

**UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA DA REGIÃO DE CHAPECÓ**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais

Dórys Angela Cordenunzi

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO INSETICIDA METIL PARATION  
E EXTRATO DE CINAMOMO (*Melia azedarach L.*)  
EM UMA ESPÉCIE DE PEIXE**

Chapecó – SC, 2011

**DÓRYS ANGELA CORDENUNZZI**

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO INSETICIDA METIL PARATION  
E EXTRATO DE CINAMOMO (*Melia azedarach L.*)  
EM UMA ESPÉCIE DE PEIXE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Comunitária da Região de Chapecó, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Jacir Dal Magro

Chapecó - SC, set. 2011



## **AGRADECIMENTOS**

Aos professores Luis Flávio de Souza Oliveira, Gilza Maria de Souza Franco e Jacir Dal Magro pela amizade e orientação.

À Universidade Comunitária da Região de Chapecó – UNOCHAPECÓ, por disponibilizar os recursos que se fizeram necessários para a realização desta jornada.

À Secretária de Estado da Educação – SED, do Estado de Santa Catarina pela concessão da bolsa de estudo do Programa FUMDES.

## RESUMO

A utilização de metil paration, pesticida organofosforado, tem sido recomendada em pisciculturas para o controle de predadores aquáticos em tanques de produção e recepção de larvas de peixe. Entre os produtos que podem apresentar grande eficácia no controle de predadores e resultar em menor impacto ao meio ambiente está o pesticida natural azadiractina, isolado de plantas da família *Melia azedarach* L., a qual pertence o cinamomo. O presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos do pesticida metil paration e do extrato de cinamomo sob a ótica toxicológica, pela avaliação da toxicidade aguda 96 horas em *Pimelodus maculatus*, pintado amarelo; desenvolver e validar metodologias em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) avaliando os principais parâmetros de validação: linearidade, especificidade, precisão, exatidão, robustez, limites de detecção e quantificação, além de estudar a bioacumulação, através da análise residual em amostras de tecido muscular e cérebro. O experimento da bioacumulação foi conduzido durante 10 dias utilizando *Pimelodus maculatus*, pintado amarelo. A  $CL_{50-96\text{ h}}$  para o metil paration foi  $10,87\text{ mg.L}^{-1}$  e  $212,23\text{ mg.L}^{-1}$  para o extrato de cinamomo. Sinais clínicos de intoxicação do pintado amarelo ao metil paration foram observados após 24 horas de exposição, verificando espasmos musculares, natação irregular e perda de equilíbrio. Durante as 96 horas de exposição ao extrato de cinamomo os animais permaneceram no fundo do aquário. Os limites de detecção e quantificação variaram de  $0,000341$  a  $0,000584\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  (metil paration);  $4,6$  a  $14,18\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  (azadiractina). O método analítico desenvolvido mostrou-se rápido, sensível, robusto, seletivo e eficiente. Não foi detectado, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) o composto azadiractina no extrato de cinamomo. Na avaliação da concentração de metil paration, nas amostras de tecido muscular por CLAE, para o experimento de bioacumulação, foi observado decréscimo para as concentrações testadas no decorrer dos cinco dias do experimento. Foi detectado a presença do pesticida nas amostras de cérebro, porém o fator de bioacumulação não foi calculado devido a dificuldade de quantificar com precisão e exatidão sua concentração final. A excreção de substâncias tóxicas pelos organismos obedece a uma cinética de primeira ordem, desta forma o fator de bioacumulação pode ser uma ferramenta no controle de qualidade para piscicultura, orientando quanto ao tempo de exposição, concentração e o período de carência para sua eliminação.

Palavras-chave: *Pimelodus maculatus*. Toxicidade. Validação.

## ABSTRACT

The use of methyl parathion, organophosphate pesticides has been recommended in fish ponds to control aquatic predators in the production and reception of fish larvae. Among the products that may have greater efficacy in control and result in less impact on the environment Azadirachtin is isolated from plants of the family *Melia azedarach L.*, which belongs to the cinnamon. The objectives of this study were to evaluate the acute toxicity 96 hours the pesticide methyl parathion and *Melia azedarach L.*, of acute toxicity by in *Pimelodus maculatus*; develop and validate methodologies in high performance liquid chromatography (HPLC) for evaluating the main validation parameters: linearity, specificity, precision, accuracy, robustness, limits of detection and quantification and experimental protocol for studying the process of bioaccumulation through the residual analysis in tissue muscle and brain. The study was conducted during 10 days using *Pimelodus maculatus*. Estimated values of the C50 methyl parathion is 10,87 mg.L<sup>-1</sup> and 212,23 mg.L<sup>-1</sup> for the *Melia azedarach L.* Clinical signs of intoxication to Methyl parathion were observed after 24 hours of exposure checking muscle spasms, erratic swimming and loss of balance. During 96 hours of exposure to *Melia azedarach L.* extract the animals remained in the bottom of the aquarium. The method was validated and the intermediate precision (< 15 %) was shown to be satisfactory. The detection and quantification limits ranged from 0,000341 a 0,000584 µg.L<sup>-1</sup> (Methyl parathion); 4,6 a 14,18 µg.L<sup>-1</sup> (Azadirachtin). The results obtained in the validation in showed that method is fast, simple and very sensitive. Was not detected by high performance liquid chromatography (HPLC) azadirachtin in the compound. In assessing the concentration of methyl parathion, in the samples of muscle tissue by HPLC, tested in the course for bioaccumulation experiment was observed to decrease the concentrations tested in the course of the five days of the experiment bioaccumulation was observed to decrease the concentrations tested in the course of the five days of the experiment. Detected the presence of the pesticide in samples of brain, but the bioaccumulation factor was not calculated due to the difficulty to quantify with precision and accuracy its final concentration. The excretion of toxic bodies follows a first order kinetics, thus the bioaccumulation factor can be a tool in quality control for fish farming, advising as to the exposure time, concentration and grace period for its elimination.

Keywords: *Pimelodus maculatus*. Toxicity. Validation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estrutura química do metil paration.....	28
Figura 2-	Exemplares do cinamomo, <i>Melia azedarach L.</i> , na propriedade do Sr. André Colombi.....	29
Figura 3-	Exemplar de <i>Pimelodus maculatus</i> .....	30
Figura 4-	Aclimação dos peixes nas condições dos bioensaios .....	31
Figura 5-	Curva de regressão linear estimada para a mortalidade em <i>Pimelodus maculatus</i> , exposto a diferentes concentrações de metil paration.....	39
Figura 6-	Alterações comportamentais de natação em <i>Pimelodus maculatus</i> , exposto a concentração de 12 mg.L <sup>-1</sup> do inseticida metil paration. Observar perda de equilíbrio (PE).....	40
Figura 7-	Curva de regressão linear estimada para a mortalidade em <i>Pimelodus maculatus</i> , exposto a diferentes concentrações de extrato de cinamomo.....	42
Figura 8-	Perfil cromatográfico do metil paration, contendo somente o pico do padrão analítico, obtido nas condições otimizadas.....	43
Figura 9-	Perfil cromatográfico da azadiractina, contendo somente o pico do padrão analítico, obtido nas condições otimizadas.....	44
Figura 10-	Perfil cromatográfico do metil paration para o ensaio de especificidade.....	45
Figura 11-	Perfil cromatográfico da azadiractina para o ensaio de especificidade.....	45
Figura 12-	Perfil cromatográfico do branco dos reagentes.....	46
Figura 13-	Área do pico em função da concentração de metil paration. Cada ponto da reta corresponde a média de três corridas realizadas para cada concentração.....	47
Figura 14-	Área do pico em função da concentração de azadiractina. Cada ponto da reta corresponde a média de três corridas realizadas para cada concentração.....	47
Figura 15-	Apresentação da equação da reta e coeficiente de determinação. Cada ponto da reta corresponde a média de três corridas realizadas para cada concentração de metil paration.....	49
Figura 16-	Apresentação da equação da reta e coeficiente de determinação. Cada ponto da reta corresponde a média de três corridas realizadas para cada concentração de azadiractina.....	50
Figura 17-	Perfil cromatográfico do Extrato de Cinamomo (A e B) e padrão analítico azadiractina (C).....	50
Figura 18-	Cromatografia de Camada Delgada do extrato alcoólico e bruto de cinamomo. Mancha marrom representa o Triperpenóide Melianona.....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Classificação dos testes para a ANVISA.....	25
Tabela 2-	Soluções Padrão Estoque I.....	34
Tabela 3-	Valores médios e desvio padrão para as variáveis físico-químicas da água, nas concentrações utilizadas no teste de toxicidade aguda em <i>Pimelodus maculatus</i> , pintado amarelo exposto ao metil paration e extrato de cinamomo.....	38
Tabela 4-	Cálculo da exatidão (%) e precisão (DPR) obtida para as concentrações testadas de metil paration e azadiractina .....	48
Tabela 5-	Valores médios e desvio padrão das variáveis físico-químicas da água e biomassa dos animais, para as concentrações utilizadas no experimento de bioacumulação em <i>Pimelodus maculatus</i> (pintado amarelo) exposto ao metil paration.....	53
Tabela 6-	Evolução do fator de bioacumulação em amostras de tecido muscular de <i>Pimelodus maculatus</i> (pintado amarelo) exposto ao metil paration. Os valores estão expressos como média dos 2 aquários.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AChE** – Acetilcolinesterase

**ALT**- Alanina amino transferase

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**AST**- Aspartato amino transferase

**CAS** - Chemical Abstracts Service

**Che**- Colinesterase

**CCD** – Cromatografia em Camada Delgada

**CLAE** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**CL** - Concentração letal

**CL50** - Concentração letal média

**cm** - Centímetro

**CODEX** - Comissão do Codex Alimentarius

**°C**- Graus Celsius

**DL 50** - Dose letal média

**DPR** – Desvio Padrão Relativo

**EEC** – Extrato etanólico dos frutos de cinamomo

**FAO** – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação

**g** – Grama

**h** – Horas

**IBAMA** - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

**IUPAC** - International Union of Pure and Applied Chemistry

**L**- Litro

**LD** - Limite de Detecção

**LQ** – Limite de Quantificação

**IDA** – Ingestão Diária Aceitável

**ISRPC18** - Internal Surface Reverse Phase

**MAPA** - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**mg** - Micrograma

**mL** - Mililitro

**min** - Minutos

**nM** – Nanomolar

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**PA** - Progressão Aritmética

**pH** - Potencial de Hidrogênio Iônico

**ppm** – Partes do milhão

**p/v** – Peso por volume

**v/v** - Volume por volume

**r** – Regressão linear

**RMN-<sup>13</sup>C** - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

**RMN-<sup>1</sup>H** - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

**%** - Porcentagem

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>16</b>
3.1 Agrotóxicos.....	16
3.2 Organofosforados na piscicultura.....	17
3.2.1 Metil paration.....	17
3.3 Bioacumulação de pesticidas.....	18
3.4 A planta <i>Melia azedarach</i> L.....	19
3.5 Ecotoxicologia no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos.....	21
3.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	23
3.7 Validação de Métodos Analíticos.....	24
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
4.1 Local de realização.....	28
4.2 Substâncias teste.....	28
4.2.1 Metil paration.....	28
4.2.2 Obtenção do extrato de cinamomo .....	29
4.3 Organismo teste.....	30
4.4 Aclimação dos Peixes.....	31
4.5 Testes de Toxicidade.....	32
4.5.1 Testes Preliminares.....	32
4.5.2 Teste agudo com peixes 96 horas.....	32
4.6 Análise Cromatográfica.....	33
4.6.1 Equipamentos e condições cromatográficas.....	33
4.6.2 Preparo de soluções estoque padrão analítico.....	33
4.7 Validação dos métodos analíticos.....	34
4.7.1 Identificação.....	34
4.7.2 Especificidade.....	34
4.7.3 Linearidade.....	35
4.7.4 Exatidão e Precisão.....	35
4.7.5 Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).....	35
4.8 Detecção e quantificação de azadiractina no extrato de cinamomo.....	36
4.9 Protocolo experimental de Bioacumulação Direta em peixes.....	36
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
5.1 Caracterização físico-química da água.....	38
5.2 Toxicidade aguda em peixes 96 horas.....	39
5.2.1 Metil paration.....	39
5.2.2 Extrato de Cinamomo .....	41

5.3	Determinações das condições cromatográficas (CLAE).....	42
5.4	Validação dos métodos analíticos.....	44
5.4.1	Especificidade.....	44
5.4.2	Linearidade.....	46
5.4.3	Estudo da Exatidão e Precisão.....	48
5.4.4	Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).....	49
5.5	Detecção da Azadiractina no Extrato de Cinamomo.....	50
5.6	Estimativa do Fator de Bioacumulação para os peixes expostos ao Metilparation no período de acumulação – 5 dias.....	52
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A criação de peixes em tanques é uma prática antiga desenvolvida por trabalho como uma maneira de estabilizar a oferta de alimentos. Vários fatores influenciam para o sucesso dessa atividade, sendo de grande relevância o efeito predatório por larvas de insetos aquáticos e parasitoses nas fases iniciais do desenvolvimento (NEDER, 2005; LOPERA BARRERO et al., 2006; LOPES et al., 2007).

No Brasil, o controle das parasitoses e predadores em piscicultura geralmente é feito com agrotóxicos aplicados sem orientação adequada e indiscriminadamente. Dos agrotóxicos, o metil paration, do grupo dos organofosforados, destaca-se como o inseticida mais empregado para prevenir perdas de alevinos, pela predação por larvas e ectoparasitoses, em tanques de cultivo (MATAQUEIRO, 2002; TOMAZELLI, 2009).

Dependendo das características físico-químicas, o agrotóxico no ambiente aquático pode tanto se ligar ao material particulado em suspensão, como se depositar no sedimento ou ser absorvido por organismos que o degrada ou acumula. Outro tipo de problema bastante comum é a exposição múltipla a mistura de agentes tóxicos. O emprego de misturas é vantajoso em relação à aplicação de um único composto, entretanto, a toxicidade de misturas, não é resultante da soma das atividades tóxicas dos compostos. Ela pode ocorrer, inadvertidamente, porque alguns compostos persistem por longos períodos no meio ambiente (LIMA, 2001; TOMITA; BEYRUTH, 2002).

Esses produtos, além do efeito tóxico aos tecidos dos peixes, principalmente o das brânquias, do tegumento e do fígado, podem acumular resíduos na musculatura, oferecendo risco potencial ao consumidor, caso não sejam respeitados os tempos de carência pós-tratamento. Cabe ainda ressaltar que a utilização de produtos químicos deve ser regida por legislação específica, e no Brasil poucos produtos são registrados para uso em piscicultura (TAVECHIO; GUIDELLI; PORTZ, 2009).

