

**TOXICIDADE AGUDA E RISCO AMBIENTAL DO
INSETICIDA TEFLUBENZURON PARA *Daphnia magna*,
Lemna minor E *Poecilia reticulata***

Louise de Souza Medeiros

Bióloga

Jaboticabal –SP

Abril/2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

TOXICIDADE AGUDA E RISCO AMBIENTAL DO
INSETICIDA TEFLUBENZURON PARA *Daphnia magna*,
Lemna minor* E *Poecilia reticulata

Louise de Souza Medeiros

Orientador: Prof. Dr. Joaquim G. Machado Neto

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

Jaboticabal –SP

Abril/2008

M488t Medeiros, Louise de Souza
Toxicidade aguda e risco ambiental do inseticida teflubenzuron para *Daphnia magna*, *Lemna minor* e *Poecilia reticulata* / Louise de Souza Medeiros. -- Jaboticabal, 2008
vi, 54 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, 2008
Orientador: Joaquim Gonçalves Machado Neto
Banca examinadora: Júlio Vicente Lombardi, Robinson Antônio Pitelli

Bibliografia

1. Toxicidade. 2. Teflubenzuron. 3. Organismos aquáticos. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aqüicultura.

CDU 574.64

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

La unica lucha que se pierde es la
que se abandona. Rebeldia para
luchar, coraje para seguir.

Madres de Plaza de Mayo

Dedico este trabalho à minha família, que é minha base de sustentação. Meu pais (Guilherme e Mariza), meus irmãos (Fabíola, Rúbio e Juliana) e meu sobrinho (Arthur). Obrigada por me apoiar e acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir que eu tivesse esta experiência ímpar.

Ao Prof. Dr. Joaquim G. Machado Neto, pela orientação e paciência. Obrigada por ter aberto a porta do seu laboratório para mim, assim eu pude sair de Natal-RN para conhecer uma forma diferente de ver a vida.

Ao querido Alexandre Coêlho, sempre presente mesmo à distância, obrigada pelo apoio e por não desistir.

Às amigas-irmãs da República Balalaika, Camila, Francine, Maria e Michelle, e às agregadas, Fernanda e Francine Faustino, pela agradável convivência e pelos momentos inesquecíveis. Sem vocês eu não teria conseguido permanecer em Jaboticabal.

Ao amigo Claudinei da Cruz, pela paciência em me ensinar e tirar minhas dúvidas nas diversas vezes em que pedi sua ajuda.

Ao amigo Severino Júnior, pelas longas conversas e por ter sempre a mão estendida para mim.

Aos amigos de laboratório: Jaqueline, Letícia, Wilson, Giorge, Ângela, Daniele, Elis, Bruno, Melina, Bárbara, Patrícia e José Rodolfo pela amizade e colaboração.

Aos amigos Débora Matioli, Francine Zocoler, Bruno Estevão, Mariane Schorer e demais colegas da pós-graduação do CAUNESP, pela convivência.

A Professora Dr^a Laura Satiko O. Nakaghi pela amizade e à Prof^a Dr^a Irene Bastos F. Vicentini, por estar sempre disposta a ajudar.

À Secretária da pós-graduação do CAUNESP, Veralice Capatto pela paciência e amizade.

Ao Centro de Aqüicultura da UNESP pela oportunidade de realização do curso

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. A agricultura como fonte de poluição da água.....	3
2.2. A aquicultura como fonte de poluição de ambientes aquáticos	4
2.3. Teflubenzuron	5
2.4. Testes de toxicidade	7
2.4.1. Organismos-teste utilizados neste estudo	8
2.4.1.1. <i>Daphnia magna</i>	8
2.4.1.2. <i>Lemna minor</i>	10
2.4.1.3. <i>Poecilia reticulata</i>	12
2.5. Avaliação de risco ambiental.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. Local de realização dos testes	16
3.2. Organismos-teste.....	16
3.2.1. <i>Daphnia magna</i>	16
3.2.1.1. Cultivo de <i>Daphnia magna</i>	17
3.2.1.2. Alimentação.....	18
3.2.1.3. Cultura de algas	18
3.2.1.4. Alimento composto	19
3.2.2. <i>Lemna minor</i>	19
3.2.2.1. Cultivo de <i>Lemna minor</i>	19
3.2.2.2. Desinfecção.....	20
3.2.3. <i>Poecilia reticulata</i>	20
3.2.3.1. Obtenção e manutenção dos peixes.....	20
3.2.3.2. Aclimação.....	21
3.2.4. Testes de toxicidade aguda com teflubenzuron.....	22
3.2.4.1. Testes preliminares	22
3.2.4.2. Testes definitivos.....	22
3.2.4.2.1. Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i>	22
3.2.4.2.2. Inibição do crescimento da macrófita <i>Lemna minor</i>	23
3.2.4.2.4. Teste de toxicidade aguda com <i>Poecilia reticulata</i>	25
3.2.5. Teste de sensibilidade.....	26
3.2.5.1. <i>Daphnia magna</i>	26
3.2.5.2. <i>Lemna minor</i>	27
3.2.5.3. <i>Poecilia reticulata</i>	28

3.2.6. Cálculo das CE_{50} e CL_{50}	29
3.2.7. Classificação quanto ao potencial tóxico	30
3.2.8. Determinação do risco de intoxicação ambiental.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1. Toxicidade aguda para <i>Daphnia magna</i>	32
4.2. Inibição do crescimento de <i>Lemna minor</i>	35
4.3. Toxicidade aguda para <i>Poecilia reticulata</i>	38
4.4. Avaliação do risco de intoxicação ambiental	41
5. CONCLUSÕES	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxa de crescimento (k) em função do aumento da concentração e do tempo de exposição ao teflubenzuron	37
Tabela 2. Valores médios e desvio padrão dos registros das variáveis de qualidade da água nos testes de toxicidade aguda para peixe	39
Tabela 3. Concentrações ambientais estimadas (CAE) em função da contaminação das águas com porcentagens decrescentes da maior dose recomendada do TFB para as culturas agrícolas (37,5 g de i.a./ha), quociente de risco (RQ) e classes de risco para <i>D. magna</i>	42
Tabela 4. Concentrações ambientais estimadas (CAE) em função da contaminação das águas com porcentagens decrescentes da dose do TFB utilizada na ração para tratamento de parasitos (2 g de i.a./kg de ração), quociente de risco (RQ) e classes de risco para <i>D. magna</i>	42
Tabela 5. Valores de CE ₅₀ e CL ₅₀ do teflubenzuron para <i>D. magna</i> , <i>L. minor</i> e <i>P. reticulata</i>	43
Tabela 6. Concentrações ambientais estimadas (CAE) em função da contaminação das águas com porcentagens decrescentes da maior dose recomendada do TFB para as culturas agrícolas (37,5 g de i.a./ha), quociente de risco (RQ) e classes de risco para <i>L. minor</i>	43
Tabela 7. Concentrações ambientais estimadas (CAE) em função da contaminação das águas com porcentagens decrescentes da dose do TFB utilizada na ração para tratamento de parasitos (2 g de i.a./kg de ração), quociente de risco (RQ) e classes de risco para <i>L. minor</i>	44
Tabela 8. Concentrações ambientais estimadas (CAE) em função da contaminação das águas com porcentagens decrescentes da maior dose recomendada do TFB para as culturas agrícolas (37,5 g de i.a./ha), quociente de risco (RQ) e classes de risco para <i>P. reticulata</i>	44
Tabela 9. Concentrações ambientais estimadas (CAE) em função da contaminação das águas com porcentagens decrescentes da dose do TFB utilizada na ração para tratamento de parasitos (2 g de i.a./kg de ração), quociente de risco (RQ) e classes de risco para <i>P. reticulata</i>	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de <i>Daphnia magna</i>	09
Figura 2. Exemplar de <i>Lemna minor</i>	11
Figura 3. Exemplar de <i>Poecilia reticulata</i>	13
Figura 4. Cultivo de <i>D. magna</i> em cristalizadores, mantidos em estufa incubadora.	17
Figura 5. Cultivo da alga <i>Scenedesmus subspicatus</i> para alimentação de daphnias ...	18
Figura 6. Cultivo de <i>Lemna minor</i>	20
Figura 7. Aclimatação dos organismos-teste nas condições dos bioensaios.....	21
Figura 8. Teste de toxicidade aguda do teflubenzuron com <i>Daphnia magna</i>	23
Figura 9. Teste de toxicidade aguda do teflubenzuron com <i>Lemna minor</i>	24
Figura 10. Quantificação da condutividade elétrica das águas do teste de toxicidade aguda de teflubenzuron para <i>Poecilia reticulata</i>	26
Figura 11. Carta-controle do organismo <i>D. magna</i> para a substância referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). Médias das CE_{50-24h} e médias dos limites superior e inferior.....	27
Figura 12. Teste de sensibilidade com <i>Lemna minor</i>	28
Figura 13. Carta-controle do organismo <i>L. minor</i> para a substância referência Cloreto de sódio (NaCl). Médias das CE_{50-7d} e limites superior e inferior. .	28
Figura 14. Carta-controle do organismo <i>P. reticulata</i> para a substância referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). Médias das CE_{50-96h} e limites superior e inferior.	29
Figura 15. Representação gráfica da imobilidade de <i>D. magna</i> em função das concentrações de teflubenzuron no teste de toxicidade aguda.....	33
Figura 16. Representação gráfica da inibição do crescimento de <i>L. minor</i> em função das concentrações de TFB no teste de toxicidade aguda.....	35
Figura 17. Inibição do crescimento do número de frondes em função da concentração nos testes de toxicidade aguda	36
Figura 18. Frondes de <i>L. minor</i> normais (A) do grupo controle, e cloróticas (B e C) em resultado à exposição ao teflubenzuron.....	38
Figura 19. Representação gráfica da mortalidade de <i>Poecilia reticulata</i> em função do aumento das concentrações de TFB no teste de toxicidade aguda	39

RESUMO

Os agrotóxicos aplicados nas áreas agrícolas podem ser carregados, por diversos mecanismos, até os corpos d'água da rede hidrográfica. Além disso, estes produtos são comumente utilizados na aquicultura para o controle de parasitoses. O teflubenzuron (TFB) é um inseticida registrado em alguns países da Europa para o controle de parasitas de peixes. Os possíveis efeitos tóxicos e risco ambiental do TFB podem ser avaliados inicialmente em condições de laboratório por meio de testes de toxicidade aguda com organismos-teste eleitos internacionalmente. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a toxicidade aguda e o risco de intoxicação ambiental do uso agrícola e em aquicultura do TFB, com base nos valores de CE_{50} e CL_{50} estimados em testes com *Daphnia magna*, *Lemna minor* e *Poecilia reticulata*, utilizados como organismos bioindicadores. Os testes de ecotoxicidade aguda foram realizados de acordo com normas nacionais e internacionais para estas espécies. A CE_{50-48h} estimada para *D. magna* foi $0,00026 \text{ mg.L}^{-1}$, o que caracteriza este inseticida como altamente tóxico para esta espécie. Para *L. minor*, a CE_{50-7d} estimada foi $1.176,16 \text{ mg.L}^{-1}$, e para *P. reticulata* CL_{50-96h} , $2.707,87 \text{ mg.L}^{-1}$, que classificam o TFB como praticamente não-tóxico para estas duas espécies. Devido à alta toxicidade do TFB para daphnídeos, mesmo em pequenas contaminações, pode causar desequilíbrio na cadeia alimentar aquática. Para minimizar o risco ambiental, o TFB pode ser utilizado de forma controlada e diluído em quantidades restritas de água.

Palavras-chave: Inseticida, toxicidade, organismos aquáticos e intoxicação ambiental.

ABSTRACT

The pesticides used in agriculture areas can be transported to water bodies of the local hydrographic basin in several ways. Moreover, these chemicals are commonly used in aquaculture to fish parasite control. The teflubenzuron (TFB) is a registered insecticide in some European countries to this use. The possible effects of the TFB and environmental risk can be evaluated initially in laboratory conditions by tests of acute toxicity with internationally elected organisms. The objectives of this study were to evaluate the acute toxicity and the environmental risk due to agriculture and aquaculture use of TFB, based on the values of EC_{50} and LC_{50} estimated in tests with *Daphnia magna*, *Lemna minor* and *Poecilia reticulata*, internationally used as bioindicators organisms. The acute ecotoxicity tests were performed in accordance with national and international standards for these species. The EC_{50-48h} estimated to *D. magna* was $0,00026 \text{ mg.L}^{-1}$, which characterizes that as very highly toxic insecticide for this species. For *L. minor*, EC_{50-7d} was estimated $1.176,16 \text{ mg.L}^{-1}$, and *P. reticulata* LC_{50-96h} , $2.707,87 \text{ mg.L}^{-1}$, which classified the TFB as practically non-toxic to these species. Due to the high toxicity of the TFB to daphnids, even in little contamination, can cause a loss of equilibrium in the aquatic food chain. To minimize the environmental risk, the TFB can be used in a controlled way and diluted in limited quantities of water.

Keywords: Insecticide, toxicity, aquatic organisms and environmental poisoning.

1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento da população mundial, ocorre também o aumento significativo na demanda de alimentos. Cada vez mais são necessárias novas alternativas para suprir as necessidades de proteína animal do ser humano. Com os recursos ambientais cada dia mais limitados, apenas fazendo uso da tecnologia é possível atender essa demanda, intensificando a produção agropecuária e o uso de agrotóxicos.

Além de possibilitar o aumento da produtividade agrícola, os agrotóxicos também são utilizados em ambientes aquáticos para controlar problemas biológicos, como vetores de diversas doenças, “blooms” de fitoplâncton e infestações de plantas aquáticas. Entretanto, seu uso excessivo e desordenado tem provocado inúmeros impactos sobre o meio ambiente, e proporciona riscos de intoxicação dos organismos vivos pela contaminação dos sedimentos, das águas superficiais e subterrâneas, e da contaminação dos alimentos (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006; TOMITA e BEYRUTH, 2002; BOYD e TUCKER, 1998).

