

HEMERSON LOUREÇO SILVA FREITAS

**IMPACTOS DO INSETICIDA DIMILIN® EM INSETOS AQUÁTICOS NÃO-ALVO E
EM PEIXES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Defesa Sanitária Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Eugênio Eduardo de Oliveira

Coorientadora: Sabrina Helena da Cruz
Araujo

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa -
Campus Viçosa

T

F866i
2020

Freitas, Hemerson Lourenço Silva, 1992-

Impactos do inseticida Dimilin® em insetos aquáticos não-alvo e em peixes / Hemerson Lourenço Silva Freitas. – Viçosa, MG, 2020.

34 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eugenio Eduardo de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 29-34.

1. Diflubenzuron (Inseticida). 2. *Belostoma anurum*. 3. *Buenoa amnigenus*. 4. Insetos aquáticos - Efeito dos inseticidas. 5. Peixes - Efeito dos inseticidas. I. Universidade Federal de

CDD 22. ed. 632.9517

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fatima
Alves CRB6/2578

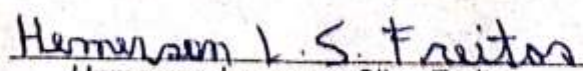
HEMERSON LOURENÇO SILVA FREITAS

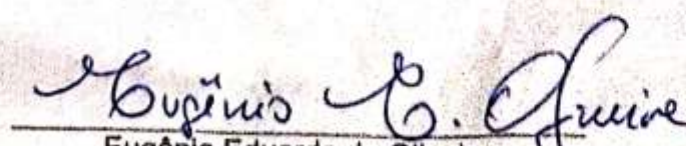
IMPACTOS DO INSETICIDA DIMILIN® EM INSETOS AQUÁTICOS NÃO-ALVO E
EM PEIXES

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Defesa Sanitária Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de junho de 2020.

Assentimento:


Hemerson Lourenço Silva Freitas
Autor


Eugênio Eduardo de Oliveira
Orientador

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, e ao Departamento de Entomologia, pela realização do Mestrado.

Ao professor orientador Dr. Eugênio Eduardo de Oliveira, pela amizade, dedicação, compreensão e confiança.

À Coorientadora Dra. Sabrina Helena da Cruz Araujo pela ajuda na elaboração dos experimentos.

A todos os professores, estagiários, e funcionários da UFV pela atenção e contribuições.

À CAPES por todo apoio.

RESUMO

FREITAS, H. L. S., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2020. **Impactos do inseticida Dimilin® em insetos aquáticos não-alvo e em peixes.** Orientador: Eugênio Eduardo de Oliveira. Coorientadora: Sabrina Helena da Cruz Araujo.

A utilização de pesticidas traz grandes benefícios para a produtividade agrícola. Entretanto, tais insumos agrícolas acarretam impactos ambientais para ecossistemas terrestres e aquáticos. O inseticida diflubenzuron (Dimilin®), pertencente à classe de reguladores de crescimento, é amplamente utilizado em diversas culturas para o controle de pragas, incluindo aquelas que causam danos a produção intensiva de alevinos. Entretanto, faltam informações a respeito do impacto deste inseticida em organismos aquáticos não-alvo, principalmente aqueles pertencentes a entomofauna aquática. Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o impacto do Dimilin® na sobrevivência de baratas d'água *Belostoma anurum* (Hemiptera: Belostomatidae), de notonectídeos *Buenoa amnigenus* (Hemiptera: Notonectidae) e peixes barrigudinhos *Poecilia reticulata* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). Ninfas de segundo instar de *B. anurum*, adultos de *B. amnigenus* e jovens de *P. reticulata* foram expostos às seguintes concentrações de Dimilin®: 1g/3000 L de água (i.e., a dosagem recomendada para controle de insetos aquáticos em tanques de piscicultura), bem como as diluições correspondentes à 30% e 1% da dose de campo. O tratamento controle consistiu de água destilada e deionizada. Os tempos totais de exposição para *B. anurum*, *B. amnigenus* e *P. reticulata* foi de 4, 10 e 4 dias, respectivamente. A mortalidade foi avaliada a cada 24h e os organismos eram considerados mortos quando não respondiam a estímulos mecânicos. Estes dados de mortalidade foram submetidos a análises de sobrevivência utilizando o método Log-rank. Os resultados obtidos demonstraram que tanto os insetos aquáticos (i.e., *B. Anurum* e *B. Amnigenus*) quanto os barrigudinhos (*P. reticulata*) não sofreram alterações em suas habilidades de sobrevivência quando expostos ao Dimilin®, não importando a dosagem aplicada. Tais achados indicam que o inseticida Dimilin® não traz impactos aparentes na sobrevivência dessas espécies aquáticas, o que reforça a sua seletividade e potencial para utilização no controle de insetos pragas na piscicultura.

