Figura 12. Carta-control de do organismo <i>P. reticulata</i> para a substância referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). Médias das CL_{50-96h} e limites superior e inferior.....	40
Figura 13. Carta controle da macrófita <i>L. minor</i> para a substância referência cloreto de sódio (NaCl). Médias das $CE_{50-7dias}$ e limites superior e inferior.....	41
Figura 14. Representação gráfica da relação entre a concentração do inseticida diflubenzuron e a porcentagem de imobilidade do microcrustáceo <i>Daphnia magna</i> após as 48 horas de exposição aguda na ausência e na presença de sedimento.....	44
Figura 15. Representação gráfica da relação entre a concentração do inseticida diflubenzuron e a porcentagem de mortalidade do peixe <i>Poecilia reticulata</i> após as 96 horas de exposição aguda na ausência e na presença de sedimento.....	46
Figura 16. Representação gráfica da relação entre a concentração do inseticida diflubenzuron e a porcentagem de inibição de crescimento da macrófita <i>Lemna minor</i> após 7 dias de exposição aguda na ausência e na presença de sedimento.....	49
Figura 17. Representação gráfica da taxa de crescimento de <i>Lemna minor</i> em função da concentração de diflubenzuron usada na ausência e presença de sedimento aos três dias de exposição.....	50
Figura 18. Representação gráfica da taxa de crescimento de <i>Lemna minor</i> em função da concentração de diflubenzuron usada na ausência e presença de sedimento aos cinco dias de exposição.....	51

Figura 19. Representação gráfica da taxa de crescimento de *Lemna minor* em função da concentração de diflubenzuron usada na ausência e presença de sedimento aos sete dias de exposição.....51

Figura 20. Alterações observadas durante o desenvolvimento da macrófita *L.minor* em função da exposição ao diflubenzuron após sete dias. (A) Grupo controle; (B e C) Concentrações intermediárias (700 e 1400 mg.L⁻¹); (D) Maior concentração (1900 mg.L⁻¹).....54

ÍNDICE DE TABELAS**Página**

Tabela 1. Composição do meio Básico/M4.....	27
Tabela 2. Composição do meio CHOU.....	28
Tabela 3. Composição do meio de Hoagland.....	31
Tabela 4. Análises químicas e granulométricas do solo usado como sedimento nos testes de toxicidade aguda.....	37
Tabela 5. Média $\pm$ Desvio padrão das variáveis de qualidade da água durante os testes de toxicidade aguda na presença e ausência de sedimento.....	47
Tabela 6. Médias dos valores de CE_{50} ou CL_{50} ($mg.L^{-1}$) do diflubenzuron calculados para as três espécies de organismos aquáticos.....	55
Tabela 7. Valores obtidos na análise de variância para as três espécies em função da presença de sedimento.....	55
Tabela 8. Classificação do DFB pela toxicidade aguda aos organismos aquáticos e pelo risco ambiental.....	56

**Toxicidade Aguda e Risco Ambiental do Diflubenzuron para *Daphnia magna*,
Poecilia reticulata e *Lemna minor* na ausência e presença de sedimento**

RESUMO

O inseticida diflubenzuron (DFB), comercializado como Dimilin®, é empregado em pisciculturas no tratamento de ectoparasitoses em peixes. Este composto inibe a síntese de quitina, componente do exoesqueleto dos parasitas. A utilização deste inseticida se deve à sua baixa toxicidade aos peixes e eficácia no controle dos ectoparasitas. Porém, no ambiente aquático o DFB pode ser tóxico à espécies sensíveis e não-alvos, a concentração empregada no tratamento das ectoparasitoses é de 2 mg.L⁻¹. Os objetivos deste estudo foram avaliar a toxicidade do DFB para as espécies de *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* e *Lemna minor*, classificar o produto quanto à sua toxicidade e risco ambiental e avaliar o efeito do sedimento na biodisponibilidade do DFB na água. Os organismos-teste foram submetidos a concentrações crescentes do inseticida em salas climatizadas do Laboratório de Ecotoxicologia da FCAV-UNESP. Os testes com *D. magna* foram realizados em volume de 10 mL a 20° C e cinco organismos neonatos por concentração, durante 48 horas na presença e ausência de sedimento. Os peixes (*P. reticulata*) foram expostos às concentrações do DFB por 96 horas em testes na presença e ausência de sedimento. O volume final foi de 3000 mL e cinco animais por concentração à 25° C. As plantas de *L. minor* foram expostas ao DFB por sete dias na presença e ausência de sedimento. O volume final foi de 100 mL e 12 frondes por concentração à 24° C. Os testes foram realizados com três réplicas incluindo o controle. As CE_{50-48h} calculadas para *D. magna* foram de 0,56 µg.L⁻¹ e 1,51 µg.L⁻¹ na ausência e presença de sedimento respectivamente; as CL_{50-96h} para *P. reticulata* foram 152,00 mg.L⁻¹ e 277,83 mg.L⁻¹ na ausência e presença de sedimento respectivamente; e as CE_{50-7dias} para *L. minor* foram 459,50 mg.L⁻¹ e 698,25 mg.L⁻¹ na ausência e presença de sedimento respectivamente. O DFB classifica-se como extremamente tóxico para *D. magna* e não-tóxico para *P. reticulata* e *L. minor*. A avaliação do risco ambiental classifica o DFB com risco de alto efeito adverso para *D. magna* e risco com nenhum efeito adverso para *P. reticulata* e *L. minor*. A presença do sedimento diminui significativamente a biodisponibilidade do DFB na água. A utilização do DFB em pisciculturas deve ser realizada de forma restrita, pois é extremamente tóxico para *D. magna*, um organismo de importância significativa para cadeia alimentar aquática.

Palavras-chave: microcrustáceo, peixe, macrófita, inseticida, ecotoxicidade, risco ambiental.

Acute Toxicity and Environmental Risk of Diflubenzuron to *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* and *Lemna minor* in the Absence and Presence of Sediment

ABSTRACT

The insecticide diflubenzuron (DFB), marketed as Dimilin[®], is used in fish farms to treat ectoparasites in fishes. This compound inhibits the chitin synthesis, exoskeleton component of the parasites. The use of this insecticide is due to its low toxicity for fish and effectiveness in the control of ectoparasites. However, the DFB in the aquatic environment can be toxic to sensitive species and non-targeted, the concentration used in the treatment of ectoparasites is 2 mg.L⁻¹. The aims of this study were to evaluate the toxicity of the DFB for the species of *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* and *Lemna minor*, classify the product as to their toxicity and environmental risk and evaluate the effect of sediment on the bioavailability of the DFB in the water. The organisms tested were submitted to increasing concentrations of insecticide in air conditioned rooms of the Laboratory of Ecotoxicology FCAV-UNESP. Tests with *D. magna* were performed in volume of 10 mL at 20° C and five organisms neonates (6 and 24 hours of age) in each concentration, for 48 hours in the presence and absence of sediment. Fishes (*P. reticulata*) were exposed to concentrations of the DFB for 96 hours in tests in the presence and absence of sediment. The final volume was 3000 mL and five animals per concentration to 25° C. The plants of *L. minor* were exposed to the DFB for seven days in the presence and absence of sediment. The final volume was 100 mL and 12 fronds by concentration to 24° C. The tests were performed with three repetitions including the control. The EC_{50-48h} estimated for *D. magna* were 0.56 and 1.51 µg.L⁻¹ in the absence and presence of sediment respectively; the LC_{50-96h} for *P. reticulata* were 152.00 mg.L⁻¹ and 277.83 mg.L⁻¹ in the absence and presence of sediment respectively; and the EC_{50-7dias} to *L. minor* were 459.50 mg.L⁻¹ and 698.25 mg.L⁻¹ in the absence and presence of sediment respectively. This results classifies the DFB as extremely toxic to *D. magna* and non-toxic to *P. reticulata* and *L. minor*. The environmental risk assessment classifies the DFB with high risk of adverse effect to *D. magna* and with no adverse effect to *P. reticulata* and *L. minor*. The presence of sediment significantly decreases the bioavailability of the DFB in the water. The use of the DFB in fish farms should be held in restrictive way, because it is extremely toxic to *D. magna*, an organism of significant importance to the aquatic food chain.

Keywords: micro crustaceous, fish, macrophyte, insecticide, ecotoxicity, environmental risk.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a expansão da aquicultura no Brasil atingiram proporções consideráveis e ao mesmo tempo preocupantes. A utilização de práticas de manejo inadequadas, o desenvolvimento de novas tecnologias de criação, altas densidades populacionais e a diminuição da qualidade da água, tornam-se cada vez mais freqüentes. Esses fatores, isolados ou associados, podem resultar em enfermidades aos organismos cultivados, causando prejuízos econômicos significativos à atividade (Mabilia e Souza, 2006).

Diante dos possíveis casos de enfermidades, são comuns o uso de algumas formas de tratamento que utilizam medicamentos de uso agrícola ou veterinário. Sabe-se que no Brasil não existe uma legislação regulamentadora para registro destes produtos na aquicultura. Diante da ameaça à produtividade empregam-se muitas vezes quimioterápicos não registrados e sem especificações técnicas do fabricante para uso nos setores aquícolas (Campos, 2005).

As parasitoses são de importância significativa à piscicultura. Os parasitas dos gêneros *Ergasilus sp*, *Lernaea sp*, *Lepeophtheirus sp* e *Argulus sp*, afetam a reprodução dos peixes infectados, provocam deficiências na conversão de alimentos, são vetores de bactérias e vírus e ainda provocam infecções secundárias por fungos, que podem levar a morte dos organismos parasitados. Normalmente, o controle desses organismos danosos aos animais de cultivo é feito por meio da utilização de quimioterápicos em banhos terapêuticos, rações medicadas e aplicação de vacinas (Davies et al., 2001; Scholz, 1999).

O grande problema da utilização desses produtos químicos tóxicos está relacionado aos possíveis impactos negativos que podem provocar quando atingem, nos ambientes aquáticos, espécies sensíveis e não-alvos. O ecossistema aquático é constantemente perturbado por poluentes tóxicos das mais variadas

fontes. Os lixiviados de áreas agrícolas, os crescentes despejos de esgotos domésticos e industriais e a liberação dos efluentes das pisciculturas, contribuem significativamente para modificações ambientais; reduzem a diversidade de espécies autóctones e aumentam desordenadamente a densidade de determinadas espécies indesejáveis (Zagatto e Bertoletti, 2006).

O inseticida diflubenzuron (DFB), comercializado com o nome de Dimilin[®], é usado na agricultura para o controle de insetos em culturas de milho, tomate, algodão, trigo e citros (USEPA, 1997, Tomlin, 1997), mas vem sendo utilizado ilegalmente nas pisciculturas brasileiras, pois apresenta resultados satisfatórios no controle de ectoparasitoses e tem baixa toxicidade para peixes (Fujimoto et al., 1999). Este produto age como inibidor do crescimento dos insetos e parasitas, impede a ecdise ou muda e causa a morte dos organismos expostos. (Burka et al., 1997).

O DFB é frequentemente usado em piscicultura com eficácia nas concentrações que variam entre 0,5 a 2 mg.L⁻¹ (Schalch, et al., 2005; Fujimoto et al., 1999; Kubitza e Kubitza, 1999). Porém, alguns trabalhos ressaltam que essas doses podem ser letais para populações zooplanctônicas, principalmente aquelas que apresentam exoesqueleto quitinoso, como as de invertebrados de água doce, crustáceos marinhos e estuarinos. Alguns autores recomendam o não uso do DFB em aquicultura devido ao risco que pode oferecer a esses organismos (Scholz, 1999). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1997) classificou o DFB como um produto de uso restrito devido a falta de informações sobre os efeitos que pode causar sobre invertebrados aquáticos.

Diante do exposto, são necessários estudos que considerem os riscos que este produto é capaz de oferecer aos organismos zooplanctônicos e também a outros organismos representativos da cadeia alimentar aquática. Nestes estudos, os testes toxicológicos são fundamentais, pois relacionam os efeitos tóxicos das substâncias químicas e dos agentes físicos sobre os organismos vivos, especialmente nas populações e nas comunidades de um ecossistema definido, incluindo os caminhos da transferência desses agentes e sua interação com o ambiente (Truhaut, 1977).

Os resultados dos testes de toxicidade aguda são usados para classificar os produtos químicos quanto à sua toxicidade aguda e risco ambiental; auxiliar no gerenciamento de substâncias tóxicas, pois possibilitam a seleção dos organismos

danosos aos animais de cultivo; propor estratégias de controle capazes de minimizar os impactos ambientais e manter a integridade física, química e biológica dos ecossistemas aquáticos (Herricks, 2002).

Um importante fator a ser considerado na avaliação toxicológica dos compostos tóxicos nos ambientes aquáticos é a presença do sedimento. O sedimento é resultado de processos físicos, químicos e biológicos que influenciam o metabolismo de todo o sistema. Portanto, indispensável na avaliação do nível de contaminação dos ecossistemas aquáticos, dada sua capacidade em acumular compostos orgânicos e inorgânicos, principalmente por processos de decantação. Uma vez no ambiente aquático, os contaminantes podem associar-se a partículas dos sedimentos tornando-se menos disponíveis para os organismos que fazem parte desses ambientes. Os toxicantes podem ainda sofrerem transformações em formas com menor ou maior grau de toxicidade. Níveis elevados de contaminantes presentes no sedimento podem ou não acarretar efeitos para a biota aquática; depende de uma série de fatores que afetam a biodisponibilidade e a toxicidade (Zagatto e Bertoletti, 2006).

O emprego dos testes toxicológicos, dos procedimentos de avaliação de risco juntamente com os conhecimentos a respeito da função dos sedimentos nos ecossistemas aquáticos são informações fundamentais para a determinação do potencial de toxicidade de agentes químicos à diferentes organismos aquáticos. Possibilitam o estabelecimento de limites permissíveis de várias substâncias químicas para se proteger a vida aquática e a realização da avaliação do impacto momentâneo sobre a biota dos corpos hídricos. Com estas informações é possível alertar para a necessidade da utilização de medidas preventivas, a fim de evitar a ocorrência de danos irreversíveis, que colocam em risco a saúde ambiental e, conseqüentemente, a saúde humana (Azevedo e Chasin, 2003).

Os organismos recomendados para os testes toxicológicos e para os processos de classificação de risco ambiental devem ser de importância significativa na cadeia trófica aquática. Para este estudo escolheu-se trabalhar com o microcrustáceo *Daphnia magna*, com o peixe *Poecilia reticulata* e com a macrófita *Lemna minor*. Esses organismos fazem parte da cadeia alimentar e são indicados em normas de estudos toxicológicos por órgãos competentes para se realizar os testes de toxicidade. Estes organismos são capazes de se adaptarem facilmente às condições de laboratório, não exigem cuidados muito especiais durante o manejo,

possuem ciclo de vida relativamente curto e, principalmente, possuem elevada sensibilidade a uma grande variedade de contaminantes que frequentemente atingem os ambientes aquáticos (Villarroel et al., 2003).

Diante disso, os objetivos do presente estudo foram:

- Determinar a toxicidade aguda do inseticida diflubenzuron (DFB) para o microcrustáceo *Daphnia magna*, para o peixe *Poecilia reticulata* e para a macrófita *Lemna minor*;
- Classificar o DFB quanto à sua toxicidade aguda;
- Classificar o DFB quanto ao risco ambiental em ecossistema aquático;
- Avaliar o efeito inicial da presença do sedimento na biodisponibilidade do DFB na água.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Inseticida diflubenzuron (DFB)

No passado, organismos indesejáveis à agricultura eram combatidos por meio da aplicação de pequeno número de produtos inorgânicos, geralmente à base de cobre e arsênico, além de alguns inseticidas de ocorrência natural como as piretrinas (Rand e Petrocelli, 1985). Antes da II Guerra Mundial o desenvolvimento e uso efetivo de compostos orgânicos foram lentos. No entanto, a partir da descoberta da propriedade inseticida do dicloro-difenil-tricloroetano, o DDT, começou-se a expansão e desenvolvimento de uso que se caracterizou nos últimos 40 anos (Kotaka e Zambrone, 2001). E em função do modelo de agricultura adotado que se baseia no uso de agrotóxicos estas substâncias passaram, então, a ser amplamente utilizadas, abrangendo outras áreas como o controle de vetores em saúde pública e mesmo o combate a parasitoses em aquicultura.

O composto 1 – (4 – clorofenil) – 3 – (2,6 – difluorobenzoil) uréia, diflubenzuron (DFB), comercializado na formulação denominada Dimilin[®], é um inseticida amplamente utilizado na agricultura, sendo indicado para o controle de insetos nos cultivos de milho, tomate, algodão, trigo e citros (USEPA, 1997, Tomlin, 1997). Uma outra aplicação para este produto ocorre nas pisciculturas brasileiras, onde é responsável pelo tratamento de ectoparasitas de peixes (Kubitza e Kubitza, 1999).

A ação deste inseticida se dá por meio da inibição do crescimento dos insetos e parasitas, impedindo a síntese da quitina, componente da carapaça dos artrópodes, levando os organismos expostos à morte, pois não conseguem realizar

a ecdise ou muda. Os inseticidas reguladores de crescimento surgiram na década de 50 causam modificações fisiológicas e morfológicas durante o desenvolvimento do inseto. Estes compostos têm ação mais específica e menor toxicidade para mamíferos, aves e peixes do que para os insetos, pois atuam seletivamente ao interromper o desenvolvimento e crescimento ao invés da intoxicação direta (Martins e Silva, 2004).

A utilização do DFB nos Estados Unidos e em países da Europa é restrita, pois sabe-se que possui elevada toxicidade para organismos invertebrados aquáticos (USEPA, 1997; WHO, 1995). No Brasil, o Ministério da Agricultura e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ainda não estabeleceram nenhum tipo de restrição quanto ao uso deste produto na área agrícola. Quanto ao seu uso em pisciculturas, tem-se um problema, já que ainda não existe uma legislação que regule o seu uso.

O DFB é um composto pouco persistente em ambientes de água doce, devido à sua hidrólise e ao seu elevado grau de adsorção à matéria orgânica, responsável também por grande parte da sua degradação nesses ambientes. Estudos realizados em condições de laboratório e de campo foram constatados que a meia vida do DFB em água doce varia entre 2,1 e 7,9 dias, sob condições de pH de 10 e 7,7, respectivamente, e temperaturas variando entre 10 e 38° C (Schaefer e Drupas, 1976).

No sedimento, a persistência do DFB depende de fatores como tamanho da partícula, temperatura, pH e composição do solo. A meia vida do diflubenzuron foi inferior a duas semanas em solos com partículas de tamanho aproximado de 2 µm (Nimmo et al., 1984). Em outros estudos foram constatados que o limite detectável de DFB em sedimento ocorre entre 3 e 5 dias (Kingsbury et al., 1987).

A toxicidade do DFB foi avaliada para várias espécies de água doce e verificou-se amplo espectro de sensibilidade dos organismos, que depende da composição corporal (exoesqueleto de quitina) e do nível trófico. Os invertebrados aquáticos foram 25.000 vezes mais suscetíveis ao DFB que peixes, durante uma exposição aguda (Fischer e Hall, 1992).

Vários estudos foram realizados para avaliar a resposta de espécies zooplânctônicas ao tratamento com DFB. Pelos resultados obtidos, verificou-se que populações de cladóceros e copépodos podem ser totalmente eliminadas por

extensos períodos de exposição a concentrações superiores a $7 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Fischer e Hall, 1992).

Os efeitos do DFB sobre espécies de peixe foram avaliados em muitos estudos. Os valores das $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ calculados foram superiores a 50 mg.L^{-1} de DFB (Fischer e Hall, 1992). Apesar da baixa toxicidade, o inseticida pode apresentar efeitos subletais nos peixes. Tanner e Moffet (1995) constataram redução de 97% na taxa de crescimento das larvas *Lepomis macrochirus* expostas a $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ de DFB e de 86% no crescimento das larvas dos peixes, mesmo em concentrações mais baixas do inseticida ($2,5 \mu\text{g.L}^{-1}$). Draredja e Soltani (2001) constaram que o DFB provocou atraso no crescimento do peixe mosquito (*Gambusia affinis*), expostos por 24 horas à concentração de 78 ng.L^{-1} .