Os agrotóxicos representam relevantes fatores estressantes para muitas espécies em ambientes aquáticos e terrestres. Eles têm potencial para afetar diversos grupos de organismos aquáticos como: microorganismos (ANDRÉA e PETTINELLI, 2000),

invertebrados (CHRISTENSEN et al., 2005), plantas (BOONYAWANICH et al., 2001) e peixes (SELVI et al., 2005). Segundo RAND e PETROCELLI (1985), as substâncias químicas podem atingir o ambiente aquático acidentalmente ou de forma proposital. Dentro de um ecossistema, os agrotóxicos, de um modo geral, podem influenciar populações de organismos e, conseqüentemente, afetar interações entre espécies. Assim, provocam alterações na estabilidade e função do ecossistema. Além disso, as espécies mais sensíveis de um ecossistema podem ser temporariamente exterminadas, o que reduz a diversidade de espécies. O fluxo de energia através dos ecossistemas também podem ser influenciados pelos agrotóxicos, que alteram a produtividade primária e afetam os processos de decomposição da matéria orgânica (PIMENTEL e EDWARDS, 1982).

Os testes de toxicidade aquática são ferramentas utilizadas para detectar e avaliar os efeitos toxicológicos potenciais de produtos químicos nos organismos aquáticos. Por meio de dos bioensaios, organismos aquáticos respondem a presença ou ao efeito de uma substância tóxica, sozinha ou combinada com outras. Assim, esses testes fornecem uma base de dados que pode ser usada para avaliar o risco associado com a situação no qual o agente químico, o organismo e as condições de exposição são definidas (RAND e PETROCELLI, 1985).

Os objetivos do presente trabalho foram:

- 1) Calcular a concentração efetiva média (CE_{50}) do teflubenzuron (TFB) para *Daphnia magna* e *Lemna minor*, e a concentração letal média (CL_{50}) para *Poecilia reticulata*;
- 2) Classificar o TFB quanto ao potencial tóxico para *Daphnia magna*, *Lemna minor* e *Poecilia reticulata* com base nos valores de CE_{50} e CL_{50} ;
- 3) Classificar o TFB quanto ao risco de intoxicação ambiental comparando a Concentração Ambiental Estimada (CAE) e os valores de CE_{50} e CL_{50} calculados para *Daphnia magna*, *Lemna minor* e *Poecilia reticulata*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A agricultura como fonte de poluição da água

Os agrotóxicos são moléculas sintetizadas para afetar determinadas reações bioquímicas de insetos, microorganismos, animais e plantas que se quer controlar ou eliminar. No entanto, determinados processos bioquímicos são comuns a todos os seres vivos e, assim, causam efeito não só no organismo-alvo, como também nos outros seres vivos do ambiente (SPADOTTO et al., 2004). Assim, o uso extensivo de agrotóxicos para proteger as culturas das pragas, doenças e plantas daninhas, pode resultar em riscos à saúde humana e ao ambiente como um todo. Dentre os efeitos nocivos dos agrotóxicos destacam-se a presença de resíduos no solo, na água, no ar, nas plantas e animais em concentrações suficientes para afetar performances biológicas (TOMITA e BEYRUTH, 2002).

Após a aplicação do agrotóxicos na lavoura, uma parte do produto fica retida nos vegetais, frutos, sementes e vegetação rasteira e a outra parte atinge o solo. Em função do potencial de mobilidade/degradabilidade, a substância pode ou não ficar retida no solo. Processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos determinam a dissipação do agrotóxico no ambiente. O destino dos agrotóxicos no ambiente é determinado por

processos de retenção (sorção, absorção), de transformação (degradação química e biológica) e de transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial), e por interações desses processos. Assim, os agrotóxicos podem chegar aos corpos hídricos por meio de das águas de lixiviação do solo. Caso parte do produto tenha volatilizado durante a aplicação, também pode chegar às águas fluviais por meio das águas de chuva (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006; SPADOTTO et al., 2004).

O destino final de determinado agrotóxico no ambiente aquático está relacionado à forma de sua aplicação no ambiente. A incorporação direta do agrotóxico no solo, por exemplo, apresenta baixa probabilidade de deriva quando comparado àqueles pulverizados nas culturas. A aplicação por pulverização apresenta maior risco de contaminação do ambiente aquático, pois fatores como vento, tamanho de gotículas, temperatura, altura da aplicação, volatilidade relativa e distancia da aplicação, teor de matéria orgânica e argila no solo podem contribuir para maior ou menor deriva do agrotóxico para o corpo hídrico (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006; AGUIAR e MORAES, 1999).

2.2. A aqüicultura como fonte de poluição de ambientes aquáticos

A aqüicultura, que tem se mostrado uma alternativa viável na produção de proteína animal, sem dúvida deverá responder pelos futuros acréscimos de produção de um alimento de alto valor nutritivo, para atender à demanda resultante do crescimento da população mundial (CASTAGNOLLI, 1992). Entretanto, a produção intensiva de organismos aquáticos aumenta a possibilidade de problemas com doenças nos cultivos. Os peixes ficam submetidos a estresse crônico, que afeta a homeostasia, ocasiona maior sensibilidade e, por conseqüência, uma menor resistência às enfermidades em geral (VALENTI et al., 2000). Essas infecções podem provocar prejuízos econômicos, como atraso no desenvolvimento dos animais, o alto custo com tratamentos de combate aos parasitos, ou a mortalidade dos cardumes (MARTINS, 1997).

São diversos os parasitos que afetam os peixes cultivados. No Brasil destaca-se a *Lernaea cyprinacea*, que não tem especificidade parasitária e é responsável por vários casos de mortalidade em várias espécies de peixes com larga distribuição demográfica (VALENTI et al, 2000). Outros ectoparasitos crustáceos também são conhecidos por infectar peixes, como *Lamproglena sp*, *Ergasilus sp*, *Argulus sp* e *Dolops sp*, entre outros. Além disso, os peixes também podem ser acometidos por doenças causadas por vírus, bactérias, helmintos e protozoários (LUQUE, 2004).

O desenvolvimento da aquicultura tem gerado um crescimento acentuado no consumo de produtos químicos terapêuticos. Vários tratamentos têm sido utilizados como, banhos terapêuticos, aplicação de vacinas e o uso de rações medicadas (FOUZ et al., 2001; ARANA, 1999). HAYA et al., (2001) citam que no tratamento de salmões infectados com os copépodos *Lepeophtheirus salmonis* e *Caligus elongatus*, os peixes hospedeiros têm sido submetidos a banhos terapêuticos com peróxido de hidrogênio, pyrethrin, cypermethrin, dichlorvos ou azamethiphos. Além disso, também vêm sendo tratados com rações medicadas contendo ivermectin, emamectin, benzoate, diflubenzuron ou teflubenzuron.

O tratamento dos organismos de cultivo com quimioterápicos resulta na liberação de grandes quantidades de substâncias ativas e de seus metabólitos no habitat aquático. Com a liberação dos efluentes contaminados com quimioterápicos dos sistemas de cultivo, diversos organismos não-alvo são atingidos nos corpos de água receptores (ARANA, 1999).

2.3. Teflubenzuron

O teflubenzuron [1-(3,5-dicloro-2,4 difluorofenil)-3-(2,6-difluorobeznoil)-uréia] é um inseticida do grupo das benzoilfenilureas que atua como regulador do crescimento de insetos. Os inseticidas deste grupo atuam interferindo na capacidade do inseto produzir quitina e, conseqüentemente, a formação da cutícula que é uma parte importante do exosqueleto. A quitina é um polissacarídeo de N-acetilglucosamina, e sua síntese

envolve várias etapas bioquímicas. RETNAKARAN et al. (1985) citam que as benzoilfenilureas inibem a formação da enzima quitina sintetase a partir de seu zimógeno, pela interferência em alguma protease responsável pela ativação desta enzima. Na ausência de quitina, a cutícula do inseto se torna fina e frágil, o processo de ecdise (muda de pele) é afetado pela incapacidade de formar uma nova cutícula normal e afeta todos os estádios imaturos, levando-os à morte.

Por este mecanismo de ação, o teflubenzuron (TFB) pode afetar de diferentes formas qualquer organismo que tenha quitina em sua estrutura corporal, como insetos, moluscos, crustáceos, anelídeos, fungos, entre outros. Em estudos com o poliqueta *Capitella* sp, MENDÉZ (2006 e 2005) observou que, quando exposto ao TFB, houve atraso na metamorfose das larvas, forte redução no peso corpóreo nos juvenis e efeito significativo no comportamento alimentar dos adultos. Isso acontece porque, apesar de não realizar ecdise, esta espécie possui quitina na estrutura de seus segmentos.

O TFB é um inseticida desenvolvido para uso agrícola, mas tem sido usado incorporado à ração de peixes para o tratamento de infestações de piolho-do-salmão (*Lepeophtheirus salmonis*) na Noruega, desde 1996, e no Reino Unido, desde 2000 (BRANSON et al., 2000). Estes autores citam que TFB foi extensivamente testado como tratamento para *L. salmonis*. Os mesmos verificaram que, quando administrado oralmente, cerca de 10 mg/kg de peixe de 1 a 7 dias consecutivos, o TFB foi altamente eficiente no controle do piolho-do-salmão em testes conduzidos a temperaturas entre 11 e 15°C.

Ao ser administrado por via oral, o TFB entra na corrente sanguínea do peixe e o parasito que se alimenta do sangue acaba por ingerir o inseticida. Segundo SEPA (1999), cerca de 90% do TFB ingerido pelo peixe é eliminado nas fezes. O TFB também pode atingir o ambiente por meio da ração desperdiçada pelos peixes. Entretanto, nesta modalidade de aplicação, a quantidade da substância ativa liberada no ambiente é muito menor que no banho terapêutico (RAMSTAD et al., 2002).

De acordo com dados publicados pela FAO (1996), em água com pH entre 5 e 7 a 25 °C, o TFB apresenta meia-vida de 30 dias, enquanto que, em pH 9 a 25 °C, a meia-vida do produto é de 10 dias.

2.4. Testes de toxicidade

Os testes de toxicologia aquática constituem-se em importante ferramenta para avaliação da sensibilidade de organismos a fatores ambientais desfavoráveis como efluentes tóxicos, poluentes físicos, químicos e medicamentos. São realizados com diversas finalidades, como a regulamentação dos limites aceitáveis de contaminação ambiental, homologação e registro de produtos químicos comerciais utilizados no meio ambiente e teste de medicamentos, que permitem avaliar a eficácia e também os efeitos deletérios dos compostos químicos utilizados nos tratamentos de doenças de organismos aquáticos (LOMBARDI, 2004).

As substâncias químicas têm um potencial tóxico que depende da concentração no ponto de contato dos organismos no ambiente. É baseado neste ponto que os seres vivos desencadeiam sua capacidade de proteção, que consiste principalmente na metabolização e excreção dos agentes agressores. O resultado da interação entre estes fatores é o efeito mensurável pelos biotestes (KNIE e LOPES, 2004). Os testes de toxicidade com organismos aquáticos em condições de laboratório possibilitam a qualificação e a mensuração dos efeitos dos produtos tóxicos sobre os componentes da biota.

Para efeito de monitoramento de um corpo de água possivelmente contaminado com substâncias tóxicas, os testes mais utilizados são os de avaliação das toxicidades aguda e crônica em organismos bioindicadores.

O efeito agudo trata-se de uma resposta severa e rápida a um estímulo, que se manifesta nos organismos aquáticos em geral em um curto período de tempo (RAND e PETROCELLI, 1985). Para avaliar os efeitos agudos em testes de toxicidade, usa-se a concentração letal ou concentração efetiva a 50% dos organismos em teste (CL₅₀ ou

CE₅₀), ou seja, a concentração do agente tóxico presente no ambiente aquático que causa 50% de letalidade, ou outro efeito, à espécie-teste (GHERARDI-GOLDSTEIN, 1988). O objetivo destes testes é determinar a concentração da substância química ou efluente que produz um efeito deletério na população exposta durante um curto período de tempo e sob condições controladas (RAND, 1995).

Nos testes de toxicidade crônica, o organismo responde a um estímulo que continua por longos períodos, podendo afetar todo seu ciclo de vida. De um modo geral, as concentrações a que os organismos são expostos são subletais, ou seja, permitem a sobrevivência do organismo, mas afetam uma ou várias de suas funções biológicas, por exemplo, interferência na reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento, maturação e/ou comportamento em geral (GHERARDI-GOLDSTEIN, 1988).

Para uma avaliação mais ampla de um agente químico no meio hídrico, recomenda-se a utilização de organismos representativos de diversos níveis tróficos da cadeia alimentar. Isso porque, dependendo de características filogenéticas e fisiológicas, organismos aquáticos diferentes podem apresentar diferentes níveis de sensibilidade a um mesmo poluente (LOMBARDI, 2004).

Os principais organismos recomendados são: produtores primários, como microalgas e macrófitas (ex.: *Selenastrum capricornutum* e *Lemna minor*); consumidores primários, como os organismos zooplânctônicos (ex.: *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia*); e os consumidores secundários, como os peixes (ex.: *Danio rerio* e *Poecilia reticulata*) (IBAMA, 1987); além de organismos associados aos sedimentos, como o crustáceo anfípoda *Hyalella azteca* (MOORE et al., 2007).

2.4.1. Organismos-teste

2.4.1.1. *Daphnia magna*

A comunidade zooplânctônica é de grande importância nos ecossistemas aquáticos devido ao seu papel central na cadeia trófica, pois representa a via de acesso

na transferência de energia dos organismos produtores para os níveis superiores da cadeia (ABRANTES e GONÇALVES, 2003).

A *Daphnia magna* (Figura 1) é um microcrustáceo filtrador pertencente à Ordem Cladocera, que faz parte do zooplâncton de água doce. Em condições ambientais favoráveis, reproduz-se assexuadamente por partenogênese e origina uma população constituída apenas por fêmeas geneticamente idênticas à mãe. Em condições desfavoráveis, como superpopulação, falta de alimento ou mudanças de temperatura, ocorre a produção de machos e como resultado da reprodução sexuada, efípios. Os efípios são ovos envolvidos por uma casca escura e altamente resistente, desenvolvida para suportar condições desfavoráveis, como ressecamento, congelamento e até a passagem pelo intestino dos peixes e de outros animais (RUPPERT e BARNES, 1996).



Figura 1. Exemplar de *Daphnia magna*. Fonte<www.mpil-ploen.mpg.de/english/physeco/staff/fink/Daphniamagna.jpg>

Entre os cladóceros, a *D. magna* tem sido frequentemente utilizada como organismo-teste em testes ecotoxicológicos para o monitoramento ambiental (UNTERSTEINER et al., 2003). A daphnia como organismo para experimentação, tem vantagens como cultivo fácil e barato em laboratório, curto ciclo de vida e curto período

de gestação com grande produção de filhotes, e necessita de pequeno espaço físico (MARTINS et al., 2007; PAUL et al., 2004).

