

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO  
PESTICIDA ALDICARBE A DUAS ESPÉCIES  
DE PEIXES DE ÁGUA DOCE,**

*Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822)

(Teleostei, Cyprinidae) E

*Orthospinus franciscensis* (Eigenmann, 1929)

(Teleostei, Characidae)

**FÁBIO DE CASTRO PATRÍCIO**

REGISTRO

MARCA

EMPRESA

INDICADO

CLASSIFICAÇÃO

DESCRIÇÃO

DESCRIÇÃO

DESCRIÇÃO

(1)

(2)

(3)

DATA DE DEVOLUÇÃO  
«CIRCULAÇÃO E EMPRÉ» registro

46057

13072 MFV.

**FÁBIO DE CASTRO PATRÍCIO**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO PESTICIDA ALDICARBE**

**A DUAS ESPÉCIES DE PEIXES DE ÁGUA DOCE**

*Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) (Teleostei, Cyprinidae) E

*Orthospinus franciscensis* (Eigenmann, 1929) (Teleostei, Characidae)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Entomologia, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Dr. Renê Luís de Oliveira Rigitano

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1998

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA

Patrício, Fábio de Castro

Avaliação da toxicidade do pesticida aldicarbe a duas espécies de peixes de água doce *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) (Teleostei, Cyprinidae) e *Orthospinus franciscensis* (Eigenmann, 1929) (Teleostei, Characidae) / Fábio de Castro Patrício. – Lavras : UFLA, 1998.

76 p. : il.

Orientador: Renê Luís de Oliveira Rigitano.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Inseticida. 2. Nematicida. 3. Peixe. 4. Toxicidade. 5. Aldicarbe. 6. *Brachydanio rerio*. 7. *Orthospinus franciscensis*. 8. Pesticida. 9. Ecotoxicologia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-632.951

-639.375

**FÁBIO DE CASTRO PATRÍCIO**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO PESTICIDA ALDICARBE  
A DUAS ESPÉCIES DE PEIXES DE ÁGUA DOCE**

*Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) (Teleostei, Cyprinidae) E

*Orthospinus franciscensis* (Eigenmann, 1929) (Teleostei, Characidae)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Entomologia, para obtenção do título de "Mestre".

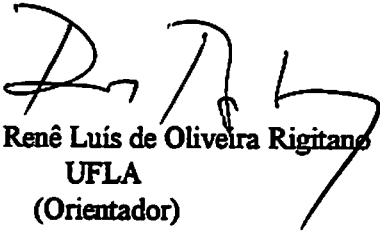
APROVADA em 17 de dezembro de 1998

Prof. Lea Rosa Mourgués-Schurter

UFLA

Prof. Geraldo Andrade de Carvalho

UFLA

  
Prof. Dr. Renê Luís de Oliveira Rigitano  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

**Dedico:**

**À Roberta, minha esposa, amiga e companheira.**

**Aos meus pais e à toda minha família.**

## **AGRADECIMENTOS**

**Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento da pesquisa.**

**Ao professor René L.O. Rigitano pelos ensinamentos e orientação.**

**Ao funcionário Anderson V. Gouvea, pelos trabalhos no laboratório de Toxicologia do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras.**

**A todos os Professores do Curso de Mestrado, colegas, amigos e funcionários do Departamento de Entomologia, por tomarem nosso convívio o mais agradável possível.**

**Aos amigos e parentes que muito auxiliaram nos trabalhos de campo.**

**À Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, pelo apoio fornecido no uso de sua infra-estrutura.**

**Aos colegas do CETEC, pela amizade e pelo auxílio incondicional.**

**Aos colegas Agostinho Clovis e Mônica Vaz da equipe de Ictiofauna do CETEC e a Giovanni Landa pela valorosa contribuição.**

**Aos Professores Geraldo Andrade e Lea M-Schurter, pela atenção dispensada e sugestões que melhoraram este trabalho.**

# SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	i
ABSTRACT .....	ii
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 O destino de inseticidas no ambiente.....	3
2.2 Problemas e efeitos causados pela utilização de inseticidas a ambientes aquáticos. ....	4
2.3 Estudos relativos à toxicidade de inseticidas sobre peixes .....	6
2.4 Testes de toxicidade .....	10
2.4.1 Tipos de testes.....	10
2.4.2 Tipos de peixes utilizados.....	12
2.5 Descrição das espécies utilizadas nos testes .....	13
2.5.1 A espécie <i>Orthospinus franciscensis</i> .....	13
2.5.2 A espécie <i>Brachydanio rerio</i> (Hamilton-Buchanan, 1822).....	14
2.6 O inseticida-nematicida aldicarbe.....	16
2.6.1 Características.....	16
2.6.2 Toxicologia do aldicarbe .....	17
2.6.3 Estudos relacionados com o destino e persistência do aldicarbe no ambiente. ....	19
3 - METODOLOGIA.....	22



3.1	A escolha das espécies a serem utilizadas nos testes .....	23
3.2	Obtenção e aclimação dos peixes.....	24
3.3	Manutenção de peixes em laboratório.....	25
3.4	Obtenção do aldicarbe.....	26
3.5	Execução dos testes.....	27
3.5.1	Preparo da água reconstituída.....	28
3.5.2	Determinação da CL <sub>50</sub> , 96 h do aldicarbe sobre <i>O. franciscensis</i> .....	29
3.5.2.1	Teste preliminar com o <i>O. franciscensis</i> .....	30
3.5.2.2	Teste definitivo com o <i>O. franciscensis</i> .....	30
3.5.3	Determinação da CL <sub>50</sub> , 96 h do inseticida aldicarbe sobre <i>B. rerio</i> .....	31
3.5.3.1	Teste preliminar com <i>B. rerio</i> .....	31
3.5.3.2	Teste definitivo com <i>B. rerio</i> .....	31
3.5.4	Teste com ovos de <i>B. rerio</i> .....	31
3.5.5	Testes com larvas de <i>B. rerio</i> .....	32
3.5.6	Determinação do fator de bioconcentração nos peixes.....	33
3.6	Quantificação do aldicarbe por cromatografia em fase gasosa.....	33
3.6.1	Análise da solução estoque.....	33
3.6.2	Análise de soluções aquosas .....	34
3.6.3	Análise dos peixes.....	35
3.6.4	Verificação da eficiência do método de análise utilizado.....	36
3.7	Análises físico-químicas das soluções.....	36
3.8	Análise estatística dos resultados.....	37

3.8.1 Princípio do método Litchfield-Wilcoxon .....	37
3. 8. 2 Procedimento geral do método Litchfield-Wilcoxon .....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
4.1 Aclimação e utilização de espécies nativas regionais .....	41
4. 2 Determinação da concentração do aldicarbe nas soluções teste .....	41
4. 3 Análises físico-químicas das soluções utilizadas nos testes .....	44
4. 4 Validação dos resultados de análise.....	45
4.5 Determinação da CL <sub>50</sub> , 96 h do aldicarbe para as espécies de peixes.....	45
4. 5. 1 - Determinação da CL <sub>50</sub> , 96 h do aldicarbe para <i>B. rerio</i> .....	45
4.5.2 - Determinação da CL <sub>50</sub> , 96 h do aldicarbe para <i>O. franciscensis</i> .....	48
4.5. 3 CL <sub>50</sub> , 96 h obtidos para as espécies na fase adulta .....	51
4.6 Experimento com ovos de <i>B. rerio</i> .....	52
4.7 Experimento com larvas de <i>B. rerio</i> .....	55
4.8 Discussão sobre os resultados dos testes com ovos e larvas de <i>B. rerio</i> .....	58
4.9 Determinação do fator de bioconcentração .....	59
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
5.1 Implicações das concentrações de aldicarbe sobre peixes no meio ambiente.....	61
5.2 Bioacumulação nas espécies testadas.....	62
6 CONCLUSÕES .....	63
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	64
ANEXOS .....	74

## RESUMO

**PATRÍCIO, Fábio de Castro. Avaliação da toxicidade do pesticida aldicarbe a duas espécies de peixes de água doce *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) (Teleostei, Cyprinidae) e *Orthospinus franciscensis* (Eigenmann, 1929) (Teleostei, Characidae). UFLA, 1998. 76p. (Dissertação de Mestrado em Entomologia)**

A detecção de resíduos do inseticida-nematicida aldicarbe em reservatórios de água e riachos, nas proximidades de campos agrícolas, onde é utilizado, motivou-nos a estudar os seus efeitos sobre organismos de água doce. Utilizou-se de biotestes em laboratório, avaliando-se o efeito agudo e o potencial de impacto do aldicarbe sobre peixes, como representantes da biota aquática. Selecionou-se, para a realização dos testes, a espécie *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) e a *Orthospinus franciscensis* (Eigenmann, 1929). A espécie *O. franciscensis* é de importância forrageira, servindo de alimento para outros peixes carnívoros. Os espécimes utilizados nos testes foram coletados num braço da represa de Três Marias, localizado no município de Felixlândia - MG, em local de pouca influência antrópica, sendo os peixes da espécie *B. rerio* (paulistinha), adquiridos de criadores, no comércio da cidade de Belo Horizonte. O *B. rerio* é uma espécie ornamental originária da Índia, sendo bastante utilizada em biotestes. Os testes com o inseticida aldicarbe, avaliando seus efeitos sobre diferentes estágios de vida (ovos, larvas e adultos) da espécie *B. rerio*, mostraram uma sensibilidade maior da fase adulta, seguindo-se do estágio de ovo e posteriormente da fase de larva. Os efeitos agudos, causados pela exposição ao inseticida nematicida aldicarbe, foram verificados pela determinação da  $CL_{50}$ , 96 h com intervalo de confiança ao nível de 95 %. Para o *B. rerio*, a  $CL_{50}$ , 96 h foi de 2,1ppm (1,80 ppm - 2,33 ppm) e para o *O. franciscensis*, a  $CL_{50}$ , 96 h foi de 0,95 ppm (0,84 ppm - 1,07 ppm). Após exposição dos peixes às diversas concentrações utilizadas nos testes, determinou-se a bioconcentração do inseticida em questão. Os resultados mostraram um fator de bioacumulação próximo de 1,0 (um), indicando que o aldicarbe não foi cumulativo para as espécies testadas durante o período de teste.

Orientador: Renê Luis de O. Rigitano- UFLA

## ABSTRACT

**PATRÍCIO, Fábio de Castro. EVALUATION OF THE TOXICITY OF THE PESTICIDE ALDICARB ON TWO SPECIES OF FRESH WATER FISH *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) (Teleostei, Cyprinidae) and *Orthospinus franciscensis* (Eigenmann, 1929) (Teleostei, Characidae). UFLA, 1998. 76p. (Dissertation - Master Program in Entomology)**

The detection of residues of the insecticide-nematicide aldicarb in water reservoirs and streams in the proximities of fields where it is used in Minas Gerais state motivated us to study the effects of this pesticide on fish species that inhabit the waters of the referred State. In this work, tests were carried out in laboratories to evaluate the effects and potential of the chemical impact on fish, as representatives of the aquatic biota. The species were selected for accomplishment of the tests. The species *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) and *Orthospinus franciscensis* (Eigenmann, 1929). The species *O. franciscensis* is of forage importance, serving as food for another fish. The specimens used in the tests were from Três Marias dam, located in the city of Felixlândia - MG. The *B. rerio* (paulistinha), were acquired in the trade market of the city of Belo Horizonte. *B. rerio* is an ornamental specie of India oragin, largely used in toxicity tests, using eggs, larvae or adults. The results showed that adults of *B. rerio* were more sensitive to the chemical, folowed by the egg and larval phases. With regard to acute effects,  $CL_{50}$  (96 h) values for aldicarb to *B. rerio* and *O. franciscensis* were, respectively, 2,1 ppm (1,80 ppm - 2,33 ppm) and 0,95 ppm (0,84 ppm - 1,07 ppm). After exposition of the fishes to the several concentrations used in the tests, the bioconcentration factor of the insecticide was shown to be close to one, indicating that the chemical was not cumulative during the test period.

Guidance: René Luis de O. Rigitano - UFLA

## 1 - INTRODUÇÃO

A agricultura moderna vem-se deparando com um grande desafio: conciliar o aumento da produtividade de biomassa com a demanda de energia e alimentos, decorrentes do crescimento das populações consumidoras.

Até o presente momento, uma resposta economicamente viável para se reduzirem perdas na produção, causadas por insetos-pragas, sobretudo em culturas extensivas, ainda tem sido o emprego de produtos químicos denominados usualmente agrotóxicos. Os agrotóxicos, também conhecidos como pesticidas, agem diretamente sobre as pragas reduzindo sua densidade populacional, temporariamente, viabilizando assim, o aumento da produção. Apesar de inúmeros esforços para obtenção de novas técnicas agrícolas que venham reduzir ou mesmo substituir o uso de agrotóxicos, ainda estamos longe da isenção de seu uso.

Existem atualmente inúmeras substâncias químicas empregadas na luta contra os insetos e outros organismos considerados pragas agrícolas, sendo os inseticidas um grupo numeroso e destacado. No entanto, as consequências de seu uso, não são unicamente positivas. Muitos dos compostos são altamente tóxicos ao homem e animais e, portanto, há um ônus adicional que, do ponto de vista ambiental, é representado pelo comprometimento de outros componentes do meio, significando uma diminuição do potencial de usos múltiplos dos recursos ambientais e reduzindo também as possibilidades de seu uso econômico.

Minas Gerais, assim como outros estados do país, pelo seu nível de desenvolvimento econômico, pelo seu parque agroindustrial e seus recursos naturais, é efetivamente um grande consumidor de agrotóxicos. Por esta razão

tomou-se urgente um posicionamento técnico-científico sobre os riscos ambientais agregados ao uso de agrotóxicos.

Paralelamente ao desenvolvimento industrial e agrícola no Estado, tem-se verificado um crescente aumento no aparecimento de resíduos tóxicos nos cursos d'água. A identificação de casos de contaminação e o desenvolvimento de alternativas de manejo adequadas no sentido de minimizar os problemas gerados pelo uso de agrotóxicos, especialmente no caso dos reservatórios de água utilizados para abastecimento doméstico, tornam-se necessários e urgentes.

A detecção de resíduos do inseticida-nematicida aldicarbe em reservatórios de água e riachos, nas proximidades de campos onde se cultiva batata no Estado de Minas Gerais (Rigitano,1995), motivou-nos propor o estudo dos efeitos do referido pesticida sobre organismos de água doce, levando-se em conta a escassez de dados referentes à atuação de pesticidas sobre espécies de peixes que habitam as águas do referido Estado.

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar os efeitos toxicológicos agudos e o potencial de impacto do aldicarbe sobre duas espécies de peixes de água doce.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O destino de inseticidas no ambiente

O destino dos inseticidas, após sua aplicação, já vem sendo bastante discutido há algum tempo. De maneira geral, diversos autores direcionaram seus estudos no sentido de compreender a movimentação, persistência e degradação de pesticidas no ambiente. Fellenberg (1980) comenta que em todo o mundo são aplicados 1,5 milhões de toneladas de pesticidas, anualmente, e que cerca de 50% dessa quantidade não atingem seu destino, perdendo-se no ambiente.

Independentemente do modo de aplicação, todo pesticida eventualmente alcança o solo, onde processos de natureza química e física determinarão se o produto permanecerá adsorvido nas camadas agricultáveis do solo ou se moverá até atingir camadas mais profundas.

A contaminação ambiental por inseticidas pode ser devido a aplicações diretamente no solo, propagação pelo vento, pelo despejo de restos de soluções, descarte inadequado da água de limpeza dos recipientes e utensílios utilizados nas aplicações, contaminação do solo por substâncias aplicadas nas plantas, etc.