Palavras-chave: Diflubenzuron (Inseticida). *Belostoma anurum*. *Buenoa amnigenus*.

Insetos aquáticos.

ABSTRACT

FREITAS, H. L. S., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2020. **Impacts of the insecticide Dimilin® on non-target aquatic insects and fish.** Advisor: Eugênio Eduardo de Oliveira. Co-Advisor: Sabrina Helena da Cruz Araujo.

The use of pesticides has great benefits for agricultural productivity. However, such agricultural inputs have environmental impacts for terrestrial and aquatic ecosystems. The insecticide diflubenzuron (Dimilin®), belonging to the class of growth regulators, is widely used in several cultures for pest control, including those that cause damage to intensive fry production. However, there is a lack of information regarding the impact of this insecticide on non-target aquatic organisms, especially those belonging to aquatic entomofauna. Thus, this work was carried out with the objective of evaluating the impact of Dimilin® on the survival of water cockroaches *Belostoma anurum* (Hemiptera: Belostomatidae), of *Buenoa amnigenus* (Hemiptera: Notonectidae) and potbellied fish *Poecilia reticulata* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). Second instar nymphs of *B. anurum*, adults of *B. amnigenus* and young of *P. reticulata* were exposed to the following concentrations of Dimilin®: 1g/3000 L of water (i.e., the recommended dosage for control of aquatic insects in ponds) fish farming), as well as the dilutions corresponding to 30% and 1% of the field dose. The control treatment consisted of distilled and deionized water. The total exposure times for *B. anurum*, *B. amnigenus* and *P. reticulata* were 4, 10 and 4 days, respectively. Mortality was assessed every 24 hours and organisms were considered dead when they did not respond to mechanical stimuli. These mortality data were submitted to survival analysis using the Log-rank method. The results obtained showed that both aquatic insects (i.e., *B. Anurum* and *B. Amnigenus*) and paunchy insects (*P. reticulata*) did not change their survival skills when exposed to Dimilin®, the dosage applied was not important. Such findings indicate that the insecticide Dimilin® has no apparent impact on the survival of these aquatic species, which reinforces their selectivity and potential for use in the control of insect pests in fish farming.

Keywords: Diflubenzuron (Insecticide). *Belostoma anurum*. *Buenoa amnigenus*. Water insects.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Estrutura do inseticida Diflubenzuron: Philips-Duphar BV 1972..... | 15 |
| Figura 2 – Modo de ação do Diflubenzuron em <i>Drosophila</i> | 16 |
| Figura 3 – Análise de sobrevivência de percevejos aquáticos <i>B. anurum</i> e <i>Buenoa amnigenus</i> em resposta ao inseticida Dimilin®..... | 24 |
| Figura 4 – Análise de sobrevivência de notonectídeos <i>B. amnigenus</i> em resposta ao inseticida Dimilin®..... | 25 |
| Figura 5– Análise de sobrevivência de peixes barrigudinhos <i>P. reticulata</i> resposta ao inseticida Dimilin®..... | 26 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|-----------------------|
| CL ₅₀ | Concentração Letal. |
| CE ₅₀ | Concentração Efetiva. |
| TL ₅₀ | Tempo Letal. |
| h | Hora. |
| ml | Mililitro. |
| g | grama. |
| µg | Micrograma. |
| DC | Doce de campo. |
| g/ L ⁻¹ | Concentração. |

LISTA DE SÍMBOLOS

- ® Marca Registrada.
- P Probabilidade.
- % Porcentagem.
- °C Grau Celsius.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 13 |
| 2.1. CONTAMINAÇÃO DE AMBIENTES AQUÁTICOS E A PSICULTURA..... | 13 |
| 2.2. DIFLUBENZURON | 14 |
| 2.3. ECOTOXICOLOGIA..... | 17 |
| 3. OBJETIVOS | 18 |
| 3.1. OBJETIVO GERAL | 18 |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 18 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 18 |
| 4.1. <i>OBTENÇÃO DOS INSETOS E PEIXES</i> | 18 |
| 4.2. <i>INSETICIDA</i> | 19 |
| 4.3. <i>ENSAIOS DE SOBREVIVÊNCIA</i> | 19 |
| 4.4. <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i> | 20 |
| 5. RESULTADOS | 21 |
| 6. DISCUSSÃO | 25 |
| 7. CONCLUSÃO | 28 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 29 |