A produção de peixes é inteiramente dependente do ecossistema no qual está inserida, uma vez que os peixes vivem em contato estreito com o seu meio e, por isso, são afetados pelas mudanças causadas por diferentes agentes físicos, químicos e biológicos. Sendo assim, a exploração econômica dos peixes considerada um investimento, requer conhecimentos básicos dos principais fatores que direta ou indiretamente estejam ligados ao ambiente aquático (VALENTI, 2002).

Métodos analíticos tradicionais capazes de avaliar inseticidas organofosforados são realizados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), no entanto esses métodos de análise apresentam alto custo operacional e exigem mão-de-obra especializada, o que torna inviável sua aplicação em larga escala. Além disso, a poluição ambiental associada ao uso de agrotóxicos é especialmente difícil de ser avaliada, pois os eventos de contaminação obedecem a uma dinâmica espacialmente difusa e temporalmente variável. O resultado é um quadro de contaminação baixa e contínua, que nem sempre é captado pelos métodos de *screening* químicos, pois estes registram apenas o instante exato em que foram coletadas as amostras e não acompanham a variação temporal e espacial da contaminação (ARIAS et al., 2007).

Dessa forma, os testes de toxicidade aquática são ferramentas de crucial importância para avaliar e fornecer dados dos possíveis efeitos toxicológicos potenciais do risco associado com a situação no qual o agente químico, o organismo e as condições de exposições estão definidas. Entre as espécies utilizadas para os testes de toxicidade, os peixes são excelentes organismos teste para este tipo de estudo, pois possuem a capacidade de retirar, estocar e bioacumular compostos (MEDEIROS, 2008; RODRIGUES, 2009).

os testes de toxicidade não substituem as análises químicas tradicionais. Enquanto as análises químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas, os testes de toxicidade avaliam o efeito dessas substâncias sobre sistemas biológicos. Assim, as análises químicas e os testes de toxicidade se complementam (COSTA, 2008).

Contraopondo-se a tais efeitos, a utilização de substâncias de origem vegetal como inseticida para o controle de parasitoses e predadores tem sido amplamente estudada. O composto natural mais promissor é a azadiractina, extraída de plantas de nim (*Azadirachta indica*) e do cinamomo (*Melia azedarach L.*), ambas da família Meliaceae. Porém, o emprego de inseticidas botânicos depende da identificação dos compostos ativos, seu modo de ação, produção, formulação, estabilidade, doses, ação sobre inimigos naturais, persistência em campo, testes de toxicidade para registros, entre outros (MARTINEZ, 2003).

Reconhecendo os efeitos negativos do inseticida metil paration, à saúde, e a escassez de informações a respeito dos efeitos causados pelo extrato de cinamomo (*Melia azedarach L.*), considerando-o como uma alternativa para o controle de predadores, na produção de peixes, o presente estudo justifica-se como um instrumento de estudos de avaliação toxicológica dos possíveis danos ambos podem causar no *Pimelodus maculatus*, pintado amarelo quando utilizados em tanques de cultivo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos do extrato padronizado de cinamomo (*Melia azedatach L.*) e do inseticida metil paration no *Pimelodus maculatus*, pintado amarelo sob a ótica toxicológica.

### 2.2 Objetivos Específicos:

- a) Validar o método analítico para metil paration e azadiractina por CLAE;
- b) Utilizar a metodologia para detectar e quantificar a presença do composto azadiractina, no extrato padronizado de cinamomo;
- c) Estimar a concentração letal ( $CL_{50}$ ) no *Pimelodus maculatus* em 96 horas de exposição para o inseticida metil paration e extrato padronizado de Cinamomo;
- d) Desenvolver método analítico por CLAE para análise residual de metil paration em amostras de tecido muscular e cerebral de peixes;
- e) Desenvolver protocolo de Bioacumulação no *Pimelodus maculatus* para o inseticida metil paration.

### **3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### **3.1 Agrotóxicos**

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define agrotóxico como sendo produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, estimuladores e inibidores de crescimento (ANVISA, 2002).

Originalmente, os agrotóxicos eram estáticos, possuíam baixa solubilidade e tinham um forte poder de adesão ao solo. Com a evolução tecnológica, os agrotóxicos passaram a ser mais solúveis em água, mais voláteis e baixa capacidade de adesão, características que aumentaram e prolongaram o potencial nocivo dos agrotóxicos de causar danos à saúde humana e ao meio ambiente (COUTINHO et al., 2005; VEIGA, 2006).

Entre os contaminantes aquáticos decorrentes das atividades antropogênicas, os agrotóxicos são os mais perigosos, justamente pelo fato de terem sido concebidos para eliminar alguma forma de vida e, por isso, atingirem também de modo letal espécies não-alvo (ALBINATI et al., 2009).

Segundo o Decreto nº 4.074 de 2002, que regulamenta a Lei nº 7.802 de 1989, aqueles que solicitam o registro devem submeter informações e dados específicos para que os produtos sejam propriamente avaliados, ao Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento (MAPA), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) – órgãos federais responsáveis pela avaliação e registro de agrotóxicos e afins (OLIVERIA FILHO, 2008).

A Legislação garante que o registro para um novo produto agrotóxico será concedido se a sua ação tóxica sobre o ser humano e o meio ambiente for comprovadamente igual ou menor do que daqueles já registrados para o mesmo fim. O Brasil proibiu o registro de agrotóxicos que revelam características mutagênicas, carcinogênicas, teratogênicas e para os quais o Brasil não disponha de métodos para desativação de seus componentes, de modo a

impedir que os seus resíduos remanescentes provoquem riscos ao meio ambiente e à saúde pública (BRASIL, 1998).

### **3.2 Organofosforados na piscicultura**

A piscicultura é uma atividade importante como fonte de proteína animal para o consumo humano, no entanto, o desenvolvimento da aquicultura nos últimos anos enfrenta problemas relacionados a qualidade da água, doenças infecciosas, ataques de predadores e parasitas que provocam prejuízos devido à redução do crescimento e mortalidade, sendo os insetos aquáticos considerados os que mais causam perdas na fase de alevinagem. Na piscicultura os organofosforados são empregados no controle de odonatas, principal inseto predador de peixes (TOMAZELLI, 2009).

O tratamento dos peixes pode ser feito interna ou externamente. Quando o tratamento é feito de forma externa, pode-se utilizar a administração de inseticidas na água. Esse método é denominado de banho e pode ser de longa ou curta duração, onde os peixes são expostos ao inseticida até total renovação da água. Um tratamento muito empregado é o que se processa em tanques e viveiros de maiores dimensões, que consiste em expor os peixes doentes à baixa concentração do inseticida por tempo indeterminado (MATAQUEIRO, 2002).

Essas substâncias são consideradas não-persistentes, ou seja, uma vez presentes em ambientes naturais decompõem-se em dias ou semanas. Porém, alguns trabalhos mostram que essa afirmativa não é totalmente verdadeira, visto que alguns compostos dessa classe podem persistir em águas de rios, solos e sedimentos, por um período de até 12 meses (BAIRD, 2002; ARAÚJO, 2006).

#### **3.2.1 Metil paration**

O paration metílico (O,O-dimetil O-4-nitrofenil fosforotioato) é um inseticida e acaricida com classificação toxicológica I e ingestão diária aceitável (IDA) de 0,003 mg/kg de peso corpóreo. A modalidade de emprego, segundo a ANVISA, é a aplicação em partes áreas e culturas de bulbos, cereais, frutas em geral, hortaliças, algodão, batata, soja, amendoim,

café, cana-de-açúcar, alfafa e pastagens. Atualmente, está proibido em alguns países ocidentais industrializados, mas ainda é amplamente usado em países em desenvolvimento (MENEZHINI, 2006; LUVIZOTTO-SANTOS, 2009).

No mercado brasileiro o metil paration é comercializado como Bravik<sup>®</sup>, Declare<sup>®</sup>, Folidol<sup>®</sup>, Folisuper<sup>®</sup> 600 BR, Mentox<sup>®</sup>, Paracap<sup>®</sup>, Paration Metílico Pikapau<sup>®</sup> e Paration Pikapau<sup>®</sup>.

Sua atividade depende dos diversos radicais ligados ao átomo de fósforo, às vezes, pequenas modificações nestes radicais podem afetar a toxicidade do composto. A substituição de radicais metil em R1 e R2 por radicais etil aumenta a toxicidade do composto (MENEZHINI, 2006; MACIEL, 2005).

Estes pesticidas possuem efeito tóxico agudo para seres humanos e outros mamíferos, sua ação tóxica deve-se à interação com o organismo de modo a inibir as colinesterases. Nos peixes os órgãos são as brânquias e a pele, pois exibem grande superfície de contato e ambos apresentam células de muco, que possuem papel importante na resistência aos patógenos e as substâncias tóxicas (CRUZ, 2004; STULP et al., 2008).

### **3.3 Bioacumulação de inseticidas**

Bioacumulação é um termo geral que descreve a tomada de um contaminante químico por uma ou mais rotas possíveis (respiração, dieta, via dérmica), a partir de qualquer fonte no ambiente onde tais substâncias estão presentes. A assimilação e a retenção de um contaminante por um organismo podem acarretar a concentração elevada do mesmo, com a probabilidade de causar efeitos deletérios, em função da diminuição da taxa de excreção. Os peixes, por exemplo, assimilam algumas substâncias químicas procedentes de sua alimentação, ou ainda através da ingestão de material particulado adsorvido nos sedimentos ou presente em suspensão nas águas. Em muitos casos, tais substâncias não são metabolizadas pelo peixe e acabam se acumulando nos tecidos adiposos, nos quais sua concentração aumenta com o tempo (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006; GHISELLI; JARDIM, 2007).

Mesmo em concentrações baixas, os inseticidas representam riscos para algumas espécies de organismos aquáticos que podem concentrar estes produtos até 1000 vezes (AZEVEDO; CHASIN, 2004).

Os limites máximos de resíduos de pesticidas, bem como a padronização internacional aplicada aos alimentos são determinados pela Comissão Codex Alimentarius (CODEX), Programa Conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação - FAO e da Organização Mundial da Saúde – OMS. Um excesso de resíduos, segundo os padrões do CODEX, indica dois aspectos: que os pesticidas foram aplicados de maneira inadequada na produção, no processamento ou na armazenagem; e em segundo, que há risco potencial à saúde do consumidor. Entretanto a exposição humana aos riscos associados ao consumo de produtos aquáticos nunca foi explicitamente considerado pelo CODEX, provavelmente pelo fato da magnitude da exposição aos agrotóxicos não ter sido completamente avaliado via produtos aquacultivados (SANTOS, 2009; MACIEL 2005).

Segundo D'Amato et al. (2002), a biomagnificação foi demonstrada em um fiorde no norte norueguês por Ruus et al. (1999) com estudo realizado em uma cadeia alimentar que envolvia os peixes *Ammodytes marinus* e *Gadus morhua* (bacalhau), as focas *Phoca vitulina* e *Halichoerus grypus*, com cinco grupos distintos de organoclorados (PCBs,  $\Sigma$ DDT, Clordanos, HCHs e HCB). Tal estudo demonstrou que o processo de biomagnificação apresentou altas concentrações nos organismo de nível trófico mais elevado. Os dados sugerem que os mecanismos de bioacumulação nos níveis tróficos mais baixos dependem principalmente de fatores físico-químicos como a solubilidade do poluente, enquanto que os níveis tróficos superiores são afetados por fatores bioquímicos, como o metabolismo corporal.

Ao contrário do que ocorre com produtos químicos que geralmente causam aumento da resistência dos parasitas e têm elevado tempo de permanência no ambiente, acredita-se que os extratos vegetais possam causar um desenvolvimento lento de resistência, ser direcionados a espécies-alvo, ser facilmente biodegradáveis e diminuir amplamente a emissão de resíduos ao ambiente (TAVECHIO; GUIDELLI; PORTZ, 2009).

### **3.4 A planta *Melia azedarach* L.**

Na busca de espécies com ação inseticida, a família Meliaceae foi identificada como um dos grupos mais promissores uma vez que maioria de suas espécies tem compostos com ação antialimentar em insetos, o que sugere o seu papel na defesa contra determinados microorganismos e toxicidade geralmente baixa (ARAÚJO, 2009; SEFFRIN et al., 2008).

*Melia azedarach L.*, também conhecida no Brasil como cinamomo ou Santa Bárbara, é originária da Pérsia, Índia e China, encontra-se naturalizada no Brasil onde ocorre com frequência nos ambientes urbano e rural (BORGES, 2005).

Poucos autores têm descrito sobre a biologia de *Melia azedarach L.*, no entanto, baseado em descrições gerais sobre seu habitat, esta planta requer sol aberto para seu desenvolvimento, não sendo tolerante à sombra. Apresenta rápido crescimento podendo alcançar de 6 a 8 metros de altura, em 4 a 5 anos (MACIEL, 2004).

A *Melia azedarach L.*, apresenta uma ampla utilização popular, já teve muitos princípios ativos isolados e várias ações farmacológicas testadas e comprovadas. Entre estas ações destacam-se a atividade antiviral, antimicrobiana, antimalarial, antiparasitária, contraceptiva, antifoliculogênica, citotóxica e inseticida (ARAÚJO, 2009).

A atividade inseticida e repelente é atribuída aos limonoides, como azadiractina que possui ação antialimentar em insetos. Esta substância tem sido isolada de várias plantas da família Meliaceae tais como *Melia azedarach L.* A azadiractina interfere no funcionamento das glândulas endócrinas que controlam a metamorfose em insetos, impedindo o desenvolvimento da ecdise (VIEGAS, 2003; SIMÕES et al., 2007).

Tomazelli et al. (2011) pesquisaram o efeito do Extrato de *Melia azedarach L.* sobre a predação de alevinos de carpa comum (*Cyprinus carpio*) por larvas Odonata (*Neuraeschna* sp.). Este apresentou resultados positivos no controle de larvas de insetos aquáticos.

A eficácia do extrato hexânico dos frutos de *Melia azedarach L.* foi avaliada em bezerros infestados artificialmente com *Boophilus microplus*, carrapato que tem os bovinos como seus principais hospedeiros. Os resultados indicaram que houve interferência da planta no desenvolvimento do carrapato sobre os animais, mas não ocorreu interferência na sua reprodução (BORGES, 2005).

A busca por novos compostos contra o vetor da dengue, Coria et al. apud Araújo (2009) analisaram o efeito dos extratos obtidos das folhas e dos frutos da *Melia azedarach L.* sobre o *Aedes aegypti L.* e verificaram uma atividade tanto larvicida quanto ovicida.

