



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP



**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA E RISCO
AMBIENTAL DOS INSETICIDAS UTILIZADOS NO
CONTROLE DA LARVA DE *Aedes aegypti* PARA
Daphnia magna, *Lemna minor* E PEIXES**

Flavia Renata Abe - Bióloga

Jaboticabal – SP
2012

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

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA E RISCO
AMBIENTAL DOS INSETICIDAS UTILIZADOS NO
CONTROLE DA LARVA DE *Aedes aegypti* PARA
Daphnia magna, *Lemna minor* E PEIXES**

Flavia Renata Abe

Orientador: Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto

Co-orientador: Dr. Claudinei da Cruz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Biologia de Organismos Aquáticos, Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal – SP
2012

A138a Abe, Flavia Renata
Avaliação ecotoxicológica e risco ambiental dos inseticidas utilizados no controle da larva de *Aedes aegypti* para *Daphnia magna*, *Lemna minor* e peixes / Flavia Renata Abe. - - Jaboticabal, 2012
xiv, 130 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2012
Orientador: Joaquim Gonçalves Machado Neto
Banca examinadora: Marco Antônio de Andrade Belo, Robinson Antonio Pitelli
Bibliografia

1. Ecotoxicologia. 2. Larvicidas. 3. Organismos não alvos. I. Título. II. Jaboticabal- Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.09

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de Jaboticabal.
e-mail: flavia_abe@yahoo.com.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA E RISCO AMBIENTAL DOS INSETICIDAS UTILIZADOS NO CONTROLE DA LARVA DE *Aedes aegypti* PARA *Daphnia magna*, *Lemna minor* E PEIXES

AUTORA: FLAVIA RENATA ABE


ORIENTADOR: Prof. Dr. JOAQUIM GONÇALVES MACHADO NETO

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. CLAUDINEI DA CRUZ

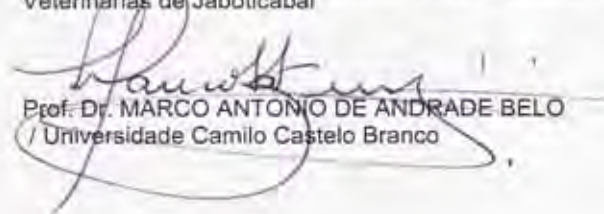
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Aqüicultura , pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOAQUIM GONÇALVES MACHADO NETO

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


Prof. Dr. ROBINSON ANTONIO PITELLI

Departamento de Biologia Aplicada À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO

Universidade Camilo Castelo Branco

Data da realização: 17 de julho de 2012.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

FLAVIA RENATA ABE – Filha de Mauro Abe e Clarice Aparecida Capeti Abe, nascida no município de Ribeirão Preto - SP, em 17 de setembro de 1986. Bióloga, graduada pela Universidade Estadual Paulista na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, campus de Jaboticabal, em 2008. Estagiou no Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária. Realizou o trabalho de Iniciação Científica no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, sendo bolsista FAPESP. Mestranda em Aquicultura pelo CAUNESP – campus de Jaboticabal, com início em março de 2010, sendo bolsista CNPq. Participou e apresentou trabalhos em congressos científicos. Obteve o título de mestre em Aquicultura em julho de 2012.

SUMÁRIO

INDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
DEDICATÓRIA.....	2
AGRADECIMENTOS	3
APOIO FINANCEIRO.....	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
I. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	8
II. REVISÃO DE LITERATURA	10
1. Aspectos ecotoxicológicos dos larvicidas	10
2. Diflubenzuron (DFB)	12
3. Temefós	13
4. Testes de toxicidade para organismos aquáticos	14
5. Sedimento.....	15
6. Avaliação de risco ambiental	15
7. Análise de resíduo	16
8. Lesões histológicas em peixes	17
III. OBJETIVOS	19
IV. CAPÍTULO I.....	20
Avaliação ecotoxicológica dos larvicidas diflubenzuron e temefós para a macrófita <i>Lemna minor</i>	20
INTRODUÇÃO.....	20
MATERIAL E MÉTODOS	22
1. Cultivo dos organismos-testes.....	22
2. Testes de sensibilidade com substância de referência.....	22
3. Testes preliminares com os larvicidas	23
4. Testes definitivos de toxicidade aguda com os larvicidas.....	24
5. Testes de toxicidade crônica com os larvicidas	25
6. Sedimento	26
7. Cálculo da CI50, CENO, CEO e VC	27

8. Risco de intoxicação ambiental	28
9. Forma de análise dos resultados.....	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
V. CAPÍTULO II.....	51
Avaliação ecotoxicológica dos larvicidas diflubenzuron e temefós para peixes	51
INTRODUÇÃO.....	51
MATERIAL E MÉTODOS	52
1. Criação e aclimação dos organismos-testes	53
2. Testes de sensibilidade com a substância de referência.....	54
3. Testes preliminares com os larvicidas	54
4. Testes definitivos de toxicidade aguda com os larvicidas.....	55
5. Testes de toxicidade crônica com os larvicidas	56
6. Sedimento	57
7. Cálculo da CL50, CENO, CEO e VC	57
8. Risco de intoxicação ambiental	58
9. Forma de análise dos resultados.....	59
RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
VI. CAPÍTULO III.....	79
Avaliação ecotoxicológica e risco ambiental de diflubenzuron e temefós para <i>Daphnia magna</i>	79
INTRODUÇÃO.....	79
MATERIAL E MÉTODOS	81
1. Cultivo do organismo-teste	81
2. Testes de sensibilidade com substância de referência.....	82
3. Testes preliminares com os larvicidas	83
4. Testes definitivos de toxicidade aguda com os larvicidas.....	83
5. Testes de toxicidade crônica com os larvicidas	84
6. Sedimento	85
7. Cálculo da CE50.....	85

8. Risco de intoxicação ambiental	86
9. Forma de análise dos resultados.....	87
RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
VII. CAPÍTULO IV	97
Determinação de resíduos de diflubenzuron e temefós em águas de bioensaios de tilápia-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	97
INTRODUÇÃO.....	97
MATERIAL E MÉTODOS	99
1. Testes preliminares	99
2. Sedimento	100
3. Validação do método analítico.....	101
4. Determinação do potencial de lixiviação e potencial de transporte	104
RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
CONCLUSÃO	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
VIII. CAPÍTULO V	114
Lesões histológicas de tilápias-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas aos larvicidas diflubenzuron e temefós	114
INTRODUÇÃO.....	114
MATERIAL E MÉTODOS	115
1. Testes preliminares	116
2. Histopatologia de brânquia e fígado de <i>O. niloticus</i>	116
RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
1. Brânquias	117
2. Fígados.....	119
CONCLUSÃO	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
IV. CONCLUSÃO GERAL.....	123
X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos da colonização da macrófita <i>L. minor</i>	22
Figura 2. Aspectos de <i>L. minor</i> no cultivo e aclimação.	23
Figura 3. Aspectos da montagem do teste preliminar de toxicidade aguda de DFB para <i>L. minor</i>	24
Figura 4. Aspectos do teste de toxicidade aguda de temefós na ausência e presença de sedimento para <i>L. minor</i>	25
Figura 5. Diminuição do número de frondes nos testes de toxicidade aguda da menor para a maior concentração de DFB e temefós para <i>L. minor</i>	30
Figura 6. Número de frondes nos testes de toxicidade aguda na presença de sedimento da menor para a maior concentração de DFB e temefós para <i>L. minor</i>	30
Figura 7. Comparação das médias do número de frondes de <i>L. minor</i> no 7º dia de avaliação.	31
Figura 8. Comparação das médias do número de frondes de <i>L. minor</i> no momento inicial do teste até o 7º dia de avaliação.....	32
Figura 9. Média do crescimento final de frondes ao longo das concentrações nos testes de toxicidade crônica de DFB e temefós para a macrófita <i>L. minor</i>	34
Figura 10. Taxa de crescimento relativa de frondes ao longo das concentrações nos testes de toxicidade aguda na ausência e presença de sedimento para a macrófita <i>L. minor</i>	35
Figura 11. Taxa de crescimento relativa dos testes de toxicidade crônica de <i>L. minor</i> na presença e ausência de sedimento para DFB e temefós.	36
Figura 12. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de DFB entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade aguda sem sedimento para <i>L. minor</i>	38
Figura 13. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de DFB entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade aguda com sedimento para <i>L. minor</i>	39
Figura 14. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de DFB entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade crônica sem sedimento para <i>L. minor</i>	40

Figura 15. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de DFB entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade crônica com sedimento para <i>L. minor</i>	41
Figura 16. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de temefós entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade aguda sem sedimento para <i>L. minor</i>	43
Figura 17. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de temefós entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade aguda com sedimento para <i>L. minor</i>	44
Figura 18. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de temefós entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade crônica sem sedimento para <i>L. minor</i>	45
Figura 19. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de temefós entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade crônica com sedimento para <i>L. minor</i>	46
Figura 20. Exemplares dos peixes <i>O. niloticus</i> e <i>H. eques</i>	53
Figura 21. Aspectos dos testes de toxicidade aguda na ausência e presença de sedimento para <i>H. eques</i>	55
Figura 22. Aspectos do teste de toxicidade crônica para <i>H. eques</i>	56
Figura 23. Aspectos da natação errática de <i>H. eques</i> e <i>O. niloticus</i> na concentração de 22 e 30 mg.L ⁻¹ de temefós, respectivamente, no teste de toxicidade aguda.	60
Figura 24. Comparação das médias de mortalidade de mato grosso com 48 horas de teste agudo.....	62
Figura 25. Comparação das médias de mortalidade de tilápia com 48 horas de teste agudo.....	62
Figura 26. Diminuição total dos pesos dos peixes ao final de 7 dias de teste crônico com DFB ao longo das concentrações (diferença entre a somatória dos pesos iniciais e finais para cada concentração).....	64
Figura 27. Mortalidade total de peixes ao final de 7 dias de teste crônico ao longo das concentrações de temefós.....	65
Figura 28. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de DFB entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade aguda para <i>H. eques</i>	68

Figura 29. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de DFB, na presença de sedimento, entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade aguda para <i>H. eques</i>	69
Figura 30. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de temefós entre os dias de avaliação nos testes de toxicidade aguda para <i>H. eques</i>	70
Figura 31. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de temefós, na presença de sedimento, entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade aguda para <i>H. eques</i>	71
Figura 32. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de DFB, na ausência de sedimento, entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade crônica para <i>H. eques</i>	72
Figura 33. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de DFB, na presença de sedimento, entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade crônica para <i>H. eques</i>	73
Figura 34. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de temefós, na ausência de sedimento, entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade crônica para <i>H. eques</i>	74
Figura 35. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de temefós, na presença de sedimento, entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade crônica para <i>H. eques</i>	75
Figura 36. Exemplar no microcrustáceo <i>Daphnia magna</i>	82
Figura 37. Aspectos da criação de <i>D. magna</i> em BODs climatizadas.	82
Figura 38. Aspectos do controle do teste preliminar de DFB para <i>D. magna</i>	83
Figura 39. Aspectos do teste agudo de DFB na ausência e na presença de sedimento para <i>D. magna</i>	84
Figura 40. Comparação das médias de mortalidade de <i>D. magna</i> com 48 horas de teste.	88
Figura 41. Mortalidade de <i>D. Magna</i> ao final de 7 dias de testes crônicos com DFB e temefós.	91
Figura 42. Cromatogramas dos padrões de 4 ppm de DFB e 8 ppm de temefós	102
Figura 43. Curvas analíticas obtidas para DFB e temefós.	103

Figura 44. Diminuição das concentrações de DFB na água ao longo do tempo em teste agudo na ausência e presença de sedimento.	106
Figura 45. Diminuição das concentrações de DFB na água ao longo do tempo em teste crônico na ausência e presença de sedimento.....	107
Figura 46. Diminuição das concentrações de temefós na água ao longo do tempo em teste agudo na ausência e presença de sedimento	107
Figura 47. Diminuição das concentrações de temefós na água ao longo do tempo em teste crônico na ausência e presença de sedimento.....	108
Figura 48. Fotomicropia de cortes transversais de brânquias de tilápia-do-Nilo ao final do teste de toxicidade aguda com DFB e temefós.	118
Figura 49. Fotomicropia de cortes transversais de fígados de tilápia-do-Nilo ao final do teste de toxicidade aguda com DFB e temefós	120

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Análise física e química do sedimento argiloso.....	27
Tabela 2. Classes dos valores de CI50 de acordo com Zucker (1985).....	27
Tabela 3. Classes dos valores de RQ de acordo com Goktepe et al. (2004).....	28
Tabela 4. Concentrações de inibição média, limites inferiores e limites superiores de NaCl (g.L^{-1}) e dos larvicidas (mg.L^{-1}) nos testes de toxicidade aguda para <i>L. minor</i> e classificação dos larvicidas DFB e temefós de acordo com as classes de Zucker (1985).....	29
Tabela 5. Classificação dos larvicidas quanto ao risco de intoxicação ambiental para <i>L. minor</i> , de acordo com os testes agudos realizados com e sem sedimento.....	33
Tabela 6. Análise física e química do sedimento argiloso.....	57
Tabela 7. Classes dos valores de CL50 de acordo com Zucker (1985).....	58
Tabela 8. Classes dos valores de RQ de acordo com Goktepe et al. (2004).....	59
Tabela 9. Concentrações letais médias, limites inferiores e superiores de KCl (g.L^{-1}) e dos larvicidas (mg.L^{-1}) dos testes de toxicidade aguda para mato grosso e classificação dos larvicidas de acordo com as classes de Zucker (1985).....	60
Tabela 10. Concentrações letais médias, limites inferiores e superiores de KCl (g.L^{-1}) e dos larvicidas (mg.L^{-1}) dos testes de toxicidade aguda para tilápia-do-Nilo e classificação dos larvicidas de acordo com as classes de Zucker (1985).....	61
Tabela 11. Classificação dos larvicidas quanto ao risco de intoxicação ambiental para mato grosso, de acordo com os testes agudos.....	63
Tabela 12. Classificação dos larvicidas quanto ao risco de intoxicação ambiental para tilápia, de acordo com os testes agudos.....	63
Tabela 13. Valores de CENO, CEO e VC (mg.L^{-1}) de testes com mato grosso....	66
Tabela 14. Valores de CENO, CEO e VC (mg.L^{-1}) de testes com tilápia-do-Nilo..	66
Tabela 15. Análise física e química do sedimento argiloso.....	85
Tabela 16. Classes dos valores de CE50 de acordo com Zucker (1985).	86

Tabela 17. Classes dos valores de RQ de acordo com Goktepe et al. (2004).....	87
Tabela 18. Concentrações efetivas médias de NaCl (g.L ⁻¹) e dos larvicidas (µg.L ⁻¹) em testes de toxicidade aguda para <i>D. magna</i> e classificação de Zucker (1985).....	88
Tabela 19. Classificação dos larvicidas quanto ao risco de intoxicação ambiental para <i>D. magna</i> , de acordo com os testes agudos.....	89
Tabela 20. Análise física e química do sedimento argiloso.....	100
Tabela 21. Método utilizado para determinação dos resíduos de DFB e temefós nas águas dos testes.	101
Tabela 22. Validação do método analítico de DFB em água.	103
Tabela 23. Validação do método analítico para temefós em água.....	104
Tabela 24. Classes dos valores de GUS de acordo com Gustafson (1989).	104
Tabela 25. Propriedades físico-químicas do DFB e temefós (Fontes: USEPA, 1998; WAUCHOPE et al. 1992; WHO, 2004).....	105
Tabela 26. Percentualidade da diminuição da concentração inicial de DFB medidas ao final dos testes agudos na ausência e presença de sedimento.....	109
Tabela 27. Percentualidade da diminuição da concentração inicial de DFB medidas ao final dos testes crônicos na ausência e presença de sedimento.....	109
Tabela 28. Percentualidade da diminuição da concentração inicial de temefós medidas ao final dos testes agudos na ausência e presença de sedimento.....	110
Tabela 29. Percentualidade da diminuição da concentração inicial de temefós medidas ao final dos testes crônicos na ausência e presença de sedimento.....	110

*“E a coisa mais divina
Que há no mundo
É viver cada segundo
Como nunca mais...”*

Vinicius de Moraes

Dedico

*À minha família e meus amigos,
que me acompanharam nesta
jornada e me apoiaram para
a realização de um sonho.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me guiado neste caminho, e por me fortalecer nos momentos difíceis, para que eu pudesse desenvolver e finalizar este trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto, pela oportunidade e confiança que colocou em mim, pelas orientações e ensinamentos que ficarão para toda a vida.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Claudinei da Cruz, por acreditar no meu trabalho, e aceitar o desafio de me auxiliar e me co-orientar. A todos os colegas do Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia- NEPEAM, pela colaboração e pelo espaço físico cedido.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP, aos coordenadores Prof^a. Dr^a. Laura Satiko Okada Nakaghi e Sérgio Ricardo Batlouni, aos secretários Veralice Cappatto e David Oliveira Lorente, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / CNPq, pela concessão de bolsa de estudos de mestrado.

À Prof^a. Dr^a. Teresa Cristina Ribeiro Dias Koberstein do setor de Tilapicultura do CAUNESP, pelas tilápias cedidas para a realização do experimento, e ao funcionário Marcio Alves dos Santos agradeço a ajuda para capturá-las e a paciência de me escutar.

Aos funcionários Gilson e Jurandir (Bizu) do Departamento de Fitossanidade, pela ajuda na coleta do sedimento, agradeço o bom humor e a disposição em sempre querer ajudar.

Às minhas amigas de laboratório Márcia Macri, Carla de Barro Sant'Anna, Manuela Teodoro de Oliveira, Melina Espanhol Soares, Juliana Trevisoli Donadon e Larissa Garcia Veiga Rodrigues, pelo companheirismo, risadas e todo o auxílio recebido, e em especial à Ana Carla Coleone e Angela Aparecida Machado, por aceitar que eu dividisse os meus momentos felizes e tristes, e receber palavras de conforto.

Aos meus melhores amigos de faculdade Flavia Barbosa Soares (Barrosa), Jhoanne Hansen (Kuika), Fernanda Travaini de Lima (Foka), Cecília Anatriello Boareto (Ciça) e Lucas Detogni Simi (Piri), que foram essenciais para a minha vida, por todas as risadas, jantares, festas, trabalhos, pela amizade e carinho que guardo comigo para sempre. Agradeço em especial à minha "gema" Fernanda, pelas noites desperdiçadas ao meu lado, me auxiliando em dias de coleta.

Às minhas amigas-irmãs Gisele Donadeli, Paula Sbrissa e Mariana Cardoso, que aturaram a minha ausência durante esta jornada, e mesmo assim me apoiaram e me desejaram sempre o melhor.

À minha família, que me apoiou e acreditou no meu sonho, e me ajudou a torná-lo real.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

Muito Obrigada!

APOIO FINANCEIRO

CNPq, Bolsa de Mestrado, Processo nº 556469/2010-0.

RESUMO

O uso dos larvicidas temefós e diflubenzuron (DFB) na agricultura, aquicultura e combate a vetores de doenças pode acarretar desequilíbrios ambientais, e a ocorrência destes efeitos são analisados por estudos ecotoxicológicos e avaliações de risco ambiental. Objetivou-se: i) classificar os larvicidas DFB e temefós pela toxicidade aguda e crônica para os peixes tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e mato grosso (*Hyphessobrycon eques*), para a macrófita *Lemna minor* e para microcrustáceo *Daphnia magna*; ii) avaliar o efeito do sedimento na biodisponibilidade dos larvicidas; iii) classificar os larvicidas quanto ao risco ambiental em ecossistema aquático; iv) avaliar a concentração de resíduos dos larvicidas nas águas dos testes agudos e crônicos de tilápia-do-Nilo, na presença e ausência de sedimento; v) avaliar o potencial de lixiviação e de escoamento superficial de ambos os larvicidas e vi) verificar os efeitos tóxicos dos larvicidas no fígado e brânquia de tilápias-do-Nilo expostas aos testes de toxicidade aguda. O DFB classifica-se como praticamente não-tóxico para *L. minor*, ligeiramente tóxico para *H. eques* e *O. niloticus*, e extremamente tóxico para *D. magna*. O temefós é ligeiramente tóxico para *L. minor*, moderadamente tóxico para *H. eques* e *O. niloticus* e extremamente tóxico para *D. magna*. A exposição dos peixes às baixas concentrações de DFB por longos períodos causa redução no crescimento dos peixes, e o temefós causa mortalidade. O temefós causa redução na taxa de crescimento relativa de *L. minor* expostas às doses subletais. Ambos os larvicidas causam mortalidade para *D. magna* em testes crônicos. A presença de sedimento reduz a biodisponibilidade dos larvicidas nas águas de testes com *L. minor*. O DFB classifica-se como de baixo risco de intoxicação ambiental e o temefós como de médio risco para *L. minor* e para os peixes. Para *D. magna* os larvicidas são de alto risco ambiental. Ambos os larvicidas possuem médio potencial de transporte superficial, e não sofrem lixiviação, e as concentrações diminuem ao longo dos testes de toxicidade aguda e crônica, na ausência e presença de sedimento. DFB e temefós causam lesões histológicas em brânquias e fígados de tilápias-do-Nilo expostas aos larvicidas.

PALAVRAS-CHAVE

Ecotoxicologia, larvicidas, organismos não alvos.

ABSTRACT

The use of the pesticide temephos and diflubenzuron (DFB) in agriculture, aquaculture and in the disease vectors control may cause environmental disequilibrium, and these effects are analysed for ecotoxicological studies and environmental risk assessments. This study aimed to: i) classify the pesticides DFB and temephos by the acute and chronic toxicity to the fishes tilapia (*Oreochromis niloticus*) and mato grosso (*Hyphessobrycon eques*), the macrophyte *Lemna minor* and the microcrustaceans *Daphnia magna*; ii) evaluate the effect of sediment on the pesticides bioavailability; iii) classify the pesticides by the environmental risk in the aquatic ecosystem; iv) evaluate the pesticides residues concentrations in the water during acute and chronic toxicity tests for tilapia; v) evaluate the potential for leaching and runoff of both pesticides; vi) verify the toxic effects of the pesticides in the liver and gill of tilapia exposed to the acute toxicity tests. The DFB is classified as practically nontoxic to *L. minor*, slightly toxic to *H. eques* and *O. niloticus*, and extremely toxic to *D. magna*. Temephos is slightly toxic to *L. minor*, moderately toxic to *H. eques* and *O. niloticus*, and extremely toxic to *D. magna*. The longer exposure of fishes at low concentrations of DFB decreases the growth of organisms, and temephos causes mortality. The temephos decreases the relative growth rate of *L. minor* exposed to sublethal doses. Both pesticides cause mortality to *D. magna* in chronic tests. The presence of sediment decreases the bioavailability of the pesticides in water of *L. minor* tests. DFB is classified as low environmental risk and temephos as medium risk to *L. minor* and fishes. To fishes, DFB is low risk, and temephos is medium risk. To *D. magna*, the larvicidas were high risk. Both larvicidas have medium potential for runoff and do not leach, and the concentrations decrease over the acute and chronic tests, with and without sediment. Temephos and DFB cause histological lesions in gills and livers of tilapias exposed to the larvicidas.

KEY-WORDS

Ecotoxicology, larvicides, non-target organisms.

I. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Atualmente alguns inseticidas são empregados na agricultura, aquicultura e programas de saúde pública, dentro os quais se destacam os reguladores de crescimento de insetos ou IGR (insect growth regulator). O composto 1 – (4 – clorofenil) – 3 – (2,6 – difluorobenzoil) uréia, diflubenzuron (DFB), é um IGR derivado de benzoilfeniluréia, que atua como ovicida e larvicida (SILVIA e MENDES, 2002), empregado na agricultura para controlar pragas em culturas de milho, tomate, algodão, trigo e citros (USEPA, 1997) e na piscicultura, para o controle de ectoparasitoses de peixes (FUJIMOTO et al. 1999).

O DFB também é eficiente no controle de larvas de *Aedes aegypti* (MARTINS e SILVA, 2004; SILVIA e MENDES, 2007; CHEN et al. 2008; SECCACINI et al. 2008). Em programas de saúde pública, o DFB é aplicado em recipientes criadouros de larvas de mosquito da dengue nos ambientes urbanos. Da mesma forma que no uso agrícola e em aquicultura, o uso urbano do DFB contém um determinado risco de intoxicação aguda dos organismos não alvos que possam ser atingidos. Com a dinâmica ambiental, é passível que o DFB aplicado em saúde pública atinja a rede hidrográfica local e intoxique os organismos aquáticos.

Os estudos dos efeitos do DFB sobre os organismos aquáticos e a interação com o meio ainda são escassos. Assim, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1997) recomenda o uso restrito do DFB devido à falta de informações sobre os efeitos adversos em invertebrados aquáticos.

Outro inseticida importante para o controle de pragas em programas de saúde pública é o temefós (0,0, 0',0'-tetrametil-0, 0'-tio di - (p-fenileno) bis tiofosfato), um larvicida recomendado pelo Ministério da Saúde para o controle de larvas do mosquito da dengue. É um inseticida do grupo dos organofosforados usado para controle de mosquitos (LEE e SCOTT, 1989). A ecotoxicidade do temefós para peixes e invertebrados não alvos também é pouco estudada.

O constante uso destes inseticidas eleva a possibilidade de desequilíbrios ambientais quando atingem os corpos hídricos por meio de escoamento superficial e/ou lixiviação. O contato de organismos aquáticos não alvos com os larvicidas pode desencadear intoxicações agudas e crônicas, e provocar desequilíbrios ambientais.

Diante da possibilidade da ocorrência de desequilíbrios ambientais decorrente do uso dos larvicidas DFB e do temefós em saúde pública, há a necessidade de estudos de avaliação da ecotoxicidade e de risco ambiental. Tais estudos são fundamentais para estabelecimento de necessidade e seleção de medidas mitigadoras, para controlar e/ou minimizar os efeitos adversos sobre os ecossistemas. Assim, justificam-se estes estudos ecotoxicológicos e de avaliação de risco de intoxicação ambiental decorrente dos usos de DFB nas áreas de agricultura, aquicultura e saúde pública e do temefós em saúde pública.

II. REVISÃO DE LITERATURA

1. Aspectos ecotoxicológicos dos larvicidas

O uso dos inseticidas na agricultura, aquicultura e combate a vetores de doenças aumenta a cada ano. Em 2006, o Brasil foi classificado como o segundo maior consumidor de inseticidas do mundo (ANVISA, 2006).

No Brasil, a aquicultura se expandiu nos últimos anos, sendo alvo de muitos estudos sobre práticas de manejo. Vários prejuízos econômicos a esta atividade foram relatados devido às práticas de manejo inadequadas, alta densidade populacional, o não-controle da qualidade da água, o que deixa os animais vulneráveis às enfermidades (MABILIA e SOUZA, 2006). Apesar de existirem tratamentos para combater possíveis enfermidades com o uso de inseticidas, no Brasil ainda não existe uma legislação que fiscalize o uso destes químicos na aquicultura (CAMPOS, 2005). Devido a não recomendação dos inseticidas para o setor aquícola, o uso na piscicultura de produtos não registrados para este fim leva a aplicações de doses exageradas no combate às

doenças. Poucos são os estudos realizados para avaliar a toxicidade dos inseticidas para os animais alvos e não alvos.

Outra finalidade em que os inseticidas são empregados é no combate a vetores de doenças. Uma destas doenças que se destaca em âmbito mundial é a dengue (WHO, 2002). Esta doença é transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* seu principal vetor. Em locais de alta incidência e transmissão da dengue, o controle desta doença é realizado por meio do controle químico, com aplicações de inseticidas larvicidas e adulticidas.

O uso frequente e inadequado de determinado inseticida, tanto na agricultura, aquicultura, ou combate a vetores de doenças, pode acarretar resistência dos organismos a tais substâncias químicas (PAIVA, 2006). A resistência aos inseticidas compromete diretamente a eficácia do controle químico.

No Brasil, o controle químico do vetor *Aedes aegypti* é realizado com o larvicida temefós desde 1967 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1968). A resistência do vetor ao larvicida foi relatada nos Estados de Goiás (MARCORIS et al. 1995), Rio de Janeiro, Alagoas, Sergipe (BRAGA et al. 2004), Ceará (LIMA et al. 2006), Manaus (PINHEIRO e TADEI, 2002), Distrito Federal (CARVALHO et al. 2004) e na cidade de Santos (MARCORIS et al. 2003).

Para solucionar o problema da resistência das populações de mosquito da dengue ao larvicida temefós, foi realizada a substituição deste larvicida pelo DFB nos seguintes Estados: Pará, Sergipe, Ceará, Alagoas, Rio Grande do Norte, Goiás, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro e Minas Gerais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010), entretanto faltam estudos sobre a ação do temefós e do DFB para organismos aquáticos não alvos, pois nas aplicações estes larvicidas podem atingir as redes hidrográficas locais e expressar os riscos de intoxicação ambiental.

2. Diflubenzuron (DFB)

O DFB, 1 – (4 – clorofenil) – 3 – (2,6 – difluorobenzoil) uréia, é um composto regulador do crescimento de insetos (IGR) por meio da inibição da síntese de quitina (MARTINS e SILVA, 2004). A ecotoxicidade do DFB é pouco estudada, entretanto, em testes de toxicidade aguda sob condições laboratoriais, ele classifica-se como extremamente tóxico para o microcrustáceo *Daphnia magna*, que depende da síntese de quitina para crescer. Por outro lado, o DFB classifica-se como praticamente não tóxico para o peixe *Poecilia reticulata* e para a macrófita *Lemna minor* (SOUZA, 2008). Para peixes da espécie pacu (*Piaractus mesopotamicus*), em testes de 96 horas de exposição, o DFB classifica-se com praticamente não tóxico, pois a CL50 foi maior que 2000 mg.L⁻¹ (WINKALER, 2008).

A concentração de 100 mg.L⁻¹ de DFB, em 96 horas de exposição em curimbatá (*Prochilodus lineatus*), causa diminuição do número e aumento do volume de eritrócitos, redução na quantidade de hemoglobina, hiperglicemia e lesões histológicas hepáticas (MADUENHO e MARTINEZ, 2008). Por outro lado, o DFB não afeta o sêmen, volume, aspecto, duração da motilidade e concentração espermática no sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) (MABILIA e SOUZA, 2006).

Quanto ao uso em saúde pública, o DFB é eficiente contra as larvas do *Aedes aegypti* (SECCACINI et al. 2008), devido à atividade inibidora da ecdise de larvas (MARTINS e SILVA, 2004). O DFB foi eficiente no controle de larvas do mosquito da dengue de populações oriundas da cidade de Uberlândia - MG (SILVA, 2006; SILVA e MENDES, 2007), e também em estudos realizados na Malásia (CHEN et al. 2008).

Entretanto, mais estudos são necessários para saber quais os riscos que causam aos organismos aquáticos. Devido a esta falta de informações, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1997) recomenda o uso restrito do DFB na aquicultura.

3. Temefós

O temefós (0,0, 0',0' – tetrametil – 0, 0' – tio di – (p – fenileno) bis tiofosfato) é um composto organofosforado largamente usado para controle de mosquitos (LEE e SCOTT, 1989). O mecanismo de ação tóxica é a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), que cataliza a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). Com a inibição da AChE, ocorre acúmulo de ACh nas terminações nervosas, provocando sinapses aleatórias, espasmos musculares e paralisia do inseto (MADDRELL, 1980).

Os estudos de avaliação da toxicidade do temefós para peixes e invertebrados não alvos são escassos. Porém, sabe-se que o temefós causa efeitos adversos e afeta o comportamento e sobrevivência do camarão *Uca pugnax* em condições de campo e de laboratório (WARD e BUSCH, 1976; WARD et al. 1976). A CL50 do temefós no período de 96 horas para girinos da rã *Rana clamitans* foi calculada em 4,24 $\mu\text{L.L}^{-1}$, sendo classificado como extremamente tóxico (SPARLING et al. 1997).

Foi verificada a eliminação de quase todos os zooplânctons após a aplicação de temefós em lago eutrófico raso do Japão, sem recuperação dos cladóceros ao final do experimento (47 dias) e recuperação dos copépodos após 40 dias (HANAZATO et al. 1989). Em Minnesota (USA), o temefós causou redução na população de cladóceros de um lago natural 24 horas após a aplicação, e a reprodução destes organismos se reduziu quando comparado com o ano anterior. Os daphnídeos sofreram diminuição na densidade populacional, porém, a *Daphnia pulex* reapareceu após 35 dias (HELGEN et al. 1988). Este inseticida também é tóxico para algas da espécie *Scenedesmus obliquus*, que sofreram inibição do crescimento das células (LUIZ et al. 2008).

Em águas de culturas de arroz tratadas com temefós, na concentração de 250 ml.ha^{-1} , nos meses de julho a agosto, foram detectadas concentrações de 0,49 e 0,07 $\mu\text{g.L}^{-1}$, uma e cinco horas após a aplicação, respectivamente, em Tarragona, Espanha. Entretanto, onze horas após a aplicação não foi detectada a presença do larvicida na água. A oxidação fotolítica foi a principal via de

degradação, devido a sua absorção ser acima de 295 nm e sua dupla estrutura aromática (LACORTE et al. 1996).

4. Testes de toxicidade para organismos aquáticos

A ecotoxicologia aquática estuda os efeitos tóxicos de substâncias químicas sobre organismos aquáticos e sua interação com o meio. Os dados ecotoxicológicos são base para se estabelecer quantidades limites seguras dos contaminantes químicos no ambiente e para a avaliação de risco ambiental. Testes ecotoxicológicos iniciam-se com a toxicidade aguda, estabelecida com a determinação da concentração efetiva média (CE50) - concentração que provoca imobilidade/mortalidade em metade dos organismos-testes. Nestes testes avalia-se uma resposta rápida e severa dos organismos aquáticos ao estímulo que se manifesta, geralmente em períodos entre 24 a 96 horas (RAND e PETROCELLI, 1985).

Nos estudos de toxicidade crônica avalia-se a ação das substâncias químicas por meio da resposta a um estímulo por longo período, geralmente de 1/10 do ciclo vital até a totalidade da vida do organismo. Esses efeitos são subletais, onde as concentrações do agente tóxico permitem a sobrevivência do organismo, porém afetam suas funções biológicas, como a reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento, maturação e comportamento em geral (RAND e PETROCELLI, 1985).

Os organismos-testes para o presente trabalho foram escolhidos de acordo com a relevância na cadeia trófica e representação dos organismos aquáticos. Os daphnídeos estão entre os organismos-testes mais utilizados nos testes ecotoxicológicos, e representam os invertebrados aquáticos. Eles são de grande importância na composição do zooplâncton, como consumidores primários. A macrófita aquática *Lemna minor* é uma angiosperma e representa os vegetais aquáticos superiores. Peixes das espécies *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-Nilo), utilizada em piscicultura, e *Hyphessobrycon eques* (mato grosso) podem ser utilizados em estudos ecotoxicológicos como representantes dos vertebrados aquáticos (CRUZ et al. 2008).

5. Sedimento

O inseticida no ambiente sofre processos de adsorção através da interação entre o ingrediente ativo e partículas do solo (SILVA e FAY, 2004). O sedimento funciona como depósito para contaminantes da água, fixa e remove compostos químicos, entre os quais são encontrados elementos nocivos à natureza (CIHACEK et al. 1996).

A disponibilidade e adsorção do inseticida na água depende de fatores como a solubilidade do produto em água, a quantidade e o tamanho de partículas em suspensão no meio aquático, o nicho ecológico local, temperatura, pH, dureza, alcalinidade, fluxo, profundidade e sedimento (MURILO, 2000).

Para o glifosato, o valor da CE50 para *Daphnia pulex* foi maior na presença de sedimento devido à imobilização do herbicida no sedimento, e deixou disponível apenas 59,5% da concentração do herbicida adicionado na água (JONSSON e MAIA, 1999). Os valores da CE50 do piramicarb para *Daphnia magna* foi de 16 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 24 $\mu\text{g.L}^{-1}$ na ausência e presença de sedimento, respectivamente, tornando-o menos disponível para os organismos-testes (KUSK, 1996). Em estudos com o herbicida clamazone foram determinados valores de CE50 equivalentes a 1,51 mg.L^{-1} e 11,28 mg.L^{-1} em sistemas sem e com sedimento, respectivamente, onde o sedimento imobilizou 86,6% do herbicida (JONSSON e MAIA, 1999). A presença de sedimento diminuiu a biodisponibilidade de triclorfon e sulfato de cobre para *D. magna*, *D. similis* e *D. laevis* (ARAUCO et al. 2005).

6. Avaliação de risco ambiental

A exposição da biota a estressores ambientais resulta em efeitos ecológicos adversos, como mudanças na estrutura e características funcionais de uma população. A probabilidade de ocorrência destes efeitos é analisada por meio da avaliação de risco ambiental, sendo a base para a determinação dos efeitos adversos dos compostos químicos tóxicos para os ecossistemas, que

podem alterar a estrutura e a dinâmica dos sistemas biológicos (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

No Brasil, para introduzir um novo produto químico no mercado agrícola, avalia-se o risco ambiental que o inseticida pode oferecer ao ambiente (IBAMA, 1996). Entretanto, para uso agrícola ainda não foi estabelecida e aprovada uma legislação específica para o registro dos produtos tóxicos eficazes no controle químico, não são obrigatórios os estudos de avaliação do risco ambiental e, muitas vezes, os inseticidas são utilizados em concentrações muito elevadas e intoxicam organismos não alvos no ambiente.