Uma vez no ambiente, os inseticidas podem persistir por algum tempo até serem degradados através de reações químicas e também pela ação de microrganismos (biodegradação). De acordo com Felsot (1989), a biodegradação é o termo usualmente utilizado quando se refere ao metabolismo microbiológico de produtos químicos no solo ou na água. O tempo de degradação de um pesticida é medido em termos de “meia-vida”. Por definição, segundo Rao et al. (1983), tem-se que cada unidade de meia-vida mede a quantidade de tempo gasto para ser desativado um pesticida no solo, na metade de sua quantidade inicial. Ou,

também, como sendo o tempo requerido para que a metade da quantidade aplicada de um pesticida seja degradada e desprendida como dióxido de carbono.

No solo, o inseticida e seus produtos de degradação ficam sujeitos à ação de substâncias que podem ou não interagir, facilitando ou dificultando a sua movimentação. Devido a propriedades físico-químicas dos solos, o transporte dos pesticidas no mesmo ocorre principalmente por fluxo de massa, juntamente com a água. Souza (1996) relacionou duas formas básicas pelas quais os pesticidas podem ser transportados: a) sobre a superfície do solo, quando os pesticidas são arrastados juntamente com a água que não consegue infiltrar no solo (enxurrada), caracterizando o escoamento superficial; b) através do perfil do solo, quando os pesticidas podem ser transportados juntamente com a água que infiltra, caracterizando a lixiviação.

Dessa forma, os pesticidas podem atingir diretamente os mananciais hídricos ou o lençol freático e conseqüentemente poços, minas e demais corpos d'água, (Rao et al 1983). Isto implica no comprometimento da utilização de recursos múltiplos dos corpos e reservatórios de água.

Cox (1992) e Corrêa (1996) citaram que num relatório da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S. Environmental Protection Agency), foi informado que pelo menos 46 pesticidas têm sido detectados nas análises de água subterrânea nos 26 Estados daquele país como resultado de práticas agrícolas.

## **2.2 Problemas e efeitos causados pela utilização de inseticidas a ambientes aquáticos.**

Os problemas causados por pesticidas à biota aquática, são motivos de preocupação já há algum tempo. Edwards (1973) comentou que a concentração



de substâncias tóxicas processa-se nas biocenoses aquáticas ao longo das cadeias alimentares, transferindo-se da matéria orgânica para os organismos planctônicos, em seguida para os peixes, e posteriormente para as aves que se alimentam de organismos aquáticos. Tal afirmação pôde ser esclarecida através do caso clássico do “Clear Lake”, na Califórnia, de bastante repercussão na época. Nesse lago, após aplicação do inseticida organoclorado DDT para destruir larvas de mosquito, a água apresentou uma concentração de 1 parte por 70 milhões. O produto concentrou-se, passando do meio líquido (1/70 milhões) para os organismos planctônicos (5/1 milhão) em seguida para os peixes de planctófagos, para os peixes carnívoros, atingindo finalmente as aves consumidoras de peixe (mergulhões) em concentrações que variam de 40 a 2500 partes por 1 milhão, o que provocou uma mortalidade extremamente elevada em sua população. A análise da carne dos peixes revelou concentrações elevadas de DDT e seus produtos de degradação, que podem assim ser considerados como responsáveis pela morte das aves.

Tais fenômenos dependem da persistência do pesticida no ambiente, disponibilidade e afinidade com a matéria orgânica. Os inseticidas mais persistentes no ambiente têm uma maior chance de se mostrarem disponíveis e conseqüentemente mais propícios a serem agentes contaminantes, podendo atingir níveis de concentração elevados capazes de causar ação tóxica aos organismos. Segundo comentário de Belo Horizonte (1996), a biodisponibilidade é a propriedade do agente químico determinar o efeito tóxico no organismo.

Veiga (1994), classificou os efeitos dos pesticidas em:

a) crônico-ação cujos efeitos podem ser observados após longos períodos de exposição do organismo ao poluente e podem ser expressos através de mudanças comportamentais, alterações fisiológicas e genéticas, efeitos na comunidade e até mesmo a morte;

b) agudo - ação cujos efeitos podem ser observados em tempos relativamente curtos, sendo o efeito morte, o mais observado;

c) cumulativo - ação cujos efeitos são observados no decorrer da acumulação da substância no organismo ou através da cadeia alimentar;

d) bioconcentração - processo pelo qual o produto tóxico entra no organismo por ingestão ou absorção epitelial através da água;

e) bioacumulação - processo pelo qual os agentes químicos são absorvidos e retidos pelos organismos, a partir do ambiente em que vivem ou através da sua alimentação;

f) biomagnificação - é o aumento da concentração da substância tóxica no decorrer da cadeia alimentar. Refere-se ao processo resultante total, incluindo a bioconcentração e bioacumulação, processos pelos quais a concentração dos tóxicos nos tecidos passa para níveis tróficos mais elevados.

É importante observar que os mecanismos de bioconcentração, bioacumulação e biomagnificação, são apenas processos que determinam o destino do contaminante e não sua ação tóxica. Johnson (1973) ressaltou problemas de bioacumulação de pesticidas em peixes considerando a possibilidade dos níveis de resíduos nos organismos superarem seus níveis de tolerância, o que provocaria a redução dos recursos alimentares proveniente de peixes, bem como a inviabilização da recreação em ambientes contaminados.

### **2.3 Estudos relativos à toxicidade de inseticidas sobre peixes**

A toxicidade pode ser definida, segundo Veiga (1994), como sendo o potencial de uma substância química em causar efeitos adversos sobre os organismos vivos. Considerando-se efeitos adversos ou tóxicos como sendo uma medida do quanto o organismo está fora da faixa normal de um organismo

saudável (morte, comportamento, crescimento, reprodução etc.), esses efeitos podem ser expressos de diversas maneiras, utilizando determinações de taxas ou índices de efeito, sendo estes resultantes da concentração do poluente e do tempo de exposição dos organismos vivos ao mesmo.

Outra maneira de se expressarem os efeitos de uma substância tóxica é através da determinação da concentração letal 50 (CL<sub>50</sub>). Ou seja, é o valor da concentração da substância capaz de matar 50 % dos animais de prova em um determinado tempo.

Para avaliação da toxicidade de determinada substância, recorre-se aos testes de toxicidade ou bioensaios. Para tais estudos, diversos autores, como Bertolotti (1990), Herricks (1991) e Fanta (1997), vêm propondo o uso de métodos e técnicas de biotestes para avaliação de riscos e impactos sobre os recursos hídricos.

A utilização do bioensaio visa a avaliar a potência relativa de um produto químico, sobre organismos vivos, pela comparação de seu efeito com o de uma solução padronizada. A população padrão a ser testada deve apresentar uma resposta ao efeito causado pela solução padronizada, dentro de uma faixa de sensibilidade pré-determinada para a substância utilizada. Já nos biotestes, verificam-se os efeitos de substâncias ou misturas delas em espécies não padronizadas para bioensaio. Com base nesses princípios, diversos estudos podem ser realizados de acordo com os interesses ou objetivos das pesquisas.

Alabaster (1969) testou a influência de 164 substâncias, dentre elas, inseticidas e herbicidas sobre algumas espécies de peixes. Determinou a CL<sub>50</sub> após 24 e 48 horas de exposição às substâncias testadas.

Landau e Tucker (1984) estudaram os efeitos do aldicarbe e do EDB (dibrometo de etileno) sobre o desenvolvimento de embriões e larvas de peixes *Centropomus undecimalis* Bloch, 1792 e *Cyprinodon variegatus* Gunther, 1865

avaliando-se também a toxicidade aguda sobre as duas espécies. As concentrações de aldicarbe testadas, foram 0,025; 0,100; 0,250 e 0,500 ppm. Determinou-se a  $CL_{50}$  do aldicarbe, após 36 horas, como sendo de 0,04 ppm para embriões de *C. undecimalis* e 0,1 ppm para as larvas das duas espécies testadas. Nas concentrações de 0,25 e 0,50 ppm observaram-se efeitos de contorção e morte das larvas e granulações na gema dos ovos.

Heath et al. (1993) estudaram os efeitos de 3 inseticidas (metil paration, molinato e carbofuran) em concentrações subletais, sobre larvas do peixe *Oryzias latipes* Temminck & Schlegel. Larvas dessa espécie com 1 a 2 dias de vida foram expostas aos inseticidas, analisando-se diversos parâmetros biológicos ao final da exposição, tais como: performance de natação, atividade muscular espontânea, crescimento e peso, taxas de RNA:DNA e atividade da acetilcolinesterase. Como resultado, observou-se que os efeitos dos inseticidas testados foram muito sutis, com exceção da baixa de acetilcolinesterase, acentuada.

Kaur e Dhawan (1993) estudaram a variação de sensibilidade da carpa, *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 aos inseticidas carbaryl, carbofuran, malathion e phosphamidon, sobre as fases de ovo, larva e pós larva da espécie. Verificou-se a viabilidade dos ovos, menor que 50 % na presença dos inseticidas nas respectivas concentrações: carbaryl, 3 - 5 mg/l; carbofuran, 2 - 4 mg/l; malathion, 25 - 30 mg/l e phosphamidon 300 - 400 mg/l. A análise dos valores de  $CL_{50}$  96 h revelou uma variação na sensibilidade em função do estágio de vida, ou seja, ovos > larvas > adultos para carbamatos (carbaryl e carbofuran) e larvas > adultos > ovos para organofosforados (malathion e phosphamidon).

Srivastava et al (1995) determinaram a toxicidade aguda do inseticida chlorpyrifos para a espécie de peixe *Heteropneustes fossilis* Bloch, 1894. Nesse estudo, foi determinada a  $CL_{50}$ , 96 h do inseticida com os valores de 2,20 (1,88 -

2,57 mg/l), utilizando-se o método estatístico proposto por Litchfield e Wilcoxon (1949). Com esse resultado, a espécie *H. fossilis*, mostrou ser a mais resistente ao chlorpyrifos, quando comparados às outras espécies de peixes até então testadas.

Gallo et al. (1995) determinaram a  $CL_{50}$  96 h dos inseticidas aldicarbe e carbaryl para as espécies, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) e *Poecilia reticulata* Eigenmann, 1895. Observou-se uma alteração do equilíbrio, com nado circulares das duas espécies, seguido de hipoatividade e consequente morte, quando os indivíduos foram expostos a altas concentrações dos inseticidas. Em concentrações menores dos inseticidas observaram-se as mesmas reações, porém somente após o 3º e 4º dias. A  $CL_{50}$  obtida após 96 h com o inseticida aldicarbe, foi de 52,9  $\mu\text{mol/l}$  para o *B. rerio* e 3,5  $\mu\text{mol/l}$  para o *P. reticulata*. Os valores obtidos da  $CL_{50}$  96h obtida com o inseticida carbaryl, foram 46,0  $\mu\text{mol/l}$  para o *B. rerio* e 12,5  $\mu\text{mol/l}$  para o *P. reticulata*.

No Brasil, os estudos relativos à toxicidade de pesticidas sobre peixes, são escassos e poucos são os centros de pesquisa capacitados para tais estudos. No entanto, alguns trabalhos vêm sendo realizados no país. Zagatto et al (1981) verificaram a toxicidade de alguns organoclorados, organofosforados, clorofosforados e herbicidas, sobre três espécies de peixes *B. rerio*, *P. reticulata* e *Hemigrammus marginatus* Ellis, 1911. Os resultados foram expressos em termos de  $CL_{50}$ , 96 h, verificando-se que o DDT foi o mais tóxico em termos de princípio ativo, seguido pelo BHC e malathion, tricolorfon e 2,4 D. Os valores de  $CL_{50}$ , 96 h para o DDT situaram-se na faixa de  $1,5 \times 10^{-3}$  ppm; para o BHC e malathion variaram entre 0,2 e 0,7 ppm; para o tricolorfon entre 2 e 4,5 ppm e para o 2,4 D ao redor de 400 ppm, para as três espécies.

Toledo, Jonsson e Yokomizo (1989) estudaram a toxicidade e o acúmulo do inseticida endosulfan sobre a espécie *B. rerio*. A  $CL_{50}$ , 24 h determinada foi de 1,6 ppm (1,3 - 2,1 ppm), mostrando ser um composto altamente tóxico para a

espécie estudada. Alterações comportamentais foram também observadas nesse experimento, quando os peixes foram expostos a concentrações mais elevadas do endosulfan.

Jonsson e Toledo (1993), avaliaram a eliminação e bioacumulação do endosulfan no peixe *Hyphessobrycon bifasciatus* Ellis, 1911. Os peixes foram coletados em um lago do Campus da Universidade de Campinas - UNICAMP, transportados para laboratório, aclimatados e expostos a concentrações de 0,2 - 0,4 mg / l de endosulfan por 21 dias.

## **2.4 Testes de toxicidade**

### **2.4.1 Tipos de testes**

Os testes de toxicidade são usados para medir a capacidade inerente do agente tóxico em produzir efeitos deletérios a organismos vivos, (Bertoletti 1990). Dessa forma, os testes de toxicidade podem ser classificados de acordo com o tempo de execução e também pela renovação da substância, conforme citado por Belo Horizonte (1996):

- Teste estático: em recipiente adequado com água em repouso;
- Teste dinâmico: com água corrente;
- Teste agudo: com 48 a 96 horas de duração;
- Teste subagudo: com 28 a 30 dias de duração;
- Teste crônico: com duração de 90 a 365 dias ou mais de duração.

Quanto aos objetivos dos testes, Veiga (1994) relatou que a avaliação de toxicidade visa a estimar a faixa de concentração de um contaminante que produz uma ou mais respostas, facilmente observadas e quantificadas em um grupo de organismos de mesma espécie, sob condições controladas em laboratório.

No caso da execução de testes agudos, podem ser caracterizadas as reações ou respostas abaixo descritas:

1. Alteração do ritmo das funções vitais - frequência respiratória, intensidade da natação, modificação da secreção mucosa, comportamento ao contato, etc.;
2. Distúrbios das funções nervosas (paralisia incipiente ou estímulo das reações nervosas ao nível dos órgãos dos sentidos);
3. Manifestações corporais externas (descoloração, mucosidade, hemorragia).

No teste subagudo são determinados: Variações do sistema sangüíneo (taxas de açúcar sangüíneo e de colesterol, valor hemotócito, etc.); transtornos histopatológicos em sangue, fígado, baço e rim; modificações do comportamento normal (toxicologia da conduta).

Com relação ao teste crônico, de maior duração, atende-se então às variações bioquímicas e histopatológicas.

Os resultados obtidos pela exposição de organismos a substâncias tóxicas, em diferentes concentrações, são plotados graficamente relacionando a concentração da substância *versus* percentual de organismos afetados. Pressupõe-se que as respostas observadas são causadas pela exposição à amostra e que a severidade das respostas é função da concentração da mesma.

Qualquer valor de toxicidade se baseia em trabalhar com uma água teoricamente padronizada. A comissão de qualidade de água do interior dos USA (1968), propôs a cifra de oxigênio de 5 mg/l, que pode reduzir-se a 4 mg/l durante breves períodos, mas sem nunca descer a essa quantidade. As flutuações na taxa de oxigênio diminuem o crescimento do peixe e, a níveis mínimos, provocam más formações. Quando o oxigênio fica escasso, o peixe passa a respirar com mais rapidez. A escassez de oxigênio aumenta a taxa de gás carbônico no sangue, podendo provocar, muitas vezes, a intoxicação por ácido carbônico.

A temperatura desempenha em todos os processos toxicológicos um papel essencial. Regularmente, o aumento da temperatura acelera todos os processos químicos, como o consumo de oxigênio, a velocidade de todos os processos fisiológicos, a formação de substâncias imunizantes, a velocidade de reações bioquímicas, etc..