A *D. magna* é conhecida por ser sensível a muitos produtos químicos que são comumente encontrados no ambiente aquático, e pode responder a essas substâncias com uma variedade de características fisiológicas e comportamentais (MICHELS et al., 2000).

CHRISTENSEN et al. (2005) verificaram mais de 50% de redução na eficiência alimentar e uma significativa inibição da capacidade natatória de *D. magna* em concentrações a partir de 0,1 µg.L⁻¹ do inseticida cypermethrin.

O inseticida regulador do crescimento pyriproxyfen foi testado por TRAYLER e DAVIS (1996), que calcularam CE_{50-48h} de 0,08 mg.L⁻¹ para o cladóceros *Daphnia carinata*. Na concentração subletal de 0,01 mg.L⁻¹ os autores observaram redução da fecundidade, produção de efípios e diminuição do crescimento e da biomassa dos indivíduos expostos, em relação ao controle.

O inseticida inibidor de quitina diflubenzuron (DFB) foi considerado altamente tóxico para *D. magna* em estudo realizado por KASHIAN e DODSON (2002). Na concentração de 0,01 µg.L⁻¹, o DFB provocou redução considerável da sobrevivência dos organismos testados. Entretanto, concentrações mais baixas do DFB não provocaram efeitos adversos no crescimento/muda ou reprodução das daphnias.

2.4.1.2. *Lemna minor*

A *Lemna minor* (Figura 2) é uma espécie de pequenas macrófitas aquáticas flutuantes pertencentes à família *Lemnaceae*. As macrófitas estão presentes em quase todos os tipos de ambientes aquáticos e, dependendo do tipo de sistema, como em ambientes rasos e/ou enriquecidos, podem constituir-se no grupo principal de produção primária e formar a base da cadeia alimentar (FERREIRA, 1995). Juntamente com as algas, as plantas aquáticas são responsáveis pela produção de oxigênio, ciclagem de

nutrientes, controle da qualidade da água, estabilização do sedimento, proteção das margens dos corpos d'água do processo erosivo das ondas, remoção do excesso de substâncias tóxicas e eutrofizantes da água, e fornecem habitat e abrigo para desova e proteção das fases jovens de organismos aquáticos (PITELLI, 1998; LEWIS, 1995).



Figura 2. Exemplar de *Lemna minor*.

Fonte <www.bioassay.narod.ru/museum/img/cultures/Lemna-001.jpg>

As plantas aquáticas têm sido usadas frequentemente para remover sólidos em suspensão, nutrientes, metais pesados, tóxicos orgânicos, entre outros. Por outro lado, não são comumente utilizadas como espécies-teste em ensaios para avaliar o dano de poluentes, apesar de estarem entre os primeiros organismos a serem atingidos nos ambientes aquáticos (MITSOU et al, 2006; MOHAN e HOSETTI, 1999). Segundo WANG (1990), a lemna é considerada um modelo adequado para estudos ecotoxicológicos devido a seu tamanho reduzido, rápida taxa de crescimento, reprodução vegetativa, facilidade de cultivo e sensibilidade a numerosos poluentes.

Além de *L. minor*, outras macrófitas podem ser utilizadas para avaliar os efeitos de poluentes em ambientes aquáticos, como: *Pistia stratiotes*, *Hydrocharis dubia*, macrófitas submersas como *Elodea* sp., *Myriophyllum* sp., e macrófitas emergentes como *Typha latifolia* (OLETTE, 2008; AMAYA-CHÁVEZ et al., 2006; TURGUT e FOMIN, 2002).

Na literatura são escassos os trabalhos sobre os efeitos de inseticidas nas macrófitas aquáticas. A toxicidade do inseticida carbaryl foi avaliada por

BOONYAWANICH et al. (2001) em testes de toxicidade com as macrófitas *Ipomoea aquatica*, *Pistia stratiotes* e *Hydrocharis dubia*. Com o aumento na concentração do inseticida, estes autores observaram que houve decréscimo no conteúdo total de clorofila e no peso fresco das macrófitas, e aumento no índice de lesão foliar nas plantas tratadas, enquanto o controle apresentou índice de lesão zero. As folhas desenvolveram clorose e necrose devido à exposição ao carbaryl. No estudo desenvolvido por AMAYA-CHÁVEZ et al. (2006), por sua vez, não foi observada redução na clorofila total em decorrência da exposição de *Typha latifolia* ao inseticida metil paration.

MENONE et al. (2008) observaram que o inseticida endossulfan eleva o estresse oxidativo na macrófita *Myriophyllum quitense*. Quando a macrófita foi exposta à concentração de 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ocorreu uma generalizada indução na atividade das enzimas catalase (CAT), glutaciona-S-transferase (GST) e glutaciona redutase (GR), o que indica que o inseticida ativou o sistema de proteção desta planta.

2.4.1.3. *Poecilia reticulata*

O guarú ou guppy (*Poecilia reticulata*) (Figura 3) é uma espécie originalmente do norte da América do Sul e, atualmente, é considerada cosmopolita. Foi introduzida no Brasil para o controle biológico de mosquitos transmissores da malária e outras doenças, devido ao seu hábito alimentar larvófago. O guarú é encontrado na natureza, geralmente, em águas pouco movimentadas, como pequenos córregos, ou até estagnadas. É uma espécie muito utilizada em estudos de toxicidade devido à sua adaptabilidade às condições de laboratório. Esta espécie de peixe é recomendada pela American Public Health Association (APHA, 1991) como organismo-teste.

Em estudos realizados com deltamethrin, VIRAN et al. (2003) observaram alterações no comportamento de *P. reticulata* expostos a este inseticida. Em concentrações de deltamethrin acima de 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ os peixes apresentaram movimento branquial rápido, natação errática, letargia, perda do equilíbrio, natação na superfície da água, posicionamento vertical na coluna d'água, entre outras respostas.



Figura 3. Exemplar de *Poecilia reticulata*.

Fonte: <http://www.aquahobby.com/gallery/img/Poecilia_reticulata_2.jpg>

Em concentrações acima de $8 \mu\text{g.L}^{-1}$ do inseticida α -cypermethrin, YILMAZ et al. (2004) verificaram dificuldade respiratória, mudança na coloração abdominal, letargia e perda do equilíbrio em *P. reticulata*.

DE SILVA e SAMAYAWARDHENA (2005) avaliaram o desempenho reprodutivo de *P. reticulata* em testes com as concentrações subletais de $0,002 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ do inseticida organofosforado chlorpyrifos e verificaram que, em ambas as concentrações, houve uma redução significativa da tentativa de acasalamento por parte dos machos expostos, em relação aos do grupo controle. Houve também uma diminuição significativa no número de filhotes nascidos vivos em relação ao controle.

O inseticida chlorpyrifos-metil apresenta baixa toxicidade para mamíferos e moderada para peixes, com uma CL_{50-96h} estimada em $1,79 \text{ mg.L}^{-1}$ para *P. reticulata* (SELVI et al., 2005). Em concentrações a partir de 2 mg.L^{-1} foi observada que a perda do equilíbrio se torna mais freqüente nos peixes expostos. Na mais alta concentração testada neste estudo (3 mg.L^{-1}), os peixes apresentaram respostas em alta intensidade: natação errática, perda do equilíbrio, posicionamento vertical, movimento branquial rápido, movimento em espiral repentino, além de permanecerem longos períodos imóveis no fundo do aquário (SELVI et al., 2005).

2.5. Avaliação de risco ambiental

O risco ambiental de determinada substância é o resultado do julgamento de sua periculosidade em função da exposição (USEPA, 1986 apud ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). A periculosidade está associada às potencialidades intrínsecas da substância, como por exemplo, a toxicidade aguda e crônica, degradação e bioacumulação, dentre outras, enquanto que a exposição está associada às condições de uso e distribuição no ambiente (concentração ou dose) (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Avaliação de risco é a caracterização do potencial efeito adverso no organismo em exposição a perigos ambientais. A avaliação de risco inclui alguns elementos como: descrição dos efeitos potenciais para um organismo, baseado em pesquisa toxicológica, epidemiológica e ecológica; extrapolação desses resultados para prever o tipo de efeito e estimar a severidade e extensão desses efeitos em populações naturais sob dadas condições de exposição; estimativa das espécies e localização dos organismos expostos à várias intensidades e durações; e julgamento da existência e magnitude dos problemas ecológicos (BURNS, 2001).

De acordo com BURNS (2001) a avaliação de risco ambiental é realizada por meio de um processo que envolve as quatro etapas descritas a seguir.

1. **Identificação do perigo:** é o procedimento para se determinar se a exposição a um agente pode causar um aumento na incidência de um efeito biológico (mortalidade, redução da fertilidade, entre outros).
2. **Avaliação da dose-resposta:** é o procedimento para se caracterizar a relação entre a dose do agente administrado ou recebido e a incidência de um efeito adverso em uma população experimentalmente exposta; e estimar a incidência do efeito em populações naturais e ecossistemas como uma função da exposição ao agente.

3. **Avaliação da exposição:** é o procedimento para se medir ou estimar a intensidade, frequência e duração do contato da biota com o agente presente no ambiente, ou de estimar exposições hipotéticas que podem surgir do lançamento de um novo químico no ambiente.
4. **Caracterização do risco:** é o procedimento para se estimar a incidência de um efeito sobre as várias condições de contaminação dos sistemas naturais e contato biológico, descritos na avaliação da exposição. Comparam-se os níveis toxicológicos de preocupação com as concentrações ambientais estimadas (CAEs) obtidas na avaliação da exposição, para julgar se existe risco suficiente para necessitar de mais investigações ou ação regulatória.

Segundo OLIVEIRA (2005), para se realizar a avaliação do risco ambiental há a necessidade do levantamento de todas as informações possíveis sobre o contaminante, no que se refere à suas propriedades físico-químicas e toxicológicas, da distribuição nos compartimentos ambientais (ar, água, solo, sedimento) e dos efeitos nos elementos da biota representativa, pertencentes aos diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar – como microcrustáceos, peixes, plantas, organismos do solo.

O presente trabalho enfocou estas etapas do processo de avaliação do risco descrito por BURNS (2001), no qual foram realizados testes de toxicidade aguda com o inseticida TFB e, baseado nos resultados obtidos, o inseticida foi classificado quanto à toxicidade aos organismos testados e ao risco de intoxicação ambiental.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada nos testes de toxicidade aguda do teflubenzuron (TFB) para *Lemna minor* Linnaeus foi realizada de acordo com a norma da OECD (2002). Os testes com *Daphnia magna* Straus, 1820 e *Poecilia reticulata* Peters, 1859 foram realizados de acordo com os métodos padronizados em norma da CETESB (1999) e do IBAMA (1987), respectivamente.

3.1. Local de realização dos testes

Os testes para a avaliação da toxicidade aguda do TFB foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional do Departamento de Fitossanidade, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / UNESP, Campus de Jaboticabal, associado ao Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP).

3.2. Organismos-teste

3.2.1. *Daphnia magna*

Os exemplares de *Daphnia magna* utilizados nos teste foram obtidos a partir do cultivo-estoque mantido no laboratório. As culturas foram mantidas dentro de câmaras

incubadoras, dos seguintes modelos 121FC Eletrolab e 347 FANEM, sob temperatura controlada de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, intensidade luminosa de 3000 lux e fotoperíodo de oito horas de escuro e 16 horas de luz, de acordo com a norma do IBAMA (1987).

3.2.1.1. Cultivo de *Daphnia magna*

O meio de cultivo básico/M4 constitui-se de água destilada reconstituída, com pH $7,0 \pm 0,2$, dureza total de $250 \pm 25 \text{ mg.L}^{-1}$ em CaCO_3 e condutividade de $600 \pm 21 \mu\text{S/cm}$ (KNIE e LOPES, 2004).

Os organismos foram cultivados em recipientes de vidro (cristalizadores) de dois e 3 L de capacidade (Figura 4). O meio de cultivo foi completamente renovado duas vezes por semana. No início de cada semana, na ocasião da troca do meio de cultivo, os lotes de organismos com quatro semanas de idade foram descartados e novos lotes de primeira semana iniciados com os neonatos coletados no dia. Nos outros dias da semana, pela manhã, os aquários foram limpos por sifonamento e fornecida a alimentação.



Figura 4. Cultivo de *D. magna* em cristalizadores, mantidos em estufa incubadora.

3.2.1.2. Alimentação

A alimentação da cultura foi realizada com uma suspensão de algas da espécie *Scenedesmus subspicatus* na quantidade aproximada de 5×10^6 células/daphnia/dia. Além disso, também foi oferecido, diariamente, 0,5 mL de alimento composto, constituído por proporções iguais de solução de ração para peixe ornamental fermentada e solução de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), de acordo com a norma da CETESB (1999).

3.2.1.3. Cultura de algas

A solução algácea utilizada na alimentação das daphnias foi cultivada em meio CHOU, como descrito por KNIE e LOPES (2004). O meio foi composto por água destilada autoclavada e reconstituída com nutrientes. O cultivo de *Scenedesmus subspicatus* foi conduzido em erlenmeyers de 2 L (Figura 5), mantido sob aeração e luminosidade (3000 lux) constantes por uma semana. Após a alga atingir o crescimento adequado, a solução foi transferida para frascos de vidro e mantida em refrigerador, a 4 °C até o uso.



Figura 5. Cultivo da alga *Scenedesmus subspicatus* para alimentação de daphnias.

3.2.1.4. Alimento composto

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

3.2.2. *Lemna minor*

Do cultivo-estoque da macrófita aquática *Lemna minor* mantido no laboratório foram obtidos os exemplares utilizados nos testes. Os organismos foram mantidos em sala climatizada com temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, sob intensidade luminosa de 6000 lux fornecida por lâmpadas fluorescentes de 20 W, com fotoperíodo de 12 horas de luz.

3.2.2.1. Cultivo de *Lemna minor*

As plantas foram cultivadas (Figura 6) em meio de Hoagland (LI et al., 2004), com pH 5,8. O meio de cultivo foi completamente substituído duas vezes por semana. Na ocasião da troca do meio, as plantas danificadas e com raízes escurecidas foram descartadas e apenas as de aspecto saudável foram mantidas.



Figura 6. Cultivo de *Lemna minor*.

3.2.2.2. Desinfecção

Com o objetivo de eliminar algas e protozoários contaminantes, eventualmente foi realizada a desinfecção dos cultivos de lemna. As plantas foram imersas em solução de 0,5% de hipoclorito de sódio por quatro minutos, em seguida, foram imersas por duas vezes em água destilada, e recolocadas em meio de cultivo por sete dias antes da utilização nos bioensaios, segundo a recomendação da norma OECD (2002).