Em humanos, alguns trabalhos relatam toxicidade, imunotoxicidade e carcinogenicidade em relação ao metabólito 4-cloroanilina do DFB (Chhabra et al., 1990, 1991). Em pessoas que tiveram contato com este produto durante a manipulação, em curtos períodos de exposição, foi constatada a ocorrência de sulfametahemoglobina e, para períodos prolongados de exposição, a ocorrência de metahemoglobina (USEPA, 1997).

2.2. Os ectoparasitas e a piscicultura

O crescimento e o desenvolvimento da piscicultura no Brasil favoreceram a ocorrência de problemas sanitários relacionados ao manejo inadequado e más condições ambientais. A intensificação dos meios produtivos, o transporte, a diminuição da qualidade da água, entre outros fatores, atuam como agentes estressantes e resultam em depressão dos mecanismos de defesa orgânica e aumento da susceptibilidade dos peixes às doenças (Schalch, et al., 2005).

Os parasitas encontrados nas pisciculturas são principalmente os crustáceos. Estes organismos vivem sobre o tegumento, nadadeiras, boca e brânquias de várias espécies de peixes cultivados e silvestres. Os braquiúros da espécie *Dolops carvalhoi*, por exemplo, possuem aparelho bucal dotado de ganchos para fixação e, para se alimentarem, perfuram a pele do hospedeiro, injetam anti-coagulantes e secreções digestivas e sugam o sangue e as células epiteliais digeridas. Dessa forma, o hábito hematófago de argulídeos provoca anemia, enquanto a histofagia

causa inflamação do tegumento cutâneo e abre soluções de continuidade, que permitem a instalação de infecções secundárias (Thacher e Brites-Neto, 1994).

Outros parasitas dos gêneros *Ergasilus sp*, *Lernaea sp* e *Lepeophtheirus sp* também possuem importância significativa para a piscicultura, pois são capazes de afetar a reprodução dos peixes infectados e provocar deficiências na conversão alimentar. Além disso, estes parasitas podem ser vetores de bactérias e vírus e provocar infecções secundárias, causar mortalidade devido a lesões e possíveis oclusões nos vasos sanguíneos e aorta dos peixes (Kubitza e Kubitza, 1999; Scholz, 1999; Davies et al., 2001).

Normalmente os tratamentos utilizados para combaterem as parasitoses incluem banhos terapêuticos, rações medicadas e a aplicação de vacinas (Burka et al., 1997; Scholz, 1999; Costello et al., 2001).

Produtos químicos como formaldeído, inseticidas organofosforados, piretróides e alguns compostos naturais são utilizados de forma ilegal no controle desses parasitas (Scholz, 1999). Porém, consta-se na prática que alguns desses produtos possuem pouca eficiência ou são ineficientes para controlar as infestações. O DFB adicionado às rações de peixes, ou por meio de banhos terapêuticos, tem sido usado em quantidades significativas e alcançado efeitos desejáveis no combate às parasitoses por copépodos e braquiurídeos (Burka et al., 1997; Scholz, 1999).

Em condições de laboratório, Onaka (2005) avaliou a eficácia da atividade anti-parasitária do DFB na ração de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), piaçu (*Leporinus macrocephalus*), matrinxã (*Brycon cephalus*) e pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) infestados por *Dolops carvalhoi*. Neste estudo foi constatado que a administração de 30 mg DFB.kg⁻¹ peso vivo/ dia durante três dias consecutivos (com repetições aos 7, 14 e 21 dias) foi suficiente para conseguir atingir todos os estágios de vida do parasita e combater a infestação.

Outros estudos utilizando 3 mg.kg⁻¹ de peso vivo de peixe do DFB na ração de robalo (*Dicentrarchus lobrax*), comprovou controlar o parasita *Ceratomyxa oestroides*. Observou-se ainda que o inseticida controlou os parasitas nos estágios pré-adultos e adultos, sendo 100% eficaz após 14 dias de tratamento (Bouboulis et al., 2004).

A eficácia do DFB foi avaliada também por meio de banhos terapêuticos para o controle de *Dolops carvalhoi* em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) naturalmente infestados. O DFB foi aplicado três vezes na concentração de 2,0 mg.L⁻¹ na água,

na forma de banhos com trinta minutos de duração e intervalo de 24 horas. Na avaliação parasitológica foi constatada a eficácia do DFB de 97,2%. Nos peixes do grupo tratado houve redução da glicemia, aumento da quantidade de eritrócitos, redução do percentual de células granulocíticas especiais e aumento da quantidade de trombócitos circulantes e a eliminação dos parasitas, quando comparado ao grupo controle (Schalch, 2005).

Fujimoto et al. (1999) também observaram a eficácia de 100% do DFB no controle de crustáceos ectoparasitas de piauçus (*Leporinus macrocephalus*) submetidos a banhos terapêuticos de 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹ do inseticida.

2.3. Testes ecotoxicológicos

A Toxicologia tem como objeto fundamental estudar a intoxicação sob todos os aspectos. Por intoxicação entende-se a manifestação (clínica e/ou laboratorial) de efeitos adversos que revelam um estado patológico causado pela interação de um toxicante, isto é, de um agente químico com um organismo. Os agentes tóxicos são, portanto, substâncias químicas capazes de quebrar o equilíbrio orgânico, ou seja, substâncias que provocam alterações na homeostase do organismo (Larini, 1993).

Desse modo, a toxicidade é uma propriedade potencial que as substâncias químicas possuem, em maior ou menor grau, de instalar um estado patológico em consequência de sua introdução e interação com o organismo. Esta maior ou menor gravidade de ação dependerá de fatores relacionados com a substância química, com o organismo e com o ambiente onde a ação ocorre (Larini, 1993).

A preocupação com os ambientes aquáticos começou na década de 1930, nos Estados Unidos e em países Soviéticos, quando foram implementados os primeiros testes de toxicidade aguda com organismos aquáticos, com o objetivo de estabelecer a relação causa/efeito de substâncias químicas e despejos líquidos sob a qualidade da água. A partir da década de 1940 foi recomendado o uso de peixes para avaliar a toxicidade desses despejos líquidos. Porém, um pouco mais tarde, em estudos foi observado que havia espécies de peixes resistentes a certos produtos químicos. Assim, surgiu a necessidade da utilização de espécies mais sensíveis, de importância econômica e representativa do ecossistema aquático (Rand, 1995).

Os estudos continuaram evoluindo e nas décadas de 1950 e 1960 deu-se maior importância a critérios e padrões que permitiram as disposições desses agentes em níveis compatíveis à preservação dos recursos hídricos. Na década de 70 houve grande desenvolvimento de sistemas adequados para a condução dos testes de toxicidade, aguda e crônica, utilizando ovos e larvas de peixes na avaliação da toxicidade de substâncias químicas (Rand, 1995).

No Brasil, a partir de 1976, os estudos de toxicologia aquática começaram a serem desenvolvidos. Porém, o modelo utilizado na avaliação da toxicidade foi baseado nos critérios norte-americanos e soviéticos, os quais avaliavam apenas o caráter potável da água e não a qualidade da vida na água. Com o avanço dos estudos, os conhecimentos tornaram-se mais eficientes e esse importante aspecto de manutenção da vida aquática começou a ser percebido e utilizado como critério de avaliação da toxicidade das substâncias químicas, estabelecendo-se padrões seguros para o ambiente e para a qualidade da água (Zagatto e Bertoletti, 2006).

Na década de 1980 foram desenvolvidos ensaios de toxicidade de curta duração com as fases mais sensíveis de alguns organismos, a fim de aumentar a eficiência e minimizar os custos. Métodos utilizando microcrustáceos e peixes de águas continentais e marinhas foram normalizados e estão sendo usados mundialmente e fazem parte das exigências legais dos órgãos ambientais em vários países (Macek, 1980).

Diante dessa preocupação com a influência dos poluentes químicos sobre os organismos vivos e o ambiente no qual estão inseridos, surge um novo ramo da toxicologia, a ecotoxicologia; para estudar *“os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado”* (Plaa, 1982).

Os estudos ecotoxicológicos compreendem três seqüências principais: 1) estudo das emissões e entradas de poluentes no ambiente abiótico, distribuição e destino nos diferentes compartimentos; 2) estudo da entrada e destino dos poluentes nas cadeias biológicas e suas formas de transferência como alimento via cadeia trófica; e 3) estudo qualitativo e quantitativo dos efeitos tóxicos dos poluentes ao ecossistema com conseqüências para homem (Thuhaut, 1977).

Os resultados dos estudos ecotoxicológicos fornecem dados de uma substância ou composto químico que permitem classificá-lo toxicologicamente e, ao mesmo tempo, possibilita estabelecer a forma correta de uso, bem como as medidas preventivas e curativas quanto ao uso inadequado (Larini, 1993).

A toxicidade de agentes químicos no meio hídrico é avaliada por meio de ensaios ecotoxicológicos com organismos representativos da coluna d'água ou dos sedimentos de ambientes de água doce, estuarina ou marinha (Zagatto e Bertoletti, 2006). Esses ensaios podem ter diversas finalidades: 1) calcular a toxicidade de agentes químicos, efluentes líquidos, lixiviados de resíduos sólidos etc; 2) instituir critérios e padrões de qualidade das águas; 3) estabelecer limites máximos de lançamento de efluentes líquidos em corpos hídricos; 4) analisar a necessidade de tratamento de efluentes líquidos quanto às exigências de controle ambiental; 5) avaliar a qualidade das águas; 6) comparar a toxicidade relativa de diferentes substâncias; 7) avaliar a sensibilidade relativa de organismos aquáticos; 8) auxiliar programas de monitoramento ambiental, 9) estimar os impactos provocados em acidentes ambientais (Rand e Petrocelli, 1985).

Os critérios de avaliação final da toxicidade aguda nos ensaios ecotoxicológicos são a mortalidade e a imobilidade dos organismos-teste. Normalmente, observam-se mortalidade para peixes e imobilidade para invertebrados. Esses critérios são utilizados porque são facilmente determinados e têm significado biológico e ecológico para o ambiente (Zagatto e Bertoletti, 2006).

Os resultados dos ensaios de ecotoxicidade podem ser afetados por fatores bióticos e abióticos. Os fatores bióticos estão relacionados ao estágio de vida, tamanho, idade e estado nutricional dos organismos. Organismos jovens são mais sensíveis às substâncias tóxicas que os adultos. Por essa razão, recomenda-se o uso de organismos em estágios iniciais de vida. Além disso, todos os organismos utilizados em um determinado ensaio devem ter aproximadamente a mesma idade e devem ser provenientes de uma mesma cultura. Os fatores abióticos que podem interferir nos resultados são: pH, oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade e dureza da água, que devem ser monitorados durante a execução do teste (Zagatto e Bertoletti, 2006).

Os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda são expressos através das concentrações efetivas medianas (CE₅₀) ou concentrações letais medianas (CL₅₀) que são as concentrações da substância química testada capazes de causar

efeito ou mortalidade a 50% da população em estudo. Valores acima da CE_{50} ou CL_{50} ameaçam a integridade, sobrevivência da espécie e o equilíbrio e dinâmica do ecossistema (Rand e Petrocelli, 1985).

2.4. Organismos-teste

2.4.1. *Daphnia magna*

A *Daphnia*, conhecida também como pulga d'água, é um microcrustáceo facilmente encontrado em lagos, represas e lagoas de águas continentais, com tamanho de 0,5 a 5,0 mm de comprimento. O corpo é protegido por uma carapaça transparente, bivalve, exceto a cabeça e antenas. O olho é composto, bem evidente, sensível à mudança da qualidade e quantidade de luz. As longas antenas funcionam como remos e são responsáveis pelo impulso natatório para frente (Figura 1) (Buikema e Sherberger, 1977).

A *Daphnia* é um organismo filtrador, alimenta-se de algas, bactérias e detritos orgânicos presentes na água. A filtração é essencialmente efetuada pelas patas torácicas, que agem como peneiras para selecionar partículas presentes na água (Buikema e Sherberger, 1977).

A reprodução geralmente é por partenogênese, ou seja, assexuada, onde as fêmeas produzem células diplóides, que originam fêmeas com o mesmo genótipo. Assim, resulta numa população composta inteiramente por fêmeas. A incubação ocorre na câmara existente na parte superior do organismo. Após três a quatro dias, os organismos jovens são liberados para o ambiente, já semelhantes à forma adulta. A *Daphnia* torna-se reprodutiva de cinco a dez dias após seu nascimento (Buikema e Sherberger, 1977).



Figura 1. Exemplar do microcrustáceo *Daphnia magna*. Fonte: www.kuleuven-korrijk.be/facult/wet/biologie/daphnia%20magna.htm

As Daphnias atendem as exigências das normas dos ensaios ecotoxicológicos e estão entre os organismos mais utilizados nos bioensaios, como representantes dos invertebrados aquáticos. A sua utilização se deve ao ciclo de vida relativamente curto com elevada taxa reprodutiva, necessidade de pequenos espaços para sobrevivência, facilidade de adaptação às condições de laboratório, facilidade de manejo, e, principalmente, ampla sensibilidade a grande variedade de produtos químicos, como os agrotóxicos (Arauco et al., 2005; Villarroel et al., 2003).

Os representantes da espécie *Daphnia magna* são organismos abundantes no meio aquático e exercem funções significantes para a cadeia alimentar aquática. As Daphnias são os consumidores primários do fitoplâncton e fonte de alimento para consumidores secundários (predadores). Dada sua importância na cadeia alimentar, supõe-se que os organismos num ambiente natural quando perturbados por algum toxicante, por exemplo, um inseticida, produzirão poucos neonatos. A falta dos neonatos diminui a taxa de forrageamento dos organismos fitoplanctônicos e, como consequência, poder-se-á ter um crescimento incontrolado de algas e aumento do problema de eutrofização nos corpos d'água (Clément e Zaid, 2004).

Além disso, os organismos zooplantônicos constituem um elo entre produtores primários e níveis tróficos superiores, e exercem significativa influência na biomassa e na composição das espécies algais. Esses organismos estão sujeitos a diferentes níveis de estresse durante o ciclo de vida. Caso os agentes

estressores estejam presentes por um período longo de tempo, eles poderão alterar a fisiologia do organismo, decrescer a reprodução e a sobrevivência, e assim influenciar nas taxas de produtividade secundária e na estrutura das populações e da comunidade (Fernández-Casalderrey et al., 1994).

Quanto à sensibilidade da *D. magna* aos contaminantes ambientais, existem muitos trabalhos descritos na literatura. Fernández-Casalderrey et al. (1994), investigaram o efeito dos inseticidas endosulfan e diazinon sobre o comportamento alimentar de *Daphnia magna*. Verificaram que o alimento contaminado com concentrações subletais dos inseticidas foi capaz de provocar diminuição na taxa de filtração dos dafnídeos. Villaroel et al. (1999) demonstraram redução na taxa de filtração da fonte alimentar (microalgas) quando avaliaram o efeito do acaricida tetradifon sobre o comportamento alimentar do cladóceros *Daphnia magna*.

Os trabalhos descritos na literatura classificam a *D. magna* como um dos organismos mais sensíveis aos contaminantes ambientais. Fischer e Hall (1992) demonstram que o inseticida DFB tem elevada toxicidade para esta espécie. Nebeker et al. (1983) descrevem que populações de dafnídeos poderiam ser totalmente eliminadas quando expostas por períodos prolongados ao inseticida DFB.

Visto que dafnídeos ocupam uma posição-chave na cadeia alimentar, possíveis alterações no seu ciclo de vida e na produtividade secundária, causada por agentes tóxicos, devem ser investigadas. A ferramenta normalmente utilizada para esta investigação são os ensaios ecotoxicológicos.

2.4.2. *Poecilia reticulata*

O peixe *Poecilia reticulata*, conhecido popularmente por guarú, guppy ou lebiste, pertence à ordem dos Ciprinodontiformes. Esses peixes foram trazidos ao Brasil para o controle biológico de mosquitos, entre eles o transmissor da malária, pois são excelentes larvófagos. É uma espécie ovovivípara, que apresenta dimorfismo sexual. O macho é menor e possui a nadadeira anal modificada em órgão copulador denominado gonopódio. O hábito alimentar desses peixes segue algumas táticas, tais como cata de itens arrastados pela corrente, poda e cata de presas. Porém, nos riachos a preferência por micro-habitas mais lênticos parece ser uma característica marcante nessa espécie. O guarú é um peixe que habita

pequenos córregos e riachos que, normalmente, estão presentes em áreas agrícolas ou em áreas colonizadas por macrófitas (Figura 2) (Kiss et al., 2003).



Figura 2. Exemplar do peixe *Poecilia reticulata*. Fonte: www.aquahobby.com

Assim como as Daphnias, os guarús são organismos indicados para a realização de testes de ecotoxicidade, pois são cosmopolistas, facilmente adaptáveis às condições de laboratório e apresentam sensibilidade a diversas substâncias tóxicas (IBAMA, 1987).

O uso de organismos bioindicadores parece ser uma estratégia adequada para avaliar os efeitos combinados de substâncias químicas que interagem com os componentes biológicos de forma simultânea (Kiss et al., 2003). A bioindicação é importante, especialmente para alguns produtos que são empregados diretamente no ambiente aquático para o controle de parasitoses e vetores de macrófitas aquáticas (Wang e Freemark, 1995). Os bioensaios constituem-se em ferramenta para estudos ecotoxicológicos e permitem avaliar os potenciais impactos das substâncias xenobióticas nos organismos (Kiss et al., 2003).

Os organismos bioindicadores são utilizados em testes ecotoxicológicos para avaliar potenciais impactos causados por derramamentos acidentais ou pela contínua liberação de efluentes industriais no ambiente aquático e para mensurar os possíveis impactos causados pela utilização de agrotóxicos de forma direta ou indireta (Kiss et al., 2003).

A sensibilidade do peixe *P. reticulata* foi avaliada para diversos pesticidas, e a resposta aos contaminantes varia em função das condições de realização dos ensaios e das características do produto químico testado.

Em um estudo de avaliação da toxicidade do fungicida oxicloreto de cobre para o peixe guarú (*P. reticulata*), com peso corporal médio de 0,9 g, foi calculada a CL_{50-96h} de 0,1 mg.L⁻¹, onde observa-se a grande sensibilidade desta espécie ao fungicida cúprico (Boock e Machado-Neto, 2005).

Boock et al. (2004) realizaram estudos de toxicidade aguda com o inseticida regulador de crescimento metoprene para *Poecilia reticulata* (guarú) e *Brachydanio rerio* (paulistinha). Verificaram que o guarú é mais sensível ao inseticida que o paulistinha.

Selvi et al. (2005) estudaram a toxicidade aguda do inseticida organofosforado metil-clorpirifós para o guppy (*P. reticulata*) e calcularam a CL_{50-96h} de 1,79 mg.L⁻¹. Observaram ainda alterações em parâmetros comportamentais dos peixes, quando comparados aos controles, como perda do equilíbrio, natação errática e alterações na atividade geral.

O inseticida alfa-cipermetrin, utilizado no controle de uma ampla variedade de insetos na área agrícola, contra mosquitos, pulgas e outros vetores em saúde pública, e no controle de parasitoses em aquicultura, é extremamente tóxico para a espécie *P. reticulata* com CL_{50-96h} de 9,43 µg.L⁻¹ (Yilmaz, et al., 2004).

Em testes de toxicidade aguda realizados com o inseticida DFB para o *P. reticulata*, com quatro semanas de idade, foi constatado que concentrações inferiores a 36 µg.L⁻¹ não causam nenhum efeito sobre o peixe estudado, sob condições de pH 7,3 e temperatura de 20° C (Nebeker, et al., 1983).

2.4.3. *Lemna minor*

A macrófita aquática *Lemna minor*, conhecida pelo nome de lentilha d'água, é uma angiosperma, pertencente ao grupo das monocotiledôneas, representante da família das aráceas. Esta planta é comumente encontrada formando densos tapetes flutuantes na superfície de lagos e lagoas eutrofizadas em ecossistemas de água doce e salobra de clima temperado (Freemak e Boutin, 1994). Esta espécie reproduz-se vegetativamente com novas frondes (folhas) brotadas a partir das bordas de folhas mais velhas (Figura 3).