O uso inadequado dos produtos tóxicos, geralmente excessivo, em agricultura, aquicultura, ou no combate a vetores de doenças acentua a contaminação ambiental e a ocorrência de resistência dos organismos alvos (PAIVA, 2006).

O risco ambiental é calculado por meio do quociente de risco (Q) (GOKTEPE et al. 2004). O cálculo do Q é feito por meio da divisão do valor da concentração ambiental estimada (CAE) de cada inseticida pelo valor de CE50 calculado nos testes de toxicidade aguda. As concentrações limites também são obtidas, indicando a partir de qual concentração da substância foi observado um efeito estatisticamente significativo. Elas são descritas como CEO (concentração de efeito observado, sendo a menor concentração real da amostra que causa efeito deletério estatisticamente significativo) e CENO (concentração de efeito não observado, sendo a maior concentração real da amostra que não causa efeito deletério estatisticamente significativo). A partir da média geométrica do CEO e CENO calcula-se o valor crônico (VC).

7. Análise de resíduo

O uso de inseticidas leva à exposição de organismos aquáticos que habitam águas contaminadas. Nos últimos anos, aumentou o interesse sobre os efeitos que as substâncias tóxicas provocam em peixes. Estas atividades geram resíduos que podem atingir bacias hidrográficas, expondo animais aquáticos a

altas concentrações de substâncias tóxicas (PARMA de CROUX et al. 2002). A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é utilizada para a análise de resíduo de substâncias tóxicas em amostras dos componentes do ambiente aquático.

Resíduos de DFB foram detectáveis sete dias após a aplicação na água. Um dia após a aplicação ocorreu dissipação de aproximadamente 52%, em relação ao total das aplicações na água ($0,4 \text{ mg.L}^{-1}$). A partir do terceiro dia ocorreu aumento na dissipação do inseticida na água, com redução de 85% da concentração total aplicada. A concentração do DFB na água permaneceu estável do terceiro ao sétimo dia e os resíduos não foram detectados ao décimo dia (WINKALER, 2008).

Alguns fatores influenciam a quantidade de inseticida que atinge o meio aquático, como a lixiviação e o escoamento superficial (SILVA e FAY, 2004). Processos de adsorção e dessorção também influenciam a persistência dos inseticidas nos recursos hídricos, assim como a volatilização, a biodegradação, a fotólise e a hidrólise (DOUCETTE, 2003). A bioacumulação e a toxicidade de inseticidas em organismos aquáticos também são influenciadas pelos processos de adsorção e dessorção (JONES e HUANG, 2003).

O controle de resíduos dos inseticidas no meio aquático é fundamental para o estabelecimento de medidas mitigadoras que controlem e/ou minimizem intoxicações à flora e fauna viventes no local.

8. Lesões histológicas em peixes

Alguns indicadores são frequentemente utilizados na avaliação dos efeitos causados por substâncias tóxicas nos organismos, como os danos relativos a alterações histológicas e morfológicas nos ossos, rins, fígado etc. As brânquias de peixes, por exemplo, são compostas por tecidos altamente sensíveis, que apontam a presença dos compostos irritantes a elas. De acordo com Wester e Roghair (1994), o estudo histopatológico consegue indicar os efeitos adversos de compostos químicos em diversos órgãos de pequenos peixes utilizados

experimentalmente em laboratório. Tais estudos podem ser usados como uma ferramenta útil na avaliação de riscos dos inseticidas nos ambientes aquáticos.

III. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

1) Determinar a toxicidade aguda dos inseticidas diflubenzuron e temefós para os peixes tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e mato grosso (*Hyphessobrycon eques*), para a macrófita *Lemna minor*, e para o microcrustáceo *Daphnia magna*, na presença e ausência de sedimento.

2) Determinar a toxicidade crônica dos inseticidas diflubenzuron e temefós para os peixes tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e mato grosso (*Hyphessobrycon eques*) e para a macrófita *Lemna minor*, na presença e ausência de sedimento, e para *Daphnia magna* na ausência de sedimento.

3) Classificar o diflubenzuron e o temefós pelo risco ambiental agudo e avaliar o risco crônico para os organismos-testes.

4) Avaliar a concentração de resíduos de diflubenzuron e temefós nas águas do teste de toxicidade aguda e crônica com tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), e o potencial de lixiviação e escoamento superficial de ambos os larvicidas.

5) Verificar os efeitos tóxicos dos inseticidas no fígado e brânquias de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) dos testes de toxicidade aguda.

IV. CAPÍTULO I

Avaliação ecotoxicológica dos larvicidas diflubenzuron e temefós para a macrófita *Lemna minor*

INTRODUÇÃO

O intenso desenvolvimento da agricultura, aquicultura e o combate a vetores de doenças eleva o uso de inseticidas e, conseqüentemente, aumenta os impactos ambientais. Com a dinâmica ambiental, estas substâncias aplicadas em diversas práticas atingem a rede hidrográfica e intoxicam organismos aquáticos.

A contaminação do ambiente aquático por inseticidas ocorre por meio de escoamento superficial, lixiviação ou decomposição química. Práticas inadequadas de manejo agravam ainda mais esta situação, a qual deixa os organismos aquáticos mais vulneráveis às enfermidades.

O diflubenzuron (DFB) é um larvicida amplamente aplicado na agricultura em culturas de milho, tomate, algodão, trigo e citros (USEPA, 1997) e na

piscicultura para o controle de ectoparasitoses de peixes (FUJIMOTO et al. 1999). Atualmente ele também é empregado no combate ao vetor da dengue, devido à sua atividade inibidora de síntese de quitina em larvas de *Aedes aegypti*.

Outro inseticida largamente empregado em saúde pública para o controle de *A. aegypti* é o larvicida organofosforado temefós. No Brasil, ele é usado desde 1967 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1968), e há diversos relatos de casos de desenvolvimento de resistência de inseto a este produto devido o seu uso por longos períodos.

Estudos de DFB e temefós sobre organismos aquáticos não alvos ainda são escassos, e a falta de informações da toxicidade destes larvicidas sobre o ecossistema aquático pode afetar a sobrevivência e o hábitat dos organismos no ambiente.

A avaliação da possibilidade da ocorrência de desequilíbrios ambientais devido ao uso dos larvicidas DFB e do temefós em saúde pública, agricultura e aquicultura, e também a possibilidade de contaminação de ecossistemas aquáticos, demanda a necessidade de estudos de avaliação da ecotoxicidade e de risco ambiental para organismos não alvos.

Alguns organismos são utilizados como bioindicadores de contaminação aquática, por meio de testes realizados em laboratório. A macrófita *Lemna minor* é um bioindicador representante das angiospermas aquáticas, com alta sensibilidade a alterações na água. Estudos com estes organismos fundamentam o estabelecimento de medidas mitigadoras que controle e/ou minimize os efeitos adversos sobre os ecossistemas.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi determinar a toxicidade aguda e crônica dos inseticidas DFB e temefós para a macrófita *Lemna minor*, na presença e ausência de sedimento e classificar os dois larvicidas pelo risco agudo e risco crônico para os organismos-testes.

MATERIAL E MÉTODOS

Os testes de toxicidade aguda e crônica foram conduzidos no Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal. Os produtos comerciais utilizados foram o Diflubenzuron 25% Champion[®] e o Temefós Fersol 1G[®].

1. Cultivo dos organismos-testes

O cultivo da macrófita *Lemna minor* seguiu as especificações da norma Guideline 221 (OECD, 2002). Os exemplares da macrófita *Lemna minor* foram obtidos do cultivo-estoque do laboratório, mantido em sala climatizada com temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$. As plantas foram cultivadas em meio Hoagland (LI e XIONG, 2004), com pH 5,8, composto de água destilada reconstituída com nutrientes. Para os testes, foram utilizadas as plantas que permaneceram no meio de cultivo por sete dias (Figura 1).



Figura 1. Aspectos da colonização da macrófita *L. minor*.

Fonte: <http://www.aquapage.cz/Obrazky/Rostliny/Okrehek.jpg>.

2. Testes de sensibilidade com substância de referência

Testes de sensibilidade foram aplicados para avaliar a sanidade e sensibilidade das macrófitas aos testes toxicológicos. A substância de referência

utilizada para este teste foi o cloreto de sódio (NaCl) (CHASTINET e SILVA, 2000). As macrófitas foram aclimatadas por quatro dias, em meio Hoagland e água destilada (75:25), com aeradores (Figura 2). Posteriormente, os testes foram conduzidos com as concentrações 0, 1, 3, 5, 7 e 10 g.L⁻¹ de NaCl, com três repetições de cada tratamento e do controle. Foram utilizadas quatro colônias com três frondes (folhas) cada colônia, totalizando 12 frondes por recipiente, de acordo com a norma Guideline 221 (OECD, 2002). As frondes foram selecionadas pelo aspecto sanitário, nutricional e de tamanho homogêneo. Os recipientes-testes utilizados foram frascos de vidro de 170 ml.

As parcelas experimentais foram compostas com volumes conhecidos do meio de cultivo completados para 100 ml com as concentrações testadas. Os testes foram mantidos em sala climatizada sob fotoperíodo de 16 horas, a 24 ± 2°C, por sete dias em sistema estático. A concentração de inibição média (CI50) foi calculada em cada teste, assim como o limite superior (LS) e o limite inferior (LI).



Figura 2. Aspectos de *L. minor* no cultivo e aclimação.

3. Testes preliminares com os larvicidas

Após a verificação da sanidade e sensibilidade das macrófitas, foram realizados testes preliminares na presença e ausência de sedimento com os larvicidas, nas mesmas condições descritas no item anterior, para estabelecer o

intervalo de concentrações dos inseticidas no meio de cultivo que causam os efeitos de 0 e 100% de inibição do crescimento da *L. minor* (Figura 3).



Figura 3. Aspectos da montagem do teste preliminar de toxicidade aguda de DFB para *L. minor*.

Os testes na ausência de sedimento foram realizados em recipientes de 170 ml, com volume final de 100 ml, e as plantas foram aclimatadas nos recipientes por 24 horas antes do início do teste, com 50 ml de meio Hoagland. Os testes na presença de sedimento foram realizados em recipientes de 300 ml, com volume final de 200 ml e 100 g de sedimento argiloso. O sedimento seco foi pesado e colocado nos recipientes-testes 24 horas antes do início do ensaio com 100 ml de meio de cultivo, para ocorrer interação entre as fases solo e água. A macrófita foi aclimatada por 24 horas na presença do sedimento antes da adição das soluções contendo o inseticida.

4. Testes definitivos de toxicidade aguda com os larvicidas

Os testes definitivos foram realizados com as concentrações 0, 20, 50, 80, 110, 140 e 170 mg.L⁻¹ de DFB e 0, 5, 15, 25, 35, 45 e 55 mg.L⁻¹ de temefós para testes na ausência de sedimento, e 0, 25, 75, 125, 175, 225, 275 e 325 mg.L⁻¹ de DFB e 0, 15, 40, 60, 90, 115, 140 e 165 mg.L⁻¹ de temefós para testes na presença de sedimento (Figura 4), com nove repetições de cada concentração e

do controle. As condições experimentais foram as mesmas anteriores, com 12 frondes por recipiente. As avaliações dos efeitos dos larvicidas na formação das frondes foram realizadas nos 3^o, 5^o e 7^o dias de teste, por meio da contagem das frondes formadas. A taxa de crescimento relativa foi calculada com a seguinte fórmula proposta por Guillard (1979):

$$K = \frac{\log_2 nf - \log_2 ni}{t}$$

Onde:

K = taxa de crescimento diário;

Log₂nf = Logarítmo na base dois do número de frondes ao final do experimento;

Log₂ni = Logarítmo na base dois do número de frondes no início do experimento;

t = tempo de incubação (dias).

As variáveis físico-químicas da água (pH, oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade elétrica) foram mensuradas ao longo dos testes.

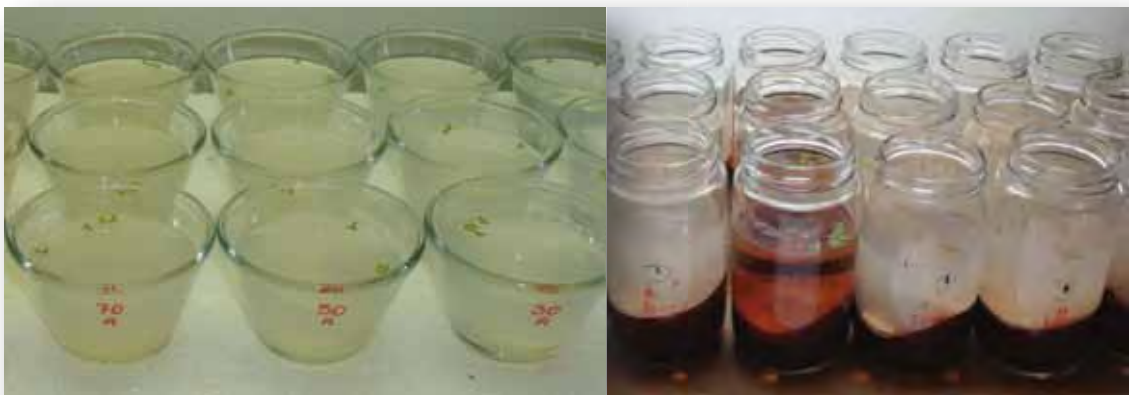


Figura 4. Aspectos do teste de toxicidade aguda de temefós na ausência e presença de sedimento para *L. minor*.

5. Testes de toxicidade crônica com os larvicidas

Os ensaios foram realizados de acordo com as normas da OECD (2002). Foram mantidas as mesmas condições dos testes descritos anteriormente, com exposição dos organismos às concentrações sub-letais 0, 1, 2, 9 e 19 mg.L⁻¹ de DFB e 0; 0,2; 0,4; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹ de temefós para testes na ausência de

25

sedimento, e 0, 1,5; 3,0; 14,5 e 29,0 mg.L⁻¹ de DFB e 0; 0,25; 0,5; 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹ de temefós para testes na presença de sedimento, por um período de 14 dias, com nove repetições de cada tratamento e do controle. A taxa de crescimento relativa foi calculada com a fórmula proposta por Guillard (1979), e os valores da concentração de efeito não-observado (CENO), concentração de efeito observado (CEO) e valor crônico (VC) foram calculados.

As variáveis físico-químicas da água (pH, oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade elétrica) foram mensuradas ao longo do teste.

6. Sedimento

O sedimento utilizado nos testes foi coletado da camada superficial do solo em uma área natural localizada na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, onde nunca foi aplicado qualquer inseticida e não sujeita a descarte de resíduos de atividades antrópicas diretamente, de acordo com as normas da OECD (1995). O solo foi peneirado e as composições químicas e granulométricas foram determinadas no Departamento de Solos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal (Tabela 1).

Tabela 1. Análise física e química do sedimento argiloso.

Composição química	Valores	Composição física	Valores
pH (CaCl ₂)	5,3	Argila (g.kg ⁻¹)	578
MO (g.dm ⁻³)	12,0	Limo (g.kg ⁻¹)	200
P (mg.dm ⁻³)	11,0	Areia fina (g.kg ⁻¹)	141
K (mmol _c .dm ⁻³)	1,3	Areia grossa (g.kg ⁻¹)	81
CA (mmol _c .dm ⁻³)	19,0	Classe textural	Argilosa
Mg (mmol _c .dm ⁻³)	9,0		
H + Al (mmol _c .dm ⁻³)	20,0		
SB (mmol _c .dm ⁻³)	29,3		
T (mmol _c .dm ⁻³)	49,3		
V (%)	59,0		

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

7. Cálculo da CI50, CENO, CEO e VC

Os dados obtidos nos testes de toxicidade aguda foram utilizados para calcular os valores da CI50. Os valores de CI50 obtidos para *L. minor* foram utilizados para classificar os inseticidas quanto ao potencial tóxico para esta espécie, de acordo com as classes toxicológicas citadas por Zucker (1985) (Tabela 2). Os valores de CENO e CEO foram obtidos estatisticamente, e o VC foi calculado pela divisão entre o CENO e o CEO.

Tabela 2. Classes dos valores de CI50 de acordo com Zucker (1985).

CI50 (mg.L⁻¹)	Categoria
CI < 0,1	Extremamente tóxico
0,1 < CI < 1,0	Altamente tóxico
1,0 < CI < 10,0	Moderadamente tóxico
10,0 < CI < 100,0	Ligeiramente tóxico
CI > 100,0	Praticamente não-tóxico

8. Risco de intoxicação ambiental

O risco de intoxicação ambiental dos larvicidas para os organismos-testes foi determinado por meio do método do quociente (Q) (GOKTEPE et al. 2004). O cálculo do Q é feito por meio da divisão do valor da concentração ambiental estimada (CAE) de cada inseticida pelo valor de CI50 calculado nos testes de toxicidade aguda.

A CAE é a concentração do inseticida aplicada em campo, de acordo com as recomendações previstas pelo Ministério da Saúde. Os valores da CAE utilizados foram as concentrações utilizadas para o controle de *A. aegypti*, de 0,25 mg.L⁻¹ para DFB e 1,0 mg.L⁻¹ para temefós.

O valor do Q, também denominado de quociente de risco (RQ), é um número puro, pois as unidades dos parâmetros se anulam na divisão. As classes de risco ambiental utilizadas foram alto risco, médio risco e baixo risco (Tabela 3).

Tabela 3. Classes dos valores de RQ de acordo com Goktepe et al. (2004).

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

9. Forma de análise dos resultados

As CI50 foram calculadas com o software Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al. 1977) e utilizadas para classificar os dois larvicidas pela toxicidade aguda ao organismo-teste.

O risco ambiental foi estimado pelo método de comparação da CAE dos dois inseticidas com os valores de CI50 e utilizado para classificar os dois larvicidas pelo risco de intoxicação ambiental do organismo-teste.

Para os valores de CENO e CEO, os dados foram analisados comparando-se as médias da taxa de crescimento relativa de *L. minor* ao final dos testes. Para isso, foram realizados testes de Pressuposições para análise de variância dos dados (Normalidade Cramer-von Mises, Homocedasticidade Brown Forsythe), e aplicado o teste ANOVA, com nível de significância de 5%. Para a comparação entre médias de dados paramétricos foi aplicado o teste de Tukey, utilizando-se programa de computação SAS 9.0 (2001).

Os dados dos parâmetros de água foram analisados pelo Coeficiente de Correlação de Pearson, com nível de significância a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes de sensibilidade e toxicidade aguda com a macrófita *L. minor* estão contidos na Tabela 4. Por meio do teste de sensibilidade com a substância de referência NaCl verificou-se a sanidade e sensibilidade das plantas aquáticas para prosseguir o uso nos testes toxicológicos.

Tabela 4. Concentrações de inibição média, limites inferiores e limites superiores de NaCl (g.L⁻¹) e dos larvicidas (mg.L⁻¹) nos testes de toxicidade aguda para *L. minor* e classificação dos larvicidas DFB e temefós de acordo com as classes de Zucker (1985).

	LI	CI50	LS	Classificação de Zucker
NaCl	3,8	4,0	4,3	-
DFB sem sed.	95,4	103,6	119,1	Praticamente não tóxico
DFB com sed.	120,1	140,2	163,9	Praticamente não tóxico
Temefós sem sed.	17,2	19,7	22,6	Ligeiramente tóxico
Temefós com sed.	20,6	25,1	30,5	Ligeiramente tóxico

Nos testes de toxicidade aguda na ausência e presença de sedimento, o temefós foi 5,2 e 5,6% mais tóxico que o DFB para as macrófitas,

respectivamente (Figuras 5 e 6, Tabela 4). Estudos realizados com DFB também obtiveram baixa toxicidade deste larvicida para *L. minor*, com CI50 de 459,50 mg.L⁻¹ (SOUZA, 2008). O inibidor de crescimento de insetos teflubenzuron também foi considerado pouco tóxico para a *L. minor*, apresentando CI50 de 1176,16 mg.L⁻¹ (MEDEIROS, 2008). Estudos com outros inseticidas organofosforados relataram baixas CI50 de 1,24; 0,52 e 0,53 µg.L⁻¹ de malation, endosulfan e clorpirifos, respectivamente, para *L. minor* (MUNKEGAARD et al. 2008).

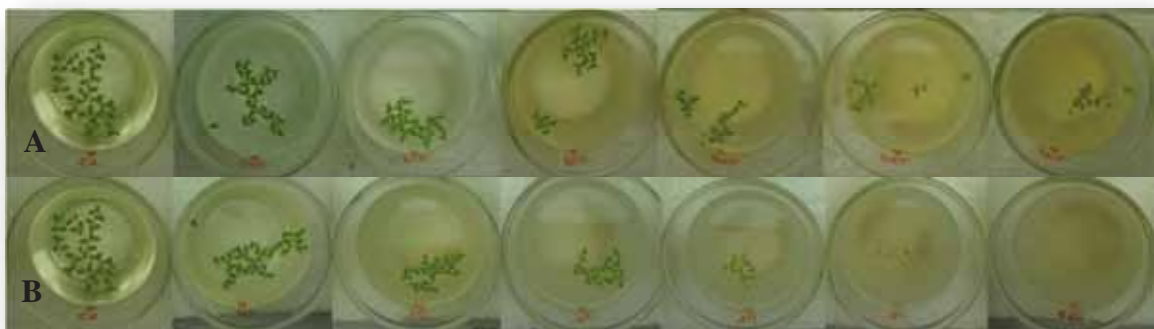


Figura 5. Diminuição do número de frondes nos testes de toxicidade aguda da menor para a maior concentração de DFB (A) e temefós (B) para *L. minor*.

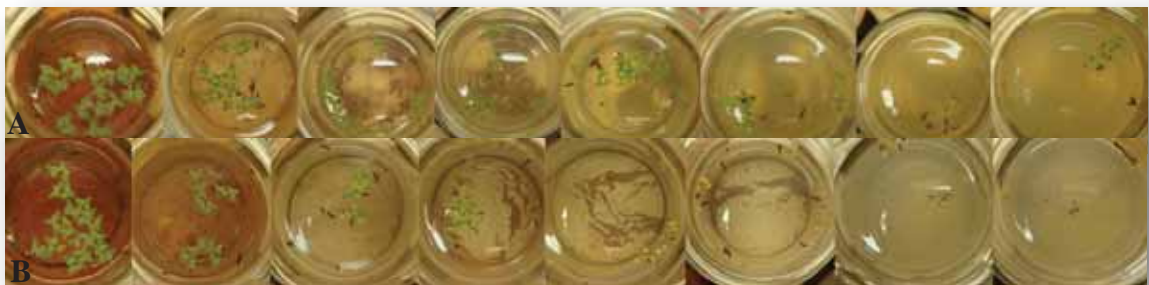


Figura 6. Número de frondes nos testes de toxicidade aguda na presença de sedimento da menor para a maior concentração de DFB (A) e temefós (B) para *L. minor*.

A menor toxicidade de larvicidas inibidores de crescimento de insetos às macrófitas pode estar relacionada ao mecanismo de ação tóxico do larvicida, que não interfere de modo relevante em plantas, pois a quitina não faz parte de seu metabolismo e crescimento. Já o maior grau tóxico de organofosforados pode ser relacionado ao inseticida inibir a enzima citocromo P450 monooxigenase de

plantas, responsável pela detoxificação de xenobióticos e degradação de pesticidas (TARDIF e POWLES, 1999).

As enzimas citocromo P450 são heme-proteínas envolvidas na biotransformação de compostos químicos em polares, tornando-os mais solúveis e mais fáceis de serem eliminados do organismo (TESTA e JENNER, 1976). Entretanto, os organofosforados apresentam grupos tio-fosfatos sujeitos a dessulfuração oxidativa por estas enzimas, o que resulta em compostos de enxofre reativos. Estes enxofres ligam-se covalentemente à proteína cisteína das enzimas, o grupo heme é liberado e a enzima é inativada (DECKER e DOERGE, 1992; KYLE, 2005).

Comparando-se os testes agudos de DFB e temefós com e sem sedimento, verifica-se que a presença do solo influencia na biodisponibilidade do inseticida para as macrófitas, evidenciado pela menor ação tóxica do produto quando adicionado ao teste com sedimento.

Testes onde havia sedimento, as CI50 foram 35,3% e 27,4% maiores nos tratamentos de DFB e temefós, respectivamente, em comparação com os tratamentos sem sedimento (Figura 7). Estudos realizados com DFB também obtiveram maior ação tóxica deste larvicida para *L. minor* em testes sem sedimento (CI50 de 459,50 mg.L⁻¹) quando comparada com testes com sedimento (CI50 de 698,25 mg.L⁻¹) (SOUZA, 2008).

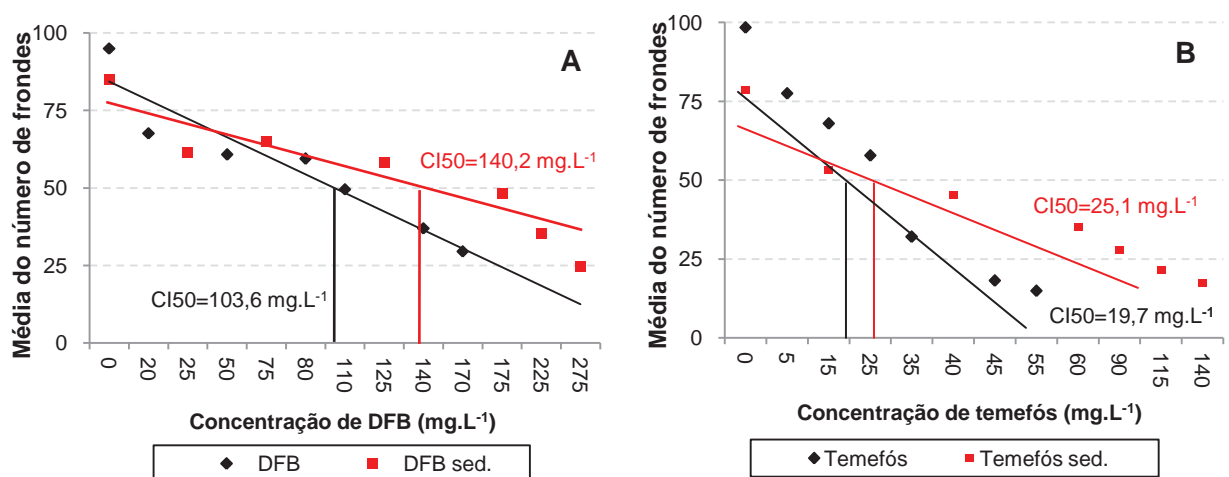


Figura 7. Comparação das médias do número de frondes de *L. minor* no 7º dia de avaliação. A: Comparação das CI50 entre testes de DFB na presença e ausência de sedimento. B: Comparação das CI50 entre testes de temefós na presença e ausência de sedimento.

O menor crescimento inicial de macrófitas no controle de testes com sedimento pode ser devido ao baixo pH do solo (5,3) (Figura 8). A redução da ação tóxica dos larvicidas para as macrófitas pode ser relacionada com o alto coeficiente de adsorção do temefós (10.000 l.kg^{-1}) e do DFB (18.250 l.kg^{-1}). Entretanto, a menor ação tóxica não foi suficiente para mudar a classificação dos larvicidas quanto às classes de Zucker (1985).

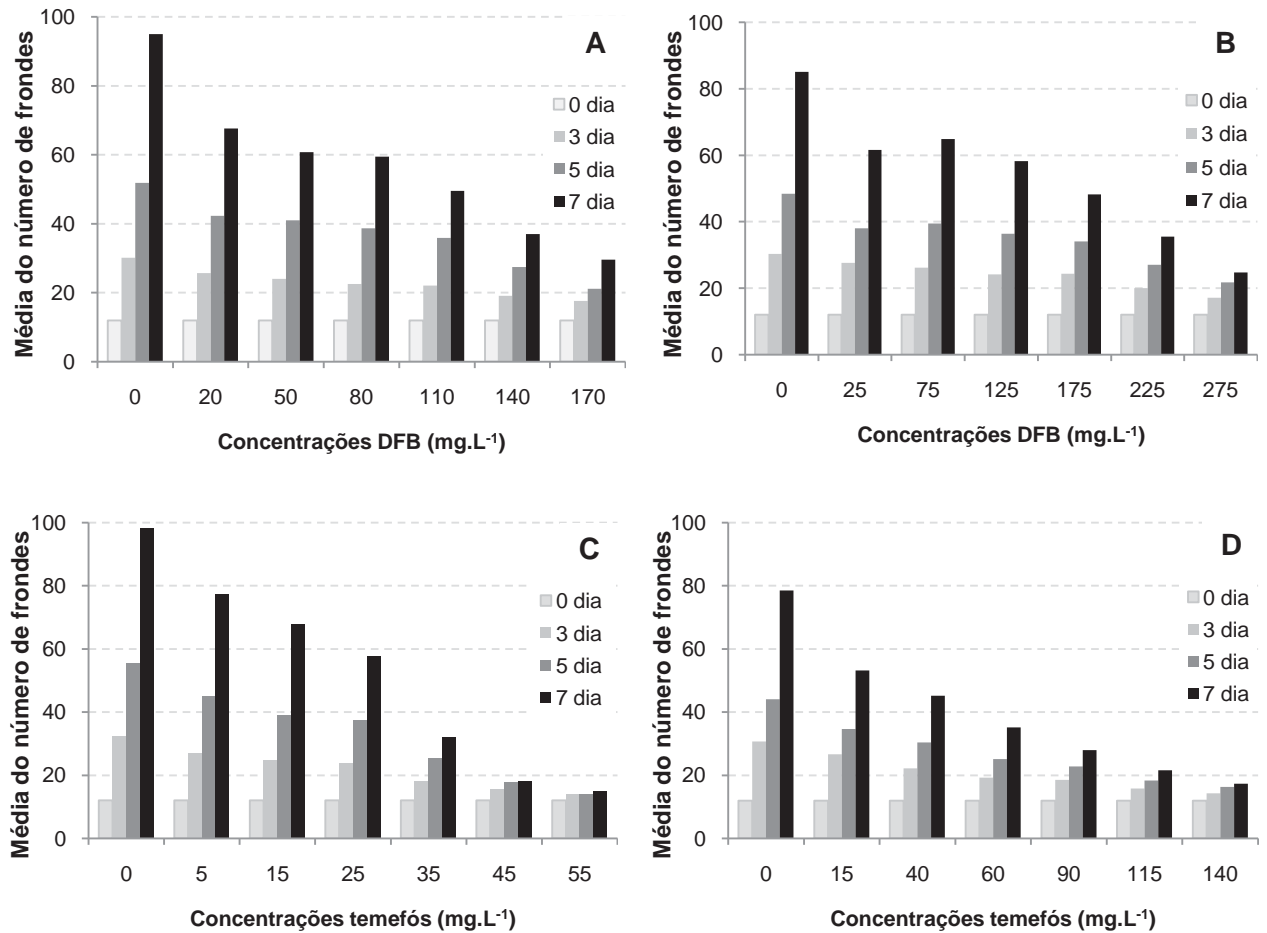


Figura 8. Comparação das médias do número de frondes de *L. minor* no momento inicial do teste até o 7º dia de avaliação. A: Teste de toxicidade aguda de DFB sem sedimento. B: Teste de toxicidade aguda de DFB com sedimento. C: Teste de toxicidade aguda de temefós sem sedimento. D: Teste de toxicidade aguda de temefós com sedimento.

De acordo com a classificação de Zucker (1985), o larvicida DFB classifica-se como praticamente não tóxico na ausência e presença de sedimento ($CI_{50} > 100,0 \text{ mg.L}^{-1}$), diferentemente do temefós, que se classifica como ligeiramente

tóxico para as macrófitas ($10,0 < CI_{50} < 100,0 \text{ mg.L}^{-1}$) em ambos os testes (Tabela 4). Outros estudos realizados com DFB (SOUZA, 2008) e teflubenzuron (MEDEIROS, 2008) também obtiveram a classificação de praticamente não tóxico para *L. minor*.

O risco de intoxicação ambiental calculado pelo método do quociente, obtido para ambos os larvicidas, foi de baixo risco ($RQ < 0,05$), exceto para temefós na ausência de sedimento, classificado como de médio risco para este organismo-teste ($0,05 < RQ < 0,5$). Entretanto, ressalta-se que o valor de RQ de temefós em testes com sedimento foi extremamente próximo da classe de médio risco (Tabela 5). A concentração ambiental estimada (CAE) utilizada para o cálculo foi a recomendada pelo Ministério da Saúde para o uso contra larvas de *Aedes aegypti* (DFB: $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$, temefós: $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$).

Tabela 5. Classificação dos larvicidas quanto ao risco de intoxicação ambiental para *L. minor*, de acordo com os testes agudos realizados com e sem sedimento.

	DFB sem sedimento	DFB com sedimento	Temefós sem sedimento	Temefós com sedimento
RQ	0,002	0,002	0,051	0,047
Classificação	baixo risco	baixo risco	médio risco	baixo risco

Em relação aos testes de toxicidade crônica, não ocorreu diferença significativa no crescimento de frondes ao longo do tempo em testes com DFB, na presença e ausência de sedimento ($p > 0,05$). Para o larvicida temefós, houve diminuição significativa do crescimento de frondes da menor para a maior concentração em testes crônicos na ausência de sedimento ($p < 0,05$). Entretanto, este decréscimo não ocorreu no teste com sedimento ($p > 0,05$) (Figura 9).

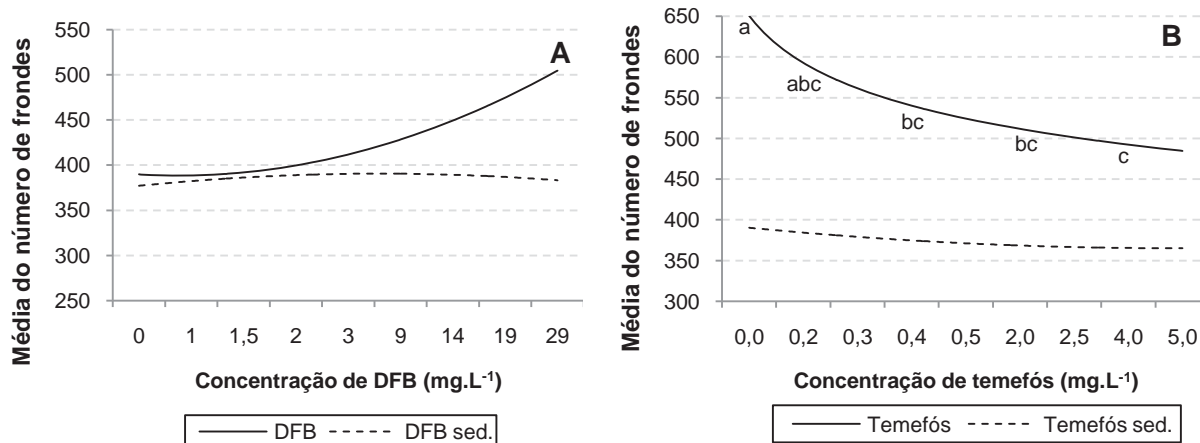


Figura 9. Média do crescimento final de frondes ao longo das concentrações nos testes de toxicidade crônica de DFB e temefós para a macrófita *L. minor*. As pressuposições para a análise de variância foram satisfeitas (Teste de Homocedasticidade Brown Forsythe $F=0,16$ e $p=0,9556$ para DFB, $F=0,35$ e $p=0,8409$ para DFB com sedimento, $F=0,35$ e $p=0,8402$ para temefós e $F=0,49$ e $p=0,7460$ para temefós com sedimento; Teste de Normalidade dos Erros Cramer-von Mises $wsq=0,07$ e $p=0,2418$ para DFB, $wsq=0,05$ e $p>0,2500$ para DFB com sedimento, $wsq=0,06$ e $p>0,2500$ para temefós e $wsq=0,08$ e $p=0,2160$ para temefós com sedimento). a - c: comparação entre médias das concentrações. Teste de Tukey com nível de significância a 5%: DFB: $F=0,14$ e $p=0,9604$. Temefós: $F=3,39$ e $p=0,05270$. DFB com sedimento $F=0,93$ e $p=0,4855$. Temefós com sedimento: $F=0,92$ e $p=0,4904$.

A taxa de crescimento relativa das frondes diminuiu significativamente ($p<0,05$) com o aumento das concentrações de temefós e DFB nos testes de toxicidade aguda na ausência e presença de sedimento (Figura 10). Testes realizados com propanil também diminuíram a taxa de crescimento das frondes de *L. minor* (MITSOU et al. 2006). Souza (2008) e Medeiros (2008) indicaram diminuição da taxa de crescimento de *L. minor* com o aumento de concentrações de DFB e teflubenzuron, respectivamente.