A intoxicação por *Melia azedarach L.* tem sido mencionada no homem e em animais domésticos em consequência da ingestão de folhas e frutos caídos. Neste sentido, Seffrin et al. (2008), avaliaram a ação toxicológica do extrato dos frutos de *Melia azedarach L.*, em ratos nas doses de 2,5, 5,0 e 10% (p/v, mL/kg). Noss resultados não foi observado nenhuma alteração nos níveis plasmáticos das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) quando comparado aos valores encontrados nos animais controles. A administração dos extratos também não causou nenhuma alteração nos níveis plasmáticos de

uréia e creatinina, sugerindo que o extrato de frutos verdes de *Melia azedarach L.*, nas doses testadas não causa toxicidade renal ou hepática.

Experimentos conduzidos na Austrália indicaram que a toxicidade das plantas pode variar de acordo com a área onde crescem e que algumas árvores podem não ser tóxicas. Entretanto, as propriedades fitotóxicológicas dessa planta merecem atenção. A planta contém compostos limonoides conhecidos como meliatoxinas que são tóxicos para os mamíferos, o que torna necessário aprofundar as pesquisas relacionadas à sua toxicidade aos vertebrados antes de se recomendar sua utilização (VIVIAN, 2005; MÉNDEZ, 2006).

### **3.5 Ecotoxicologia no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos**

Na avaliação do impacto de substâncias tóxicas em sistemas aquáticos, as análises químicas são muito importantes, mas são limitadas para a real compreensão dos processos de interações com o meio e a biota. Para suprir estas limitações os testes ecotoxicológicos com organismos aquáticos são utilizados como instrumento para classificação, regulação e mapeamento da contaminação por compostos tóxicos. (MANRIQUE, 2009).

Os testes de toxicidade aquática apresentam-se como mecanismos para a compreensão dos efeitos de impactos antropogênicos sobre este compartimento, utilizando-se de organismos vivos que atuam como bioindicadores. A duração e a frequência da exposição dos organismos ao agente químico também afetará a toxicidade (MAGALHÃES; FILHO, 2008).

As informações obtidas por meio dessa cadeia são essenciais para: determinar os níveis de contaminantes no ambiente e seus destinos; estimar o grau de periculosidade dos contaminantes e seus metabólitos para os organismos vivos; indicar níveis máximos permitidos de contaminantes; diagnosticar e prognosticar o efeito dos contaminantes no ambiente e o efeito das medidas tomadas; controlar e avaliar os riscos ecológicos (COSTA et al., 2008).

Os testes de toxicidade aquática são um conjunto de procedimentos, onde as respostas servem para detectar e avaliar os efeitos de uma ou mais substâncias sobre os fatores ambientais. Os métodos podem ser categorizados de acordo com o tempo de exposição, situação de teste, efeitos a serem avaliados e organismos a serem testados (MOREIRA, 2010).

A escolha do ensaio de toxicidade mais adequado depende do propósito do estudo a ser realizado e deve considerar os seguintes fatores: sensibilidade, importância ecológica e relevância do organismo indicador. Estes são realizados com diversas finalidades, como:

testes que permitem avaliar sua eficácia, regulamentação dos limites aceitáveis de contaminação ambiental, homologação e registro de produtos químicos comerciais utilizados no meio ambiente (HOBOLD, 2005; MEDEIROS, 2008).

A nocividade de uma substância é comumente avaliada pela utilização do teste de toxicidade aguda, devido à facilidade da coleta de dados com o aparecimento rápido dos sintomas logo após o contato. Na toxicidade aguda, determina-se a dose letal média ( $DL_{50}$ ) ou concentração letal média ( $CL_{50}$ ), nos casos de absorção dérmica, inalação ou em ambiente aquático. As provas baseiam-se na verificação do evento letal nas 24 horas que se seguem à administração e no acompanhamento dos sobreviventes até sete dias (BAIRD, 2002).

Várias espécies vêm sendo empregadas em testes de toxicidade, dentre os principais grupos de organismos utilizados em ensaios laboratoriais destacam-se: poliquetas, oligoquetas, microalgas, microcrustáceos, equinóides, bactérias e peixes. Geralmente para a escolha do organismo-teste usa-se os seguintes critérios: disponibilidade e abundância; representação ecológica significativa; conhecimento da sua biologia, fisiologia e hábitos alimentares; estabilidade genética, uniformidade de suas populações; baixo índice de sazonalidade; importância comercial para a região, facilidade de cultivo e adaptação em laboratório (MAGALHÃES; FILHO, 2008).

No contexto da aquicultura, aos testes de toxicidade aguda são desenvolvidos para determinar a toxicidade relativa de uma amostra sobre um organismo aquático selecionado, exposto as várias concentrações desta amostra, em um curto período de tempo. O tempo de exposição geralmente compreende 24-96 horas. Estas podem causar graves distúrbios fisiológicos até a morte por envenenamento (OGA, 2008).

A frequência da exposição também afeta a toxicidade dos compostos químicos. Uma exposição aguda a uma única concentração pode resultar num efeito adverso imediato num organismo, enquanto duas exposições sucessivas cumulativas iguais à exposição aguda podem ter efeito pequeno ou nenhum efeito, devido ao metabolismo do organismo entre as exposições (TOMITA; BEYRUTH, 2002).

O conhecimento ecotoxicológico obtido por método apropriado permitirá: avaliar a extensão do risco; a definição de limites e padrões de qualidade envolvendo um ou mais compartimentos ambientais; estipular metodologias e rastrear a presença de tóxicos nesses compartimentos. O objetivo é apoiar o gerenciamento ambiental e implementar estratégias de controle capazes de minimizar impactos ambientais, mantendo a integridade física, química e biológica dos sistemas envolvidos (GRADVHOL, 2006).

Para Azevedo e Chasin (2004), a ecotoxicologia auxilia a tomada de decisões para intervenções instantâneas ou para formulação de políticas públicas com vistas à proteção da saúde humana e do meio ambiente. Ainda, ações de gestão ambiental que visam proteger a integridade dos meios físicos e bióticos, bem como grupos sociais que deles dependem requerem uma série de medidas, muitas delas com gênese na ecotoxicologia. Dentre estas medidas pode-se citar a toxicovigilância, o controle e fiscalização dos usos e recursos ambientais, bem como o processo de avaliação e licenciamento de operações com potencial poluidor químico.

### **3.6 Cromatográfica líquida de alta eficiência (CLAE)**

Inicialmente os traços de resíduos eram analisados por métodos colorimétricos e cromatográficos não muito sofisticados. Na última década o desenvolvimento tem sido direcionado à necessidade de análises mais rápidas, porém sem o comprometimento do desempenho cromatográfico (MALDANER; JARDIM, 2009).

A Cromatografia líquida de alta eficiência, em menos de trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. As razões para este crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com destaque para a indústria farmacêutica, medicina e aplicações em determinações ambientais (TONHI; COLLINS; JARDIM et al., 2002).

As colunas utilizadas em CLAE são geralmente de aço inoxidável, com diâmetro interno de 0,45 cm para separações analíticas e na faixa de 2,2 cm para preparativas. O comprimento é variável, sendo comum colunas analíticas de 10-25 cm e preparativas em torno de 25-30 cm. O detector mais utilizado para separações por CLAE é o detector de ultravioleta, sendo também empregados detectores de fluorescência, de índice de refração e eletroquímicos, entre outros. Separações analíticas são predominantemente realizadas em fase reversa, como a fase C18 (octadecilsílica), ao passo que são preferidas fases que atuem no modo normal para fins preparativos, em vista de que separações no modo reverso utilizam fases móveis aquosas (DEGANI, 1998; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Os desenvolvimentos significativos alcançados nas últimas décadas, foram consequências do uso de colunas mais curtas associadas a vazões mais elevadas de fase móvel. Sistemas que consistem de uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase

móvel de maior polaridade. Estas fases apresentam várias vantagens, tais como: uso de fases móveis menos tóxicas e de menor custo, como metanol e água; fases estacionárias estáveis; rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel. Essas fases, dependendo da modificação feita ao suporte, podem atuar no modo normal, reverso ou ambos (TONHI; COLLINS; JARDIM, 2002; MALDANER; JARDIM, 2009).

Uma vez desenvolvido o método de análise cromatográfica, surge a necessidade de se mostrar a qualidade das medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis (ROCA et al., 2007).

### **3.7 Validação de Métodos Analíticos**

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e seguras, ele deve ser validado. A validação de um procedimento que emprega técnicas cromatográficas pode ser considerada como a soma de diferentes etapas que desafiam a metodologia a fim de garantir que os resultados serão exatos, específicos frente a pequenas alterações. Desta forma, todas as variáveis como a estratégia de amostragem, preparação da amostra, detecção e avaliação dos dados devem ser consideradas. Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI et al., 2004).

No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) são os órgãos credenciados para avaliar a competência destes ensaios. Os parâmetros de validação preconizados pelo INMETRO, por meio da norma DOQ-CGCRE-008, de 2003, são: especificidade e seletividade, faixa de trabalho e faixa linear de trabalho, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão, robustez e incerteza de medição. Já a ANVISA, por meio da Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003, determina os testes segundo a categoria da análise (Tabela 1).

**Tabela 1-** Classificação dos testes para ANVISA

<b>Categoria</b>	<b>Finalidade do Teste</b>
<b>I</b>	Determinação de princípios ativos em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
<b>II</b>	Testes quantitativos ou ensaios limite para determinar de impurezas de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
<b>III</b>	Testes de performance
<b>IV</b>	Teste de identificação

Fonte: BRASIL, 2003.

A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos mas que pode distinguir a resposta de um analito a de outros, é chamado seletivo. Entretanto, os termos especificidade e seletividade são freqüentemente utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações. Uma forma de verificação da seletividade é a observação de ausência de picos em amostra placebo (ROCA et al., 2007; INMETRO, 2003).

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados linearmente proporcionais a concentração da substância em análise, em uma dada faixa de concentração. É expressa através da correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico cromatográfico) e a concentração da substância (SARTORATTO, 2006).

A linearidade do método deve ser avaliada por meio da obtenção do coeficiente de correlação ( $r$ ) da curva obtida pelo gráfico resposta *versus* concentração da amostra. A ANVISA, sugere no mínimo cinco níveis de concentração, para que seja construída uma curva analítica, sendo injetados as amostras em ordem crescente de concentração, por no mínimo três vezes cada (BRITO et al., 2003).

Julga-se satisfatória a linearidade do gráfico quando o coeficiente de correlação ( $r$ ) obtido não é estatisticamente diferente da unidade (9). De acordo com a Resolução 899/2003 da ANVISA, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) deve ser 0,99; segundo o INMETRO (2003), o valor deve ser superior a 0,90 e, para o FDA (2001), os métodos cromatográficos devem apresentar valor superior a 0,999 (BRASIL, 2003; FRANCO, 2009).

O limite de detecção (LD) consiste na menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas.

Esse valor pode ser determinado por método visual, método da relação sinal-ruído ou baseados nos parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004; FRANCO, 2009).

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis (BRITO et al., 2003).

Dentre os critérios citados, a exatidão e a precisão são considerados os mais relevantes porque permitem estimar os erros e variações embutidos nos resultados analíticos. Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição, e uma das formas mais comuns de expressá-la é por meio da repetibilidade e da reprodutibilidade (INMETRO, 2003).

Esta é considerada em três níveis: repetibilidade (precisão intra-corrída), concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação; precisão intermediária (precisão inter-corrídas), concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) onde ocorre a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo de uma série de medidas (ANVISA, 2003).

Exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. Deve ser determinada em uma mesma corrida analítica (exatidão intra-corrída) ou em corridas diferentes (exatidão inter-corrídas). O desvio padrão não deve exceder 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20% (ANVISA 2003; RIBANI, 2004).

A robustez mede a sensibilidade que este apresenta em face a pequenas e deliberadas variações de parâmetros, em geral, fornece a dimensão do problema que ocorre quando o método é repetido em diferentes condições como: concentração do solvente, tipo de agitação, temperatura, pH, fluxo da fase móvel, analistas e equipamentos ou quando é transferido, por exemplo, para outro laboratório. O teste de robustez pode ser expresso pelo coeficiente angular das retas obtidas por regressão linear. Este parâmetro garante que a resposta seja originada exclusivamente pelo composto de interesse (SARTORATTO, 2006; ROCA et al., 2007).

De acordo com o INMETRO (2003), a robustez pode recorrer ao teste de *Youden*, que permite não só avaliar a robustez como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados, indicando qual a influência de cada uma dessas variações. Quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança dos resultados.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

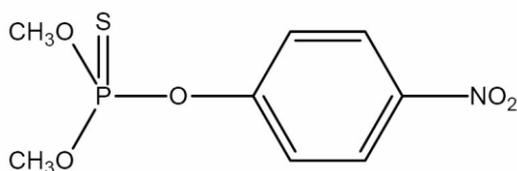
### 4.1 Local de realização

Os experimentos para a avaliação da toxicidade aguda foram conduzidos no Laboratório de Genética localizado na Área de Ciências Exatas e Ambientais. As análises cromatográficas foram verificadas no Laboratório de Toxicologia na Área de Ciências da Saúde, da Universidade Comunitária da Região de Chapecó - UNOCHAPECÓ, campus de Chapecó (SC).

### 4.2 Substâncias teste

#### 4.2.1 Metil paration

O metil paration (Figura 1) é utilizado no Brasil tanto na agricultura quanto na piscicultura, nesta última para eliminar ectoparasitoses e larvas de insetos aquáticos predadores de peixes (CRUZ, 2004; TOMAZELLI, 2009).



**Figura 1-** Estrutura química do metil paration

Fonte: Kalipci et al. (2010, p.713)

As características principais do produto comercial utilizado neste experimento, segundo a ANVISA (2001), são:

Nome comercial: Folisuper<sup>®</sup> 600 BR

Nome técnico ou comum: Paration Metílico (parathion-methyl)

Número CAS: 298-00-01

Nome químico: 0,0 - dimetil 0 - 4 - nitrofenil fosforotioato (IUPAC)

0,0 - dimetil 0 - (4 - nitrofenil) fosforotioato (CA).

Sinonímia: Tiofosfato de dimetil – paranitrofenila

Fórmula bruta: C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>5</sub>PS

Concentração do ingrediente ativo: 600g/L

Peso molecular: 263,2 mol<sup>-1</sup>

Grupo químico: inseticida organofosforado

#### 4.2.2 Obtenção do Extrato de Cinamomo

O material vegetal (Figura 2) foi coletado no município de Guatambu-SC, na propriedade rural do Sr. André Colombi, localizada a uma latitude 27° 06' 34.24" S e longitude 52° 42' 39.65".

