



**6º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2012
13 a 15 de agosto de 2011 – Jaguariúna, SP**

**TOXICIDADE CRÔNICA DO DIFLUBERZURON SOBRE UM INVERTEBRADO
AQUÁTICO BIOINDICADOR**

ELIANE A. DE OLIVEIRA¹; VERONICA J. DE PAULA²; MARJORIE GUIMARÃES³;
MARINA D.B. PELEGRINI⁴; CLAUDIO MARTIN JONSSON⁵

Nº 12405

RESUMO

Nas últimas décadas observa-se um crescimento considerável da aquicultura como uma fonte alternativa na produção de alimentos. Entretanto, a saúde dos sistemas aquícolas e a qualidade dos seus efluentes se vê ameaçada pelo uso de agentes químicos empregados no controle de parasitas. Outra ameaça refere-se à aplicação de agroquímicos nas regiões de entorno, os quais podem atingir os sistemas aquícolas. Os organismos zooplanctônicos são responsáveis por 80% da produção secundária nos ambientes aquáticos e de fundamental importância nos sistemas piscícolas. Portanto, alterações significativas sobre a comunidade zooplanctônica refletirão em desequilíbrio nesses ambientes. Um dos pesticidas mais utilizados hoje não só na aquicultura, mas também na agricultura é o diflubenzuron, usado no controle de exoparasitas de peixes. O presente trabalho visou o estudo de influência de concentrações subletais do pesticida no crescimento e sobrevivência do microcrustáceo zooplanctônico *Daphnia similis*, após um período de 7 dias de exposição. A maior concentração de efeito não observado (CENO) e a menor de efeito observado (CEO) foram respectivamente 0,033 e 0,11 $\mu\text{g L}^{-1}$, tanto para a taxa de crescimento como para a sobrevivência. A concentração que afetou 50% da mobilidade dos organismos (CE50-7d) foi equivalente a 0,100 (0,073 – 0,162) $\mu\text{g L}^{-1}$, indicando que a toxicidade aumentou em aproximadamente 10 vezes em relação à exposição por 48 h. Os dados são úteis no estabelecimento de níveis máximos permissíveis em corpos de água e no manejo menos agressivo para a biota aquática quanto à aplicação do diflubenzuron.



**6º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2012
13 a 15 de agosto de 2011 – Jaguariúna, SP**

ABSTRACT

In recent decades there has been considerable growth of aquaculture as an alternative source of food production. However, the health of aquaculture systems and the quality of their effluent is threatened by the application of chemical agents used to control pests. Another threat refers to the application of agrochemicals in the surrounding regions, which can reach the aquaculture systems. The zooplankton organisms are responsible for 80% of secondary production in aquatic environments and are of fundamental importance in fish farming. Therefore, alterations in the zooplankton community will reflect an imbalance in these environments. One of the pesticides most commonly used today not only in aquaculture but also in agriculture is diflubenzuron. It has been used to control fish exoparasitosis. The present work aimed to study changes by sublethal concentrations (7 days) on growth and survival of the zooplanktonic microcrustacean *Daphnia similis*. The highest concentration of no observed effect (NOEC) and lowest observed effect concentration (OEC) were respectively 0.033 and 0.11 $\mu\text{g L}^{-1}$, for the growth rate as for survival. The concentration which affect the 50% mobility (EC50-7d) was equivalent to 0.100 (0.073 - 0.162) $\mu\text{g L}^{-1}$, indicating that the toxicity increased approximately 10 times compared to exposure for 48 h. The data are useful in establishing maximum permissible levels in water compartments and in implement a less aggressive management for aquatic biota associated to the use of diflubenzuron.

¹ Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária, PUCC, Campinas-SP; elia59@live.com

² Bolsista Treinamento Técnico 3 Fapesp: Graduação em Ciências Biomédicas, Veris Metrocamp IBTA, Campinas-SP.

³ Bolsista Embrapa: Graduação em Ciências Biomédicas, Veris Metrocamp IBTA, Campinas-SP.

⁴ Bolsista Embrapa: Graduação em Ciências Biológicas, IB / Unicamp, Campinas-SP.

⁵ Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.