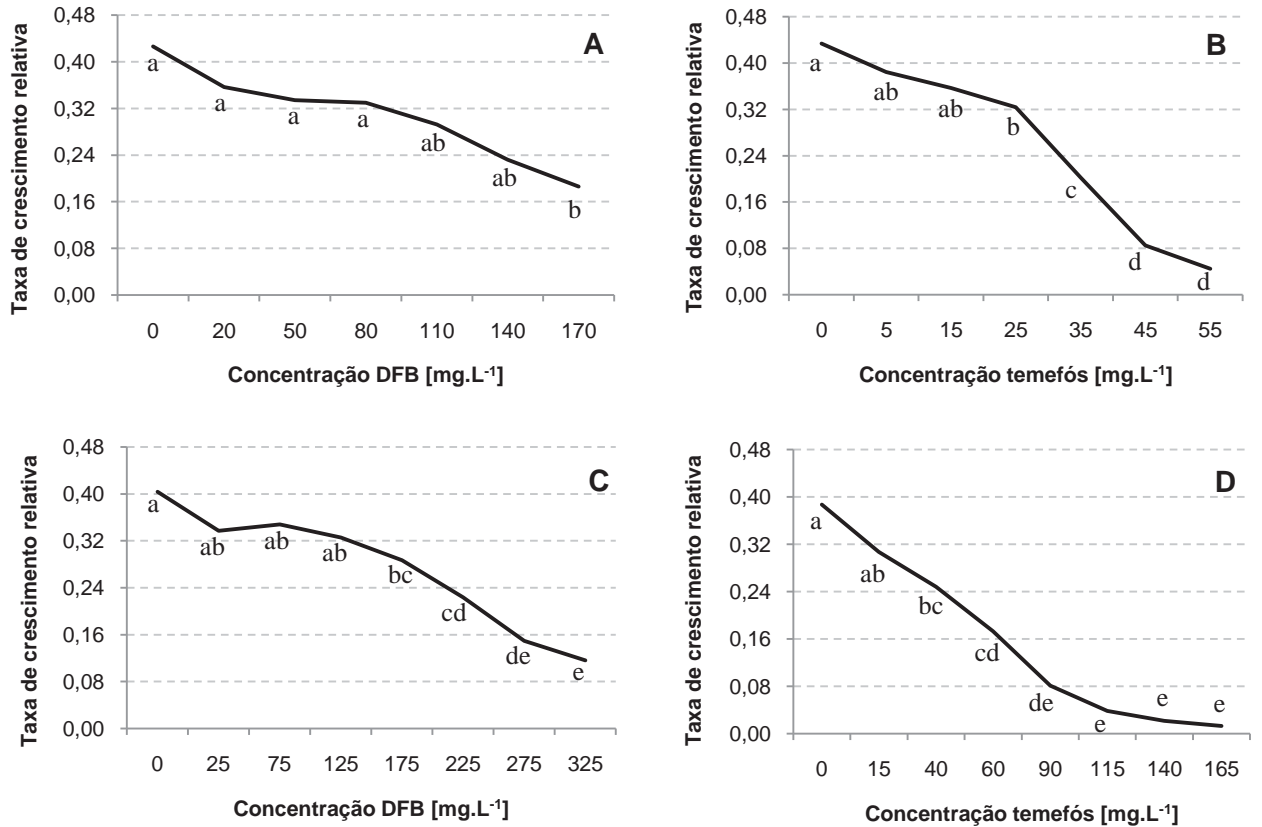


Figura 10. Taxa de crescimento relativa de frondes ao longo das concentrações nos testes de toxicidade aguda na ausência e presença de sedimento para a macrófita *L. minor*. A-B: DFB e temefós na ausência de sedimento, respectivamente. C-D: DFB e temefós na presença de sedimento, respectivamente. As pressuposições para a análise de variância foram satisfeitas (Teste de Homocedasticidade Brown Forsythe $F=0,23$ e $p=0,9203$ para A; $F=0,52$ e $p=0,7226$ para B; $F=0,25$ e $p=0,8233$ para C e $F=0,43$ e $p=0,7230$ para D; Teste de Normalidade dos Erros Cramer-von Mises $wsq=0,07$ e $p=0,2382$ para A; $wsq=0,03$ e $p>0,2500$ para B; $wsq=0,07$ e $p=0,2832$ para C e $wsq=0,05$ e $p>0,2500$ para D). a - e: comparação entre médias das concentrações para cada produto testado. Teste de Tukey com nível de significância a 5%: $F=5,36$ e $p=0,0050$ para A; $F=66,93$ e $p<0,0001$ para B; $F=43,72$ e $p<0,0001$ para C; $F=74,43$ e $p<0,0001$ para D.

Apesar da ação dos inseticidas inibidores de quitina não ser específica para plantas, a redução da taxa de crescimento das macrófitas pode ser relacionada a algum fator fisiológico da planta, que em função da presença do larvicida, priva-se do crescimento na tentativa de responder à detoxificação desse produto (DE LA VEGA SALAZAR et al. 1997).

Para os testes de toxicidade crônica, houve diminuição significativa na taxa de crescimento relativa apenas para temefós na ausência de sedimento ($p < 0,05$) (Figura 11).

Os valores calculados de CENO e CEO foram baseados na taxa de crescimento relativa das frondes dos testes crônicos, para verificar os limites de concentrações dos larvicidas que causam ou não efeitos deletérios para a macrófita.

Para DFB estes valores não foram encontrados, pois estatisticamente não houve diferença significativa na taxa de crescimento relativa da macrófita. Para temefós, os valores de CENO e CEO foram 0,4 e 2,0 mg.L^{-1} , com valor crônico de 1,2 mg.L^{-1} .

A CAE recomendada pelo Ministério da Saúde para temefós e utilizada em campo é de 1 mg.L^{-1} , valor 2,5 vezes superior à maior concentração do larvicida que não provoca efeito significativamente deletério para *L. minor* (0,4 mg.L^{-1}).

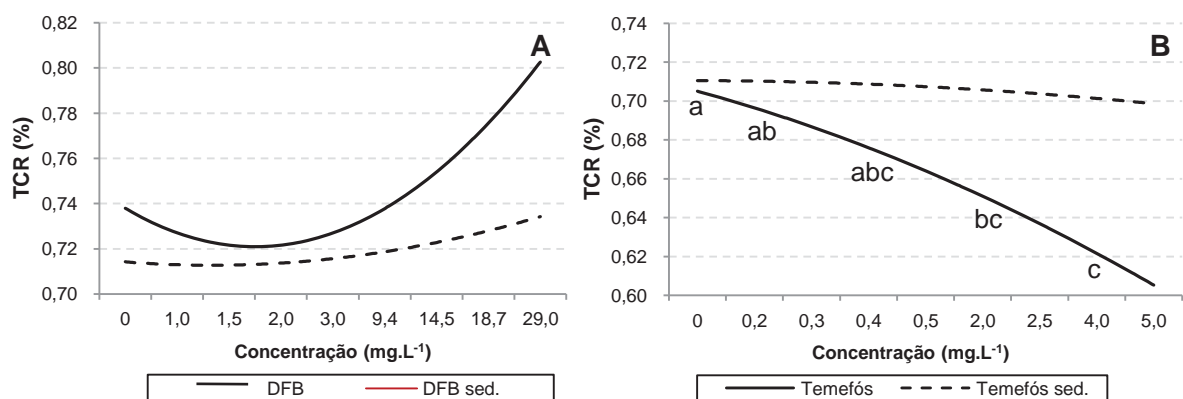


Figura 11. Taxa de crescimento relativa dos testes de toxicidade crônica de *L. minor* na presença e ausência de sedimento para DFB e temefós. As pressuposições para a análise de variância foram satisfeitas (Teste de Homocedasticidade Brown Forsythe $F=0,33$ e $p=0,8235$ para DFB; $F=0,42$ e $p=0,7968$ para DFB com sedimento; $F=0,32$ e $p=0,7006$ para temefós e $F=0,39$ e $p=0,8975$ para temefós com sedimento; Teste de Normalidade dos Erros Cramer-von Mises $wsq=0,07$ e $p=0,2222$ para DFB; $wsq=0,04$ e $p>0,2500$ para DFB com sedimento; $wsq=0,03$ e $p>0,2500$ para temefós e $wsq=0,03$ e $p>0,2500$ para temefós com sedimento). a-c: comparação entre médias das concentrações. Teste de Tukey com nível de significância a 5%: DFB: $F=0,33$ e $p=0,8523$. Temefós: $F=10,43$ e $p=0,0110$. DFB com sedimento: $F=0,10$ e $p=0,9838$. Temefós com sedimento: $F=2,45$ e $p=0,1897$.

A qualidade da água foi avaliada ao longo dos testes de toxicidade de *L. minor*. Os dados de temperatura não foram avaliados com o Coeficiente de Correlação de Pearson, pois as salas de ensaio são climatizadas, com temperatura e umidade do ambiente aferidas diariamente. Variações baixas de temperatura podem ser relacionadas com a presença, entrada e saída de pessoas da sala de ensaio. Entretanto, as medidas foram realizadas ao longo dos testes para detectar possíveis mudanças bruscas que poderiam afetar a veracidade dos resultados.

Em relação aos testes agudos com o larvicida DFB, a condutividade elétrica, o pH e o OD da água diminuíram com o aumento das concentrações nos testes sem sedimento, sendo significativo ($p < 0,05$) quanto aplicado o Teste de Correlação de Pearson (Figuras 12 e 13).

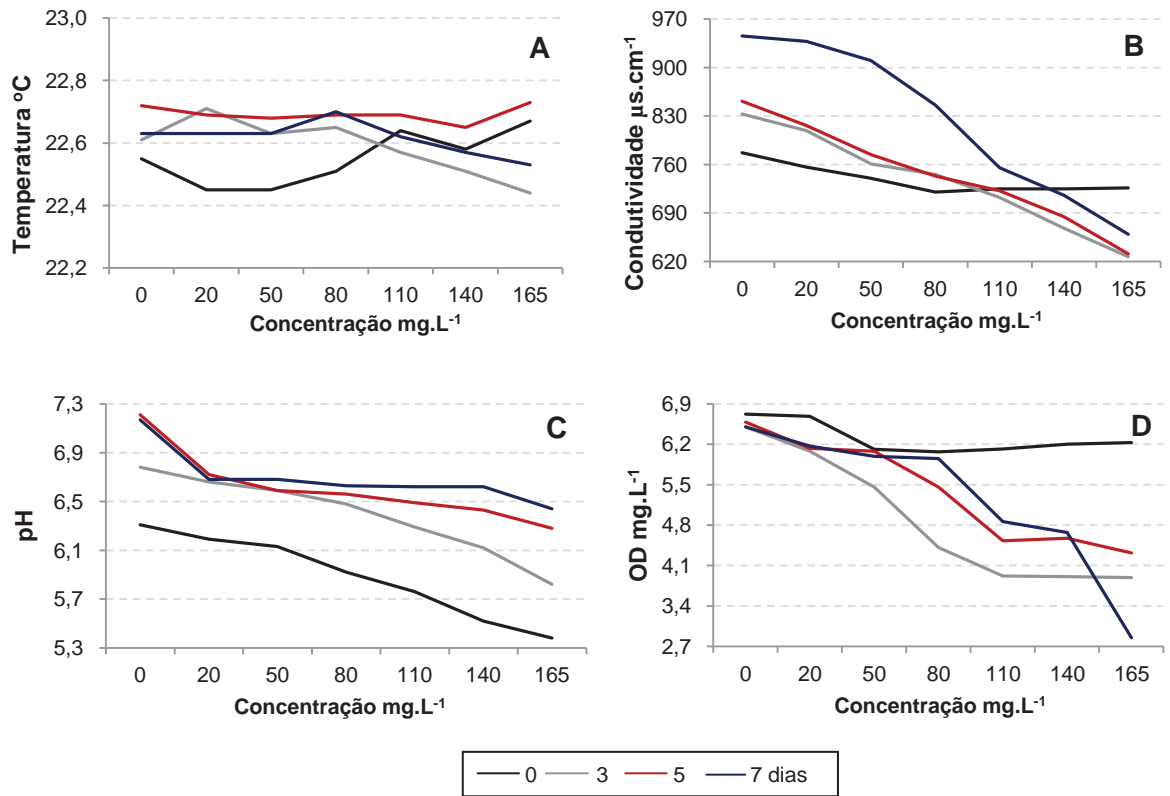


Figura 12. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de DFB entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade aguda sem sedimento para *L. minor*. Teste de Coeficiente de Correlação de Pearson (alfa=5%). B: $r=-0,7678$ e $p<0,0001$ para 0 hora; $r=-0,9903$ e $p<0,0001$ para 3º dia; $r=-0,9890$ e $p<0,0001$ para 5º dia; $r=-0,9653$ e $p<0,0001$ para 7º dia; C: $r=-0,9507$ e $p<0,0001$ para 0 hora; $r=-0,9502$ e $p<0,0001$ para 3º dia; $r=-0,8089$ e $p<0,0001$ para 5º dia; $r=-0,6073$ e $p<0,0001$ para 7º dia; D: $r=-0,5941$ e $p<0,0001$ para 0 hora; $r=-0,9231$ e $p<0,0001$ para 3º dia; $r=-0,9486$ e $p<0,0001$ para 5º dia; $r=-0,8736$ e $p<0,0001$ para 7º dia.

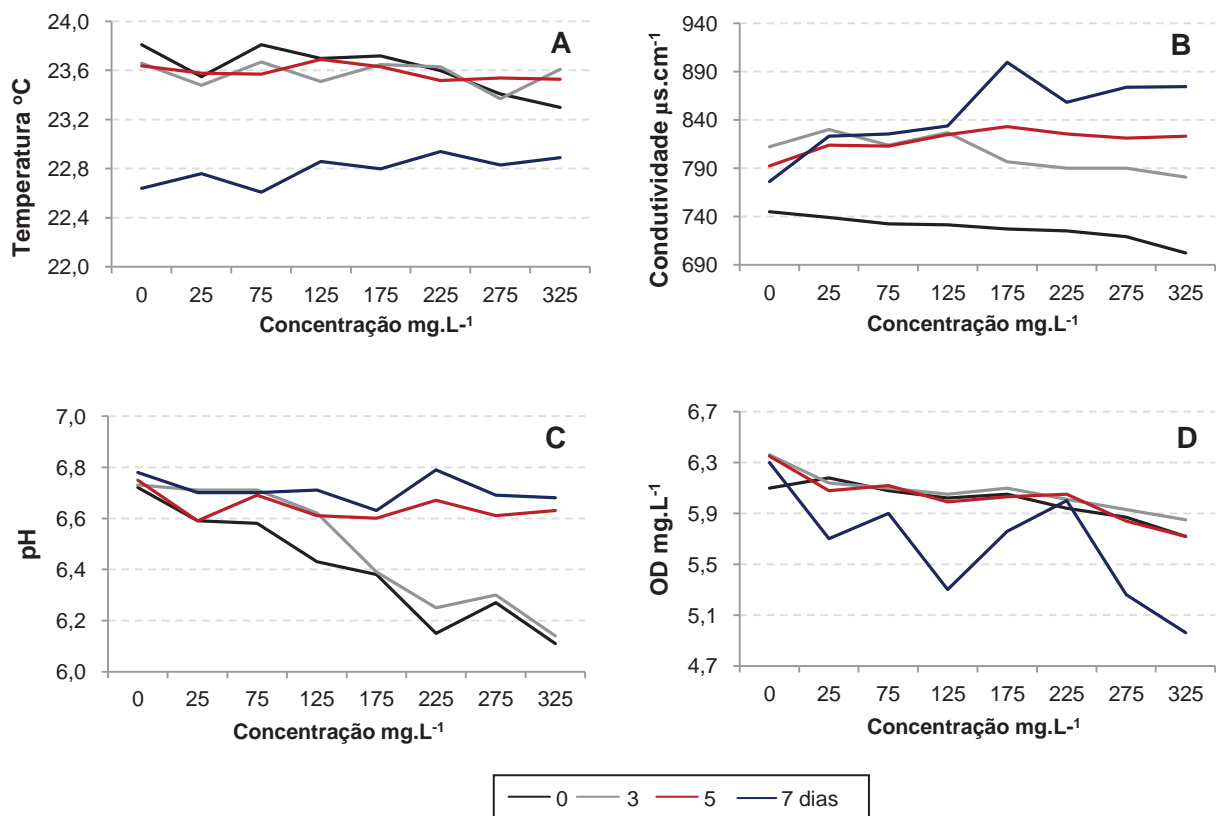


Figura 13. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de DFB entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade aguda com sedimento para *L. minor*. Teste de Coeficiente de Correlação de Pearson (alfa=5%). B: $r=-0,7812$ e $p<0,0001$ para 0 hora; $r=-0,7996$ e $p<0,0001$ para 3º dia; $r=0,5908$ e $p<0,0001$ para 5º dia; $r=0,7930$ e $p<0,0001$ para 7º dia; C: $r=-0,9052$ e $p<0,0001$ para 0 hora; $r=-0,9120$ e $p<0,0001$ para 3º dia; $r=-0,2216$ e $p=0,0614$ para 5º dia; $r=-0,1847$ e $p=0,1203$ para 7º dia; D: $r=-0,7478$ e $p<0,0001$ para 0 hora; $r=-0,8199$ e $p<0,0001$ para 3º dia; $r=-0,8326$ e $p<0,0001$ para 5º dia; $r=-0,7206$ e $p<0,0001$ para 7º dia.

Testes crônicos de DFB apresentaram diminuição dos parâmetros condutividade elétrica, pH e OD a partir do 7º dia nas maiores concentrações na presença e ausência de sedimento, como também ocorreu nos testes agudos (Figuras 14 e 15). Mesmo em baixas concentrações, a presença do larvicida DFB influenciou os parâmetros mensurados.

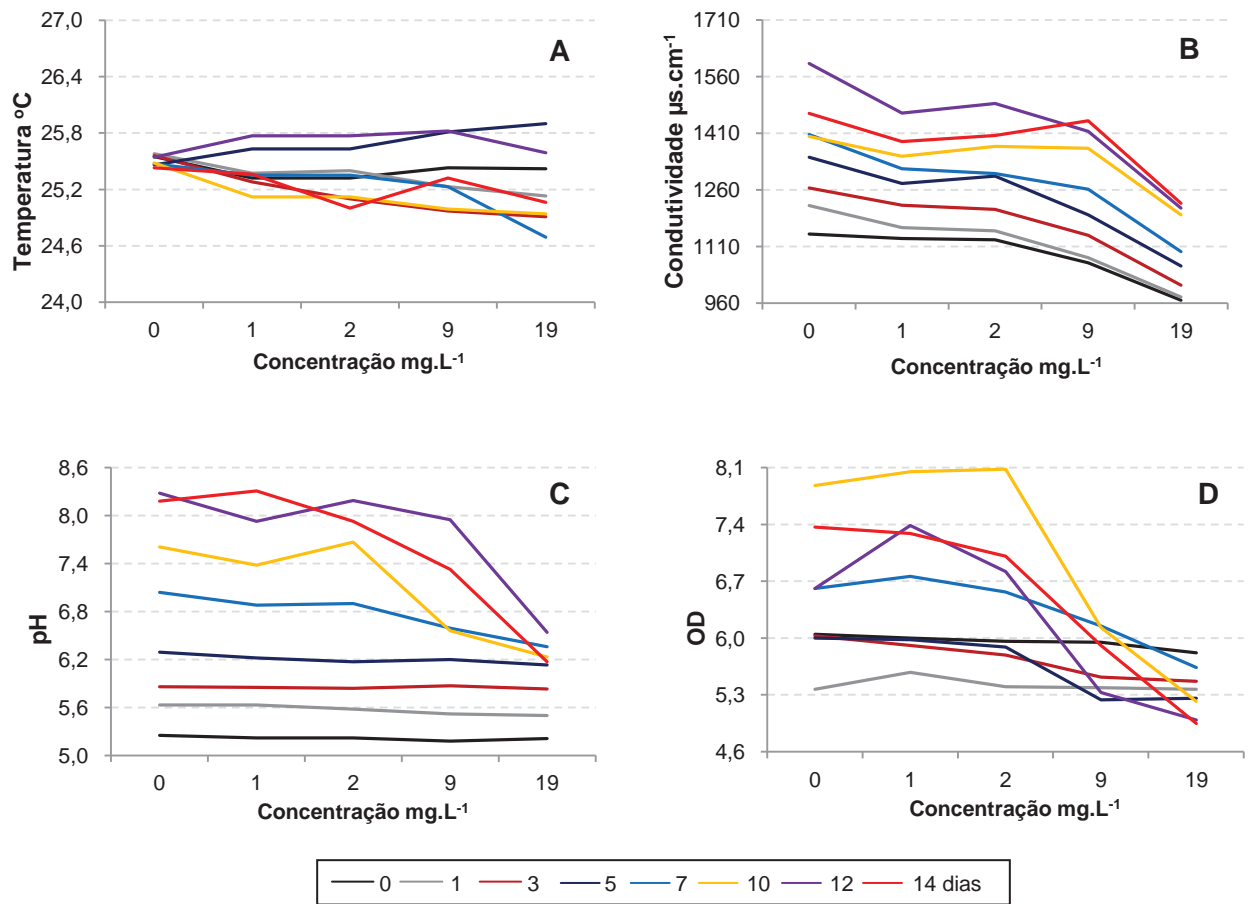


Figura 14. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de DFB entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade crônica sem sedimento para *L. minor*. Teste de Coeficiente de Correlação de Pearson (alfa=5%). B: $r=-0,9826$ e $p<0,0001$ para 0 hora; $r=-0,9738$ e $p<0,0001$ para 1º dia; $r=-0,9832$ e $p<0,0001$ para 3º dia; $r=-0,9639$ e $p<0,0001$ para 5º dia; $r=-0,9180$ e $p<0,0001$ para 7º dia; $r=-0,8310$ e $p<0,0001$ para 10º dia; $r=-0,9170$ e $p<0,0001$ para 12º dia; $r=-0,7634$ e $p<0,0001$ para 14º dia; C: $r=-0,2278$ e $p=0,1323$ para 0 hora; $r=-0,5246$ e $p=0,0002$ para 1º dia; $r=-0,0686$ e $p=0,6544$ para 3º dia; $r=-0,4637$ e $p=0,0013$ para 5º dia; $r=-0,9214$ e $p<0,0001$ para 7º dia; $r=-0,9254$ e $p<0,0001$ para 10º dia; $r=-0,9038$ e $p<0,0001$ para 12º dia; $r=-0,9723$ e $p<0,0001$ para 14º dia; D: $r=-0,6191$ e $p<0,0001$ para 0 hora; $r=-0,2685$ e $p=0,0745$ para 1º dia; $r=-0,8631$ e $p<0,0001$ para 3º dia; $r=-0,8895$ e $p<0,0001$ para 5º dia; $r=-0,9436$ e $p<0,0001$ para 7º dia; $r=-0,9426$ e $p<0,0001$ para 10º dia; $r=-0,8912$ e $p<0,0001$ para 12º dia; $r=-0,9860$ e $p<0,0001$ para 14º dia.

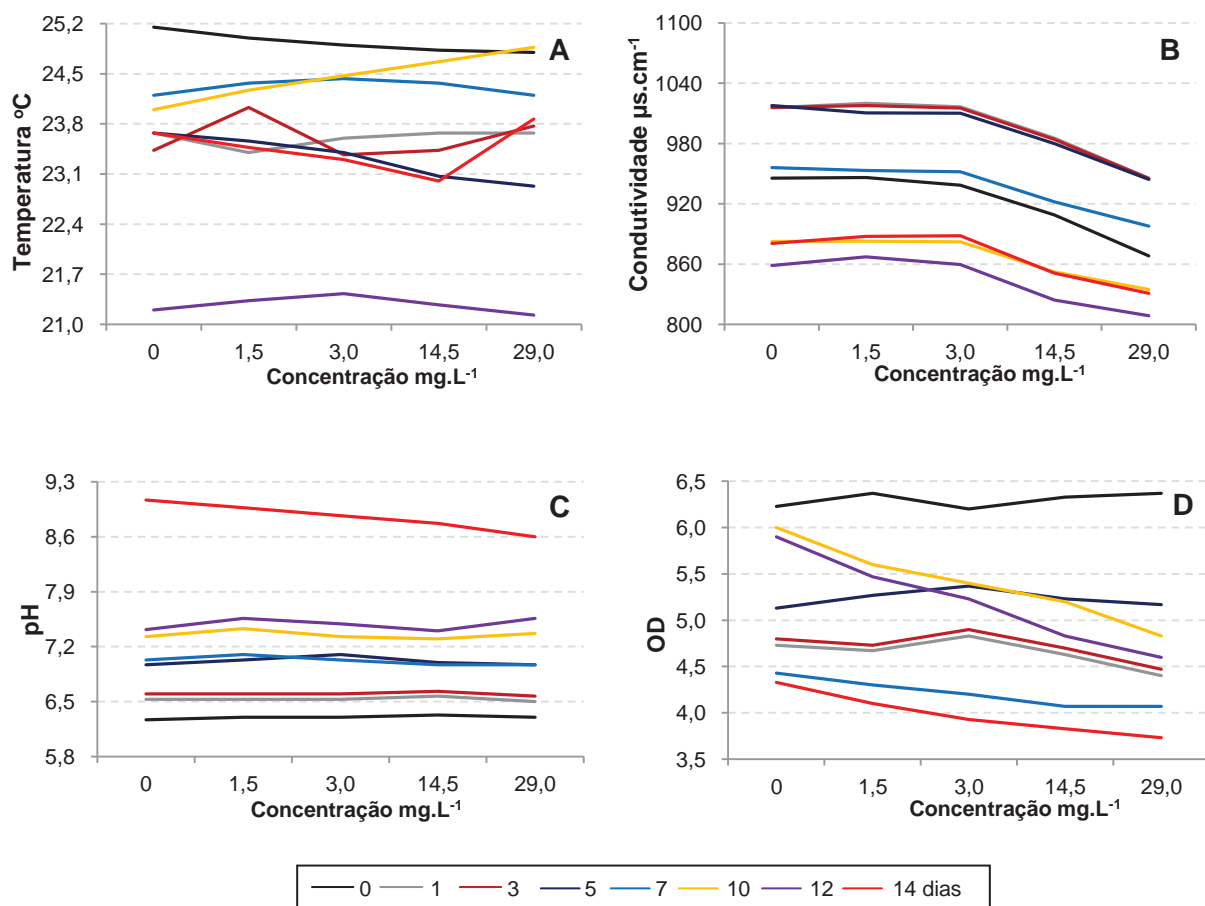


Figura 15. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de DFB entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade crônica com sedimento para *L. minor*. Teste de Coeficiente de Correlação de Pearson (alfa=5%). B: $r=-0,9971$ e $p<0,0001$ para 0 hora; $r=-0,9898$ e $p<0,0001$ para 1º dia; $r=-0,9871$ e $p<0,0001$ para 3º dia; $r=-0,9898$ e $p<0,0001$ para 5º dia; $r=-0,9801$ e $p<0,0001$ para 7º dia; $r=-0,9520$ e $p<0,0001$ para 10º dia; $r=-0,9160$ e $p<0,0001$ para 12º dia; $r=-0,8302$ e $p=0,0001$ para 14º dia; C: $r=0,2413$ e $p=0,3862$ para 0 hora; $r=-0,1869$ e $p=0,5047$ para 1º dia; $r=-0,0804$ e $p=0,7757$ para 3º dia; $r=-0,3191$ e $p=0,2464$ para 5º dia; $r=-0,6029$ e $p=0,0174$ para 7º dia; $r=-0,0963$ e $p=0,7327$ para 10º dia; $r=-0,0963$ e $p=0,7327$ para 12º dia; $r=-0,6401$ e $p=0,0102$ para 14º dia; D: $r=0,4183$ e $p=0,1207$ para 0 hora; $r=0,7735$ e $p=0,0007$ para 1º dia; $r=-0,7499$ e $p=0,0013$ para 3º dia; $r=-0,2382$ e $p=0,3926$ para 5º dia; $r=-0,7884$ e $p=0,0005$ para 7º dia; $r=-0,8661$ e $p<0,0001$ para 10º dia; $r=-0,8774$ e $p<0,0001$ para 12º dia; $r=-0,7970$ e $p=0,0004$ para 14º dia.

O inibidor de síntese de quitina teflubenzuron também causou diminuição do valor do oxigênio dissolvido da água, que variou entre 2,63 mg.L⁻¹ no controle

e $0,73 \text{ mg.L}^{-1}$ em 1000 ppm do produto após 48 horas de exposição (IKEFUTI et al. 2011).

O decréscimo de oxigênio disponível no sistema pode ser relacionado com a maior quantidade de macrófitas em decomposição nas maiores concentrações dos larvicidas. A decomposição aeróbica, realizada por microorganismos, consome oxigênio dissolvido da água e, como resultado de seu metabolismo, libera dióxido de carbono. Altas quantidades de CO_2 tendem a diminuir o pH (ESTEVES, 1998).

A influência do pH sobre os ecossistemas aquáticos naturais ocorre diretamente sobre a fisiologia das diversas espécies. Efeitos indiretos também podem contribuir na solubilidade de nutrientes, e precipitação de elementos químicos tóxicos, como metais pesados (PIVELI e KATO, 2005).

Com relação ao larvicida temefós, em testes agudos na presença e ausência de sedimento, houve correlação negativa com os parâmetros pH e OD, entretanto, para condutividade elétrica, a correlação foi positiva em testes sem e com sedimento ($p < 0,05$) (Figuras 16 e 17).

O organofosforado temefós aumentou a condutividade elétrica, enquanto o DFB diminui este parâmetro. O decréscimo no valor de pH também pode ser correlacionado com o decréscimo de OD, devido a maior quantidade de macrófitas em decomposição nas maiores concentrações dos larvicidas e, conseqüentemente, maior consumo de oxigênio dissolvido e liberação de dióxido de carbono. O acúmulo de gases de dióxido de carbono e ácido carbônico aumenta a quantidade de íons H^+ no sistema, tornando-o mais ácido (ESTEVES, 1998).

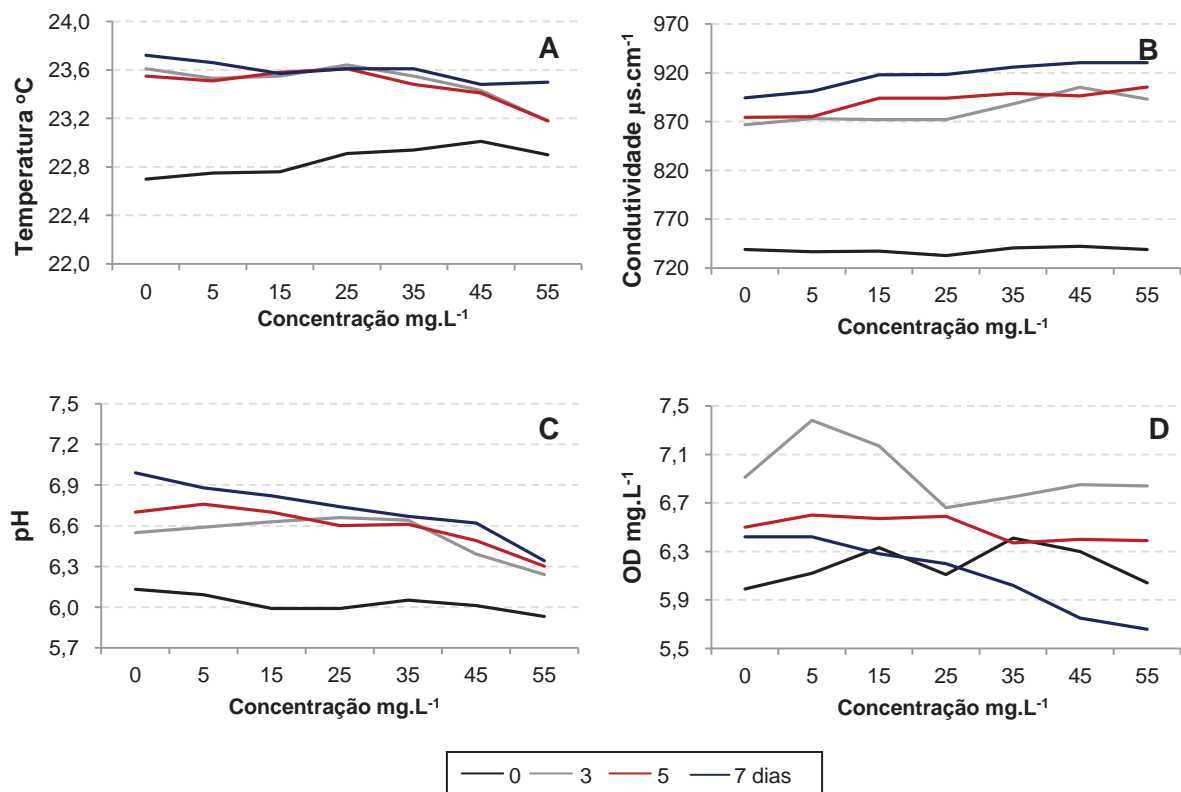


Figura 16. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de temefós entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade aguda sem sedimento para *L. minor*. Teste de Coeficiente de Correlação de Pearson (alfa=5%). B: $r=0,1128$ e $p=0,3788$ para 0 hora; $r=0,7045$ e $p<0,0001$ para 3º dia; $r=0,7232$ e $p<0,0001$ para 5º dia; $r=0,5767$ e $p<0,0001$ para 7º dia; C: $r=-0,4731$ e $p<0,0001$ para 0 hora; $r=-0,5629$ e $p<0,0001$ para 3º dia; $r=-0,7810$ e $p<0,0001$ para 5º dia; $r=-0,7870$ e $p<0,0001$ para 7º dia; D: $r=0,2181$ e $p=0,0859$ para 0 hora; $r=-0,4774$ e $p<0,0001$ para 3º dia; $r=-0,5448$ e $p<0,0001$ para 5º dia; $r=-0,7929$ e $p<0,0001$ para 7º dia.

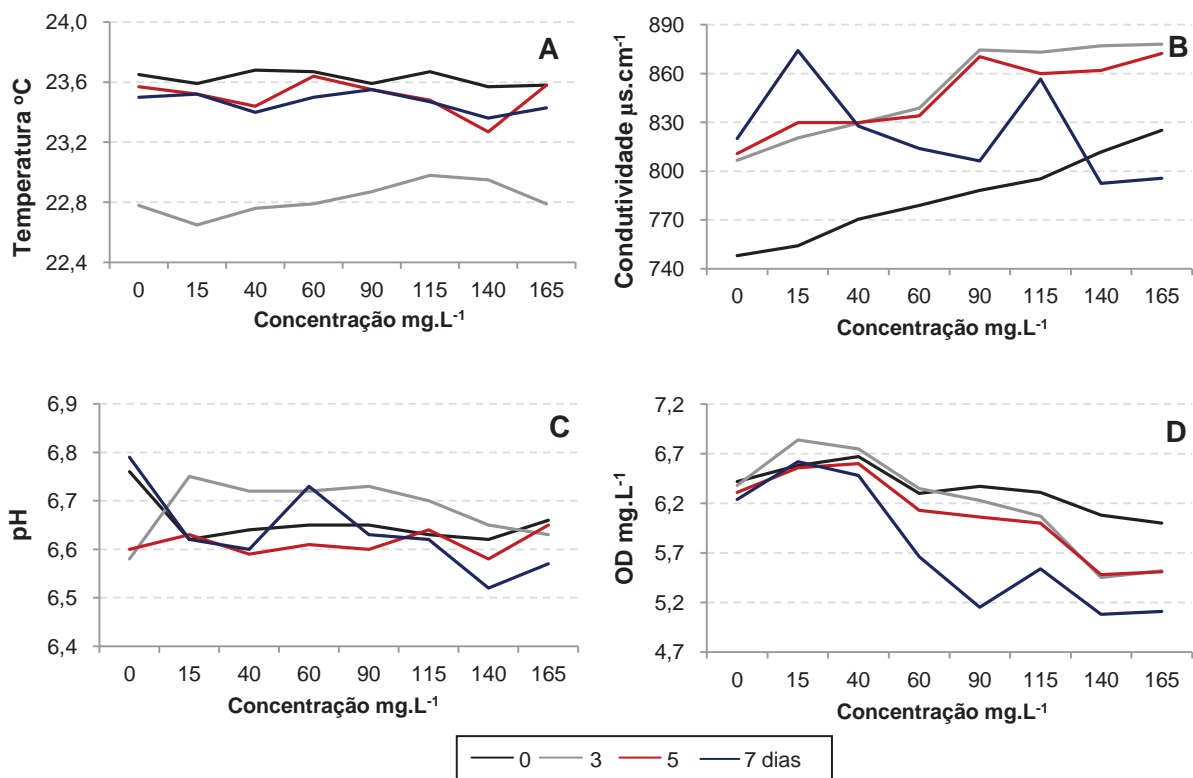


Figura 17. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de temefós entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade aguda com sedimento para *L. minor*. Teste de Coeficiente de Correlação de Pearson (alfa=5%). B: $r=0,9505$ e $p<0,0001$ para 0 hora; $r=0,9207$ e $p<0,0001$ para 3º dia; $r=0,8684$ e $p<0,0001$ para 5º dia; $r=-0,5128$ e $p<0,0001$ para 7º dia; C: $r=-0,2462$ e $p=0,0371$ para 0 hora; $r=-0,0903$ e $p=0,4507$ para 3º dia; $r=0,1032$ e $p=0,3885$ para 5º dia; $r=-0,5858$ e $p<0,0001$ para 7º dia; D: $r=-0,7951$ e $p<0,0001$ para 0 hora; $r=-0,8753$ e $p<0,0001$ para 3º dia; $r=-0,8915$ e $p<0,0001$ para 5º dia; $r=-0,8695$ e $p<0,0001$ para 7º dia.