As espécies do gênero *Lemna* são usadas em pesquisas de ecotoxicologia e representam os vegetais aquáticos superiores. Em comparação com os outros organismos aquáticos, a utilização de *Lemna sp.* em ensaios ecotoxicológicos é

ainda pequena, não obstante sua larga distribuição no Brasil. Essas espécies são indicadas por diversas organizações, incluindo a EPA e OECD, como potencial organismo bioindicador, devido a sua importante função ecológica, possuir ampla ocorrência no meio ambiente e está entre os primeiros organismos atingidos por poluentes lançados nos ecossistemas aquáticos. São plantas facilmente cultivadas, possuem taxa de crescimento elevada sob condições de laboratório e alta sensibilidade a diferentes poluentes. As respostas da planta são geralmente avaliadas pelas alterações nas taxas de crescimento (Kiss, et al., 2003).

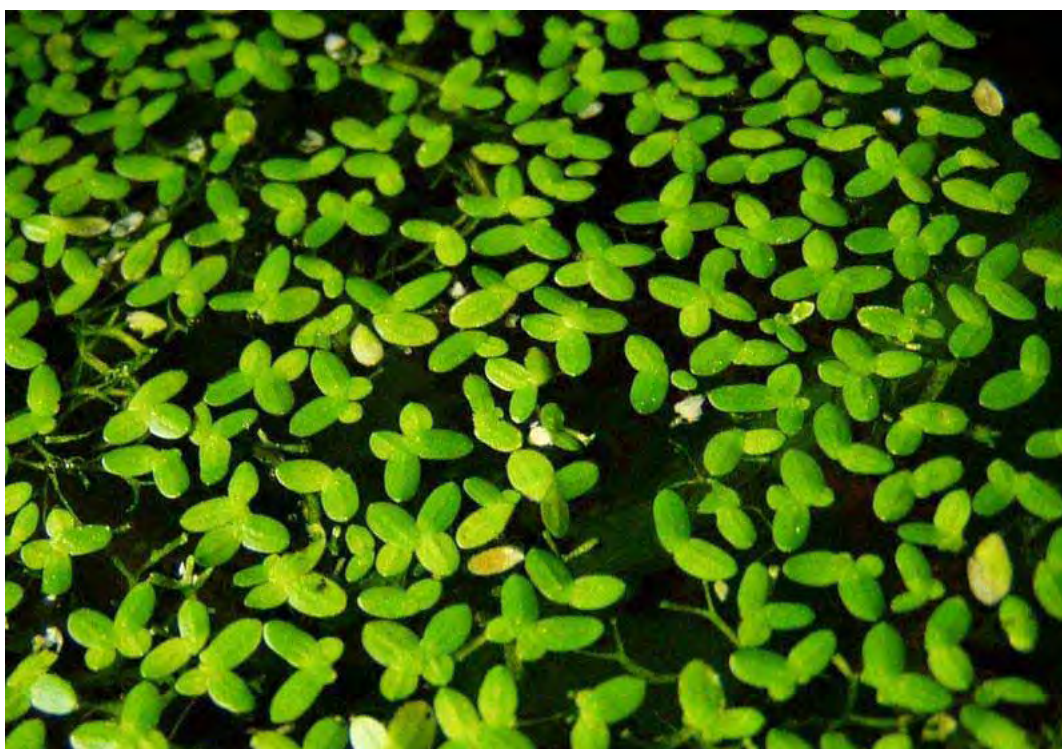


Figura 3. Representante da macrófita aquática *Lemna minor*. Fonte: www.aquapage.cz/Obrázky/Rostliny/Okrehek.jpg

A importância ecológica dessas plantas para o ambiente aquático é que elas fornecem alimento e abrigo para outros organismos, incluindo insetos, invertebrados, peixes, anfíbios, pássaros e mamíferos (Freemark e Boutin, 1994). São essenciais nos processos de ciclagem dos nutrientes e na estabilização do sedimento. As macrófitas fazem parte do primeiro nível trófico da cadeia alimentar aquática e fornecem oxigênio e substâncias orgânicas das quais muitas outras formas de vida são dependentes. Elas protegem as margens dos corpos d'água do processo erosivo das ondas, retiram o excesso de substâncias tóxicas e

eutrofizantes da água, retém o material carregado pela erosão dos ambientes terrestres e promovem heterogeneidade espacial e sazonal, contribuindo para a maior biodiversidade do sistema aquático (Wang e Freemark, 1994).

Devido à sua grande importância para os ambientes aquáticos, a presença de poluentes pode ocasionar efeitos indesejáveis sobre essas plantas, resultando em problemas que diretamente afetam a estrutura e função de um ecossistema, como diminuição do oxigênio dissolvido, diminuição na produtividade primária, aumento na correnteza e degradação dos habitats selvagens (Freemark e Boutin, 1994).

Os testes de fitotoxicidade estão entre as práticas rotineiras na avaliação ambiental de substâncias tóxicas e efluentes complexos. Os componentes dos efluentes que podem ser praticamente não tóxico para peixes, crustáceos e daphnídeos, podem causar danos ou mesmo matar a vegetação aquática quando liberados em corpos d'água receptores (Wang e Freemark, 1995).

De acordo com Giesy e Hoke (1989) os testes de fitotoxicidade também têm sido úteis na determinação da toxicidade de sedimentos. Em diversos trabalhos observam-se relatos de que as macrófitas são sensíveis a muitas substâncias e são utilizadas como organismos-teste na avaliação da toxicidade de poluentes como pesticidas de maneira geral e surfactantes, além de serem empregadas no tratamento de efluentes e na remoção de metais pesados (Miretzky et al., 2004; Frankart et al., 2003; Dalu e Ndamba, 2003; Tong e Hongjun, 1997; Dirilgen e Ince, 1995).

Para se avaliar o potencial tóxico de produtos químicos usados na agricultura e piscicultura para a macrófita *Lemna minor*, o herbicida propanil, comumente usado em lavouras de arroz, foi testado durante 24 dias de exposição. Verificou-se que o crescimento da *Lemna* foi significativamente reduzido e que o herbicida prejudica o estabelecimento das plantas no ambiente aquático (Mitsou et al., 2006).

Em outro trabalho foi avaliada a toxicidade do herbicida metsulfuron-metil para doze espécies de plantas aquáticas. Foi constatado que a *Lemna minor* é uma das espécies mais sensíveis ao metsulfuron-metil (Cedergreen et al., 2004).

Um estudo caracterizou os efeitos subcrônicos do metil-paration (MP), inseticida organofosforado, sobre organismos aquáticos em um ecossistema natural no México. O fator de bioconcentração do inseticida nos tecidos de *Lemna sp.* foi de 6,55 (Concentração do MP nos tecidos/Concentração do MP na água). Maior atividade da enzima Glutathione S-Transferase (GST) ocorreu em espécies

tolerantes, em comparação com as espécies suscetíveis. A GST catalisa a reação de detoxificação de xenobióticos. As plantas não possuem sistema de excreção, em vez disso, conjugados de GST são armazenados nos vacúolos ou transferidos ao apoplasto, na tentativa de armazenagem ou excreção do agente tóxico (Marrs, 1996).

2.5. Influência do sedimento

O sedimento é o resultado de processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem nos ecossistemas aquáticos e exerce influência no metabolismo de todo o sistema. Portanto, é um dos mais importantes compartimentos que devem ser estudados durante a avaliação do nível de contaminação dos ecossistemas aquáticos, dada a sua grande capacidade em acumular compostos orgânicos e inorgânicos, principalmente por processos de decantação (Zagatto e Bertolotti, 2006).

O sedimento é constituído normalmente por um complexo de argila, areia, sais minerais e matéria orgânica. A composição do sedimento pode variar desde totalmente mineral até com predominância orgânica, dependendo de fatores naturais e antrópicos. Os sedimentos são considerados uma das partes mais complexas existentes nos ecossistemas aquáticos. Desde a origem do material particulado em solução, o qual compete com a coluna d'água pela adsorção de inúmeros compostos, até sua sedimentação no leito dos rios, lagos ou reservatórios, as mudanças são inúmeras (Azevedo e Chasin, 2003).

Os materiais de natureza orgânica e inorgânica, dissolvidos e particulados, que penetram no ambiente aquático inevitavelmente se associam, por meio de processos de superfície, como a adsorção, complexação e reprecipitação, aos particulados suspensos preexistentes no ambiente e, conseqüentemente, tendem a se depositar no fundo desses ambientes, passando a fazer parte dos sedimentos. A reatividade dos sólidos particulados suspensos e de fundo será mais elevada quanto mais fina for a partícula, isto é, quanto maior a área superficial (Zagatto e Bertolotti, 2006).

Quando presentes no sedimento, os contaminantes podem se associar às partículas, tornando-se indisponíveis ao ecossistema, onde podem sofrer

transformações, originar formas mais ou menos tóxicas, ou migrar para organismos bentônicos ou coluna d'água. Grandes quantidades de poluentes presentes no sedimento podem ou não ocasionar efeitos sobre os organismos aquáticos; depende de vários fatores que afetam a sua biodisponibilidade e a toxicidade (Azevedo e Chasin, 2003).

Os contaminantes adsorvidos às partículas do sedimento de rios, lagos e mares têm a mobilidade e disponibilidade reduzidas. A natureza da substância, a força da ligação, a temperatura do meio, o pH e o teor de oxigênio determinam a disponibilidade química do contaminante. O teor de oxigênio na água determina a natureza e a velocidade das transformações químicas e bioquímicas e esses teores diferem nos sedimentos (Azevedo e Chasin, 2003).

A variação da toxicidade de compostos orgânicos não iônicos em diferentes sedimentos está relacionada com o conteúdo de carbono orgânico presente nos mesmos. Isso ocorre porque a partição desses compostos entre o sedimento e a água é influenciada pelo conteúdo de matéria orgânica. Portanto, para os compostos orgânicos não iônicos, a característica dominante que afeta o comportamento dos mesmos é o conteúdo de matéria orgânica associada ao sedimento e à água intersticial (Zagatto e Bertoletti, 2006).

Os organismos bentônicos entram em contato com contaminantes presentes no sedimento através da ingestão de partículas e por meio do contato com as paredes do corpo, ou superfícies respiratórias. Além dessas vias de exposição, o organismo pode ficar exposto às inúmeras formas de cada composto, que podem agir de várias maneiras, dependendo da via de acesso (Azevedo e Chasin, 2003).

A resposta dos organismos aos contaminantes pode ser afetada pelo estágio de vida, saúde dos mesmos e pela forma como o composto é metabolizado. Além disso, o hábito alimentar, incluindo o tipo de alimento e a taxa de alimentação, pode controlar a quantidade de contaminante à qual o organismo está exposto. É importante lembrar que invertebrados bentônicos selecionam como alimento partículas com elevadas concentrações de matéria orgânica, que podem conter elevadas concentrações de contaminantes (Zagatto e Bertoletti, 2006).

Quanto aos trabalhos descritos na literatura a respeito da influência dos sedimentos na toxicidade de pesticidas de maneira geral, Jonsson e Maia (1999) calcularam valores da CE_{50-48h} do herbicida clamazone para *Daphnia similis* de 1,51 $mg.L^{-1}$ em sistema sem sedimento e 11,28 $mg.L^{-1}$ em sistema com sedimento. Estes

autores verificaram que a presença do sedimento promoveu a imobilização de 86,6% do herbicida na água.

Arauco et al. (2005) realizaram estudos ecotoxicológicos com três espécies de daphnias (*D. magna*, *D. similis* e *D. Laevis*) para avaliar o potencial tóxico do inseticida organofosforado triclorfon (usado em agricultura e piscicultura) e do sulfato de cobre na presença ou ausência de sedimento. Esses autores verificaram que a presença de sedimento diminuiu a biodisponibilidade de ambos os produtos utilizados para as três espécies de daphnias.

2.6. Classificação quanto à toxicidade aguda e ao risco ambiental

O ambiente aquático é frequentemente alvo de diversos tipos de poluentes. Os lixiviados resultantes das aplicações agrícolas de agrotóxicos, os despejos de esgotos domésticos e industriais e mesmo os efluentes liberados em pisciculturas, são fontes ameaçadoras ao equilíbrio nesses ambientes. Diante da constante ameaça à sobrevivência da biota aquática, processos de avaliação de risco são aplicados em países desenvolvidos com o intuito de controlar ou minimizar os impactos ambientais negativos e favorecer a integridade física, química e biológica dos ecossistemas aquáticos (Herricks, 2002).

Os procedimentos de avaliação de risco ambiental são caracterizados pela análise da probabilidade da ocorrência de efeitos ecológicos adversos resultantes da exposição da biota a um ou mais estressores ambientais. Um estressor ambiental é usualmente um contaminante químico. Os efeitos ecológicos adversos são definidos como todas as mudanças consideradas indesejáveis que alteram a estrutura ou as características funcionais da população, da comunidade, do ecossistema ou de seus componentes (USEPA, 1998).

É importante enfatizar que durante a avaliação do risco ambiental considera-se que os organismos de um sistema natural são componentes de uma cadeia trófica. Assim, é indispensável ponderar as inter-relações existentes nos diferentes níveis tróficos integrantes da pirâmide energética. A avaliação do risco tem por objetivo proteger as funções das populações, comunidades e ecossistemas (Azevedo e Chasin, 2003).

Nos países desenvolvidos, nos últimos dez anos, grande ênfase tem sido dada por governos e agências não governamentais para melhoria dos processos de

caracterização do risco ecológico (Solomon, 1996). No Brasil, a avaliação do risco ainda não é utilizada como ferramenta de gerenciamento ambiental. Entretanto, o Brasil possui uma grande diversidade de ecossistemas, e estes necessitam de estudos que dêem suporte ao entendimento da dinâmica e da estrutura dos sistemas biológicos, informação fundamental para avaliação de risco ecológico (Zagatto e Bertoletti, 2006).

No Brasil, quando um produto químico novo é produzido para ser utilizado na área agrícola, antes que a sua comercialização seja liberada, ocorre o procedimento de avaliação do risco e periculosidade que o produto pode oferecer para o ambiente onde será utilizado. Dessa avaliação resulta uma classificação que garante, aos produtos aprovados para comercialização, que se aplicados de forma adequada e dentro das especificações técnicas e de eficiência de uso, apresentarão riscos mínimos, tecnicamente justificáveis e aceitáveis para o ambiente (IBAMA, 1996). No entanto, os produtos químicos empregados nas pisciculturas não possuem essa orientação, já que são destinados à área agrícola. O resultado é que em pisciculturas os procedimentos empregados nos tratamentos das enfermidades nem sempre são realizados nas doses realmente seguras para o ambiente aquático.

Uma seqüência de etapas de estudos permite a seleção eficiente de testes essenciais para a avaliação de risco ambiental dos pesticidas (FAO, 1989). Normalmente as etapas do processo de avaliação do risco ambiental dos pesticidas para registro e permissão de uso são: testes padronizados de laboratório, estudos suplementares de laboratório, estudos simulados de campo e monitoramento pós-registro. Na primeira etapa estão os testes para a determinação das propriedades químicas e físicas, destino primário do composto e efeitos biológicos agudos de curta exposição (FAO, 1989).

Avaliações de toxicidade aguda e de risco ambiental dos pesticidas para os organismos dos ambientes em que são utilizados são necessárias no processo de registro para um uso particular (Stavola e Craven, 1992). Essas avaliações são baseadas em testes toxicológicos padronizados, em condições de laboratório, e com organismos representativos das cadeias alimentares aquáticas. Os resultados dos testes iniciais de toxicidade aguda são utilizados para classificar os agrotóxicos quanto à toxicidade aguda e ao risco ambiental.

Os agrotóxicos podem ser classificados nas seis classes de toxicidade citadas por Zucker (1985), com base nos valores da CL_{50} ou CE_{50} obtidos em testes de

toxicidade aguda para peixes e invertebrados aquáticos. Estas classes representam o potencial de perigo ambiental, ou seja, quanto menor o valor da CL_{50} ou CE_{50} maior é o perigo do agrotóxico para o ambiente. Os agrotóxicos também podem ser classificados nas classes de risco citadas por Urban e Cook (1986), de acordo com resultado da divisão do valor da Concentração Ambiental Estimada (CAE) pelos valores de CL_{50} ou CE_{50} (Figura 4).

A Concentração Ambiental Estimada (CAE) de um produto químico é caracterizada como a concentração desse produto que chega efetivamente ao ambiente. No caso dos ecossistemas aquáticos, a CAE considerada será 100% da maior dose do produto que é normalmente utilizada nesses ambientes (SETAC, 1994).

Os resultados destas classificações são analisados e interpretados e servem para a tomada de decisão no que diz respeito à aprovação, proibição ou restrição do uso, em função do nível de risco estimado. A partir daí espera-se que sejam implementadas estratégias de controle capazes de minimizar os impactos ambientais e manter a integridade dos ecossistemas aquáticos.

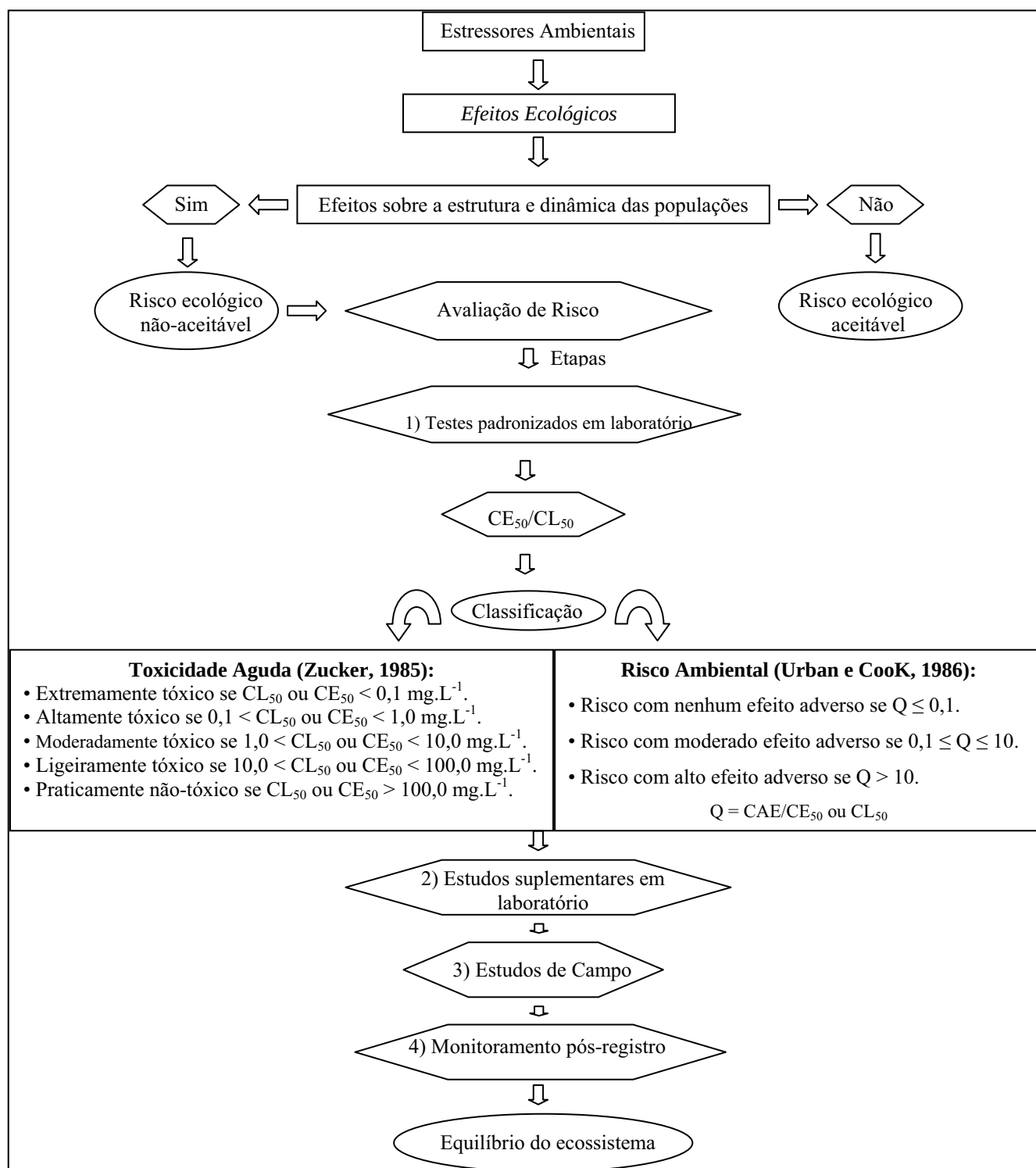


Figura 4. Procedimento de classificação quanto à toxicidade aguda e risco ambiental dos contaminantes ambientais. Os retângulos representam as entradas, os hexágonos representam as ações e os círculos, as saídas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local de realização dos bioensaios

Os testes ecotoxicológicos foram conduzidos em salas climatizadas do Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional, do Departamento de Fitossanidade, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal.