Os frutos do cinamomo foram secos à temperatura de 40°C e submetidos à maceração com etanol por 7 dias em um percolador, sendo homogeneizados em intervalos de 24 horas. Foram preparadas duas extrações, com biomassas vegetais de 555,72 e 784,28 g, em 2 L de etanol cada. Após a extração, os macerados foram filtrados, recolhidos e concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida, obtendo-se o extrato etanólico dos frutos de cinamomo (EEC).



**Figura 2-** Exemplos do cinamomo, na propriedade do Sr. André Colombi  
Fonte: Tomazelli, 2009.

### 4.3 Organismo teste

A espécie de peixe utilizada foi o *Pimelodus maculatus*, sem distinção de sexo. Os peixes foram selecionados, nos tanques de criação, na estação de piscicultura do Instituto Goio-En no município de São Carlos (SC), localizado a uma latitude 27°04'39" e a uma longitude 53°00'14".

A espécie *Pimelodus maculatus* (LACEPÈDE, 1803), também conhecido popularmente como pintado amarelo, mandi, mandi amarelo e mandi pintado. Pertence à ordem do Siluriformes, família Pimelodidae. É o maior dos mandis, podendo alcançar 50 cm de comprimento total (WEINGARTER; FILHO, 2004).

Essa espécie apresenta características zootécnicas diferenciadas que a torna potencialmente importante para a piscicultura como: boa qualidade de carne e a ausência de espinhos intramusculares, resistência a baixas concentrações de oxigênio dissolvido, hábito alimentar onívoro, plasticidade na dieta, pode se adaptar à disponibilidade de alimento e alimentação artificial, o que representa um aspecto positivo a se considerar para a viabilidade nas criações intensivas (ALMEIDA; NUÑER, 2009).

Taxonomia segundo Sverlij et al. (1998):

**Classe** OSTEICHTHYES

**Ordem** SILURIFORMES

**Família** PIMELODIDAE

**Gênero e espécie** *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803



**Figura 3-** Exemplar de *Pimelodus maculatus*

Fonte: Autora.

#### 4.4 Aclimação dos Peixes

Inicialmente o lote foi aclimatado por um período de sete dias permanecendo em aquários de vidro com capacidade para 12 litros, dotados de aeração artificial constante (Figura 4). A água de abastecimento utilizada foi neutralizada com Aquassafe – Tetra Aqua<sup>®</sup> para retirada do cloro, o pH foi ajustado em 8,0 com Mydor pH Ease Increase<sup>®</sup>. A temperatura do laboratório foi controlada em  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas de luz.

Os peixes foram alimentados com ração comercial para peixes, fornecida uma vez ao dia, a qual foi interrompida 24 horas antes do início dos experimentos. As variáveis de qualidade da água como oxigênio dissolvido, temperatura, pH, condutividade elétrica e amônia foram quantificadas a cada 24 horas.

A limpeza dos aquários foi realizada por sifonamento, com renovação de 20% do total do volume de água por dia, a fim de não haver acúmulo de rejeitos. Os peixes mortos foram retirados sempre que detectados.

O período de aclimação foi necessário para observar a sanidade dos peixes, detecção de parasitas, doenças e recuperação do estresse da captura e transporte.

Antes de iniciar os experimentos de toxicidade, os peixes foram pesados para posterior comparação dos resultados com o grupo controle (sem exposição).



**Figura 4-** Aclimação dos peixes nas condições dos bioensaios  
Fonte: Autora.

## **4.5 Teste de Toxicidade**

### **4.5.1 Testes Preliminares**

Foram realizados testes preliminares para determinação das faixas de concentração letal do metil paration e extrato de cinamomo. Com base nos intervalos compreendidos entre a maior concentração não letal e a menor concentração letal, foram determinadas as seguintes concentrações de 10,0; 10,6; 11,0; 11,6 e 12,0 mg de metil paration e 210; 211; 212; 213 e 215 mg de extrato de cinamomo, por litro de água.

### **4.5.2 Teste agudo com peixes 96 horas**

Após aclimatação, os peixes pesando em média  $11 \pm 12,27$  g foram transferidos para os aquários. O manejo eleva o estresse dos peixes e, por este motivo as soluções-teste foram adicionadas após 24 horas.

Cada concentração foi avaliada em triplicata, contendo cinco animais cada aquário, resultando em 15 animais por concentração. O grupo controle não sofreu exposição a nenhum composto. O sistema de condução do teste foi o estático, sem alimentação e remoção da solução-teste. O período de exposição dos peixes foi de 96 horas, após a taxa de mortalidade foi determinada pelo Método da Média Móvel e a Concentração Letal Média a 50% (CL<sub>50</sub>) identificada pela curva concentração-resposta, para a média das repetições.

As avaliações de mortalidade foram conduzidas às 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após o início dos testes. Foram considerados mortos os peixes que não demonstraram reação após serem tocados no pendúnculo caudal.

Durante o experimento, a natação dos peixes foi observada durante os primeiros 60 minutos após a aplicação das substâncias teste.

A aeração permaneceu constante. As variáveis de qualidade da água também foram quantificadas à cada 24 horas, até completar 96 horas do experimento.

O teste foi mantido em sala climatizada a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , livre de barulho e trânsito de pessoas para evitar o estresse dos peixes, com fotoperíodo de 12 horas de luz.

## 4.6 Análise Cromatográfica

O desenvolvimento do método em CLAE para o metil paration e azadiractina iniciou-se pelas metodologias de validação descritas por Sampaio (2005) e Menezes (2004), respectivamente. O método final foi aquele que apresentou melhor simetria do pico e menor tempo de retenção para o analito.

### 4.6.1 Equipamento e condições cromatográficas

O sistema cromatográfico (CLAE) utilizado é composto de um injetor automático 410-Varian com amostrador de 20 a 100  $\mu\text{L}$ , bomba com fluxo de gradiente ternário 230-Varian, detector ultravioleta UV-VIS 325-Varian e detector de fluorescência 363-Varian. O sistema encontra-se integrado a um microcomputador pelo programa GALAXIE.

As separações cromatográficas em CLAE foram conduzidas usando coluna tipo C-18 (Microsorb-MV de 250 mm x 4,6 mm x 1/4'') e detector ultravioleta UV-VIS 325-Varian.

Para todas as separações cromatográficas as condições ambientais do laboratório foram controladas, com umidade relativa em 60% e temperatura ambiente de 20°C.

As condições cromatográficas para o metil paration foram: fase móvel composta por acetonitrila e água (70:30 v/v), fluxo ajustado de 1,0  $\text{mL}\cdot\text{minuto}^{-1}$ , comprimento de onda do detector em 245 nm e volume de amostra injetado de 20  $\mu\text{L}$ .

Para azadiractina, a fase móvel foi composta por uma mistura de solução aquosa de fosfato monobásico de sódio 0,05  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  e acetonitrila (63:37 v/v), fluxo ajustado em 0,5  $\text{mL}\cdot\text{minuto}^{-1}$ , comprimento de onda em 217 nm e volume de amostra injetado de 20  $\mu\text{L}$ .

### 4.6.2 Preparo de soluções estoque padrão analítico

Os padrões analíticos de metil paration e azadiractina foram adquiridos da Aldrich-Sigma®.

Os padrões analíticos foram pesados e diluídos em metanol, grau cromatográfico, para preparação das soluções padrão estoque (I) nas concentrações de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de metil

paration e  $5000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para azadiractina em metanol, respectivamente. A partir dessas soluções padrão estoque (I) foram realizadas diluições decrescentes (Tabela 2), para otimizar das condições cromatográficas. As soluções foram armazenadas sob refrigeração durante as análises cromatográficas e a estabilidade acompanhada nos períodos de 0, 15, 30 e 60 dias. A estabilidade foi mensurada pela mudança de cor e presença de cristais.

**Tabela 2-** Soluções padrão estoque (I)

<b>Metil paration</b>	<b>Azadiractina</b>
$100 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$5000 \mu\text{g.mL}^{-1}$
$75 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$50 \mu\text{g.mL}^{-1}$
$50 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$25 \mu\text{g.mL}^{-1}$
$25 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$10 \mu\text{g.mL}^{-1}$
$10 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$5 \mu\text{g.mL}^{-1}$

## 4.7 Validação dos métodos analíticos

### 4.7.1 Identificação

Esse teste foi realizado apenas para verificar a similaridade entre os vários perfis cromatográficos e o tempo de retenção para cada substância.

Definidas as melhores condições cromatográficas de separação e identificação, foi realizada a validação dos métodos analíticos a partir dos seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, exatidão e precisão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez (BRASIL, 2003).

### 4.7.2 Especificidade

A especificidade foi observada de forma qualitativa, pela resposta do analito de interesse em diferentes concentrações *versus* o tempo de retenção (INMETRO, 2003).

### 4.7.3 Linearidade

A linearidade foi avaliada com três curvas analíticas em cinco concentrações definidas em: 100, 75, 50, 25 e 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de metil paration e 5000, 50, 25, 10 e 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para azadiractina. Os gráficos foram confeccionados em área obtida no cromatograma (mAU.s) *versus* concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) da solução injetada. A correlação foi expressa matematicamente pela equação da reta, com a utilização de Microsoft Excel<sup>®</sup> 2003, que forneceu o coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

### 4.7.4 Exatidão e Precisão

Para a exatidão, foram utilizados os resultados cromatográficos do ensaio de linearidade para a solução padrão com 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de metil paration e 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de azadiractina. As equações das curvas analíticas foram recalculadas. A exatidão foi expressa em percentual (%) pela divisão da concentração real *versus* a concentração obtida.

A precisão foi determinada como repetibilidade. Em três dias consecutivos, as mesmas concentrações do ensaio de exatidão, foram analisadas mantendo-se o mesmo equipamento e diferentes analistas, a fim de verificar se o método desenvolvido apresenta o mesmo comportamento quando mudam algumas variáveis, como o analista.

O resultado foi fornecido como desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR).

### 4.7.5 Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Nesse trabalho convencionou-se denominar como unidades LD e LQ as medidas de menor concentração da curva de calibração detectável, porém não quantificada com exatidão (RIBANI et al., 2004).

O gráfico foi construído em área (mAU.s) *versus* concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e a avaliação realizada pelos parâmetros da curva analítica.

O LD e LQ foram estabelecidos pelas equações (1) e (2):

$$\text{LD} = \frac{3,3 \times b}{a} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10 \times b}{a} \quad (2)$$

onde,

**a** inclinação da curva de calibração ( $y = ax + b$ )

**b** é o coeficiente linear da equação da reta da curva de calibração

O valor de LD e LQ foi considerado aceitável para unidades 10 a 20 vezes superior a concentração do analito (BRASIL, 2003; FRANCO, 2009).

#### **4.8 Detecção e quantificação de azadiractina no extrato de cinamomo**

Para a determinação da azadiractina foi preparada uma solução em metanol grau cromatográfico, contendo  $3,04 \text{ mg.mL}^{-1}$  do extrato de cinamomo. A solução foi filtrada em membrana de poliéster ( $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ ) para posterior injeção no cromatógrafo. A identificação deu-se através da seletividade, pela análise do perfil cromatográfico da amostra em comparação com a solução padrão estoque (I) de azadiractina.

#### **4.9 Protocolo experimental de Bioacumulação Direta em peixes**

Esse foi baseado na metodologia de Buratini e Brandelli (2006), onde a partir do valor encontrado para a concentração letal  $CL_{50-96h}$  do metil paration três concentrações teste foram definidas: 0,1; 1,0 e  $10 \text{ mg. L}^{-1}$ .

Foram preparados seis aquários com 10 L de água, conforme o procedimento de aclimação dos peixes descrito no item 4.4

O delineamento experimental foi casualizado. Antes de adicionar o metil paration, nos aquários, os peixes foram pesados, para posterior comparação dos resultados com o grupo controle. O experimento foi conduzido durante 5 dias, em réplica, sem remoção da água, com alimentação controlada e fotoperíodo de luminosidade de 12 horas de luz.

Os dados físico-químicos iniciais da água dos aquários foram: oxigênio dissolvido 7,10 mg/L, temperatura da água  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , pH 8,0, condutividade elétrica 184 mS/cm e amônia 17,3 mg/mL. A temperatura da sala manteve-se em  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Após 6 horas do início da adição do metil paration na água dos aquários, foi coletado alíquota de 1 mL para análise cromatográfica, a fim de verificar a cinética de degradação do pesticida. Alíquotas diárias de 30 mL foram retiradas para verificação das variáveis: oxigênio dissolvido, temperatura, pH, condutividade elétrica, amônia e análise cromatográfica da concentração do metil paration.

Após completar 24 horas da adição do metil paration, um peixe de cada aquário foi pesado, anestesiado por hipotermia, segundo procedimento descrito por Wilson JM, et al. (2009), morto e retirado 2 gramas de tecido muscular. Foi realizado o mesmo procedimento para o grupo controle.

As amostras de tecido muscular e cérebro foram maceradas, separadamente, com almofariz e pistilo até obter uma massa homogênea. Os macerados foram transferidos para um frasco e este avolumado para 10 mL de metanol, grau cromatográfico.

Os frascos foram centrifugados 4000 rpm por 20 minutos, conforme metodologia descrita por Menezes et al. (2004).

Ao término deste processo o sobrenadante foi filtrado em membrana de poliéster (0,45  $\mu\text{m}$ ) e armazenado em frasco de vidro (vials) sob refrigeração, até realizar as análises cromatográficas. As amostras de análise foram os sobrenadantes.

Por fim, calculou-se o fator de bioacumulação do metil paration adicionado na água do aquário, nas amostras de tecido muscular e cérebro.

O fator de bioacumulação (Equação 3) foi estimado através da razão:

$$\text{BCF} = \frac{C_o}{C_w} \quad (3)$$

onde,

**BCF** é o fator de bioacumulação

$C_o$  é a concentração da substância no organismo

$C_w$  é a concentração da substância teste na água

Os resultados foram plotados em tabela.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização físico-química da água

Os parâmetros físico-químicos (oxigênio dissolvido, temperatura, pH, condutividade elétrica e amônia) da água dos aquários, utilizada no teste de toxicidade aguda estão descritos na Tabela 3. Ao longo do período experimental não foram observadas variações significativas que comprometessem os peixes.