Nos testes crônicos de temefós, não houve correlação significativa entre a condutividade elétrica e as concentrações na ausência de sedimento ($p>0,05$). Contudo, na presença de sedimento, este parâmetro aumentou com o aumento das concentrações a partir do 10º dia ($p<0,05$). Houve correlação negativa significativa entre a redução de pH e o aumento das concentrações ($p<0,05$) (Figura 18 e 19), assim como ocorreu para o larvicida DFB, devido a diminuição da quantidade de OD disponível na água e consequente acidificação do meio.

Mesmo em baixas concentrações, ambos os larvicidas alteraram a condutividade elétrica e, indiretamente, os parâmetros OD e pH, com a provável diminuição da taxa de fotossíntese.

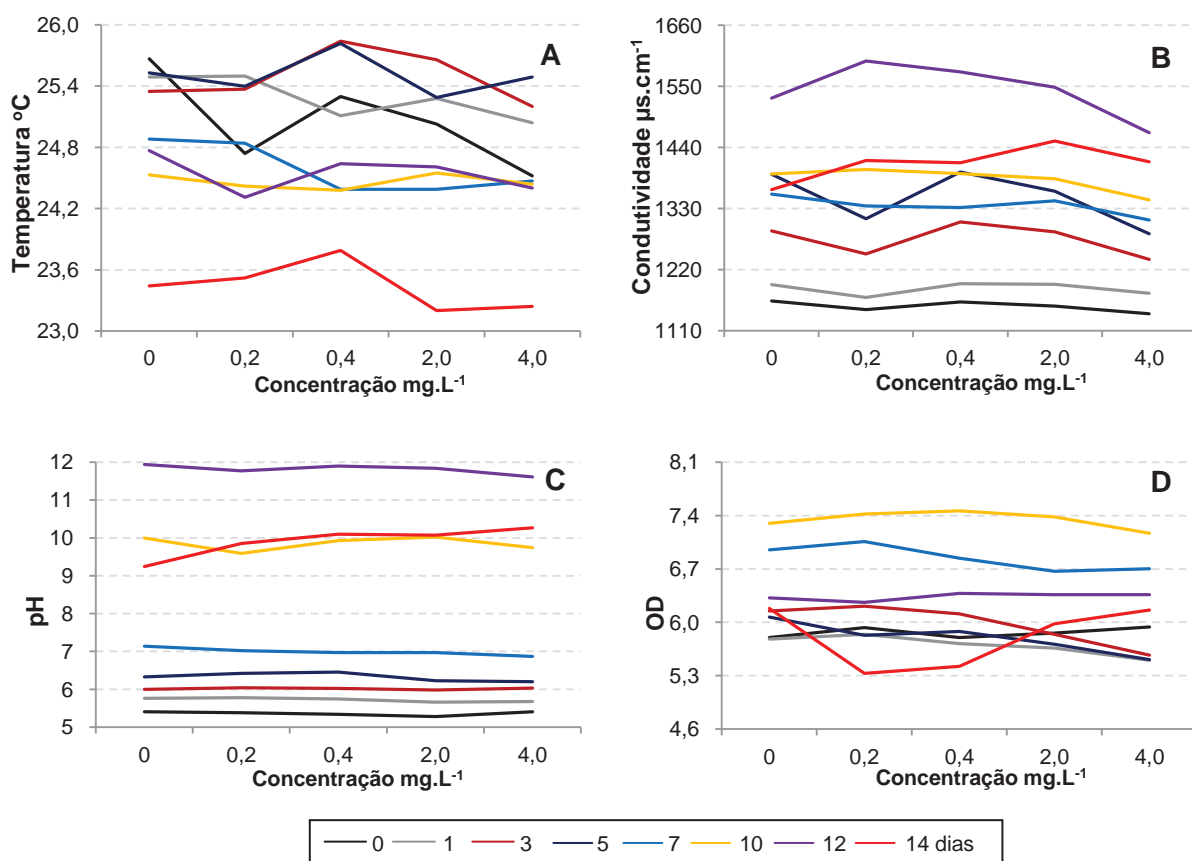


Figura 18. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de temefós entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade crônica sem sedimento para *L. minor*. Teste de Coeficiente de Correlação de Pearson (alfa=5%). B: $r=-0,4712$ e $p=0,0762$ para 0 hora; $r=-0,0928$ e $p=0,7423$ para 1^o dia; $r=-0,2296$ e $p=0,4103$ para 3^o dia; $r=-0,3178$ e $p=0,2483$ para 5^o dia; $r=-0,3356$ e $p=0,2213$ para 7^o dia; $r=-0,4036$ e $p=0,1358$ para 10^o dia; $r=-0,6353$ e $p=0,0109$ para 12^o dia; $r=0,2410$ e $p=0,3869$ para 14^o dia; C: $r=0,0059$ e $p=0,9833$ para 0 hora; $r=-0,3578$ e $p=0,1904$ para 1^o dia; $r=0,0253$ e $p=0,9286$ para 3^o dia; $r=-0,7882$ e $p=0,0005$ para 5^o dia; $r=-0,6011$ e $p=0,0178$ para 7^o dia; $r=-0,0752$ e $p=0,7898$ para 10^o dia; $r=-0,5302$ e $p=0,0421$ para 12^o dia; $r=0,5725$ e $p=0,0257$ para 14^o dia; D: $r=0,2889$ e $p=0,2964$ para 0 hora; $r=-0,7166$ e $p=0,0026$ para 1^o dia; $r=-0,9477$ e $p<0,0001$ para 3^o dia; $r=-0,9018$ e $p<0,0001$ para 5^o dia; $r=-0,5107$ e $p=0,0517$ para 7^o dia; $r=-0,4993$ e $p=0,0581$ para 10^o dia; $r=0,1361$ e $p=0,6287$ para 12^o dia; $r=0,8269$ e $p=0,0001$ para 14^o dia.

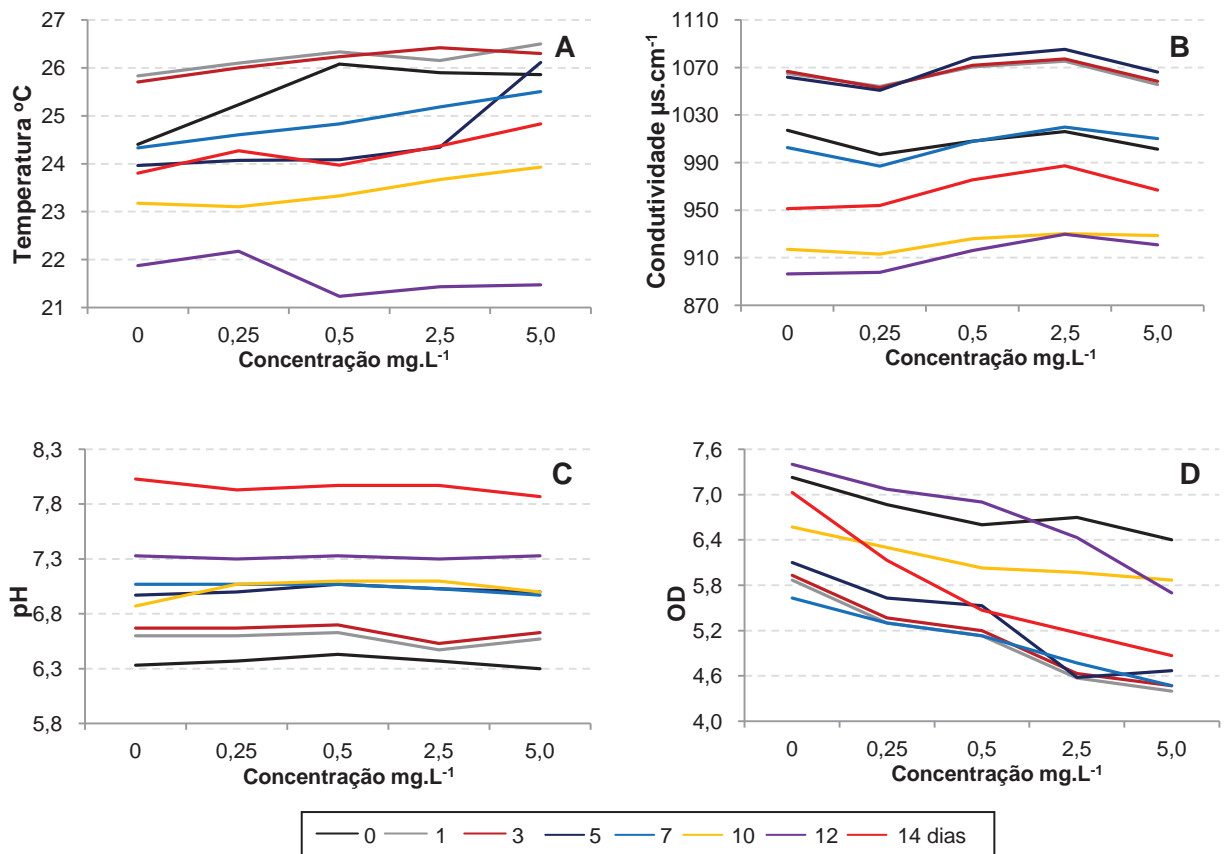


Figura 19. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de temefós entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade crônica com sedimento para *L. minor*. Teste de Coeficiente de Correlação de Pearson (alfa=5%). B: $r=-0,1558$ e $p=0,5792$ para 0 hora; $r=-0,1449$ e $p=0,6064$ para 1^o dia; $r=-0,0639$ e $p=0,8211$ para 3^o dia; $r=0,2303$ e $p=0,4089$ para 5^o dia; $r=0,4861$ e $p=0,0662$ para 7^o dia; $r=0,6265$ e $p=0,0125$ para 10^o dia; $r=0,6180$ e $p=0,0141$ para 12^o dia; $r=0,3151$ e $p=0,2526$ para 14^o dia; C: $r=-0,3633$ e $p=0,1832$ para 0 hora; $r=-0,4089$ e $p=0,302$ para 1^o dia; $r=-0,2316$ e $p=0,4062$ para 3^o dia; $r=0,0141$ e $p=0,9602$ para 5^o dia; $r=-0,6277$ e $p=0,0122$ para 7^o dia; $r=0,1099$ e $p=0,6966$ para 10^o dia; $r=0,0484$ e $p=0,8641$ para 12^o dia; $r=-0,1527$ e $p=0,5869$ para 14^o dia; D: $r=-0,6932$ e $p=0,0042$ para 0 hora; $r=-0,8265$ e $p=0,0001$ para 1^o dia; $r=-0,8073$ e $p=0,0003$ para 3^o dia; $r=-0,8473$ e $p<0,0001$ para 5^o dia; $r=-0,9262$ e $p<0,0001$ para 7^o dia; $r=-0,7291$ e $p=0,0020$ para 10^o dia; $r=-0,9342$ e $p<0,0001$ para 12^o dia; $r=-0,7798$ e $p=0,0006$ para 14^o dia.

CONCLUSÃO

Este estudo indica que o larvicida temefós tem maior ação tóxica que o DFB para *L. minor*. A CI50 do organofosforado temefós é 19,7 e 25,1 mg.L⁻¹ na ausência e presença de sedimento, respectivamente, e a CI50 de DFB é 103,6 e 140,2 mg.L⁻¹ na ausência e presença de sedimento, respectivamente.

Em testes agudos na presença de sedimento o crescimento de frondes é maior. Contudo, a taxa de crescimento relativa da macrófita nas maiores concentrações é menor.

O DFB classifica-se como praticamente não tóxico para *L. minor*, com baixo risco de intoxicação ambiental, enquanto o temefós é ligeiramente tóxico, com médio risco de intoxicação ambiental para a macrófita.

Testes crônicos apresentaram efeitos deletérios apenas com temefós e na ausência de sedimento, e baixas concentrações de DBF não provocam efeitos adversos, mesmo quando as macrófitas são expostas ao produto por período prolongado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- DECKER, C. J.; DOERGE, D. R. Covalent binding of 14C- and 35S-labeled thiocarbamides in rat hepatic microsomes. *Biochemical Pharmacology*, v. 43, p. 881-888.
- 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. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 38, p. 53-62, 1997.

- ESTEVEES, F. A. *Fundamentos de Limnologia*. 2 ed., Rio de Janeiro: Interciência, 1998.
- FUJIMOTO, R. Y.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; ONAKA, E. M. Utilização do diflubenzuron no controle de crustáceos parasitos de piaçu, *Leporinus macrocephalus*. Efeitos paraticida e parâmetros hematológicos. *Anais do XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 133p. 1999.
- GOKTEPE, I.; PORTIER, R.; AHMEDNA, M. Ecological risk assessment of Neem-based pesticides. *Journal of Environmental Science Health Part B. Pestic. Food Contam. Agric. Wastes B.* v. 39, n. 2, p. 311-320, 2004.
- GUILLARD, R. R. L. Division rates. In: *Handbook of phycolgical 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. Trimed Sperm-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicology bioassays. *Environmental Science and Technology*. v. 7, p. 714-719, 1977.
- IKEFUTI, C. V.; CARRASCHI, S. P.; SERVIDONE, J. S.; FLORÊNCIO, T.; CRUZ, C.; ONAKA, E. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Risco ambiental do inseticida teflubenzuron para o pacu, *Piaractus mesopotamicus*. *Anais da X Reunião Científica do Instituto de Pesca*, p.168-170, 2011.
- KYLE, P. B. *Inactivation of cytochrome P450 3^a during the oxidative desulfuration of methyl parathion*. Dissertação (Doctor of Philosophy), University of Mississippi Medical Center, Mississippi, 127p, 2005.
- LI, T. Y.; XIONG, Z. T. Cadmium-induced colony disintegration of duckweed (*Lemna poucicostata* Hegelm.) and as biomarker of phytotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, San Diego, v. 59, n. 2, p. 174-179. 2004.
- MEDEIROS, L. S. *Toxicidade aguda e risco ambiental do inseticida teflubenzuron para Daphnia magna, Lemna minor e Poecilia reticulata*. Dissertação (Mestrado em Aquicultura de Águas Continentais), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 54p. 2008.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Endemias Rurais – Métodos de trabalho adotados pelo DNERu*. Departamento Nacional de Endemias Rurais. Rio de Janeiro, 1968.
- 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.
- MUNKEGAARD, M.; ABBASPOOR, M.; CEDERGREEN, N. Organophosphorous insecticides as herbicide synergists on the green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and the aquatic plant *Lemna minor*. *Ecotoxicology*, v. 17, p. 29–35, 2008.
- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. *Final report of the OECD workshop selection of soils/sediments*. Belgrate, Italy. p. 1-55, Jun. 1995.
- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. *Lemna sp. Growth Inhibition Test*. In: GUIDELINE for testing of chemicals, 2002.
- PIVELI, R. P.; KATO, M. T. *Qualidade das águas e poluição: aspectos físico-químicos*. 1 ed., São Paulo: ABES, 2005.
- SAS Institute Inc. SAS® 9.0 Language Reference: Concepts. Cary, NC: SAS Institute Inc, 2001.
- SOUZA, J. P. *Toxicidade aguda e risco ambiental do diflubenzuron para Daphnia magna, Poecilia reticulata e Lemna minor na ausência e presença de sedimento*. Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 78p, 2008.
- TARDIF, F. J.; POWLES, S. B.; Effect of malathion on resistance to soil-applied herbicides in a population of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Science*, v. 47, p. 258-261, 1999.
- TESTA, B.; JENNER, P. Drug metabolism: chemical and biochemical aspects. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences Marcel Dekker*, New York: Dekker, 1976, 500p.

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: 27 Jan. 2010.

ZUCKER, E. Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure Acute toxicity test for freshwater fish. Washington. *USEPA Publication*, 540/9-85-006, 1985.

V. CAPÍTULO II

Avaliação ecotoxicológica dos larvicidas diflubenzuron e temefós para peixes

INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos são fundamentais para a vida na Terra. Entretanto, o aumento das atividades antrópicas causa diversos impactos ambientais, tornando estes ambientes cada vez mais impróprios para o uso humano e para a sobrevivência das espécies em seu habitat nativo.

O desequilíbrio ambiental pode ter diversas origens, como de atividades industriais, urbanas e/ou agrícolas, e o controle dos pontos de entrada de poluentes é baixo, por serem difusos e dependerem de outros fatores, como chuvas, temperaturas, ventos (ESTEVES, 1998). Um importante poluente destas atividades antrópicas são os inseticidas.

Grandes parcelas das comunidades bióticas são afetadas direta e indiretamente pelos poluentes, como por exemplo, com a contaminação de solos e lençóis freáticos. Outra parcela que sofre vários danos com o uso dos inseticidas são os organismos aquáticos. O nicho ecológico destes ambientes é diretamente afetado, e a sobrevivência das espécies ali presentes torna-se ameaçada.

A intensificação das atividades agrícolas e urbanas, com fins lucrativos ou de saneamento básico, requer maior demanda de inseticidas e, por conseguinte, causa maior impacto ambiental. Dois inseticidas frequentemente usados em tais atividades são o diflubenzuron (DFB) e o temefós, ambos larvicidas. Nos últimos tempos, ambos vêm sendo muito usados no combate ao vetor da dengue, uma doença epidemiológica de origem asiática.

O organofosforado temefós age na inibição da enzima acetilcolinesterase, ligando-se ao seu sítio ativo, impedindo a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), o que provoca acúmulo de ACh nas terminações nervosas, sinapses aleatórias e espasmos musculares, até a paralisia do inseto (MADDRELL, 1980). Já o DFB atua na síntese de quitina, impedindo a ecdise das larvas de *A. aegypti* (MARTINS e SILVA, 2004).

No uso em saúde pública, agricultura e em aqüicultura, os larvicidas DFB e temefós contêm determinado risco de intoxicação dos organismos não alvos. Entretanto, a ecotoxicidade destes inseticidas para estes organismos ainda é pouco estudada. Objetivou-se neste trabalho determinar a toxicidade aguda e crônica dos inseticidas DFB e temefós para os peixes tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e mato grosso (*Hyphessobrycon eques*), na presença e ausência de sedimento, e classificar os dois larvicidas pelo risco agudo e risco crônico para os organismos-testes.

MATERIAL E MÉTODOS

Os testes de toxicidade aguda e crônica foram conduzidos no Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional da Faculdade de

Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal. Os produtos comerciais utilizados foram o Diflubenzuron 25% Champion[®] e o Temefós Fersol 1G[®].

1. Criação e aclimação dos organismos-testes

Os peixes da espécie *H. eques* foram criados no Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia da FCAV/ UNESP, campus de Jaboticabal, e os da espécie *O. niloticus* foram obtidos do setor de Tilapicultura do Centro de Aquicultura da UNESP, campus de Jaboticabal. A aclimação dos animais ocorreu durante 15 dias em tanques de 500 litros de capacidade. Os tanques foram abastecidos com água de poço artesiano, renovação e aeração constante e os animais alimentados diariamente com ração comercial (Polinutri[®], 32% de proteína bruta).

Posteriormente, um lote homogêneo de peixes foi transferido para o Laboratório de Ecotoxicologia e Saúde Ocupacional da FCAV/UNESP, campus de Jaboticabal, e aclimatados durante 10 dias em reservatório de 250 litros em sala climatizada com a temperatura ajustada em $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$. A aeração e o fluxo de água foram mantidos constantes. Diariamente, os peixes mortos foram retirados e os detritos precipitados no fundo do tanque foram sifonados (Figura 20).



Figura 20. Exemplos dos peixes *O. niloticus* (A) e *H. eques* (B).

B: Fonte: <http://www.aquaportail.com/aquabdd/photos/hyphessobrycon-eques.jpg>.

2. Testes de sensibilidade com a substância de referência

Os testes sensibilidade foram realizados com cloreto de potássio (KCl), de acordo com a norma NBR 15088:2004 (ABNT, 2004). Para o controle da sensibilidade e sanidade dos organismos após o período de aclimação, os peixes foram expostos às concentrações 0; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 g.L⁻¹ de KCl para mato grosso e 0, 1, 2, 3, 4 e 5 g.L⁻¹ para tilápia, com três repetições de cada tratamento e do controle. Os testes foram conduzidos em sistema estático durante 24 horas, a 27 ± 2°C, com fotoperíodo de 16 horas, sem alimentação, em frascos de vidro de 6 litros com volume final de 3 litros das soluções-teste. Cada réplica recebeu 3 peixes com aproximadamente 1 g cada, totalizando 3 gramas por recipiente-teste. Os testes foram realizados com alevinos de tilápia-do-Nilo e adultos de mato grosso. A concentração letal média (CL50) foi calculada para o teste, assim como o limite superior (LS) e o limite inferior (LI).

3. Testes preliminares com os larvicidas

Os testes preliminares com os dois larvicidas foram conduzidos nas mesmas condições do teste de sensibilidade, na ausência e presença de sedimento, para se determinar a menor concentração que causa 100% de mortalidade e a maior concentração que causa 0% de mortalidade dos peixes.

Em testes na ausência de sedimento, os peixes foram aclimatados por 24 horas nos recipientes-testes com 2 litros de água, e após este período, foram adicionados os larvicidas, com volume final de 3 litros de solução-teste. Nos testes na presença de sedimento, o solo foi mantido nos recipientes com 2 litros de água, por 24 horas, para ocorrer interação entre solo e água, e posteriormente os larvicidas foram adicionados, totalizando 3 litros de solução-teste. Os peixes foram adicionados somente após 24 horas, a fim de que ocorresse interação solo e larvicida. Para cada repetição pesou-se 900 g de sedimento seco.

A cada 24 horas foi observada a mortalidade dos peixes e registradas as variáveis físico-químicas da água (pH, oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade elétrica), durante 48 horas de teste.

4. Testes definitivos de toxicidade aguda com os larvicidas

Os testes definitivos foram realizados sob as mesmas condições experimentais dos testes anteriores, com nove repetições de cada tratamento e do controle. As concentrações para mato grosso foram 0, 1, 5, 10, 12, 14 e 16 mg.L⁻¹ para DFB e 0, 5, 7, 9, 11, 13 e 15 mg.L⁻¹ para temefós nos testes sem sedimento, e 0, 2, 6, 11, 13, 15 e 17 mg.L⁻¹ para DFB e 0, 5, 15, 25, 35, 45 e 55 mg.L⁻¹ para temefós nos testes com sedimento (Figura 21). Para os testes com tilápia, as concentrações foram: 0, 1, 3, 5, 10, 14 e 16 mg.L⁻¹ para DFB e 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg.L⁻¹ para temefós para testes sem sedimento, e 0, 5, 12, 18, 22, 31 e 55 mg.L⁻¹ para DFB e 0, 5, 10, 15, 20 e 25 mg.L⁻¹ para temefós para testes com sedimento.

A mortalidade dos peixes foi observada a cada 24 horas, no período de 48 horas, com subsequente registro das variáveis físico-químicas da água (pH, oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade elétrica).



Figura 21. Aspectos dos testes de toxicidade aguda na ausência (A) e presença de sedimento (B) para *H. eques*.

5. Testes de toxicidade crônica com os larvicidas

O experimento foi realizado nas mesmas condições dos testes de sensibilidade. As concentrações dos larvicidas para matogrosso foram 0; 0,02; 0,04; 0,2 e 0,4 mg.L⁻¹ para DFB e 0; 0,08; 0,16; 0,8 e 1,6 mg.L⁻¹ para temefós em testes sem sedimento, e 0; 0,05; 0,09; 0,5 e 0,9 mg.L⁻¹ para DFB e 0; 0,06; 0,13; 0,65 e 1,3 mg.L⁻¹ para temefós em testes com sedimento. Para tilápia as concentrações foram de 0; 0,07; 0,13; 0,67 e 1,34 mg.L⁻¹ para DFB e 0; 0,07; 0,1; 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹ para temefós em testes sem sedimento, e 0; 0,08; 0,15; 1,22 e 4,40 mg.L⁻¹ para DFB e 0; 0,08; 0,1; 1,5 e 3,0 mg.L⁻¹ para temefós em testes com sedimento.

Os testes foram realizados com nove repetições do tratamento e do controle, sendo utilizados 5 alevinos por repetição, com oxigenação constante (Figura 22). O tempo de exposição ao produto foi de 7 dias, com avaliações no 1º, 3º, 5º e 7º dias. Os peixes foram alimentados com ração extrusada logo após cada período de avaliação, seguido de sifonagem do excedente e de excretas, em sistema estático.

As variáveis físico-químicas da água (temperatura, condutividade elétrica, pH e oxigênio dissolvido) foram aferidas ao longo dos dias. A cada avaliação, os animais mortos foram retirados dos aquários. Ao final do teste foi avaliada a longevidade e o crescimento dos organismos por meio da pesagem inicial e final dos peixes (ABNT, 2007).



Figura 22. Aspectos do teste de toxicidade crônica para *H. eques*.

6. Sedimento

Os sedimentos utilizados nos testes foram coletados da camada superficial do solo em área localizada na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, onde nunca foi aplicado qualquer inseticida e não sujeita a descarte de resíduos de atividades antrópicas diretamente, de acordo com as normas da OECD (1995). O solo foi peneirado e as composições químicas e granulométricas foram determinadas no Departamento de Solos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal (Tabela 6).

Tabela 6. Análise física e química do sedimento argiloso.

Composição química	Valores	Composição física	Valores
pH (CaCl ₂)	5,3	Argila (g.kg ⁻¹)	578
MO (g.dm ⁻³)	12,0	Limo (g.kg ⁻¹)	200
P (mg.dm ⁻³)	11,0	Areia fina (g.kg ⁻¹)	141
K (mmol _c .dm ⁻³)	1,3	Areia grossa (g.kg ⁻¹)	81
CA (mmol _c .dm ⁻³)	19,0	Classe textural	Argilosa
Mg (mmol _c .dm ⁻³)	9,0		
H + Al (mmol _c .dm ⁻³)	20,0		
SB (mmol _c .dm ⁻³)	29,3		
T (mmol _c .dm ⁻³)	49,3		
V (%)	59,0		

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

7. Cálculo da CL50, CENO, CEO e VC

Os dados obtidos nos testes de toxicidade aguda foram utilizados para calcular os valores da concentração letal média (CL50). Os valores de CL50 obtidos para cada espécie estudada foram utilizados para classificar os inseticidas

quanto ao potencial tóxico para estas espécies, de acordo com as classes toxicológicas citadas por Zucker (1985) (Tabela 7).

Para os dados dos testes crônicos, os valores da concentração efetiva não-observada (CENO – maior concentração que não causa efeito deletério nos organismos-testes), e da concentração efetiva observada (CEO – menor concentração que causa efeito deletério nos organismos-testes) foram obtidos estatisticamente, e o valor crônico (VC) foi calculado pela divisão entre o CENO e o CEO.

Tabela 7. Classes dos valores de CL50 de acordo com Zucker (1985).

CL50 (mg.L ⁻¹)	Categoria
< 0,1	Extremamente tóxico
0,1 < CL < 1,0	Altamente tóxico
1,0 < CL < 10,0	Moderadamente tóxico
10,0 < CL < 100,0	Ligeiramente tóxico
> 100,0	Praticamente não-tóxico

8. Risco de intoxicação ambiental

O risco de intoxicação ambiental dos larvicidas para os organismos-testes foi determinado pelo método do quociente (Q) (GOKTEPE et al. 2004), por meio da divisão do valor da concentração ambiental estimada (CAE) de cada inseticida pelo valor de CL50 calculado nos testes de toxicidade aguda.

A CAE é a concentração do inseticida aplicada em campo, de acordo com as recomendações previstas pelo Ministério da Saúde. Os valores da CAE utilizados foram as concentrações utilizadas para o controle de *A. aegypti*, de 0,25 mg.L⁻¹ para DFB e 1,0 mg.L⁻¹ para temefós.

O valor do Q, também denominado de quociente de risco (RQ), é um número puro, pois as unidades dos parâmetros se anulam na divisão. As classes de risco ambiental utilizadas foram alto risco, médio risco e baixo risco (Tabela 8).

Tabela 8. Classes dos valores de RQ de acordo com Goktepe et al. (2004).

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

9. Forma de análise dos resultados

As CL50 foram calculadas com a utilização do método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al. 1977) e os valores encontrados foram utilizados para classificar os dois larvicidas pela toxicidade aguda aos organismos-testes. O risco ambiental foi estimado pelo método de comparação da CAE dos inseticidas com os valores de CL50. Os valores de RQ foram utilizados para classificar os dois larvicidas pelo risco de intoxicação ambiental dos organismos-testes.

Para CENO e CEO, os dados obtidos foram analisados comparando-se as médias de peso e mortalidade dos peixes ao final dos testes crônicos. Para isso, foram realizados testes de Pressuposições para análise de variância dos dados (Normalidade Cramer-von Mises e Homocedasticidade Brown Forsythe), e foi aplicado o teste ANOVA, com nível de significância de 5%. Para a comparação entre médias de dados paramétricos foi aplicado o teste de Tukey, e para dados não paramétricos aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis, utilizando-se programa de computação SAS 9.0 (2001).

Os dados dos parâmetros de água foram analisados pelo Coeficiente de Correlação de Pearson, com nível de significância a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes de sensibilidade com KCI em mato grosso e tilápia-do-Nilo evidenciaram a sensibilidade e sanidade dos peixes para prosseguir com os testes de toxicidade aguda.

De acordo com os testes de toxicidade aguda com e sem sedimento para mato grosso, os larvicidas DFB e temefós obtiveram CL50 próximas, sendo que para temefós foi ligeiramente mais baixo que para DFB (Figuras 23, Tabela 9). Nos testes agudos com e sem sedimentos realizados com tilápias, a ação tóxica de DFB foi menor em relação à de temefós (Tabela 10). A presença do sedimento não alterou a ação tóxica do produto para os peixes em estudo.



Figura 23. Aspectos da natação errática de *H. eques* (A) e *O. niloticus* (B) na concentração de 22 e 30 mg.L⁻¹ de temefós, respectivamente, no teste de toxicidade aguda.

Tabela 9. Concentrações letais médias, limites inferiores e superiores de KCl (g.L⁻¹) e dos larvicidas (mg.L⁻¹) dos testes de toxicidade aguda para mato grosso e classificação dos larvicidas de acordo com as classes de Zucker (1985).

	LI	CL50	LS	Classificação de Zucker
KCl	1,45	1,67	1,94	-
DFB	8,52	10,91	13,69	Ligeiramente tóxico
DFB com sed.	7,68	11,51	16,42	Ligeiramente tóxico
Temefós	6,77	7,30	7,88	Moderadamente tóxico
Temefós com sed.	5,91	6,58	7,16	Moderadamente tóxico

Tabela 10. Concentrações letais médias, limites inferiores e superiores de KCI (g.L^{-1}) e dos larvicidas (mg.L^{-1}) dos testes de toxicidade aguda para tilápia-do-Nilo e classificação dos larvicidas de acordo com as classes de Zucker (1985).

	LI	CL50	LS	Classificação de Zucker
KCI	2,82	3,20	3,64	-
DFB	7,18	10,04	13,46	Ligeiramente tóxico
DFB com sed.	12,60	15,43	18,89	Ligeiramente tóxico
Temefós	4,87	7,11	11,55	Moderadamente tóxico
Temefós com sed.	4,73	5,82	7,15	Moderadamente tóxico

A adsorção de produtos químicos a superfícies sólidas desempenha um importante papel no impacto ambiental. Produtos químicos hidrofóbicos apresentam coeficiente de adsorção elevado, e podem adsorver-se com mais facilidade ao sedimento em ambientes aquáticos (SWANN et al. 1983). Apesar de o DFB e o temefós serem hidrofóbicos, não houve diferença significativa entre testes agudos com e sem sedimento.

Quanto maior a fração orgânica do solo, maior o número de moléculas adsorvidas a ele e menor disponibilidade e a biodegradação destes compostos hidrofóbicos (MILLIOLI et al. 2008). Entretanto, a baixa adsorção dos produtos ao solo pode ser relacionada à baixa quantidade de matéria orgânica presente no sedimento (12 g.dm^{-3} , apenas 1% da composição do sedimento).

O temefós é mais tóxico em relação ao DFB para tilápia, e levemente mais tóxico para mato grosso. As CL50 de DFB foram 75 e 49% maiores que a de temefós em testes de mato grosso com e sem sedimento, respectivamente. Para tilápias, as CL50 de DFB foram 41 e 165% maiores que a de temefós, em testes na ausência e presença de sedimento, respectivamente (Figuras 24 e 25).

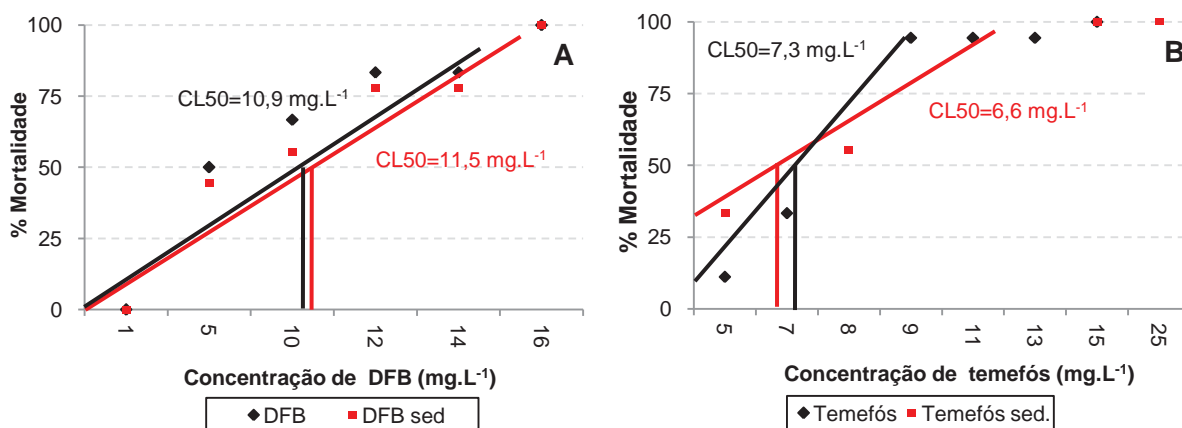


Figura 24. Comparação das médias de mortalidade de mato grosso com 48 horas de teste agudo. A: Comparação das CL50 entre testes de DFB na presença e ausência de sedimento. B: Comparação das CL50 entre testes de temefós na presença e ausência de sedimento.

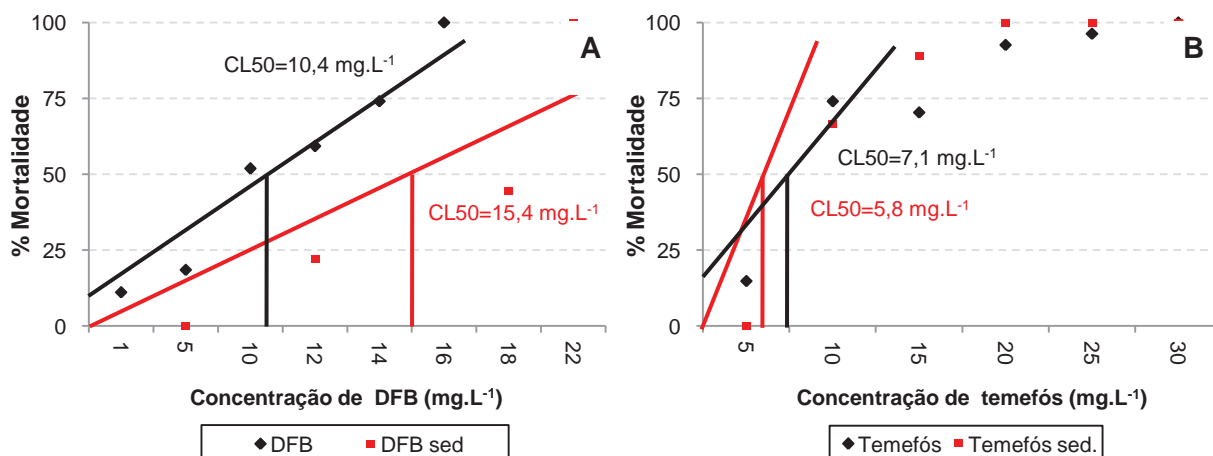


Figura 25. Comparação das médias de mortalidade de tilápia com 48 horas de teste agudo. A: Comparação das CL50 entre testes de DFB na presença e ausência de sedimento. B: Comparação das CL50 entre testes de temefós na presença e ausência de sedimento.

Menor ação tóxica foi relatada em estudos com DFB para *Poecilia reticulata*, onde a CL50 calculada foi de 152 mg.L⁻¹ em 96 horas de teste (SOUZA, 2008). Para inseticidas organofosforados, as CL50 encontradas são mais baixas. Metil-clopirifós foi utilizado em testes com *Poecilia reticulata* e obteve CL50 de

1,79 mg.L⁻¹ em 96 horas de teste (SELVI et al. 2005). O organofosforado phoxim testado em *Brachydanio rerio* obteve CL50 de 1,28 mg.L⁻¹ (ZHANG et al. 2010) e o temefós em *Pseudomugil signifier* obteve CL50 de 0,594 mg.L⁻¹ (BROWN et al. 1998).

De acordo com a classificação de Zucker (1985), o larvicida DFB se enquadra como ligeiramente tóxico para os peixes mato grosso e tilápia-do-Nilo nos testes na presença e ausência de sedimento ($10 < CL50 < 100$ mg.L⁻¹), enquanto o temefós classifica-se como moderadamente tóxico para ambas as espécies de peixe ($1 < CL50 < 10$ mg.L⁻¹).

Na classificação de risco de intoxicação ambiental calculada pelo método do quociente, o temefós classifica-se como de médio risco ambiental ($0,05 < RQ < 0,5$), e o DFB como de baixo risco ambiental ($RQ < 0,05$) (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11. Classificação dos larvicidas quanto ao risco de intoxicação ambiental para mato grosso, de acordo com os testes agudos.