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, vem crescendo a contaminação dos ecossistemas por inseticidas; e vários estudos mostram impactos negativos destes em insetos não-alvo de ambientes terrestres (GARZON *et al.*, 2015, FERNANDES *et al.*, 2016). A contaminação por pesticidas também é considerada um estressor importante em ecossistemas aquáticos (RELYEA & HOVERMAN, 2006, BUTCHART *et al.*, 2010; GUTIÉRREZ *et al.*, 2016). São poucas as informações quanto ao impacto dessas moléculas na entomofauna aquática não-alvo. A situação se agrava quando pesticidas usados no controle de doenças e pragas nas lavouras podem ser carregados através de águas de chuvas até corpos de água e acarretar efeitos letais a organismos não-alvo (INVEST & LUCAS, 2008; VAN DEN BERG *et al.*, 2012; BENGGOA *et al.*, 2014; PONLAWAT *et al.*, 2013; GUTIÉRREZ *et al.*, 2016; TUTEN *et al.*, 2016).

Na atualidade, a piscicultura vem crescendo e ganhando notoriedade no cenário do agronegócio brasileiro, consolidando-se assim como uma importante atividade econômica (KUBITZA, 2015). Porém, assim como nas lavouras, também existem pragas e doenças que causam danos à saúde dos peixes e causam prejuízos econômicos ao piscicultor. Para remediar tais situações, a primeira estratégia é a aplicação de produtos químicos para o combate das parasitoses e predadores que atacam os peixes. Entretanto, a falta de pesticidas licenciados para a aquicultura em conjunto com a falta de informação levam ao uso indiscriminado de produtos químicos, com formulações que são próprias para a agricultura (MADUENHO, *et al.*, 2007).

Entre os inseticidas utilizados no controle de mosquitos e insetos-praga na agricultura, estão os piretroides e reguladores de crescimento de insetos (BENGGOA *et al.*, 2014; TUTEN *et al.*, 2016). Diflubenzuron (Dimilin®) é um inseticida regulador de crescimento em insetos da classe benzoiluréia, que atua inibindo a síntese de quitina do exoesqueleto de artrópodes (MADUENHO *et al.*, 2007). Na agricultura é utilizado no combate de insetos em culturas como a do milho, tomate, algodão, trigo e citros. Devido à sua eficácia, vem sendo utilizado de forma ilegal em algumas pisciculturas brasileiras no controle de fases larvais de odonata, assim como de ectoparasitos dos peixes.

A utilização incorreta desses produtos químicos, além da contaminação do ambiente aquático, pode causar efeitos subletais em peixes, além de afetar a

habilidade predatória de inimigos naturais de insetos, incluindo inimigos naturais da fauna aquática (REYNALDI *et al.*, 2011). Alguns desses inimigos naturais são os insetos da família Belostomatidae que são predadores de outros insetos aquáticos e pequenos vertebrados (TOLEDO, 2003; SHAALAN *et al.*, 2009; KWEKA *et al.*, 2011). Esses organismos são usados como bioindicadores de qualidade de água (MOGREN *et al.*, 2013).

Os impactos dos pesticidas na entomofauna aquática e em peixes são amplos, porém existe uma carência de dados e estudos sobre os efeitos e impactos causados especificamente pelo Dimilin®. Portanto, esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito do inseticida Dimilin® na sobrevivência de *Belostoma anurum* (Hemiptera: Belostomatidea), *Buenoa amnigenus* (Hemiptera: Notonectidae) e em peixes *Poecilia reticulata* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). Deste modo, os resultados descritos no presente estudo contribuem para a avaliação dos riscos ecológicos decorrentes da exposição de predadores aquáticos e peixes.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Contaminação de Ambientes aquáticos e a piscicultura

O crescimento da população mundial e a tendência por alimentos mais saudáveis têm aumentando a demanda pelo pescado, e conseqüentemente isso reflete no crescimento e fortalecimento do setor aquícola no Brasil (KUBITZA, 2003). Na piscicultura brasileira é comum a prática de utilização de produtos muitas vezes não registrados para o uso veterinário nos peixes, dentre os produtos utilizados estão: avermectinas, organofosforados e diflubenzuron. Esse último é utilizado na aquicultura, principalmente no controle de crustáceos ectoparasitas como a *Lernaea cyprinacea* e *Dolops carvalhoi* (MADUENHO *et al.*, 2007).