INTRODUÇÃO

O exploração da aquicultura cresce consideravelmente à medida que a população aumenta, como uma fonte alternativa na produção de alimentos. Esse aumento preocupam a comunidade científica a respeito da saúde dos sistemas aquícolas e qualidade de seus efluentes, já que agentes químicos usados no controle de parasitas podem ser usados de forma inadequada (MABILIA; SOUZA, 2006).

De acordo com Mangas-Ramirez, et. al. (2001), organismos zooplanctônicos, são responsáveis por 80% da produção secundária nesses ambientes. Portanto, alterações significativas sobre a comunidade zooplanctônica refletirão em desequilíbrio do ecossistemas aquáticos.

Um dos pesticidas mais utilizados hoje não só na piscicultura, mas também na agricultura, é o diflubenzuron. É um agrotóxico do tipo benzoilureia, da classe benzamida que tem uma ação inibidora da síntese de quitina, durante o estágio imaturo do inseto, componente do exoesqueleto do parasita. (SECRETARIA DO ESTADO DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO – PARANÁ, 2011).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1997) classifica o diflubenzuron como um produto de uso restrito devido a falta de informações sobre os efeitos que pode causar sobre invertebrados aquáticos.

A concentração com maior eficácia está entre 0,5 a 2 mg.L⁻¹, concentração que tem eficácia na parasitose de peixes, mas que também pode afetar em toda biota aquática dos sistemas aquícolas. Os efeitos potenciais da contaminação dos efluentes destes sistemas devem-ser considerados, assim como também o risco decorrente da aplicação do inseticida nas regiões de entorno dos sistemas aquícolas (FUJIMOTO et al., 2005).

O microcrustáceo planctônico *Daphnia sp* é amplamente utilizado na avaliação de risco e monitoramento de poluentes em meio aquático, sendo recomendado o seu uso por órgãos internacionais (OECD, 2004; EUROPEAN COMMISSION, 2002) e nacionais (IBAMA, 1988).

Em trabalhos previamente realizados por nosso grupo de pesquisa, foram avaliados os efeitos decorrentes da exposição aguda em *Daphnia similis* e de microalgas ao diflubenzuron (DANTZGER et al., 2011). O presente trabalho visou avaliar o efeito de



6º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2012 13 a 15 de agosto de 2011 – Jaguariúna, SP

concentrações subletais de diflubenzuron no crescimento e sobrevivência de *Daphnia similis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo de *D. similis*:

Como organismo-teste utilizou-se o microcrustáceo de água doce *D. similis* com idade inferior a 24 horas. O invertebrado foi previamente cultivado em aquários de 40 x 25 x 15 cm, com água decolorizada com as seguintes características físico-químicas: dureza total = 53,58 mg L⁻¹ CaCO₃; pH = 7,5 e condutividade = 111,4 µS cm⁻¹. Os organismos foram mantidos em sala climatizada sob temperatura controlada a 20±2°C, luminosidade de 1.000 lux e alimentados com algas das espécies *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Material-teste: Formulação comercial de diflubenzuron (pó molhável) na concentração de 250 g /Kg.

Delimitação experimental e análise de dados: Um neonato de *D. similis* foi colocado num béquer de 50 mL num volume total de 30 ml. O experimento foi realizado em número de 10 réplicas para cada concentração-teste: 0,00; 0,011; 0,033; 0,11; 0,33 e 1,00 µg L⁻¹. Tais soluções-teste referem-se às concentrações dos ingredientes ativos dissolvidos em água com as características físico-químicas já descritas anteriormente. As soluções foram renovadas em períodos aproximados de 48 horas durante 7 dias, sendo que os organismos de cada recipiente eram retirados periodicamente para avaliar a medida do comprimento total do indivíduo. Neste caso considerou-se o comprimento da cabeça até o final da carapaça, desconsiderando o espinho apical. A medida foi realizada utilizando-se um estereomicroscópio ao que foi acoplado uma câmera digital, sendo que a análise da imagem foi realizada utilizando-se o programa MB-Ruler. Calcularam-se as taxas de crescimento (unidades MB-Ruler . d⁻¹) para cada concentração testada. As taxas de crescimento em função de cada tratamento foram comparadas pelo módulo One Way Anova do programa Statgraphic Plus Version 5.1 (MANUGISTICS, 2001). Assim sendo, calculou-se a maior concentração de efeito não observado (CENO) e a menor concentração de efeito observado (CEO).