	DFB	DFB sed.	Temefós	Temefós sed.
RQ	0,023	0,022	0,137	0,152
Classificação	Baixo risco	Baixo risco	Médio risco	Médio risco

Tabela 12. Classificação dos larvicidas quanto ao risco de intoxicação ambiental para tilápia, de acordo com os testes agudos.

	DFB	DFB sed.	Temefós	Temefós sed.
RQ	0,025	0,016	0,141	0,172
Classificação	Baixo risco	Baixo risco	Médio risco	Médio risco

Estudos com *Piaractus mesopotamicus* (pacu) classificaram os inibidores de crescimento DFB e teflubenzuron como praticamente não tóxico para a espécie (WINKALER, 2008). Souza (2008) e Medeiros (2008) também classificam DFB e teflubenzuron, respectivamente, como sendo de baixo risco ambiental para o peixe *Poecilia reticulata*.

Nos testes crônicos realizados com o DFB, houve redução de peso dos peixes mato grosso e tilápia ao final dos testes com e sem sedimento, com o aumento das concentrações do larvicida ($p < 0,05$) (Figura 26).

Durante os testes crônicos com temefós, alguns matos grossos e tilápias morreram ao longo do tempo, impossibilitando a pesagem final (Figura 27). Houve mortalidade significativamente maior ($p < 0,05$) nas concentrações mais altas de temefós.

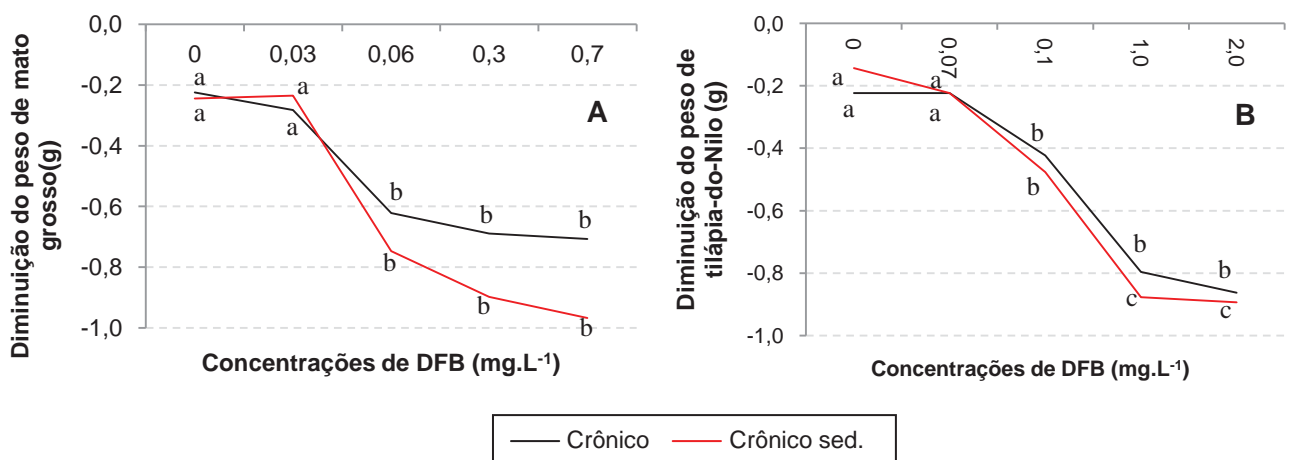


Figura 26. Diminuição total dos pesos dos peixes ao final de 7 dias de teste crônico com DFB ao longo das concentrações (diferença entre a somatória dos pesos iniciais e finais para cada concentração). A: mato grosso. B: tilápia. As pressuposições para a análise de variância foram satisfeitas (A: Teste de Homocedasticidade Brown Forsythe $F=0,23$ e $p=0,9203$ para crônico, $F=0,38$ e $p=0,6967$ para crônico com sedimento; Teste de Normalidade dos Erros Cramer-von Mises $wsq=0,04$ e $p>0,2500$ para crônico, $wsq=0,05$ e $p>0,2500$ para crônico com sedimento. B: Teste de Homocedasticidade Brown Forsythe $F=0,52$ e $p=0,7226$ para crônico, $F=0,67$ e $p=0,6259$ para crônico com sedimento; Teste de Normalidade dos Erros Cramer-von Mises $wsq=0,07$ e $p=0,2382$ para crônico, $wsq=0,03$ e $p>0,2500$ para crônico com sedimento). a-c: comparação entre médias das concentrações para cada produto testado (A: Teste de Tukey $F=26,04$ e $p<0,0001$ para crônico, $F=4,57$ e $p=0,0324$ para crônico com sedimento. B: Teste de Tukey $F=18,60$ e $p=0,0001$ para crônico, $F=50,16$ e $p<0,0001$ para crônico com sedimento).

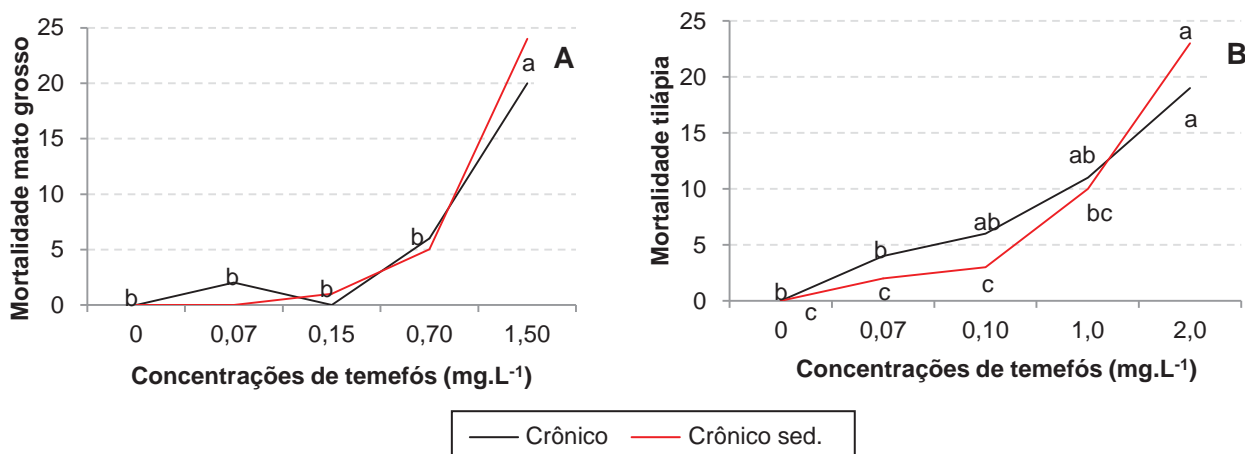


Figura 27. Mortalidade total de peixes ao final de 7 dias de teste crônico ao longo das concentrações de temefós. A: mato grosso. B: tilápia. a-c: comparação entre médias das concentrações para cada produto testado (A: Teste de Kruskal-Wallis $F=2,07$ e $p=0,0221$ para crônico, $F=2,57$ e $p=0,0324$ para crônico com sedimento. B: Teste de Kruskal-Wallis $F=4,60$ e $p=0,0041$ para crônico, $F=5,16$ e $p=0,0023$ para crônico com sedimento).

A mortalidade de mato grosso nos testes sub-letais pode ser entendida como maior toxicidade do temefós, mesmo sendo utilizadas baixas concentrações. Peixes da espécie *Aphanius dispar* expostos às baixas concentrações do larvicida temefós apresentaram sinais de natação errática e convulsões, além de hipertrofia epitelial e, conseqüentemente, fusão lamelar (BA-OMAR et al. 2011). A exposição do peixe *Melanotaenia duboulayi* ao temefós resultou em redução significativa na velocidade de natação dos animais, ao contrário do inibidor de crescimento s-metoprene, que não provocou efeitos adversos na natação (HURST et al. 2007). Estudos com tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas ao DFB indicaram baixo potencial de bioacumulação do larvicida nos peixes (AHMED e EID, 1991).

Os valores de CENO (maior concentração da amostra que não causou efeito deletério estatisticamente significativo no crescimento dos peixes) e CEO (menor concentração da amostra que causou efeito deletério estatisticamente significativo no crescimento dos peixes) foram calculados com base nos resultados dos testes crônicos, crescimento dos organismos (diferença entre o peso final e o inicial dos peixes) para DFB, e mortalidade ao final do teste para

temefós (Tabelas 13 e 14). Para DFB e temefós, os valores foram muito próximos nos testes com e sem sedimento.

Tabela 13. Valores de CENO, CEO e VC (mg.L^{-1}) de testes com mato grosso.

	DFB	DFB sed.	Temefós	Temefós sed.
CEO	0,04	0,09	1,60	1,30
CENO	0,02	0,05	0,80	0,65
VC	0,03	0,07	1,13	0,92
CAE	0,25		1,00	

Tabela 14. Valores de CENO, CEO e VC (mg.L^{-1}) de testes com tilápia-do-Nilo.

	DFB	DFB sed.	Temefós	Temefós sed.
CEO	0,13	0,15	1,00	3,00
CENO	0,07	0,08	0,50	1,50
VC	0,10	0,11	0,71	2,12
CAE	0,25		1,00	

Testes com temefós para *Tilapia melanopleura* obtiveram valores maiores de CENO ($14,1 \text{ mg.L}^{-1}$) e CEO ($3,0 \text{ mg.L}^{-1}$). A CL50 para estes organismos também foi maior ($30,2 \text{ mg.L}^{-1}$) (ANADU et al. 1996).

A CAE de DFB determinada pelo Ministério da Saúde ($0,25 \text{ mg.L}^{-1}$), utilizada em áreas urbanas para o controle de *A. aegypti*, é superior que a menor concentração de DFB que provoca decréscimo no crescimento de mato grosso e tilápia-do-Nilo. Portanto o produto deve ser utilizado com cautela, pois sub-doses de DFB causam efeitos adversos, ao longo de tempo, em espécies do ambiente aquático.

As maiores concentrações de temefós que não causaram efeitos deletérios estatisticamente significativos em mato grosso e tilápia-do-Nilo foram inferiores à CAE do larvicida ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), e os dados utilizados para o cálculo foram os de mortalidade. Portanto, o uso de temefós na concentração determinada pelo Ministério da Saúde, se acumulado nos cursos hídricos, pode ser letal para ambas as espécies de peixes.

A qualidade da água foi avaliada ao longo dos testes de toxicidade aguda e crônica. Dados de temperatura não foram avaliados com o Coeficiente de Correlação de Pearson, devido a sala de ensaio ser climatizada, com temperatura e umidade do ambiente aferidas diariamente. Pequenas variações de temperatura podem ser relacionadas com a presença de pessoas na sala de ensaio. Contudo, as medidas foram mantidas ao longo dos testes para detectar possíveis mudanças bruscas que poderiam afetar os resultados.

Nos testes agudos com DFB na presença e ausência de sedimento houve correlação positiva da condutividade elétrica com o aumento das concentrações ($p < 0,05$). Os demais parâmetros mensurados não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$) no teste de Correlação de Pearson, com exceção do pH com 48 horas de teste sem sedimento, que diminuiu com o aumento das concentrações (Figuras 28 e 29).

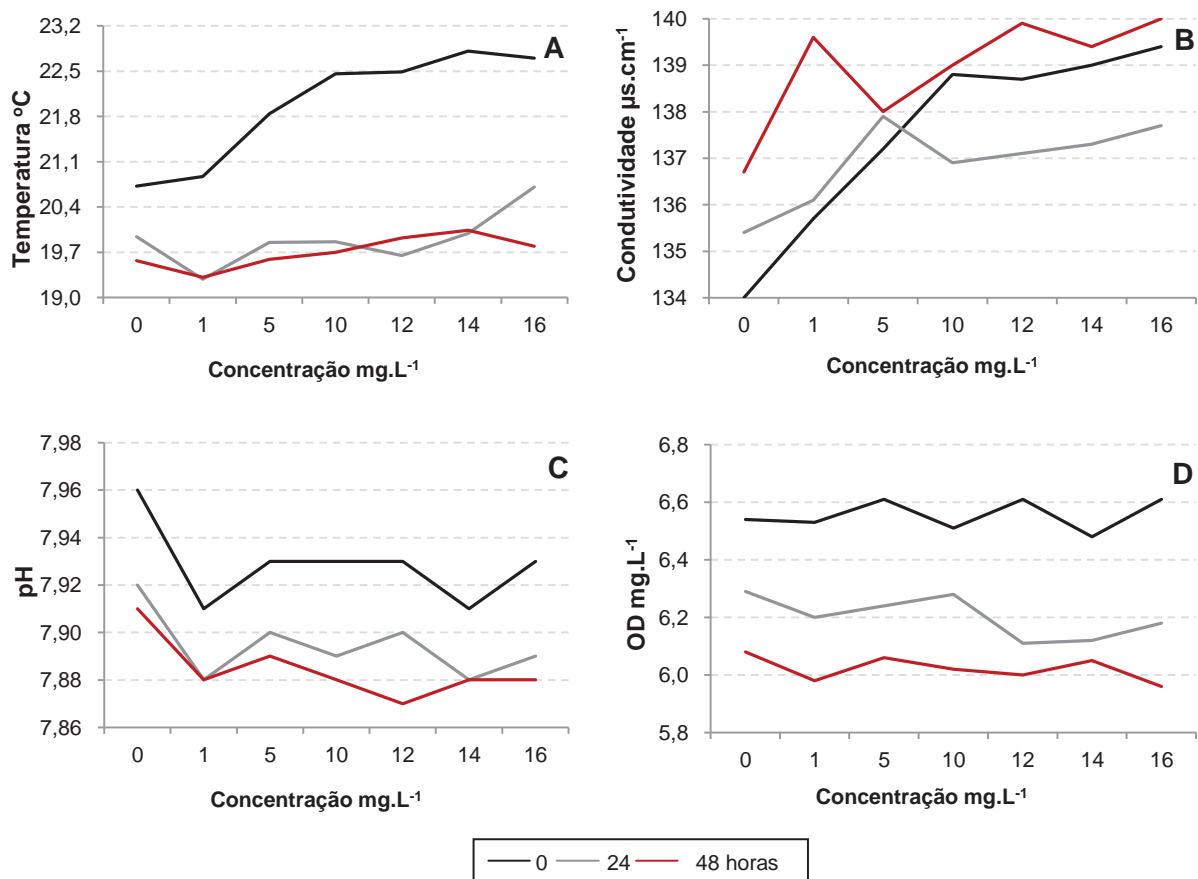


Figura 28. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de DFB entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade aguda para *H. eques*. Teste de Coeficiente de Correlação de Pearson (alfa=5%). B: $r=0,7115$ e $p<0,0001$ para 0 hora; $r=0,4117$ e $p=0,0008$ para 24 horas; $r=0,3615$ e $p=0,0036$ para 48 horas; C: $r=-0,2458$ e $p=0,0522$ para 0 hora; $r=-0,2161$ e $p=0,0889$ para 24 horas; $r=-0,3198$ e $p=0,0106$ para 48 horas; D: $r=0,0354$ e $p=0,7829$ para 0 hora; $r=-0,1917$ e $p=0,1323$ para 24 horas; $r=-0,0964$ e $p=0,4523$ para 48 horas.

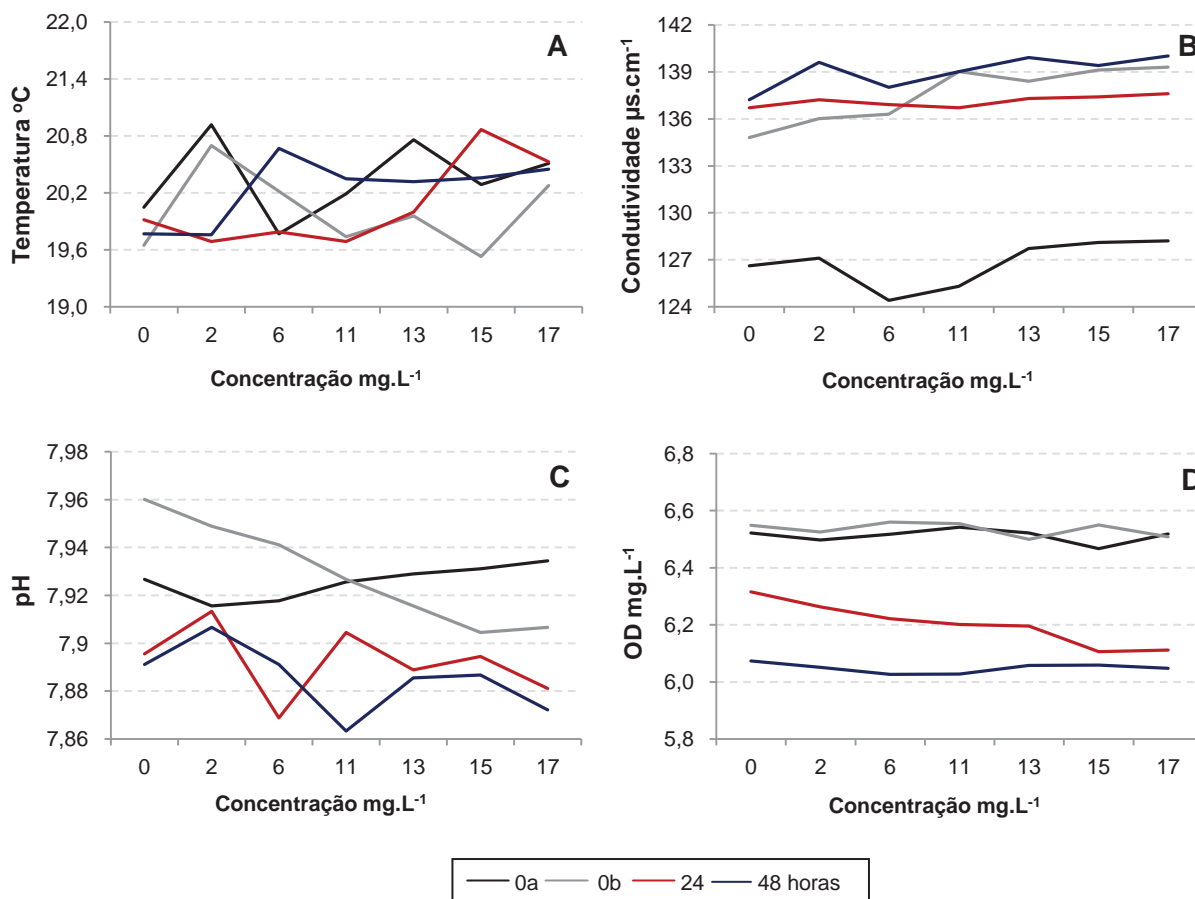


Figura 29. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de DFB, na presença de sedimento, entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade aguda para *H. eques*. 0a: início do teste com a adição do larvicida à água. 0b: adição dos peixes à água 24 horas após a adição do larvicida. Teste de Coeficiente de Correlação de Pearson (alfa=5%). B: $r=0,2188$ e $p=0,0849$ para 0a hora; $r=0,6352$ e $p<0,0001$ para 0b hora; $r=0,1616$ e $p=0,2058$ para 24 horas; $r=0,3466$ e $p=0,0054$ para 48 horas; C: $r=0,0871$ e $p=0,4974$ para 0a hora; $r=-0,2002$ e $p=0,1157$ para 0b hora; $r=-0,0942$ e $p=0,4625$ para 24 horas; $r=-0,2071$ e $p=0,1035$ para 48 horas; D: $r=0,0513$ e $p=0,6895$ para 0a hora; $r=0,0664$ e $p=0,6050$ para 0b hora; $r=-0,1062$ e $p=0,4073$ para 24 horas; $r=-0,1018$ e $p=0,4274$ para 48 horas.

Nos testes agudos com temefós na ausência de sedimento houve correlação positiva entre o aumento da condutividade elétrica e o aumento das concentrações do inseticida, entretanto, na presença de sedimento, este parâmetro sofreu aumento apenas nos primeiros dias de teste, e decresceu após 48 horas ($p<0,05$). O mesmo fato ocorreu com o pH, este aumentou ao longo das

concentrações nos testes sem sedimento, porém decaiu nas maiores concentrações do inseticida nos últimos dias de teste com sedimento ($p < 0,05$) (Figuras 30 e 31).

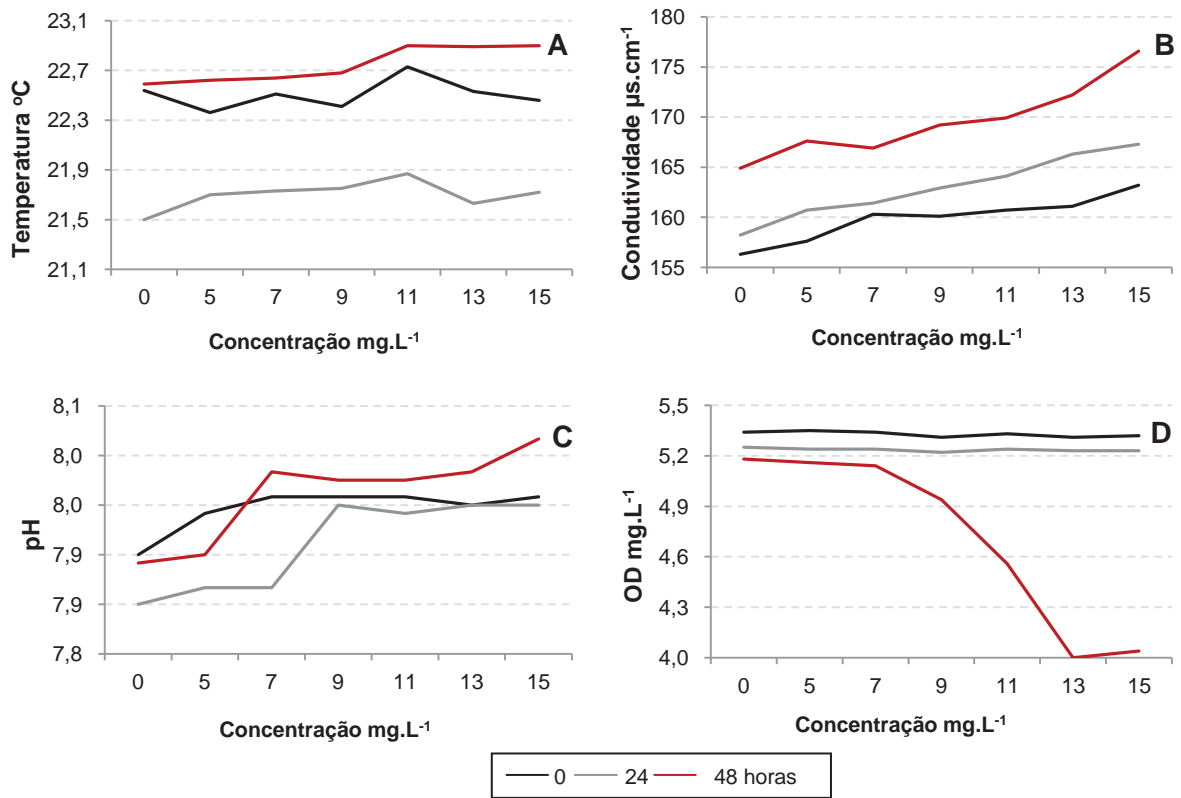


Figura 30. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de temefós entre os dias de avaliação nos testes de toxicidade aguda para *H. eques*. Teste de Coeficiente de Correlação de Pearson (alfa=5%). B: $r=0,8609$ e $p < 0,0001$ para 0 hora; $r=0,9396$ e $p < 0,0001$ para 24 horas; $r=0,8904$ e $p < 0,0001$ para 48 horas; C: $r=0,7011$ e $p < 0,0001$ para 0 hora; $r=0,8665$ e $p < 0,0001$ para 24 horas; $r=0,8297$ e $p < 0,0001$ para 48 horas; D: $r=-0,2315$ e $p=0,0679$ para 0 hora; $r=-0,1458$ e $p=0,2543$ para 24 horas; $r=-0,8757$ e $p < 0,0001$ para 48 horas.

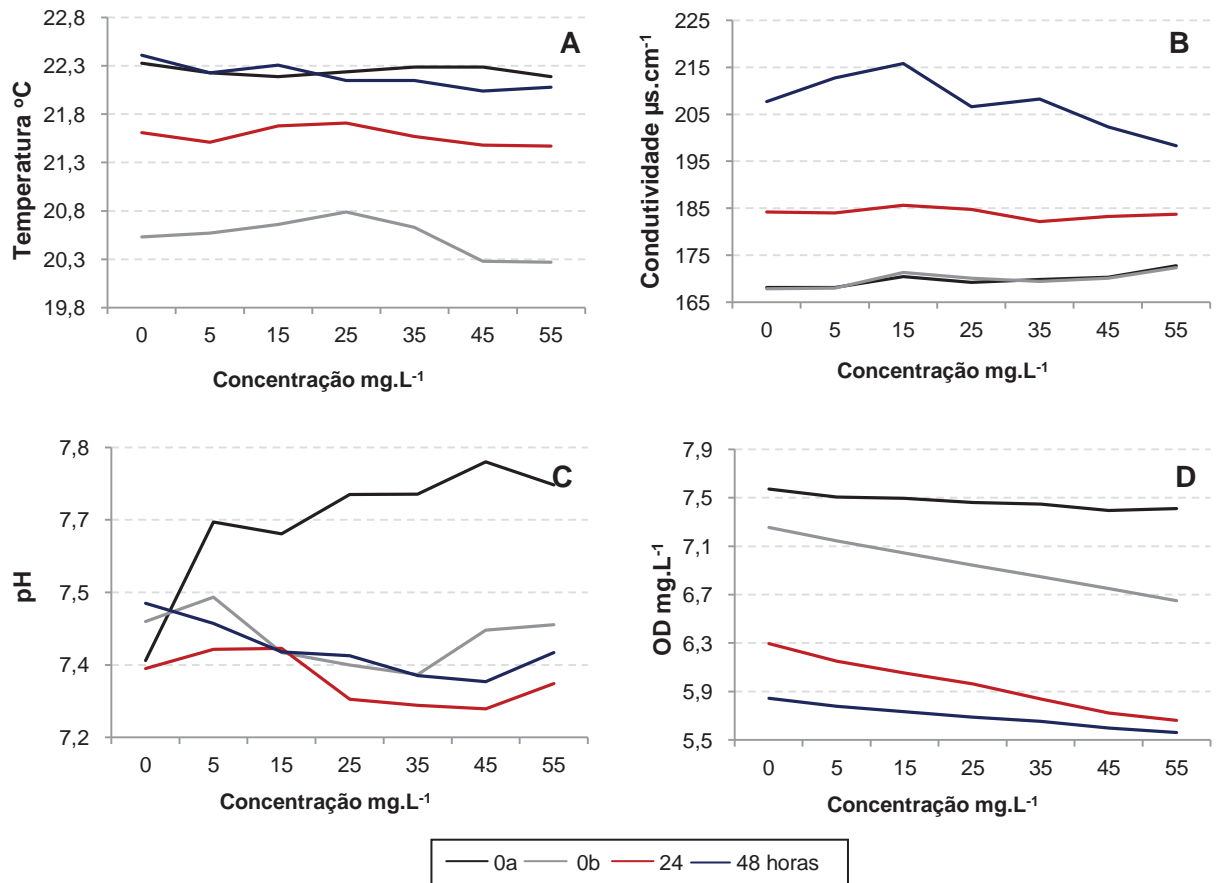


Figura 31. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de temefós, na presença de sedimento, entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade aguda para *H. eques*. 0a: início do teste com a adição do larvicida à água. 0b: adição dos peixes à água 24 horas após a adição do larvicida. Teste de Coeficiente de Correlação de Pearson (alfa=5%). B: $r=0,3502$ e $p=0,0049$ para 0a hora, $r=0,2685$ e $p=0,0334$ para 0b hora; $r=-0,0987$ e $p=0,4417$ para 24 horas; $r=-0,5302$ e $p<0,0001$ para 48 horas; C: $r=0,5984$ e $p<0,0001$ para 0a hora; $r=-0,1523$ e $p=0,2333$ para 0b hora; $r=-0,4496$ e $p=0,0002$ para 24 horas; $r=-0,5183$ e $p<0,0001$ para 48 horas; D: $r=-0,3065$ e $p=0,0146$ para 0a hora; $r=-0,8934$ e $p<0,0001$ para 0b hora; $r=-0,9215$ e $p<0,0001$ para 24 horas; $r=-0,9599$ e $p<0,0001$ para 48 horas.

Nos testes crônicos com DFB, a condutividade elétrica manteve-se constante ao longo das concentrações em testes com e sem sedimento ($p>0,05$), diferentemente dos testes agudos, que obtiveram aumento deste parâmetro (Figuras 32 e 33). Este fato pode ser relacionado às baixas concentrações de DFB nos testes crônicos, não sendo suficientes para ocasionar o aumento da condutividade.

Houve correlação negativa significativa entre o aumento das concentrações e a diminuição do pH no início e no fim dos testes com e sem sedimento ($p < 0,05$) (Figuras 32 e 33). Os testes crônicos foram realizados com a presença de bombas de oxigênio individuais para os aquários, portanto não podemos inferir que modificações ocorridas durante os testes sejam pela presença do inseticida.

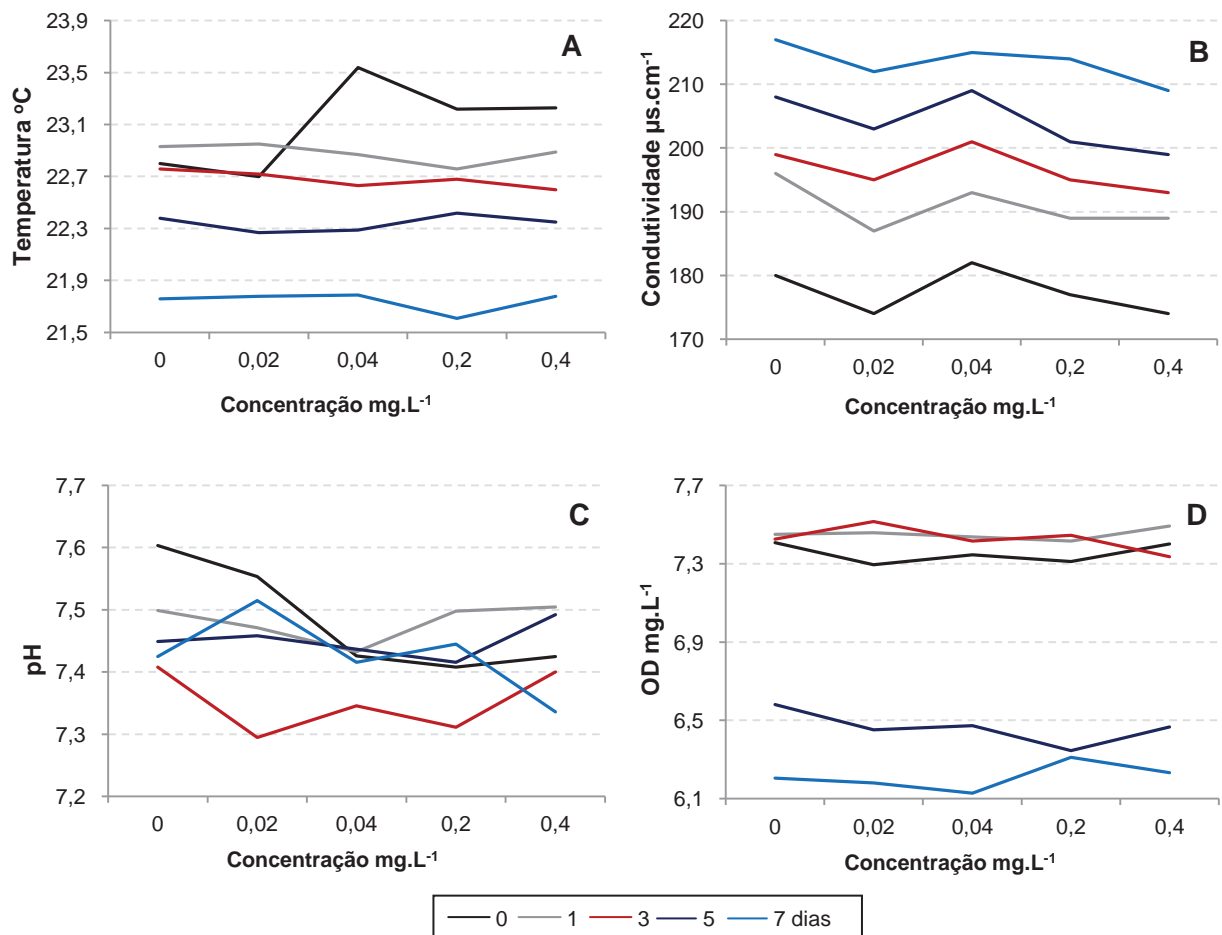


Figura 32. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de DFB, na ausência de sedimento, entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade crônica para *H. eques*. Teste de Coeficiente de Correlação de Pearson (alfa=5%). B: $r = -0,0454$ e $p = 0,7672$ para 0 dia; $r = 0,0545$ e $p = 0,7221$ para 1 dia; $r = 0,2832$ e $p = 0,0594$ para 3 dias; $r = -0,2115$ e $p = 0,1632$ para 5 dias; $r = 0,0043$ e $p = 0,9776$ para 7 dias; C: $r = -0,4791$ e $p = 0,0009$ para 0 dia; $r = 0,1839$ e $p = 0,2266$ para 1 dia; $r = 0,1517$ e $p = 0,3198$ para 3 dias; $r = 0,1400$ e $p = 0,3588$ para 5 dias, $r = -0,4494$ e $p = 0,0020$ para 7 dias; D: $r = -0,1293$ e $p = 0,3974$ para 0 dia; $r = 0,1739$ e $p = 0,2532$ para 1 dia; $r = 0,2256$ e $p = 0,1363$ para 3 dias; $r = 0,0115$ e $p = 0,9400$ para 5 dias; $r = 0,4649$ e $p = 0,0013$ para 7 dias.

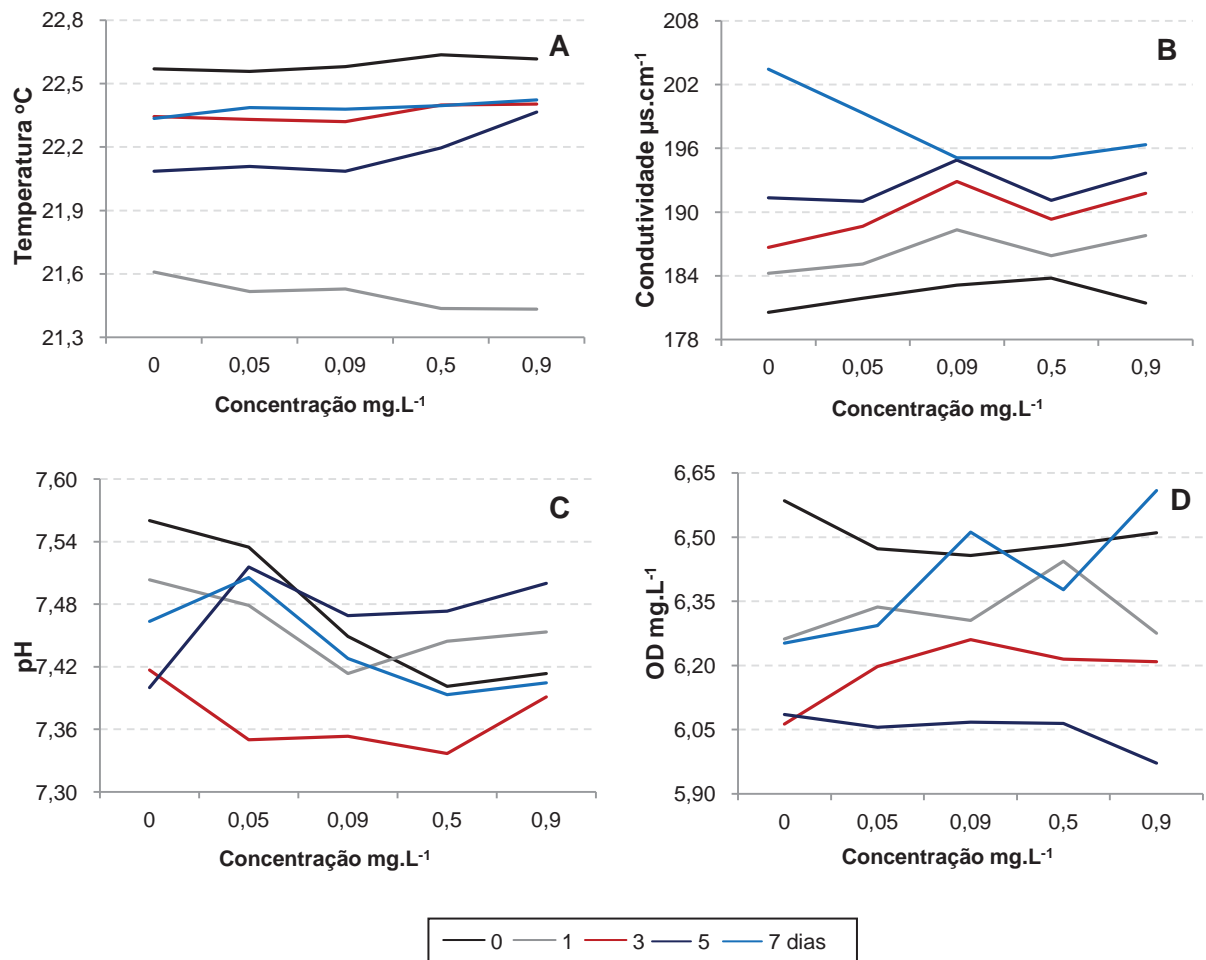


Figura 33. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de DFB, na presença de sedimento, entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade crônica para *H. eques*. Teste de Coeficiente de Correlação de Pearson (alfa=5%). B: $r=0,0303$ e $p=0,8433$ para 0 dia; $r=0,2657$ e $p=0,0777$ para 1 dia; $r=0,2958$ e $p=0,0485$ para 3 dias; $r=0,1175$ e $p=0,4421$ para 5 dias; $r=-0,2535$ e $p=0,0929$ para 7 dias; C: $r=-0,5040$ e $p=0,0004$ para 0 dia; $r=-0,1035$ e $p=0,4986$ para 1 dia; $r=0,0185$ e $p=0,9039$ para 3 dias; $r=0,1666$ e $p=0,2741$ para 5 dias; $r=-0,3152$ e $p=0,0349$ para 7 dias; D: $r=-0,0142$ e $p=0,9261$ para 0 dia; $r=0,0185$ e $p=0,9042$ para 1 dia; $r=0,0690$ e $p=0,6525$ para 3 dias; $r=-0,1553$ e $p=0,3084$ para 5 dias; $r=0,4005$ e $p=0,0064$ para 7 dias.