3.2. Testes ecotoxicológicos

Os materiais e metodologias utilizados nos testes ecotoxicológicos com o inseticida DFB foram os determinados nas normas de bioensaios estabelecidas pela CETESB (1999) – Métodos de Avaliação da Toxicidade de Poluentes a Organismos Aquáticos V. I; OECD (2002) – Guidelines for Testing of Chemicals – Draft Guideline 221, IBAMA (1987) Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos e ABNT – Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes (2004).

3.3. Produto químico

Foi utilizado o composto 1 – (4 – Clorofenil) – 3 (2,6 – difluorobenzoil) uréia (Diflubenzuron ou DFB), comercialmente denominado de Dimilin[®], fabricado pela

empresa Chemtura Indústria Química do Brasil Ltda, apresentado na forma de pó molhável.

3.4. Cultivo dos organismos-teste

3.4.1. *Daphnia magna*

Os exemplares de *Daphnia magna* utilizados nos testes foram obtidos a partir do cultivo mantido no laboratório de acordo com as normas da CETESB (1999), ABNT (1993) e IBAMA (1987), e com algumas modificações descritas posteriormente. O meio de cultivo constituiu-se de água destilada reconstituída com nutrientes (Tabela 1), pH $7,0 \pm 0,2$, dureza total de $250 \pm 25 \text{ mg.L}^{-1}$ em CaCO_3 e condutividade em torno de $600 \mu\text{S.cm}^{-1}$.

Os organismos foram cultivados em cristalizadores de 2 e 3 L de capacidade, com o meio de cultivo renovado completamente duas vezes por semana. A renovação do meio era realizada nas segundas-feiras e os lotes de organismos mais velhos (quatro semanas de vida), descartados e os novos lotes foram compostos com os neonatos coletados no dia. Nas quintas-feiras o meio era novamente renovado, porém os lotes permaneciam iguais. Nos outros dias da semana, pela manhã, os aquários eram limpos por sifonamento e fornecida a alimentação.

A alimentação da cultura foi composta por uma suspensão de algas da espécie *Scenedesmus subspicatus* na concentração aproximada de 5×10^6 células/indivíduo/dia, fornecida uma vez ao dia. Duas vezes por semana também foi fornecido alimento composto constituído por solução de ração para peixes ornamentais fermentada e solução de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*).

A solução de algas utilizada na alimentação das daphnias foi cultivada em meio CHOU, como descrito por Knie e Lopes (2004). O meio foi composto por água destilada, autoclavada e reconstituída com os nutrientes descritos na Tabela 2. O cultivo de *S. subspicatus* foi realizado em frascos erlenmeyer de 2 L, mantidos sob aeração e com luminosidade de aproximadamente 3.700 lux, constantes por uma semana.

Tabela 1. Composição do meio Básico/M4.

Soluções do Meio Básico		
Solução	Reagente	Fórmula
1	Cloreto de cálcio di-hidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
2	Sulfato de magnésio hepta-hidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
3	Cloreto de potássio	KCl
4	Bicarbonato de sódio	NaHCO_3
Soluções Meio M4		
Solução	Reagente	Fórmula
5	Cloreto de manganês tetra-hidratado	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
	Cloreto de lítio	LiCl
	Cloreto de rubídio	RbCl
	Cloreto de estrôncio hexa-hidratado	$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
	Cloreto de cobre di-hidratado	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	Cloreto de zinco	ZnCl_2
	Cloreto de cobalto hexa-hidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
6	Nitrato de sódio	NaNO_3
	Ácido bórico	H_3BO_3
	Brometo de sódio	NaBr
	Molibdato de sódio di-hidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	Metavanadato de amônio	NH_4VO_3
	Iodeto de potássio	KI
	Selenito de sódio	NaSe_2O_3
7	Silicato de sódio	Na_2SiO_3
8	Titriplex III	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	Sulfato ferroso hepta-hidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
9	Ortofosfato di-hidrogenado de potássio	KH_2PO_4
	Ortofosfato hidrogenado de dipotássio	K_2HPO_4
10	Hidrocloreto de tiamina	
	Cianocobalamina	
	D(+)-Biotina	

Os cristalizadores foram mantidos em estufas incubadoras sob temperatura controlada de $20 \pm 2^\circ \text{C}$, intensidade luminosa de aproximadamente 3.000 lux e fotoperíodo de 8 horas de escuro e 16 horas de luz.

Tabela 2: Composição do meio CHOU.

Solução	Reagente	Fórmula
1	Nitrato de sódio	NaNO_3
2	Cloreto de cálcio di-hidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
3	Sulfato de magnésio hepta-hidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
4	Fosfato de potássio dibásico	K_2HPO_4
5	Fosfato de potássio monobásico	KH_2PO_4
6	Cloreto de sódio	NaCl
7	Titriplex III	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	Hidróxido de potássio	KOH
8	Sulfato ferroso hepta-hidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
9	Ácido bórico	H_3BO_3
10	Sulfato de zinco hepta-hidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	Cloreto de manganês tetra-hidratado	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
	Oxido de molibdênio	MoO_3
	Sulfato de cobre penta-hidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
	Nitrato de cobalto hexa-hidratado	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

O preparo do alimento composto foi realizado com a adição de 5 g de ração comercial para peixe ornamental (42% de proteína bruta) em 1 L de água destilada, mantida por uma semana sob aeração constante. Após esse período, a solução foi filtrada e fracionada em frascos de 100 mL, mantidos congelados até o uso. Para o uso, 50 mL da solução de ração descongelada foi misturada com 50 mL de uma suspensão composta por 0,25 g de fermento biológico seco instantâneo diluído em 50 mL de água destilada.

3.4.2. *Poecilia reticulata*

Os peixes utilizados nos testes ecotoxicológicos com o inseticida foram cultivados de acordo com as normas do ABNT (2004) e IBAMA (1987). Os exemplares de guarú (*Poecilia reticulata*) foram coletados em tanques de cultivo do Centro de Aqüicultura da UNESP, localizado no Campus de Jaboticabal. Inicialmente os peixes foram aclimatados em reservatórios com 1000 L de capacidade, constituídos de fibra de amianto revestidos com resina epóxi. Os reservatórios foram abastecidos com água de poço artesiano com renovação e aeração constante, por 15 dias. Esse período foi reservado para a observação da sanidade dos organismos e recuperação do estresse da captura. A temperatura da água foi mantida em torno de 25° C com o uso de um termostato.

Os peixes foram alimentados com ração comercial para peixes “Poli peixes” Polinutre LTDA. (28% proteína bruta), fornecida uma vez ao dia. Foram descartados os lotes de peixes em que ocorreram alta taxa de mortalidade e o aparecimento de parasitas e doenças.

Após o período de aclimação, um lote homogêneo de peixes, com aproximadamente mesmo tamanho e idade, foi transferido às salas de ensaios sob as condições de realização dos testes ecotoxicológicos por sete dias. A temperatura e o fotoperíodo da sala foram controlados. Os peixes foram mantidos em um reservatório de 250 L de capacidade na sala climatizada (Figura 5) com a temperatura controlada em $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e 12 horas de luz.

A aeração e o fluxo de água foram mantidos constantes. A alimentação consistiu em ração para peixes ornamentais de formulação conhecida (28% de proteína bruta), fornecida diariamente.

Sempre que necessário foi realizada a limpeza dos reservatórios de aclimação por sifonamento, para retirada de rejeitos e peixes mortos e evitar a deterioração da qualidade da água. A água de cultivo foi mantida em pH = 7,0, 64,10% de saturação de oxigênio e $180 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ de condutividade.



Figura 5. Aclimação dos peixes à 25° C para realização dos ensaios ecotoxicológicos.

3.4.3. *Lemna minor*

O cultivo da macrófita *Lemna minor* seguiu as especificações da norma OECD (2002) com algumas modificações. As plantas foram obtidas de coleções mantidas em caixa d' água do Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional, sob condições ambientais naturais em uma construção coberta e telada (Figura 6A).

As plantas de *lemna* foram selecionadas das caixas d'água e transferidas para cristalizadores de vidro e cultivadas em 1 L de solução de Hoagland (Li et al., 2004) (Figura 6B e C), com pH 5,8. O meio de cultivo foi composto por água destilada reconstituída com os nutrientes listados na Tabela 3.

As plantas foram mantidas em sala climatizada com temperatura de $24 \pm 2^\circ \text{C}$, sob intensidade luminosa de 6.000 lux de lâmpadas fluorescentes de 20W super luz do dia, com fotoperíodo de 12 horas de luz. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana. Por ocasião da troca do meio, as macrófitas danificadas e com raízes escurecidas foram retiradas e mantidas apenas aquelas com aspecto saudável. Para os testes foram utilizadas as plantas que permaneceram no meio de cultivo por sete dias (OECD, 2002).



Figura 6. (A) Cultivo de *Lemna minor* mantido em reservatório do laboratório; (B) Sala climatizada à 24° C do laboratório; (C) Cultivo em Meio de Hoagland.

Para eliminar algas e protozoários contaminantes, eventualmente foi realizada a desinfecção das macrófitas, com a imersão das plantas em uma solução 0,5% de hipoclorito de sódio por 4 min. Após a imersão, as plantas foram lavadas com água destilada e colocadas em meio de cultivo (OECD, 2002).

Tabela 3: Composição do meio de Hoagland.

Solução	Reagente	Fórmula
1	Nitrato de cálcio tetra-hidratado	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
2	Cloreto de ferro hexa-hidratado	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
	EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
3	Sulfato de magnésio hepta-hidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
4	Nitrato de potássio	KNO_3
5	Fosfato de potássio monobásico	KH_2PO_4
6	Ácido bórico	H_3BO_3
	Cloreto de manganês tetra-hidratado	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
	Sulfato de zinco hepta-hidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	Molibdato de sódio diidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	Sulfato de cobre penta-hidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

3.5. Teste de toxicidade aguda para *Daphnia magna*

Obedecendo as normas da CETESB (1999), ABNT (1993) e IBAMA (1987), a primeira etapa da realização dos testes de avaliação da ecotoxicidade aguda dos inseticidas para a *Daphnia magna* consistiu na separação dos neonatos com idade entre 6 e 24 horas. Para obtenção de organismos com essa idade, 24 horas antes do ensaio as fêmeas ovígeras foram isoladas. Na manhã seguinte, os neonatos nascidos foram separados e mantidos em meio de cultivo até o início do teste.

Foram realizados testes preliminares para a determinação das faixas de concentração letal do inseticida para serem utilizadas nos testes definitivos. Foram determinadas as concentrações do inseticida DFB que causaram 0 e 100% de imobilidade/mortalidade dos organismos-teste.

Os testes foram realizados em frascos de vidro com 30 mL (Figura 7). O volume final das soluções-teste nos frascos foi de 10 mL com as concentrações crescentes do inseticida. As diluições do produto foram feitas a partir da adição de volumes conhecidos de soluções-estoque de 0,01 mg.L⁻¹ de DFB e completado com 9 mL do meio de cultivo. Em seguida, cinco organismos neonatos (6 a 24 horas de vida) foram adicionados em cada frasco em 1 mL de meio de cultivo, completando o volume final de 10 mL em cada recipiente-teste. O teste foi mantido durante o período de 48 horas em sistema estático de exposição, no escuro, a 20 ± 2 °C e sem alimentação dos animais.

Em todos os ensaios foram acrescentados um tratamento controle com somente o meio de cultivo e com o mesmo número de organismos. Os testes foram conduzidos com três réplicas de cada concentração e do tratamento controle. A avaliação da imobilidade/mortalidade dos organismos foi realizada ao final do período de exposição do teste por meio da contagem dos organismos imóveis em cada recipiente. Foram descartados os testes em que ocorreu mais de 10% de imobilidade/mortalidade dos organismos no tratamento controle.

Os testes definitivos foram realizados com as concentrações estabelecidas nos testes preliminares. Os procedimentos para realização dos testes definitivos foram os mesmos descritos para os testes preliminares. As concentrações utilizadas do DFB foram: 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,1 e 1,3 µg.L⁻¹ na ausência de sedimento; e 0,7; 1,0; 1,3; 1,6; 1,9; 2,2 e 2,5 µg.L⁻¹ na presença de sedimento.

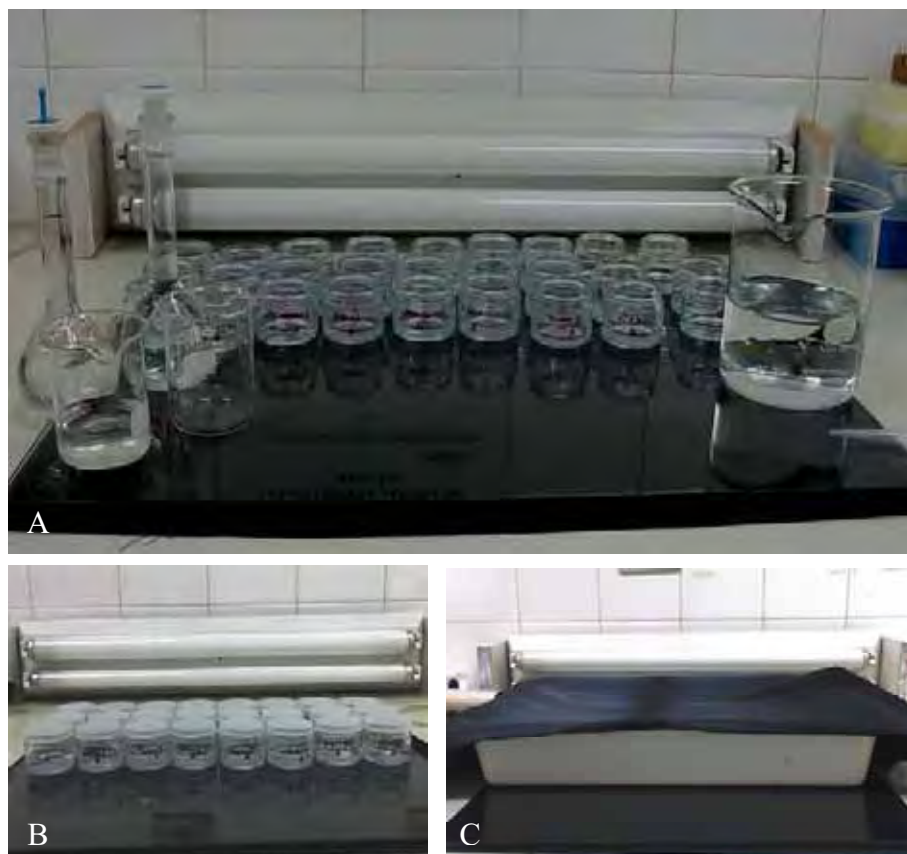


Figura 7. (A) Teste de toxicidade aguda com diflubenzuron para *Daphnia magna*. (B) Receipientes-teste. (C) Testes mantidos no escuro.

3.6. Teste de toxicidade aguda para *Poecilia reticulata*

De acordo com as normas da ABNT (2004) e IBAMA (1987), os testes preliminares e definitivos com os peixes foram conduzidos em sistema estático, sem substituição ou sifonagem de água e sem alimentação durante a exposição ao DFB. A água utilizada foi a de abastecimento da faculdade, oriunda de poço artesiano localizado no campus com $\text{pH} = 7,0$; 64,10% de saturação de oxigênio e $180 \mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$ de condutividade. Os recipientes-teste foram cristalizadores de vidro de 8 L e com o volume final de 3L das soluções-teste. Foram utilizados cinco peixes por recipiente-teste obedecendo a densidade estabelecida pelo IBAMA (1987) de, no máximo, 1g de peixe por litro de água. Inicialmente, foram adicionados 2L de água nos recipientes-teste e os peixes após pesagem cuidadosa. Os peixes estavam com peso corpóreo médio de $0,12 \pm 0,08$ g. Para minimizar o estresse dos animais, as soluções-teste só foram adicionadas 24 horas após a transferência para os recipientes-teste.

As concentrações utilizadas nos testes sem sedimento foram preparadas a partir de uma solução-estoque de 2000 mg.L^{-1} de DFB, e nos testes na presença de sedimento a solução-estoque, de 8000 mg.L^{-1} . Os tratamentos com as concentrações do inseticida e o controle foram conduzidos com três repetições.

Os testes foram efetuados em sala climatizada a $25 \pm 2^\circ \text{C}$, sem aeração durante o período de 96 horas (Figura 8). A cada 24 horas os peixes mortos foram retirados dos recipientes e contados e determinada a qualidade da água, com as medições de pH, % de saturação de oxigênio e condutividade.

Testes preliminares foram realizados para a determinação do intervalo de concentrações que causaram mortalidades de 0 e 100% dos organismos-teste. Após o estabelecimento dos intervalos de concentrações foram realizados os testes definitivos sob as mesmas condições descritas. As concentrações finais utilizadas no teste definitivo sem sedimento foram 70; 100; 130; 160; 190; 210 e 240 mg.L^{-1} e, na presença do sedimento, 155; 190; 225; 260; 295; 330 e 365 mg.L^{-1} .



Figura 8. Teste de toxicidade aguda com diflubenzuron para *Poecilia reticulata*. (A e C) Aclimação dos peixes aos aquários-teste na ausência e na presença de sedimento; (B e D) Teste com diflubenzuron na ausência e na presença de sedimento.

3.7. Teste de toxicidade aguda para *Lemna minor*

Os testes de toxicidade aguda do inseticida DFB para *Lemna minor* foram realizados de acordo com a norma da OECD (2002). As frondes (folhas) selecionadas estavam com bom aspecto sanitário, nutricional e de tamanho similar. Os recipientes testes utilizados foram frascos de vidro de 170 mL, nas mesmas condições de temperatura e luminosidade especificadas para a manutenção das culturas (Figura 9). Os recipientes foram cobertos com filme plástico flexível de PVC com perfurações de 1 mm de diâmetro para permitir as tocas gasosas.

Foram realizados testes preliminares para o estabelecimento do intervalo de concentrações do inseticida no meio de cultivo que causaram os efeitos de 10 e 90% de inibição do crescimento da *Lemna minor*. Foram utilizadas soluções-estoque de 4000 e 10000 mg.L⁻¹ de DFB para os ensaios na ausência e presença do sedimento, respectivamente. Volumes conhecidos da solução-estoque foram adicionados ao meio de cultivo e completado para 100 mL com as concentrações testadas nos recipientes-teste. Todos os testes foram conduzidos com três repetições de cada concentração e do tratamento controle.

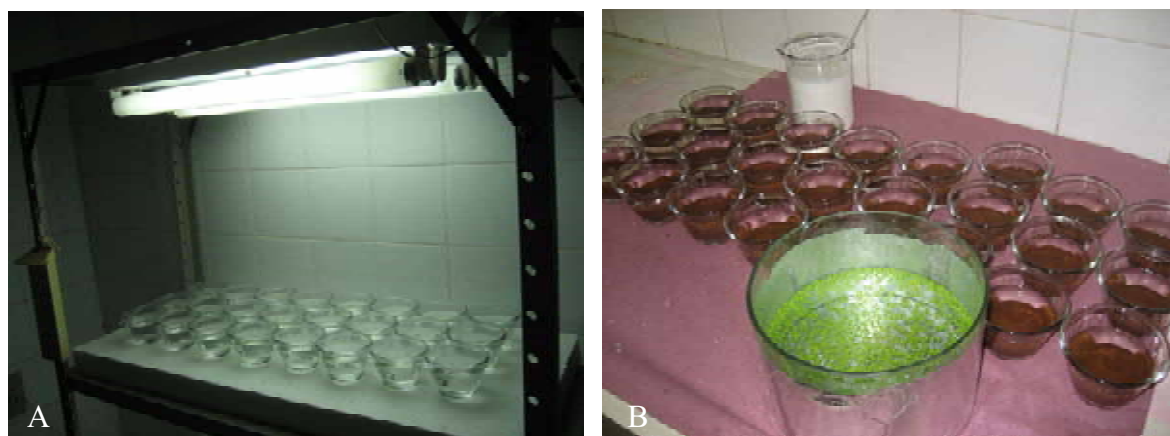


Figura 9. A e B Teste de toxicidade aguda com diflubenfuron para *Lemna minor* na ausência e presença de sedimento.