Também registrou-se o número de indivíduos móveis em cada tempo de exposição. A concentração que afetou 50% dos organismos móveis no período de 7 dias (CE50-7d), e



6º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2012
13 a 15 de agosto de 2011 – Jaguariúna, SP

seu intervalo de confiança 95%, foi estimada pelo módulo Probit Analysis do programa Statgraphic Plus Version 5.1 (MANUGISTICS, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1, são apresentados os resultados referentes ao efeito do diflubenzuron sobre a taxa de crescimento do microcrustáceo. Constatou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da taxa de crescimento a partir da concentração de $0,11 \mu\text{g L}^{-1}$ em relação ao controle, sendo assim estimada uma CENO e uma CEO equivalentes a $0,033$ e $0,11 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente

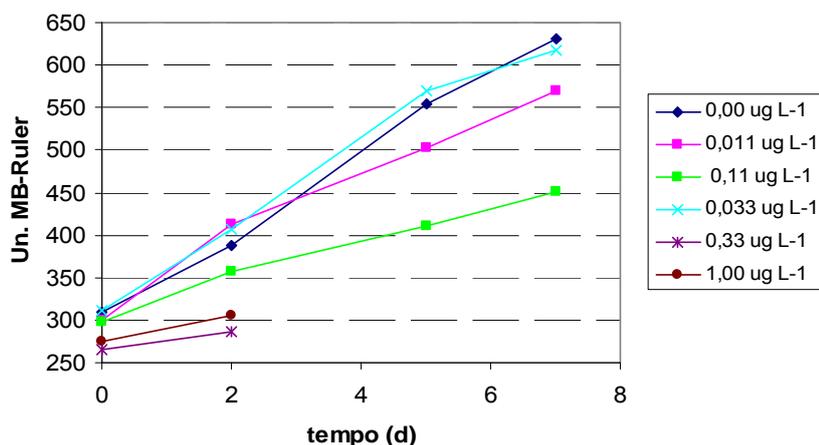


Figura 1: Variação do tamanho (unidades MB-Ruler) de *D. similis* em função do tempo de exposição ao diflubenzuron sob diferentes concentrações. Cada ponto é a média de 10 observações para cada tratamento.

Nas concentrações $0,33 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,00 \mu\text{g L}^{-1}$ houve mortalidade total no 5º dia de observação. Apenas 40% dos organismos expostos à concentração de $0,11 \mu\text{g L}^{-1}$ sobreviveram até o final do experimento.

Nas concentrações de $0,011$ e $0,033 \mu\text{g L}^{-1}$ constatou-se uma sobrevivência de 90 e 100%, respectivamente.

Portanto, analogamente aos efeitos sobre o crescimento, a partir da concentração de $0,11 \mu\text{g L}^{-1}$ constatou-se uma diminuição acentuada da taxa de sobrevivência comparativamente ao controle (Figura 2). A partir destes dados, a CE50-7d calculada, e seus intervalos de confiança 95%, foi equivalente a $0,100$ ($0,073 - 0,162$) $\mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 3).

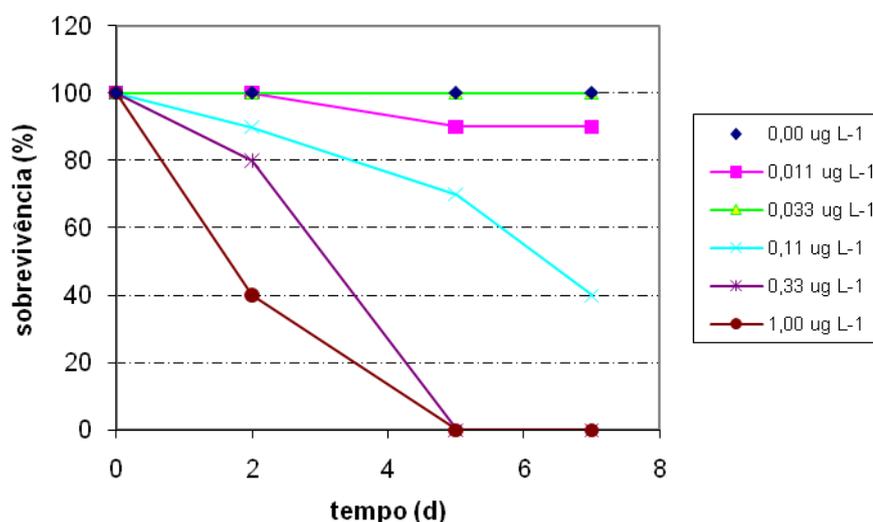


Figura 2: Variação da sobrevivência de *D. similis* em função da exposição por 7 dias ao diflufenuron sob diferentes concentrações. Observações referentes a 10 réplicas..