Testes crônicos realizados com temefós na presença e ausência de sedimento obtiveram os mesmos resultados que testes agudos para a condutividade elétrica e pH. Houve correlação positiva entre o aumento das concentrações do inseticida e a condutividade elétrica ($p<0,05$). O pH aumentou

no início do teste, e ao final, diminuiu com o aumento das concentrações nos testes com sedimento ($p < 0,05$) (Figuras 34 e 35).

O aumento da condutividade elétrica nos testes pode ser relacionado com os larvicidas utilizados, uma vez que tenderam a aumentar mais nas maiores concentrações dos produtos.

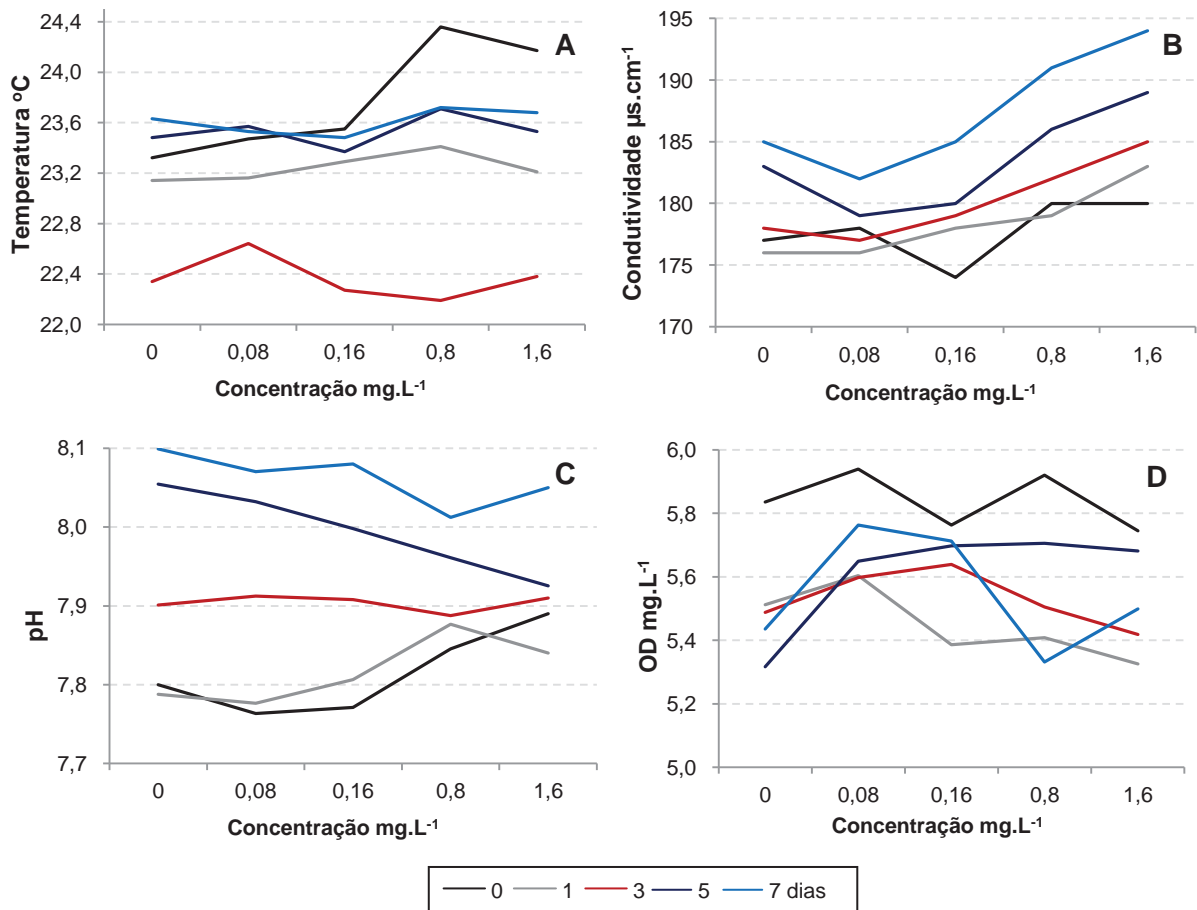


Figura 34. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de temefós, na ausência de sedimento, entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade crônica para *H. eques*. Teste de Coeficiente de Correlação de Pearson (alfa=5%). B: $r=0,6560$ e $p < 0,0001$ para 0 dia; $r=0,6729$ e $p < 0,0001$ para 1 dia; $r=0,7805$ e $p < 0,0001$ para 3 dias; $r=0,7403$ e $p < 0,0001$ para 5 dias; $r=0,8882$ e $p < 0,0001$ para 7 dias; C: $r=0,6856$ e $p < 0,0001$ para 0 dia; $r=0,4223$ e $p=0,0039$ para 1 dia; $r=-0,0104$ e $p=0,9262$ para 3 dias; $r=-0,4873$ e $p=0,0007$ para 5 dias; $r=-0,2503$ e $p=0,0972$ para 7 dias; D: $r=-0,1560$ e $p=0,3061$ para 0 dia; $r=-0,3138$ e $p=0,0358$ para 1 dia; $r=-0,1865$ e $p=0,2199$ para 3 dias; $r=0,2306$ e $p=0,1275$ para 5 dias; $r=-0,2204$ e $p=0,1457$ para 7 dias.

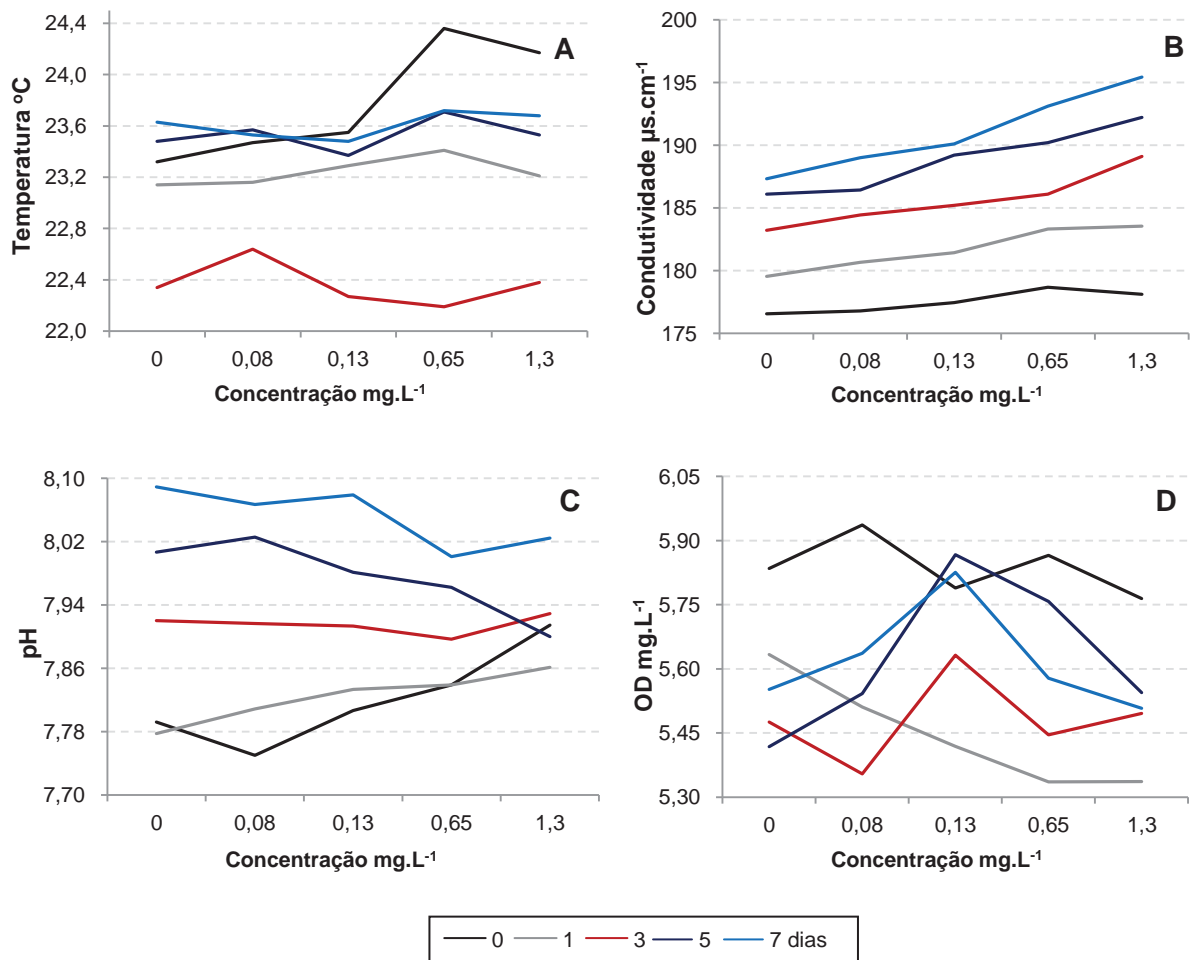


Figura 35. Variação dos parâmetros da qualidade de água ao longo das concentrações de temefós, na presença de sedimento, entre os dias de avaliação dos testes de toxicidade crônica para *H. eques*. Teste de Coeficiente de Correlação de Pearson (alfa=5%). B: $r=0,3203$ e $p=0,0320$ para 0 dia; $r=0,5973$ e $p<0,0001$ para 1 dia; $r=0,8096$ e $p<0,0001$ para 3 dias; $r=0,7499$ e $p<0,0001$ para 5 dias; $r=0,8137$ e $p<0,0001$ para 7 dias; C: $r=0,7432$ e $p<0,0001$ para 0 dia; $r=0,4265$ e $p=0,0035$ para 1 dia; $r=0,0511$ e $p=0,7389$ para 3 dias; $r=-0,4948$ e $p=0,0005$ para 5 dias; $r=-0,3575$ e $p=0,0159$ para 7 dias; D: $r=-0,1575$ e $p=0,3013$ para 0 dia; $r=-0,3200$ e $p=0,0321$ para 1 dia; $r=0,0112$ e $p=0,9420$ para 3 dias; $r=0,0078$ e $p=0,9593$ para 5 dias; $r=-0,1876$ e $p=0,2172$ para 7 dias.

CONCLUSÃO

As CI50 de temefós para mato grosso são $7,30$ e $6,58 \text{ mg.L}^{-1}$ na ausência e presença de sedimento, respectivamente, e as de DFB são $10,91$ e $11,51 \text{ mg.L}^{-1}$,

sem e com sedimento, respectivamente. Para tilápia-do-Nilo, as CI50 são 10,04 e 15,43 mg.L⁻¹ para DFB na ausência e presença de sedimento, respectivamente, e 7,11 e 5,83 mg.L⁻¹ para temefós em testes sem e com sedimento, respectivamente.

De acordo com a classificação de Zucker (1985), o DFB classifica-se como ligeiramente tóxico para os organismos-testes, e de baixo risco ambiental, e o temefós moderadamente tóxico e de médio risco de intoxicação ambiental.

Nos testes crônicos, o DFB provoca diminuição no peso dos peixes, e nos testes com temefós houve mortalidade nas maiores concentrações, mesmo estas sendo baixas. Conclui-se que, apesar das doses serem sub-letais, a exposição dos peixes por longos períodos provoca alterações no crescimento e longevidade dos organismos.

A presença de sedimento em testes agudos e crônicos não altera significativamente a ação tóxica dos larvicidas sobre os organismos-testes.

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. *Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade Crônica de curta duração – Método de ensaio com peixes*. 21p. 2007.
- AHMED, M. T.; EID, A. H. Accumulation of diflubenzuron in boliti fish *Oreochromis niloticus*. *Nahrung-Food*. v. 35, p. 27-31, 1991.
- ANADU, D. I.; ANASO, H. U.; ONYEKA, O. N. D. Acute toxicity of the insect larvicide Abate ® (temephos) on the fish *Tilapia melanopleura* and the dragonfly larvae *Neurocordelia virginensis*. *Journal of Environmental Science and Helth Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, v. 31, n. 6, p. 1363-1375, 1996.

- BA-OMAR, T. A.; AL-JARDANI, S.; VICTOR, R. Effects of pesticide temephos on the gills of *Aphanius díspar* (Pisces: Cyprinodontidae). *Tissue and Cell*. v. 43, p. 29–38, 2011.
- ESTEVEES. F. A. Fundamentos de Limnologia. 2 ed., Rio de Janeiro: Interciência, 1998.
- GOKTEPE, I.; PORTIER, R.; AHMEDNA, M. Ecological risk assessment of Neem-based pesticides. *Journal of Environmental Science Health Part B. Pestic. Food Contam. Agric. Wastes B*. v. 39, n. 2, p. 311-320, 2004.
- HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, V. Trimed Sperman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicology bioassays. *Environmental Science and Technology*. v. 7, p. 714-719, 1977.
- HURST, T. P.; KAY, B. H.; RYAN, P. A.; BROWN, M. D. Sublethal effects os mosquito larvicides on swimming performance of larvivorous fish *Melanotaenia duboulayi* (Atheriniformes: Melanotaeniidae). *Journal of Economic Entomology*. v. 100, p. 61-65, 2007.
- MADDRELL, S. H. P. The insect neuroendocrine system as a target for insecticides. *Insect neurobiology and pesticide action*. Society of Chemical Industry, London, p. 329-334, 1980.
- MARTINS, F.; SILVA, I. G. Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 37, n. 2, p. 135-138, Mar./Abr. 2004.
- MEDEIROS, L. S. *Toxicidade aguda e risco ambiental do inseticida teflubenzuron para Daphnia magna, Lemna minor e Poecilia reticulata*. Dissertação (Mestrado em Aquicultura de Águas Continentais), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 54p. 2008.
- MILLIOLI, V. S.; SOBRAL, L. G. S.; SÉRVULO, E. F. C.; CARVALHO, D. D. Biorremediação de solo impactado com óleo cru: avaliação da potencialidade da utilização surfatantes. *Série Tecnologia Ambiental 50*. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008. 95p.

- OECD - Final report of the OECD workshop selection of soils/sediments. Belgirate, Italy. p. 1-55, Jun. 1995.
- SAS Institute Inc. SAS® 9.0 Language Reference: Concepts. Cary, NC: SAS Institute Inc, 2001.
- 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.
- SOUZA, J. P. *Toxicidade aguda e risco ambiental do diflubenzuron para Daphnia magna, Poecilia reticulata e Lemna minor na ausência e presença de sedimento*. Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 78p, 2008.
- SWANN, R. L.; LASKOWSKI, D. A.; MCCALL, P. J. KUY, K. V.; DISHBURGER, H. J. A rapid method for the estimation of the environmental parameters octanol/water partition coefficient, soil sorption constant, water to air ratio and water solubility. *Residue Review*, v. 85, p. 17-28, 1983.
- WINKALER, E. U. *Aspectos ecotoxicológicos dos inseticidas diflubenzuron e teflubenzuron para o pacu (Piaractus mesopotamicus)*. Dissertação (Doutorado em Aquicultura), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 79p, 2008.
- ZHANG, Z. Y.; YU, X. Y.; WANG, D. L.; YAN, H. J.; LIU, X. J. Acute toxicity to zebrafish of two organophosphates and four pyrethroids and their binary mixtures. *Pest Management Science*. v. 66, p. 84-89, 2010.
- ZUCKER, E. Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure Acute toxicity test for freshwater fish. Washington. *USEPA Publication*, 540/9-85-006, 1985.

VI. CAPÍTULO III

Avaliação ecotoxicológica e risco ambiental de diflubenzuron e temefós para *Daphnia magna*

INTRODUÇÃO

A crescente preocupação sobre os efeitos de pesticidas no ecossistema aumenta nos últimos anos, principalmente em relação à poluição aquática. Os corpos hídricos são normalmente usados para despejos de efluentes de pisciculturas, resíduos industriais e domésticos, além de serem receptores de outros poluentes carregados ou lixiviados pela chuva.

Os lixiviados contribuem significativamente para a contaminação do ecossistema aquático, reduzem a diversidade de espécies autóctones e aumentam desordenadamente a densidade de determinadas espécies indesejáveis (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

O constante desenvolvimento e expansão da aquicultura no Brasil ocasionaram problemas por falta de boas práticas de manejo, altas densidades de

estocagem de peixes e, conseqüentemente, diminuição da qualidade de água. Uma prática muito utilizada é a adição de produtos agrícolas nos viveiros, como forma de tratamento das enfermidades dos peixes. O uso indevido destes produtos, em doses exageradas, gera maior quantidade de efluentes contaminados, despejados nos corpos hídricos.

Outro meio de contaminação hídrica é o uso de inseticidas para fins de controle de vetores. A utilização de controle químico de vetores em épocas de epidemias é comum e faz-se necessário para combater a doença. No Brasil, medidas de controle químico foram adotadas para evitar a dispersão de mosquitos adultos e desenvolvimento de larvas de *Aedes aegypti*.

O larvicida DFB é utilizado em áreas agrícolas contra pragas das ordens Coleoptera (MSCASLAND et al. 1998), Lepidoptera (VILLANUEVA-JIMENEZ et al. 2000) e Ortoptera (DELGADO et al. 1999), e em pisciculturas no controle de ectoparasitoses de peixes (FUJIMOTO et al. 1999). Além disso, é o inseticida recomendado pelo Ministério da Saúde no uso contra o mosquito da dengue. Existem vários estudos mostrando os efeitos deste inseticida como possibilidade de uso no controle das larvas (MARTINS e SILVA, 2004; SILVIA e MENDES, 2007; CHEN et al. 2008; SECCACINI et al. 2008).

Outro larvicida muito utilizado no Brasil é o organofosforado temefós, entretanto, diversos estudos verificaram resistência de larvas de *A. aegypti* ao temefós, em várias regiões do país (MARCORIS et al. 1995; BRAGA et al. 2004; LIMA et al. 2006; PINHEIRO e TADEI, 2002; CARVALHO et al. 2004; MARCORIS et al. 2003).

O grande problema da utilização de inseticidas está relacionado com os impactos negativos que podem provocar aos organismos sensíveis e não alvos, quando atingem os ambientes aquáticos. O ecossistema aquático é constantemente perturbado por poluentes tóxicos das mais variadas fontes.

Análises ambientais ajudam a proteger o ambiente natural e a saúde humana, por meio de testes com contaminantes, como pesticidas, metais pesados e outros xenobióticos que podem atingir os recursos hídricos. Neste contexto, muitos trabalhos avaliam o risco ambiental de poluentes com o auxílio de índices de toxicidade. Uma das principais aplicações de dados toxicológicos é

informar as avaliações de risco e apoiar medidas preventivas que são de proteção da saúde humana e do meio ambiente (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

Diante da possibilidade da ocorrência de desequilíbrios ambientais devido ao uso dos larvicidas DFB e do temefós, o presente estudo objetivou determinar a toxicidade aguda dos inseticidas DFB e temefós para o microcrustáceo *Daphnia magna*, na presença e na ausência de sedimento, a toxicidade crônica na ausência de sedimento, e classificar os dois larvicidas pelo potencial de risco de intoxicação para o organismo-teste.

MATERIAL E MÉTODOS

Os testes de toxicidade aguda foram conduzidos no Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal. Os produtos comerciais utilizados foram o Diflubenzuron 25% Champion[®] e o Temefós Fersol 1G[®].

1. Cultivo do organismo-teste

Os exemplares de *Daphnia magna* foram cultivados em laboratório, de acordo com a norma NBR 12713:2009, da ABNT (2009) (Figura 36). O meio de cultivo foi composto de água destilada reconstituída com nutrientes, pH $7,0 \pm 0,2$, dureza total de $250 \pm 25 \text{ mg.L}^{-1}$ em CaCO_3 e condutividade de $600 \pm 21 \text{ } \mu\text{s.cm}^{-1}$ (Figura 37).

A alimentação da cultura foi composta por uma suspensão de algas da espécie *Scenedesmus subspicatus* na quantidade aproximada de 5×10^6 células/indivíduo/dia. A alimentação foi diária com 0,5 ml de alimento composto, constituído por proporções iguais de solução de ração para peixe ornamental fermentada e solução de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*).



Figura 36. Exemplar no microcrustáceo *Daphnia magna*.

Fonte: <http://www.cienciahoje.pt/files/31/31296.jpg>.



Figura 37. Aspectos da criação de *D. magna* em BODs climatizadas.

2. Testes de sensibilidade com substância de referência

Inicialmente, foram realizados testes de sensibilidade com substância de referência cloreto de sódio para avaliar a sanidade dos organismos-testes. Os organismos-testes utilizados tinham idade de 2 a 24 horas, de acordo com as normas NBR 12713:2009 (ABNT, 2009).

Os testes com a substância de referência foram realizados com as concentrações 0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0 mg.L⁻¹ de NaCl, em frascos de vidro com 30 ml de capacidade, com a adição de volumes conhecidos de soluções-estoque, completando um volume de 9 ml com meio de cultivo. Em seguida, cinco organismos neonatos foram adicionados, juntamente com 1 ml de

meio de cultivo, completando um volume total de 10 ml de solução-teste. O teste foi mantido durante 24 horas em sistema estático de exposição, no escuro, a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e sem alimentação dos animais, com 3 réplicas de cada concentração e do controle. Após 24 horas de exposição foi avaliada a imobilidade/mortalidade dos organismos em cada recipiente e calculada a concentração efetiva média (CE50), o limite superior (LS) e o limite inferior (LI).

3. Testes preliminares com os larvicidas

Posteriormente, foram realizados testes preliminares para determinar as faixas de concentração letal dos dois larvicidas a serem utilizadas nos testes definitivos (Figura 38). Nestes testes foram determinadas as maiores concentrações não letais e as menores que causam 100% de efeito agudo nos organismos-testes. Os testes foram mantidos sob as mesmas condições dos testes de sensibilidade, com duração de 48 horas, na presença e ausência de sedimento. Utilizou-se 2 g de sedimento argiloso seco para cada réplica.



Figura 38. Aspectos do controle do teste preliminar de DFB para *D. magna*.

4. Testes definitivos de toxicidade aguda com os larvicidas

Os testes definitivos foram realizados nas mesmas condições dos testes anteriores, com as seguintes concentrações 0; 0,01; 0,03; 0,05; 0,07; 0,09; 0,11 e

0,13 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para DFB na presença e ausência de sedimento (Figura 39), e 0; 0,03; 0,04; 0,05; 0,25; 0,45; 0,65 e 1,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para temefós na presença e ausência de sedimento, sob as mesmas condições descritas anteriormente. A contagem dos organismos mortos ou imóveis foi realizada após 48 horas de teste.

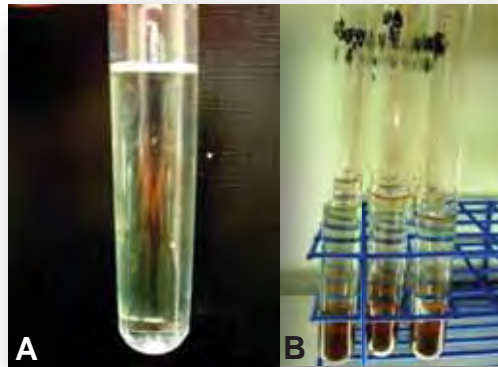


Figura 39. Aspectos do teste agudo de DFB na ausência (A) e na presença de sedimento (B) para *D. magna*.

5. Testes de toxicidade crônica com os larvicidas

Para os testes de toxicidade crônica, os ensaios foram realizados nas mesmas condições do teste anteriores, com fotoperíodo de 16 horas, na ausência de sedimento. As concentrações sub-letais utilizadas foram 0,16; 0,62; 1,2; 2,5; 5,0 e 10,0 ng.L^{-1} para DFB e 0,8; 3,1; 6,2; 12,5; 25,0 e 50,0 ng.L^{-1} para temefós, por um período de 7 dias. Para cada diluição, foram utilizadas 9 réplicas, dispondo 5 organismos com 6 a 24 horas de vida em cada recipiente-teste.

Cada recipiente recebeu uma alíquota de 15 ml da solução-teste. As avaliações foram realizadas no 3^o, 5^o e 7^o dias, com posterior alimentação dos organismos-testes. Avaliou-se a longevidade (tempo de vida dos organismos) (ABNT, 2010).

6. Sedimento

Os sedimentos utilizados nos testes foram coletados da camada superficial do solo em área natural, localizada na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, onde nunca foi aplicado qualquer inseticida e não sujeita a descarte de resíduos de atividades antrópicas diretamente, de acordo com as normas da OECD (1995). O solo foi peneirado e as composições químicas e granulométricas foram determinadas no Departamento de Solos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal (Tabela 15).

Tabela 15. Análise física e química do sedimento argiloso.

Composição química	Valores	Composição física	Valores
pH (CaCl ₂)	5,3	Argila (g.kg ⁻¹)	578
MO (g.dm ⁻³)	12,0	Limo (g.kg ⁻¹)	200
P (mg.dm ⁻³)	11,0	Areia fina (g.kg ⁻¹)	141
K (mmol _c .dm ⁻³)	1,3	Areia grossa (g.kg ⁻¹)	81
CA (mmol _c .dm ⁻³)	19,0	Classe textural	Argilosa
Mg (mmol _c .dm ⁻³)	9,0		
H + Al (mmol _c .dm ⁻³)	20,0		
SB (mmol _c .dm ⁻³)	29,3		
T (mmol _c .dm ⁻³)	49,3		
V (%)	59,0		

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

7. Cálculo da CE50

Os dados obtidos nos testes de toxicidade aguda foram utilizados para calcular os valores da concentração efetiva média (CE50). Os valores de CE50 obtidos para cada espécie estudada foram utilizados para classificar os inseticidas quanto ao potencial tóxico para estas espécies, de acordo com as classes

toxicológicas citadas por Zucker (1985) (Tabela 16). Os valores de CENO e CEO foram obtidos estatisticamente, e o VC foi calculado pela divisão entre o CENO e o CEO.

Tabela 16. Classes dos valores de CE50 de acordo com Zucker (1985).

CE50 (mg.L⁻¹)	Categoria
CE < 0,1	Extremamente tóxico
0,1 < CE < 1,0	Altamente tóxico
1,0 < CE < 10,0	Moderadamente tóxico
10,0 < CE < 100,0	Ligeiramente tóxico
CE > 100,0	Praticamente não-tóxico

8. Risco de intoxicação ambiental

O risco de intoxicação ambiental dos larvicidas para os organismos-testes foi determinado por meio do método do quociente (Q) (GOKTEPE et al. 2004). O cálculo do Q é feito por meio da divisão do valor da concentração ambiental estimada (CAE) de cada inseticida pelo valor de CE50 calculado nos testes de toxicidade aguda.

A CAE é a concentração do inseticida aplicada em campo, de acordo com as recomendações previstas pelo Ministério da Saúde. Os valores da CAE utilizados foram as concentrações utilizadas para o controle de *A. aegypti*, de 0,25 mg.L⁻¹ para DFB e 1,0 mg.L⁻¹ para temefós.

O valor do Q, também denominado de quociente de risco (RQ), é um número puro, pois as unidades dos parâmetros se anulam na divisão. As classes de risco ambiental utilizadas foram alto risco, médio risco e baixo risco (Tabela 17).

Tabela 17. Classes dos valores de RQ de acordo com Goktepe et al. (2004).

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

9. Forma de análise dos resultados

As CE50 foram calculadas com a utilização do método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al. 1977) e os valores foram utilizados para classificar os dois larvicidas pela toxicidade aguda aos organismos-testes.

Para os valores de CENO e CEO, os dados obtidos foram analisados comparando-se as médias da mortalidade de *D. magna* ao final dos testes crônicos. Para isso, foram realizados testes de Pressuposições para análise de variância dos dados (Normalidade Cramer-von Mises, Homocedasticidade Brown Forsythe), e aplicado o teste ANOVA, com nível de significância de 5%. Para a comparação entre médias de dados paramétricos foi aplicado o teste de Tukey, utilizando-se programa de computação SAS 9.0 (2001).

O risco ambiental foi estimado pelo método de comparação da CAE do uso dos dois inseticidas com os valores de CE50. Os valores de QR foram utilizados para classificar os dois larvicidas pelo risco de intoxicação ambiental dos organismos-testes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes de sensibilidade com NaCl evidenciaram a sensibilidade e sanidade dos organismos para prosseguir com os testes de toxicidade aguda.

Nos testes agudos, as CE50 foram muito próximas para DFB e temefós, na ausência e presença de sedimento. A presença do sedimento não alterou a ação tóxica do produto para os organismos em estudo. De acordo com a classificação

de Zucker (1985) ambos os larvicidas se enquadram como extremamente tóxicos para *D. magna*, na presença e ausência de sedimento ($< 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) (Figura 40, Tabela 18).

Tabela 18. Concentrações efetivas médias de NaCl (g.L^{-1}) e dos larvicidas ($\mu\text{g.L}^{-1}$) em testes de toxicidade aguda para *D. magna* e classificação de Zucker (1985).

	LI	CE50	LS	Classificação de Zucker
NaCl	4,39	4,96	5,65	-
DFB	0,03	0,06	0,10	Extremamente tóxico
DFB com sed.	0,02	0,04	0,07	Extremamente tóxico
Temefós	0,10	0,15	0,20	Extremamente tóxico
Temefós com sed.	0,10	0,15	0,25	Extremamente tóxico

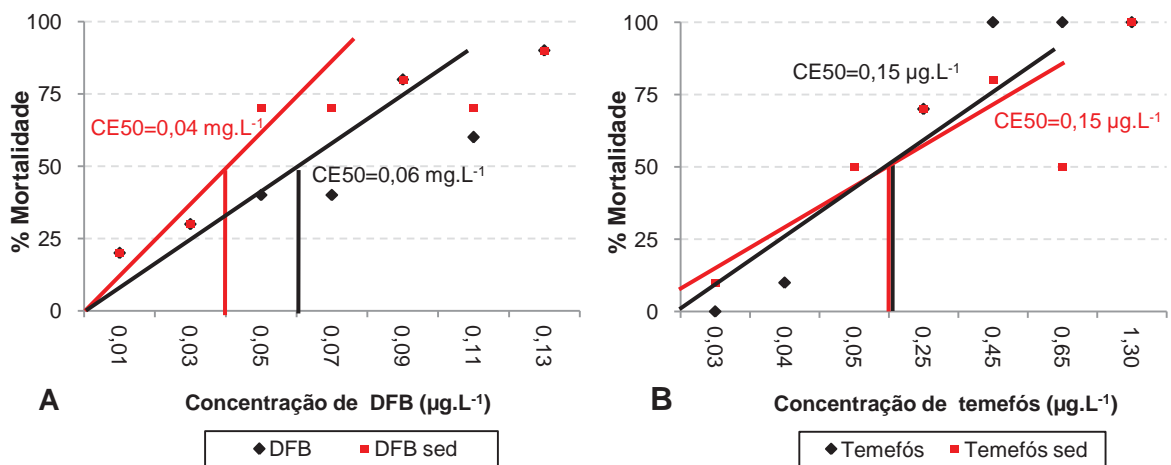


Figura 40. Comparação das médias de mortalidade de *D. magna* com 48 horas de teste. A: Comparação das CE50 entre testes de DFB na presença e ausência de sedimento. B: Comparação das CE50 entre testes de temefós na presença e ausência de sedimento.

Para o glifosato, o valor da CE50 para *Daphnia pulex* foi maior na presença de sedimento devido à imobilização do herbicida no sedimento, e deixou disponível apenas 59,5% da concentração do herbicida adicionado na água (JONSSON e MAIA, 1999). Os valores da CE50 do piramicarb para *Daphnia*

magna foi de 16 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 24 $\mu\text{g.L}^{-1}$ na ausência e presença de sedimento, respectivamente, tornando-o menos disponível para os organismos-testes (KUSK, 1996). Em estudos com o herbicida clamazone foram determinados valores de CE50 equivalentes a 1,51 mg.L^{-1} e 11,28 mg.L^{-1} em sistemas sem e com sedimento, respectivamente, onde o sedimento imobilizou 86,6% do herbicida (JONSSON e MAIA, 1999).

Maiores ações tóxicas foram encontradas em estudos de 48 horas com o organofosforado trichlorfon para cladóceros, com CE50 de 0,70; 0,53 e 0,92 ng.L^{-1} para *Daphnia magna*, *Daphnia similis* e *Daphnia laevis*, respectivamente, na ausência de sedimento, e 299,70; 381,62 e 282,73 ng.L^{-1} , respectivamente, na presença de sedimento, sendo o trichlorfon classificado como de alto risco ambiental (ARAUCO et al. 2005).

A menor adsorção dos inseticidas ao sedimento pode ser relacionada à baixa fração orgânica do solo utilizado nos testes. Esta fração é responsável principalmente pela adsorção de compostos hidrofóbicos, devido à presença de carbono orgânico (MILLIOLI et al, 2008). Apesar de os larvicidas DFB e temefós serem hidrofóbicos, a matéria orgânica presente no sedimento era de 12 g.dm^{-3} , somente 1% da composição do sedimento.

Na classificação de risco de intoxicação ambiental calculada pelo método do quociente, os dois larvicidas classificam-se como de alto risco ambiental ($\text{RQ} > 0,5$) (Tabela 19).

Tabela 19. Classificação dos larvicidas quanto ao risco de intoxicação ambiental para *D. magna*, de acordo com os testes agudos.

	DFB	DFB sed.	Temefós	Temefós sed.
RQ	4166,7	6250,0	6666,6	6666,6
Classificação	Alto risco	Alto risco	Alto risco	Alto risco

Em testes de toxicidade aguda de 48 horas de trichlorfon para *D. magna*, foram encontrados os valores de CE50 de 0,59 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (FERREIRA, 1998), 0,96 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (TOMLIN, 1995) e 0,01 mg.L^{-1} (EXOTOXNET, 1996). Estudos apontam que

os organofosforados, quando aplicados em tanques, reduzem a população de crustáceos, copépodos e cladóceros planctônicos (MCCRAAEN e PHILIPS, 1977).

O organofosforado clorpirifós também foi extremamente tóxico para populações de cladóceros, com CENO de $0,1\mu\text{g.L}^{-1}$ (MANCISIDOR et al. 2008).

Estudos com o inibidor de síntese de quitina DFB, na ausência e presença de sedimento, obtiveram CE50 em 48 horas de $0,56\mu\text{g.L}^{-1}$ e $1,51\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente, sendo classificado extremamente tóxico e de alto risco ambiental (SOUZA, 2008). Nebeker et al. (1983) calcularam CE50 de $2\mu\text{g.L}^{-1}$ de DFB para a *D. magna*.

Organismos zooplanctônicos foram utilizados para avaliar a ação tóxica de DFB em efluentes de piscicultura, e as CE50 encontradas foram $0,18\mu\text{g.L}^{-1}$; $0,51\mu\text{g.L}^{-1}$; $0,05\mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,04\mu\text{g.L}^{-1}$ para *D. similis*, *Ceriodaphnia dubia*, *Ceriodaphnia silvestrii* e *Simocephalus serrulatus*, respectivamente (MABILIA et al. 2004). Outros autores também o classificam como de ação tóxica elevada para invertebrados aquáticos (FISHER e HALL, 1992). Espécies de invertebrados de copépodos também foram estudadas quanto à sensibilidade ao larvicida DFB, e 50% da população de *Eurytemora affinis* foi eliminada quando submetidos à concentração de $2,2\mu\text{g.L}^{-1}$ do produto (SAVITZ et al. 1994).

Para os testes crônicos, houve mortalidade de *D. magna* para ambos os larvicidas, mesmo em concentrações sub-letais (Figura 41). Os valores de CENO, CEO e VC foram de $2,5\text{ng.L}^{-1}$, $5,0\text{ng.L}^{-1}$ e $3,54\text{ng.L}^{-1}$, respectivamente, para DFB; e de $6,2\text{ng.L}^{-1}$, $12,5\text{ng.L}^{-1}$ e $8,80\text{ng.L}^{-1}$, respectivamente, para temefós. As concentrações de DFB e temefós utilizadas em campo contra o vetor *A. aegypti*, recomendadas pelo Ministério da Saúde (DFB: $0,25\text{mg.L}^{-1}$, temefós: $1,0\text{mg.L}^{-1}$), são extremamente superiores às menores concentrações em que ocorreram mortalidades significativas para os organismos-testes.