Após o preparo das soluções, as macrófitas foram cuidadosamente transferidas para os recipientes-teste com o auxílio de pinça metálica, para evitar danos às frondes. Foram utilizadas quatro colônias com 3 frondes cada colônia, totalizando 12 frondes por recipiente-teste. Foi utilizado o sistema estático de exposição das plantas aos inseticidas. As avaliações dos efeitos do inseticida na

formação das frondes foram realizadas aos 3, 5 e 7 dias de exposição por meio da contagem do número de frondes formadas.

A taxa de crescimento relativa foi calculada com a seguinte fórmula proposta por Guillard (1979).

$$K (d)^{-1} = (\text{Log}_2 n_f - \text{Log}_2 n_i) / t$$

Onde:

K = Taxa de crescimento diário;

Log₂n_f = Logarítmo na base dois do número de frondes ao final do experimento;

Log₂n_i = Logarítmo na base dois do número de frondes no início do experimento;

t = tempo de incubação (dias).

As alterações macroscópicas referentes ao desenvolvimento físico das plantas de *lemna* também foram observadas ao longo dos testes de toxicidade aguda.

Os testes definitivos foram realizados com as concentrações estabelecidas no teste preliminar de 100; 400; 700; 1000; 1300; 1600 e 1900 mg.L⁻¹ na ausência de sedimento e de 400; 900; 1400; 1900; 2400; 2900 e 3400 mg.L⁻¹ na presença de sedimento, sob as mesmas condições experimentais.

3.8. Testes na presença do sedimento

Todos os testes de toxicidade aguda foram efetuados também na presença do sedimento, como descrito anteriormente, com a finalidade de avaliar a influência da sua presença sobre a toxicidade do inseticida aos organismos-teste.

O sedimento foi coletado da camada superficial de 0 a 20 cm do solo em uma área natural, onde nunca foi aplicado qualquer pesticida e não sujeita a descarte de resíduos de atividades antrópicas. O solo foi peneirado e sua composição química e granulométrica analisada (Tabela 4).

A quantidade de sedimento utilizada nos recipientes-teste foi de 2 g; 900 g e 30 g para os ensaios com *D. magna*, *P. reticulata* e *L. minor*, respectivamente. O volume final das soluções-teste também foi o mesmo empregado nos testes na ausência de sedimento, 10 mL; 3000 mL e 100 mL. O sedimento foi pesado e colocado nos recipientes-teste 24 horas antes do início do ensaio, para ocorrer interação entre as fases solo e água. No caso dos testes com os peixes, os mesmos foram aclimatados por 24 horas na presença do sedimento antes da adição das soluções contendo o diflubenzuron (Figura 10). Nos ensaios com o

microcrustáceo, o DFB foi colocado na presença do sedimento 24 horas antes da adição dos neonatos, para haver tempo suficiente de interação do produto com o solo, considerando que a duração do teste com a *D. magna* foi de 48 horas.

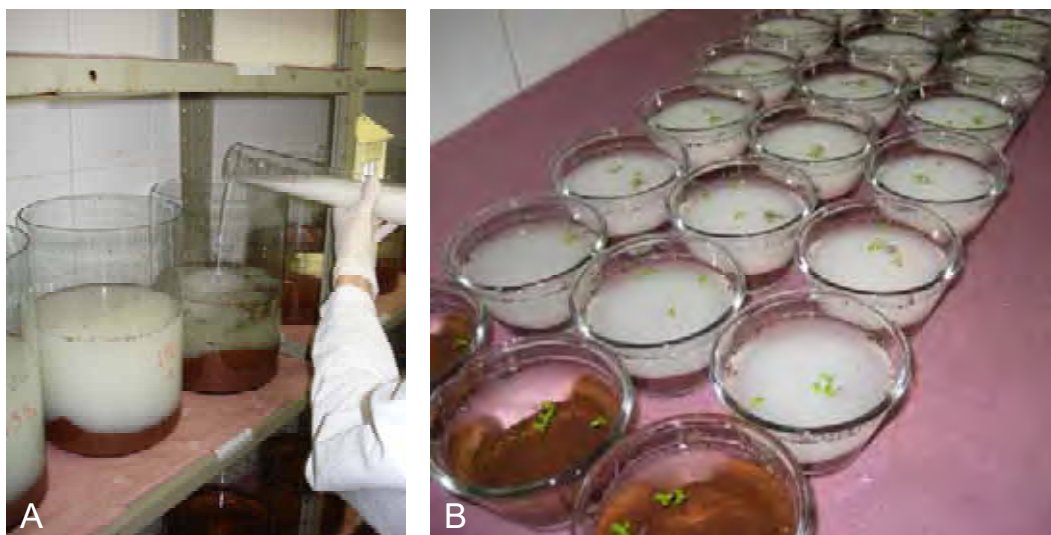


Figura 10. Teste de toxicidade aguda com diflubenuron na presença de sedimento, (A) teste com *P. reticulata* e (B) teste com *L. minor*.

Tabela 4. Análises químicas e granulométricas do solo usado como sedimento nos testes de toxicidade aguda.

Composição Química	Valores	Composição Física	Valores
pH (em CaCl ₂)	4,7	Argila (g/Kg)	230
MO (g/dm ³)	25	Limo (g/Kg)	30
P (mg/dm ³)	7	Areia fina (g/Kg)	340
K (mmol/dm ³)	2,2	Areia grossa (g/Kg)	400
Ca (mmol/dm ³)	12	Classe textural	Média
Mg (mmol/dm ³)	7		
H + Al (mmol/dm ³)	31		
SB (mmol/dm ³)	21,2		
T (mmol/dm ³)	52,2		
V (%)	41		

MO = Matéria Orgânica; H + Al = Hidrogênio + Alumínio; SB = Soma de Bases; T = Capacidade de Troca de Cátions; V = Porcentagem de saturação de bases.

3.9. Controle de sensibilidade dos organismos-teste

Testes de sensibilidade foram realizados para as três espécies em estudo de acordo com as metodologias utilizadas e estabelecidas nas normas dos testes (ABNT, 2004; CETESB, 1999; ABNT, 1993 e IBAMA, 1987).

Durante o período de estudos realizados com o inseticida foram conduzidos testes periódicos com as substâncias de referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) para daphnia e guarú, de acordo com as normas adotadas para estas espécies e cloreto de sódio (NaCl) para lemna, como sugerido por Chastinet e Silva (2000). As CE_{50} e CL_{50} foram calculadas em cada teste e todos os valores utilizados no controle de sensibilidade durante o período de teste.

3.9.1. *Daphnia magna*

O teste de sensibilidade para a *Daphnia magna* faz parte da rotina do laboratório e é efetuado a cada 15 dias. Os organismos foram expostos a concentrações crescentes do dicromato de potássio, sendo utilizadas três réplicas de cada concentração, inclusive o controle. As diluições foram feitas a partir da adição de volumes calculados de uma solução-estoque de 10 mg.L^{-1} . Os testes de sensibilidade foram conduzidos nas mesmas condições utilizadas nos testes de ecotoxicidade aguda e com as avaliações finais após 24 horas de exposição.

As concentrações utilizadas foram: 0,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8 e 1,9 mg.L^{-1} . A partir dos resultados dos dezesseis testes realizados com daphnia foram calculados a CE_{50-24h} média de $1,45 \text{ mg.L}^{-1}$ com desvio padrão de 0,08, o limite superior (LS) foi de $1,61 \text{ mg.L}^{-1}$ e o limite inferior (LI) foi de $1,29 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 11).

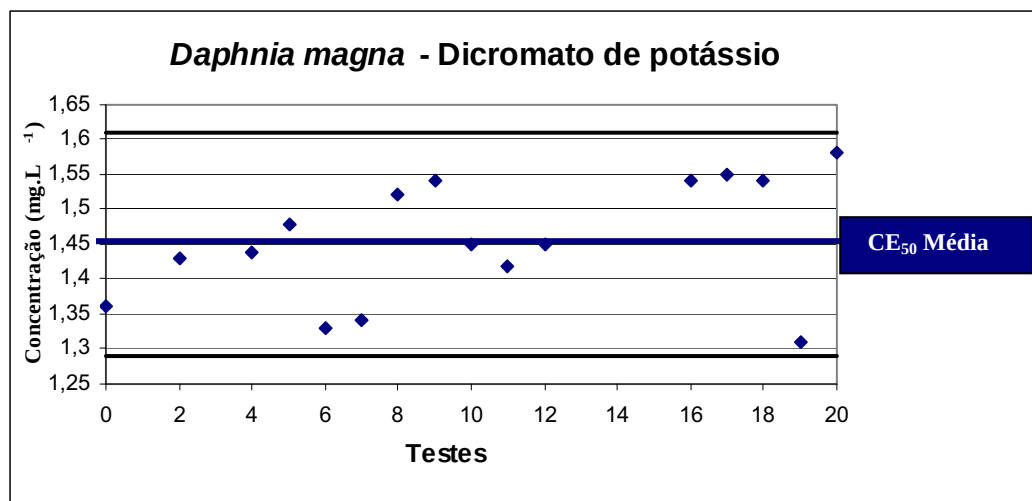


Figura 11. Carta-controle do organismo *D. magna* para a substância referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). Médias das CE_{50-24h} e limites superior e inferior.

3.9.2. *Poecilia reticulata*

Para o controle da sensibilidade após o período de aclimação, os peixes foram expostos a concentrações crescentes do dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), utilizado como substância de referência em testes com duração de 96 horas. Da mesma forma, foram empregadas concentrações crescentes do produto, com três repetições, sob as mesmas condições descritas para os testes com o inseticida DFB. As diluições foram feitas a partir de uma solução-estoque de 10.000 mg.L^{-1} de $K_2Cr_2O_7$. A cada 24 horas o teste foi avaliado, os peixes mortos anotados e retirados dos recipientes.

As concentrações utilizadas foram: 40; 60; 80; 100; 120; 140 e 160 mg.L^{-1} . A CL_{50-96h} média calculada ao longo dos experimentos foi de $82,25 \text{ mg.L}^{-1}$ com desvio padrão de 10,50; o limite superior (LS) foi de $103,25 \text{ mg.L}^{-1}$ e o limite inferior (LI) foi de $61,25 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 12).

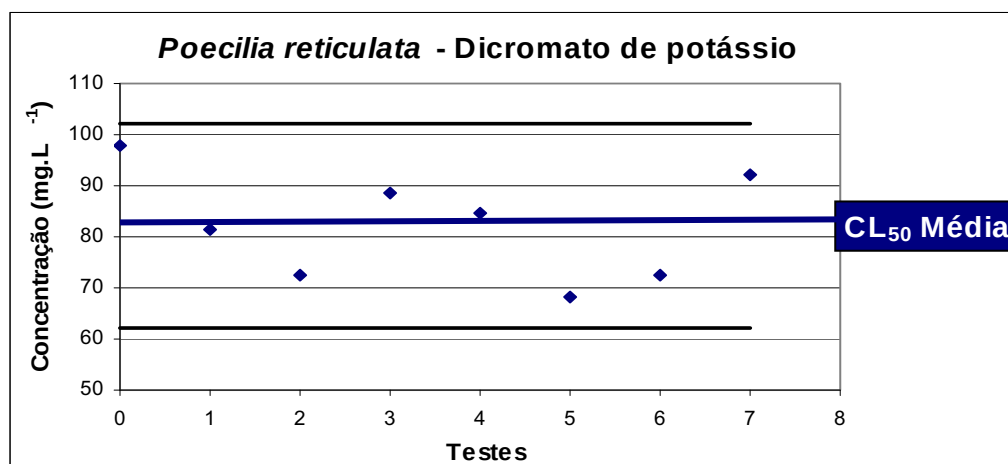


Figura 12. Carta-controle do organismo *P. reticulata* para a substância referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). Médias das CL_{50-96h} e limites superior e inferior.

3.9.3. *Lemna minor*

A sensibilidade da *lemna* cultivada foi avaliada mensalmente com o cloreto de sódio (NaCl) utilizado como substância de referência. Os testes foram conduzidos com concentrações crescentes do produto com três repetições, inclusive o controle (Figura 13).

As diluições foram feitas a partir de uma solução-estoque de 10.000 mg.L^{-1} de NaCl. Volumes conhecidos da solução foram adicionados ao meio de cultivo, completando 100 mL de solução por recipiente-teste. As condições de realização dos testes de sensibilidade foram as mesmas utilizadas com os demais testes realizados. As avaliações dos números de frondes foram realizadas no 3º, 5º e 7º dias de exposição.

As concentrações do NaCl utilizadas foram: 0,0; 1500; 2500; 3500; 4500; 5500; 6500 e 7500 mg.L^{-1} . A $CE_{50-7\text{dias}}$ média calculada ao longo dos experimentos foi de $4294,34 \text{ mg.L}^{-1}$, com desvio padrão de 452,72; o limite superior (LS) foi de $5199,78 \text{ mg.L}^{-1}$ e o limite inferior (LI) foi de $3388,90 \text{ mg.L}^{-1}$.

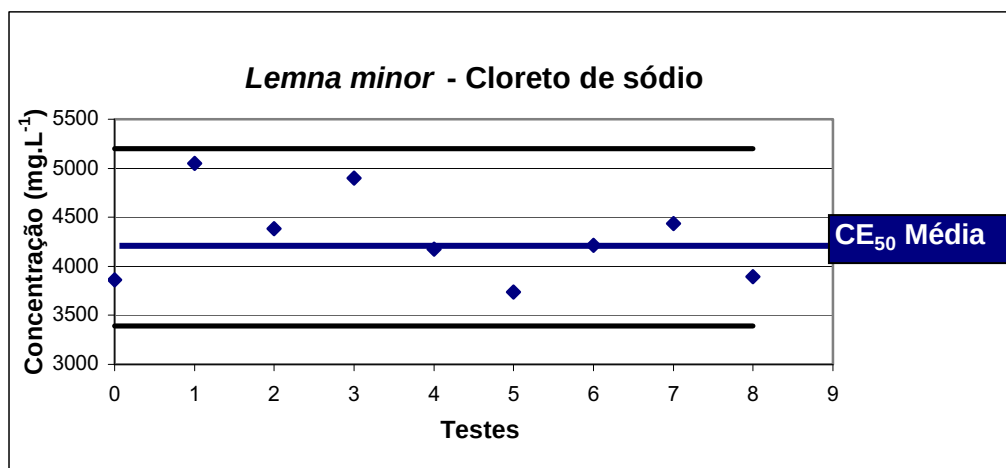


Figura 13. Carta-controle da macrófita *L. minor* para a substância referência cloreto de sódio (NaCl). Médias das CE_{50-7dias} e limites superior e inferior.

3.10. Classificação do DFB quanto à toxicidade aguda e ao risco ambiental

O inseticida diflubenzuron foi classificado pela toxicidade aguda nas classes citadas por Zucker (1985):

- Extremamente tóxico se CL₅₀ ou CE₅₀ < 0,1 mg.L⁻¹.
- Altamente tóxico se 0,1 < CL₅₀ ou CE₅₀ < 1,0 mg.L⁻¹.
- Moderadamente tóxico se 1,0 < CL₅₀ ou CE₅₀ < 10,0 mg.L⁻¹.
- Ligeiramente tóxico se 10,0 < CL₅₀ ou CE₅₀ < 100,0 mg.L⁻¹.
- Praticamente não-tóxico se CL₅₀ ou CE₅₀ > 100,0 mg.L⁻¹.

A classificação do risco ambiental do DFB foi realizada por meio do método do quociente (Q) citada por Urban e Cook (1986). O valor do Q foi calculado pela divisão dos valores da Concentração Ambiental Estimada (CAE) de (2 mg.L⁻¹)¹ pelos valores de CL₅₀ ou CE₅₀ obtidos nos testes de toxicidade aguda. As classes de risco ambiental utilizadas foram as seguintes:

¹ 2 mg.L⁻¹ corresponde à concentração utilizada para aplicação direta no ambiente aquático. Tratamento adotado por piscicultores.

- Risco com nenhum efeito adverso se $Q \leq 0,1$.
- Risco com moderado efeito adverso se $0,1 \leq Q \leq 10$.
- Risco com alto efeito adverso se $Q > 10$.

3.11. Análise estatística

Os resultados dos três testes definitivos realizados com cada espécie foram utilizados para os cálculos das CE_{50} e CL_{50} médios com auxílio do programa de análise estatística Trimmed Sperm-Karber (Hamilton et al., 1977).

Os valores de CE_{50} e CL_{50} calculados nos ensaios realizados na presença e ausência de sedimento foram analisados estatisticamente segundo um delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se da análise de variância com o teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, quando o F foi significativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Concentração efetiva média (CE_{50-48h}) para *Daphnia magna* na ausência e presença do sedimento

Os resultados dos testes de toxicidade aguda definitivos com diflubenzuron para *Daphnia magna*, na ausência de sedimento, estão apresentados na Figura 14, onde se observa o valor médio calculado de CE_{50-48h} de 0,56 µg.L⁻¹, o desvio padrão de 0,20, limite inferior de 0,16 e limite superior de 0,96. A equação linear $y = 69,641x + 6,4884$ ajustada e $R^2 = 0,98$.

Os valores obtidos nos testes de toxicidade aguda definitivos com diflubenzuron para *Daphnia magna*, na presença de sedimento, estão apresentados também na Figura 14, onde o valor médio calculado de CE_{50-48h} foi de 1,51 µg.L⁻¹, o desvio padrão de 0,11, limite inferior de 1,29 e limite superior de 1,73. A equação linear $y = 50,262x - 27,076$ ajustada e $R^2 = 0,95$.

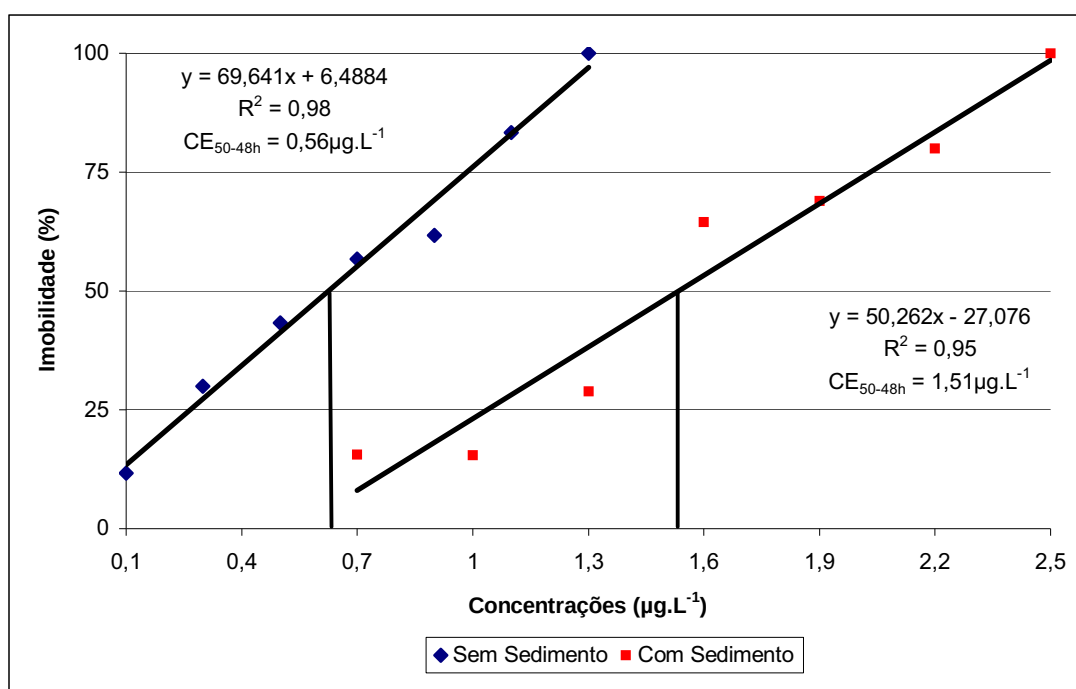


Figura 14. Representação gráfica da relação entre a concentração do inseticida diflubenzuron e a porcentagem de imobilidade do microcrustáceo *Daphnia magna* após as 48 horas de exposição aguda na ausência e na presença de sedimento.