3.2.3. *Poecilia reticulata*

3.2.3.1. Obtenção e manutenção dos peixes

Os guarús (*Poecilia reticulata*) foram coletados em tanques de cultivo do Centro de Aqüicultura da UNESP, localizado no Campus de Jaboticabal.

Inicialmente os peixes foram mantidos em reservatórios de fibra de amianto revestidos com resina epóxi, com 1000 litros de capacidade, por cerca de 15 dias. A água de abastecimento foi poço artesiano com renovação e aeração constantes. A temperatura da água foi mantida em torno de 25°C regulada com o uso de termostatos. Os peixes foram alimentados com ração comercial para peixes “Poli peixes” Polinutre LTDA. (28 % pb), fornecida uma vez ao dia. O período de aclimação foi necessário para a

observação da sanidade dos animais e recuperação do estresse da captura. Se houvesse alta taxa de mortalidade ou o aparecimento de parasitas e doenças, o lote de peixes seria descartado.

3.2.3.2. Aclimação

Os lotes de peixes foram aclimatados em um reservatório de 250 L (Figura 7) às condições de realização dos bioensaios por sete dias. A temperatura e fotoperíodo da sala foram controlados, em $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de luz. A aeração e o fluxo de água, de poço artesiano, foram mantidos constantes. A alimentação foi fornecida diariamente com a ração comercial anteriormente citada.

A limpeza dos reservatórios de aclimação foi realizada por sifonamento, sempre que necessária, a fim de não haver acúmulo de rejeitos. Os peixes mortos foram retirados sempre que detectados.



Figura 7. Aclimação dos organismos-teste nas condições dos bioensaios.

3.2.4. Testes de toxicidade aguda

3.2.4.1. Testes preliminares

Os testes preliminares foram realizados segundo as normas mencionadas para cada espécie, a fim de determinar as faixas de concentração letal do TFB para serem utilizadas nos testes definitivos para as três espécies. Nestes testes foram determinadas as maiores concentrações não letais e as menores que causaram 100% de efeito agudo nos organismos-teste.

Neste estudo foi utilizada a formulação Nomolt[®], que é comercializada na forma de suspensão concentrada contendo 15% do ingrediente ativo teflubenzuron. As diluições foram feitas considerando a quantidade de ingrediente ativo presente na formulação comercial.

3.2.4.2. Testes definitivos

Com as faixas de concentrações obtidas nos testes preliminares com cada espécie, foram executados os testes definitivos. Nestes testes foram utilizadas três réplicas de cada concentração, que foram consideradas em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Para cada organismo-teste foram realizados três testes definitivos. A metodologia utilizada nos testes definitivos para cada organismo estudado está descrita a seguir:

3.2.4.2.1. Teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

O teste foi realizado segundo as normas CETESB (1999). Para a obtenção de organismos com a idade adequada (6 a 24 horas), as fêmeas ovígeras foram isoladas à tarde, 24 horas antes do início do teste. Na manhã seguinte, os indivíduos neonatos foram separados dos adultos e mantidos em meio de cultivo por seis horas, até o início do teste.

Os organismos neonatos foram expostos a concentrações crescentes do teflubenzuron (TFB), e os ensaios foram compostos por três réplicas de cada

concentração (tratamento) e um tratamento controle sem o TFB. Os testes foram realizados em frascos de vidro com 30 mL de capacidade (Figura 8). As diluições foram feitas a partir da adição de volumes conhecidos de soluções-estoque de 1 mg.L⁻¹ e 0,01 mg.L⁻¹, completando um volume de 9 mL com meio de cultivo. As concentrações utilizadas foram 0, 0,00005; 0,0001; 0,0003; 0,0005; 0,001 e 0,005 mg.L⁻¹. Em seguida, cinco organismos neonatos (6 a 24 horas de vida) foram adicionados, juntamente com 1 mL de meio de cultivo, completando um volume total de 10 mL de solução-teste. Os testes foram mantidos no escuro, em sala climatizada a 20 ± 2°C, sistema estático, sem alimentação ou aeração por 48 horas. Após esse período, o número de organismos imóveis (ou mortos) foi registrado. Os testes nos quais a mortalidade do grupo controle excedeu 10%, foram descartados.



Figura 8. Teste de toxicidade aguda do teflubenzuron com *Daphnia magna*.

3.2.4.2.2. Inibição do crescimento da macrófita *Lemna minor*

Os testes definitivos foram realizados com as concentrações de TFB de 0, 100, 300, 900, 1800, 3600 e 7200 mg.L⁻¹, e sob condições ambientais similares às dos preliminares.

Os testes foram realizados em recipientes de vidro com 170 mL de capacidade. As diluições foram feitas a partir de volumes conhecidos das soluções-estoque de 500 e 15000 mg.L⁻¹ de TFB. Alíquotas destas soluções foram adicionadas ao meio de cultivo

para completar 100 mL de solução por recipiente-teste (Figura 9). Após o preparo das soluções, as plantas foram cuidadosamente transferidas para os recipientes-teste com o auxílio de uma pinça metálica de forma a evitar danos às frondes (folhas). Foram selecionadas apenas as frondes não danificadas e com forma e tamanho homogêneos. Para cada diluição e controle foram utilizadas três réplicas, em cada réplica foi adicionada quatro colônias com três frondes cada, num total de 12 frondes por réplica. Para evitar a contaminação externa os recipientes foram cobertos com filme plástico perfurado para permitir trocas gasosas. O teste foi mantido em sala climatizada sob fotoperíodo de 12 horas, a 24 ± 2 °C, por sete dias. As avaliações feitas nos 3º, 5º e 7º dias de teste, por meio da contagem das frondes que nasceram no decorrer deste período.



Figura 9. Teste de toxicidade aguda do teflubenzuron com *Lemna minor*.

A taxa de crescimento relativo foi calculada com a fórmula proposta por GUILLARD (1979), que é a seguinte:

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

Onde:

K= Taxa de crescimento diário;

$\text{Log}_2 n_f$ = Logarítmo na base dois do número de frondes ao final do experimento;

$\text{Log}_2 n_i$ = Logarítmo na base dois do número de frondes no início do experimento;

t= tempo de incubação (dias).

3.2.4.2.4. Teste de toxicidade aguda com *Poecilia reticulata*

Durante os testes preliminares foi observado que com o aumento da concentração do TFB ocorria diminuição dos níveis de oxigênio dissolvido nas soluções-teste, atingindo valores abaixo de 4 mg.L⁻¹. Nessas condições, a norma do IBAMA (1987) recomenda que o teste seja executado sob aeração constante. Por este motivo os testes definitivos foram realizados com aeração da água dos recipientes-teste com bombas elétricas.

Após o período de aclimação, os peixes foram expostos a concentrações crescentes do TFB. Os testes foram realizados em sistema estático e sem alimentação por 96 horas. A água utilizada na diluição do produto testado foi obtida do poço artesiano da FCAV.

Inicialmente, os aquários-teste foram preenchidos com 1 L de água e adicionados cinco peixes adultos. Os peixes foram cuidadosamente pesados e transferidos para os aquários com o uso de puçás de nylon. Esse manejo eleva o estresse dos peixes e, por esse motivo, as soluções-teste foram adicionadas 24h após a transferência dos organismos. O peso médio do grupo de cinco peixes foi de 0,40 ± 0,08 g, que está de acordo com densidade recomendada pelo IBAMA (1987) de no máximo 1g de peixe para cada litro de água. As diluições foram então preparadas em 500 mL de água, completando o volume total de 1,5 L de solução-teste por réplica. Para cada concentração foram utilizadas três réplicas. O teste foi mantido em sala climatizada a 25 ± 2 °C, sem alimentação e com aeração por 96 horas. A sala de teste foi mantida fechada, livre de barulho e trânsito de pessoas para evitar o estresse dos peixes. A cada 24 horas o teste foi avaliado, e os peixes mortos contabilizados e retirados dos aquários. As variáveis de qualidade da água (pH, condutividade e oxigênio dissolvido) também foram quantificadas à cada 24 horas (Figura 10).

Os testes definitivos foram conduzidos com as concentrações 0, 500, 2000, 3500, 5000 e 6500 mg.L⁻¹ estabelecidas nos testes preliminares.

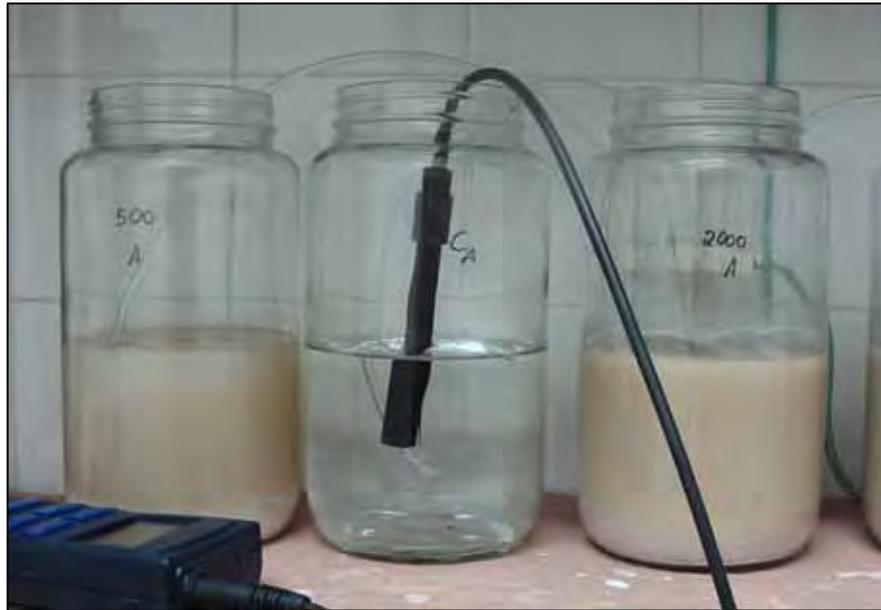


Figura 10. Quantificação da condutividade elétrica da água do teste de toxicidade aguda de teflubenzuron para *Poecilia reticulata*.

3.2.5. Teste de sensibilidade dos organismos-teste

Para de verificar a sensibilidade dos organismos, durante o período de estudo do TFB foram realizados testes de toxicidade aguda periódicos com as substâncias de referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) para daphnia e peixe, de acordo com as normas adotadas para cada espécie e cloreto de sódio (NaCl) para lemna, como indicado por CHASTINET e SILVA (2000).

Para estabelecer as cartas-controle dos organismos-teste, o limite superior (LS) e o limite inferior (LI) da faixa de sensibilidade dos lotes foram calculados com a média dos valores de CE_{50} ou CL_{50} do número de testes realizados com cada espécie ± 2 desvios-padrão, calculados com as respectivas substâncias de referência.

3.2.5.1. *Daphnia magna*

Os organismos foram expostos a concentrações crescentes do dicromato de potássio, em três réplicas de cada concentração. As diluições foram preparadas a partir da adição de volumes conhecidos de uma solução-estoque de 10 mg.L^{-1} . Os testes foram

realizados a cada 15 dias, seguindo o procedimento descrito nos testes de toxicidade aguda com TFB. A avaliação foi realizada após 24 horas de teste.

As concentrações utilizadas foram 0,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8 e 1,9 mg.L⁻¹. As CE_{50-24h} média (n=15) estimada foi de 1,45 mg.L⁻¹, com limite superior (LS) de 1,61 mg.L⁻¹ e limite inferior (LI) de 1,29 mg.L⁻¹ (Figura 11).

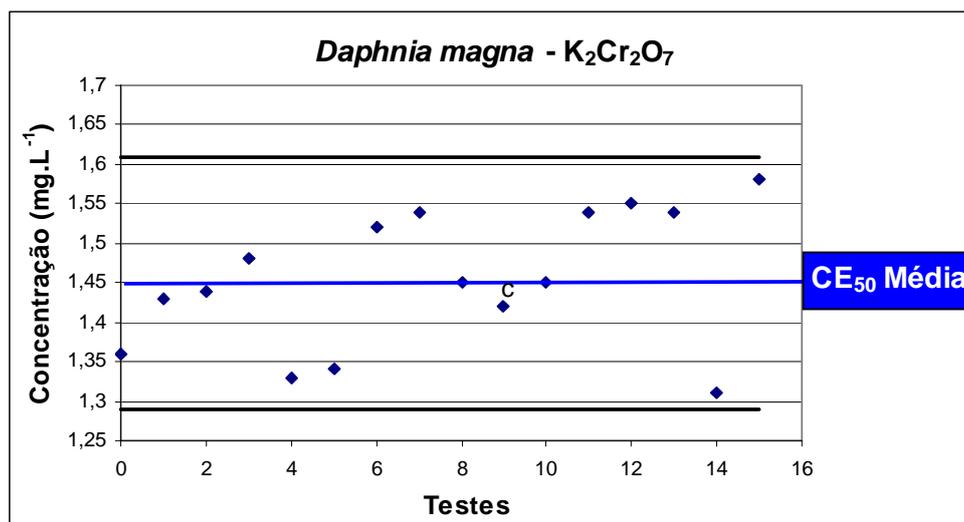


Figura 11. Carta-control de organismo *D. magna* para a substância referência dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇). Médias das CE_{50-24h} e médias dos limites superior e inferior.

3.2.5.2. *Lemna minor*

A sensibilidade da lemna cultivada foi avaliada mensalmente utilizando-se o cloreto de sódio (NaCl) como substância de referência. As soluções-teste foram preparadas a partir de volumes conhecidos de uma solução-estoque de 10.000 mg.L⁻¹ de NaCl, diluídos em meio de cultivo (Hoagland). Para cada diluição foram utilizadas três réplicas, em cada réplica foram adicionadas quatro colônias com três frondes cada. O procedimento e condições dos testes foram os mesmos descritos para os testes preliminares (Figura 12). A avaliação foi realizada por meio da contagem das frondes que nasceram no decorrer do período de sete dias do teste.



Figura 12. Teste de sensibilidade com *Lemna minor*.

As concentrações do NaCl utilizadas foram 0,0; 1500; 2500; 3500; 4500; 5500; 6500 e 7500 mg.L⁻¹. A CE_{50-7d} média (n=9) estimada foi de 4294,3 mg.L⁻¹, com limite superior (LS) de 5199,7 mg.L⁻¹ e limite inferior (LI) de 3388,8 mg.L⁻¹ (Figura 13).