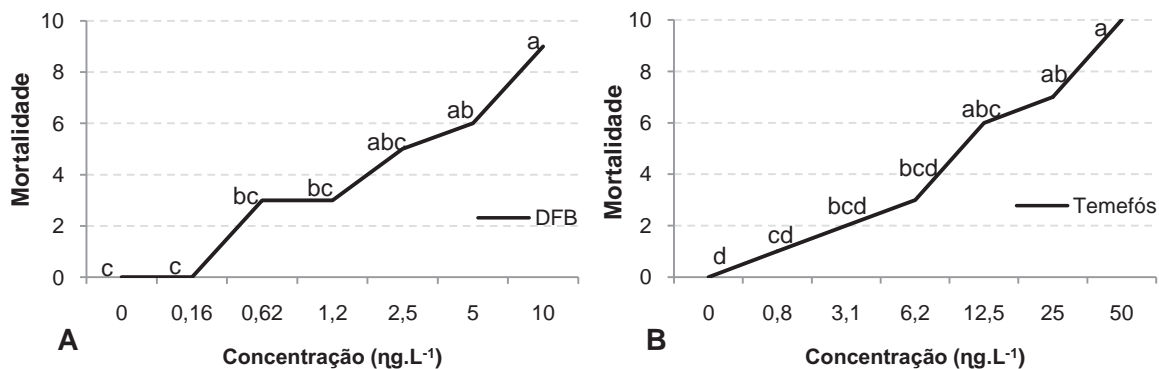


Figura 41. Mortalidade de *D. Magna* ao final de 7 dias de testes crônicos com DFB e temefós. a-d: comparação entre médias das concentrações para cada produto testado (A: Teste de Kruskal-Wallis F=6,66 e p=0,0002. B: Teste de Kruskal-Wallis F=9,10 e p<0,0001).

De acordo com os resultados apresentados, os larvicidas DFB e temefós são extremamente tóxicos para *D. magna* e outros organismos zooplanctônicos, mesmo em concentrações muito baixas. A dinâmica do ecossistema aquático pode sofrer danos severos com alterações drásticas na comunidade zooplanctônica, responsáveis por 80% da produção secundária nesses ambientes (MANGAS-RAMÍREZ et al. 2004).

A aplicação dos larvicidas DFB e temefós em áreas urbanas e rurais, e o possível carreamento dos produtos para os cursos hídricos, pode causar efeitos deletérios bruscos nas *D. magna*, espécie de grande importância para a comunidade zooplanctônica.

CONCLUSÃO

O larvicida temefós é levemente mais tóxico que o DFB para *D. magna*. A CI50 de temefós é 0,15 µg.L⁻¹ para testes com e sem sedimento, e as CI50 de DFB são 0,06 e 0,04 µg.L⁻¹ nos testes agudos na ausência e presença de sedimento, respectivamente, sendo ambos os larvicidas classificados como extremamente tóxicos para o microcrustáceo, e de alto risco de intoxicação ambiental para a espécie.

Testes crônicos sem sedimento para *D. magna* diminuem a longevidade dos organismos nas maiores concentrações, sendo estas são muito inferiores à concentração utilizada em campo para o controle de *A. aegypti*.

A presença de sedimento não altera a ação tóxica dos produtos para o organismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. *Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade Aguda – Método de ensaio com Daphnia ssp* (Crustacea, Cladocera). Terceira Edição, 22 p. 2009.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. *Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade Crônica – Método de ensaio com Ceriodaphnia ssp* (Crustacea, Cladocera). Terceira Edição, 18 p. 2010.

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: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 15, p. 55-64, jan./dez. 2005.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. *As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia*. São Carlos: Editora Rima, São Paulo, 2003, 340 p.

BRAGA, I. A.; LIMA, J. B. P.; SOARES, S. S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 99, n. 2, p. 199-203, Mar. 2004.

CARVALHO, M. S. L.; CALDAS, E. D.; DEGALLIER, N.; VILARINHOS, P. T. R.; SOUZA, L. C. K. R.; YOSHIZAWA, M. A. C.; KNOX, M. B.; OLIVEIRA, C. Susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós do Distrito Federal. *Revista de Saúde Pública*, v. 38, n. 5, p. 623-629, 2004.

- CHEN, C. D.; SELEENA, B.; CHIANG, Y. F.; LEE, H. L. Field evaluation of the bioefficacy of diflubenzuron (Dimilin ®) against container-breeding *Aedes* sp. mosquitoes. *Tropical Biomedicine*, v. 25, n. 1, p. 80-86, 2008.
- DELGADO, F. X.; BRITTON, J. H.; ANSAGER, J. A.; SWEARINGEN, W. Field assessment of *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin and potential synergism with diflubenzuron for control of savanna grasshopper complex (Orthoptera) in Mali. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 73, p. 34-39, 1999.
- EXOTOXNET Extension Toxicology Network. *Pesticide information profiles*. Oregon State University, 1996. p. 1-3.
- FERREIRA, A. C. *Toxicidade aguda e risco de contaminação ambiental de inseticidas para peixes (Poecilia reticulata) e microcrustáceos (Daphnia magna)*. 1998. f. 37-68. Monografia (Trabalho de graduação em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- 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.
- 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.
- GOKTEPE, I.; PORTIER, R.; AHMEDNA, M. Ecological risk assessment of Neem-based pesticides. *Journal of Environmental Science Health Part B. Pestic. Food Contam. Agric. Wastes B*. v. 39, n. 2, p. 311-320, 2004.
- HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, V. Trimed Sperman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicology bioassays. *Environmental Science and Technology*. v. 7, p. 714-719, 1977.
- JONSSON, C.; MAIA, A. Toxicidade dos herbicidas Clomazone e Quinclorac. Para o invertebrado aquático *Daphnia similis* na presença e ausência de

- sedimento. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 9. p. 145-153, 1999.
- KUSK. K. Bioavailability and effect of pirimicarb on *Daphnia magna* in a laboratory freshwater. Sediment system. *Environmental Contamination and Toxicology* v. 31, p. 252-255, 1996.
- LIMA, E. P.; OLIVEIRA FILHO, A. M.; LIMA, J. W. O.; RAMOS JÚNIOR, A. N.; CAVALCANTI, L. P. G. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em municípios do estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 3, p. 250-263, Mai/Jun. 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.
- MANCISIDOR, P. L.; CARBONELL, G.; MARINA, A.; FERNA NDEZ, C.; TARAZONA, J. V. Zooplankton community responses to chlorpyrifos in mesocosms under Mediterranean conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 71, p. 16–25, 2008.
- 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). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 51, p. 216-222, 2004.
- MARCORIS, M. L. G.; CAMARGO, M. F.; SILVA, I. G.; TAKAKU, L.; ANDRIGHETTI, M. T. Modificação da susceptibilidade de *Aedes aegypti* ao temephos. *Revista de Patologia Tropical*, v. 24, p.31-40, 1995.
- MARCORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; TAKAKU, L.; GLASSER, C. M.; GARBELOTO, V. C.; BRACCO, J. E. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 98, n. 5, p. 703-708, Jul. 2003.
- MARTINS, F.; SILVA, I. G. Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae).

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 37, n. 2, p. 135-138, Mar./Abr. 2004.

MCCRAREN, J. P.; PHILIPS, T. R. Effects of masoten (Dylox) on plankton in eathponds. *Proceedings of the Annual Conference of Southeastern Association of Fish and Wildlife Agencies*, v. 3, n, p. 441–448, 1977.

MILLIOLI, V. S.; SOBRAL, L. G. S.; SÉRVULO, E. F. C.; CARVALHO, D. D. Biorremediação de solo impactado com óleo cru: avaliação da potencialidade da utilização surfatantes. *Série Tecnologia Ambiental 50*. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008. 95p.

MSCASLAND, C. S.; COOPER, R. J.; BARNUM, D. A. Implications for the use diflubenzuron to reduce arthropod populations inhabiting evaporation ponds of the San Joaquin Valley, California. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 60, p. 702-708, 1998.

NEBEKER, A. V.; MCKINNEY, P.; CAIRNS, M. A. Acute and chronic effects of Diflubenzuron (dimilin) on freshwater fish and invertebrates. *Environmental Toxicology & Chemistry*, v. 2, p. 239, 1983.

OECD - Final report of the OECD workshop selection of soils/sediments. Belgirate, Italy. p. 1-55, Jun. 1995.

PINHEIRO, V. C.; TADEI, W. P. Evaluation of the residual effect of temephos on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae in artificial containers in Manaus, Amazonas State, Brazil. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 18, n. 6, p. 1529-1536, Nov/Dez. 2002.

SAS Institute Inc. 2001. SAS® 9.0 Language Reference: Concepts. Cary, NC: SAS Institute Inc.

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*. *Marine Environmental Research*, v. 37, p. 297-312, 1994.

SECCACINI, E.; LUCIA, A.; HARBURGUER, L.; ZERBA, E.; LICASTRO, S.; MASUH, H. Effectiveness of pyriproxyfen and diflubenzuron formulations as

- larvicides against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 24, n. 3, p. 398-403, 2008.
- SILVIA, J. J.; MENDES, J. Susceptibility of *Aedes aegypti* (L) to the insect growth regulators diflubenzuron and methoprene in Uberlândia, state of Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 5, p. 612-616, Nov./Dez. 2007.
- SOUZA, J. P. *Toxicidade aguda e risco ambiental do diflubenzuron para Daphnia magna, Poecilia reticulata e Lemna minor na ausência e presença de sedimento*. Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 78p, 2008.
- TOMLIN, C. The pesticide manual: a world compendium. 10 ed. Washington: *Crop Protection*, 1995. 1606 p.
- VILLANUEVA-JIMENEZ, J. A.; HOY, M. A.; DAVIES, F. S. Field evaluation of integrated pest management-compatible pesticides for the citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae) and its parasitoid *Ageniaspis citricola* (Hymenoptera: Encyrtidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 93, p. 357-367, 2000.
- ZAGATTO, P. A.; 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.

VII. CAPÍTULO IV

Determinação de resíduos de diflubenzuron e temefós em águas de bioensaios de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

INTRODUÇÃO

Substâncias químicas acumulam-se em recursos hídricos e causam problemas de saúde pública. Destacam-se os inseticidas, entre eles os inseticidas, herbicidas, fungicidas, utilizados com frequência na aquicultura, na agricultura e no combate a vetores de doenças. O acúmulo destes produtos no meio aquático depende de fatores como temperatura, pH, luminosidade e sedimento, de acordo com as propriedades físico-químicas dos inseticidas.

Inseticidas organofosforados como o tamaron (metamidofós), muito utilizado na agricultura, e o Abate (temefós), amplamente empregado no controle do vetor transmissor da dengue, possuem distribuição em todo o território brasileiro (MENDES et al. 2006). Os organofosforados são compostos químicos

cujo efeito se processa principalmente pela intoxicação aguda, por meio da inibição da enzima colinesterase, ocasionando convulsões, paradas respiratórias e morte (MADDRELL, 1980).

Outro grupo químico de agrotóxicos com ampla distribuição no país é o *Insect Growth Regulators* (IGR). Inibidores de síntese de quitina fazem parte deste grupo, e atualmente são alvos de estudos para aplicações contra vetores de doenças no meio urbano. O diflubenzuron (DFB) atua na inibição da enzima quitina sintetase, a qual é responsável pela polimerização da uridina-difosfato-acetilglucosamina em quitina (KIRK-OTHMER, 1981).

A necessidade do uso destes produtos químicos origina preocupações com possíveis consequências ambientais. O acúmulo dos inseticidas nos recursos hídricos provoca intoxicações agudas, e quando presentes em concentrações sub-letais, acarreta intoxicações crônicas com a exposição prolongada ao produto. O controle de resíduos dos inseticidas no meio aquático é fundamental para o estabelecimento de medidas mitigadoras que controlem e/ou minimizem intoxicações à flora e fauna viventes no local.

A entrada dos inseticidas no ambiente aquático depende de processos de lixiviação e escoamento superficial (SILVA e FAY, 2004). Processos de adsorção e dessorção também possuem grande influência na persistência dos inseticidas nos recursos hídricos, juntamente com a volatilização, a biodegradação, a fotólise e a hidrólise (DOUCETTE, 2003). A bioacumulação e a toxicidade de inseticidas em organismos aquáticos também são influenciadas pelos processos de adsorção e dessorção (JONES e HUANG, 2003).

Diante da possibilidade da ocorrência de desequilíbrios ambientais devido ao uso de inseticidas e possíveis acúmulos no meio aquático, objetivou-se avaliar a concentração de resíduos dos larvicidas DFB e temefós, utilizados no controle de larvas de *Aedes aegypti*, em águas utilizadas em bioensaios de toxicidade aguda e crônica de *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-Nilo), na ausência e presença de sedimento, e avaliar o potencial de lixiviação e escoamento superficial de ambos os larvicidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Testes preliminares de toxicidade aguda e crônica de DFB e temefós foram conduzidos no Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal. Os testes foram realizados com tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), na presença e ausência de sedimento. Os produtos comerciais utilizados foram o Diflubenzuron 25% Champion[®] e o Temefós Fersol 1G[®].

1. Testes preliminares

Os peixes foram obtidos do setor de Tilapicultura do Centro de Aquicultura da UNESP, campus de Jaboticabal. Os testes agudos foram conduzidos em sistema estático durante 48 horas, com volume final de 3 litros das soluções-testes e 3 alevinos por tratamento. Os testes crônicos foram mantidos por 7 dias, com volume final e 3 litros de soluções-testes e 5 alevinos por tratamento, ambos realizados na ausência e presença de sedimento.

Em testes na ausência de sedimento, os larvicidas foram adicionados 24 horas após os peixes serem colocados nos recipientes-testes. Nos testes na presença de sedimento, os larvicidas foram adicionados 24 horas antes da adição dos peixes, a fim de que ocorresse interação solo e larvicida.

As concentrações utilizadas para testes agudos foram: 0, 1, 3, 5, 10, 14 e 16 mg.L⁻¹ para DFB e 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg.L⁻¹ para temefós para testes sem sedimento, e 0, 5, 12, 18, 22, 31 e 55 mg.L⁻¹ para DFB e 0, 5, 10, 15, 20 e 25 mg.L⁻¹ para temefós para testes com sedimento. Para testes crônicos, as concentrações foram de 0; 0,07; 0,13; 0,67 e 1,34 mg.L⁻¹ para DFB e 0; 0,07; 0,1; 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹ para temefós em testes sem sedimento, e 0; 0,08; 0,15; 1,22 e 4,40 mg.L⁻¹ para DFB e 0; 0,08; 0,10; 1,5 e 3,0 mg.L⁻¹ para temefós em testes com sedimento.

As coletas de água foram realizadas no momento inicial de cada teste, e subsequentes dias de avaliação dos testes (testes agudos: 24 e 48 horas; testes crônicos: 1º, 3º, 5º e 7º dias).

2. Sedimento

O sedimento utilizado nos testes pertence à classe textural argilosa, não sujeito a descarte de resíduos de atividades antrópicas, coletado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Tabela 20).

Tabela 20. Análise física e química do sedimento argiloso.

Composição química	Valores	Composição física	Valores
pH (CaCl ₂)	5,3	Argila (g.kg ⁻¹)	578
MO (g.dm ⁻³)	12,0	Limo (g.kg ⁻¹)	200
P (mg.dm ⁻³)	11,0	Areia fina (g.kg ⁻¹)	141
K (mmol _c .dm ⁻³)	1,3	Areia grossa (g.kg ⁻¹)	81
CA (mmol _c .dm ⁻³)	19,0	Classe textural	Argilosa
Mg (mmol _c .dm ⁻³)	9,0		
H + Al (mmol _c .dm ⁻³)	20,0		
SB (mmol _c .dm ⁻³)	29,3		
T (mmol _c .dm ⁻³)	49,3		
V (%)	59,0		

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

3. Validação do método analítico

Para determinação de resíduos dos inseticidas na água, coletou-se amostras de água dos testes de toxicidade de *O. niloticus* logo após a adição dos produtos, e posteriormente a cada 24 horas dos testes agudos, e no 1º, 3º, 5º e 7º dias dos testes crônicos. Foi realizada a preparação da matriz água e a determinação do DFB e temefós por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O equipamento utilizado foi o sistema cromatográfico da marca Thermo Finnigan, equipado com detector ultravioleta e *loop* de 20 µL, coluna ACER 5 C18 de fase reversa com 250 mm de comprimento, diâmetro interno de 4,5 mm e tamanho de partícula de 5 µm. A fase móvel empregada foi solução de acetonitrila e água (70:30 para DFB e 80:20 para temefós v:v), em sistema isocrático com fluxo da fase móvel de 1,0 ml.min⁻¹ e comprimento de onda do detector de 258 nm para DFB e 252 nm para temefós (Tabela 21). Os tempos de retenção dos analitos foram 3,6 minutos para DFB e 4,3 minutos para temefós (Figura 42).

Tabela 21. Método utilizado para determinação dos resíduos de DFB e temefós nas águas dos testes.

	DFB	Temefós
Coluna	ACER 5 C18 de fase reversa 250 x 4,5 mm 5 µm	ACER 5 C18 de fase reversa 250 x 4,5 mm 5 µm
Fase móvel	Acetonitrila-água (70:30 v/v)	Acetonitrila-água (80:20 v/v)
Taxa de fluxo	1 ml.min ⁻¹	1 ml.min ⁻¹
Temperatura coluna	20°C	20°C
Comprimento de onda	256 nm	254 nm
Volume injeção	10 µl	15 µl
Padrão interno	Diflubenzuron Champion 99,6%	Temephos Pestanal 95,6%
Tempo retenção	3,6 min	4,5 min
Solvente da amostra	Acetonitrila	Acetonitrila

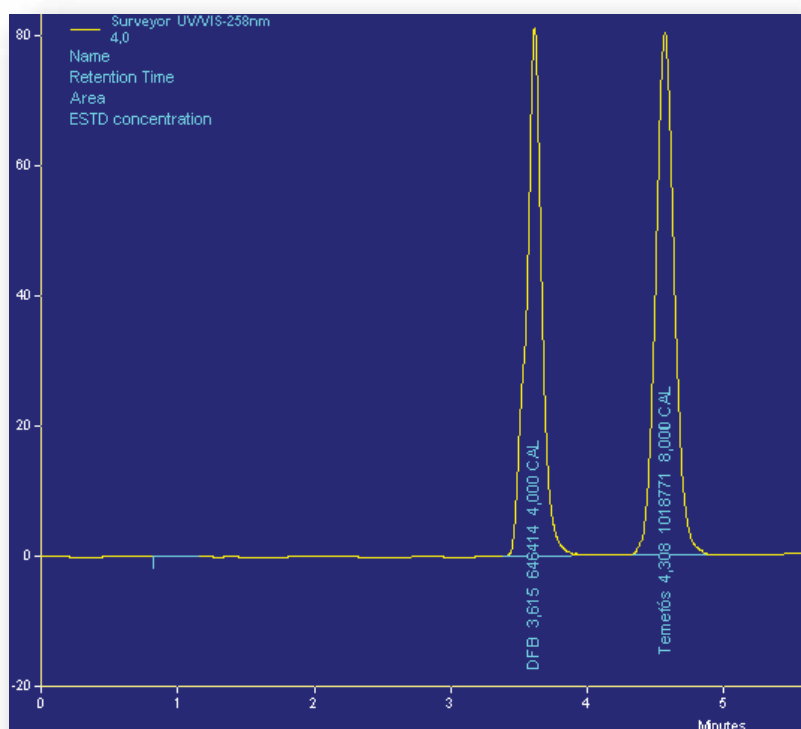


Figura 42. Cromatogramas dos padrões de 4 ppm de DFB e 8 ppm de temefós.

O limite de detecção (LD) foi determinado como a menor concentração do analito diferenciada com segurança do ruído do sistema (3 vezes superior ao ruído da linha de base). O limite de quantificação (LQ) correspondeu à menor concentração do analito quantificada com exatidão e fidelidade (LANÇAS, 2004).

A curva analítica foi estabelecida após injeção de soluções-padrão para cada larvicida. Injetaram-se soluções-padrão de 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 ppm de DFB e 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 ppm de temefós (Figura 43). As soluções-padrão foram obtidas a partir de padrões analíticos Diflubenzuron Champion® (pureza de 99,6%) e Temephos Pestanal® (pureza de 95,6%) diluídos em acetonitrila (grau HPLC).

A metodologia foi validada de acordo com os parâmetros: especificidade; determinação da faixa de trabalho e faixa linear; linearidade; sensibilidade; limite de detecção; limite de quantificação; exatidão; precisão e incerteza de medição (Tabelas 22 e 23) (SILVA e ALVES, 2006).

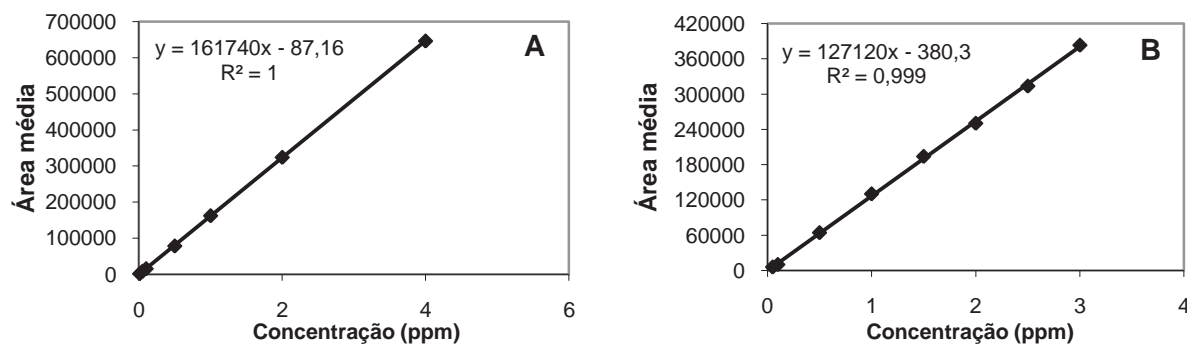


Figura 43. Curvas analíticas obtidas para DFB (A) e temefós (B).

Tabela 22. Validação do método analítico de DFB em água.

Parâmetro	DFB
Limite de detecção (mg.L ⁻¹) (n=5)	0,002221745
Limite de quantificação (mg.L ⁻¹) (n=5)	0,006732561
Curva de calibração (n=3)	$y = 161740 x - 87,16$ $r = 1$
Exatidão (%)	
0,01 mg.L ⁻¹	121,01
0,5 mg.L ⁻¹	97,43
4,0 mg.L ⁻¹	99,94
Precisão (CV%)	<i>Intra-ensaio (n=5)</i>
0,01 mg.L ⁻¹	5,82
0,5 mg.L ⁻¹	0,58
4,0 mg.L ⁻¹	0,02

r = coeficiente de correlação linear
CV = coeficiente de variação

Tabela 23. Validação do método analítico para temefós em água.

Parâmetro	Temefós
Limite de detecção (mg.L ⁻¹) (n=5)	0,011747751
Limite de quantificação (mg.L ⁻¹) (n=5)	0,035599245
Curva de calibração (n=3)	y = 127120 x - 380,3 r = 0,999
Exatidão (%)	
0,05 mg.L ⁻¹	92,52
1,0 mg.L ⁻¹	102,66
3,0 mg.L ⁻¹	100,64
Precisão (CV%)	<i>Intra-ensaio (n=5)</i>
0,05 mg.L ⁻¹	8,23
1,0 mg.L ⁻¹	0,59
3,0 mg.L ⁻¹	0,81

r = coeficiente de correlação linear

CV = coeficiente de variação

4. Determinação do potencial de lixiviação e potencial de transporte

Foi realizada a avaliação do potencial de lixiviação dos larvicidas por meio do Índice de GUS (GUSTAFSON, 1989), de acordo com a equação:

$$GUS = \log (t^{1/2} \text{ solo}) \times (4 - \log (K_{oc}))$$

onde:

$t^{1/2}$ solo = meia vida do produto no solo;

K_{oc} = coeficiente de adsorção ao carbono orgânico.

Os valores de GUS obtidos foram utilizados para classificar os inseticidas nas categorias, definidas por faixas pré-estabelecidas (Tabela 24).

Tabela 24. Classes dos valores de GUS de acordo com Gustafson (1989).

Índice de GUS	Classes
$GUS \leq 1,8$	Não sofre lixiviação
$1,8 \leq GUS \leq 2,8$	Faixa de transição
$GUS \geq 2,8$	Provável lixiviação

Para a avaliação do potencial de transporte dos larvicidas foi utilizado o método de GOSS (GOSS, 1992), o qual reúne um conjunto de cláusulas de regras, que classifica os inseticidas em alto potencial, médio potencial e baixo potencial de transporte de água, dissolvido em água ou associado a sedimento. Os cálculos dos potenciais de lixiviação e transporte foram baseados em valores de coeficiente de adsorção e meia vida disponibilizados por USEPA (1998) e WHO (2004) (Tabela 25).

Tabela 25. Propriedades físico-químicas do DFB e temefós (Fontes: USEPA, 1998; WAUCHOPE et al. 1992; WHO, 2004).

	DFB	Temefós
Massa molecular relativa	310,7	466,5
Ponto de fusão	230-232°C (pureza≥99%) 210-230°C (pureza≥95%)	30,0-30,5°C (pureza 94%)
Ponto de ebulição	-	-
Pressão de vapor a 25°C	≤ 9X10 ⁻¹⁰ mmHg	6 x 10 ⁻⁸ mmHg
Temperatura decomposição	não decompõe no ponto de fusão < 4% (sólido)	120-125°C
Volatilidade	< 2% (água pH 5,6)	não volátil
Densidade	1,56 g.cm ⁻³	1,3 g.cm ⁻³
¹ log K _{ow}	3,89 (22°C e pH 3)	4,41 (25°C)
² K _{oc}	10000 l.kg ⁻¹	18250 a 31800 l.kg ⁻¹
Solubilidade em água (25°C)	8 x 10 ⁻⁵ g/L (pH 7) 1 x 10 ⁻⁴ g/L (pH 4) 3,2 x 10 ⁻⁴ g/L (pH 10)	30 µg.L ⁻¹
Estabilidade em água	4% decomposição (21 dias, pH 5) 8% decomposição (21 dias, pH 7) 26% decomposição (21 dias, pH 9)	ótima em pH 5-7 e até 49°C
Hidrólise (25°C)	½ > 180 dias (pH 5) ½ > 180 dias (pH 7) ½ = 32,5 dias (pH 9)	½ = 79,3 dias (pH 4) ½ = 28,7 dias (pH 7) ½ = 49,1 dias (pH 9)
Degradação no solo	½ ≤ 7 dias	½ = 17,2 dias
Fotólise	½ = 80 dias a 25°C	não sofre

¹ Coeficiente de partição n-octanol/água.

² Coeficiente de adsorção carbono orgânico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as cláusulas do método de GOSS (1992), os larvicidas DFB e temefós possuem médio potencial de transporte em água, associado a sedimento ou dissolvido em água, e não sofrem lixiviação, segundo cálculos realizados pelo Índice de GUS. Outros trabalhos com DFB (PESSOA et al. 2007; IPCS, 1994) e com temefós (USEPA, 1998) também classificaram estes inseticidas como médio potencial de transporte e não sofrem lixiviação.

Nos resultados dos resíduos na água dos testes de tilápia-do-Nilo, as concentrações de DFB diminuíram ao longo do tempo. A presença do sedimento nos testes não alterou a disponibilidade do produto na água (Figuras 44 e 45).

A diminuição de concentração do DFB foi mais acentuada nas primeiras 24 horas de teste, e após este período, manteve concentrações baixas, com decréscimos menores.

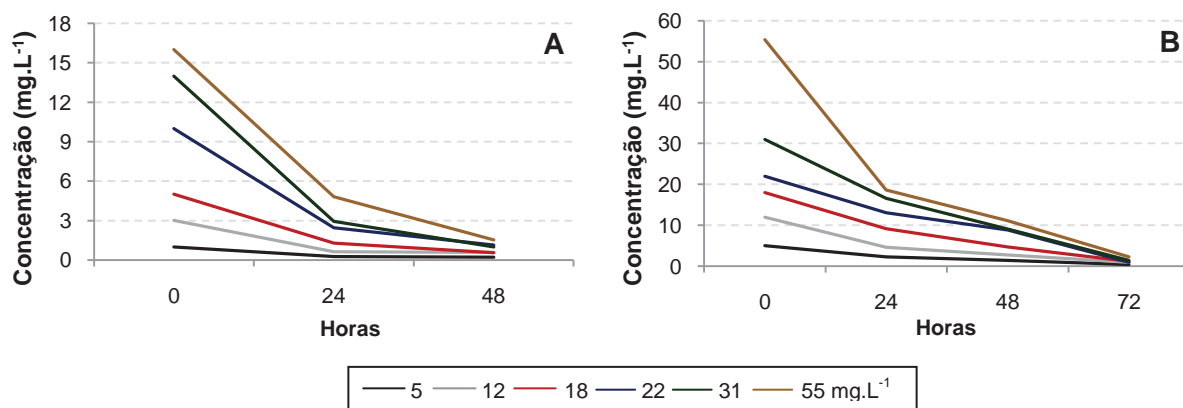


Figura 44. Diminuição das concentrações de DFB na água ao longo do tempo em teste agudo na ausência (A) e presença de sedimento (B).

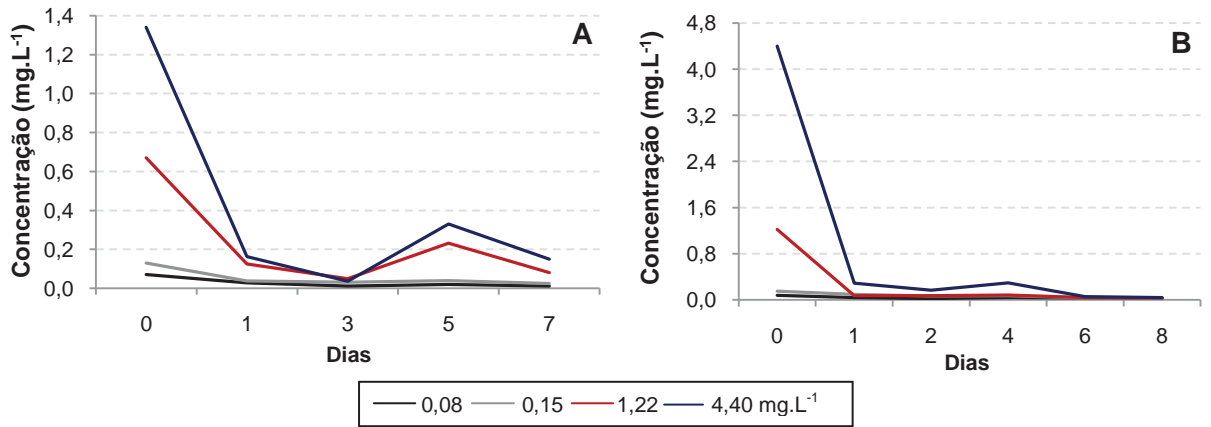


Figura 45. Diminuição das concentrações de DFB na água ao longo do tempo em teste crônico na ausência (A) e presença de sedimento (B).

Em testes com temefós também houve decréscimo da concentração do produto ao longo do tempo. Não houve diferença entre testes realizados na ausência e presença de sedimento (Figura 46 e 47).

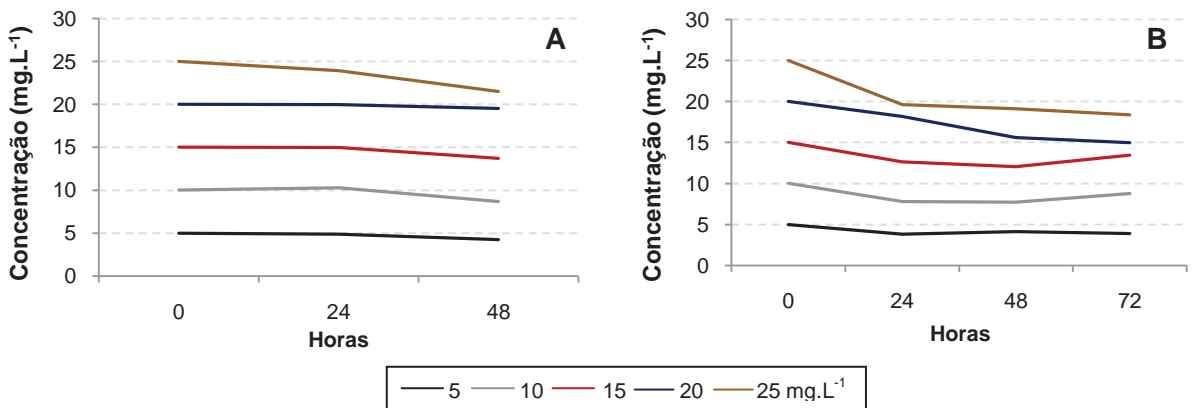


Figura 46. Diminuição das concentrações de temefós na água ao longo do tempo em teste agudo na ausência (A) e presença de sedimento (B).

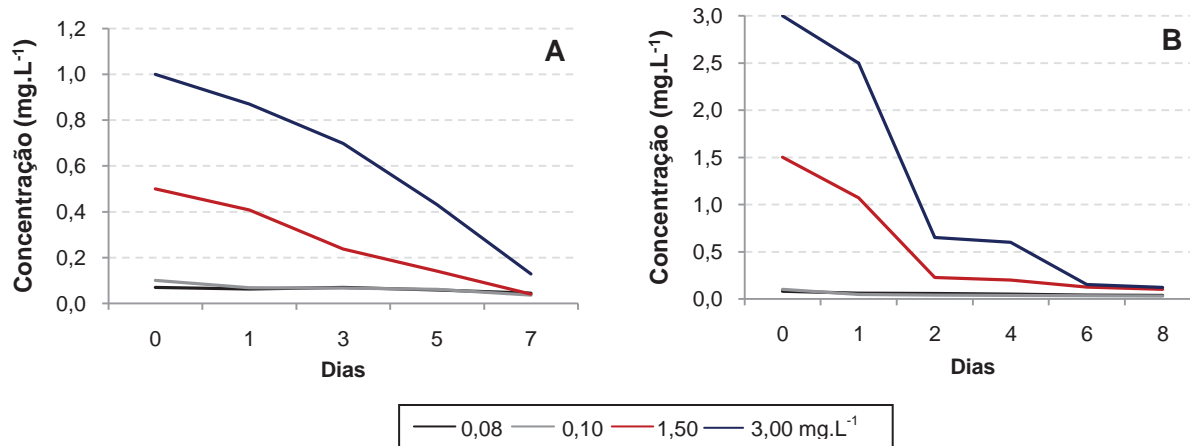


Figura 47. Diminuição das concentrações de temefós na água ao longo do tempo em teste crônico na ausência (A) e presença de sedimento (B).

O larvicida temefós apresentou concentrações variadas ao longo dos testes. Houve uma forte redução da concentração do temefós até 48 horas no teste crônico com sedimento, entretanto, no sem sedimento esta redução ocorreu de maneira constante ao longo dos dias. Em testes agudos com sedimento, houve uma sutil diminuição do temefós até 24 horas, e posteriormente manteve-se constante. Testes agudos na ausência de sedimento apresentaram concentrações com leve redução até 48 horas.

A disponibilidade do DFB na água diminuiu até 91,7% com 48 horas de teste na ausência de sedimento, e até 95,9% com 72 horas de teste na presença de sedimento (Tabela 26). Nos testes crônicos houve diminuição de até 96,2% de DFB com 7 dias na ausência de sedimento, e de 99,1% com 8 dias na presença de sedimento (Tabela 27).

Tabela 26. Percentualidade da diminuição da concentração inicial de DFB medidas ao final dos testes agudos na ausência e presença de sedimento.

Concentração inicial (mg.L ⁻¹) ¹	Concentração com 48 h (%) ¹	Concentração inicial (mg.L ⁻¹) ²	Concentração com 48 h (%) ²	Concentração com 72 h (%) ²
1	-76,5	2	-73,3	-91,9
5	-79,9	6	-77,0	-91,9
10	-90,9	11	-74,1	-93,5
12	-90,0	13	-61,4	-95,8
14	-91,7	15	-71,2	-95,5
16	-91,4	17	-80,0	-95,9

¹ Teste agudo na ausência de sedimento.

² Teste agudo na presença de sedimento.

Tabela 27. Percentualidade da diminuição da concentração inicial de DFB medidas ao final dos testes crônicos na ausência e presença de sedimento.

Concentração inicial (mg.L ⁻¹) ¹	Concentração com 7 d (%) ¹	Concentração inicial (mg.L ⁻¹) ²	Concentração com 6 d (%) ²	Concentração com 8 d (%) ²
0,07	-85,5	0,08	-62,3	-73,6
0,13	-84,4	0,15	-76,3	-80,6
0,67	-96,2	1,22	-96,7	-97,3
1,34	-85,5	4,40	-98,6	-99,1

¹ Teste crônico na ausência de sedimento.

² Teste crônico na presença de sedimento.

Nos ensaios realizados com temefós também não houve diferença significativa na diminuição das concentrações do larvicida ao final dos testes agudos e crônicos com e sem sedimento (Tabelas 28 e 29). Testes agudos apresentaram redução na concentração de até 21,2% com 48 horas na ausência de sedimento, e de 23,1% com 72 horas na presença de sedimento.