**Tabela 3-** Valores médios e desvio padrão para as variáveis físico-químicas da água, nas concentrações utilizadas no teste de toxicidade aguda em *Pimelodus maculatus*, pintado amarelo exposto ao metil paration e extrato de cinamomo

	Oxigênio dissolvido (mg.L <sup>-1</sup> )	Temperatura da água do aquário (°C)	pH	Condutividade elétrica (uS/cm)	Amônia (mg.L <sup>-1</sup> )
<b>Grupo Controle</b>	6,61 ± 0,10	20,33 ± 0,47	8,03 ± 0,04	202,00 ± 9,41	18,60 ± 1,30
<b>Metil paration</b>	6,49 ± 0,31	20,06 ± 0,40	8,10 ± 0,08	201,34 ± 9,74	19,55 ± 1,90
<b>Extrato de Cinamomo</b>	6,83 ± 0,56	20,66 ± 0,47	8,01 ± 0,03	198,67 ± 9,46	19,87 ± 1,29

A concentração baixa do oxigênio dissolvido pode ser atribuída à degradação ao aumento do consumo de oxigênio pelos peixes que se encontravam sob situação de estresse.

Dentre as espécies nativas mais investigadas para a produção em cativeiro encontra-se o *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803), uma espécie rústica, resistente a baixas concentrações de oxigênio dissolvido, que apresenta plasticidade na dieta (ALMEIDA; NUÑER, 2009).

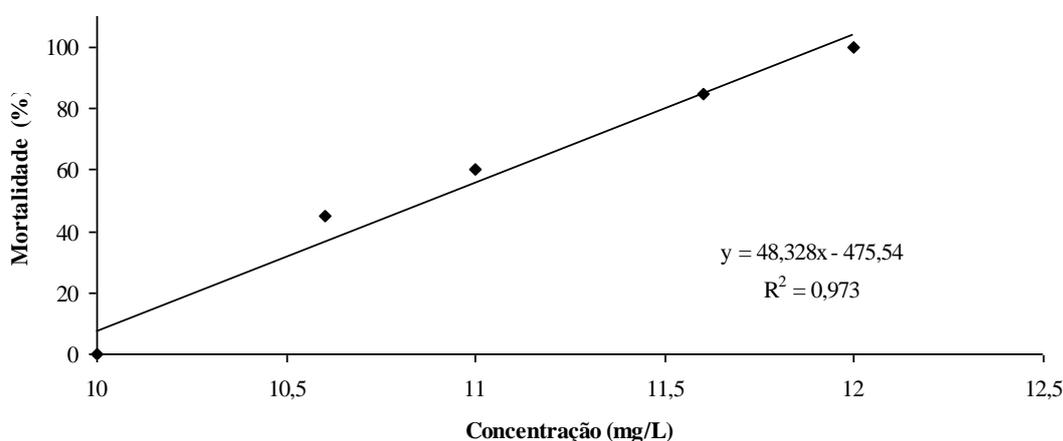
A fim de manter a integridade dos animais a concentração de oxigênio dissolvido foi mantida acima do limite mínimo permitido (4 mg.L<sup>-1</sup>) pela ABNT (2004).

## 5.2 Toxicidade aguda em peixes 96 horas

### 5.2.1 Metil paration

Após 96 horas de exposição foi possível correlacionar a taxa de mortalidade dos peixes em função das concentrações utilizadas. A maior incidência de mortalidade ocorreu nas primeiras 24 horas de exposição nas concentrações 11,0; 11,6 e 12 mg.L<sup>-1</sup>.

Os resultados (Figura 5) representam a relação concentração-resposta através da curva de regressão linear. O valor estimado para a CL<sub>50-96h</sub> foi 10,87 mg.L<sup>-1</sup>.



**Figura 5-** Curva de regressão linear estimada para a mortalidade em *Pimelodus maculatus*, exposto a diferentes concentrações de metil paration

Segundo Cruz (2005), para *P. mesopotamicus* (pacu), na fase juvenil a concentração letal CL<sub>50-96h</sub> calculada foi de 3,97 mg.L<sup>-1</sup> e para alevinos 9,89 mg.L<sup>-1</sup>. Mataqueiro (2002), encontrou concentração letal (CL<sub>50-96h</sub>) para juvenis e alevinos de *P. mesopotamicus*, de água mole e água de represa, valores de 4,06 mg.L<sup>-1</sup> e 5,15 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Para juvenis de *Oreochromus niloticus* (tilápia do nilo), a CL<sub>50-96h</sub> calculada foi de 17,82; 8,91; 4,00 e 2,7 mg.L<sup>-1</sup> em 24, 48, 72 e 96 horas de exposição respectivamente (BARBIERI; FERREIRA, 2011).

Outros inseticidas utilizados no tratamento de parasitas apresentaram maior toxicidade para peixes quando comparados com o metil paration. Moura (2009), expôs alevinos de *Oreochromus niloticus* (tilápia do nilo), *Cyprinus carpio* (carpa comum) e *Colossoma*

*macropomum* (tambaqui) ao herbicida Roundup®. A  $CL_{50-96h}$  foi de 21,63; 15,33 e 20,06  $mg.L^{-1}$ , respectivamente. O metil paration foi mais tóxico quando comparado com o herbicida Roundup®.

Silva et al, (2010) encontraram a  $CL_{50-48h}$  do herbicida comercial, composto por diuron, por diuron, hexazinona e ingredientes inertes para *Danio rerio* (*paulistinha*) igual a 581,50  $mg.L^{-1}$ . Em concentrações a partir de 50  $mg.L^{-1}$  do herbicida foram observadas alterações comportamentais significativas, como hipoatividade relacionada ao movimento natatório em mais de 50% dos organismos. Segundo Silva et al, (2010), a diminuição do movimento natatório pode ser explicada como comportamento adaptativo ao estresse devido à possível realocação de energia para outros processos fisiológicos, resultando em menor quantidade de energia para a locomoção.

Após 24 horas de exposição ao inseticida metil paration, nas concentrações 11,4; 11,6 e 12,0  $mg.L^{-1}$  observou-se sinais clínicos de intoxicação no *Pimelodus maculatus* (Figura 6), relacionada a hiperatividade como: espasmos musculares, natação irregular, perda de equilíbrio, movimentos natatórios erráticos devido à ação do inseticida na inibição do sistema enzimático colinérgico.

Nas demais concentrações, a saber 10,0; 10,6 e 11,0  $mg.L^{-1}$ , os peixes mostraram-se agitados somente nos primeiros 60 minutos de exposição.



**Figura 6-** Alterações comportamentais de natação em *Pimelodus maculatus* expostos a concentração de 12  $mg.L^{-1}$  do inseticida metil paration. Observar perda de equilíbrio (PE)

Estes sinais estão de acordo com os observados por Barbieri e Ferreira (2011) em *Oreochromis niloticus* (tilápia do nilo) exposto a diferentes concentrações de metil paration. O experimento foi conduzido em 24, 48, 72 e 96 horas onde os valores encontrados para a  $CL_{50}$  foram 17,82; 8,91; 4,0 e 2,70, respectivamente. A inibição das colinesterases (AChE, BChE e PChE) no plasma dos peixes expostos atingiu 94% nas concentrações mais elevadas.

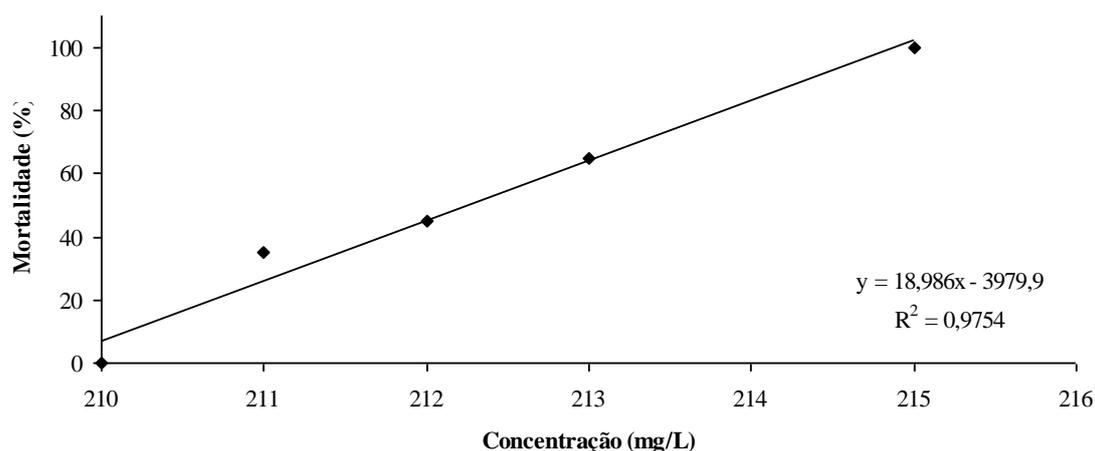
Os inseticidas organofosforados agem no sistema nervoso central, inibindo as enzimas colinesterases. Dentro dos neurônios, os sinais são transmitidos por impulsos elétricos mediante íons de sódio com carga positiva. Chegando aos nós sinápticos, os impulsos elétricos excitam as vesículas que repassam os sinais por mensageiros químicos para as células seguintes. As células nervosas usam diversos tipos de mensageiros químicos, sendo mais conhecidos o ácido gamaaminobutírico (GABA) que comunica as células nervosas com células musculares e a acetilcolina, que transmite sinais entre células nervosas. Assim que o sinal químico é transmitido, a acetilcolina é removida da sinapse pela enzima colinesterase, deixando-a pronta para novo sinal. A seqüência desses eventos acontece em frações de segundo. A inibição da atividade dessa enzima leva ao acúmulo de acetilcolina, provocando estimulação descontrolada do sistema nervoso (COUTINHO et al, 2005).

Em relação a biomassa não houve diferenças significativas para as concentrações testadas em relação ao grupo controle.

### **5.2.2 Extrato de Cinamomo**

A partir dos resultados dos ensaios preliminares estabeleceu-se o intervalo entre a menor concentração que não causou letalidade e a maior concentração que causou 100% de letalidade. O gráfico (Figura 7) representa a relação concentração-reposta. A  $CL_{5-96h}$  foi calculada através da equação linear, onde obteve-se 212,25  $mg.L^{-1}$ .

A mortalidade 100% dos animais, para a concentração de 215  $mg.L^{-1}$  ocorreu aproximadamente 36 horas após a exposição, diferente do observado para o inseticida metil paration.



**Figura 7-** Curva de regressão linear estimada para a mortalidade em *Pimelodus maculatus* exposto a diferentes concentrações do extrato de cinamomo.

Mudanças comportamentais como espasmos musculares, natação irregular e perda de equilíbrio não foram observadas. Durante as 96 horas de exposição os animais permaneceram no fundo do aquário.

Em relação a biomassa dos peixes foi observado que as concentrações utilizadas não são suficientes para promover a perdas significativas, quando comparado com o grupo controle.

Efeitos do extrato aquoso de *M. azedarach L* foram investigados na *Tilapia zilli* (Gervais), em condições de laboratório por um período de 96 horas, demonstrando toxicidade aguda ao animal (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005).

Os frutos verdes de *M. azedarach L* contêm saponinas e um alcalóide, a azaridina ou mangrovina, que é um narcótico com ação sobre o sistema nervoso central (Zwing, 2001 apud Seffrin, 2008). Segundo Tomita (2002), a toxicidade de um composto químico depende do tempo de exposição, da suscetibilidade do organismo, das características químicas e de fatores ambientais.

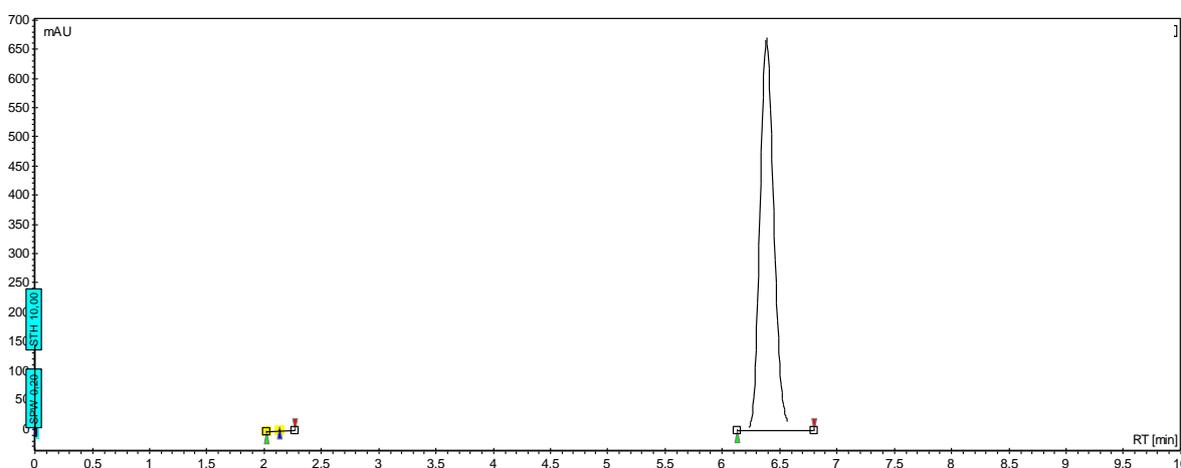
### 5.3 Determinações das condições cromatográficas (CLAE)

No desenvolvimento das condições cromatográficas para metil paration e azadiractina

buscou-se utilizar condições mais simples e reprodutíveis, isto é, fase móvel sem ajuste de pH e menor tempo de retenção.

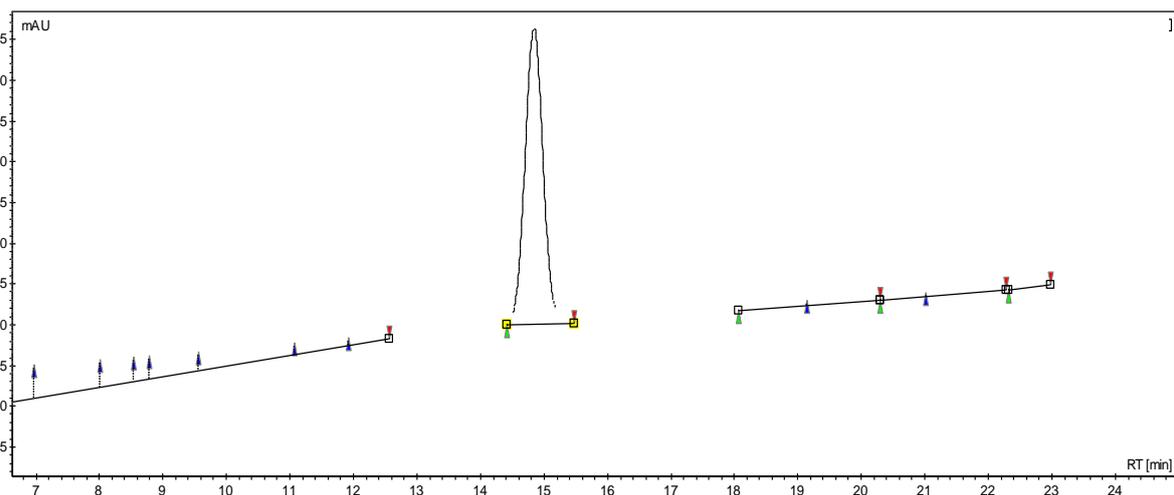
A Identificação deu-se através da constatação visual da separação do pico do metil paration e azadiractina. Primeiramente com a injeção de 20  $\mu\text{L}$  da solução padrão na concentração  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ , respectivamente, foi verificado o perfil cromatográfico para o tempo de retenção. Em seguida, foram realizados ensaios avaliando a vazão e os solventes orgânicos, acetonitrila e água, em diferentes proporções.