Estes resultados estão de acordo com os trabalhos encontrados na literatura que classificam o inseticida diflubenzuron como um produto de elevada toxicidade para invertebrados aquáticos, entre eles a *Daphnia magna* (Fischer e Hall, 1992). Nebeker et al., (1983), em estudos com este inseticida, calcularam uma CE_{50-48h} de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ para a *D. magna*, sob temperatura de 20°C e pH de 7,3. De acordo com estes autores, o inseticida pode eliminar totalmente populações de daphnias expostas por períodos prolongados ao DFB.

Organismos zooplânctônicos foram utilizados por Mabilia et al. (2004) na avaliação da toxicidade do DFB em efluentes de pisciculturas. As concentrações efetivas médias (CE_{50-48h}) calculadas foram: $0,18 \mu\text{g.L}^{-1}$ para *D. similis*, $0,51 \mu\text{g.L}^{-1}$ para a *Ceriodaphnia dubia*, $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$ para *Ceriodaphnia silvestrii*, e $0,039 \mu\text{g.L}^{-1}$ para *Simocephalus serrulatus*. Estas concentrações são muito menores que as doses recomendadas para o tratamento de parasitoses em peixes, cujas concentrações em chegam a 2mg.L^{-1} .

Outras espécies de invertebrados foram estudadas quanto à sensibilidade ao inseticida DFB. Náuplios do copépoda estuarino *Eurytemora affinis*, tiveram 50% da população afetada quando submetidos à concentração de $2,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ do produto. Observou-se ainda que a exposição à concentração subletal de $0,78 \mu\text{g.L}^{-1}$ afetou a sobrevivência e o desenvolvimento desses náuplios após um período de cinco dias (Savitz, et al., 1994).

Nos resultados da exposição da espécie de cladócero, *Bosmina longirostris*, à concentração de $12 \mu\text{g.L}^{-1}$ do DFB durante os meses de abril e agosto, observou-se total eliminação da espécie durante a primeira semana do experimento em ambos os períodos. No mesmo estudo, também foi verificado a recuperação da população dos cladóceros só após onze semanas seguintes ao tratamento com o DFB (Ali e Mulla, 1978).

As espécies de cladóceros *Ceriodaphnia sp.* e *Daphnia laevis* foram submetidas a concentrações entre 4 e $7 \mu\text{g.L}^{-1}$ de DFB durante um tratamento a base de pulverização em um lago. Verificou-se que não houve efeito significativo sobre os indivíduos teste. Porém, quando expostas, também por pulverização, à concentração de $12 \mu\text{g.L}^{-1}$ de DFB, os organismos foram totalmente eliminados na primeira semana de experimento (Ali e Mulla, 1978).

Em estudos realizados com uma espécie de caranguejo azul (*Callinectes sapidus*) foi constatado que os adultos foram sensíveis ao DFB quando expostos a concentrações entre 5 e $200 \mu\text{g.L}^{-1}$, enquanto que os juvenis da mesma espécie foram afetados sob concentrações entre $3,6$ e $20 \mu\text{g.L}^{-1}$. Os estágios larvais foram os mais sensíveis ao DFB ao serem afetados pelas concentrações de $0,5$ a $10 \mu\text{g.L}^{-1}$. A alta sensibilidade dessa espécie de artrópode ao DFB se deve à presença da carapaça quitinosa, o inseticida inibe a síntese de quitina e provoca a morte dos indivíduos (Rebach e French, 1996).

Pelos resultados apresentados neste estudo verifica-se que o inseticida Dimilin[®], mesmo em concentrações muito baixas, é capaz de causar danos severos à população de daphnídeos e, com isso, pode interferir diretamente na dinâmica do ecossistema aquático. De acordo com Mangas-Ramírez, et al. (2001), organismos zooplanctônicos, incluindo a *D. magna*, são responsáveis por 80% da produção secundária nesses ambientes. Portanto, alterações significativas sobre a comunidade zooplanctônica refletirão em desequilíbrio do ecossistema. Isto porque as concentrações utilizadas na piscicultura para o tratamento das parasitoses

ultrapassam muito a concentração efetiva média para a *D. magna* e também para outros organismos zooplanctônicos.

4.2. Concentração letal média (CL_{50-96h}) para *Poecilia reticulata* na ausência e presença de sedimento

O valor médio de CL_{50-96h} do inseticida DFB calculado para o peixe *Poecilia reticulata*, na ausência do sedimento, foi de 152 mg.L⁻¹, o desvio padrão de 6,93, limite inferior de 138,14 mg.L⁻¹ e limite superior de 165,86 mg.L⁻¹. A equação linear ajustada foi $y = 0,4742x - 21,193$ e $R^2 = 0,97$ (Figura 15).

Nos testes efetuados na presença de sedimento foi calculada a CL_{50-96h} média do DFB para o peixe de 277,83 mg.L⁻¹, o desvio padrão de 29,59, limite inferior de 218,65 mg.L⁻¹ e limite superior de 337,01 mg.L⁻¹. A equação linear ajustada foi $y = 0,3538x - 41,661$ e $R^2 = 0,84$ (Figura 15).

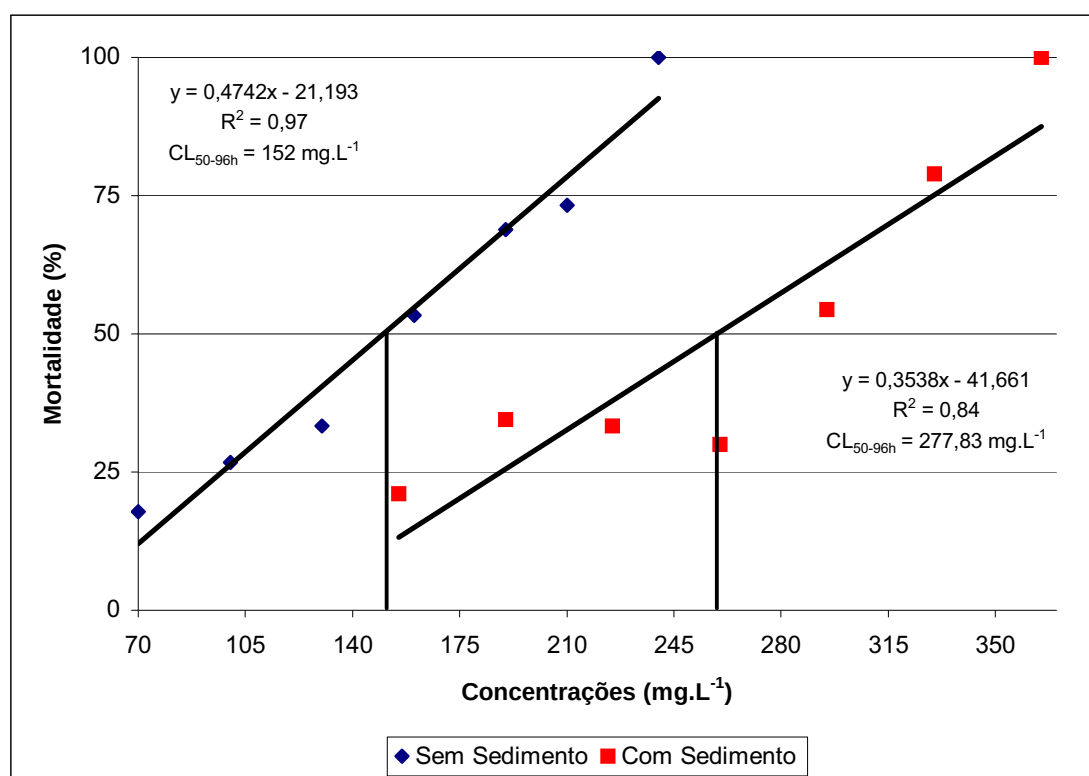


Figura 15. Representação gráfica da relação entre a concentração do inseticida diflubenzuron e a porcentagem de mortalidade do peixe *Poecilia reticulata* após as 96 horas de exposição aguda na ausência e na presença de sedimento.

A qualidade da água foi avaliada ao longo dos testes de toxicidade aguda na presença e ausência de sedimento. Verificou-se que não ocorreram variações expressivas nos parâmetros de qualidade da água ao longo dos testes. As variáveis medidas permaneceram dentro dos padrões de qualidade recomendados pela ABNT (2004) e IBAMA (1996) (Tabela 5).

Tabela 5. Média $\pm$ Desvio padrão das variáveis de qualidade da água durante os testes de toxicidade aguda na presença e ausência de sedimento.

Horas	Variáveis de qualidade da água					
	Sem Sedimento			Com Sedimento		
	Cond.	% Sat.	pH	Cond.	% Sat.	pH
24	179,82 $\pm$ 5,66	62,18 $\pm$ 11,34	7,87 $\pm$ 0,24	135,17 $\pm$ 5,78	48,39 $\pm$ 17,93	6,95 $\pm$ 0,12
48	183,72 $\pm$ 5,01	67,15 $\pm$ 5,44	7,99 $\pm$ 0,14	138,02 $\pm$ 8,00	45,35 $\pm$ 21,98	7,06 $\pm$ 0,19
72	185,72 $\pm$ 5,18	70,99 $\pm$ 2,73	8,07 $\pm$ 0,10	142,51 $\pm$ 8,99	49,19 $\pm$ 19,70	7,06 $\pm$ 0,19
96	189,61 $\pm$ 4,69	76,12 $\pm$ 5,73	8,17 $\pm$ 0,12	142,84 $\pm$ 9,17	59,77 $\pm$ 8,66	7,18 $\pm$ 0,15

O mecanismo de ação tóxica do DFB em peixes ainda foi pouco estudado e os trabalhos encontrados na literatura são insuficientes para uma afirmação definitiva. Alguns autores relatam que a enzima glutathione-S-transferase está envolvida no processo de detoxificação do DFB e de outros xenobióticos. A exposição crônica a inseticidas provocou aumento da atividade dessa enzima em peixes, o que pode ter causado possíveis danos ao sistema hepático do animal (De la Veja Salazar et al., 1997). Outros autores acreditam que a exposição crônica ao DFB é capaz de provocar alterações em parâmetros hematológicos de peixes (Mabilia e Souza, 2006).

O inseticida metoprene, inibidor de crescimento, foi utilizado em testes de toxicidade aguda para o *Brachidanio rerio* e para o *Poecilia reticulata*. O inseticida foi considerado moderadamente tóxico para o *B. rerio*, pois a CL_{50-96h} calculada foi de $1,3 \text{ mg.L}^{-1}$, e altamente tóxico para o *P. reticulata* pois a CL_{50-96h} calculada foi de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ (Boock, et al., 2004). Este estudo permite concluir a alta sensibilidade da espécie *P. reticulata* a este inseticida regulador de crescimento.

Os inseticidas organofosforados também têm toxicidade acentuada para os peixes, devido à sua ação sobre a enzima acetilcolinesterase. Selvi et al. (2005) determinaram a toxicidade aguda do metil-clorpirifós, inseticida organofosforado, para o *P. reticulata*. Os autores calcularam a CL_{50-96h} de $1,79 \text{ mg.L}^{-1}$. O inseticida causou alterações em parâmetros comportamentais dos peixes, quando comparados ao grupo controle, como perda do equilíbrio, natação errática e alterações na atividade geral.

Os inseticidas do grupo piretróide também têm toxicidade elevada para os peixes. O inseticida alfa-cipermetrin, utilizado no controle de uma ampla variedade de insetos na área agrícola, como mosquitos, pulgas e outros vetores em saúde pública, e no controle de parasitoses em aquicultura, é moderadamente tóxico para *P. reticulata*, pois a CL_{50-96h} calculada foi de $9,43 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ (Yilmaz, et al., 2004).

Variáveis hematológicas, como número total de eritrócitos, leucócitos, hematócrito e contagem diferencial de leucócitos, foram avaliadas em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos às concentrações de 0,01; 0,1 e 1 mg.L^{-1} de DFB no tratamento antiparasitário de *Lernaea cyprinacea* (Mabilia e Souza, 2006). A exposição por curtos períodos de tempo ao inseticida não causa alterações nas variáveis hematológicas dos peixes. Porém, os autores sugerem que a exposição crônica ao produto pode causar mudanças nessas variáveis.

A toxicidade aguda do inseticida DFB também foi avaliada para várias espécies de peixes. A CL_{50-96h} calculada para truta arco-íris, com peso corporal médio de 1,5 g, foi de 240 mg.L^{-1} , sob condições de pH 7,4 e temperatura de 10°C (Ficher e Hall, 1992). Para o bagre do canal, com peso corporal médio de 2,0 g, a CL_{50-96h} foi superior a 100 mg.L^{-1} sob pH de 7,4 e temperatura de 22°C (Fischer e Hall, 1992). Para o *Poecilia reticulata* com quatro semanas de idade, concentrações inferiores a $36 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ não causaram qualquer efeito sobre a espécie em condições de pH 7,3 e temperatura 20°C (Nebeker et al., 1983).

A espécie *Gambusia affinis* (peixe mosquito) exposta durante 15 dias a $200 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ do DFB, apresentou aumento na excitabilidade 2,5 vezes superior ao grupo controle aos 2 dias após a exposição. O maior nível de excitação foi verificado entre os dias 4 e 8 e 4 vezes mais intenso que os controles. O comportamento do grupo exposto ao DFB só voltou a ser semelhante ao grupo controle após 14 dias de exposição ao inseticida. O peixe mosquito foi capaz de ajustar ou compensar a presença do DFB (Ellgaard et al., 1979).

4.3. Concentração efetiva média (CE_{50-7dias}) para *Lemna minor* na ausência e presença de sedimento

O valor médio da CE_{50-7dias} calculado para *L. minor* na ausência do sedimento foi de 459,50 mg.L⁻¹, o desvio padrão de 81,20, o limite inferior de 297,10 mg.L⁻¹ e limite superior de 621,90 mg.L⁻¹, a equação linear ajustada $y = 0,0443x + 20,831$ e $R^2 = 0,92$ (Figura 16).

Nos testes na presença de sedimento, o valor médio de CE_{50-7dias} foi de 698,25 mg.L⁻¹, desvio padrão de 98,25, limite inferior de 501,75 mg.L⁻¹ e limite superior de 894,75 mg.L⁻¹, a equação linear ajustada foi $y = 0,02x + 32,748$ e $R^2 = 0,96$ (Figura 16).

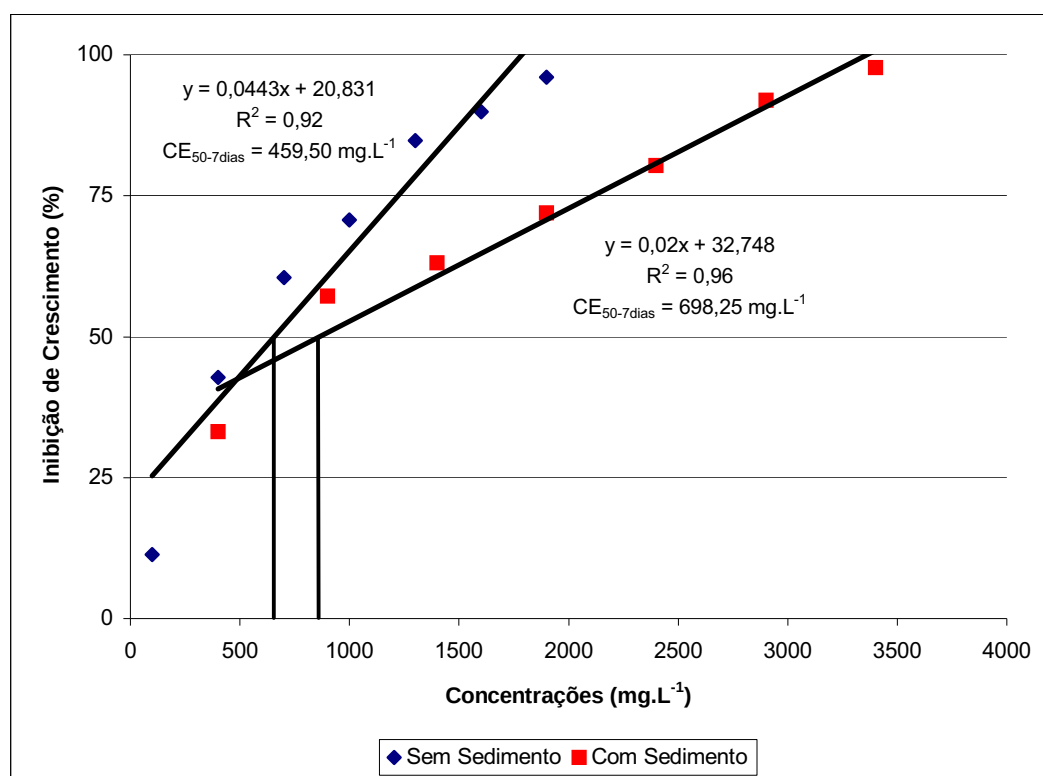


Figura 16. Representação gráfica da relação entre a concentração do inseticida diflubenzuron e a porcentagem de inibição de crescimento da macrófita *Lemna minor* após 7 dias de exposição aguda na ausência e na presença de sedimento.

4.4 Taxa de crescimento para *Lemna minor* na ausência e presença de sedimento

Houve diminuição na taxa de crescimento nos três dias avaliados, à medida que se aumentavam as concentrações do DFB (Figuras 17, 18 e 19). Verificou-se também que as macrófitas submetidas ao teste com sedimento apresentaram maior taxa de crescimento que às expostas ao DFB na ausência do sedimento.

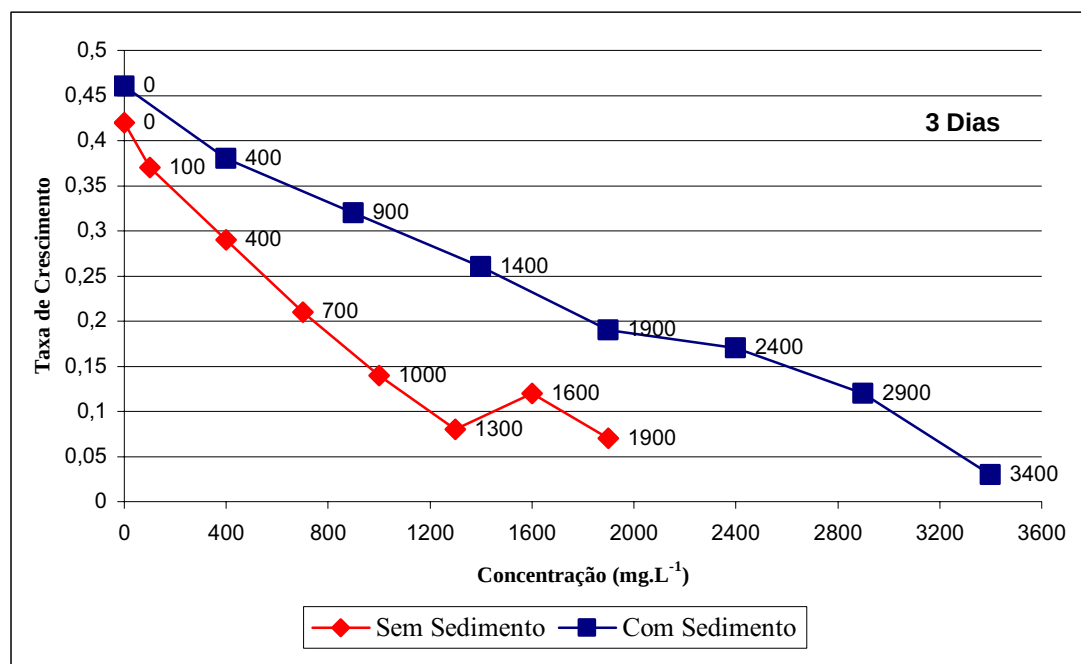


Figura 17. Representação gráfica da taxa de crescimento de *Lemna minor* em função da concentração de diflubenzuron usada na ausência e presença de sedimento aos três dias de exposição.