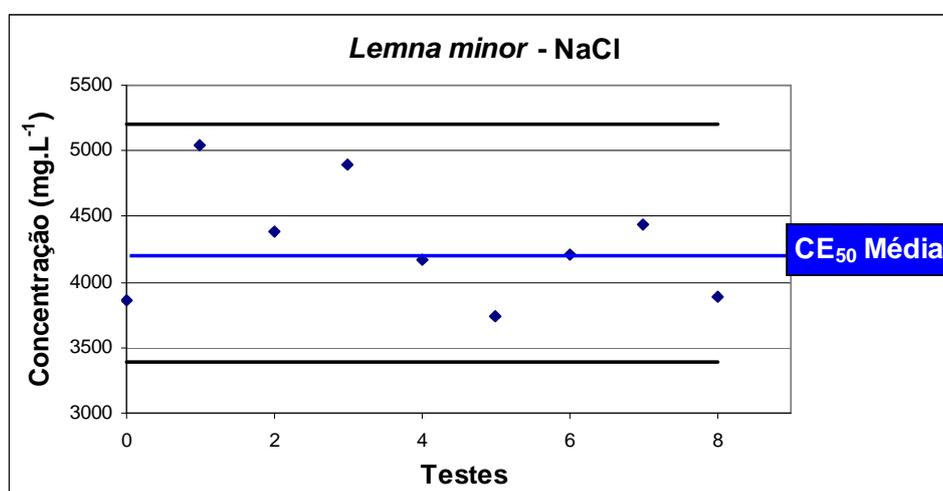


Figura 13. Carta-controle do organismo *L. minor* para a substância referência Cloreto de sódio (NaCl). Médias das CE_{50-7d} e limites superior e inferior.

3.2.5.3. *Poecilia reticulata*

Para avaliar a sensibilidade dos peixes obtidos dos tanques do CAUNESP, após o período de aclimatação descrito, os animais foram expostos a concentrações crescentes

do dicromato de potássio. Para cada concentração foram utilizadas três réplicas. O teste foi mantido em sala climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sem alimentação ou aeração por 96 horas. A cada 24 horas foram avaliadas as variáveis físico-químicas das soluções-teste das parcelas experimentais, e os peixes mortos, contabilizados e retirados dos aquários. As diluições foram feitas a partir de uma solução-estoque de 10.000 mg.L^{-1} de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

As concentrações utilizadas foram 0, 40, 80, 120, 160 e 200 mg.L^{-1} . A $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ média ($n=8$) calculada ao longo dos experimentos foi de $82,25 \text{ mg.L}^{-1}$, com limite superior (LS) de $103,2 \text{ mg.L}^{-1}$ e limite inferior (LI) de $61,2 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 14).

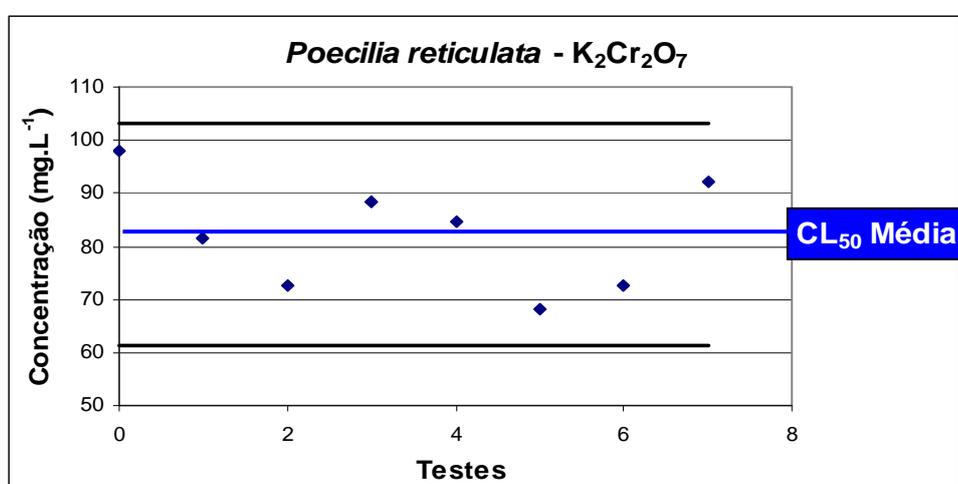


Figura 14. Carta-controle do organismo *P. reticulata* para a substância referência dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Médias das $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ e limites superior e inferior.

3.2.6. Cálculo das CE_{50} e CL_{50}

Os resultados obtidos dos testes de toxicidade aguda e nos testes com as substâncias de referência foram utilizados no cálculo das CE_{50} e CL_{50} . A concentração efetiva média (CE_{50}) e a concentração letal média (CL_{50}) que provocou efeito agudo em 50% dos organismos no período de teste foram estimadas com o programa estatístico Trimmed Spearman – Karber (HAMILTON et al., 1977).

3.2.7. Classificação quanto ao potencial tóxico

Os valores de CE_{50} e CL_{50} obtidos para cada espécie estudada foram utilizados para classificar o TFB quanto ao potencial tóxico para estas espécies, de acordo com as classes toxicológicas citadas por ZUCKER (1985):

- $CL_{50}/CE_{50} < 0.1 \text{ mg.L}^{-1}$ – altamente tóxico;
- $CL_{50}/CE_{50} = 0.1 - 1 \text{ mg.L}^{-1}$ – muito tóxico;
- $1 \text{ mg.L}^{-1} < CL_{50}/CE_{50} < 10 \text{ mg.L}^{-1}$ – moderadamente tóxico;
- $10 \text{ mg.L}^{-1} < CL_{50}/CE_{50} < 100 \text{ mg.L}^{-1}$ – levemente tóxico;
- $CL_{50}/CE_{50} > 100 \text{ mg.L}^{-1}$ – praticamente não-tóxico

3.2.8. Determinação do risco de intoxicação ambiental

Por não ter registro no Brasil, não há uma dosagem recomendada do TFB para aplicação direta na água. Desta forma, o cálculo da Concentração Ambiental Estimada (CAE) foi realizado considerando-se a maior dosagem recomendada para uso agrícola (ANDREI, 1999), e a dosagem utilizada em 1 kg de ração medicada para tratamento de peixe (SEPA, 1999).

Para o cálculo da CAE foram considerados os seguintes critérios (BOOCK e MACHADO NETO, 2000), baseados em uma situação hipotética:

- O produto estava uniformemente distribuído no espelho d'água de um reservatório de 1 ha (10.000 m^2) de área e com profundidades diferentes;
- Profundidades de 0,3 m por compreender a faixa onde se encontram o zooplâncton e o fitoplâncton, que são as bases da cadeia alimentar aquática, e 2 m, profundidade recomendada pela EPA para avaliação de risco em ambientes aquáticos (SOLOMON, 1996);

- Considerou-se as proporções de 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125% e 1,56% da maior dosagem (37,5 g i.a./ha) recomendada do produto para uso agrícola (ANDREI, 1999); e da dosagem incorporada à ração para tratamento do piolho-do-salmão (2 g i.a./kg de ração) (SEPA, 1999);
- A densidade média da água de 1,0 g/cm³.

O teflubenzuron também foi classificado quanto ao risco de intoxicação ambiental nas classes citadas por GOKTEPE (2004), estabelecidas de acordo com resultado da divisão da concentração ambiental estimada (CAE) pela CL₅₀ ou CE₅₀ do TFB estimadas nos testes de toxicidade aguda realizados. Este resultado é um número puro, as unidades se anulam na divisão, e pode ser denominado de Quociente de Risco (RQ = CAE/CL₅₀ ou CE₅₀).

Assim o critério de classificação do risco de intoxicação ambiental utilizado, de acordo com GOKTEPE (2004), foi o seguinte:

- RQ > 0,5 → **alto risco** (é recomendada a revisão da permissão de uso ou cancelamento da mesma);
- 0,05 < RQ < 0,5 → **médio risco** (produto com uso restrito);
- RQ < 0,05 → **baixo risco** (é recomendada cautela no uso do produto).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Toxicidade aguda para *Daphnia magna*

Na Figura 15 observa-se a representação gráfica dos resultados dos valores de imobilidade dos testes de toxicidade aguda do TFB para a *Daphnia magna*. Para esta espécie a CE_{50-48h} estimada foi de $0,00026 \text{ mg.L}^{-1}$ e a equação linear ajustada aos dados foi a seguinte: $y = 16,496X - 17,357$ e $R^2 = 0,9815$.

Pelos resultados obtidos neste trabalho, observa-se que o TFB é consideravelmente mais tóxico para *D. magna* que outros inseticidas utilizados no combate aos parasitos de peixe e testados por outros autores. O TFB é 27,3 vezes mais tóxico que o diflubenzuron ($CE_{50-48h} 0,0071 \text{ mg.L}^{-1}$), 28,1 vezes mais tóxico que metil paration ($CE_{50-48h} 0,0073 \text{ mg.L}^{-1}$) e 3,7 vezes mais tóxico que trichlorfon ($CE_{50-48h} 0,00096 \text{ mg.L}^{-1}$) (KASHIAN e DODSON, 2002; TOMLIN, 1997).

Esta diferença de toxicidade pode ser devida às diferentes formas de atuação dos inseticidas avaliados, além de diferenças nas metodologias de cultivo e avaliação da toxicidade. De acordo com ZUCKER (1985), o TFB pode ser classificado como altamente tóxico para *Daphnia magna*. A sensibilidade da *D. magna* à inseticidas é esperada, pois

os crustáceos estão mais estreitamente relacionados aos insetos do que qualquer outro invertebrado ou vertebrado (FERRANDO, 1996).

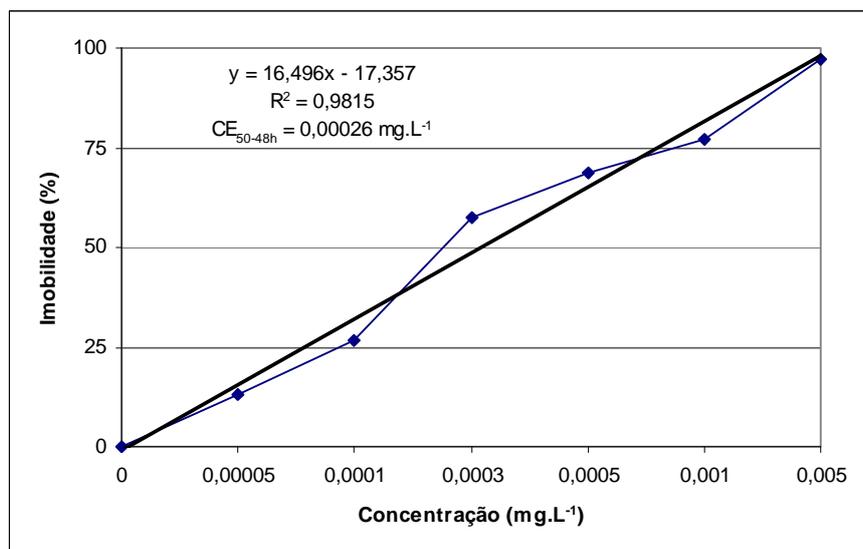


Figura 15. Representação gráfica da imobilidade de *D. magna* em função das concentrações de teflubenzuron no teste de toxicidade aguda.

O inseticida fenoxycarb, que também é um regulador do crescimento de insetos, foi testado por ODA et al. (2007) em testes com 7 clones geneticamente distintos de *D. magna*, provenientes de 5 países. Constataram considerável variação na sensibilidade de um clone para outro; a menor CE_{50-48h} estimada foi de 210 $\mu\text{g.L}^{-1}$, e a maior, 860 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

LAHR et al. (2001) expuseram indivíduos adultos das espécies de macroinvertebrados *Streptocephalus sudanicus* (Branchiopoda, Anostraca, Streptocephalidae) e *Anisops sardeus* (Hemiptera, Notonectidae) a concentrações crescentes dos inseticidas inibidores de quitina diflubenzuron (DFB), teflubenzuron (TFB) e triflumuron (TFM). Os valores de CE_{50-48h} estimados para *S. sudanicus* foram de: 0,74 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para DFB; 0,59 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para TFB e 0,21 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para TFM. Para *A. sardeus*, os valores de estimados CL_{50-48h} foram: 1937 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para DFB; 249 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para TFB e 189 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para TFM. Estes autores citam que as benzoilureas foram altamente tóxicas para *S. sudanicus*, mas bem menos tóxicas para *A. sardeus*.

Esta diferença de efeito tóxico ocorreu porque, em estádios adultos, os insetos são geralmente menos sensíveis a inibidores de quitina. Já *S. sudanicus*, como *D. magna*, realiza mudas continuamente durante o ciclo de vida, sendo mais sensíveis a esse grupo de inseticidas.

Em estudo com o inseticida cypermethrin, CHRISTENSEN et al. (2005) avaliaram os efeitos subletais de concentrações entre 0,05 e 0,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$, que estão entre as concentrações encontradas nos ambientes de água doce após aplicação do produto no campo. Após 6 horas de exposição a 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, foi observada redução de mais de 50% da eficiência alimentar, avaliada pelo conteúdo de clorofila presente no trato digestivo de *D. magna*. Os autores verificaram ainda que, com o aumento da concentração e do tempo de exposição, em concentrações a partir de 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, ocorreu significativa inibição da capacidade natatória do cladóceros. No mesmo trabalho, os autores observaram que o tempo necessário para a recuperação dos indivíduos expostos aumentava com o aumento da concentração. Em concentrações acima de 0,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$, os indivíduos não se recuperaram plenamente.

Os daphnídeos ocupam posições fundamentais nas cadeias alimentares aquáticas, devido a isso, a resposta desses organismos à entrada de substâncias tóxicas no ambiente límico constitui-se em informação relevante sobre o risco geral de xenobióticos nesse ecossistema (PEREIRA et al., 2007; HANAZATO, 1998). Com o uso de inseticidas, a abundância de cladóceros tende a declinar. Por serem forrageadores de fitoplâncton, a redução desses organismos no ambiente pode ter efeito na comunidade fitoplanctônica local, o que permite explosões populacionais de algas (CHRISTENSEN et al., 2005; WENDT-RASCH et al, 2003). LÓPEZ-MANCISIDOR et al. (2007) observaram que o chlorpyrifos na concentração 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ causou redução significativa na abundância de organismos zooplânctônicos como cladóceros (*Daphnia galeata*), copépodos (cyclopoids e náuplios de copépodos) e rotíferos (*Keratella cochlearis*).