#### 2.4.2 Tipos de peixes utilizados

Conforme visto anteriormente, várias espécies de peixes podem ser utilizadas em ensaios de toxicidade; contudo, tais organismos devem atender a certos requisitos que determinam sua viabilidade ou não para execução dos testes. A Norma ISO 7346/1-1984 recomenda para testes de toxicidade, o peixe zebra *B. rerio*, também conhecido como “Paulistinha”, procedente do sudeste asiático, devendo-se também acrescentar outras espécies de água doce, para maior aceitabilidade dos resultados. A lista a seguir apresenta algumas espécies citadas na referida norma, que também podem ser utilizadas em adição aos testes com o Paulistinha são: *Cichlasoma nigrofasciatum* (Teleostei, Cichlidae); *Lepomis macrochirus* (Teleostei, Centrarchidae); *O. latipes*; *Pimephales promelas* (Teleostei, Cyprinidae); *P. reticulata*.

De acordo com o método de ensaio, CETESB L5.019-I (Teste de Toxicidade Aguda com Peixes), outras espécies da Família Characidae, de sensibilidade semelhante, podem ser utilizadas.

Segundo Belo Horizonte (1996), dentre os espécimes a serem utilizados, deve-se observar o fator de condição da população trabalhada, selecionando exemplares de tamanho e forma homogêneos (fator de corpulência) e também padronizando-se o aspecto fisiológico (classe de peso, repleção intestinal) assim



como sua origem. Os peixes utilizados nos testes toxicológicos também devem reunir os seguintes requisitos:

- dispor de quantidade suficiente durante todo o ano;
- ser de pequeno tamanho e não terem grandes exigências de espaço.
- ter sensibilidade média à escassez de oxigênio, influências tóxicas, iluminação, temperatura e demais estímulos externos;

## 2.5 Descrição das espécies utilizadas nos testes

### 2.5.1 A espécie *Orthospinus franciscensis*

A espécie *Orthospinus franciscensis* (Eingenmann, 1929), é um teleósteo pertencente à ordem Characiformes, família Characidae, subfamília Stethaprioninae (figura 1). Britisk, Sato e Rosa (1988) descrevem suas características morfológicas como sendo de corpo comprido e alto, altura 1,8 a 2,1 no comprimento, cabeça 3,9 a 4,4 no comprimento; olho 2,1 a 2,6, focinho 4,2 a 5,8, interorbital 2,4 a 2,9 na cabeça; altura do pedúnculo caudal 4,5 a 5,2 na altura do corpo. Dorsal com 10 a 11 raios; ventral com 8, às vezes com 7 raios; anal com 34 a 37 raios, sendo os primeiros prolongados. 34 a 37 escamas na linha lateral; 8 a 9 tanto acima quanto abaixo na linha transversal. A série externa do pré-maxilar tem 4 a 5, raramente um dente. Uma faixa longitudinal ao longo do flanco; primeiros raios da anal negros. Comprimento máximo 80 mm.

Vulgarmente conhecida como piaba nas regiões do norte de Minas, são de índole pacífica, logo se habituando com a presença do homem; vêm à beira dos ribeirões e lagos em busca de alimentos. Como a maioria dos peixes, desovam pela época das cheias, sempre com abundância. Devido a isso, é comum em certas regiões encontrarem-se piabinhas no mercado, por preço insignificante. Mas se as piabas não possuem o valor comercial desejado para o homem, valem

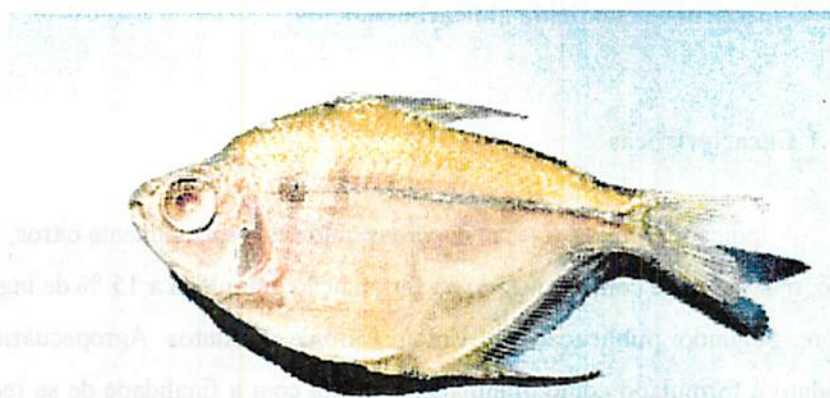
muito como alimentação de outros peixes e também como controladores de densidade de organismos planctônicos, ocupando lugar de destaque na cadeia alimentar, conforme Santos et al.(1994).

### 2.5.2 A espécie *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822)

O *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan,1822) é uma espécie ornamental, originária da Índia. Seu colorido é prateado, ornado com 5 faixas azul-escuras longitudinais, lembrando a bandeira paulista. A figura 2 demonstra as características morfológicas externas da espécie utilizada nos ensaios.

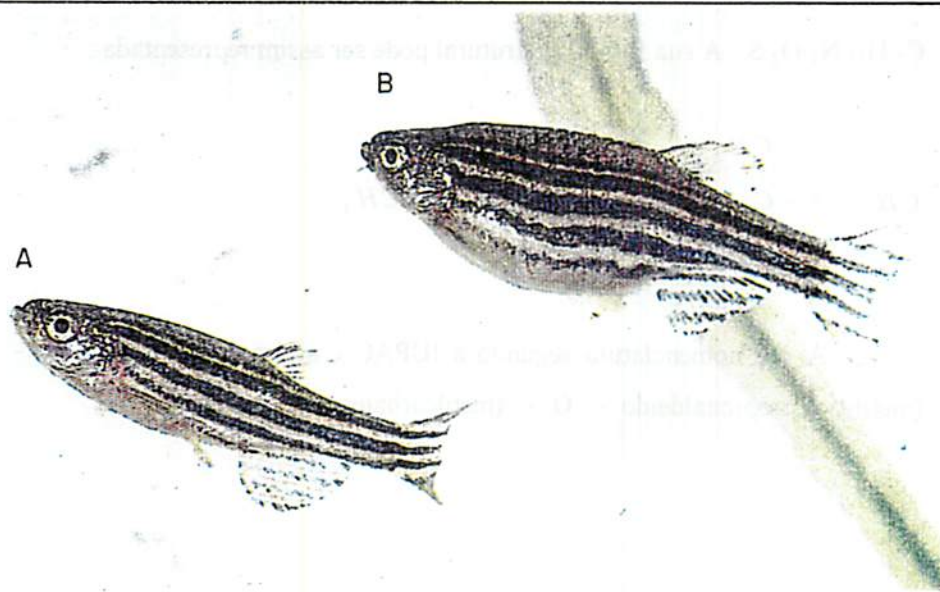
É de fácil criação em aquários, sendo vulgarmente conhecido como Paulistinha ou Peixe-Zebra. Sobrevive facilmente a uma temperatura de 24 a 27 °C, em aquários com cerca de 40 litros de água, com intensa luminosidade, porém sem luz solar.

A fêmea possui fecundidade variando de 100 a 400 óvulos por postura, geralmente depositados nas raízes de plantas aquáticas. Quando adulto, pode atingir cerca de 5 cm de comprimento, segundo Nomura (1984). Quando em aquário, possui hábito natatório sem nível preferencial, sendo a espécie pacífica e gregária. Devido às facilidades de criação, manutenção e reprodução controlada, essa espécie é bastante utilizada em testes de toxicidade, podendo ser executados testes nas fases de ovos, larvas e adultos, estando disponíveis o ano todo, quando mantidos em condições ideais de criação.



---

FIGURA 1- Ilustração da espécie *Orthospinus franciscensis*



---

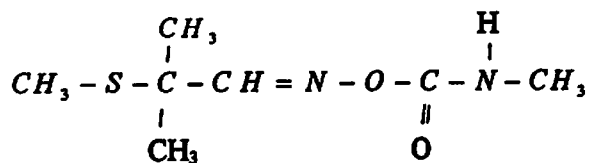
FIGURA 2-Ilustração da espécie *Brachydanio rerio* A= macho ; B= fêmea

## 2.6 O inseticida-nematicida aldicarbe

### 2.6.1 Características

Indicado para a proteção de várias culturas, especialmente citros, batata e café, o aldicarbe é comercializado na formulação granulada a 15 % de ingrediente ativo. Segundo publicação da Union Carbide Produtos Agropecuários, este produto é formulado como granulado, somente com a finalidade de se reduzir os riscos de absorção dérmica em homens e animais. Os grânulos de gesso são recobertos com o ingrediente ativo aldicarbe juntamente com um agente de coesão e um agente de fluidez, conferindo aos grânulos extrema dureza e resistência à abrasão, impedindo assim, a formação de pó quando em trânsito, devido ao atrito.

O aldicarbe é um éster do ácido carbâmico, cuja fórmula molecular é  $C_7H_{14}N_2O_2S$ . A sua fórmula estrutural pode ser assim representada :



A sua nomenclatura segundo a IUPAC é assim descrita: 2-metil - 2-(metil-tio) propionaldeído - O - (metilcarbamamoil) oxima

## 2.6.2 Toxicologia do aldicarbe

O aldicarbe é um inseticida-nematicida pertencente ao grupo dos carbamatos. Seu mecanismo tóxico de ação e de seus metabólitos (sulfóxido e sulfona), envolve a reação com a enzima acetilcolinesterase, resultando na inibição da mesma. Essa reação é considerada o efeito biológico mais significativo do aldicarbe, responsável pela sua toxicidade aguda, conforme publicação da Union Carbide Produtos Agropecuários (1983).

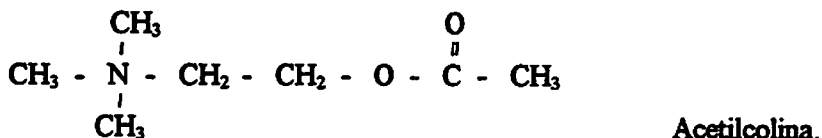
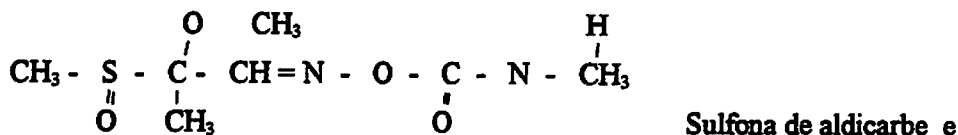
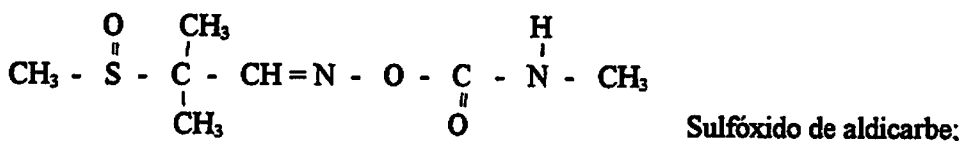
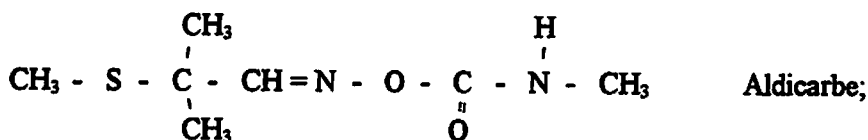
Segundo Cox (1992), a enzima acetilcolinesterase é componente essencial no mecanismo de reação que envolve a transformação do neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético. Por possuírem, o aldicarbe e a acetilcolina, uma fórmula estrutural semelhante, infere-se que o aldicarbe também possui habilidade de reação com a enzima, resultando na sua inibição.

De acordo com a publicação da Union Carbide Produtos Agropecuários (1983), a toxicidade do aldicarbe foi estabelecida sobre animais em seguida à exposição aguda, subcrônica e crônica por uma variedade de vias, verificando-se que o aldicarbe é extremamente tóxico, com uma  $DL_{50}$  oral aguda em ratos de aproximadamente 1 mg/kg de peso vivo.

A toxicidade do aldicarbe para organismos de água doce possui grande variação, dependendo da temperatura e dureza da água. Os moluscos aquáticos são pouco sensíveis aos efeitos do aldicarbe, ao passo que para *Daphnia leavis* Birge, 1878, o sulfóxido de aldicarbe é mais tóxico que o aldicarbe. Para peixes, os valores de  $CL_{50}$  96 h encontrados variam entre 52 e 2420  $\mu\text{g/l}$  a diferentes temperaturas e dureza da água. São citados, pelo fabricante, trabalhos de toxicidade com as espécies de peixes *Salmo gairdneri* Linnaeus, 1758, *Lepomis macrochirus* Hartweg, 1958 e *Barbus conchoni* (Pisces, Cyprinidae), porém as referências dos artigos não foram citadas (WHO, 1991).

Os sintomas colinérgicos de intoxicação aguda e severa aparecem rapidamente e podem levar a morte por falha respiratória. Contudo, o efeito de inibição da enzima pelo aldicarbe é rapidamente reversível. Também é informado, pelo fabricante, que o aldicarbe não permanece por muito tempo no organismo, porém sob exposição contínua, ocorre um atraso na diminuição dos efeitos de inibição da acetilcolinesterase.

A afinidade do aldicarbe pela acetilcolinesterase, pode ser melhor compreendida comparando-se a estrutura molecular da acetilcolina, do aldicarbe e seus metabólitos, conforme mostra a sequência:





Estudos referentes à degradação do Aldicarbe no ambiente têm produzido resultados variados, sendo que a meia vida atribuída ao Aldicarbe é bastante variável, dependendo do meio onde se encontra (WHO, 1991). Dessa forma, torna-se difícil prever o risco de contaminação de determinada área, tendo em vista essas variações no tempo de permanência do inseticida e de seus produtos de degradação no ambiente. Conforme mencionado anteriormente, os inseticidas mais persistentes no ambiente têm maior chance de se mostrarem disponíveis e conseqüentemente mais propícios a serem agentes contaminantes. A redução da biodisponibilidade do produto químico resulta em uma diminuição de seu efeito tóxico.

Lightfoot et al. (1987), estudando a degradação do Aldicarbe em solos da Carolina do Norte - E.U.A., observaram que o tempo de degradação do Aldicarbe foi de 44 dias em amostras de solo; e que o tempo de degradação em amostras da região do lençol freático foi de 123 dias. Piffer (1989) observou o movimento e a degradação de Aldicarbe e sulfona de Aldicarbe em dois tipos diferentes de solo, na região de Lavras - Minas Gerais. Para o Aldicarbe a meia vida de degradação determinada foi de 18 dias.

Scorza Júnior (1997) avaliou a utilização de alguns modelos matemáticos para simulação do movimento e degradação de sulfona de Aldicarbe, em um Latossolo Vermelho Amarelo na região de Lavras. Nessa avaliação, concluiu-se que o sulfona de Aldicarbe apresentou-se com um alto potencial de lixiviação no solo estudado, e a meia vida encontrada para o mesmo, nas condições estudadas, foi de 51 dias.

Em monitoramento prolongado, na região de Quebec, Canadá, Priddle et al. (1992) verificaram a concentração do inseticida Aldicarbe em poços localizados abaixo dos campos de cultura de batata. Nesses campos foram utilizados o inseticida Aldicarbe e neles foram detectados resíduos 4 anos após a



ultima aplicação do produto. Atribui-se a menor degradação do inseticida às baixas temperaturas, ocorridas na região. O aparecimento de concentrações de resíduos coincidem também com a elevação do nível de água do lençol freático, fazendo com que o aldicarbe armazenado em regiões insaturadas do solo, seja novamente movimentado.