Para o metil paration (Figura 8), a identificação se deu a partir do tempo de retenção de  $6,59 \pm 0,01$  minutos.



**Figura 8-** Perfil cromatográfico do metil paration, contendo somente o pico do padrão analítico, obtido nas condições otimizadas.

Para a azadiractina, as condições propostas por Menezes et al. (2004) não foram suficientes para promover boa resolução do pico (Figura 9). Passou então, empregar vazão de  $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$  para a fase móvel, onde obteve-se o tempo de retenção de  $14,65 \pm 0,15$  minutos.



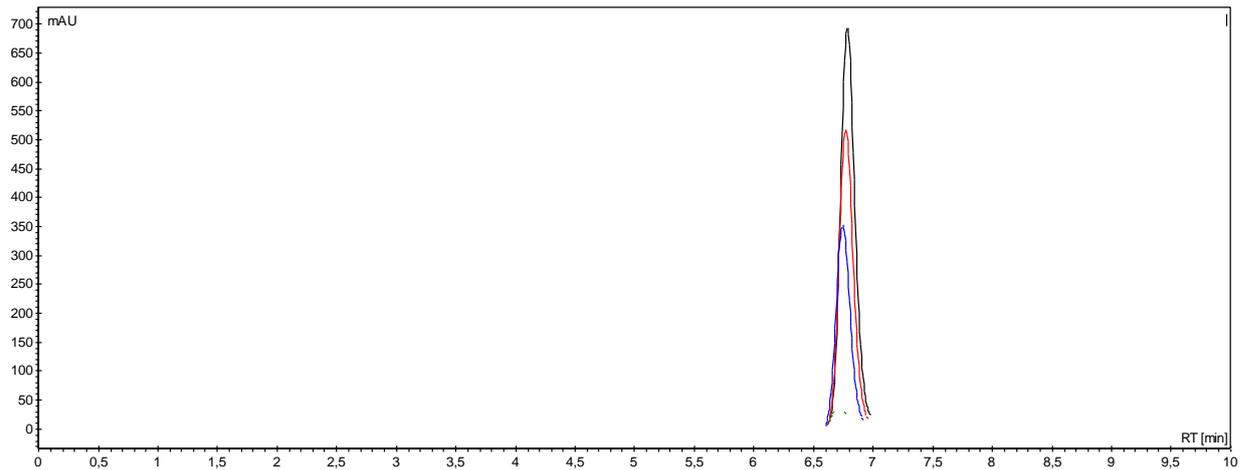
**Figura 9-** Perfil cromatográfico da azadiractina, contendo somente o pico do padrão analítico, obtido nas condições otimizadas.

Definidas as melhores condições cromatográficas de identificação foram realizadas as validações dos métodos.

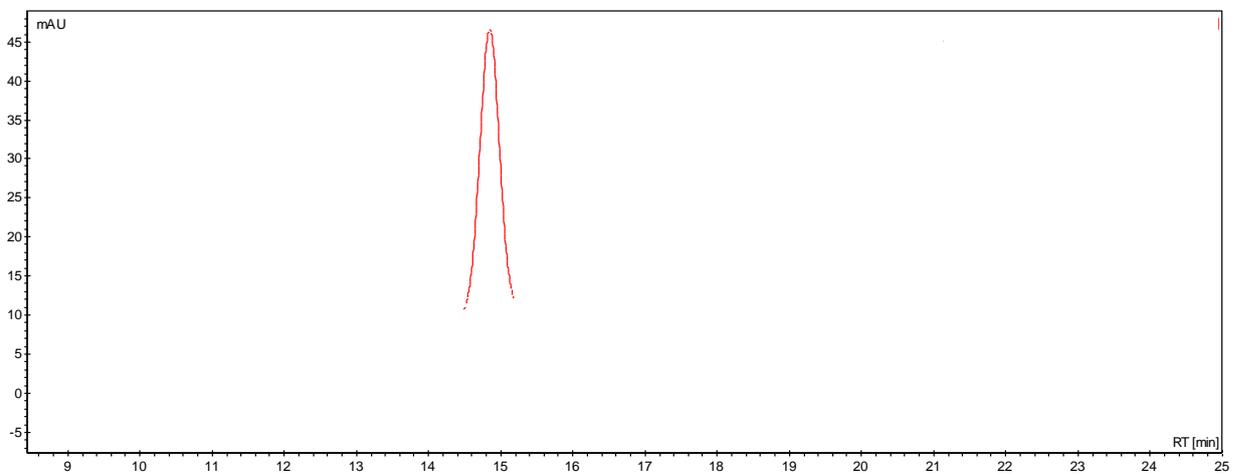
## 5.4 Validação dos métodos analíticos

### 5.4.1 Especificidade

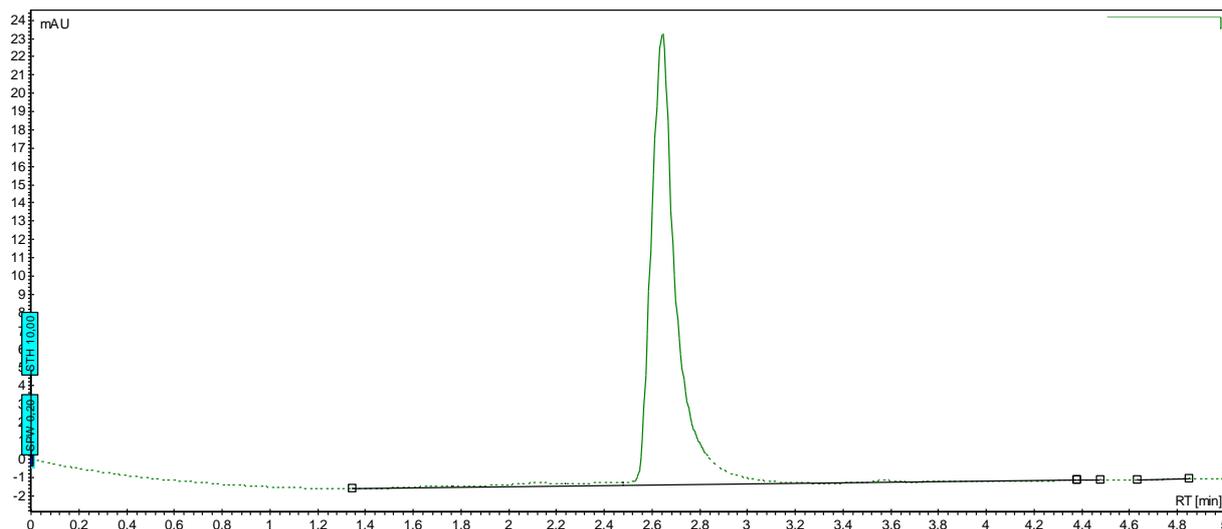
Para avaliar a especificidade do método foram preparadas amostras sem o uso de padrão, contendo todos os reagentes seguindo o mesmo método descrito nos itens 4.6.2 a 4.7.1, a fim de avaliar a presença de picos interferentes nos tempos de retenção do inseticida metil paration e azadiractina. As figuras 10, 11 e 12 mostram os cromatogramas obtidos nas análises do CLAE.



**Figura 10-** Perfil cromatográfico do metil paration para o ensaio de especificidade.



**Figura 11-** Perfil cromatográfico da azadiractina para o ensaio de especificidade.



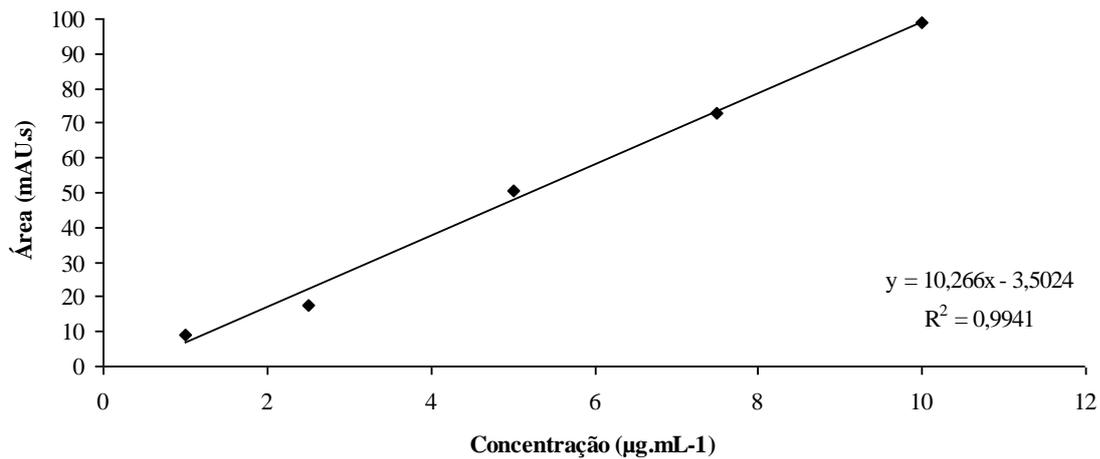
**Figura 12-** Perfil cromatográfico do branco dos reagentes.

O método mostrou específico, uma vez que produziu resposta para uma única substância, no tempo de retenção para o metil paration e azadiractina.

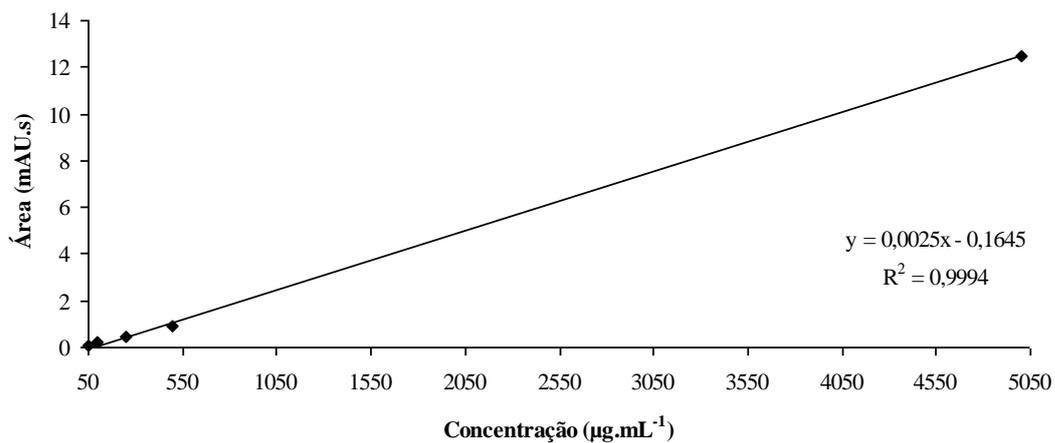
#### **5.4.2 Linearidade**

A linearidade foi obtida seguindo os parâmetros de validação preconizados pela Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003, através da construção da curva padrão do metil paration e azadiractina com cinco níveis de concentração, injetados em triplicata. Nas figuras 13 e 14, observamos pelos gráficos e pelo coeficiente de determinação ( $R^2 > 0,99$ ) que a resposta do detector foi linear.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o critério mínimo aceitável é 0,99.



**Figura 13-** Área do pico em função da concentração de metil paration. Cada ponto da reta corresponde a média de três corridas realizadas para cada concentração.



**Figura 14-** Área do pico em função da concentração de azadiractina. Cada ponto da reta corresponde a média de três corridas realizadas para cada concentração.

### 5.4.3 Estudo da Exatidão e Precisão

Os métodos desenvolvidos nesse estudo mostraram-se exato, preciso e repetitivo. Os resultados estão apresentados nas tabelas 4.

**Tabela 4-** Cálculo da exatidão (%) e Precisão (DPR) obtida para as concentrações testadas de metil paration e azadiractina

	Valor esperado ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Valor calculado ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Exatidão (%)
<b>Metil paration</b>			
$y= 978,69x - 2,8317$ $R^2=0,9932$	<b>50</b>	52,850	105,70
$y= 1067,4x - 4,6024$ $R^2=0,9938$		51,623	103,24
$y= 1033,8x - 3,039$ $R^2=0,9937$		52,850	105,70
<b>Média</b>		52,239	104,47
<b>DP</b>		0,611	1,23
<b>DPR (%)</b>		1,169	1,17
<b>Azadiractina</b>			
$y= 2,4441x - 0,13$ $R^2=0,9998$	<b>250</b>	229,12	91,64
$y= 2,6718x - 0,1747$ $R^2=0,9996$		230,06	92,02
$y=2,4566x - 0,2108$ $R^2=0,9987$		244,45	97,82
<b>Média</b>		237,25	94,92
<b>DP</b>		7,19	2,9
<b>DPR (%)</b>		3,03	3,05

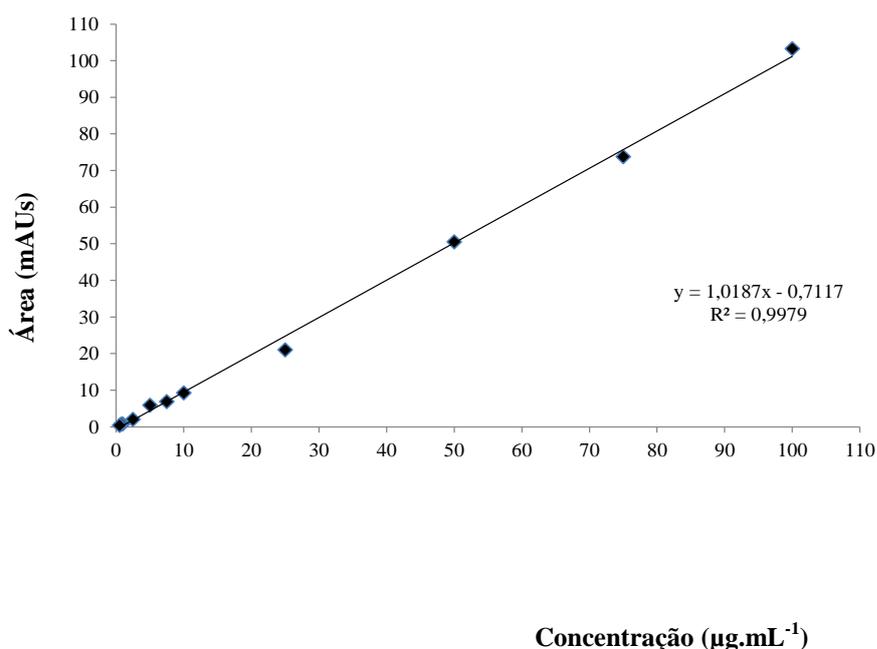
Os valores do coeficiente de variação (DPR) obtidos para a exatidão e precisão foram inferiores a 15%.