4.2. Inibição do crescimento de *Lemna minor*

Na Figura 16 estão representados os resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda do TFB para *L. minor*. A CE_{50-7d} estimada foi de 1176,16 $mg.L^{-1}$ e a equação linear ajustada foi: $y = 18x - 30$ e $R^2 = 0,9435$.

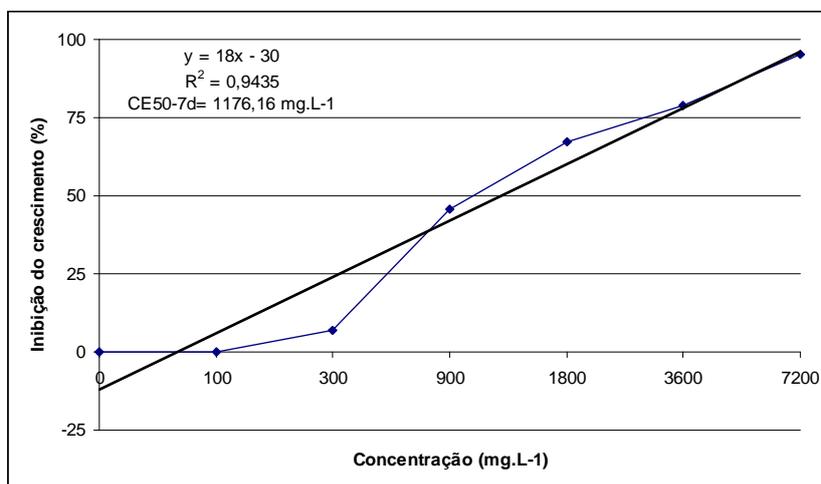


Figura 16. Representação gráfica da inibição do crescimento de *L. minor* em função das concentrações de TFB no teste de toxicidade aguda.

Com base nos valores de CE_{50-7d} estimados, o TFB pode ser classificado praticamente não-tóxico para esta espécie (ZUCKER, 1985). O inseticida organofosforado parathion, que é frequentemente encontrado em águas superficiais e sedimento dos corpos hídricos, também tem baixa toxicidade à macrófita *Myriophyllum aquaticum*. Segundo TURGUT e FOMIN (2002), a CE_{50} de parathion para esta espécie variou de 6,71 a 16,3 $mg.L^{-1}$ entre os diferentes parâmetros avaliados. O inseticida carbaryl foi classificado como de baixa toxicidade quando se avaliou o conteúdo total de clorofila nas frondes. As CE_{50-96h} de carbaryl estimadas foram 996 $mg.L^{-1}$ para *Ipomoea aquatica*, 785 $mg.L^{-1}$ para *Pistia stratiotes* e 334 $mg.L^{-1}$ para *Hydrocharis dubia* (BOONYAWANICH et al., 2001).

Enquanto a biomassa fitoplânctonica tende a aumentar devido à diminuição dos organismos forrageadores após a contaminação dos corpos de água por inseticidas, as macrófitas tendem a reduzir seus crescimentos. BOONYAWANICH et al. (2001)

observaram que, com o aumento da concentração do inseticida carbaryl, houve diminuição do crescimento, diminuição do peso fresco e aumento no índice de lesão foliar (clorose e necrose) das macrófitas *Ipomoea aquatica*, *Pistia stratiotes* e *Hydrocharis dubia*. O efeito na diminuição do crescimento também foi observado no presente trabalho. Na Figura 17 pode-se observar que a diminuição do crescimento das plantas ocorreu com o aumento da concentração do TFB.

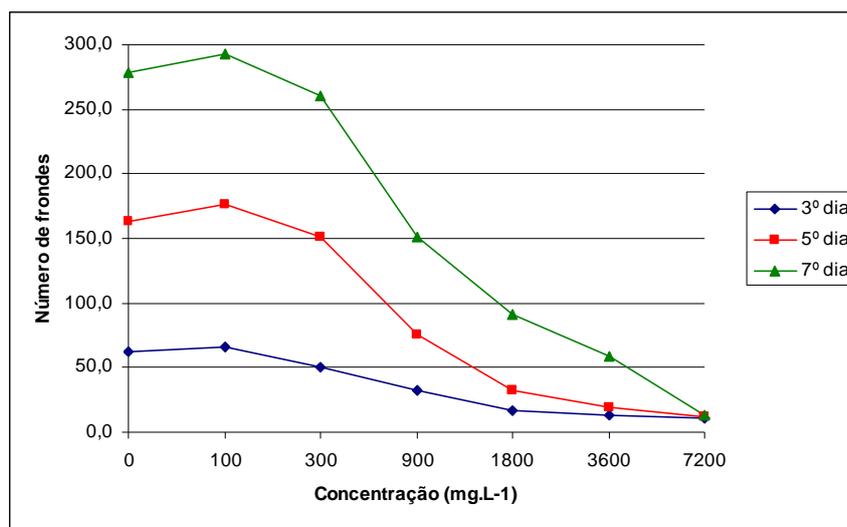


Figura 17. Inibição do crescimento do número de frondes em função da concentração nos testes de toxicidade aguda.

O aumento no número de frondes foi grande nas plantas não tratadas (controle). A taxa de crescimento (k) dos grupos controles nos 7 dias de exposição foi de 0,45. Na maior concentração de cada teste foi observada redução de mais de 86% no crescimento, em relação aos grupos controles sendo a taxa de crescimento de 0,06 na concentração 7200 mg.L⁻¹ de TFB. Isso indica que o aumento das concentrações TFB inibe o crescimento desta espécie de macrófita. Na tabela 1 verifica-se redução na taxa de crescimento com o aumento da concentração do TFB. Pode-se observar que, quanto menor a concentração maior é a taxa de crescimento.

Tabela 1. Taxa de crescimento (k) em função do aumento da concentração e do tempo de exposição ao teflubenzuron.

Concentração (mg.L ⁻¹)	3º dia	5º dia	7º dia
0	0,48 ± 0,03	0,49 ± 0,05	0,45 ± 0,02
100	0,50 ± 0,06	0,51 ± 0,06	0,46 ± 0,01
300	0,42 ± 0,06	0,47 ± 0,08	0,43 ± 0,03
900	0,30 ± 0,10	0,32 ± 0,08	0,34 ± 0,01
1800	0,18 ± 0,04	0,18 ± 0,06	0,26 ± 0,04
3600	0,15 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,20 ± 0,03
7200	0,13 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,06 ± 0,00

D.P. = Desvio padrão da média

Os sintomas de intoxicação do TFB foram evidenciados nas frondes das macrófitas tratadas. Foi possível observar que, quanto maior a concentração do TFB maior a clorose das frondes, que se iniciou na margem da folha e se estendeu para o centro da lâmina foliar (Figura 18). Nas maiores concentrações foi possível observar frondes 100% cloróticas. O mesmo efeito foi observado por BOONYAWANICH et al. (2001) em testes com as macrófitas *I. aquatica*, *P. stratiotes* e *H. dubia* expostas ao inseticida carbaryl.

AMAYA-CHÁVEZ et al. (2006) verificaram que a macrófita emergente *Typha latifolia* apresentou tolerância ao inseticida metil paration, cuja CE₅₀ estimada foi maior que 200 mg.L⁻¹. Após 10 dias de exposição, não foi observada diferença na clorofila total ou na razão clorofila a/b nas diferentes concentrações testadas, ou seja, não houve perda da clorofila em decorrência da exposição ao inseticida. Esse efeito pode ser devido à alta biomassa e as raízes fibrosas desta macrófita (MARTÍNEZ, 1979 apud AMAYA-CHÁVEZ et al., 2006).

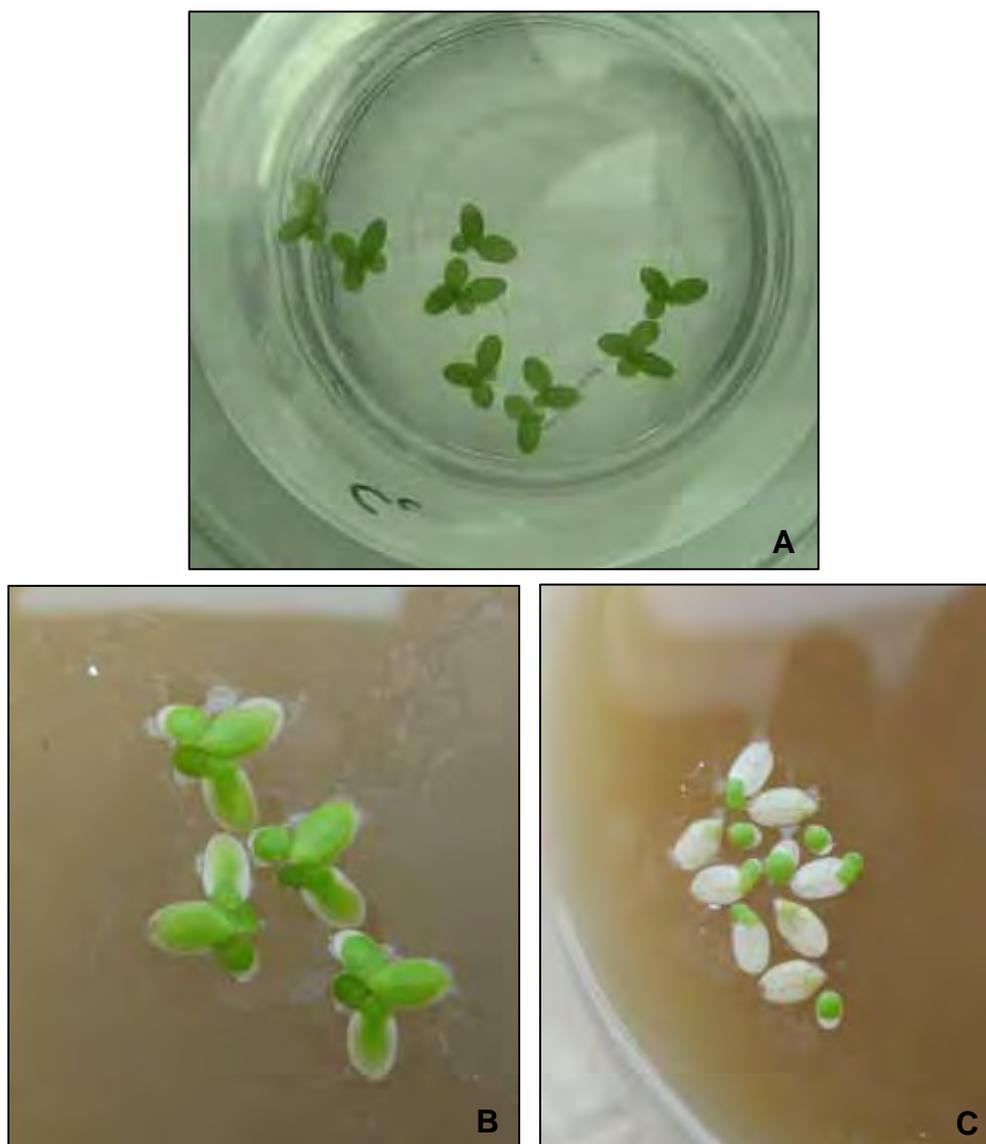


Figura 18. Frondes de *L. minor* normais (A) do grupo controle, e cloróticas (B e C) em resultado à exposição ao teflubenzuron.

4.3. Toxicidade aguda para *Poecilia reticulata*

Os registros das variáveis de qualidade da água nos testes de toxicidade aguda com *Poecilia reticulata* estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão dos registros as variáveis de qualidade da água nos testes de toxicidade aguda para peixe.

Concentração (mg.L ⁻¹)	pH	Condutividade (μS/cm)	O. D. (mg.L ⁻¹)	Temperatura (°C)
Controle	8,31 ± 0,07	184,00 ± 2,90	7,75 ± 0,25	25,35 ± 0,42
500	8,08 ± 0,11	239,11 ± 4,07	6,91 ± 0,41	25,41 ± 0,41
2000	8,13 ± 0,10	385,88 ± 5,64	6,83 ± 0,55	25,34 ± 0,36
3500	8,11 ± 0,13	555,55 ± 6,26	6,10 ± 0,91	25,35 ± 0,41
5000	8,07 ± 0,10	722,75 ± 7,61	5,72 ± 1,21	25,37 ± 0,34
6500	8,09 ± 0,10	879,75 ± 15,47	5,91 ± 1,37	25,33 ± 0,38

Verifica-se que a temperatura e o pH mantiveram-se constantes ao longo dos experimentos, enquanto que a condutividade aumentou com o aumento da concentração do TFB. Por outro lado, o oxigênio dissolvido na água diminuiu com o aumento da concentração do TFB, mas devido à aeração constante, manteve-se acima do nível mínimo recomendado pela norma adotada (4 mg.L⁻¹).

Na Figura 19 estão representados os resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda do TFB para *P. reticulata*. A CL_{50-96h} estimada foi de 2707,87 mg.L⁻¹ e a equação linear ajustada foi $y = 21,841x - 24,604$ e $R^2 = 0,8939$.

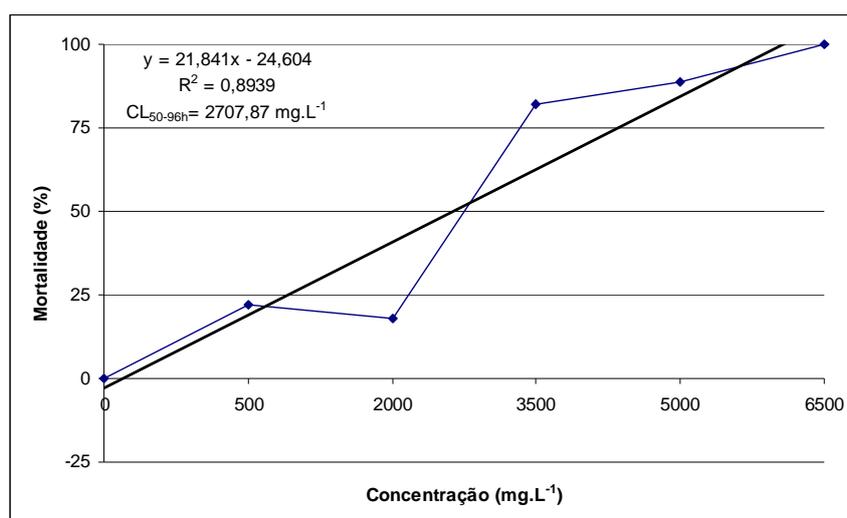


Figura 19. Representação gráfica da mortalidade de *Poecilia reticulata* em função do aumento das concentrações de TFB no teste de toxicidade aguda.