A degradação do aldicarbe na água também foi verificada seguindo um extensivo trabalho sob condições controladas em laboratório, por Given e Dierberg (1985). Nesse trabalho os autores reportaram que a hidrólise do aldicarbe é dependente do pH. Para águas com pH próximo à neutralidade, entre 6 e 8, e temperatura de 20 °C, a taxa de hidrólise era muito baixa, mantendo-se praticamente constante durante muito tempo. Nas condições de laboratório, com solução tamponada para estabilização do pH, a meia vida do aldicarbe foi determinada como sendo de 559 dias em pH igual a 6,02; 324 dias para pH de 7,96 e somente 6 dias para pH de 9,85.

Zaki et al. (1982) encontraram resíduos na água de centenas de poços de uma região produtora de batatas em Suffolk County (New York), relacionando essas concentrações de aldicarbe encontradas nos poços com as respectivas distâncias dos campos produtores de batatas. Constatou-se que pessoas estavam consumindo água desses poços, contaminada com o aldicarbe. No monitoramento extensivo, realizado em cooperação entre o município, estado e governo, juntamente com a Union Carbide Corporation, constatou-se que em cerca de 13,5% dos poços analisados, a concentração máxima de 7 ppb (partes por bilhão) de aldicarbe na água, na qual não se apresentam riscos à saúde humana, foi ultrapassada.

No Brasil, a ocorrência de aldicarbe em águas utilizadas para consumo humano pôde ser constatada por Rigitano e Gouvea (1995), em monitoramento realizado no período de março de 1993 a fevereiro de 1994 na região de Maria da

[REDACTED]

Fé - MG. Encontraram-se resíduos de aldicarbe e forato em amostras de água e sedimento ao longo da bacia hidrográfica do córrego Cambuí. Os níveis máximos de aldicarbe encontrados na água chegaram a 5,0 µg /l em um determinado ponto de amostragem. Souza (1996) também mencionou a ocorrência do aldicarbe em três subbacias hidrográficas da região de Conselheiro Lafaiete - MG.

### 3 - METODOLOGIA

#### 3.1 A escolha das espécies a serem utilizadas nos testes

Nesse trabalho, inicialmente tentou-se adaptar peixes do gênero *Astyanax*, conhecidos popularmente como lambaris ou piabas. Coletados no reservatório de água do Sistema Serra Azul, da Companhia de Saneamento de Minas Gerais - COPASA, em local de pouca influência antrópica, os lambaris do rabo vermelho *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) mostraram-se apropriados devido à sua abundância durante todo o ano. Contudo, os espécimes coletados apresentaram-se com uma média de peso relativamente elevada com cerca de 7 a 8 gramas por indivíduo. Com essa média de peso, seria necessário um volume muito grande de água, bem como frascos testes também de tamanhos maiores, de forma a se obter a relação de 1g de peixe por litro de água, o que os tornou inadequados para se trabalhar em laboratório.

Outra espécie também aclimatada em laboratório, foi o lambari bocarra *Oligosarcus argenteus* Gunther, 1864, obtido na estação de piscicultura da Universidade Federal de Viçosa - MG. Essa espécie também mostrou-se favorável para utilização em testes; porém, novamente não se conseguiu o tamanho adequado na época necessária.

Uma nova tentativa de se obterem outras espécies para os ensaios, foi realizada na região de Felixlândia - MG., onde foram coletadas diversas espécies de peixes com idade e tamanho adequados. Isto facilitou não só o transporte, como também o manuseio e aclimação dos peixes. Dentre as espécies coletadas e aclimatadas, optou-se por trabalhar com *Orthospinus franciscensis* e *Moenkhausia costae* (Steindachner, 1907) devido à sua abundância e facilidade de se obterem espécimes jovens em um largo período do ano. Contudo, a espécie

*M. costae* apresentou um alto índice de mortalidade após alguns dias de cativeiro, sendo assim excluída das espécies a serem trabalhadas.

Após essa seleção optou-se por trabalhar com *O. franciscensis*, que é uma espécie regional de importância na cadeia alimentar da represa, e que se adaptou bem às condições de laboratório. Também utilizou-se a espécie *Brachydanio rerio* por se tratar de uma espécie largamente utilizada em testes no mundo, servindo, assim, como referência na comparação dos testes efetuados.

### 3.2 Obtenção e aclimação dos peixes

Os peixes da espécie *B. rerio* (paulistinha), foram adquiridos de criadores, no comércio local da cidade de Belo Horizonte. Foram transportados em sacos plásticos com água e atmosfera de oxigênio, para os laboratórios do CETEC, onde foram aclimatados para as condições do novo ambiente.

Os peixes da espécie *O. franciscensis*, juntamente com outras espécies, foram coletados num braço da represa de Três Marias, localizado no município de Felixlândia - MG, num local de muito pouca influência antrópica.

Para captura dos peixes utilizou-se uma rede de arraste de nylon com malha de 0,2 mm e peneiras de metal, forradas com tela de nylon também de 0,2 mm, para evitar que os peixes capturados sofressem lesões. Ainda nas margens da lagoa, os peixes eram transferidos para baldes contendo a água da mesma e imediatamente conduzidos a um tanque também com água da represa, onde eram estocados. Após uma rápida triagem, os peixes eram transferidos para sacos plásticos contendo água da represa, lacrando-os após injetar-se oxigênio. Feito isto, foram transportados até os laboratórios do CETEC o mais rápido possível.

Nos laboratórios, os peixes passaram por uma segunda triagem onde se processou a separação, pesagem e identificação dos exemplares. A identificação das espécies coletadas foi baseada em chaves contidas em Britski (1988) “Chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco”.

Conforme recomenda a norma L5.019-I da CETESB, afim de se evitar que as condições ambientais afetassem de forma significativa a sensibilidade do peixe ao agente tóxico, a água proveniente da represa foi substituída gradativamente até sua totalidade, ficando, assim, somente água de manutenção, onde os peixes foram criados. Em alguns casos, os peixes tiveram de ser submetidos a uma profilaxia para se evitar mortandade devido à presença de fungos. Para isso, optou-se pela exposição dos peixes afetados a uma solução de permanganato de potássio 3,0 ppm durante 30 minutos, retornando-os aos tanques logo após. Conforme recomenda a norma, aguardou-se um prazo de 15 dias para utilização dos mesmos nos testes.

### **3.3 Manutenção de peixes em laboratório**

A água de manutenção pode ser de mananciais de boa qualidade ou mesmo desclorada de rede pública de abastecimento, segundo recomenda a norma técnica L5.019-I da CETESB. No caso, optou-se pela utilização da água da rede pública, desclorada por aeração constante, à temperatura de 25°C durante sete dias, aproximadamente, antes de ser empregada. A manutenção foi feita semanalmente com renovação da água pelo menos uma vez a cada sete dias.

Para alimentação dos peixes, utilizou-se ração específica para peixes contendo teores garantidos em análises: proteína bruta 46 % (mínimo), fibras 2,0 % (máximo), gorduras 5 % (mínimo).

Os peixes foram mantidos em aquários de vidro com capacidade para 40 litros de água e também em caixas d'água de amianto revestidas internamente com tinta epoxi, com capacidades para 100, 250 e 1000 litros. Foi mantida aeração constante da água, nas caixas e aquários, utilizando-se de bombas de ar próprias para tal finalidade, ou seja, isentas de óleos e resíduos tóxicos.

A estabilização da temperatura da água dos aquários foi mantida a 25  $\pm$  2 °C, utilizando-se aquecedores de aquário e sala climatizada. A cada 3 dias, foram retiradas amostras de água de cada aquário, para determinação dos seguintes parâmetros físico-químicos: pH, condutividade, temperatura, salinidade, sólidos totais e oxigênio dissolvido.

### 3.4 Obtenção do aldicarbe

O inseticida-nematicida aldicarbe foi obtido a partir do produto comercial, que contém 15 % do ingrediente ativo aldicarbe. Uma amostra desse produto foi dissolvida num frasco de vidro tipo Erlenmayer (250 cc, com tampa), ao qual em seguida foram adicionados 100 ml de acetona. Após agitação em mesa agitadora por 30 minutos, procedeu-se à filtração da mistura em algodão. Retirada a parte sólida (gesso e grafite), adicionou-se água destilada à solução cetônica, de forma lenta e gradual, até a recristalização do aldicarbe. Os cristais formados foram separados em papel de filtro, sendo posteriormente dissolvidos novamente em 30 ml de acetona, obtendo-se uma solução estoque de aldicarbe.

O teor do inseticida na solução estoque foi posteriormente determinado por cromatografia de gás-líquido.

### 3.5 Execução dos testes

Os testes foram conduzidos no laboratório de Bioensaios e Ecotoxicologia do CETEC, seguindo-se a metodologia proposta pela CETESB de São Paulo. Os testes consistiram na exposição de peixes, das espécies *B. rerio* e *O. franciscensis*, a concentrações de aldicarbe, compreendidas entre 0,56 e 100 ppm, por um período de 96 horas nas condições também prescritas pelas Normas ISO 7346/1; ISO 7346/2 e ISO 7346/3 de 1984. Tais procedimentos permitem determinar a concentração letal para 50 % dos organismos testados durante 96 horas de exposição ao agente tóxico em estudo.

Os testes foram executados seguindo as etapas:

a) teste preliminar, realizado para determinação do intervalo de concentrações no teste definitivo;

b) teste definitivo, que permite calcular a  $CL_{50}$ ; 96h

Para os testes de  $CL_{50}$  e de sensibilidade de ovos e larvas de *B. rerio*, optou-se pelo sistema estático, ou seja, sem a renovação das soluções durante o período de teste, uma vez que o referencial teórico demonstra a baixa taxa de degradação do aldicarbe nas condições de temperatura e pH do experimento. A água utilizada para o preparo das soluções teste (água de diluição) foi do tipo reconstituída, ou seja, água destilada ou deionizada, adicionada de soluções salinas, de forma a se obter uma dureza total de 40 a 48 mg/l em  $CaCO_3$ , pH entre 7,2 e 7,6 e com condutividade de aproximadamente 160  $\mu S/cm$ .

Os peixes utilizados foram mantidos em aclimatação por 7 dias, em aquário com volume adequado (1 g de peixe por litro de água), sendo que nos 3 primeiros dias efetuou-se a troca paulatina da água de manutenção pela água de diluição, até a metade do volume, sendo o restante substituído até 48 horas antes do início do teste.

As espécies testadas pertenciam a um lote homogêneo, e mesma idade, com sensibilidade a substância de referência (dicromato de potássio), semelhantes àquelas espécies normalmente utilizadas em testes de toxicidade, ou seja, a  $CL_{50}$  para esta substância de 90 mg/l. A mortalidade natural dos indivíduos testes, do lote utilizado, não foi superior a 5 % nas 48 horas que precederam os biotestes. Também indivíduos com malformações ou doentes foram descartados.

Optou-se também pela realização de testes com ovos e larvas da espécie *B. rerio*, considerando a hipótese de que nessas fases os indivíduos possam ser mais sensíveis à ação do inseticida. Para o *O. franciscensis* não foi possível a realização dos testes nessas fases (ovo e larva), pelo fato de não se dominarem as técnicas de reprodução induzida para a espécie, conseqüentemente a não obtenção de ovos e larvas no momento desejado.

### 3.5.1 Preparo da água reconstituída

O preparo da água reconstituída seguiu basicamente o procedimento CETESB/L5.019 proposto pela CETESB.

Após o preparo do volume necessário para a realização dos testes, anotou-se o número do lote em uma ficha de controle. A seguir introduziu-se aeração constante durante pelo menos 24 horas, para solubilização e manutenção da saturação de oxigênio dissolvido e estabilização do pH. Determinaram-se então os parâmetros físico-químicos: pH, dureza, oxigênio dissolvido e condutividade. Havendo necessidade de se ajustar o pH para faixa de 7,2 a 7,6, devem-se utilizar soluções de ácido clorídrico HCl 1N, ou solução de hidróxido de sódio NaOH 1N. Após o acerto de pH, retira-se a aeração e verifica-se a



dureza em  $\text{CaCO}_3$ , que deverá estar na faixa de 40 a 48 mg. Caso a dureza não esteja nessa faixa, a água deverá ser desprezada e outro lote deve ser preparado. Todos os reagentes utilizados para os testes foram de grau analítico.

### 3.5.2 Determinação da $\text{CL}_{50}$ , 96 h do aldicarbe sobre *O. franciscensis*

Com os dados relativos ao peso médio da população a ser testada, determinou-se o volume dos frascos de vidro a serem utilizados, obedecendo-se sempre à relação de no mínimo 1g de peixe por litro de água ou de solução. Como o peso médio dos peixes amostrados foi de 0,085 g, optou-se pela utilização de béqueres com capacidade para 1000 ml contendo, no máximo, 10 indivíduos/unidade.

Em todos os testes, tomou-se o devido cuidado com a temperatura da água e das soluções de forma a se evitar que os indivíduos testados sofressem choque térmico. Também a distribuição dos peixes nas soluções-teste foi feita de forma aleatória e uniforme, sendo colocados no máximo 2 indivíduos em cada solução por vez. Os indivíduos mortos durante o experimento foram retirados com o auxílio de um tubo de vidro com uma borda alargada e uma pera de sucção. Em seguida foram armazenados em tubos de vidro, devidamente rotulados e levados ao congelador para posterior análise. Ao final de cada teste, todos os indivíduos utilizados foram também armazenados em congelador.

### **3.5.2.1 Teste Preliminar com o *O. franciscensis***

Como não se dispunha de dados referentes à toxicidade do aldicarbe para a espécie *O. franciscensis*, realizou-se uma bateria de teste preliminar, determinando-se a faixa de concentração a ser utilizada nos testes definitivos.

Nos testes preliminares, utilizou-se uma larga faixa de concentração do inseticida, a fim de se determinar o intervalo de concentração com mortalidade entre 10 e 90%. Seguindo-se uma tabela recomendada pela Metodologia CETESB/L5.019 e baseando-se em informações de literatura, optou-se pelas concentrações de 100; 32; 10; 3,2 e 1 ppm ou mg/l do inseticida.

Para cada concentração, inclusive o grupo controle, utilizaram-se 20 indivíduos, distribuídos de forma aleatória em dois béqueres de 1000 ml de solução.

O tempo total de exposição foi de 96 horas, sendo que todos os dados observados no decorrer dos testes foram anotados.

### **3.5.2.2 Teste definitivo com o *O. franciscensis***

De acordo com os resultados obtidos nos testes preliminares, verificou-se que a faixa ideal para o teste definitivo ficou compreendida entre 0,56 e 5 ppm. Dessa forma, utilizou-se a tabela proposta pelo CETESB/L5.019, com 7 concentrações testadas dentro dessa faixa, mais o grupo controle. As concentrações utilizadas foram: 0,56 ; 1,0 ; 1,3 ; 1,8 ; 2,4 ; 3,2 e 5 ppm. Para cada concentração, utilizaram-se 20 indivíduos, distribuídos aleatoriamente em 2 béqueres contendo cerca de 1000 ml de solução teste, sendo que, no final do experimento, foram totalizadas 5 repetições de testes.

### **3.5.3 Determinação da $CL_{50}$ , 96 h do inseticida aldicarbe sobre *B. rerio***

#### **3.5.3.1 Teste Preliminar com *B. rerio***

Os procedimentos executados, nos testes com a espécie *B. rerio*, foram os mesmos utilizados para *O. franciscensis*. O peso médio dos indivíduos testados foi de 0,15 gramas, determinando-se, assim, um volume próximo de 2 litros para cada frasco-teste.

#### **3.5.3.2 Teste definitivo com *B. rerio***

De posse dos resultados obtidos nos testes preliminares, verificou-se que a faixa ideal para o teste definitivo, com esta espécie, também ficou compreendida entre 0,56 e 5 ppm. Dessa forma, avaliaram-se 7 concentrações dentro dessa faixa, mais o grupo controle. As concentrações utilizadas foram: 0,56; 1,0; 1,3; 1,8; 2,4; 3,2 e 5 ppm.