Segundo a Resolução N° 899, de 29 de maio de 2003, para precisão, o valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 15%.

Durante os ensaios de linearidade, exatidão e precisão os métodos desenvolvidos mostraram-se robustos pela capacidade do cromatógrafo, nas condições analíticas propostas, resistir a pequenas mudanças de temperatura na coluna  $\pm 2^\circ\text{C}$ , analistas e dias diferentes.

#### 5.4.4 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

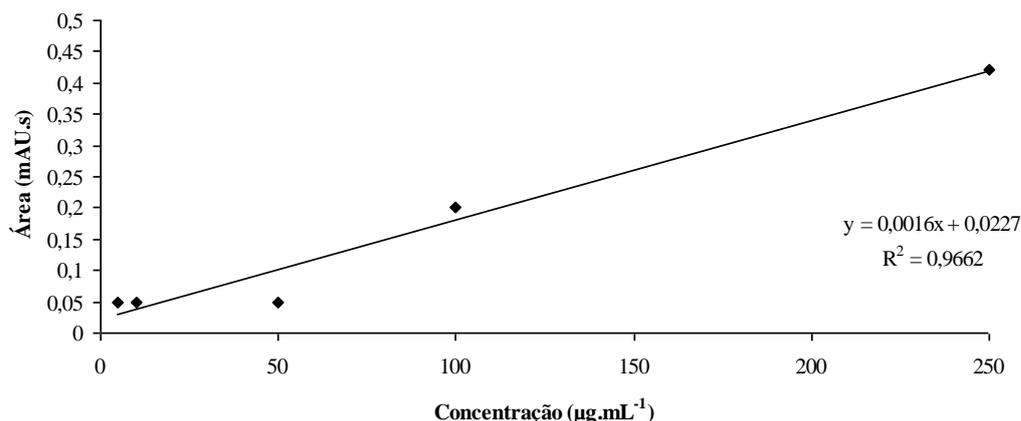
Para obter a equação da reta foram utilizados para a determinação dos limites de detecção e quantificação 11 soluções entre 0,5 a 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para o metil paration e 5 soluções entre 5,0 e 250,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para azadiractina. As áreas observadas, para cada concentração foram cruzadas para construção do gráfico (Figura 15 e 16).



**Figura 15-** Apresentação da equação da reta e coeficiente de determinação. Cada ponto da reta corresponde a média de três corridas realizadas para cada concentração de metil paration.

$$\text{LD} = \frac{3,3 \times b}{a} = \frac{3,3 \times 0,0566}{968,91} \quad \text{LD} = 0,000341 \mu\text{g.mL}^{-1} \quad (1)$$

$$\text{LQ} = \frac{10 \times b}{a} = \frac{10 \times 0,0566}{969,91} \quad \text{LQ} = 0,000584 \mu\text{g.mL}^{-1} \quad (2)$$



**Figura 16-** Apresentação da equação da reta e coeficiente de determinação. Cada ponto da reta corresponde a média de três corridas realizadas para cada concentração de azadiractina

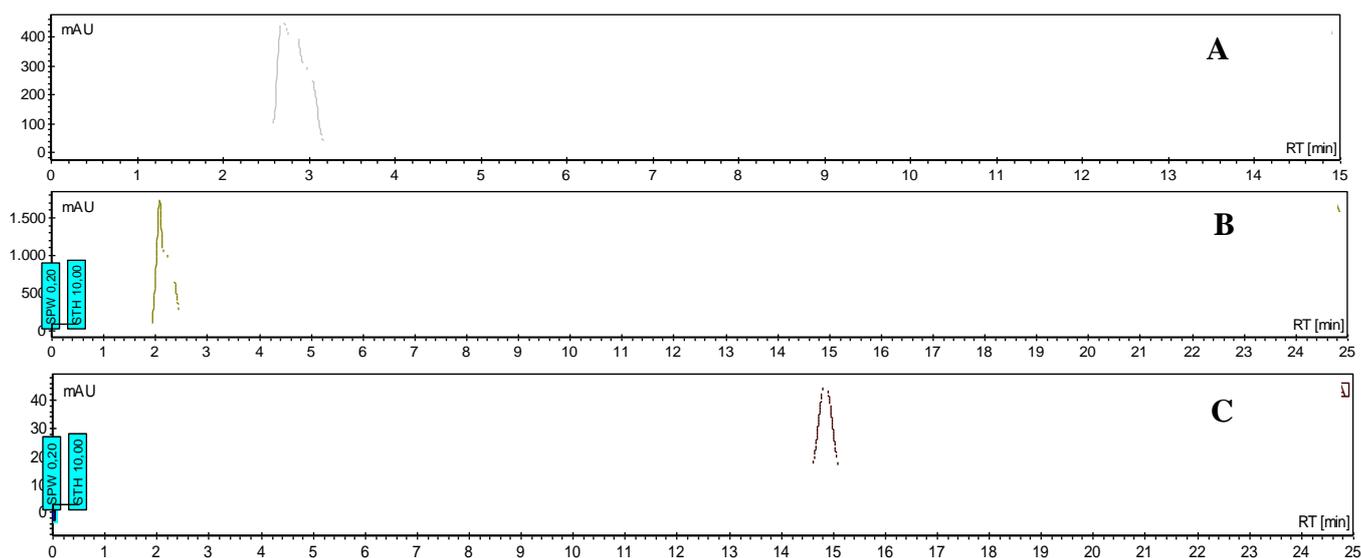
$$LD = \frac{3,3 \times b}{a} = \frac{3,3 \times 0,0227}{0,0016} \quad LD = 4,6 \mu\text{g.mL}^{-1} \quad (3)$$

$$LQ = \frac{10 \times b}{a} = \frac{10 \times 0,0227}{0,0016} \quad LQ = 14,18 \mu\text{g.mL}^{-1} \quad (4)$$

Franco (2009) destaca que o método baseado na curva analítica é estatisticamente mais confiável. O limite de quantificação representa a menor concentração em que o analito pode ser quantificado com exatidão e precisão.

### 5.5 Detecção da Azadiractina no Extrato de Cinamomo

O emprego da coluna cromatográfica ISRP-C18 permitiu a visualização do perfil cromatográfico do Extrato de Cinamomo para a detecção da azadiractina (Figura 17).

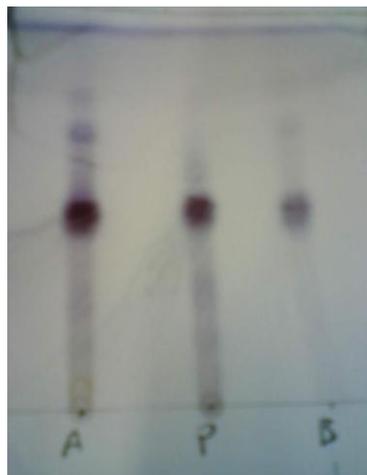


**Figura 17-** Perfil cromatográfico do Extrato de Cinamomo (A e B) e padrão analítico azadiractina (C)

A partir dos perfis cromatográficos (A) e (B) da Figura 17, observa-se que não foi detectado o composto azadiractina no Extrato de Cinamomo, esse resultado mostra-se confiável uma vez que o limite de detecção para azadiractina foi  $4,6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

A azadiractina se concentra principalmente nos frutos, aumentando ao longo do desenvolvimento, sendo máxima ação no amadurecimento. As variações de concentração podem ocorrer durante o período sazonal, processo de colheita, armazenamento, teores de umidade, presença de luz, temperatura e variações de pH (MOSSINI, 2005).

A análise fitoquímica em cromatografia de camada delgada (CCD) revelou negativo para azadiractina e positivo para melianona, confirmando o resultado da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Figura 18). Os testes não foram conduzidos com o composto melianona devido a dificuldade padronizar o composto e validar a metodologia de identificação no sistema CLAE.



**Figura 18-** Cromatografia de Camada Delgada do extrato alcoólico e bruto de cinamomo. Mancha marrom indicada a presença do Triperpenoide Melianona  
Fonte: Laboratório de Análises Instrumental – UNOCHAPECÓ.

Estudos realizados com o mesmo extrato por Tomazelli (2009) confirmaram a presença do triterpenoide melianona e do ácido linoléico, nos frutos de cinamomo. Segundo Matias et al. (2002) além dos triperpenóides, outras classes de metabólitos (limonóides e esteróides, alcalóides, proteínas, fenóis e fitoesteróis) também estão presentes nos órgãos de *Melia azedarach L.*

### **5.6 Estimativa do Fator de Bioacumulação para os peixes expostos ao metil paration no período de acumulação – 5 dias**

Os parâmetros de controle de qualidade da água dos aquários, durante o experimento, estão apresentados na Tabela 5. A temperatura ambiente manteve-se constante em  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ .

**Tabela 5-** Valores médios e desvio padrão das variáveis físico-químicas da água e biomassa médio dos animais, para as concentrações utilizadas no experimento de bioacumulação em *Pimelodus maculatus* (pintado amarelo) exposto ao metil paration

	Peso (g)	Oxigênio (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	Condutividade (uS/cm)	Amônia (mg.L <sup>-1</sup> )
<b>Controle</b>	12,33 ± 2,63	6,11 ± 0,56	8,18 ± 0,17	236,77 ± 27,93	23,07 ± 3,83
<b>0,1 mg.L<sup>-1</sup></b>	12,98 ± 3,41	6,16 ± 0,55	8,15 ± 0,16	200,08 ± 34,23	15,98 ± 3,82
<b>1,0 mg.L<sup>-1</sup></b>	14,58 ± 3,41	6,19 ± 0,64	8,12 ± 0,19	246,38 ± 30,02	21,23 ± 3,46
<b>10,0 mg.L<sup>-1</sup></b>	13,51 ± 1,17	6,90 ± 0,57	8,20 ± 0,14	201,00 ± 31,15	18,42 ± 3,17

O fator de bioacumulação e a concentração em amostras de tecido muscular foram estimados para caracterizar o padrão de acumulação do metil paration, através do tempo de exposição pela biomassa do peixe (Tabela 6).

**Tabela 6-** Evolução do fator de bioacumulação em amostras de tecido muscular de *Pimelodus maculatus* (pintado amarelo) exposto ao metil paration. Os valores estão expressos como média de 2 aquários.

Período (dias)	Tratamento		
	Concentração de 0, 1 mg.L <sup>-1</sup>	Concentração de 1,0 mg.L <sup>-1</sup>	Concentração de 10,0 mg.L <sup>-1</sup>
1°	6,02	5,0	34,48
2°	6,17	5,57	43,63
3°	6,19	5,09	36,03
4°	5,77	4,99	27,66
5°	5,56	4,99	12,57

A concentração do metil paration na água manteve-se constante durante todo o experimento. Não foi possível calcular o fator de bioacumulação do pesticida no cérebro do *Pimelodus maculatus*, uma vez que não conseguimos quantificar com exatidão e precisão a sua concentração no sobrenadante das amostras, contudo foi detectado sua presença, para as três concentrações testadas, durante os 5 dias do experimento.

No período experimental de acumulação, em que os peixes foram expostos ao metil paration, foi possível observar um decréscimo do fator de bioacumulação para as amostras de tecido muscular, ou seja, sugere-se que a taxa de eliminação seja superior a taxa de assimilação.

A assimilação dos pesticidas em peixes ocorre rapidamente, porém estes levam um tempo maior para serem eliminados do organismo, uma vez que a excreção de substâncias tóxicas pelos organismos obedecem uma cinética de primeira ordem, na qual os parâmetros que afetam a eficiência da acumulação e eliminação de um pesticida depende dos grupos atômicos, atividade físico-química, solubilidade em água, grau de ionização, estabilidade química, conteúdo lipídico do peixe e período de exposição (AZEVEDO; CHASIN, 2004; BURATINI; BRANDECELLI, 2006).

O acúmulo de metil paration em trutas foi demonstrado por ABBAS et al. (1996) apud Santos et al. (2009), os quais concluíram que a meia vida prolongada desta substância nos peixes traz preocupação quanto à possibilidade de risco aos consumidores, uma vez que esta representa um número cinco vezes maior que a meia vida em ratos.

Luvizotto Santos (2007) verificou uma bioacumulação média de metil paration metílico nos filés de tilápia em torno de 20 vezes.

Lopes et al. (2006) encontraram bioacumulação de triclorfon em pacu e concluíram que apesar da meia vida deste pesticida nos tecidos dos peixes seja curta, estimaram que o período de carência para sua eliminação (95 %) deva ser de 50 dias.

Observando os resultados obtidos quanto à presença de metil paration nas amostras de tecido muscular e cérebro, assegura a necessidade de intensificação do controle de resíduos de pesticidas em alimentos. Segundo a Vigilância Sanitária (ANVISA), o limite diário de ingestão aceitável (IDA) de metil paration é 0,003 mg/kg.

O fator de bioacumulação pode ser uma ferramenta no controle de qualidade na piscicultura, estimando a concentração e o tempo de exposição necessário para que em determinadas condições de criação, os peixes, não alcancem concentrações residuais por agrotóxicos ou afins em níveis proibidos para o consumo humano.