De acordo com as classes de toxicidade citadas por ZUCKER (1985), o TFB é classificado como praticamente não-tóxico para *P. reticulata*. FISCHER e HALL (1992) verificaram que o inseticida inibidor de quitina diflubenzuron apresenta baixa toxicidade para peixes. Em pH 7,4 e temperatura 10 °C, a CL_{50-96h} estimada para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) com peso corpóreo médio de 1,5 g foi de 240 mg.L⁻¹. Para o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) de 2,0 g, à 22 °C e pH 7,4, estimaram CL_{50-96h} maior que 100 mg.L⁻¹ e para *Pimephales promelas* de 0,9 g, a 20 °C e pH 7,4, CL_{50-96h} de 430 mg.L⁻¹. Em concentrações menores que 36 µg.L⁻¹ de DFB não foi observado nenhum efeito agudo em *P. reticulata*.

Outros inseticidas utilizados no tratamento de parasitos apresentam maior toxicidade para peixes quando comparados com o TFB. Segundo YILMAZ et al. (2004), α -cypermethrin é o isômero ativo do inseticida cypermethrin, que é usado para o controle de infestações de piolho em peixes cultivados. Este inseticida é praticamente não-tóxico para aves, mas altamente tóxico para peixes e invertebrados aquáticos. A CL_{50-96h} estimada foi 9,43 µg.L⁻¹ para *P. reticulata*, que caracteriza a alta toxicidade para esta espécie (YILMAZ et al., 2004).

O trichlorfon, um dos inseticidas mais utilizados contra parasitos de peixe na aquicultura, atua de forma a inibir a acetilcolinesterase e interferir na transmissão do impulso nervoso. Este efeito pode afetar não só o parasito, mas também o hospedeiro. GUIMARÃES et al (2007) expuseram indivíduos de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) a uma única aplicação de trichlorfon na dose recomendada para tratamento de parasitos (0,25 mg.L⁻¹). Estes autores verificaram decréscimo na atividade muscular e, após 4, 8 e 24 horas da aplicação, alterações histopatológicas nas brânquias dos peixes. O TFB, por sua vez, não exerce efeito agudo direto no peixe hospedeiro, pois atua especificamente na formação da carapaça do parasito.

MONTEIRO et al. (2006) expuseram matrinxã (*Brycon cephalus*) à concentração de 2 mg.L⁻¹ de methyl parathion por 96 horas e observaram redução significativa na glutathiona reduzida (GSH), além de aumento de catalase (CAT), glutathiona-S-transferase

(GST) e superóxido dismutase (SOD) em fígado, músculo e brânquias dos peixes. Os peixes apresentaram movimentos letárgicos com carência parcial de reflexos. Também foram observados indícios de lesão degenerativa e necrose nos animais.

Ivermectin é um medicamento de uso veterinário utilizado na ração para o controle de infecções por ectoparasitos crustáceos, como *Lernathropus kroyeri* e *Ceratothoa oestroides*, na Europa. Em testes com 96 horas de duração, MLADINEO et al. (2006) observaram moderada toxicidade para dourada (*Sparus aurata*), mas na concentração $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$ ocorreu 100% de mortalidade dos indivíduos.

4.4. Avaliação do risco de intoxicação ambiental

A classificação do TFB quanto ao risco de intoxicação ambiental do inseticida com base na toxicidade aguda para *D. magna*, nas duas profundidades do espelho d'água, considerando-se a maior dose da recomendação para uso agrícola encontra-se na Tabela 3. O TFB foi classificado como de alto risco de intoxicação ambiental em corpos d'água com profundidade de 0,30 m em todas as proporções simuladas para a maior dose de recomendação agrícola. Na profundidade de 2,0 m, o inseticida também é classificado como de alto risco nas concentrações testadas entre 100 e 12,5% da maior dose da recomendação agrícola. Ainda nesta profundidade o risco do TFB é moderado para concentrações testadas entre 6,25% e 1,56% da maior dose da recomendação (37,5 g/ha). Portanto, estas contaminações proporcionam risco de intoxicações suficientes para provocar mortalidade ao povoamento de daphnias em corpos de água de até 2 m de profundidade e, possivelmente, de outros organismos que possuam carapaça quitinosa.

O TFB também é classificado como de alto risco de intoxicação ambiental nas contaminações testadas entre 100% e 25% da dose do TFB utilizada na ração (2 g/kg), de risco moderado nas de 12,5 a 3,125% e de baixo risco em caso de contaminação com 1,56% da dose, na profundidade de 0,3 m (Tabela 4). Na profundidade de 2,0 m, o TFB se classifica como de risco moderado nas contaminações de 100% a 25% da dose

utilizada na ração, e de baixo risco nas contaminações de 12,5 %, 6,25%, 3,125 e 1,56%. Desta forma, o uso de TFB incorporado à ração em tanques de cultivo de peixes com 2,0 m de profundidade proporciona menor risco de intoxicação para organismos não-alvo quando comparado à aplicação direta do produto na água.

Tabela 3. Concentrações ambientais estimadas (CAE) em função da contaminação das águas com porcentagens decrescentes da maior dose recomendada do TFB para as culturas agrícolas (37,5 g de i.a./ha), quociente de risco (RQ) e classes de risco para *D. magna*.

Dose (%)	0,30 m			2 m		
	CAE (mg.L ⁻¹)	RQ	Risco	CAE (mg.L ⁻¹)	RQ	Risco
100	0,0125	48,0	Alto	0,00188	7,23	Alto
50	0,00625	24,0	Alto	0,00094	3,61	Alto
25	0,00313	12,0	Alto	0,00047	1,80	Alto
12,5	0,00156	6,0	Alto	0,00023	0,88	Alto
6,25	0,00078	3,0	Alto	0,00012	0,45	Moderado
3,125	0,00039	1,5	Alto	0,00006	0,23	Moderado
1,56	0,00020	0,75	Alto	0,00003	0,11	Moderado

Tabela 4. Concentrações ambientais estimadas (CAE) em função da contaminação das águas com porcentagens decrescentes da dose do TFB utilizada na ração para tratamento de parasitos (2 g de i.a./kg de ração), quociente de risco (RQ) e classes de risco para *D. magna*.

Dose (%)	0,30 m			2 m		
	CAE (mg.L ⁻¹)	RQ	Risco	CAE (mg.L ⁻¹)	RQ	Risco
100	6,6x10 ⁻⁴	2,5	Alto	1,0x10 ⁻⁴	0,38	Moderado
50	3,3x10 ⁻⁴	1,26	Alto	5,0x10 ⁻⁵	0,19	Moderado
25	1,6x10 ⁻⁴	0,63	Alto	2,5x10 ⁻⁵	0,09	Moderado
12,5	8,3x10 ⁻⁵	0,31	Moderado	1,2x10 ⁻⁵	0,04	Baixo
6,25	4,1x10 ⁻⁵	0,15	Moderado	6,2x10 ⁻⁶	0,02	Baixo
3,125	2,0x10 ⁻⁵	0,07	Moderado	3,1x10 ⁻⁶	0,01	Baixo
1,56	1,0x10 ⁻⁵	0,03	Baixo	1,5x10 ⁻⁶	0,006	Baixo

Quanto ao risco de intoxicação ambiental, considerando-se a planta aquática e o peixe, o TFB classifica-se como de baixo risco ($RQ < 0,05$), devido aos altos valores de CE_{50} e CL_{50} estimados (Tabela 5), que expressam a baixa toxicidade aguda do inseticida para estas duas espécies. Os valores de CL_{50} calculados são muito superiores aos das CAEs do TFB consideradas, mesmo em contaminações das águas com 100% da maior dose de uso agrícola e da dose utilizada na ração para tratamento de parasito. Nas Tabelas 6 e 7 estão apresentados os valores de RQ e a possibilidade de risco para *L. minor*, e nas Tabelas 8 e 9, para *P. reticulata*.

Tabela 5. Valores de CE_{50} e CL_{50} do teflubenzuron para *D. magna*, *L. minor* e *P. reticulata*.

CE ₅₀ ou CL ₅₀ (mg.L ⁻¹) (n=3) ± Desvio Padrão		
<i>D. magna</i>	<i>L. minor</i>	<i>P. reticulata</i>
0,00026 ± 0,00005	1.176,16 ± 179,52	2.707,87 ± 230,77

Tabela 6. Concentrações ambientais estimadas (CAE) em função da contaminação das águas com porcentagens decrescentes da maior dose recomendada do TFB para as culturas agrícolas (37,5 g de i.a./ha), quociente de risco (RQ) e classes de risco para *L. minor*.

Dose (%)	0,30 m			2 m		
	CAE (mg.L ⁻¹)	RQ	Risco	CAE (mg.L ⁻¹)	RQ	Risco
100	0,01250	1,0x10 ⁻⁵	Baixo	0,00188	1,5x10 ⁻⁶	Baixo
50	0,00625	5,3 x10 ⁻⁶	Baixo	0,00094	7,9x10 ⁻⁷	Baixo
25	0,00313	2,6x10 ⁻⁶	Baixo	0,00047	4,0x10 ⁻⁷	Baixo
12,5	0,00156	1,3x10 ⁻⁶	Baixo	0,00023	2,0x10 ⁻⁷	Baixo
6,25	0,00078	6,6x10 ⁻⁷	Baixo	0,00012	1,0x10 ⁻⁷	Baixo
3,125	0,00039	3,3x10 ⁻⁷	Baixo	0,00006	5,0x10 ⁻⁸	Baixo
1,56	0,00020	1,6x10 ⁻⁷	Baixo	0,00003	2,5x10 ⁻⁸	Baixo

Tabela 7. Concentrações ambientais estimadas (CAE) em função da contaminação das águas com porcentagens decrescentes da dose do TFB utilizada na ração para tratamento de parasitos (2 g de i.a./kg de ração), quociente de risco (RQ) e classes de risco para *L. minor*.

Dose (%)	0,30 m			2 m		
	CAE (mg.L ⁻¹)	RQ	Risco	CAE (mg.L ⁻¹)	RQ	Risco
100	6,6x10 ⁻⁴	5,6x10 ⁻⁷	Baixo	1,0x10 ⁻⁴	8,5x10 ⁻⁸	Baixo
50	3,3x10 ⁻⁴	2,8x10 ⁻⁷	Baixo	5,0x10 ⁻⁵	4,3x10 ⁻⁸	Baixo
25	1,6x10 ⁻⁴	1,4x10 ⁻⁷	Baixo	2,5x10 ⁻⁵	2,1x10 ⁻⁸	Baixo
12,5	8,3x10 ⁻⁵	7,0x10 ⁻⁸	Baixo	1,2x10 ⁻⁵	1,1x10 ⁻⁸	Baixo
6,25	4,1x10 ⁻⁵	3,5x10 ⁻⁸	Baixo	6,2x10 ⁻⁶	5,5x10 ⁻⁹	Baixo
3,125	2,0x10 ⁻⁵	1,8x10 ⁻⁸	Baixo	3,1x10 ⁻⁶	2,7x10 ⁻⁹	Baixo
1,56	1,0x10 ⁻⁵	9,0x10 ⁻⁹	Baixo	1,5x10 ⁻⁶	1,3x10 ⁻⁹	Baixo

Tabela 8. Concentrações ambientais estimadas (CAE) em função da contaminação das águas com porcentagens decrescentes da maior dose recomendada do TFB para as culturas agrícolas (37,5 g de i.a./ha), quociente de risco (RQ) e classes de risco para *P. reticulata*.

Dose (%)	0,30 m			2 m		
	CAE (mg.L ⁻¹)	RQ	Risco	CAE (mg.L ⁻¹)	RQ	Risco
100	0,0125	4,6x10 ⁻⁶	Baixo	0,00188	6,9x10 ⁻⁷	Baixo
50	0,00625	2,3x10 ⁻⁶	Baixo	0,00094	3,4x10 ⁻⁷	Baixo
25	0,00313	1,1x10 ⁻⁶	Baixo	0,00047	1,7x10 ⁻⁷	Baixo
12,5	0,00156	5,7x10 ⁻⁷	Baixo	0,00023	8,7x10 ⁻⁸	Baixo
6,25	0,00078	2,8x10 ⁻⁷	Baixo	0,00012	4,3x10 ⁻⁸	Baixo
3,125	0,00039	1,4x10 ⁻⁷	Baixo	0,00006	2,2x10 ⁻⁸	Baixo
1,56	0,00020	7,2x10 ⁻⁸	Baixo	0,00003	1,1x10 ⁻⁸	Baixo

Tabela 9. Concentrações ambientais estimadas (CAE) em função da contaminação das águas com porcentagens decrescentes da dose do TFB utilizada na ração para tratamento de parasitos (2 g de i.a./kg de ração), quociente de risco (RQ) e classes de risco para *P. reticulata*.

Dose (%)	0,30 m			2 m		
	CAE (mg.L ⁻¹)	RQ	Risco	CAE (mg.L ⁻¹)	RQ	Risco
100	6,6x10 ⁻⁴	2,4x10 ⁻⁷	Baixo	1,0x10 ⁻⁴	3,7x10 ⁻⁸	Baixo
50	3,3x10 ⁻⁴	1,2x10 ⁻⁷	Baixo	5,0x10 ⁻⁵	1,8x10 ⁻⁸	Baixo
25	1,6x10 ⁻⁴	6,1x10 ⁻⁸	Baixo	2,5x10 ⁻⁵	9,0x10 ⁻⁹	Baixo
12,5	8,3x10 ⁻⁵	3,0x10 ⁻⁸	Baixo	1,2x10 ⁻⁵	4,5x10 ⁻⁹	Baixo
6,25	4,1x10 ⁻⁵	1,5x10 ⁻⁸	Baixo	6,2x10 ⁻⁶	2,2x10 ⁻⁹	Baixo
3,125	2,0x10 ⁻⁵	7,5x10 ⁻⁹	Baixo	3,1x10 ⁻⁶	1,1x10 ⁻⁹	Baixo
1,56	1,0x10 ⁻⁵	3,7x10 ⁻⁹	Baixo	1,5x10 ⁻⁶	5,6x10 ⁻¹⁰	Baixo

5. CONCLUSÕES

Nas condições do presente trabalho e nos cenários estipulados, os resultados permitem concluir que:

1. O teflubenzuron é altamente tóxico para *Daphnia magna* e baixa toxicidade aguda para *Lemna minor* e *Poecilia reticulata*;
2. A contaminação de um corpo d'água com concentrações decrescentes das aplicações de teflubenzuron em culturas agrícolas, a partir de 100% da dosagem, pode proporcionar alto risco de intoxicação ambiental para *Daphnia magna* e baixo para *Lemna minor* e *Poecilia reticulata*.
3. A contaminação de um corpo d'água com concentrações decrescentes da dosagem de teflubenzuron incorporado à ração dos peixes pode proporcionar risco moderado de intoxicação devido à contaminação ambiental para *Daphnia magna*, e baixo risco para *Lemna minor* e *Poecilia reticulata*;
4. O uso do teflubenzuron incorporado à ração proporciona maior segurança ambiental quando comparado à aplicação direta na água;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, N.; GONÇALVES, F. The dynamics of *Ceriodaphnia pulchella* (Cladocera) in laboratory. **Acta Oecologica**. V. 24, p. S245–S249, 2003.