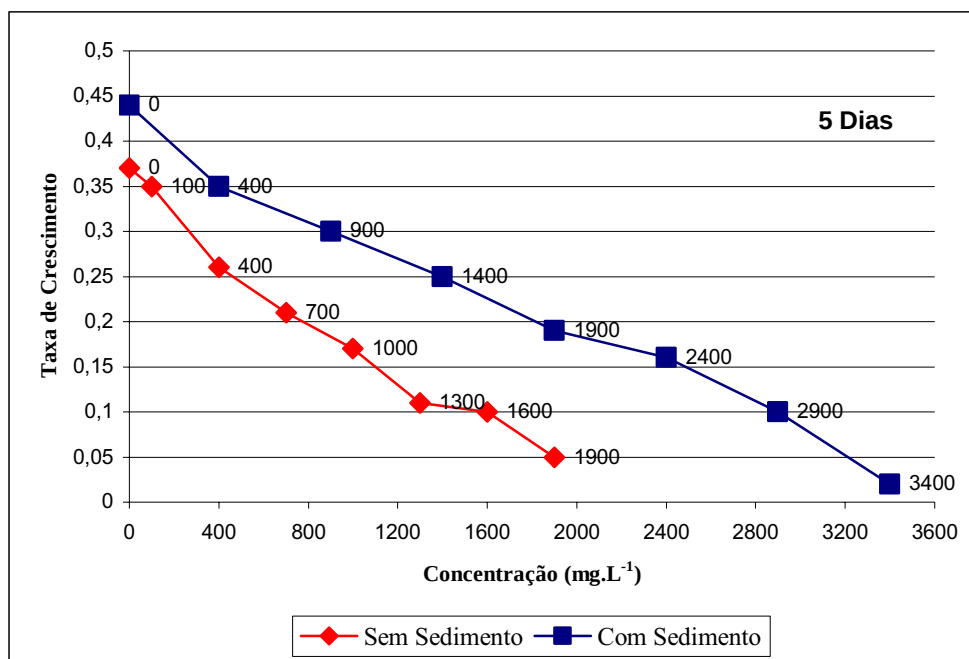


Figura 18. Representação gráfica da taxa de crescimento de *Lemna minor* em função da concentração de diflubenzuron usada na ausência e presença de sedimento aos cinco dias de exposição.

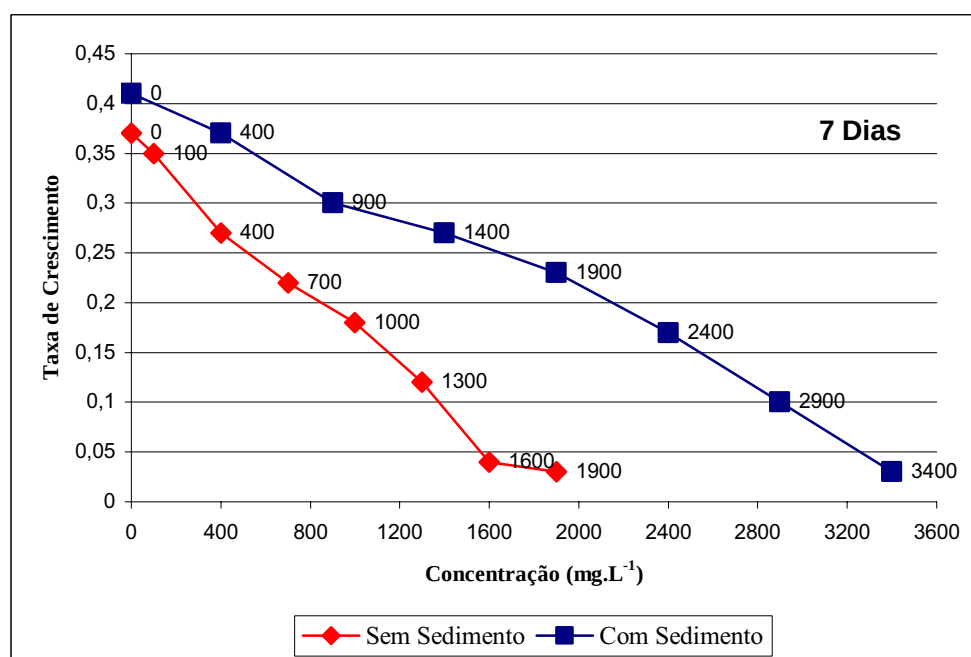


Figura 19. Representação gráfica da taxa de crescimento de *Lemna minor* em função da concentração de diflubenzuron usada na ausência e presença de sedimento aos sete dias de exposição.

De acordo com os resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda, o inseticida DFB foi pouco tóxico para a macrófita *L. minor*. Esse resultado, como esperado, possivelmente ocorreu devido ao mecanismo de ação tóxica do inseticida, que inibe o crescimento em organismos que apresentam componentes quitinosos nos tecidos corporais (Burka et al., 1997). Como a planta não apresenta esse componente de quitina, o produto provavelmente não interferiu de forma relevante na fisiologia do vegetal.

A taxa de crescimento da macrófita sofreu redução ao longo dos dias de avaliação em decorrência ao aumento das concentrações do produto. Esse resultado pode estar relacionado a algum fator fisiológico da planta, que em função da presença do DFB, privou-se do crescimento na tentativa de responder, de alguma forma, à detoxificação desse produto (De la Vega Salazar et al., 1997).

Na literatura existem poucos trabalhos descritos a respeito da toxicidade de inseticidas para plantas aquáticas. Os efeitos de inseticidas sobre as macrófitas parecem ocorrer de forma indireta no ambiente natural, onde a presença do inseticida causa mortalidade do zooplâncton e, conseqüentemente, diminui o forrageamento de algas, ocorre aumento no fitoplâncton e leva a inibição do crescimento de macrófitas (Wendt-Rasch et al., 2004).

Um estudo procurou avaliar os efeitos do inseticida metilparation sobre a macrófita *L. minor*, e foi constatado que a exposição aguda não teve efeito sobre planta. Porém, a exposição crônica causou acúmulo do inseticida nos tecidos da planta e provocou aumento na atividade da enzima glutathione-S-transferase, responsável pela detoxificação de xenobióticos em vegetais (De la Vega Salazar et al., 1997).

O inseticida carbaril foi pouco tóxico sobre as macrófitas *Ipomoea aquática*, *Pistia stratiotes* e *Hydrocharis dubia*, as CE_{50-96h} calculadas foram 996 mg.L^{-1} para *I. aquatica*, 785 mg.L^{-1} para *P. stratiotes* e 334 mg.L^{-1} para *H. dubia*. A exposição aguda causou clorose, necrose e levou as plantas à morte (Boonyawanich et al., 2001).

No entanto, a maior sensibilidade das *Lemnas sp.* parece estar relacionada à presença de herbicidas no meio aquático, concentrações de 1 mg.L^{-1} de glifosato foi capaz de alterar o tamanho, a forma e o número de frondes da macrófita *L. gibba* (Sobrero et al., 2007). A macrófita *L. minor* foi empregada para avaliar o potencial tóxico de produtos químicos usados na agricultura, o herbicida propanil, comumente

usado em lavouras de arroz, foi testado durante 24 dias de exposição. Verificou-se que o crescimento da *Lemna* foi significativamente reduzido e que o herbicida prejudica o estabelecimento das plantas no ambiente aquático (Herricks, 2002). Outro trabalho, onde se avaliou a toxicidade do herbicida metsulfuron – metil para doze espécies de plantas aquáticas, foi constatado que a *Lemna minor* é uma das espécies mais sensíveis ao herbicida (Cedergreen et al., 2004).

4.5. Desenvolvimento da macrófita *Lemna minor*

Algumas alterações macroscópicas referentes a mudanças durante o desenvolvimento das plantas puderam ser observadas ao longo dos sete dias de realização dos experimentos de toxicidade aguda, tanto na ausência como na presença do sedimento.

No terceiro, quinto e sétimo dias de avaliação, nas menores concentrações-teste observou-se que as frondes estavam com as bordas esbranquiçadas em comparação ao tratamento controle (Figura 20A e 20B). Nas concentrações intermediárias verificou-se que as frondes já apareciam parcialmente brancas e com tamanho reduzido (Figura 20C). Nas maiores concentrações-teste a maioria das frondes estavam completamente brancas, com tamanho muito inferior ao controle e algumas se destacaram das colônias ou formavam aglomerados centrais (Figura 20D).

O aspecto esbranquiçado observado nas plantas pode ser entendido como um possível início de necrose ou clorose das frondes e provavelmente ocorreu devido à depleção de alguma função fisiológica importante para a planta, em virtude da exposição ao inseticida. Possivelmente a presença do diflubenzuron provocou alterações na composição de clorofila das plantas, resultando em aspecto doente e tamanho reduzido.

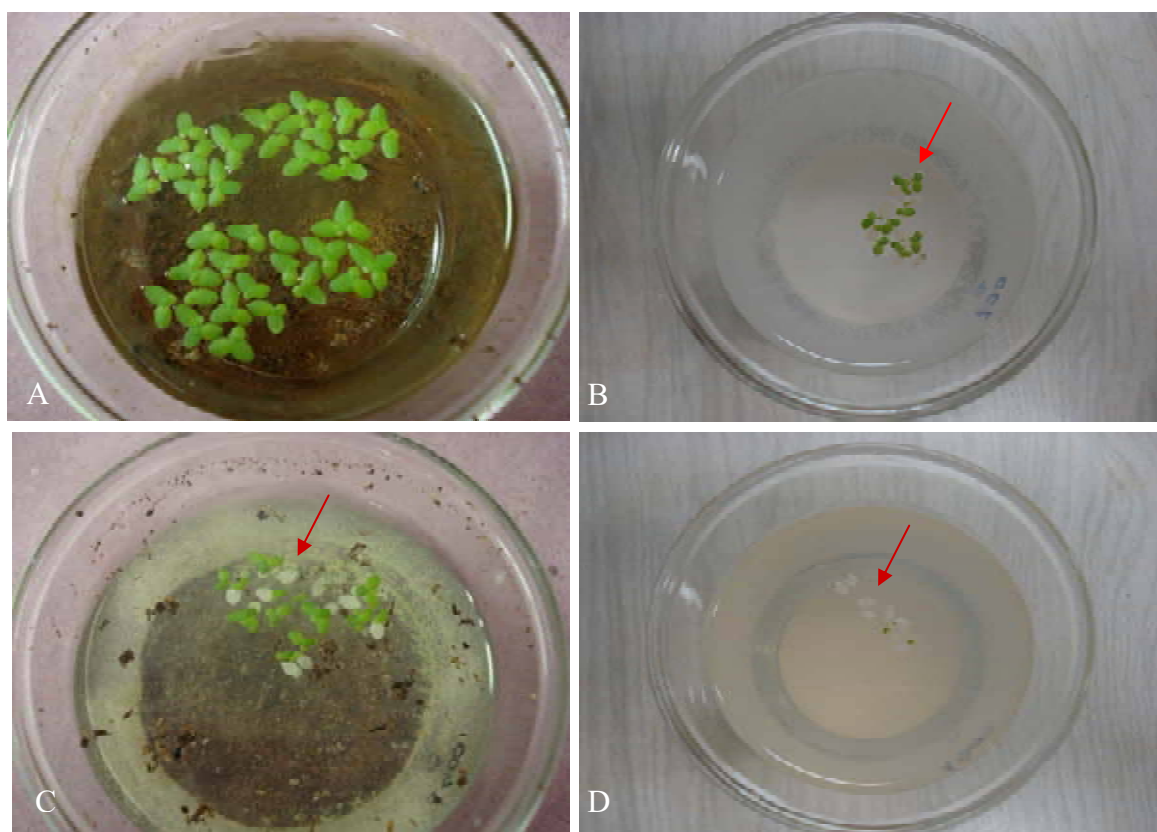


Figura 20. Alterações observadas durante o desenvolvimento da macrófita *L. minor* em função da exposição ao diflufenuron após sete dias. (A) Grupo controle; (B e C) Concentrações intermediárias (700 e 1400 mg.L⁻¹); (D) Maior concentração (1900 mg.L⁻¹).

4.6. Classificação quanto à toxicidade aguda e ao risco ambiental

De acordo com a classificação citada por Zucker (1985), o inseticida DFB classifica-se como extremamente tóxico (Tabela 8) para a espécie *D. magna*, pois os valores de CE_{50-48h}, na ausência ou presença de sedimento são inferiores a 0,1 mg.L⁻¹ (Tabela 6). Considerando as espécies de *P. reticulata* e *L. minor*, o inseticida classifica-se como não-tóxico tanto na presença quanto na ausência do sedimento (Tabela 8), pois os valores de CL_{50-96h} e CE_{50-7dias} são superiores a 100 mg.L⁻¹ (Tabela 6).

A classificação quanto ao risco ambiental do DFB realizada pelo método do quociente (Q) (Tabela 8), enquadra este produto na classe de risco com alto efeito adverso para *D magna*, pois os valores do Q calculados são superiores a 10. Os

valores do Q calculados para as espécies *P. reticulata* e *Lemna minor* classificam o inseticida na classe de risco com nenhum efeito adverso, pois os valores de Q são inferiores a 0,1 (Urban e Cook, 1986).

Tabela 6. Médias dos valores de CE₅₀ ou CL₅₀ (mg.L⁻¹) do diflubenzuron calculados para as três espécies de organismos aquáticos.

Espécies	CE ₅₀ ou CL ₅₀ (mg.L ⁻¹) ± D. P.	
	Sem Sedimento	Com Sedimento
<i>D. magna</i>	0,00056 b ± 0,00020	0,00151 a ± 0,00011
<i>P. reticulata</i>	152,00 b ± 6,93	277,83 a ± 29,59
<i>L. minor</i>	459,50 b ± 81,20	698,25 a ± 98,25

D.P. = Desvio Padrão

Tabela 7. Valores obtidos na análise de variância para as três espécies em função da presença de sedimento

Espécies	Valor de F	DMS	C.V.
<i>D. magna</i>	51,35**	0,37	15,80
<i>P. reticulata</i>	51,45**	48,76	10,00
<i>L. minor</i>	10,53*	204,51	15,57

DMS = Diferença Mínima Significativa

C.V. = Coeficiente de variação

* Indica diferença estatisticamente significativa a 5% de confiança

** Indica diferença estatisticamente significativa a 1% de confiança

Tabela 8. Classificação do DFB pela toxicidade aguda aos organismos aquáticos e pelo risco ambiental.

Espécies	Toxicidade Aguda	Q		Risco ambiental
		Sem sed.	Com sed.	
<i>D. magna</i>	Extremamente tóxico	3.571,4286	1.324,5033	Risco com alto efeito adverso
<i>P. reticulata</i>	Não-tóxico	0,0132	0,0072	Risco com nenhum efeito adverso
<i>L. minor</i>	Não-tóxico	0,0044	0,0029	Risco com nenhum efeito adverso

Os valores do Q calculados para *D. magna* classificam o DFB na classe de risco com alto efeito adverso (Urban e Cook 1986), pois os Q calculados são bastante altos. Isto por que os valores de CE_{50-48h} do DFB calculados na ausência e presença de sedimento (Tabela 6) são muito inferiores à Concentração Ambiental Estimada ($CAE = 2 \text{ mg.L}^{-1}$) do DFB utilizado no controle das parasitoses em pisciculturas. Portanto, a concentração normalmente usada do DFB, pode intoxicar e eliminar espécies zooplanctônicas e causar desequilíbrio dos ecossistemas aquáticos. Considerando as espécies de *P. reticulata* e *L. minor* o DFB não é capaz de causar impacto negativo.

Os valores de CE_{50} ou CL_{50} , sem e com a presença do sedimento, do DFB, calculados para as três espécies aquáticas, permite verificar-se que a *D. magna* é extremamente sensível ao DFB em comparação ao *P. reticulata*, que por sua vez, é mais sensível que a *L. minor*.

A espécie *D. magna* foi a mais sensível ao inseticida DFB, provavelmente devido a composição do seu exoesqueleto quitinoso e ao mecanismo de ação tóxica do inseticida. Esta espécie pode ser considerada como representativa nos procedimentos de avaliação de risco ambiental, dada sua elevada sensibilidade não só a este inseticida, mas também a um grande número de compostos poluentes que alcançam ecossistemas aquáticos (Villaroel et al., 1999).

Por outro lado, as espécies *P. reticulata* e *L. minor* não demonstraram elevada sensibilidade ao produto testado, mas não deixam de ser representativas nos procedimentos de avaliação de risco ecológico. Esses organismos são importantes para a manutenção do equilíbrio do ecossistema, pois participam da cadeia alimentar como consumidor e produtor respectivamente, e ainda oferecem

contribuições indiretas. Por exemplo: as macrófitas fornecem alimento e abrigo para outros organismos, como insetos, invertebrados e peixes, são essenciais nos processos de ciclagem dos nutrientes e na estabilização do sedimento (Freemark e Boutin, 1994).

Nos resultados apresentados neste trabalho pode-se observar uma simples aproximação do que é normalmente realizado antes que um agrotóxico seja disponibilizado para a agricultura. No entanto, quando se trata de produtos químicos empregados para a piscicultura, nenhum procedimento de classificação é efetuado. Em consequência, um grande número de fármacos são usados indiscriminadamente e atingem diretamente o ambiente aquático, já que são aplicados na água.

Em países mais desenvolvidos, como os Estados Unidos e países da União Européia, já existem guias que avaliam e regulamentam o uso de agrotóxicos nos ambientes aquáticos. Na União Européia, por exemplo, são realizadas avaliações de risco de exposição e efeitos sobre os organismos aquáticos, que incluem 10 itens obrigatoriamente questionados, que envolvem exposição por pulverização, drenagem, lixiviação entre outros meios pelos quais os agrotóxicos chegam até a superfície e profundidade das águas (Boesten et al., 2007).

Para melhor e mais completa avaliação do risco, esses países recomendam ainda o emprego de grande número de organismos representativos dos diferentes grupos taxonômicos, bem como, a utilização de testes de toxicidade crônica, nos quais os efeitos de concentrações subletais podem ser avaliados (Boesten et al., 2007). O uso de grande número de organismos relaciona-se também a um importante conceito ecológico, no qual o equilíbrio de um ecossistema só pode ser mantido quando uma quantidade mínima de diversidade de espécies é encontrada e conservada no mesmo (Landis, et al., 1996).

De acordo com Solomon (1996), a avaliação do risco ambiental é feita a partir do menor valor de concentração efetiva média (CE_{50}) observada para as espécies em estudo, ou seja, se são empregadas 3 espécies no estudo toxicológico o risco será avaliado em função daquela espécie que apresentar maior sensibilidade, que significa a menor CE_{50} calculada.

Um outro ponto importante a ser discutido é que o DFB é um inseticida que tem uso regulamentado para agricultura no Brasil, as informações técnicas contidas na bula do produto comercial, Dimilin[®], classificam o produto como sendo apenas

perigoso ao ambiente e de classe toxicológica IV, ou seja, pouco tóxico. Essa classificação deve ser revista, considerando-se que mesmo quando usado na agricultura o produto acaba atingindo ambientes aquáticos, e possui elevada toxicidade para *D. magna*, organismo de importância ecológica significativa.

4.7. Influência do sedimento na biodisponibilidade

Nos resultados obtidos nos ensaios toxicológicos na presença de sedimento verificou-se que o mesmo causou diminuição significativa da toxicidade para as três espécies avaliadas (*D. magna*, *P. reticulata* e *L. minor*) (Tabela 6). O sedimento reduziu a biodisponibilidade do DFB na água em 169,6 % no teste com *D. magna*; 82,8% no teste com *P. reticulata* e em 57,9%, com a *L. minor* na comparação com os valores de CE_{50} e CL_{50} calculados.

A presença do sedimento influenciou de maneira significativa na diminuição da toxicidade do inseticida DFB para *D. magna*, *P. reticulata* e *L. minor*, reduzindo a biodisponibilidade do DFB na água dos ensaios. Provavelmente, a adsorção do DFB ao sedimento com o passar do tempo, diminuiu a biodisponibilidade do mesmo na água, o que proporcionou o aumento significativo nos valores das CE_{50} e CL_{50} . Jonsson e Maia (1999) relatam que, na maior parte dos estudos, o sedimento é capaz de influenciar na toxicidade aguda (ou na bioconcentração) de agentes químicos. Dessa forma, a redução de efeito é provocada pela adsorção do produto ao material particulado que, por sua vez, diminui a biodisponibilidade para os organismos-teste.

Arauco et al. (2005) realizaram estudos ecotoxicológicos com três espécies de daphnias (*D. magna*, *D. similis* e *D. Laevis*) para avaliar o potencial tóxico do inseticida organofosforado triclorfon (usado na agricultura e piscicultura) e do sulfato de cobre na presença ou ausência de sedimento. Verificaram que a presença de sedimento diminuiu a toxicidade de ambos os produtos utilizados para as três espécies de daphnias.