Tabela 28. Percentualidade da diminuição da concentração inicial de temefós medidas ao final dos testes agudos na ausência e presença de sedimento.

Concentração inicial (mg.L ⁻¹)	Concentração com 48 h (%) ¹	Concentração com 48 h (%) ²	Concentração com 72 h (%) ²
5	-13,6	-17,1	-21,9
10	-19,4	-22,8	-12,5
15	-9,3	-22,2	-13,3
20	-10,5	-13,9	-17,2
25	-12,1	-20,0	-23,1
30	-21,2	-	-

¹ Teste agudo na ausência de sedimento.

² Teste agudo na presença de sedimento.

Tabela 29. Percentualidade da diminuição da concentração inicial de temefós medidas ao final dos testes crônicos na ausência e presença de sedimento.

Concentração inicial (mg.L ⁻¹) ¹	Concentração com 7 d (%) ¹	Concentração inicial (mg.L ⁻¹) ²	Concentração com 6 d (%) ²	Concentração com 8 d (%) ²
0,07	-49,4	0,08	-45,9	-51,4
0,1	-67,3	0,1	-63,0	-65,3
0,5	-92,7	1,5	-90,6	-92,4
1,0	-84,5	3,0	-94,8	-95,9

¹ Teste crônico na ausência de sedimento.

² Teste crônico na presença de sedimento.

A adsorção de produtos químicos a superfícies sólidas desempenha um importante papel no impacto sobre o meio ambiente. Produtos químicos com baixa solubilidade em água e pressão de vapor, ou com alto coeficiente de partição n-octanol-água, apresentam coeficiente de adsorção elevado, e podem adsorver-se com mais facilidade ao sedimento em ambientes aquáticos (SWANN et al. 1983). Apesar de o DFB e o temefós apresentarem tais características (Tabela 25), não houve diferença significativa entre testes agudos com e sem sedimento.

A fração orgânica do solo é responsável pela adsorção de muitos compostos, principalmente os hidrofóbicos, devido a presença de carbono orgânico. Quanto maior a fração orgânica do solo, maior o número de moléculas adsorvidas a ele e menor disponibilidade e a biodegradação destes compostos hidrofóbicos (MILLIOLI et al. 2008). Apesar de os larvicidas DFB e temefós serem

hidrocarbonetos hidrofóbicos, a baixa adsorção dos produtos ao solo, quando comparados com os testes realizados na ausência de sedimento, pode ser relacionada à baixa quantidade de matéria orgânica presente no sedimento (12 g.dm^{-3} , aproximadamente 1% da composição do sedimento).

CONCLUSÃO

O DFB e o temefós possuem médio potencial de transporte em água, associados a sedimento ou dissolvidos em água, e não sofrem lixiviação.

As concentrações de resíduos de DFB e temefós nas águas de testes agudos e crônicos de *O. niloticus* reduziram ao longo do tempo. A diminuição das concentrações de DFB foi maior, quando comparada com a redução de temefós.

O DFB apresenta predominante redução das concentrações nas primeiras 24 horas de teste, e após este período, mantém reduções menores. O larvicida temefós apresentou diminuições variadas das concentrações durante os testes.

A presença de sedimento não diminui a quantidade de resíduos dos larvicidas nas águas analisadas, o que pode ser relacionado com o tipo de solo utilizado (baixa quantidade de matéria orgânica).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DOUCETTE, W. J. Quantitative structure-activity relationships for predicting soil-sediment sorption coefficients for organic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 22, p. 1771-1788, 2003.

GOSS, D. W. Screening procedure for soils and pesticides for potential water quality impacts. *Weed Technology*, Champaign, v. 6, n. 4, p. 701-708, 1992.

GUSTAFSON, D. I. Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Elmsford, v. 8, n. 4, p. 339-357, 1989.

- IPCS. International Programme On Chemical Safety. *Environmental health criteria 184 - Diflubenzuron*. World Health Organization, Geneva, 1994. Disponível em <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc184.htm#SubSectionNumber:9.1.2>> Acesso em: Jan 2012.
- JONES, K. D.; HUANG, W. H. Evaluation of toxicity of the pesticides chlorpyrifos and arsenic, in the presence of compost humic substances in aqueous systems. *Journal of Hazardous Materials*, v. 103, p. 93-105, 2003.
- KIRK-OTHMER. *Encyclopedia of Chemical Technology*. 3rd ed., Volumes 1-26. New York, NY: John Wiley and Sons, 1978-1984, p. 413-459, 1981.
- LANÇAS, F. M. *Validação de métodos cromatográficos de análise*. São Carlos: RiMA, 2004. 62p.
- MADDRELL, S. H. P. The insect neuroendocrine system as a target for insecticides. *Insect neurobiology and pesticide action*. Society of Chemical Industry, London, p. 329-334, 1980.
- MENDES, D. R.; OLIVEIRA, J. C. S.; PINHEIRO, M. C. D.; AMARANTE-JUNIOR, O. P. NUNES, G. S. Método miniaturizado para análise de resíduos de herbicidas ácidos e inseticidas organofosforados em amostras de água. *Anais da 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Águas de Lindóia, São Paulo. 2006.
- MILLIOLI, V. S.; SOBRAL, L. G. S.; SÉRVULO, E. F. C.; CARVALHO, D. D. Biorremediação de solo impactado com óleo cru: avaliação da potencialidade da utilização surfatantes. *Série Tecnologia Ambiental 50*. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008. 95p.
- PESSOA, M. C. P. Y.; SCRAMIN, S.; CHAIM, A.; FERRACINI, V. L. Avaliação do potencial de transporte de inseticidas usados no Brasil por modelos screening e planilha eletrônica. *Embrapa Meio Ambiente*, Jaguariúna, 2007. 24p.
- SILVA, A. P.; ALVES, M. C. C. Como iniciar a validação de métodos analíticos. *Enqualab – Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia*, São Paulo, p. 8-15, 2006.

- SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. *Agrotóxicos e meio ambiente*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 400p.
- SWANN, R. L.; LASKOWSKI, D. A.; MCCALL, P. J. KUY, K. V.; DISHBURGER, H. J. A rapid method for the estimation of the environmental parameters octanol/water partition coefficient, soil sorption constant, water to air ratio and water solubility. *Residue Review*, v. 85, p. 17-28, 1983.
- USEPA. United States Environmental Protection Agency. *Registration Eligibility Document for Temephos, Chemical No 059001*. Washington, 1998.
- WAUCHOPE, R. D.; BUTTLER, T. M.; HORNSBY, A. G.; AUGUSTIJN-BECKERS, P. M.; BURT, J. P. The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision making. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 123, p. 1-155, 1992.
- WHO. World Health Organization. *Specifications and evaluations for public health pesticides. Diflubenzuron*. Geneva, 2004.

VIII. CAPÍTULO V

Lesões histológicas de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas aos larvicidas diflubenzuron e temefós

INTRODUÇÃO

A expansão da aquicultura e da agricultura elevou a quantidade de inseticidas utilizados no país. O uso destes compostos químicos em saúde pública, no combate a vetores de doenças, também aumentou com o crescimento das áreas urbanas. Os larvicidas temefós, da classe dos organofosforados, e o diflubenzuron, um inibidor de crescimento de insetos (DFB) são amplamente utilizados no combate às larvas do vetor *Aedes aegypti*, mosquito transmissor da dengue.

A utilização destes inseticidas aumenta os impactos ambientais, uma vez que estes são lixiviados e/ou carregados com a chuva até os recursos hídricos. A contaminação destes locais frequentemente é observada por meio da mortalidade do sistema biótico, entretanto, outros sinais como alterações genéticas, histológicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais podem ocorrer nos organismos não alvos.

Os xenobióticos atuam nos organismos de várias maneiras e em diferentes níveis. Diversas técnicas foram desenvolvidas para avaliar os efeitos dos agentes tóxicos nestes organismos, e os indicadores fisiológicos e comportamentais são os mais utilizados na avaliação dos impactos causados pelos contaminantes nas populações.

Alterações histológicas e morfológicas são observadas em diversos organismos afetados por contaminantes. As brânquias de peixes, por exemplo, são altamente sensíveis a materiais irritantes presentes na água (WESTER e ROGHAIR, 1994).

O fígado dos peixes é outro órgão largamente estudado como biomarcador de contaminação aquática, por ser o principal local de biotransformação de muitos xenobióticos presentes no meio aquático. Portanto, estudos sobre a histologia hepática em peixes é fundamental para realizar avaliações de possíveis contaminações químicas.

Diante do uso dos inseticidas DFB e temefós em saúde pública, agricultura e em aquicultura, e o risco de intoxicação dos larvicidas aos organismos não alvos, objetivou-se neste trabalho determinar a histopatologia de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas aos larvicidas DFB e temefós em testes de toxicidade aguda na ausência de sedimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Testes preliminares de toxicidade aguda de DFB e temefós foram conduzidos no Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade

Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal. Os testes foram realizados com tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), na ausência de sedimento. Os produtos comerciais utilizados foram o Diflubenzuron 25% Champion® e o Temefós Fersol 1G®.

1. Testes preliminares

Os peixes foram obtidos do setor de Tilapicultura do Centro de Aquicultura da UNESP, campus de Jaboticabal. Os testes agudos foram conduzidos em sistema estático durante 48 horas, com volume final de 3 litros das soluções-testes e 3 alevinos por tratamento, na ausência de sedimento. Os larvicidas foram adicionados 24 horas após os peixes serem colocados nos recipientes-testes.

As concentrações utilizadas para testes foram: 0, 1, 3, 5, 10, 14 e 16 mg.L⁻¹ para DFB e 0, 5, 10, 15, 25 e 30 mg.L⁻¹ para temefós para testes sem sedimento. Foram coletados brânquias e fígados de até três alevinos sobreviventes de cada tratamento e do controle ao final dos testes.

2. Histopatologia de brânquia e fígado de *O. niloticus*

Os animais foram eutanasiados em banho de imersão com benzocaína (1,0 g.L⁻¹ de água) e coletados fragmentos de tecidos de brânquia e fígado. Os tecidos foram imersos em solução fixadora de Formaldeído Tamponado (10%; pH 6,8) por 24 horas, e posteriormente foram submetidos à desidratação (em série crescente de etanol), diafanização, embebição e inclusão em Histosec® (Merck). Após a emblocagem, foi realizada a microtomia em micrótomo automático (Leica, RM-2155) com cortes de 4,0 µm de espessura. Os cortes foram diafanizados, hidratados, corados com hematoxilina-eosina (H.E), desidratados e diafanizados novamente, até a montagem final da lâmina.

Os cortes de brânquias e fígados foram analisados e fotografados em microscópio Leica 5000MB, acoplado com câmera DP10, do Laboratório de Anatomia da FCAV/ UNESP, campus de Jaboticabal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Brânquias

Histologicamente, os alevinos do controle apresentam tecido branquial organizado em arcos branquiais que suportam as lamelas primárias. As lamelas secundárias originam-se das primárias e são compostas por células mucosas e células pilares, que sustentam as lamelas. Entre as lamelas secundárias ocorre o espaço interlamelar, com células de cloreto e de revestimento. A altura do espaço interlamelar ocupa metade da altura da lamela secundária (Figura 48).

No tratamento com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de DFB as brânquias apresentaram-se similares às do controle. Nos tratamentos com $3,0$; $5,0$; $10,0$; $14,0$ e $16,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de DFB as brânquias sofreram estase (congestão vascular) no interior das lamelas primárias e secundárias. Além disso, as lamelas secundárias apresentaram desestruturação na sustentação lamelar, edema subepitelial e formação de aneurismas (Figura 48).

Para os alevinos submetidos ao temefós, no tratamento com $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ as brânquias foram similares às dos animais do controle. Nas concentrações $10,0$ e $15,0 \text{ mg.L}^{-1}$ as brânquias apresentaram edema subepitelial, e com $25,0$ e $30,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ocorreu edema subepitelial e estase nas lamelas secundárias (Figura 48).

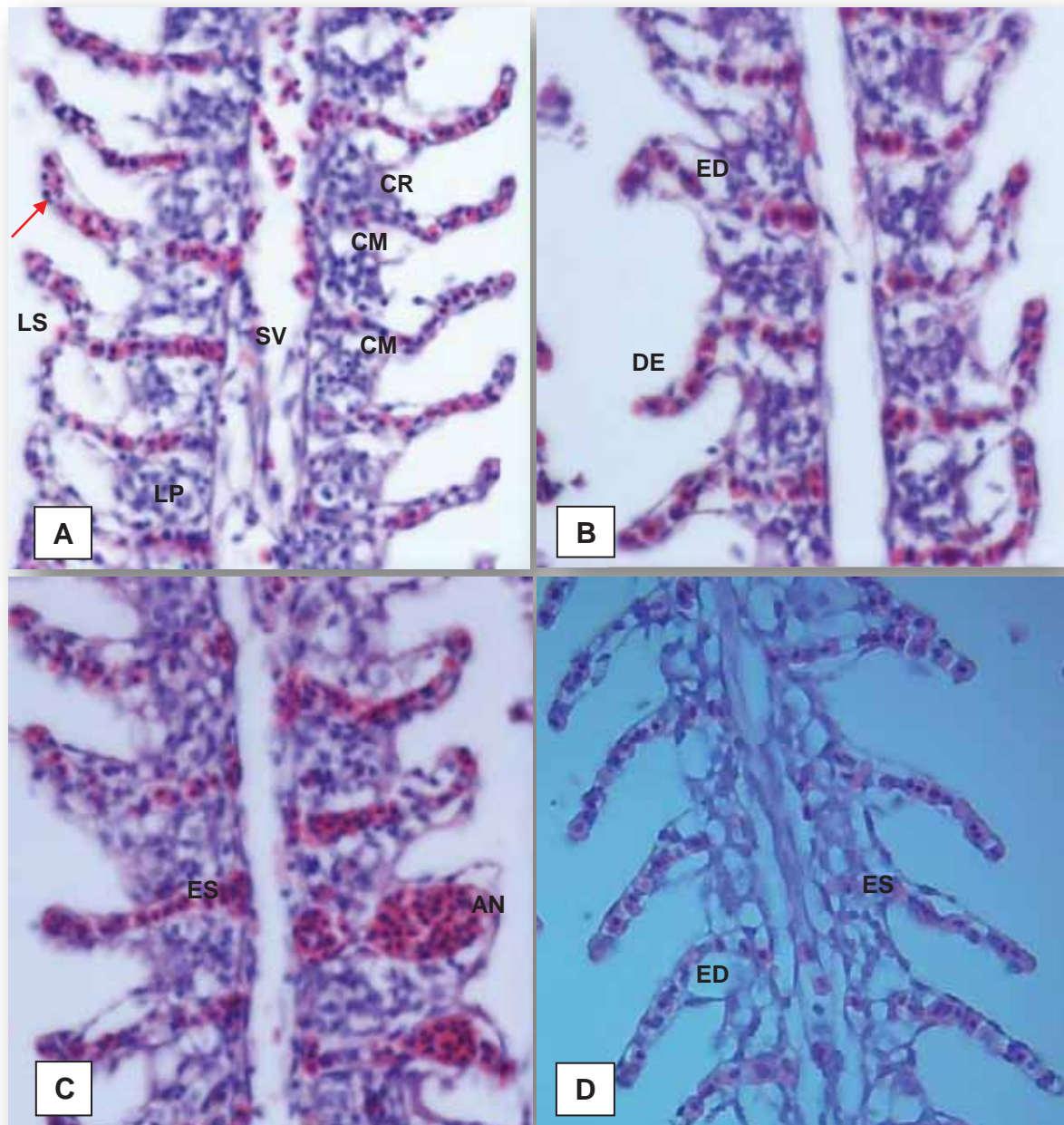


Figura 48. Fotomicrografia de cortes transversais de brânquias de tilápia-do-Nilo ao final do teste de toxicidade aguda com DFB e temefós. A: Controle, LP: lamela primária, LS: lamela secundária, SV: seio venoso central, CM: células mucosas, CR: células de revestimento, Seta: células pilares. B: tratamento com 3 mg.L^{-1} de DFB, DE: desestruturação na sustentação das lamelas, ED: edema subepitelial. C: tratamento com 3 mg.L^{-1} de DFB, ES: estase, AN: aneurisma. D: tratamento com 30 mg.L^{-1} de temefós, ES: estase, ED: edema subepitelial.

As brânquias, quando entram em contato com contaminações químicas, alteram a forma dos filamentos branquiais e das lamelas respiratórias (LUVIZOTTO, 1994). A desestruturação na sustentação lamelar direciona as lamelas no mesmo sentido de entrada do fluxo de água nas brânquias, e diminui a absorção de oxigênio (FANTA et al. 2003).

A estase raramente ocorre em condições normais, em razão dos diâmetros dos capilares serem pequenos. Situações severas em que muitos eritrócitos permanecem estagnados no lúmen dos capilares podem culminar em aneurismas, onde há rompimento epitelial (MELETTI, 2004).

Edemas entre as camadas do epitélio, como ocorreu em alevinos submetidos em ambos os larvicidas, podem caracterizar um processo inflamatório (HEATH, 1987) e serem interpretados como resposta do organismo de defesa a produtos tóxicos.

As alterações no tecido branquial dos alevinos prejudicam o fluxo sanguíneo, como as estases e os aneurismas e comprometem as trocas gasosas das brânquias, além de alterar a homeostase dos animais (equilíbrio ácido-básico e osmótico) (MELETTI, 2004).

2. Fígados

Os animais do controle apresentam o fígado composto por veias centrais, que se ramificam e originam os vasos, responsáveis pela irrigação de todo o órgão. Os capilares sinusóides surgem a partir dos vasos de irrigação.

Os hepatócitos apresentam formato levemente hexagonal, núcleo basófilo e citoplasma pouco acidófilo (claro), organizados ao longo dos capilares sinusóides, dando ao tecido um aspecto cordonal. No interior do tecido hepático localiza-se também o hepatopâncreas exócrino, margeando as veias centrais (Figura 49).

Nos tratamentos com 1,0; 3,0 e 5,0 mg.L⁻¹ de DFB a histoarquitetura do fígado foi similar ao do controle. Entretanto, ocorre hipertrofia dos hepatócitos, com deslocamento do núcleo para a periferia da célula. Nos tratamentos com

10,0; 14,0 e 16,0 mg.L⁻¹ de DFB ocorre hipertrofia dos hepatócitos e estase no interior dos capilares sinusóides (Figura 49).

Para temefós, nas concentrações 5,0 e 10,0 mg.L⁻¹ ocorre hipertrofia acentuada dos hepatócitos. Nos tratamentos com 15 e 25 mg.L⁻¹, além da hipertrofia, ocorreu estase no interior dos capilares sinusóides, e no tratamento 30 mg.L⁻¹ foi observado núcleo picnótico (Figura 49).

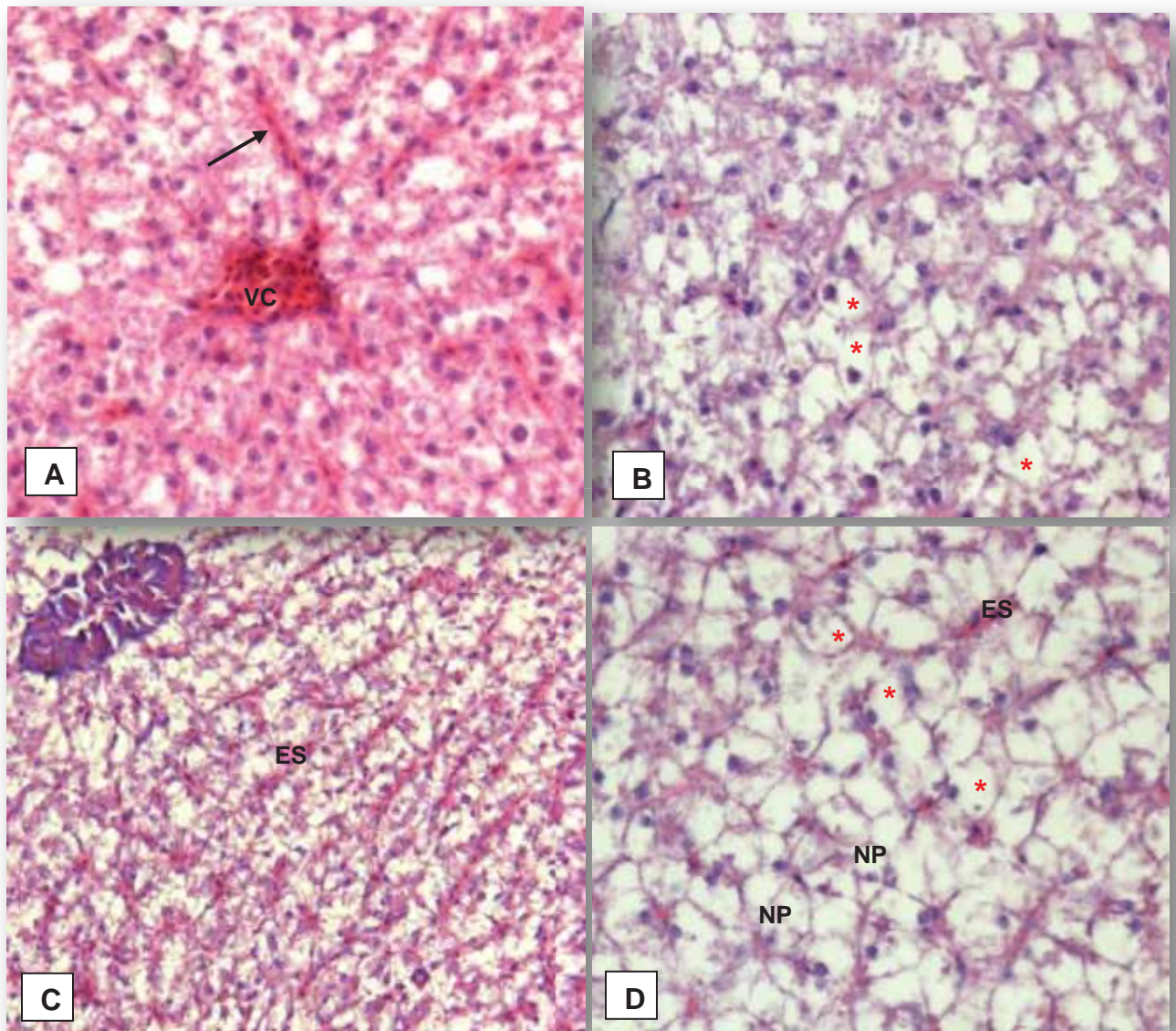


Figura 49. Fotomicrografia de cortes transversais de fígados de tilápia-do-Nilo ao final do teste de toxicidade aguda com DFB e temefós. A: Controle, VC: veia central, Seta: capilares sinusóides. B: tratamento com 3 mg.L⁻¹ de DFB, Asterisco: hipertrofia dos hepatócitos. C: tratamento com 10 mg.L⁻¹ de DFB, ES: estase. D: tratamento com 30 mg.L⁻¹ de temefós, NP: núcleo picnótico, ES: estase, Asterisco: hipertrofia dos hepatócitos.

A hipertrofia dos hepatócitos pode ser relacionada com aumento do número de organelas responsáveis pela detoxicação e é uma fase reversível ou transitória das células. Nas situações extremas em que as organelas não suportam a quantidade de toxinas presentes na célula, ocorre o núcleo picnótico, cuja cromatina encontra-se extremamente condensada e indica a necrose do tecido.

CONCLUSÃO

As brânquias de tilápias-do-Nilo submetidas ao DFB apresentam estase no interior das lamelas primárias e secundárias, desestruturação na sustentação das lamelas secundárias, edema subepitelial e formação de aneurismas a partir da concentração 3,0 mg.L⁻¹. Os organismos expostos ao temefós apresentam brânquias com edema subepitelial a partir da concentração 10,0 mg.L⁻¹ e estase no interior das lamelas secundárias a partir da concentração 25,0 mg.L⁻¹.

O DFB causa hipertrofia dos hepatócitos nos peixes a partir da concentração 1,0 mg.L⁻¹, e estase no interior dos capilares sinusóides a partir da concentração 10,0 mg.L⁻¹. Peixes submetidos ao temefós apresentam hipertrofia acentuada dos hepatócitos a partir da concentração 5,0 mg.L⁻¹, estase no interior dos capilares sinusóides a partir da concentração 15,0 mg.L⁻¹ e núcleo picnótico (necrose) no tratamento com 30,0 mg.L⁻¹.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FANTA, E.; RIOS, F. S.; ROMÃO, S.; VIANNA, A. C. C.; FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 54, p. 119-130, 2003.
- HEATH, A. G. *Water pollution and fish physiology*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1987.

- LUVIZOTTO, M. F. *Efeito de diferentes salinidades sobre as células de cloreto e as células secretoras do epitélio branquial do peixe antártico *Nototheniops nudifons* (Lonnberg, 1905)*. Curitiba, 1994. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- MELETTI, P. C.; ROCHA, O. MARTINEZ, C. B. R. Avaliação da degradação ambiental na Bacia do Rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e análises histopatológicas em peixes. In: BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E. L. G. *Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu*. 1 ed. Editora Rima, p. 249-280, 2004.
- WESTER, P. W.; ROGHAI, C. J. Monitoring of sublethal chronic effects in fish: the pathomorphological approach. In: MULLER, R.; LLOYD, R. *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fishes*. United Nation, Fishing News Books, p. 339-352, 1994.

IV. CONCLUSÃO GERAL

O DFB classifica-se como praticamente não tóxico para *L. minor*, ligeiramente tóxico para *H. eques* e *O. niloticus*, e extremamente tóxico para *D. magna*, com risco de intoxicação ambiental baixo para a macrófita e peixes, e alto para o microcrustáceo. A presença de sedimento nos testes não alterou significativamente a ação tóxica dos larvicidas sobre os organismos-testes.

O temefós classifica-se como ligeiramente tóxico para *L. minor*, *H. eques* e *O. niloticus* e extremamente tóxico para *D. magna*. O risco de intoxicação ambiental é médio para peixes e macrófita, e alto para o microcrustáceo. A presença de sedimento também não alterou a ação tóxica do produto.

Em relação aos testes crônicos, doses sub-letais dos larvicidas não alteram o crescimento de *L. minor*, com exceção do teste com temefós realizado na ausência de sedimento, em que houve redução significativa no crescimento de frondes. Entretanto, para os peixes, exposições prolongadas aos larvicidas, mesmo que em doses sub-letais, causam efeitos adversos na ausência e presença de sedimento. O DFB diminui o crescimento de mato grosso e tilápia-do-Nilo, e testes com temefós provocam mortalidade dos peixes. Testes crônicos para *D. magna* diminuem a longevidade dos organismos nas maiores

concentrações, sendo estas são muito inferiores à concentração utilizada em campo para o controle de *A. aegypti*.

O DFB e o temefós possuem médio potencial de transporte em água, associados a sedimento ou dissolvidos em água, e não sofrem lixiviação. As concentrações de resíduos de ambos os larvicidas nas águas de testes agudos e crônicos de *O. niloticus* reduziram ao longo do tempo. O DFB apresenta predominante redução das concentrações nas primeiras 24 horas, e após este período, mantém reduções menores. O larvicida temefós apresentou diminuições variadas das concentrações durante os testes. A presença de sedimento não diminui a quantidade de resíduos dos larvicidas nas águas analisadas.

As brânquias de tilápias-do-Nilo submetidas ao DFB apresentam estase no interior das lamelas primárias e secundárias, desestruturação na sustentação das lamelas secundárias, edema subepitelial e formação de aneurismas. Os organismos expostos ao temefós apresentam brânquias com edema subepitelial e estase no interior das lamelas secundárias. O DFB causa hipertrofia dos hepatócitos e estase no interior dos capilares sinusóides nos peixes. Os animais submetidos ao temefós apresentam hipertrofia acentuada dos hepatócitos, estase no interior dos capilares sinusóides e sinais de necrose.

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Resíduos de agrotóxicos em alimentos. *Revista de Saúde Pública*, v. 40, n. 2, p. 361-363, 2006.

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: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 15, p. 55-64, jan./dez. 2005.

BRAGA, I. A.; LIMA, J. B. P.; SOARES, S. S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 99, n. 2, p. 199-203, Mar. 2004.

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. *Panorama da Aquicultura*, Jan./Fev. 2005.

CARVALHO, M. S. L.; CALDAS, E. D.; DEGALLIER, N.; VILARINHOS, P. T. R.; SOUZA, L. C. K. R.; YOSHIZAWA, M. A. C.; KNOX, M. B.; OLIVEIRA, C. Susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós do Distrito Federal. *Revista de Saúde Pública*, v. 38, n. 5, p. 623-629, 2004.

- CHEN, C. D.; SELEENA, B.; CHIANG, Y. F.; LEE, H. L. Field evaluation of the bioefficacy of diflubenzuron (Dimilin ®) against container-breeding *Aedes* sp. mosquitoes. *Tropical Biomedicine*, v. 25, n. 1, p. 80-86, 2008.
- CIHACEK, L. J.; ANDERSON, W. L.; BARAK, P. W. Linkages between soil quality and plant, animal and human health. *Methods for assessing soil*. Quality SSSA, USA. 1996 .49p. (Special Publication).
- CRUZ, C.; CUBO, P.; GOMES, G. R.; VENTURINI, F. P.; GUILHERME, P. E.; PITELLI, R. A. Sensibilidade de peixes neotropicais ao dicromato de potássio. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 3, n. 1, 2008.
- DOUCETTE, W. J. Quantitative structure-activity relationships for predicting soil-sediment sorption coefficients for organic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 22, p. 1771-1788, 2003.
- 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.
- GOKTEPE, I.; PORTIER, R.; AHMEDNA, M. Ecological risk assessment of Neem-based pesticides. *Journal of Environmental Science Health Part B. Pestic. Food Contam. Agric. Wastes B*. v. 39, n. 2, p. 311-320, 2004.
- HANAZATO, T.; IWAKUMA, T.; YASUNO, M. Effects of temephos on zooplankton communities in enclosures in a shallow eutrophic lake. *Environmental Pollution*, v. 59, n. 4, p. 305-314, 1989.
- HELGEN, J. C.; LARSON, N. J.; ANDERSON, R. L. Responses of zooplankton and *Chaoborus* to temephos in a natural pond and in the laboratory. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. v. 17, p. 459-471, 1988.
- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Brasil, Ministério do Meio Ambiente. *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.

- JONES, K. D.; HUANG, W. H. Evaluation of toxicity of the pesticides chlorpyrifos and arsenic, in the presence of compost humic substances in aqueous systems. *Journal of Hazardous Materials*, v. 103, p. 93-105, 2003.
- JONSSON, C.; MAIA, A. Toxicidade dos herbicidas Clomazone e Quinclorac. Para o invertebrado aquático *Daphnia similis* na presença e ausência de sedimento. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 9. p. 145-153, 1999.
- KUSK, K. Bioavailability and effect of pirimicarb on *Daphnia magna* in a laboratory freshwater. Sediment system. *Environmental Contamination and Toxicology* v. 31, p. 252-255, 1996.
- LACORTE, S.; EHRESMANN, N.; BARCELÓ, D. Persistence of temephos and its transformation products in rice crop field waters. *Environmental Science and Technology*. v. 30, p. 917-923, 1996.
- LEE, B. M.; SCOTT, G. I. Acute toxicity of temephos, fenoxycarb, diflubenzuron, and methoprene and *Bacillusthuringiensis* var. israelensis to the mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 43, p. 827-832, Dez. 1989.
- LIMA, E. P.; OLIVEIRA FILHO, A. M.; LIMA, J. W. O.; RAMOS JÚNIOR, A. N.; CAVALCANTI, L. P. G. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em municípios do estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 3, p. 250-263, Mai/Jun. 2006.
- LUIZ, D. P.; PEREIRA, B. B.; DE CAMPOS JÚNIOR, E. O.; MOREIRA NETO, J. F.; BRANDEBURGO, M. A. M.; KERR, W. E. Toxicidade de temefós sobre o crescimento, esterases e superóxido desmutase de *Scenedesmus obliquus*. *Anais do Congresso Brasileiro de Genética*. Salvador, Set. 2008.
- MABILIA, R. G.; 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 Scientiarum Biological Sciences*, v. 28, n. 2, p. 159-163, 2006.

- MADDRELL, S. H. P. The insect neuroendocrine system as a target for insecticides. *Insect neurobiology and pesticide action*. Society of Chemical Industry, London, p. 329-334, 1980.
- MADUENHO, L. P.; MARTINEZ, C. B. R. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 148, n. 3, p. 265-272, 2008.
- MARCORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; TAKAKU, L.; GLASSER, C. M.; GARBELOTO, V. C.; BRACCO, J. E. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 98, n. 5, p. 703-708, Jul. 2003.
- MARCORIS, M. L. G.; CAMARGO, M. F.; SILVA, I. G.; TAKAKU, L.; ANDRIGHETTI, M. T. Modificação da susceptibilidade de *Aedes aegypti* ao temephos. *Revista de Patologia Tropical*, v. 24, p.31-40, 1995.
- MARTINS, F.; SILVA, I. G. Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 37, n. 2, p. 135-138, Mar./Abr. 2004.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Endemias Rurais – Métodos de trabalho adotados pelo DNERu*. Departamento Nacional de Endemias Rurais. Rio de Janeiro, 1968.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Informe epidemiológico da dengue: análise de situação e tendências*. 27p. Disponível em <
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_se7_05_03.pdf> Acesso em: 03 Abril 2010.
- MURILO, D. Testes de toxicidade para peixes. In: *Workshop sobre qualidade de água na aquicultura*, Pirassununga. p. 63-68, 2000.
- PAIVA, M. H. S. *Monitoramento do gene, que codifica a esterase, envolvido na resistência a inseticidas organofosforados em populações naturais de Aedes aegypti do Brasil*. Dissertação (Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães), 72p, 2006.

- PARMA de CROUX, M.J.; LOTESTE, A.; CAZENAVE, J. Inhibition of plasma cholinesterase and acute toxicity of monocrotophos in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, New York, v. 69, p. 356-363, 2002.
- PINHEIRO, V. C.; TADEI, W. P. Evaluation of the residual effect of temephos on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae in artificial containers in Manaus, Amazonas State, Brazil. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 18, n. 6, p. 1529-1536, Nov/Dez. 2002.
- RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Washington: G.M. Rand & S.R. Petrocelli eds. 1985, 665p.
- SECCACINI, E.; LUCIA, A.; HARBURGUER, L.; ZERBA, E.; LICASTRO, S.; MASUH, H. Effectiveness of pyriproxyfen and diflubenzuron formulations as larvicides against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 24, n. 3, p. 398-403, 2008.
- SILVA, J. J. *Potencial dos reguladores de crescimento de insetos (IGRs) diflubenzuron e methoprene, no controle de Aedes aegypti (L.) (Diptera: Culicidae) em Uberlândia – MG*. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 75p. 2006.
- SILVA, C. M. M. de S.; FAY, E. F. *Agrotóxicos e meio ambiente*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 400p.
- SILVIA, J. J.; MENDES, J. Susceptibility of *Aedes aegypti* (L) to the insect growth regulators diflubenzuron and methoprene in Uberlândia, state of Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 5, p. 612-616, Nov./Dez. 2007.
- SILVIA, J. J.; MENDES, J. Effect of diflubenzuron on immature stages of *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) in Uberlândia, state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 5, p. 679-682, 2002.
- SOUZA, J. P. *Toxicidade aguda e risco ambiental do diflubenzuron para Daphnia magna, Poecilia reticulata e Lemna minor na ausência e presença de*

- sedimento*. Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 78p, 2008.
- SPARLING, D. W.; LOWE, T. P.; PINKNEY, A. E. Toxicity of Abate[®] to green frog tadpoles. *Buletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 58, n. 4, p. 475-481, Mar. 1997.
- USEPA. Unites States Environmental Protection Agency. *Prevention Pesticides and Toxic Substances*. 1997. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/reds/factsheets/0144fact.pdf>. Acesso em: 27 Jan. 2010.
- WARD, D. V.; BUSCH, D. A. Effects of temephos, an organophosphate insecticide, on survival and escape behavior of the marsh fiddler crab, *Uca pugnax*. *Oikos*, v. 27, p. 331-335, 1976.
- WARD, D. V.; HOWES, B. L.; LUDWIG, D. F. Interactive effects of predation pressure and insecticide (temephos) toxicity on populations of the marsh fiddler crab *Uca pugnax*. *Marine Biology*, v. 35, p. 119-126, 1976.
- WESTER, P. W.; ROGHAI, C. J. Monitoring of sublethal chronic effects in fish: the pathomorphological approach. In: MULLER, R; LLOYD, R. *Sublethal and crhonic effects of pollutants on freshwater fishes*. United Nation, Fishing News Books, 1994. p. 339-352.
- WHO. World Health Organization. DengueNet – WHO’s Internet-based System for the Global Surveillance of Dengue Fever and Dengue Haemorrhagic Fever (Dengue/DHF). Geneva: Weekly Epidemiological Record, n. 36, v. 77, p. 300-304, Set 2002.
- WINKALER, E. U. *Aspectos ecotoxicológicos dos inseticidas diflubenzuron e teflubenzuron para o pacu (Piaractus mesopotamicus)*. Dissertação (Doutorado em Aquicultura), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 79p, 2008.
- ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. Editora Rima, São Carlos, 2006, 478p.