Da mesma forma que realizada para a espécie anterior, em uma bateria de teste, para cada concentração, utilizaram-se 20 indivíduos, distribuídos aleatoriamente em 2 béqueres contendo cerca de 1000 ml de solução teste. No final do experimento, foram totalizadas 3 baterias de testes em função do número de indivíduos disponíveis, no lote, para testes.

#### **3. 5. 4 Teste com ovos de *B. rerio***

Para realização desses testes, utilizaram-se ovos com cerca de 24 horas de idade, adquiridos na CETESB de São Paulo. Cerca de 600 ovos recém-ovipositados, após desova induzida, foram acomodados em um recipiente de vidro contendo água de manutenção, convenientemente vedados e transportados até os

laboratórios do CETEC-MG, em Belo Horizonte. Nos laboratórios de Criação e Manutenção de Macro-invertebrados e Peixes, efetuou-se a separação dos ovos inviáveis, retirando-se aqueles contaminados com fungos. Os ovos viáveis foram divididos em dois lotes, utilizando-se um para os testes com ovos, e o outro para os testes com larvas após a eclosão.

Os testes foram montados, utilizando-se as mesmas concentrações usados nos testes definitivos dos peixes, acrescido da concentração de 10 ppm, mais um grupo controle. Utilizaram-se béqueres de 50 ml de capacidade, contendo cada um cerca de 40 ml de solução e dez ovos vivos cada, sendo colocados aleatoriamente nos béqueres. O número de repetições por concentração foi de três, totalizando-se 30 ovos por tratamento.

Realizou-se, leituras periódicas a cada 24 horas, sendo observados os efeitos.

Devido à evaporação das soluções nos béqueres, houve a necessidade de substituí-las a cada 24 horas por uma nova solução de mesma concentração em um novo béquer, com o devido cuidado de se controlar a temperatura das soluções para não causar choque térmico nos indivíduos. Os béqueres foram mantidos em câmara encubadora a uma temperatura de 25 °C, e fotoperíodo de 12 horas, durante todo o experimento .

### 3. 5. 5 Testes com larvas de *B. rerio*

Utilizou-se as mesmas concentrações do item 3.5.4 para os testes definitivos. As larvas recém eclodidas foram distribuídas aleatoriamente nos béqueres de 50 ml, contendo cerca de 40 ml de solução e 10 larvas cada. Para cada uma das concentrações e para o grupo controle, totalizaram-se 30 indivíduos testados. Conforme procedimento mencionado no item anterior, optou-se também

pela substituição das soluções teste a cada 24 horas e a manutenção da bateria de testes em câmara incubadora com foto período de 12 horas de luz. O período de 96 horas foi estabelecido, de forma a abranger a maior parte do período larval da espécie.

### **3. 5. 6 Determinação do fator de bioconcentração nos peixes**

O fator de bioconcentração foi determinado após a análise cromatográfica dos peixes e das suas respectivas soluções às quais foram expostos. Assim, para cada lote de peixes expostos às respectivas concentrações, determina-se o fator de bioconcentração, utilizando-se a seguinte expressão de acordo com Veiga (1994):

$$\text{Fator de Bioconcentração} = \frac{\text{concentração média do inseticida nos peixes}}{\text{concentração média na solução testada}}$$

## **3. 6 Quantificação do aldicarbe por cromatografia em fase gasosa**

### **3. 6. 1 Análise da solução estoque**

Para quantificação do aldicarbe na solução estoque do composto, retiraram-se duas alíquotas de 0,1 ml da solução estoque, as quais foram transferidas a balões de vidro ( 50 cc, fundo redondo). A seguir, procedeu-se à oxidação do aldicarbe à sulfona de aldicarbe, adicionando-se, a cada balão, 1 ml de uma solução de ácido peracético a 2 % em acetato de etila. Tal oxidação é necessária, uma vez que o detetor fotométrico de chama do cromatógrafo utilizado é sensível apenas à sulfona de aldicarbe. Após três horas de contato com o ácido peracético, todo aldicarbe ali contido é transformado em sulfona de

aldicarbe. Prossegue-se a análise com a evaporação da solução de ácido peracético através de um fluxo de ar fornecido por uma bomba pneumática.

Os resíduos de sulfona de aldicarbe aderidos às paredes do balão após a evaporação foram, então, solubilizados com um pequeno volume de acetona e transferidos para tubos graduados, os quais foram devidamente etiquetados e novamente armazenado sob refrigeração para posterior quantificação pela análise em cromatografia gasosa, quando então procedeu-se à diluição ou manteve-se o volume inicial conforme necessidade da análise.

### 3. 6. 2 Análise de soluções aquosas

A partir da solução estoque do aldicarbe em acetona, foram preparadas soluções do inseticida em água, para uso nos bioensaios. Para verificação da concentração do inseticida nas soluções iniciais e finais de cada experimento, adotou-se a metodologia utilizada por Piffer e Rigitano (1991). De cada solução aquosa retirou-se uma alíquota de 5 ml, a qual foi transferida para um tubo de ensaio (vidro com 20 cc, com tampa) e submetida a extração do composto através de agitação manual com 3 frações sucessivas de 5 ml de acetato de etila durante um minuto cada fração. Com auxílio de uma pipeta, as fases orgânicas superiores foram transferidas a um único balão de fundo redondo, o qual foi posteriormente adaptado a um rotavapor (modelo RE 120 fabricado pela Buchi) para evaporação do solvente. Em seguida procedeu-se à oxidação e quantificação dos resíduos conforme descrito no item anterior.

A quantificação de sulfona de aldicarbe foi realizada comparando-se a altura de pico obtida após a injeção de padrões, com a altura de pico obtida após injeção da amostra. Os picos do gráfico foram fornecidos pelo registrador do cromatógrafo a gás. O cromatógrafo utilizado foi o de modelo 370 fabricado pela

indústria Instrumentos Científicos C.G. Ltda, equipado com detector fotométrico de chama "TRACTOR", operando com filtro para comprimento de onda na faixa compatível para detecção de enxofre. Utilizou-se uma coluna cromatográfica de vidro, com 1,8 m de comprimento por 2 mm de diâmetro interno, contendo SP - 1000 a 5 % em supelcoport 100/200 mesh. As condições de operação do cromatógrafo foram as seguintes:

- fluxo dos gases: 60 ml/min para o gás de arraste N<sub>2</sub>  
120 ml/min para os gases de chama H<sub>2</sub>  
140 ml/min para o Ar sintético
- temperatura da coluna: 220 °C
- temperatura do detector: 225 °C
- temperatura do vaporizador: 204 °C

Como todas as soluções pertenciam a um mesmo lote de preparo, optou-se pela realização de análises de amostras compostas, retiradas de forma homogênea em cada frasco de repetição dos testes. Desta forma, determinou-se as concentrações iniciais das amostras, retiradas no tempo zero do teste e também as concentrações finais dos testes, ou seja, após 96 horas de teste.

As curvas de calibração foram obtidas por meio de soluções padrão, as quais variaram entre 2 ng e 40 ng. O padrão analítico do aldicarbe foi obtido junto ao fabricante, tendo o mesmo uma especificação de pureza de 99,2%.

### 3. 6. 3 Análise dos peixes

Para a análise dos peixes, procedeu-se à maceração dos mesmos em um grau até a formação de uma pasta. Em seguida, homogenizou-se esse material com 5 frações sucessivas de 5 ml de acetona. Com auxílio de uma pipeta, os extratos cetônicos foram transferidos a um único balão de fundo redondo, após

passagem em algodão suspenso em funil de vidro. O extrato foi exposto à evaporação em rotavapor e os resíduos foram submetidos a oxidação e quantificação conforme descrito no item 3.6.2.

#### **3. 6. 4 Verificação da eficiência do método de análise utilizado**

A eficiência do método foi determinada, analisando-se amostras, de água e de peixes, as quais foram previamente adicionadas diferentes concentrações de aldicarbe (padrão analítico)

Pesou-se 1g de peixe, da mesma espécie utilizada nos experimentos, adicionando-se 0,5 ml de solução padrão de aldicarbe 0,01 mg/ml de forma a obter-se a concentração desejada de 5 ppm. Repetiu-se o procedimento, adicionando-se 0,5 ml de solução padrão de aldicarbe 0,002 mg/ml, de forma a obter-se uma concentração de 1 ppm.

Para o teste com a água, tomou-se um volume de 0,5 ml de solução padrão de aldicarbe 1 mg/ml e adicionou-se a 99,5 ml de água, de modo a se obter a concentração de 5 ppm. Diluindo-se 10 ml dessa solução de 5 ppm para 50 ml, obteve-se a solução de 1 ppm. A seguir procedeu-se a análise conforme o método utilizado para as análises. Dividindo-se a concentração analisada pelo valor teórico inicial, determinou-se o fator de correção e a eficiência do método em porcentagem.

#### **3.7 Análises físico-químicas das soluções**

Os dados referentes às análises físico-químicas da água de manutenção, foram determinados em intervalos de três dias no máximo. As análises físico-químicas das soluções teste, foram realizadas no início e no fim de cada



experimento. Para tal, utilizou-se de medidores digitais portáteis, acoplados à sonda com eletrodos.

A leitura foi feita de forma direta conforme os parâmetros mostrados a seguir:

pH . ..... Microprocessor pocket-pH / mV - meter pH 325  
Condutividade. .... Microprocessor Conductivity meter LF 325  
Temperatura. .... Microprocessor Conductivity meter LF 325  
Salinidade. .... Microprocessor Conductivity meter LF 325  
Sólidos totais. .... Microprocessor Conductivity meter LF 325  
Oxigênio dissolvido..... Microprocessor Oxi-meter Oxi 325  
Dureza em Ca. .... Titulação com EDTA - via úmida

Todos os instrumentos foram calibrados antes de cada medição, conforme procedimentos descritos em catálogos do fabricante.

### **3. 8 Análise Estatística dos resultados**

#### **3.8.1 Princípio do método Litchfield-Wilcoxon**

Para as análises estatísticas dos resultados obtidos, utilizou-se o método proposto por Litchfield-Wilcoxon, por ser um método amplamente usado em testes de avaliação dose x efeito.

Conforme referido na metodologia CETESB - L5.017, o método consiste em elaborar um gráfico com os dados obtidos no teste de toxicidade aguda de um agente tóxico. Para tal deve-se utilizar papel prob-log, onde são plotadas no eixo logarítmico (x) as concentrações testadas e no eixo probabilístico (y) a porcentagem de efeito observado. Observa-se que para

obtenção das  $CL_{50}$  neste método é necessário que se obtenha pelo menos uma porcentagem intermediária de efeito observado entre os valores de 0 % e 100 %.

### **3. 8. 2 Procedimento geral do método Litchfield-Wilcoxon**

a) Preparou-se uma tabela na qual foram registrados os seguintes dados nas colunas: concentrações utilizadas; número de organismos afetados sobre o número de organismos testados; porcentagem de efeito observado, não sendo necessário colocar na tabela mais que duas concentrações consecutivas de 0 % e 100 %; anotou-se posteriormente os dados obtidos de efeito esperado;

b) plotou-se, em papel tipo prob-log, os pontos obtidos com a porcentagem de efeito observado em função das concentrações testadas, exceto os valores de 0 e 100%. Ajustar uma reta através dos pontos, levando-se em consideração principalmente os pontos que se encontram entre 40 e 60 % de efeito observado.

c) introdução dos valores de 0 e de 100 % de efeito. Através da reta traçada, sobre o ponto de interseção desta com os valores das concentrações estudadas, obteve-se as respectivas porcentagens de efeito esperado, anotando-os na coluna apropriada da tabela. Os valores de porcentagem esperada para qualquer uma das concentrações testadas que ficaram abaixo de 0,01 % e acima de 99,9 % não foram considerados;

Utilizando-se a porcentagem de efeito esperado, (obtida através da tabela do método), introduziu-se os valores corrigidos para as porcentagens de 0 e 100 % de efeito. Tabulou-se estes valores ao lado das porcentagens de efeito esperado (obtidos através do gráfico). Colocou-se no gráfico esses valores e verificou-se através de cálculos que a reta traçada estava adequada;

d) avaliação da reta através do teste do Chi-quadrado ( $X^2$ )

Para cada concentração testada, listou-se a diferença entre o valor da porcentagem de efeito observado e o valor da porcentagem de efeito esperado. Para os valores de 0 e 100 % efetuou-se a diferença entre os valores da porcentagem de efeitos esperados corrigidos e os valores das porcentagens de efeitos esperados obtidos através do gráfico. Listou-se as diferenças em valores absolutos.

Utilizando-se a figura nomográfica do método e uma régua, conectou-se o valor da escala porcentagem de efeito esperado com o valor da diferença entre o esperado e o obtido, sendo que no ponto de intercessão na escala do  $X^2$  foram obtidos os valores de contribuição do  $X^2$  para cada concentração selecionada.

Somou-se as contribuições do  $X^2$  e multiplicou-se pelo número médio de animais por concentração (N), isto é, o número total de animais dividido pelo número de concentrações testadas. O valor assim obtido foi o  $X^2$  da reta.

Achou-se os graus de liberdade (n) da seguinte maneira: diminuiu-se duas unidades do número de pontos colocados no gráfico (k), inclusive os valores de 0 e 100 % (Assim  $n = k-2$ ).

Verificou-se na tabela do método se o  $X^2$  calculado para a reta foi menor que o valor do  $X^2$  tabelado para n graus de liberdade. Verificou-se se a reta estava bem ajustada;

e) determinação da  $CL_{50}$

Através da reta traçada, obteve-se no eixo dos x a concentração correspondente a 50 % de efeito observado (eixo dos y). A concentração assim obtida foi a  $CL_{50}$ ;

f) cálculo do intervalo de confiança a nível de 95 %

Obteve-se no gráfico as concentrações correspondentes a 16; 50 e 84% de efeito esperado. Calculou-se a inclinação da reta (S) de acordo com a fórmula:

$$S = \frac{CL_{84} / CL_{50} + CL_{50} / CL_{16}}{2}$$

Obteve-se o valor de  $N'$ , isto é, o número total de organismos utilizados nas concentrações testadas, nas quais obteve-se uma porcentagem de efeito esperado entre 16 e 84 %.

Calculou-se o expoente  $E$  para a inclinação da reta  $S$  e o fator  $fCL_{50}$  conforme as expressões:

$$E = 2,77 / \sqrt{N'} \quad \text{e} \quad fCL_{50} = S^E$$

**Cálculo dos limites de confiança :**

$CL_{50} \cdot fCL_{50}$  = limite superior com 95 % de confiança

$CL_{50} / fCL_{50}$  = limite inferior com 95 % de confiança

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Aclimação e utilização de espécies nativas regionais

Em relação à aclimação dos organismos teste, dentre as espécies ícticas selecionadas, a *Orthospinus franciscensis* foi a que se mostrou mais viável à utilização em testes de toxicidade com duração de 96 horas. Durante todos os experimentos, essa espécie apresentou uma taxa de mortalidade inferior a 10% nos tanques e aquários onde foram estocados.

As outras espécies, *Astyanax fasciatus*, *Oligosarcus argenteus* e *Moenkhausia costae*, também testadas para aclimação em laboratório, não se adequaram na ocasião, porém não se deve descartar seu potencial de utilização em testes. As características por elas apresentadas, com um alto índice de mortalidade após alguns dias de cativeiro, tamanho e peso demasiadamente grande dificultando o manuseio, poderão ser resolvido através de estudos específicos.

### 4.2 Determinação da concentração do aldicarbe nas soluções teste

Os resultados obtidos nas análises cromatográficas das soluções utilizadas nos testes de toxicidade, mostraram que houve um decaimento das concentrações, após decorrido o tempo do experimento. Esses valores são apresentados nas tabelas 1, 2 e 3.