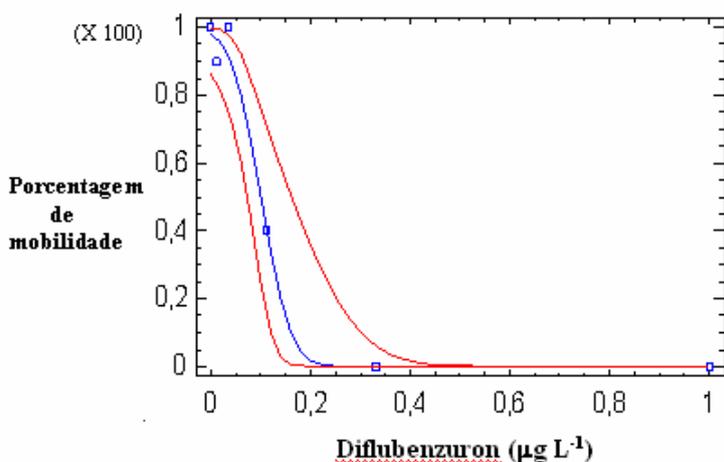


Figura 3: Curva dose-resposta após 7 dias de exposição de *D. similis* a diferentes concentrações de diflufenuron. As curvas em vermelho representam o intervalo de confiança a nível de 95% de certeza.

No presente trabalho, a maior dose de diflufenuron testada ($1,0 \mu\text{g L}^{-1}$) foi equivalente ao valor da CE50-48h para *D. similis*, determinada em estudos prévios (DANTZGER et al., 2011). Este valor foi 10 vezes diminuído pela exposição por 7 dias, sinalizando a importância do tempo de exposição no aumento da toxicidade.

Conforme relatório da WHO (2005), os valores de CENOs calculados para *Daphnia magna* foram equivalentes a $0,45$ e $0,38 \mu\text{g L}^{-1}$, entretanto estes valores são referentes a



6º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2012 13 a 15 de agosto de 2011 – Jaguariúna, SP

estudos de exposição por 24 h. Segundo Swedish Chemicals Agency (2007), $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ é o valor de CENO relatado para *D. magna* num estudo de 21 dias, valor muito próximo ao determinado no presente trabalho.

Em comparação aos efeitos tóxicos em peixes, o valor de CENO determinado em trutas sob exposição por 21 dias (SWEDISH CHEMICALS AGENCY, 2007) é muito superior ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$) ao determinado no presente trabalho.

Na sua dose de aplicação em campo quanto ao controle de pragas na agricultura, a concentração estimada de diflubenzuron decorrente da aplicação direta numa coluna de água de 15 cm seria equivalente a $\sim 0,12 \text{ mg L}^{-1}$, ou seja aproximadamente 3.600 vezes maior que o valor de CENO determinado no presente trabalho. Procedimentos semelhantes a este tem sido empregados para estimar o risco de inseticidas em sistemas aquáticos (BROWN et al., 2002).

CONCLUSÃO

Os parâmetros toxicológicos determinados no presente estudo confirmam a alta toxicidade do diflubenzuron para microcrustáceos, sendo o tempo de exposição de extrema importância para a manifestação de efeitos a menores concentrações que a CE50-48h.

Os valores de CENO apresentaram se semelhantes aos citados em relatórios de agencias reguladoras internacionais, entretanto nestes não são apresentados detalhes metodológicos.

As concentração ambiental, em corpos de água, estimada para o diflubenzuron após uma aplicação em campo, pode ser bem superior à concentração que não provocaria efeitos adversos em organismos zooplanctônicos.