## 6 CONCLUSÃO

- A Concentração letal CL<sub>50</sub> (96 horas) do pesticida metil paration e extrato de cinamomo em *Pimelodus maculatus* são respectivamente 10,87 mg.L<sup>-1</sup> e 212,25 mg.L<sup>-1</sup>.
- O método foi validado apresentando resultados satisfatórios para linearidade, exatidão e precisão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez nas condições cromatográficas propostas para o metil paration e azadiractina.
- Não foi detectado, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a presença do composto azadiractina no extrato de cinamomo.
- Foi detectado a presença de metil paration nas amostras de cérebro para o experimento de bioacumulação, contudo não foi possível calcular o fator de bioacumulação devido a dificuldade de quantificar com exatidão e precisão sua concentração.
- A análise do fator de bioacumulação, em amostras de tecido muscular em *Pimelodus maculatus* mostrou um potencial risco toxicológico do metil paration a nível de cadeia alimentar.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação aos resultados deste trabalho fornece algumas opções no que diz respeito a continuidade do desenvolvimento do estudo de toxicidade e bioacumulação. Abaixo se propõe algumas possibilidades:

- Ensaio de toxicidade crônica em pintado amarelo, para o metil paration e extrato de cinamomo.
- Determinar a cinética de degradação do metil paration, utilizado a água em diferentes temperaturas e valores de pH, a fim de observar o comportamento desse pesticida.
- Verifica e monitorar o processo de depuração do metil paration em *Pimelodus maculatus*, para o ensaio de bioacumulação – 5 dias.
- Avaliação de biomarcadores genotóxicos (Micronúcleo e Ensaio Cometa) a fim de verificar possíveis alterações a nível de DNA causadas pelo metil paration .
- Utilização de enzimas de estresse oxidativo como biomarcadoras de alterações causadas pela acumulação do metil paration em peixes.

## 8 REFERÊNCIAS

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15088**: ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio em peixes. São Paulo, 2004. 19 p.
- ALBINATI, A.C.L, et. al. Biomarcadores histológicos - toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.61, n.3, p.621-627, 2009.
- ALMEIDA, L.C.; AGUIAR, L.H.; MORAES, G. Effect of methyl parathion on the muscle and brain acetylcholinesterase activity of matrinxã (*Brycon cephalus*). Ciência Rural., v.35, n.6. 1416- 1424. 2005.
- ALMEIDA, S. C. A.; NUÑER, A. P. O. Crescimento de *Pimelodus maculatus* (Actinopterygii, Pimelodidae) estocados em diferentes densidades em tanques-rede. Biotemas, 22 (3): 113-119, setembro. 2009.
- ARAÚJO, Thiago M. R. Degradação do Paration Metílico em ambientes aquáticos naturais. Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências Naturais da Universidade Estadual do Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes/RJ. 2006.
- ARAÚJO, S.A.C.; et. al.; Usos potenciais de melia azedarach l. (meliaceae): um levantamento. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.76, n.1, p.141-148, jan./mar., 2009.
- ARIAS, A.R.L et.al.; Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. Ciência & Saúde Coletiva., 12(1):61-72, 2007.
- AZEVEDO, F; CHASIN, A. As bases toxicológicas da Ecotoxicologia. 1. ed. São Carlos: RIMA, 2004.
- BAIRD, C. Química ambiental. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- BARDIERI, E.; FERREIRA. L. A. A. Effects of the organophosphate pesticide Folidol 600\_ on the freshwater fish, Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Pesticide Biochemistry and Physiology n. 99 (2011) 209–214.
- BORGES, L.M. et. al.; Ação do Extrato Hexânico de frutos maduros de *Melia azedarach* (MELIACEAE) sobre *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE) em Bezerros infestados artificialmentete. Revista de Patologia Tropical., v. 34 (1): 53-59. Jan/Abr. 2005.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde - Centro Nacional de Epidemiologia. Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica. Brasília, 1998. 523p.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 62, de 19 de julho de 2001. Brasília, 2001.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Brasília, 2002. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/4074\\_02.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/4074_02.htm)

Acesso em: 01 dez 2010.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003.

BRITO, M.N.; et. al.; Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: Rev. Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba, v. 13, p. 129-146, jan/dez. 2003.

BURATINI, S. V; BRANDECELLI. A. Ecotoxicologia Aquática: Bioacumulação. São Carlos: RiMa. Capítulo 4. p 55-88. 2006.

COUTINHO, C.F.B. et. al.; Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. Pesticidas: Rev. Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba, v.15, p. 65-72, jan/dez. 2005.

COSTA, C.R. et al.; A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Quim. Nova, Vol. 31, No. 7, 1820-1830, 2008.

CRUZ, C.; NETO. J.M.; MENEZES. M.L. Toxicidade aguda do inseticida paration metílico e do biopesticida azadiractina de folhas de neem (*Azadirachta indica*) para alevino e juvenil de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Pesticidas: Rev. Ecotoxicologia e Meio Ambiente, Curitiba, v.14. p. 93-102, Jan/Dez. 2004.

CRUZ, C. Aspectos toxicológicos de paration metílico e de extrato aquoso de folhas secas de nim (*Azadirachta indica*) para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e eficácia no controle de monogenea Dactylogyridae. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Estadual Paulista. Jacoticabal. 2005.

DEGANI, A.L.; Cromatografia um breve ensaio. Química Nova na Escola. n 7, p. 21-27, Maio. 1998.

D'AMATO, C., Torres, J. P. M., Malm, O. DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano): Toxicidade e Contaminação Ambiental – Uma Revisão. *Química Nova*, 25: 995-1002. 2002.

FRANCO, Luiza. Desenvolvimento e Validação de metodologias para o controle de qualidade de derivados de *Pelargonium sidoides* D.C. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná. Curitiba/PR. 2009.

FERREIRA, G.R.; et. al.; Poluição do rio Santa Catarina no município de Vazante (MG) detectada por meio do teste do micronúcleo em peixes. Perquirêre. Edição 5, Ano 5, jun. 2008.

GRADVOHL, S.T de Souza. Avaliação dos riscos ambientais e ecotoxicológicos do reuso de águas residuárias em piscicultura. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Civil, na área de concentração de Saneamento Ambiental da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2006

GIANVECHIO, C.M. et al.; Avaliação da qualidade de extratos vegetais. Revista Eletrôn. Farm., v. 3, n. 2, p. 53-62, 2006.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. Interferentes endócrinos no ambiente. *Quimica. Nova*, Vol. 30, No. 3, 695-706, 2007.

HOBOLD, V. Avaliação de Metodologias para Análise Toxicológica utilizando algas tipo *Scenedesmus subspicatus* e *Daphnia magna*. Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Ambiental da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma/SC. 2007.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQCGCRE-008. 2003.

KALIPCI, E.; et. al.; Ecotoxicological effects of Methyl parathion on living things and environment. African Journal of Agricultural Research Vol. 5(8), pp. 712-718, 18 April, 2010.

LIMA, F. J. C. et al.; Inseticida organofosforado metamidofós: aspectos toxicológicos e analíticos. Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba, v.11, p. 17-34, jan/dez. 2001.

LOPES, T. M. N. Avaliação de pesticidas em água utilizada para o consumo humano no município de Dourados (MS). 2006. 161 f. Tese apresentada ao programa de pós-graduação em da Universidade Estadual Paulista. Araraquara. 2006.

LOPES, J.P. et al.; Análise da Predação de *Notonecta sp* sobre juvenis de tilápia, variedade "QAAT 1". Rev. Bras. Enga. Pesca v. 2, n. 2, maio 2007.

LOPERA BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; VARGAS, L.; STREIT JR., D.P. Tilapicultura semi-intensiva em tanques: Alternativas de fertilização e produção - Revisão. Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR, Umuarama, v. 9, n. 1, p.67-76, 2006.

LUVIZOTTO-SANTOS, R. et al.; Analysis of methyl parathion in tilapia filets using a simple solid phase extraction clean-up and GC-NPD. Braz. J. Food Technol., VII BMCFB, junho 2009.

MACIEL, Edson. Desenvolvimento e validação de metodologia de multiresíduos para a quantificação de resíduos de pesticidas em Manga (*Mangifera indica*). Dissertação apresentada à Escola superior em Agronomia da Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2005.

MADALNER, J.; JARDIM, I.C.S.F.; O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. Quim. Nova, v. 32, n. 1, 214-222, 2009.

MAGALHÃES, D.P.; FILHO, A.S.F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. Oecol. Bras. v.12, n.3, p. 355-381, 2008.

MANRIQUE, W.G. Toxicidade aguda e risco Ecotoxicológico do fipronil para o guaru (*poecilia reticulata*) e dissipação no ambiente aquático. Dissertação apresentada ao Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal. São Paulo. 2009.

MARTINEZ, S.S.; O nim – *Azadirachta indica* natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, p 142p, 2003.

MATAQUEIRO, M.I. Toxicidade aguda e subaguda do inseticida methyl parathion no pacu (*Piaractus mesopotamicus holmberg*, 1887). Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Aqüicultura da UNESP. Jaboticabal – SP. Abril – 2002.

MEDEIROS. L de Souza. Toxicologia Aguda e Risco Ambiental do inseticida Teflubenzuran para *Daphnia magna*, *lemna minor* e *Poecilia reticulata*. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Aqüicultura da UNESP. Jaboticabal/SP. 2008.

MÉNDEZ. C.M, et al.; Intoxicação experimental com frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae) em suínos. *Pesq. Vet. Bras.* 26(1):31-37, Jan/Mar. 2006.

MENEGHINI, Roberta. Desenvolvimento de uma metodologia analítica com microextração líquido-líquido para determinação de agroquímicos organofosforados em água. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Regional de Blumenau. Santa Catarina, Blumenau. 2006.

MENEZES, M. L.; et al . Determination of biopesticide azadirachtin in samples of fish and in samples of water of fish ponds, using chromatography liquid of high performance. *Salusvita*, Bauru, São Paulo-Brasil., v. 23, n. 23, p. 401-415, 2004.

MOREIRA, L.L.; Avaliação ecotoxicológica preliminar de efluentes contendo brometo de etídeo. Monografia apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas. Rio Grande do Sul. 2010.

MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER. C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. *Acta farmacêutica Bonaerense* - vol. 24 n°1, 2005.

MOURA, E. E. S. Determinação da toxicidade aguda e caracterização de risco ambiental do herbicida Roundup (Glifosato) sobre três espécies de peixes.. Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Bioecologia Aquática da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2009.

NEDER, L.M.Z. Alterações bioquímicas e cardio-respiratórias de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) frente à exposição sub-letal do sulfato de cobre. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos. São Paulo-2005.

OGA, Seizi. Fundamentos de toxicologia. 3. ed. São Paulo: Atheneu, p. 677. 2008.

OLIVEIRA-FILHO, O. C.; avaliação da periculosidade ambiental de bioinseticidas como uma nova perspectiva para a ecotoxicologia no Brasil. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 3, n. 1, p, 1-7. 2008.

RIBANI, M.; et. al.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 5, 771-780, 2004.

ROCA, M. F., et. al.; Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. Rev. Bras. Farm., 88(4): 177-180, 2007.

RODRIGUES, M.S.M.; Verificação da contaminação por dimetoato e aldicarb em fígado de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) coletados em dois frigoríficos do estado do Paraná. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 30, n. 4, p. 907-914, out./dez. 2009.

SANTANA, A.K.M.; Nunes, L.C.C.; Medeiros, F.P.M.; Silva, M.J.; Lavra, Z.M.M.; Rolim-Neto, P.J. Otimização e validação do método analítico volumétrico para quantificação do carbonato de cálcio. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., v. 28, n.2, p.177-183, 2007.

SANTOS, R.L.; et. al.; o uso de praguicidas nas pisciculturas e pesqueiros situados na bacia do rio Mogi-Guaçu. B. Inst. Pesca, São Paulo, 35(3): 343 - 358, 2009.

SARTORATTO, A. Desenvolvimento metodológicos em Microextração em Fase Sólida acoplada a Cromatografia gasosa e líquida. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química Analítica da Universidade Estadual de Campinas. São Paulo. 2006.

SEFFRIN, R.C.; et al. Extratos aquosos de frutos verdes de *Melia azedarach* L. var. *azedarach*: Investigação da presença de cianeto e avaliação toxicológica. Biotemas, 21 (3): 143-147, setembro de 2008.

SILVA, B. M. Toxicidade Aguda dos herbicidas Diuron e Hexazinona à *Danio rerio*. Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente, Curitiba, v. 20, p. 17-28, jan./dez. 2010.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.; Farmacognosia, da planta ao medicamento. Porto Alegre: editora UFRGS. P-1104, 2007.

SOUZA, J. P. Toxicidade Aguda e Risco Ambiental do Diflubezuron para *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* e *Lemna minor* na ausência e presença de sedimento.. Dissertação a apresentada ao Programa de Pósgraduação em Aqüicultura. UNESP/SP. Jaboticabal. 2008.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de Análise Instrumental*., 5ª. ed. Porto Alegre: Editora Bookman-SBQ, 2002.

STULP, S.; et. al.; Avaliação eletroquímica e degradação fotoquímica do pesticida Malathion. Revista Liberato, Novo Hamburgo, v. 9, n. 12, p. 7-12, jul./dez. 2008

TAVECHIO, M.L.G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L.; alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. B. Inst. Pesca, São Paulo, 35(2): 335 - 341, 2009.

TOMAZELLI, O. J. Uso de extratos vegetais no controle de larvas de insetos aquáticos (OONATA: *Libellulidae*) predadores de alevinos em viveiros de piscicultura. Dissertação apresentada ao no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade Comunitária e Regional de Chapecó-SC. 2009.

TOMAZELLI JR., O.1a; FRANCO, G. M. S.2; CASACA, J. M.1b; MUNARINI, A. C.3 & DAL MAGRO, J. Efeito do extrato de *Melia Azedarach* L. sobre predação de alevinos de

carpa comum (*Cyprinus carpio*) por larvas de *Neuraeschna* (ODONATA: AESHNIDAE). Braz. J. Aquat. Sci. Technol., n. 15(1): 19-25. 2011.

TOMITA, R.Y; BEYRUTH. Z.; Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. Biológico, São Paulo, v.64, n.2, p.135-142, jul./dez., 2002.

TONHI. E.; JARDIM. I.; COLLINS, C.; fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. Quim. Nova, Vol. 25, n. 4, 616-623, 2002.

VALENTI, W. C. Aquicultura sustentável. In: Congresso de Zootecnia, 12º, Vila Real, Vila Real: Associação Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos. Anais.p.111-118. Portugal. 2002,

VEIGA, M.M; et. al.; Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 22(11):2391-2399, nov, 2006.

VIEGAS, J. C.; Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. Quim. Nova, v.26, n.3, p.390-400. 2003.

VIVIAN, M. P.; Uso do cinamomo (*Melia azedarach*) como alternativa aos agroquímicos no controle do carrapato bovino (*Boophilus microplus*). Dissertação apresentada ao no Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. UFSC. Florianópolis-SC. 2005.

WILSON JM, Bunte RM, Carty AJ. Evaluation of rapid cooling and tricaine ethanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). J Am Assoc LabAnim Sci 2009;48(6):785-9.

WEINGARTNER. M.; FILHO, E. Z. Efeito de fatores abióticos na larvicultura de pintado amarelo *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803): salinidade e cor de tanque. Acta Scientiarum. Animal Sciences Maringá, v. 26, no. 2, p. 151-157, 2004.

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