TABELA 1 - Concentração de aldicarbe nas soluções-teste utilizadas com *Orthospinus franciscensis*, nos laboratórios do CETEC, 1997.

Concentração nominal (ppm)	Concentração analisada (ppm)		Concentração média analisada (ppm)
	inicial	final	
Controle	0	0	0
0,56	0,7	0,62	0,66
1,0	1,25	0,84	1,045
1,3	1,49	0,92	1,2
1,8	1,63	1,40	1,51
2,4	2,8	2,03	2,41
3,2	3,74	2,64	3,19

TABELA 2 - Concentração de aldicarbe nas soluções-teste utilizadas com *Brachydanio rerio* nos laboratórios do CETEC, 1997.

Concentração nominal (ppm)	Concentração analisada (ppm)		Concentração média analisada (ppm)
	inicial	final	
Controle	0	0	0
0,56	0,79	0,74	0,76
1,0	1,29	1,06	1,17
1,3	1,68	1,52	1,6
1,8	2,19	1,90	2,04
2,4	3,18	2,99	3,08
3,2	3,94	2,83	3,38

Foi constatada uma diminuição média em torno de 20 % na concentração do aldicarbe nas soluções durante o período de 96 h, o que é atribuído à degradação do composto nos tanques. As diferenças entre as concentrações nominais (teóricas) e as iniciais foram atribuídas a erros experimentais no preparo das soluções e na análise dos mesmos. Para os testes com ovos e larvas, analisou-se apenas as concentrações iniciais, porque as mesmas eram substituídas a cada 24 horas com a finalidade de se evitarem alterações nas concentrações devido à evaporação. A Tabela 3 demonstra as concentrações das soluções que foram substituídas a- cada 24 horas no experimento.

TABELA 3 - Concentração de aldicarbe nas soluções utilizadas nos testes com ovos e larvas de *Brachydanio rerio*, nos laboratórios do CETEC, 1997.

Concentração nominal (ppm)	Concentração inicial (ppm)
0,56	0,89
1,0	1,42
1,3	1,93
1,8	2,41
2,4	3,37
3,2	5,13

Analisou-se também a água proveniente da represa, com o objetivo de verificar se o ambiente onde foram coletados os peixes apresentava contaminação pelo inseticida testado. Nessa análise não se detectou a presença do inseticida aldicarbe.



### 4.3 Análises físico-químicas das soluções utilizadas nos testes

Considerando que todos os experimentos foram realizados sob pouca variação climática e que todas as soluções foram originadas de um mesmo lote de água, obteve-se pouca alteração dos parâmetros físico-químicos. A Tabela 4 apresenta as variações máximas medidas no início e no fim de cada experimento.

TABELA 4 - Variação máxima dos dados físico-químicos das soluções utilizadas nos testes.

Parâmetro	inicial	final
temperatura	25,4 ° C	25,4 ° C
condutividade	161,3 $\mu\text{S/cm}$	160,8 $\mu\text{S/cm}$
pH	7,46	7,62
dureza Ca	40 mg	39 mg
O. D.	67%	62 %

Como pode ser observado na tabela acima, todos os parâmetros ficaram compreendidos dentro dos limites prescritos pela norma seguida.



#### 4.4 Validação dos resultados de análise

Os testes de recuperação do aldicarbe adicionado em concentrações conhecidas em amostras de água e de peixes revelaram índices de recuperação superior a 90 % para água e de a 95 % para os peixes, não sendo necessária a correção dos resultados obtidos nas análises, considerando que o erro geral dos experimentos foi maior.

A metodologia empregada permitiu a quantificação dos resíduos do aldicarbe até o limite mínimo de determinação de 0,01ppm em soluções aquosas e 0,1 ppm nos peixes.

#### 4.5 Determinação da $CL_{50}$ , 96 h do aldicarbe para as espécies de peixes

De acordo com o referencial teórico obtido, a degradação do aldicarbe ocorre em um curto período de tempo, razão pela qual optou-se pelos testes agudos com duração de 96 horas de exposição.

##### 4.5.1 - Determinação da $CL_{50}$ 96 h do aldicarbe para *B. rerio*

O teste preliminar realizado com a espécie *B. rerio* determinou a faixa de concentração que foi utilizada nos testes definitivos. Conforme pode ser observado na Tabela 5, a faixa de concentração adequada para que se determine a  $CL_{50}$  nos testes definitivos, ficou compreendida entre as concentrações de 3,2 ppm e 0,56 ppm.

TABELA 5 -Porcentagem média de mortalidade de *Brachydanio rerio* em diferentes períodos, após exposição ao inseticida aldicarbe, nos laboratórios do CETEC, 1997.

Concentração (ppm)	n° inicial de peixes	n° de peixes mortos por período (h)						% mortes 96 h
		3	6	24	48	72	96	
100	20	20	-	-	-	-	-	100
32	20	20	-	-	-	-	-	100
10	20	0	2	20		-	-	100
3,2	20	0	2	16	20	-	-	100
1	20	0	0	0	2	4	9	45
controle	20	0	0	0	0	0	0	0

Nos testes definitivos, os dados obtidos foram agrupados em tabelas, de forma a prosseguir com os cálculos. Na tabela 6 está apresentado o número de peixes mortos pela ação do inseticida-nematicida aldicarbe, após 96 horas de exposição nos testes realizados com a espécie *B. rerio*.

TABELA 6 - Mortalidade de *Brachydanio rerio*, nos testes 1, 2 e 3, pelo inseticida aldicarbe em relação às respectivas concentrações.

Concentração (ppm)	n° inicial /teste/conc.	n° de peixes mortos após 96 h				% mortos
		teste 1	teste 2	teste 3	n° total	
5	20	20	20	20	60	100
3,2	20	20	20	20	60	100
2,4	20	17	17	15	49	81,67
1,8	20	10	9	12	31	51,67
1,3	20	8	8	9	25	41,67
1	20	2	2	2	6	10
0,56	20	0	0	0	0	0
controle	20	0	0	0	0	0

Os valores obtidos foram de  $CL_{50} = 2,1$  com intervalo de confiança de 1,80 a 2,33 ppm.

Na Figura 3, estão apresentados o percentual observado de indivíduos, adultos da espécie *B. rerio*, mortos após 96 horas de exposição ao aldicarbe nas respectivas concentrações.

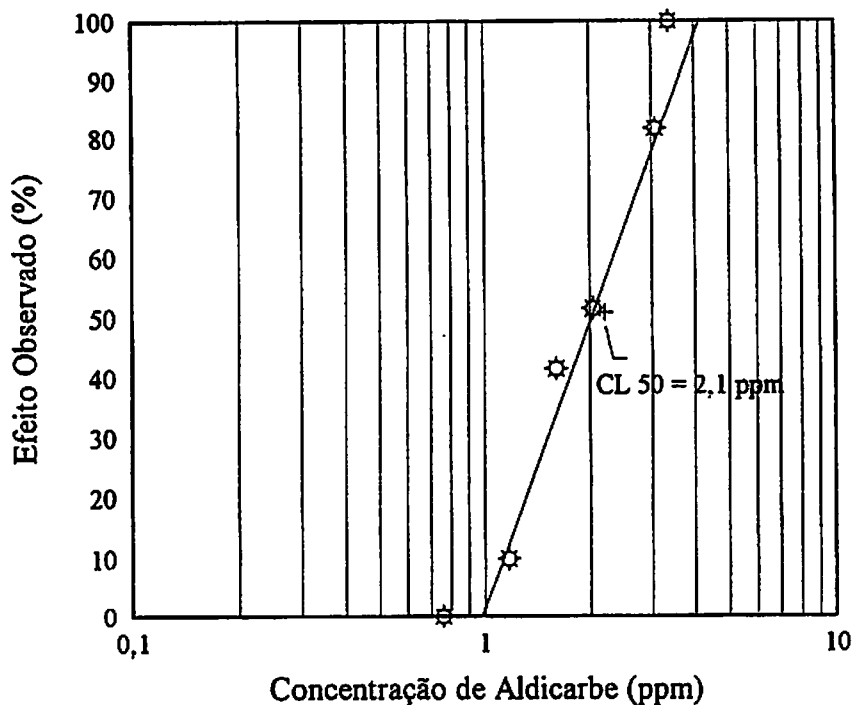


FIGURA 3 - Representação gráfica das concentrações de aldicarbe x efeito letal observado sobre o *Brachydanio rerio*.

Através do gráfico representado na figura acima, obteve-se também, os valores da  $CL_{24} = 3,45$  ppm e da  $CL_{16} = 1,15$  ppm, de acordo com o método e das normas anteriormente citadas.

#### 4.5.2 - Determinação da $CL_{50}$ , 96 h do aldicarbe para *O. franciscensis*

A tabela 7 abaixo demonstra a faixa de concentração na qual ocorreram mortes de 0% a 100%.

TABELA 7 - Porcentagem média de mortalidade de *Orthospinus franciscensis* em diferentes períodos, após exposição ao inseticida aldicarbe, nos laboratórios do CETEC, 1997.

concentração (ppm)	n° inicial de peixes	n° de peixes mortos por período (h)						% mortes 96 h
		3	6	24	48	72	96	
100	20	20	-	-	-	-	-	100
32	20	20	-	-	-	-	-	100
10	20	0	8	20	-	-	-	100
3,2	20	0	6	20	-	-	-	100
1	20	0	0	0	2	6	12	60
controle	20	0	0	0	0	0	0	0

Dessa forma pôde-se definir a faixa de concentração que foi utilizada nos testes definitivos. Utilizando-se da tabela proposta em L5.019-I da CETESB, definiu-se as concentrações entre 3,2 ppm e 0,56 ppm, mais o grupo controle, para os testes definitivos. Nesses testes calculou-se a  $CL_{50}$  baseando-se nos resultados obtidos pelos 5 testes realizados com a espécie.

A tabela 8 apresenta o percentual de mortes ocorridas após 96 horas de exposição dos peixes ao aldicarbe nas concentrações testadas, nos referidos testes.

TABELA 8 - Número de peixes *Orthospinus franciscensis* afetados pelo inseticida aldicarbe, em relação às respectivas concentrações após 96 horas de exposição, nos testes realizados (t1 a t5)

Concentração (ppm)	n° inicial de peixes	n° de peixes mortos após 96 h					total	% mortes 96 h
		teste 1	teste 2	teste 3	teste 4	teste 5		
3,2	100	20	20	20	20	20	100	100
2,4	100	20	20	20	20	20	100	100
1,8	100	20	20	20	20	20	100	100
1,3	100	18	17	20	19	18	92	92
1	100	10	9	10	10	11	50	50
0,56	100	0	1	1	0	1	3	3
controle	100	0	0	0	0	0	0	0

A  $CL_{50}$  encontrada para espécie *O. franciscensis* foi de 0,95 ppm com um intervalo de confiança, de 0,84 a 1,07 ppm ao nível de 95% de probabilidade.

De acordo com a representação da Figura 4, pode-se verificar o efeito letal observado sobre o *O. franciscensis* referente às respectivas concentrações de aldicarbe após 96 horas de exposição.

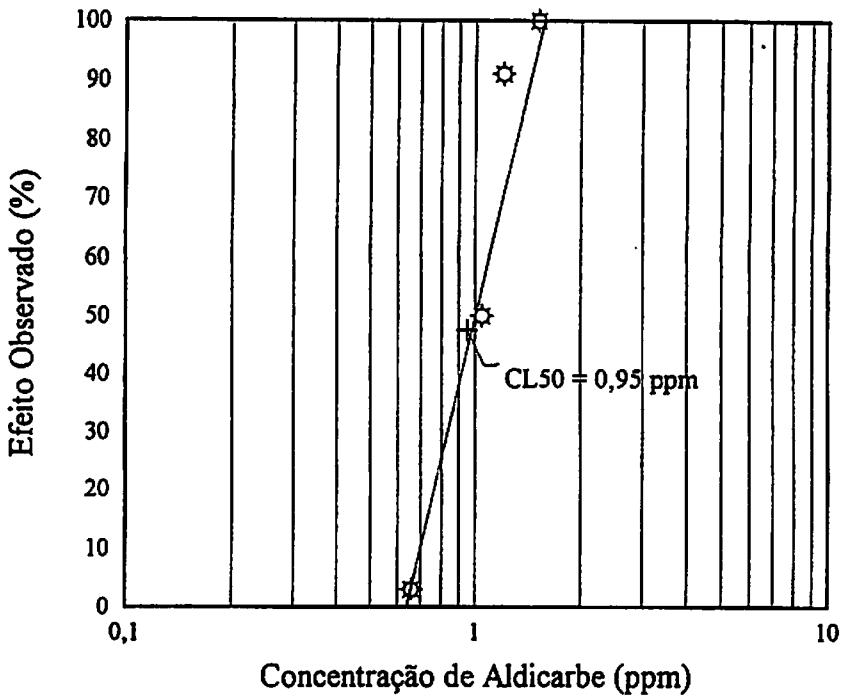


FIGURA 4 - Representação gráfica das concentrações de Aldicarbe x efeito letal observado sobre a espécie *Orthospinus franciscensis*.

Da mesma forma que para a espécie anterior, obteve-se os valores de  $CL_{16} = 0,78$  ppm e  $CL_{84} = 1,15$  ppm seguindo-se o método proposto.

#### 4.5.3 CL<sub>50</sub>, 96 h obtidos para as espécies na fase adulta

A CL<sub>50</sub> obtida para a espécie regional *O. franciscensis* foi de 0,95 ppm (0,84 - 1,07 ppm), e para a espécie padrão *B. rerio* foi de 2,1 ppm (1,8 - 2,33 ppm). A análise comparativa desses resultados mostra uma maior resistência ao inseticida, por parte do *B. rerio* em relação a *O. franciscensis*. Os valores de LC<sub>50</sub>, 96 h encontrados para diferentes espécies de peixes variaram entre 0,05 e 2,4 ppm a diferentes temperaturas e dureza da água. Essas diferenças apontaram variações de sensibilidade entre as espécies indicando não ser aconselhável a realização de bioensaios apenas com a espécie padrão *B. rerio*, uma vez que os valores obtidos para a mesma podem não ser representativos para espécies regionais. Tais observações estão de acordo com Fanta (1997), a qual analisou os resultados obtidos de testes de toxicidade com organofosforados sobre diversas espécies de peixes, concluiu que informações apresentadas de forma genérica são inadequadas, já que há significativas variações específicas para a sensibilidade, intensidade ou rapidez com que os efeitos se manifestam.

Gallo (1995), trabalhando com *B. rerio*, obteve uma CL<sub>50</sub>, 96 h de 10 ppm, para o inseticida aldicarbe. Esse resultado indica que a população de *B. rerio*, na qual sua equipe trabalhou, apresentou uma maior resistência ao aldicarbe que a do presente trabalho. Tal variação de resultados pode estar associada a diferenças nutricionais das populações, bem como a outros fatores ambientais. Para se evitarem variações de resultados, os laboratórios que executam tais ensaios devem recorrer à intercalibração entre laboratórios, utilizando-se uma substância de referência que pode ser o dicromato de potássio.

Da mesma forma, conforme já mencionado sobre a toxicidade do aldicarbe, WHO (1991) apontou que a toxicidade desse produto para organismos

de água doce possui grande variação, dependendo da temperatura e dureza da água.

#### 4.6 Experimento com ovos de *B. rerio*

Ocorreram mortes de embriões nos ovos expostos ao aldicarbe, em todas as concentrações testadas (Tabela 9). Foram considerados mortos aqueles embriões que não mais apresentaram batimentos cardíacos e circulatórios.