O sedimento é um dos compartimentos mais importantes do ecossistema aquático, sendo responsável pela regulação da dinâmica de compostos químicos no corpo hídrico incluindo nutrientes, poluentes entre outros que atingem esses ambientes. O sedimento é de extrema importância para populações zooplanctônicas que habitam locais profundos de rios, lagos e oceanos, pois

utilizam das partículas orgânicas para se alimentarem, essas partículas que, muitas vezes, estão carregadas de compostos tóxicos que podem ser letais para tais populações (Azevedo e Chasin, 2003). Para os organismos com hábitos de sobrevivência em superfície, com o *P. reticulata*, a presença do sedimento demonstrou-se foi muito eficiente na redução da biodisponibilidade do inseticida para a espécie, o que diminuiu significativamente a toxicidade do meio para o peixe.

Um outro resultado evidente é que a presença do sedimento não só diminuiu a toxicidade do meio com o DFB, mas também favoreceu o crescimento da macrófita. A diminuição da toxicidade possivelmente ocorreu devido à redução da biodisponibilidade do inseticida em decorrência de sua adsorção às partículas do sedimento (Jonsson e Maia, 1999). O aumento relativo da taxa de crescimento em função da presença do sedimento, provavelmente se deve à grande disponibilidade de nutrientes vegetais presentes no meio, que permitiu o aumento do crescimento da macrófita, em relação ao teste realizado na ausência de sedimento.

Nos resultados obtidos em relação à presença de sedimento para o peixe e macrófita, observou-se de forma clara a importância desse componente para o ecossistema aquático. Embora o DFB apresente baixa toxicidade, a presença do sedimento aumentou significativamente os valores das CL_{50} e CE_{50} . Este resultado adquire maior grau de importância se ao invés do inseticida fosse um herbicida, que normalmente é tóxico para plantas aquáticas. O sedimento atuou como uma grande camada de imobilização parcial ou definitiva desses contaminantes, permitindo que as plantas sobrevivessem em tais situações adversas.

5 CONCLUSÃO

O diflubenzuron classifica-se quanto à toxicidade aguda como extremamente tóxico para *D. magna* e não-tóxico para *P. reticulata* e *L. minor*.

Quanto ao risco ambiental, segundo o critério adotado neste estudo, o diflubenzuron tem risco com alto efeito adverso agudo para o microcrustáceo e risco com nenhum efeito adverso agudo para o peixe e macrófita.

A presença do sedimento reduz significativamente a toxicidade do meio aquático contaminado com o diflubenzuron, porque possivelmente reduz a biodisponibilidade do inseticida na água.

O uso do diflubenzuron em pisciculturas deve ser restrito a banhos terapêuticos, diluído em quantidades restritas de água, pois o produto causa desequilíbrio das cadeias biológicas do ecossistema aquático, e pode reduzir ou eliminar populações de daphnídeos, que são sensíveis.

O uso restrito a banhos dos peixes parasitados pode ser recomendado, pois o diflubenzuron na dose de 2 mg.L⁻¹ não causa efeitos tóxicos agudos à peixes e macrófitas aquáticas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de ensaio com peixes**. Segunda Edição, 19 p., 2004.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Água – Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis claus*, 1876 (Cladocera, Crustácea) – Método de Ensaio**. 16p. 1993.
- Ali, A. e Mulla, M.S. Impact of the insect growth regulator Diflubenzuron on invertebrates in a residential-recreational lake. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v.7, p.483, 1978.
- 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*. **Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente**, v.15, p.55-64, 2005.
- Azevedo, F.A.; Chasin, A.A.M. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. São Carlos: Editora Rima, São Paulo, 2003, 340 p.
- Boesten, J.J.T.I.; Köpp, H.; Adriaanse, P.I.; Brock, T.C.M.; Forbes, V.E. Conceptual model for improving the link between exposure and effects in the aquatic risk assessment of pesticides. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.66, p.291-308, 2007.
- Boock, M.V.; Machado-Neto, J.G. Estudos sobre a toxicidade aguda do oxicloreto de cobre para o peixe *Poecilia reticulata*. **B. Inst. Pesca**, v.31, n.1, p.29-35, 2005.
- Boock M.V.; Zorzenon F.J.; Farias A.A.; Silva E.A.; Almeida S.B.B. Toxicidade aguda do inseticida metoprene, para os peixes *Brachydanio rerio* (paulistinha) e *Poecilia reticulata* (lebiste). **Arq. Inst. Biol.**, v.7, p.307-312, 2004.

- Boonyawanich, S.; Kruatrachue, M.; Upatham E.S.; Soontornchainaksaeng, P. Pokethitiyook, P.; Singhakaew, S. The effect of carbamate insecticide on the growth of three aquatic plant species: *Ipomoea aquatica*, *Pistia stratiotes* e *Hydrocharis dubia*. **Science Asia**. v.27, p.99-104, 2001.
- Bouboulis, D.; Athanassopoulou, F.; Tyrpenou, A. Experimental treatments with diflubenzuron and deltamethrin of sea bass, *Discentrrchus labrax* L., infected with the isopod, *Ceratothoa oestroides*. **J. Appl. Ichthyol.**, v. 20, p. 314-317, 2004.
- Buikema, A.L.; Sherberguer, S.R. **Daphnia**. Carolina Tips, v.15, n.10, p.1-5, 1977.
- Burka, J.F.; Hammel, K.L.; Horseberg, T.E.; Johnson, G.R.; Rainnie, D.J.; Speare, D.J. Drugs in salmonid aquaculture – A review. **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, v.20, p.333-349, 1997.
- Campos, J.L. A falta de produtos registrados para uso em aquicultura no Brasil – Uma brecha para a imposição de barreiras comerciais e risco para os consumidores. **Panor. Aquic.**, Jan/Fev 2005.
- Cedergreen, N.; Streibig, J.C.; Spliid, N.H. Sensitivity of aquatic plants to the herbicide metsulfuron – methyl. **Environ. Saf.**, v.57, p.153-161, 2004.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos**, volume I, São Paulo, 1999, p.1-61.
- CETESB. **Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos. Água – teste de toxicidade aguda com peixes – parte I – sistema estático**, volume II, São Paulo, 1999, p.1-29.
- Chastinet, C.B.A.; Silva, E.M. Comparação da sensibilidade de duas linhagens de *Lemna minor* ao cloreto de sódio (NaCl) como substância de referência. In.: **Ecotoxicologia: Perspectivas para o século XXI.**, p.557-566, 2000.
- Chhabra, R.S. et al. Toxicity of p-cloroaniline in rats and mice. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.28, n.10, p.717-722, 1990.
- Chhabra, R.S. et al. Carcinogenecy of p-cloroaniline in rats and mice. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.29, n.2, p.119-124, 1991.
- Clément, B.; Zaid, S. A new protocol to measure the effects of toxicants on the daphnids-algae interactions. **Chemosphere**, v.55, p.1429-1438, 2004.

- Costello, M.J.; Grant, A.; Davies, I.M.; Cecchini, S.; Papoutsoglou, S.; Quigly, D.; Saroglia, M. The control of chemicals used in Europe. **J. Appl. Ichthyol.**, v.17, p.173-180, 2001.
- Dalu, J.M.; Ndamba, J. Duckweed based wastewater stabilization ponds for wastewater treatment (a low costo technology for small urban areas in Zimbabwe). **Phys. Chem Earth**, v.28, p.1147-1160, 2003.
- Davies, I.M.; Rodger, G.K.; Redshaw, J.; Stagg, R.M. Targeted environmental monitoring for the effects of medicines used to treat sea-lice infestation on farmed fish. **ICES Journal of Marine Science**, v.58, p.477-485, 2001.
- De la Vega Salazar, M.Y.; Tabche, L.M.; Garcia, C.M. Bioaccumulation of methyl parathion and its toxicology in several species of the freshwater community in Ignacio Ramírez Dam in Mexico. **Ecotoxicol Environ Saf** v.38, p.53-62, 1997.
- Dirilgen, N.E.; Ince, N. Inhibition effect of the anionic surfactant SDS on duckweed, *Lemna minor* with considerations of growth and accumulation. **Chemosphere**, v.31, n.9, p.4185-4196, 1995.
- Draredja, B. H.; Soltani, N. Effects of diflubenzuron on growth and glutathione in mosquito fish (*Gambusia affinis*). **Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet**, v.66, p.857-862, 2001.
- Ellgaard, E.G.; Barber, J.T.; Tiwari, S.C.; Friend, A.L. An analysis of the swimming behaviour of fish exposed to the insect growth regulators, methoprene and diflubenzuron. **Mosq. News**, v.39, n.2, p.311, 1979.
- FAO. Revised guidelines on environmental criteria for the registration of pesticides 1989.
- Fernández-Casalderrey, A.; Ferrando, M.D.; Andreu-Molinder, E. Effect of sublethal concentrations of pesticides on the feeding behavior of *Daphnia magna*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.27, p.82-89, 1994.
- Fisher, S. A.; Hall, L. W. Environmental concentrations and aquatic toxicity data on diflubenzuron (Dimilin). **Critical reviews in toxicology**, v.22, n.1, p.45-79, 1992.
- Frankart, C.; Eullaffroy, P.; Vernet, G. Comparative effects of four herbicides on non-photochemical fluorescence quenching in *Lemna minor*. **Environ. Experim. Bot.** v.49, p.159-168. 2003.

- 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.
- Fujimoto, R.Y.; Martins, M.L.; Moraes, F.R.; Onaka, E.M. Utilização do diflubenzuron no controle de crustáceos parasitos de piauçu, *Leporinus macrocephalus*. Efeitos paraticida e parâmetros hematológicos. **Anais do XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, 133p. 1999.
- Giesy, J.P.; Hoke, R.A. Freshwater sediment quality criteria: Toxicity bioassessment. In **Sediments: Chemistry and Toxicity of In-Place Pollutants**, ed. R. Baudo, J. Giesy & H. Muntau. Lewis Publishers, Chelsea, MI., p.265-348, 1989.
- Guillard, R.R.L. **Division rates. In: Handbook of phycological methods. Culture methods and Growth measurements.** STEIM, J.R (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, p.345-358, 1979.
- Hamilton, M. A.; Russo, R.C.; Thurston, V. Trimmed Spearman – Karber methodo for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Scien. Technol.**, Iowa, v.7, p.714-719, 1977.
- Herricks, E.S. Princípios gerais de toxicologia. In: Matsui S, Barrett BFD, Banerjee J. (sd) **Diretrizes para o gerenciamento de lagos - gerenciamento de substâncias tóxicas em lagos e reservatórios.** volume 4. ILEC/IIE, São Carlos – SP, 2002, 216p.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Brasil, Ministério do Meio Ambiente. Portaria normativa nº 84, de 15/10/1996. **Estabelecem os procedimentos a serem adotados junto ao IBAMA para efeito de registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental (PPA) de agrotóxicos, seus componentes e afins**, 1996.
- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Brasil, Ministério do Meio Ambiente. Avaliação da toxicidade aguda para peixes. In: **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos.** Brasília, p.20-32, 1987.
- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Brasil, Ministério do Meio Ambiente. Avaliação da toxicidade aguda para *Daphnia*

- similis*. In: **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos**. Brasília, 14p., 1987.
- Jonsson, C.; Maia, A. Toxicidade dos herbicidas clamazine e quinclorac para o invertebrado aquático *Daphnia similis* na presença e na ausência de sedimento. **Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente**, v.9, p.145-153, 1999.
- Kingsbury, P.; Sundaram, K.M.S.; Holmes, S.; Nott, R.; Kreutzweiser, D. Aquatic fate and impact studies with Dimilin, Canadian Forest Service, Saut Ste. Marie, Ontario, 1987.
- 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.
- Kotaka, E.T.; Zambrone, F.A.D. **Contribuições para a construção de diretrizes de avaliação do risco toxicológico de agrotóxicos**. Campinas: International Life Sciences Intitute do Brasil, 2001, 160p.
- Kubitza, F. e Kubitza, L.M.M. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. 3. ed. Jundiaí: Copyright, 1999. 96p.
- Landis, W.G.; Matthews R.A.; Mattheuws, G.B. The Layered and historical nature of ecological systems and the risk assessment of pesticides. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.15, n.4, p.432-440, 1996.
- Larini, L. **Toxicologia**. São Paulo: Editora Manole, 2ª Edição, 1993, 281p.
- Mabilia, R.G. e Souza, S.M.G. Efeito do tratamento com Diflubenzuron na hematologia de jundiás, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae) infestados por *Lernaea cyprinacea* (Copepoda) em banhos de imersão de 24 horas. **Acta Sci. Biol. Sci.**, v.28, n.2, p.159-163, 2006.
- Mabilia, R. G; Souza, S. M. G; Schiffino, L. Uso do Diflubenzuron na aquacultura no tratamento de ectoparasitoses – restrições de uso. **Anais do Congresso Estadual de Medicina Veterinária**, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2004.
- Macek, J.K. Aquatic Toxicology: Fact or Fiction? **Environ Health Perspect.**, v.34, p.159-163, 1980.
- Mangas-Ramírez, E.; Sarma, S.S.S.; Nandini, S. Combined effects of algal (*Chlorella vulgaris*) density and ammonia concentration on the population dynamics of *Ceriodaphnia dubia* and *Moina macrocopa* (Cladocera). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.51, p.216-222, 2004.

- Marrs, K. The functions and regulation of glutathione S-transferase in plants. **Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.47, p.127-158, 1996.
- Martins, F.; Silva, I.G. Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes Aegypti* (Linnaeus, 1762) (Díptera, Culicidae). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.37, n.2, p.135-138, 2004.
- Miretzky, P.; Saralegui, A.; Cirelli, A.F. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). **Chemosphere**, v. 57, p.997-1005, 2004.
- Mitsou, K.; Koulianou, A.; Lambropoulou, D.; Pappas, P.; Albanis, T.; Lekka, M. Growth rate effects, responses of antioxidant enzymes and metabolic fate of the herbicide Propanil in the aquatic plant *Lemna minor*. **Chemosphere**, v.62, p.275-284, 2006.
- Nebeker, A. V.; McKinney, P.; Cairns, M.A. Acute and chronic effects of Diflubenzuron (dimilin) on freshwater fish and invertebrates. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.2, p.239, 1983.
- Nimmo, W.B.; de Wilde, P.C.; Verloop, A. The degradation of diflubenzuron and its chief metabolites in soil. In: Hydrolytic cleavage of diflubenzuron. **Pestic. Sci.**, v.15, 574p., 1984.
- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. ***Lemna sp.* Growth Inhibition Test**. In: GUIDELINE for testing of chemicals, 2002.
- Onaka, E.M. **Infestação experimental por *Dolops carvalhoi* (Crustácea: Branchiura) em peixes tropicais e seu controle com diflubenzuron na ração**. Tese de doutorado apresentado a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Jaboticabal, São Paulo, 2005, 64f.
- Plaa, G.L. Present status: toxic substances in the environment. Can. **J. Physiol. Pharmacol.**, v.60, p.1010-1016, 1982.
- Rand, G.M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, environmental fate and risk assessment**. Second Edition. Taylor & Francis, Washington, DC, 1995, 1125p.
- Rand, G.M.; Petrocelli, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**, New York: Hemisphere, 665p., 1985.
- Rebach, S.; French, D.P. Effects of Dimilin on the Blue Crab, *Callinectes sapidus*, in Shallow-Water Habitats. **Estuaries**, v.19, n.2, p.279-287, 1996.

- Savitz, J.D.; David, A.; Smucker, R. A. Toxic effects of the insecticide diflubenzuron (dimilin®) on survival and development of nauplii of the estuarine copepod, *Eurytemora affinis*. **Mar. Environ. Res.**, v.37, p.297-312, 1994.
- Schaefer, C. H.; Dupras, E. F; Stewart, R. J; Davidson, L. W; Colwell, A. E. The accumulation and elimination of diflubenzuron by fish. **Bull. Environm. Contam. Toxicol.**, v.21, p.249-254, 1976.
- Schalch, S.H.C; Belo, M.A.A.; Soares, V.E.; Moraes, J.R.E.; Moraes, F.R. Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustácea: Branchiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infectados. **Acta. Sci. Anim. Sci.** v.27, n.2, p.297-302, 2005.
- Scholz, T. Parasites in cultured and feral fish. **Vet. Parasitol.**, v.84, p.317-335, 1999.
- Selvi, M.; Sarikaya, R.; Erkoç, F.; Koçak, O. Investigation of acute toxicity of chlorpyrifos-methyl on guppy *Poecilia reticulata*. **Chemosphere**, v.60, p.93-96, 2005.
- SETAC. **Aquatic Dialogue Group: Esticide Risk Assessment and Mitigation.** Society of Environmental Toxicology and Chemistry: Pensacola, Flórida, 1994, 220p.
- Sobrero, M.C.; Rimoldi, F.; Ronco, A.E. Effects of the glyphosate active ingredient and a formulation on *Lemna gibba* L. at different exposure levels and assessment endpoints. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v.79, p.537-543, 2007.
- Solomon, K.R. **Avaliação de riscos ecotoxicológicos dos produtos fitossanitários.** Centro de Toxicologia. Universidade de Guelph. 1996, 52p.
- Solomon, K.R. **Overview of recent developments in ecotoxicological risk assessment. Risk Analysis**, v.16, n.5, p.627-633, 1996.
- Stavola, A.M.; Graven, H. Terrestrial ecological risk assessment of pesticides in the United States. In. Greig-Smith PW, Becker H, Edwards PJ, Heimbach F. **Ecotoxicology of earthworms.** Intercept, London, p.177-184, 1992.
- Tanner, D. K.; Moffet, M.F. Effects of diflubenzuron on the reproductive success of bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.14, n.8, p.1345-1355, 1995.
- Thatcher, V.E.; Brites-Neto, J.B. Diagnóstico, prevenção e tratamento de enfermidades de peixes neotropicais de água doce. **Rev. Bras. Med. Vet.**, Rio de Janeiro, v.16, n.3, p.111-128, 1994.

- Tomlin, C.D.S. **The Pesticida Manual. A Word Compendium**. British Crop Protection Council, 11 Ed. 1997, 1606p.
- Tong, Z.; Hongjun, J. Use of duckweed (*Lemna minor* L.) growth inhibition test to evaluate the toxicity of acrylonitrile, sulphocyanic sodium and acetonitrile in China. **Environ. Pollu.** v.98, n.8, p.143-147, 1997.
- Truhaut, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.1, p.151-173, 1977.
- USEPA. **Guidelines for Ecological Risk Assessment**. States Environmental Protection Agency, Washington D.C., 171p, 1998.
- USEPA. **Prevention Pesticides and Toxic Substances**. Unites States Environmental Protection Agency, 1997. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/reds/factsheets/0144fact.pdf>. Acesso em: 08 Fev. 2006.
- Urban, D.J.; Cook, N.J. Hazard Evaluation Division - **Standard Evaluation Procedure Ecological risk assessment**. Washington. USEPA Publication 540/9-86-001, 1986.
- Villarroel, M. J.; Sancho, E.; Ferrando, M.D.; Andreu, E. Acute, chronic and sublethal effects of the herbicides propanil on *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v.53, p.857-864, 2003.
- Villarroel, M.J.; Ferrando, M.D.; Sancho, E.; Andreu, E. *Daphnia magna* feeding behavior after exposure to tetradifon and recovery from intoxication. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.44, p.40-46, 1999.
- Wang, W.; Freemark K. The use of plants for environmental monitoring and assessment. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.30, p.289-301, 1995.
- Wendt-Rasch L.; Van den Brink P.J.; Crum S.J.H.; Woin P. The effects of pesticide mixture on aquatic ecosystems differin in trophic status: responses of the macrophyte *Myriophyllum spicatum* and the periphytic community. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v.57, p.383-398, 2004.
- WHO-United Environmental Programme International Labour Organisation. IPCS International Programme on Chemical Safety, 1995. Disponível em: www.who.int/pdf Acesso em 08/02/2006.
- Yilmaz, M.; Gül, A.; Erbash, K. Acute toxicity of alpha-cipermethrin to guppy (*Poecilia reticulata*, Pallas, 1859). **Chemosphere**, v.56, p.381-385, 2004.

Zagatto, P.A. e Bertoletti, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações.**

Editora Rima, São Carlos, 2006, 478p.

Zucker, E. Hazard Evaluation Division - **Standard Evaluation Procedure Acute**

toxicity test for freshwater fish. Washington. USEPA Publication 540/9-85-006
1985.