Os resultados são de utilidade na ampliação da base de dados sobre interações de poluentes em organismos não-alvo, e aportam informações a respeito do estabelecimento de níveis máximos permissíveis em corpos de água e manejo menos agressivo para a biota aquática quanto à aplicação do diflubenzuron.

AGRADECIMENTOS



**6º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2012
13 a 15 de agosto de 2011 – Jaguariúna, SP**

Ao CNPq (PIBIC) pela bolsa concedida.

À Embrapa pela oportunidade de estágio

À Fapesp pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

BROWN MD, CARTER J, THOMAS D, PURDIER DM, KAY BH. Pulse-exposure effects of selected insecticides to juvenile Australian crimson-spotted rainbowfish (*Melanotaenia duboulayi*), 2002.

DANTZGER, D.D, JONSSON, C.M., AOYAMA, H. Comparative Toxicity of diflubenzuron and p-chloroaniline in Phosphatases and Antioxidant Enzymes of Non-Target Organisms. 1º Workshop do Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional Molecular. Abstracts. Campinas, IB-Unicamp, 2011.

EUROPEAN COMMISSION, **Guidance Document on Aquatic Ecotoxicology**, rev. 4. Brussels: European Commission, 2002.

FUJIMOTO, R.Y.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; ONAKA, E.M. Utilização do diflubenzuron no controle de crustáceos parasitos de piaçu, *Leporinus macrocephalus*. Efeito paratocida e parâmetros hematológicos. **Anais do XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, 133p. 1999.

GARTENSTEIN, S. et al. (2006). Toxicity effects of diflubenzuron, cypermethrin and diazinon on the development of *Artemia salina* and *Heliocidaris tuberculata*. *Australasian Journal of Ecotoxicology*, 12, 83-90.

IBAMA (1988) Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos. Secretaria do Meio Ambiente. Brasília. 351p.

MABILIA, R.G e Souza, S.M.G. Efeito do tratamento com Diflubenzuron na hematologia de jundiás, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae) infestados por *Lernaea cyprinacea* (Copepoda) em banhos de imersão 24 horas. **Acta Sci. Biol. Sci.**, v.28,n2,p.159-163, 2006.

MANGASZ-RAMIREZ, E.; SARMA, S.S.S.; ANDINII, S. Combined effects of algal (*Chlorella vulgaris*) density and ammonia concentration on the population dynamics of *Ceriodaphnia dubia* and *Moina macrocopa* (Cladocera). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.51, p.216-222, 2004

MANUGISTICS Statgraphics Plus. Version 5.1 for Windows. Rockville: Manugistics Group, 2001

OECD. **Guideline for testing on chemicals: *Daphnia* sp.**, acute immobilization test. Paris: OECD, 2004.

WHO SPECIFICATIONS AND EVALUATIONS FOR PUBLIC HEALTH PESTICIDES . DIFLUBENZURON 1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea. World Health Organization, Geneva, 2005, 29p.

MANUGISTICS Statgraphics Plus. Version 5.1 for Windows. Rockville: Manugistics Group, 2001



6º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2012
13 a 15 de agosto de 2011 – Jaguariúna, SP

SCHALC, S.H.C; Belo, M.A.A.; Soares, V.E.; Moraes, J.R.E.; Moraes, F.R. Eficacia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infectados. **Acta. Sci. Anim. Sci.** v.27, n.2, p.297-302, 2005

SEAB – Secretaria de estado de Agricultura e Abastecimento do Paraná – Bulas de inseticidas – Dimilin 80 WG. Paraná, 2011 [Acesso em 02/07/2012] Disponível em : www.seab.pr.gov.br/arquivos/file/defis/DFI/Bulas/Inseticids/DIMILIN_80_WG.pdp

SWEDISH CHEMICALS AGENCY. *Work Programme for Review of Active Substances in Biocidal Products Pursuant to Council Directive 98/8/EC. Document 1. Diflubenzuron.* Swedish Chemicals Agency, Sundbyberg, 2007. 46p.

USEPA **Prevention Pesticides and Toxic Substances.** United states Environmental Protection Agency, 1997. Disponível em; <http://www.epa.gov/oppsrrd1/reds/factsheets/0144fact.pdf>. Acesso em: 23/07/2012.