TABELA 9 - Número de ovos de *Brachydanio rerio*, mortos diários e porcentagem acumulada de mortalidade até 96 horas de exposição a diferentes concentrações do aldicarbe.

concentração (ppm)	n° inicial de ovos	n° de ovos mortos por período (horas)				% mortes até 96 h
		24	48	72	96	
5	30	0	20	30	30	100
3,2	30	0	6	8	15	50
2,4	30	0	9	9	13	43,4
1,8	30	0	7	8	14	46,7
1,3	30	0	3	5	11	36,6
1	30	0	7	8	10	33,3
0,56	30	0	2	2	3	10
controle	30	0	0	0	0	0

Após 48 horas do início do experimento, todas as larvas do grupo controle haviam eclodidas.

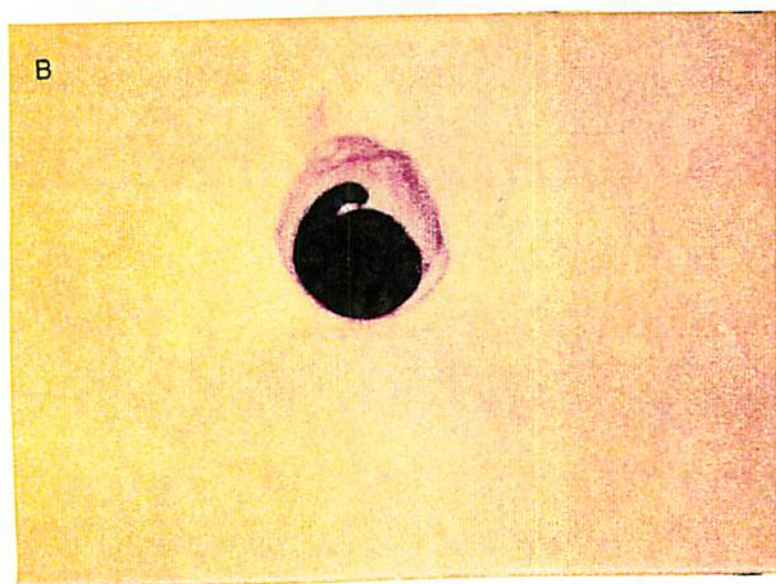
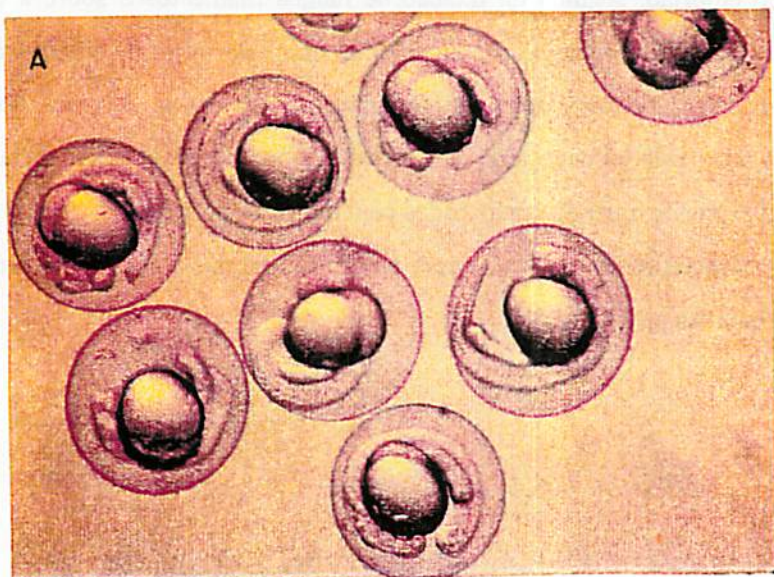
Os principais efeitos observados nos tratamentos com aldicarbe foram:

a) morte do embrião, com o cessar de movimentos cardíacos e circulatórios;



b) morte do embrião, seguida da fixação de fungos filamentosos sobre a casca dos ovos; c) impossibilidade de rompimento da casca do ovos; d) dificuldade de liberação da casca do ovo, após seu rompimento pela larva. A casca do ovo permanecia envolvida na cabeça da larva; e) atraso no tempo de eclosão, para os organismos expostos, quando comparados com o grupo controle.

As características dos ovos com embriões normais, afetados e mortos, estão apresentadas na Figura 5.



---

FIGURA 5 - Ovos de *Brachydanio rerio*, sendo A = ovos normais com embriões vivos e B = ovo contendo embrião morto.

#### 4.7 Experimento com larvas de *B. rerio*

No experimento com as larvas de *B. rerio*, observou-se mortes apenas nas concentrações de 5 e 10 ppm, conforme pode ser observado na Tabela 10.

TABELA 10 - Número de larvas de *Brachydanio rerio*, mortas diárias e porcentagem acumulada de mortalidade até 96 horas de exposição a diferentes concentrações do aldicarbe.

Concentração (ppm)	n° inicial de larvas	n° de larvas mortas por período (h)			
		24	48	72	96
10	30	30	-	-	-
5	30	30	-	-	-
3,2	30	0	*0	0	0
2,4	30	0	*0	0	0
1,8	30	0	*0	0	0
1,3	30	0	*0	0	0
1	30	0	*0	0	0
0,56	30	0	0	0	0
controle	30	0	0	0	0

\* Início de efeitos visíveis na locomoção e deformação da coluna vertebral.

Nas concentrações menores que 3,2 ppm não se constatou mortes das larvas durante as 96 horas de exposição; porém, observou-se efeitos sobre o comportamento e deformações na coluna vertebral. Após 48 horas de exposição das larvas ao inseticida, detectou-se modificações comportamentais de

locomoção, com as larvas apresentando hipoatividade, pouca resposta a estímulos externos quando provocados pela aproximação de um estilete e deformações na coluna vertebral. Todas as reações detectadas foram comparadas com as reações do grupo controle, que serviu de base comparativa do padrão normal de comportamento.

As deformações detectadas na morfologia externa das larvas variaram desde pequenos desvios em forma de ângulo, até deformações em forma de “S”, bastante retorcido. Dentre essas deformações detectadas, as de maior intensidade ocorreram nas concentrações maiores, diminuindo gradativamente até a concentração de 1 ppm, na qual os efeitos eram de pouca intensidade, porém detectáveis. Também observou-se em alguns casos uma grande dilatação da região abdominal. Na concentração de 0,56 ppm não foi detectado efeito na locomoção e nem de deformação aparente na coluna vertebral durante as 96 horas. Os efeitos observados sobre a coluna vertebral e na região abdominal das larvas, comparados com a estrutura de uma larva normal, estão apresentados na Figura 6.

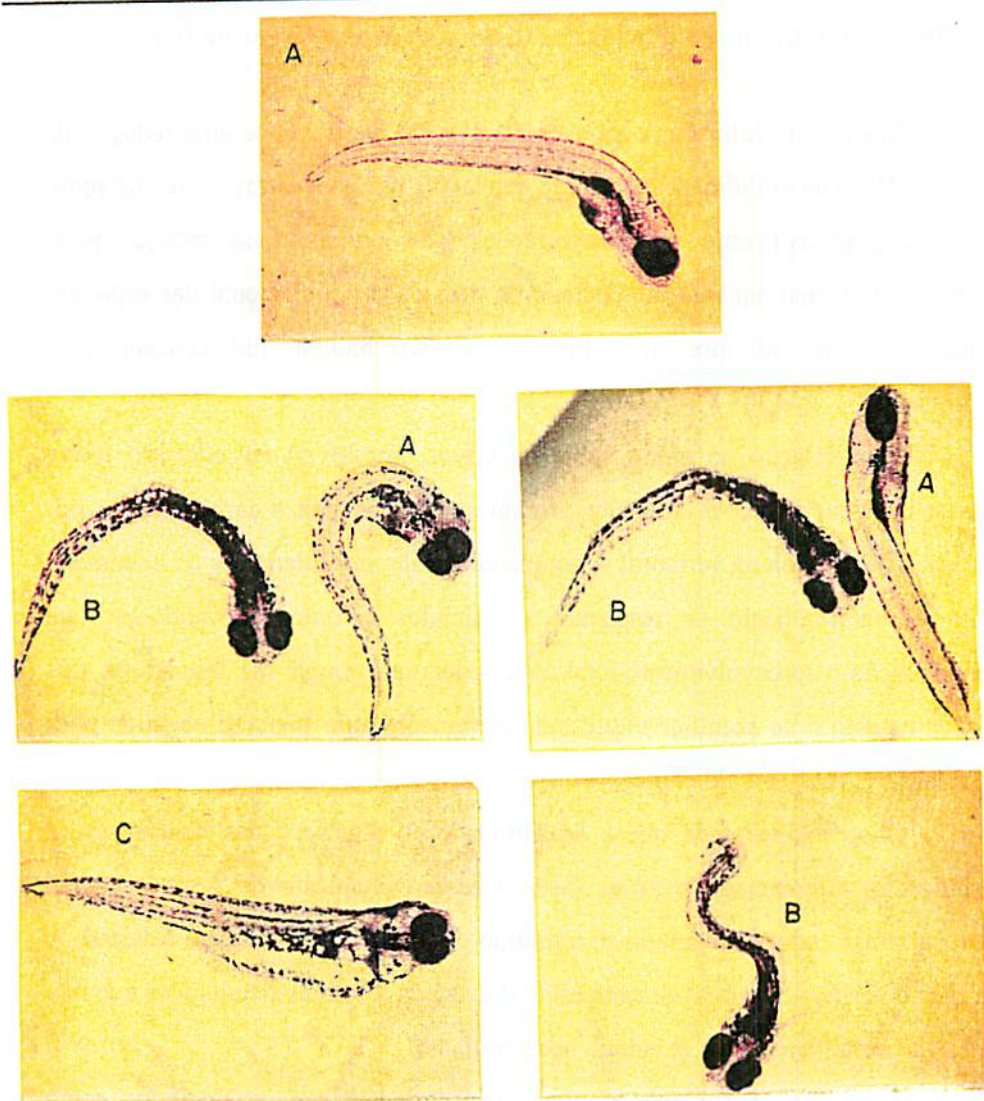


FIGURA 6 - Comparação entre larvas de *Brachydanio rerio* normais e afetadas pelo aldicarbe. A = larvas normais; B = larvas afetadas na morfologia longitudinal e C = larvas com abdômem dilatado.

#### **4.8 Discussão sobre os resultados dos testes com ovos e larvas de *B. rerio***

Nos testes realizados com ovos de *B. rerio*, verificou-se uma redução de cerca de 50 % na viabilidade de eclosão das larvas nas concentrações de 3,2 ppm, decaindo gradativamente em concentrações mais baixas. Essa redução pode implicar, de forma análoga, no declínio da densidade populacional das espécies, quando expostas ao inseticida aldicarbe em seu habitat, nas concentrações observadas.

Com relação ao efeito sobre as larvas, apesar de ter ocorrido morte apenas nas concentrações mais altas, foram registrados efeitos caracterizados por deformações na coluna vertebral e, em menor escala, por dilatações no abdômem, além de retardamento de respostas a estímulos externos. Levando-se em consideração o desenvolvimento total do indivíduo até atingir sua fase adulta, tais efeitos tendem a se acentuar implicando novamente num impacto negativo para população exposta ao aldicarbe.

Observou-se ainda que a sensibilidade ao aldicarbe nas concentrações testadas foi diferenciada entre as fases de desenvolvimento de *B. rerio*, sendo maior na fase adulta, seguindo-se o estágio de ovo e posteriormente o larval. A gradação verificada provavelmente está relacionada a fatores fisiológicos que não se constituíram em objeto de estudo neste trabalho.

Todos os efeitos relatados nos testes podem ser considerados como decorrentes da presença do inseticida-nematicida aldicarbe, uma vez que os testes controle não apresentaram reações ou efeitos considerados anormais.

#### 4.9 Determinação do fator de bioconcentração

Os resultados das análises do inseticida aldicarbe nos peixes utilizados nos experimentos, podem ser observados na Tabela 11, na qual é relacionada a concentração da água em que os peixes foram expostos, com as respectivas concentrações analisadas nos peixes.

TABELA 11 - Concentração de aldicarbe nos peixes testados após 96 horas de exposição a este inseticida.

Concentração Nominal (ppm)	Concentração analisada (ppm)	
	<i>Brachydanio rerio</i>	<i>Orthospinus franciscensis</i>
0,56	1,03	1,02
1,0	1,38	1,62
1,3	1,46	1,70
1,8	2,47	2,52
2,4	2,39	3,06
3,2	3,27	3,73
Controle	0	0

De posse dos valores de concentração obtidos nos peixes e nas soluções às quais foram expostos, obteve-se o fator de bioconcentração. Esse fator determina se a substância testada possui tendência a se acumular nos organismos testados. Os resultados dos cálculos de bioconcentração mostraram um fator de bioacumulação próximo de 1, como apresenta a Tabela 12.

TABELA 12 - Fator de bioconcentração de aldicarbe nos peixes testados, após 96 horas de exposição ao inseticida-nematicida, em suas respectivas concentrações.

Conc.Nominal (ppm)	Fator de bioconcentração	
	<i>B. rerio</i>	<i>O. franciscensis</i>
0,56	1,35	1,54
1,0	1,18	1,54
1,3	0,91	1,41
1,8	1,21	1,66
2,4	0,77	1,26
3,2	0,96	1,16
Controle	0	0



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 5.1 Implicações das concentrações de aldicarbe sobre peixes no meio ambiente

Tomando como referência as concentrações de aldicarbe encontradas em monitoramentos de águas provenientes de poços e rios, segundo levantamento teórico (Zaki et al., 1982; Pridlle et al., 1992 e Rigitano, 1995) nota-se que estes valores são inferiores aos valores de  $CL_{50}$  obtidos com o *B. rerio* e *O. franciscensis*. Desta forma, pode-se considerar que tais concentrações verificadas naqueles ambientes naturais não causariam, até então, efeitos visíveis sobre *O. franciscensis* e *B. rerio*.

Todavia, há que se considerar que a crescente utilização do produto em regiões próximas a reservatórios d'água, às vezes em quantidades e frequência muito acima do recomendado pelo receituário e pelo fabricante, pode fazer com que a concentração nos lagos e riachos atinjam níveis cada vez mais elevados de concentração, podendo provocar danos à biota aquática. Os efeitos tóxicos decorrentes da presença de pesticidas nos ecossistemas aquáticos podem variar, de danos complexos à biota a pequenos efeitos a níveis de população, conforme citado por Belo Horizonte (1996). Tal fato pôde ser observado nos testes com ovos e larvas expostos ao aldicarbe, através dos parâmetros 'dificuldades de locomoção e deformações na coluna vertebral'. Tais efeitos tomam os organismos, ainda que sobreviventes à toxicidade, vulneráveis a predadores além de outros problemas de ordem fisiológica. Landau e Tucker (1984) relataram que a população de *Centropomus undecimalis* Bloch, 1792 na Flórida, tem-se reduzido nos últimos anos e que, talvez, muitos inseticidas, incluindo o aldicarbe, vêm contribuindo para isso.

## 5.2 Bioacumulação nas espécies testadas

O fator de bioacumulação próximo de 1 comprova a teoria citada por WHO (1991), de que o aldicarbe não é acumulativo para animais. Algumas entidades de fiscalização e defesa do meio ambiente de outros países, entre eles o Japão, consideram o fator limite de bioconcentração de 1.000, acima do qual a substância é considerada acumulativa (Hernández, 1992). As concentrações encontradas nos peixes foram muito próximas das concentrações encontradas na água, às quais os peixes estavam expostos. Esses resultados sugerem que o inseticida possui facilidade de penetração no organismo, apesar de não se acumular. Diante desta hipótese, faz-se necessária a realização de estudos de efeitos crônicos, ou seja, ensaios laboratoriais de exposição prolongada dos peixes a baixas concentrações do aldicarbe, para avaliação de efeitos fisiológicos causados pela presença do inseticida.