AGUIAR, L.H.; MORAES, G. Hepatic alanine and aspartic amino transferases of the freshwater teleost. *Brycon cephalus* (Matrinchã) exposed to the organophosphorous methyl parathion (folidol 600 registred). **Fish response-to-toxic environments**. Kennedy, Canada. p. 145 – 152, 1999.

AMAYA-CHÁVEZ, A.; MARTÍNEZ-TABCHE, L.; LÓPEZ-LÓPEZ, E.; GALAR-MARTÍNEZ, M. Methyl parathion toxicity to and removal efficiency by *Typha latifolia* in water and artificial sediments. **Chemosphere**. V. 63, p. 1124–1129, 2006.

ANDRÉA, M.M.; PETTINELLI JR., A. Efeito de aplicações de pesticidas sobre a biomassa e a respiração de microrganismos de solos. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.67, n.2, p.223-228, 2000.

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

APHA. Toxicity tests methods for aquatic organisms. In: **Standart methods for the examination of water and waste water**. 17.ed. Washington, 1991. p. 689-819.

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

BOOCK, M.V.; MACHADO NETO; J.G. Estudos toxicológicos do oxicloreto de cobre para tilápia vermelha (*Oreochromis SP.*) **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.67, n.2, p.215-221, 2000.

BOONYAWANICH, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E.S.; SOONTORNCHAINAKSAENG, P.; POKETHITIYOOK, P.; SINGHAKAEW, S. The effect of carbamate insecticide on the growth of three aquatic plant species: *Ipomoea aquatica*, *Pistia stratiotes* and *Hydrocharis dubia*. **ScienceAsia**. v. 27, p. 99-104, 2001.

BOYD, C.E., TUCKER, C.S. **Pond aquaculture water quality management**. Kluwer, Norwell, MA. 1998.

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

BURNS, L.A. **Probabilistic aquatic exposure assessment for pesticides. I: Foundations**. EPA/600/R-01/071. 2001. 43p.

CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. Jaboticabal: FUNEP. 1992. 189p.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos, volume I, São Paulo, 1999, p. 1-61.

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.: ESPÍNDOLA, E.L.G.; BOTTA-PASCHOAL, C.M.R.; ROCHA, O.; BOHER, M.B.C.; OLIVEIRA-NETO, A.L. de (Ed.) **Ecotoxicologia: Perspectivas para o século XXI**. São Carlos: RiMa, 2000. p. 557-566.

CHRISTENSEN B.T., LAURIDSEN, T.L., RAVN, H.W., BAYLEY M. A comparison of feeding efficiency and swimming ability of *Daphnia magna* exposed to cypermethrin. **Aquatic Toxicology**. v. 73, p. 210–220, 2005.

DE SILVA, P.M.C.S.; SAMAYAWARDHENA, L.A. Effects of chlorpyrifos on reproductive performances of guppy (*Poecilia reticulata*). **Chemosphere**. v.58, p. 1293–1299, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.
Teflubenzuron Evaluation. 1996. Disponível em:
http://www.fao.org/ag/aqp/agpp/Pesticid/JMPR/Download/96_eva/tefluben.pdf Acessado em 11/03/2008.

FERRANDO, M.D.; SANCHO, E.; ANDREU-MOLINER, E. Chronic Toxicity of Fenitrothion to an Algae (*Nannochloris oculata*), a Rotifer (*Brachionus calyciflorus*), and the Cladoceran (*Daphnia magna*). **Ecotoxicology And Environmental Safety**. v. 35. p. 112–120, 1996.

FERREIRA, C. J. A. **Plantas aquáticas como bioindicadores da contaminação ambiental por agrotóxicos**. Revista Brasileira de Toxicologia. vol. 8, 1995.

FISCHER, 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.

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

GHERARDI-GOLDSTEIN, E. Testes de toxicidade de efluentes industriais. **Ambiente: Revista CETESB de Tecnologia**. v. 2, n. 1, p. 033-038, 1988.

GOKTEPE, I.; PORTIER, R.; AHMEDNA, M. Ecological risk assessment of Neem-based pesticides. **J. Environ. Sci. 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 Phycological Methods**. Culture Methods and Growth Measurements. STEIM, J.R. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, p.345-358. 1979.

GUIMARÃES, A.T.B.; SILVA DE ASSIS, H.C.; BOEGER, W. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 68, p. 57–62, 2007.

HAMILTON, M. A., RUSSO, R. C., TUSRTUN, R. V. Trimed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol.** v. 11, p. 714-719, 1977.

HANAZATO T. Response of a zooplankton community to insecticide application in experimental ponds: a review and the implications of the effects of chemicals on the structure and functioning of freshwater communities. **Environ Pollut.** v. 101, p. 361–373, 1998.

HAYA, K.; BURRIDGE, L.E.; CHANG, B.D. Environmental impact of chemical wastes produced by the salmon aquaculture industry. **Journal of Marine Science**. v. 58, p. 492-496, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Avaliação da toxicidade aguda para peixes**: parte D. 3: manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos. Brasília, DF, 1987.

KASHIAN, D.R.; DODSON, S.I. Effects of common-use pesticides on developmental and reproductive processes in *Daphnia*. **Toxicology and Industrial Health**. v. 18, p. 225 – 235, 2002.

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

LAHR, J., BADJI, A., MARQUENIE, S., SCHUILING, E., NDOUR, K.B., DIALLO, A.O., EVERTS, J.W. Acute toxicity of locust insecticides to two indigenous invertebrates from Sahelian temporary ponds. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 48, p. 66-75, 2001.

LEWIS, M.A. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. **Environmental Pollution**. v.87, n. 3, p. 19-336, 1995.

LI, T.Y.; XIONG, Z.T. Cadmium-induced colony disintegration of duckweed (*Lemna pucicostata* Hegelm.) and as biomarker of phytotoxicity. **Ecotoxicol. Environ. Saf**, San Diego, v. 59, n. 2, p.174-179. 2004.

LOMBARDI, J.V. Fundamentos de toxicologia aquática. In: Ranzani-Paiva, M.J.T.; Takemoto, R.M.; Lizama, M. de los A.P. **Saúde de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela Ed., 2004. cap. 11, p. 263-272.

LÓPEZ-MANCISIDOR, P.; CARBONELL, G.; MARINA, A.; FERNÁNDEZ, C.; TARAZONA, J.V. Zooplankton community responses to chlorpyrifos in mesocosms under Mediterranean conditions. **Ecotoxicol. Environm. Safety**. 2007.
doi:10.1016/j.ecoenv.2007.06.006. Article In Press.

LUQUE, J.L. Biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. **Rev. Bras. Parasitol.Vet.**, v.13, suplemento 1, 2004.

MARTÍNEZ, M., **Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas**. Fondo de Cultura Económica, México, DF. 1979.

MARTINS, J.; SOARES, M.L.; SAKER, M.L.; OLIVA TELES, L.; VASCONCELOS, M. Phototactic behavior in *Daphnia magna* Straus as an indicator of toxicants in the aquatic environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 67, p. 417–422. 2007.

MARTINS, M.L. **Doenças infecciosas e parasitárias de peixes**. Jaboticabal: FUNEP, 1997. 58 p.

MÉNDEZ, N. Effects of teflubenzuron on larvae and juveniles of the polychaete *capitella* sp. B from Barcelona, Spain. **Water, Air, and Soil Pollution**. v. 160, p. 259–269, 2005.

MÉNDEZ, N. Effects of teflubenzuron on sediment processing by members of the *Capitella* species-complex. **Environmental Pollution**. v. 139, p. 118 – 124, 2006.

MENONE, M.L.; PESCE, S.F.; DÍAZ, M.P.; MORENO, V.J.; WUNDERLIN, D.A. Endosulfan induces oxidative stress and changes on detoxication enzymes in the aquatic macrophyte *Myriophyllum quitense*. **Phytochemistry**. 2008, doi:10.1016/j.phytochem.2007.11.016. Article In press.

MICHELS, E., SEMSARI, S., BIN, C., DE MEESTER, L., Effect of sublethal doses of cadmium on the phototactic behavior of *Daphnia magna*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 47, p. 261–265, 2000.

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.

MLADINEO, I.; MARSIC-LUCIC, J.; BUZANCIC, M. Toxicity and gross pathology of ivermectin bath treatment in sea bream *Sparus aurata*, L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 63, p. 438–442, 2006.

MOHAN, B.S.; HOSETTI, B.B. Aquatic plants for toxicity assessment. Review. **Environmental Research** Section A. v. 81, p. 259-274, 1999.

MONTEIRO, D.A.; ALMEIDA, J.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C. v. 143, p. 141–149, 2006.

MOORE, M.T.; LIZOTTE JR., R.E.; KNIGHT, S.S.; SMITH JR., S.; COOPER, C.M. Assessment of pesticide contamination in three Mississippi Delta oxbow lakes using *Hyalella azteca*. **Chemosphere**. v.67, p. 2184–2191, 2007.

ODA, S.; TATARAZAKO, N.; DORGERLOH, M.; JOHNSON, R.D.; KUSK, K.O.; LEVERETT, D.; MARCHINI, S.; NAKARI, T.; WILLIAMS, T.; IGUCHI T. Strain difference in sensitivity to 3,4-dichloroaniline and insect growth regulator, fenoxycarb, in *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 67, p. 399–405, 2007.

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

OLETTE, R.; COUDERCHET, M.; BIAGIANTI, S.; EULLAFFROY, P. Toxicity and removal of pesticides by selected aquatic plants. **Chemosphere**. v. 70, p. 1414–1421, 2008.

OLIVEIRA, S.S. **O papel da avaliação de riscos no gerenciamento de produtos agrotóxicos: diretrizes para a formulação de políticas públicas**. 2005. 236f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, SP, 2005.

PAUL, R.J.; LAMKEMEYER, T.; MAURER, J.; PINKHAUS, O.; PIROW, R.; SEIDL, M.; ZEIS, B. Thermal acclimation in the microcrustacean *Daphnia*: a survey of behavioural, physiological and biochemical mechanisms. **Journal of Thermal Biology**. v. 29, p. 655–662, 2004.

PEREIRA, J.L.; GONÇALVES, F. Effects of food availability on the acute and chronic toxicity of the insecticide methomyl to *Daphnia* spp. **Sci Total Environ**. 2007, doi:10.1016/j.scitotenv.2007.07.040. Article In press.

PIMENTEL, D.; EDWARDS C.A. Pesticides and Ecosystems. **BioScience**. Vol. 32. N.7. 1982.

PITELLI, R.A. **Macrófitas aquáticas no Brasil na condição de problemáticas**. In: BRASIL (MMA/IBAMA), Workshop sobre controle de plantas aquáticas. Anais, p.12-15, 1998.

RAMSTAD, A.; COLQUHOUN, D.J.; NORDMO, R.; SUTHERLAND, I.H.; SIMMONS, R. Field trials in Norway with SLICE® (0,2% emamectin benzoate) for the oral treatment of sea lice infestation in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. **Diseases of aquatic organisms**. v. 50, p. 29-33, 2002.

RAND, G.M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**: Effects, environmental fate and risk assessment. Second Edition. Taylor & Francis, Washington, DC. 1995. 1125p.

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

RETNAKARAN, A.; GRANETT, J.; ENNIS, T. Insect growth regulators. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**. New York : Pergamon, 1985. Cap.12, p.529-601.

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

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.

SCOTTISH ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Policy nº 29. Calicide (teflubenzuron) – Authorisation for use as an in-feed sea lice treatment in marine cage salmon farms. Risk assessment, EQS and recommendations. 1999.

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

SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A.F.; LUCHINI, L.C.; ANDRÉA, M.M. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29 p.-- (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 42).

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

TOMLIN, C.D.S. (Ed.) **The pesticide manual: a world compendium**. 11th ed. Croydon: British Crop Protection Council, 1997. 1606 p.

TRAYLER, K.M.; DAVIS, J.A. Sensitivity of *Daphnia carinata* Sensu Lato to the Insect Growth Regulator, Pyriproxyfen. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 33, p. 154–156, 1996.

TURGUT, C.; FOMIN, A. Sensitivity of the Rooted Macrophyte *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdcourt to Seventeen Pesticides Determined on the Basis of EC50. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 69, p. 601–608, 2002.

UNTERSTEINER, H.; KAHAPKA, J.; KAISER, H. Behavioural response of the cladoceran *Daphnia magna* Straus to sublethal Copper stress – validation by image analysis. **Aquatic Toxicology**. v. 65, p. 435–442, 2003.

UNITED STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Hazard evaluation. Standard Evaluation Procedure. EPA-540/9-001, 1986. 5p.

VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.R. (Ed.). **Aqüicultura no Brasil**: Bases para um desenvolvimento sustentável. Brasília: CNPq/Ministério da Ciência e tecnologia, 2000. 399 p.

VIRAN, R.; ERKOÇ, F.Ü.; POLAT, H.; KOÇAK, O. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 55, p. 82–85, 2003.

WANG, W., Literature review on duckweed toxicity testing. **Environ. Res.** v. 52, p. 7–22, 1990.

WENDT-RASCH, L., FRIBERG-JENSEN, U., WOIN, P., CHRISTOFFERSEN, K., Effects of the pyrethroid insecticide cypermethrin on a freshwater community studied under field conditions. II. Direct and indirect effects on the species composition. **Aquat. Toxicol.** v. 63, p. 373–389, 2003.

YILMAZ, M.; GÜL, A.; ERBAŞLI, K. Acute toxicity of alpha- cypermethrin to guppy (*Poecilia reticulata*, Pallas, 1859). **Chemosphere**. v. 56, p. 381–385, 2004.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática**: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2006. 478 p.

ZUCKER E. Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure - Acute Toxicity Test for Freshwater Fish. U.S.EPA Publication 540/9-85-006. 1985.