## 6 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

- As espécies de peixes de pequeno porte, *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819), *Oligosarcus argenteus* Gunther, 1864 e *Orthospinus franciscensis* (Eigenmann, 1929), podem ser utilizadas em testes de toxicidade.
- A espécie *Brachydanio rerio* foi cerca de duas vezes mais tolerante ao aldicarbe que a *O. franciscensis*
- A fase adulta de *B. rerio* foi mais sensível ao aldicarbe, seguida pelo estágio de ovo e pela fase larval.
- As respostas das larvas de *B. rerio* a estímulos externos foram reduzidas devido aos efeitos do inseticida aldicarbe.
- O aldicarbe não permitiu ao embrião de *B. rerio* romper a casca do ovo, inviabilizando sua eclosão.
- O aldicarbe não se acumulou nas espécies testadas.

## 7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABIA (Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação) Portaria Nº 16 - DINAL/MS de 13 de Março de 1990. Revisão 4, p.3153 - 3156. 1990.
- ALABASTER, J.S. Survival of fish in 164 herbicides, inseticides, fungicides, weeting agents and miscellaneous substances. *Int. Pest. Control*, v.11, p.29-35, 1969.
- ALABASTER, J.S. *Water quality criteria for freshwater fish*. London: Butterworthes. 127p. 1980.
- ALVES, A. Consumo: usos e abusos. *Ciência Hoje*, v. 4, n.22, p. 49-52, jan./fev., 1986.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12714 *Ensaio de toxicidade aguda com peixes: Parte I - sistema estático*. Rio de Janeiro, 1993. 15 p.
- AXELROD, H.R. *Atlas de peixes de aquário de água doce*. TFH Publications: 1990. 1024p.
- BARBOSA,T.M.L. *Estudos em laboratório sobre a degradação do inseticida nematicida aldicarbe em quatro diferentes solos*. Lavras: ESAL, 1991. 85p (Dissertação de Mestrado em Fitossanidade).

**BARBOSA, T.M.L.; RIGITANO, R.L.O.** Influência da classe e profundidade do solo na degradação do inseticida-nematicida aldicarbe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.6, p.955-960, jun. 1994.

**BELO HORIZONTE.** Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais. **Desenvolvimento de metodologia para diagnosticar causas de mortandade de peixes.** Belo Horizonte: FNMA, 1996. 121p.(Relatório Técnico Final).

**BERTOLETTI, E.** Ensaio biológicos com organismos aquáticos e sua aplicação no controle da poluição. São Paulo: CETESB, 1990.

**BRITISK, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S.** Manual de identificação de peixes da região de Três Marias ( com chave de identificação para os peixes da bacia do São Francisco). Brasília: Câmara dos Deputados/ CODEVASF, 143p. 1988.

**CORRÊA, M.M.** Mobilidade e retenção do inseticida-nematicida sulfona de aldicarbe em colunas de solo de regiões produtoras de batata de Minas Gerais. Lavras: UFLA, 1996. 76p. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Agrícola: Irrigação e Drenagem).

**COX, C.** Aldicarb. **Journal of Pesticide Reform**, v. 12, 1992.sp.

**DORST, J.** Antes que a terra morra. São Paulo. EDUSP, 1973. 394 p.



DUFFUS, J.H. *Toxicologia Ambiental*. Barcelona. Omega, 1983. 173 p.

EDWARDS, C.A. *Environmental Pollution by Pesticides*. New York: 1973.  
542 p.

FANTA, E. Organofosforados - bons para agricultura, ruins para os peixes.  
*Germinis - Boletim informativo do Conselho Federal de Biologia*, v.1,  
p.3 - 4, 1997.

FELLENBERG, G. *Introdução aos problemas da poluição ambiental*. São  
Paulo: EDUSP, 1980. 196 p.

FELSOT, A.S. Enhanced biodegradation of pesticides in soil: implications for  
agroecosystems. *Annual Review of Entomology*. v.34, p. 453-476, 1989.

FOWLER, H.W. Os peixes de água doce do Brasil. *Arquivos de Zoologia*, São  
Paulo: v. 2-6, 1950. 786p.

GALLO, D. ; MERENDINO, A. ; KEIZER, J. ; VITTOZZI, L. Acute toxicity of  
two carbamates to the Guppy (*Poecilia reticulata*) and zebrafish  
(*Brachydanio rerio*). *Science of the Total Environment*, v.171, p.131-136,  
1995.

GIVEN, C.J.; DIERBERG, F.E. Effect of pH on the rate of aldicarb hydrolysis.  
*Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 34, p. 627-  
653, 1985.

- HERNÁNDEZ, L.M.; FERNÁNDEZ, M. A.; GONZÁLEZ, M. J.** Organochlorine pollutants in water, soils, and earthworms in the Guadalquivir river, Spain. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 49, n. 2, p.192-198, aug. 1992.
- HEATH, A.G.; CECH J.J.; ZINKL, J.G.; STEELE, M.D.** Sublethal effects of three pesticides on Japanese Medaka. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 25, p. 485-491, 1993.
- HERRICKS, E.E.** General principles of toxicology. In: **Guidelines of lake management**, v.4, p. 7-26, 1991.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION ISO/DIN 7346-1.** Water quality determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) (Teleostei, Cyprinidae) P-1 - Static method, Geneve: ISO-Draft international Standard, 1993.
- JOHNSON, D.W.** Pesticides residues in fish. In: **Environmental pollution by pesticides**. New York, 1973. 542 p
- JONSSON, C.M.; TOLEDO, M.C.** Bioaccumulation and elimination of endosulfan in the fish yellow tetra (*Hyphessobrycon bifasciatus*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, p.572-577, 1993.

- KAUR, K.; DHAWAN, A. Variable sensitivity of *Cyprinus carpio* eggs, larvae, and Fry to pesticides. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, p.593-599, 1993.
- KUCINSKI, B. O veneno nosso de cada dia. **Ciência Hoje**, v.22, n.4, p.58-62, jan./fev. 1986.
- LANDAU, M.; TUCKER, J.W. Acute toxicity of EDB and aldicarb do yong of two estuarine fish species. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 33, p.127-132, 1984.
- LARA, W. A tolerância tem limites. **Ciência Hoje**, v.4, n.22, p 63-64, jan./fev. 1986.
- LIGHTFOOT, E. N. ; THORNE, P. S.; JONES, R.L.; HANSEN,J.L.;ROMINE, R.R. Laboratory studies on mechanisms for degradation of aldicarb, aldicarb sulphoxide and aldicarbe sulfone. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Elmsford, v.6, p.377-394, 1987.
- LINO, C.M.; NORONHA DA SILVEIRA, M. I. Organophosphorus pesticide residues in cow's milk: levels of cis - mevinfos, methil - paration and paraoxon. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.49, n.2, p.211-216, aug. 1992.
- LITCHFIELD, J. T.; WILCOXON, F. A. A simplified method for evaluating dose effect experiments. **Journal Pharm. Exp. Ther.**, n.96, p.99-113, 1949.



- NEWMAN, M.C. Quantitative methods in Aquatic Ecotoxicology. Lewis Publishers, Boca Ratm, USA,1995. 426p.**
- NOMURA, H. Dicionário dos peixes do Brasil. Brasília, Editerra, 1984. 482p.**
- PANT, J.; TEWARI, H.; GILL, T.S. Effects of aldicarb on the blood and tissues of a freshwater fish. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 38, p. 36-41, 1987.**
- PARANÁ. Instituto Ambiental do Paraná. Manual de métodos para avaliação de toxicidade. Curitiba: IAP, 1997. 90p.**
- PETROCELLI, S.R. Fundamental of aquatic toxicology. New York, Hemisphere Publishing Corporation, p. 335-373, 1985.**
- PIFFER, R. Movimento e degradação de aldicarbe e sulfona de aldicarbe em dois diferentes solos. Lavras: ESAL, 1989. 99p. (Dissertação de Mestrado em Fitossanidade : Entomologia).**
- PIFFER. R.; RIGITANO, R.L.O. Lixiviação e degradação do inseticida aldicarbe em dois diferentes solos. Ciência e Prática, Lavras, v.15, n.4, p.355-363, out./dez. 1991.**
- PINTO-COELHO, R. M. Ecology and human impact on lakes and reservoirs in Minas Gerais with special reference to future development and management strategies. Belo Horizonte, Segrac, 1994. 193 p.**

PRIDDLE, M.W.; MUTCH, J.P.; JACKSON, R.E. Long-term monitoring of aldicarb residues in groundwater beneath a Canadian potato field. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 22, p. 183-189, 1992.

RAO, P.S.C. ; MANSELL, R.S.; BALDWIN, L.B.; LAURENT, M.F. **Pesticides behaviors in soil and wather**. Florida: Soil Science Fact Sheet. 1983. 4 p.

REINCHENBACH - KLINKE, H.H. **Enfermedades de los peces**. Zaragoza, Acribia, 1980. 507p.

RIGITANO, R.L.O.; GOUVEA, A. V. Contaminação de manancial hídrico com resíduos de inseticidas em Maria da Fé - M.G. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA**, 15, Caxambú, 1995. **Resumos...** Lavras: SEB/UFLA, 1995. p.485

SANTOS, G.S.; BARBOSA, P.M.M.; VIEIRA, F. e LÓPEZ, C.M. Fish and zooplankton community struture in reservoirs of southeastern Brazil: effects of the introduction of exotic predatory fish In: **ECOLOGY AND HUMAN IMPACT ON LAKES AND RESERVOIRS IN MINAS GERAIS. WITH SPECIAL REFERENCE TO FUTURE DEVELOPMENT AND MANAGEMENT STRATEGIES**. Belo Horizonte, Segrac, 1994. 193 p

SÃO PAULO. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Análise estatística de testes de toxicidade aguda, Procedimento L5.017**. São Paulo: 1990. 20p.

- SÃO PAULO. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos. São Paulo: 1995. 207p.**
- SÃO PAULO. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo: 1990. 17p.**
- SCORZA JÚNIOR, R. P. Avaliação dos modelos matemáticos CALF e PAESTLA para simulação da lixiviação do inseticida-nematicida sulfona de aldicarbe em um latossolo Vermelho Amarelo na região de Lavras, M.G. Lavras: UFLA, 1997. 87p (Dissertação de Mestrado em Agronomia, Entomologia)**
- SOUZA, E.R. Alterações físico-químicas no deflúvio de três sub-bacias hidrográficas decorrentes da atividade agrícola. Lavras: UFLA, 1996. 91p. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Florestal).**
- SRIVASTAVA, S.K.; JAISWAL, R.; SRIVATAV, A.K. Acute toxicity of chlorpyrifos to a freshwater catfish *Heteropneutes fossilis*. *Journal of Advanced Zoology*. v.16, p. 92-95, 1995.**
- TOLEDO, M.C.F.; JONSSON,C.M.; YOKOMIZO,Y. Toxicidade e acúmulo de Endosulfan em Paulistinha ( *B. rerio*) In: ENCONTRO NACIONAL DOS ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS, 13, São Paulo, 1989. Instituto Adolfo Lutz, p.103 - 128.**

**UNION CARBIDE PRODUTOS AGROPECUÁRIOS Temik-defensivo agrícola aldicarb: uma avaliação científica. s.l. Union Carbide do Brasil. Divisão de Produtos Agropecuários, 1983. 63 p.**

**VAZZOLER, A. E. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá: Nupélia, 1996. 169 p.**

**VEIGA, L.F. Noções básicas de toxicologia ambiental. Petrobras/CENPES/DITER/SEBIO, 1994.**

**VIEIRA, S.; HOFFMAN, R. Estatística Experimental. São Paulo: Atlas, 1989. 177p.**

**WORLD HEALTH ORGANIZATION. IPCS Aldicarb. Geneva: 1991. 130 p.**

**WORLD HEALTH ORGANIZATION. IPCS Toxicological Assessment of Pesticide Residues in Food. Geneva: 1990. 117 p.**

**ZAGATTO, P.A.; GOLDSTEIN, E.G.; BERTOLETTI, E.; NAVAS – PEREIRA, D. Determinação da toxicidade aguda de biocidas a peixes: *Brachydanio rerio*, *Poecilia reticulata* e *Hemigrammus marginatus*. *Ciência e Cultura*, v. 33, supl., p. 525, 1981.**

**ZAKI, M.H.; MORAN, D.; HARRIS, D. Pesticide in groundwater. The aldicarb story in Suffolk Country. *American Journal of Public Health*, New York, v.72, p.1319- 1395, 1982.**

ZAMBRONE, F. A. D. Perigosa Família. *Ciência Hoje*, v.4, n.22, p 44-47,  
jan./fev., 1986.

## ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1 - Concentração de aldicarbe nas soluções-teste utilizadas com <i>Orthospinus franciscensis</i> , nos laboratórios do CETEC, 1997.....	42
TABELA 2 - Concentração de aldicarbe nas soluções-teste utilizadas com <i>Brachydanio rerio</i> nos laboratórios do CETEC, 1997.....	42
TABELA 3 - Concentração de aldicarbe nas soluções utilizadas nos testes com ovos e larvas de <i>Brachydanio rerio</i> , nos laboratórios do CETEC, 1997.....	43
TABELA 4 - Variação máxima dos dados físico-químicos das soluções utilizadas nos testes.....	44
TABELA 5 - Porcentagem média de mortalidade de <i>Brachydanio rerio</i> em diferentes períodos, após exposição ao inseticida aldicarbe, nos laboratórios do CETEC, 1997.....	46
TABELA 6 - Mortalidade de <i>Brachydanio rerio</i> , nos testes 1, 2 e 3, pelo inseticida aldicarbe em relação às respectivas concentrações.....	46
TABELA 7 - Porcentagem média de mortalidade de <i>Orthospinus franciscensis</i> em diferentes períodos, após exposição ao inseticida aldicarbe, nos laboratórios do CETEC, 1997.....	48
TABELA 8 - Número de peixes <i>Orthospinus franciscensis</i> afetados pelo inseticida aldicarbe, em relação às respectivas concentrações após 96 horas de exposição, nos testes realizados (t1 a t5).....	49
TABELA 9 - Número de ovos de <i>Brachydanio rerio</i> , mortos diários e porcentagem acumulada de mortalidade até 96 horas de exposição a diferentes concentrações do aldicarbe.....	52

...Continua...

<b>TABELA 10 - Número de larvas de <i>Brachydanio rerio</i>, mortas diárias e porcentagem acumulada de mortalidade até 96 horas de exposição a diferentes concentrações do aldicarbe.....</b>	<b>55</b>
<b>TABELA 11 Concentração de aldicarbe nos peixes testados após 96 horas de exposição a este inseticida.....</b>	<b>59</b>
<b>TABELA 12 - Fator de bioconcentração de aldicarbe nos peixes testados, após 96 horas de exposição ao inseticida-nematicida, em suas respectivas concentrações.....</b>	<b>60</b>

FIGURA 1	Ilustração da espécie <i>Orthospinus franciscensis</i> .....	15
FIGURA 2	Ilustração da espécie <i>Brachydanio rerio</i> A, macho ; B, fêmea.....	15
FIGURA 3	- Representação gráfica das concentrações de aldicarbe x efeito letal observado sobre o <i>Brachydanio rerio</i> .....	47
FIGURA 4	- Representação gráfica das concentrações de aldicarbe x efeito letal observado sobre a espécie <i>Orthospinus franciscensis</i> .....	50
FIGURA 5	- Ovos de <i>Brachydanio rerio</i> , sendo A = ovos normais com embriões vivos e B = ovo contendo embrião morto.....	54
FIGURA 6	- Comparação entre larvas de <i>Brachydanio rerio</i> normais e afetadas pelo aldicarbe. A = larvas normais; B = larvas afetadas na morfologia longitudinal e C = larvas com abdômem dilatado.....	57