O uso indiscriminado de produtos químicos em pisciculturas para tratamento de enfermidades em peixes, assim como o uso intensivo nas lavouras para tratamento de pragas e doenças vêm provocando a contaminação dos ambientes aquáticos e causando preocupação sobre os efeitos dessas substâncias em organismos não-alvo (RELYEA & HOVERMAN, 2006; BUTCHART *et al.*, 2010; GUTIÉRREZ *et al.*, 2016).

Além do uso de pesticidas em pisciculturas, a contaminação pontual dos ambientes aquáticos pode ocorrer pela eliminação direta de despejos de esgotos domésticos e industriais. A contaminação difusa, entretanto, corresponde à eventos de contaminação difíceis de quantificar, uma vez que estão relacionados à ocorrência de precipitação atmosférica e escoamentos urbanos e agrícolas (RODRIGUES, 2007). A ocorrência de sistemas aquáticos integrados às áreas de plantio facilita a drenagem de pesticidas e contaminação da entomofauna presente (BORGES, 2005).

Alguns estudos sugerem que a quantidade de produtos químicos relacionados à agricultura que atingem ambientes aquáticos é geralmente baixa, devido ao efeito da diluição e à baixa solubilidade de muitos compostos em água (MONTANHA *et al.*, 2011). Entretanto, o efeito de tais contaminantes na entomofauna aquática não pode ser negligenciado, uma vez que ocorrem alterações nas propriedades físico-químicas da água (BORGES, 2005), além de possíveis efeitos subletais nas espécies presentes.

Adicionalmente, a persistência de poluentes no ecossistema pode variar de acordo com sua natureza química, permitindo a sua ocorrência em maiores concentrações em longo prazo. Os ecossistemas aquáticos apresentam mecanismos físicos, químicos e biológicos de assimilação de compostos tóxicos. Com a ocorrência

de tais compostos em níveis acima da capacidade assimilativa, entretanto, os poluentes afetam a sobrevivência, o crescimento e a reprodução das populações presentes (COELHO, 2006).

Nas últimas décadas, o aumento da presença de xenobióticos nos ambientes aquáticos tem alcançado níveis alarmantes e vem comprometendo a saúde dos organismos presentes (ARIAS *et al.*, 2007). O estudo do impacto da contaminação ambiental na entomofauna aquática é de extrema necessidade devido ao seu papel fundamental no fluxo de energia, na ciclagem de nutrientes e na cadeia alimentar de outros organismos (RUSSO *et al.*, 2002). Porém, a complexidade de tais ecossistemas dificulta a exata predição dos impactos de poluentes diversos, tais como os pesticidas, nos organismos aquáticos, incluindo as concentrações máximas permissíveis em tais ambientes (JONSSON *et al.*, 2002).

2.2 Diflubenzuron

O diflubenzuron, que tem sido comercializado em muitos países com o nome comercial de Dimilin®. Tendo sido descoberto de forma inesperada na década de 1970 no laboratório Philips–Duphar (ASCHER & NEMNY, 1976; CHAKRABORTI & CHATTERJEE, 200), esse pesticida pertence à classe de inseticidas das benzoilfenilureias e apresenta como mecanismo de ação a inibição da síntese de quitina, durante o estágio imaturo dos insetos (SILVA & MENDES, 2002).

A quitina é uma parte integral do exoesqueleto dos insetos, sendo essencial para a proteção contra desidratação, injúrias e infecções por microrganismos. Uma vez que a síntese de quitina é uma característica dos artrópodes e ausente em vertebrados, seu espectro de ação é restrito, o que tornou o uso de benzoilfenilureias atrativo. Além disso, ao contrário de outros inseticidas comumente empregados, como organofosforados, carbamatos, piretróides e neonicotinóides que atuam diretamente no sistema nervoso, as benzoilfenilureias inibem a síntese de quitina na epiderme, o que reduz as possibilidades de mecanismos de resistência (DOUCET & RETNAKARAN, 2012).

As benzoilfenilureias são compostos contendo uma porção central de ureia, com um grupo benzoil ligado a um nitrogênio de um lado da ponte de ureia e um grupo fenil ligado ao outro lado. O Diflubenzuron possui duas substituições do tipo orto-flúor na porção benzoíla e uma substituição para-cloro na porção fenila (Figura 1). Um estudo relacionando a estrutura de diversas benzoilfenilureias com a atividade contra

a larva da broca do arroz, *Chilo suppressalis*, revelou que a inibição da síntese de quitina está relacionada à extremidade que possui o grupo benzoil (NAKAGAWA *et al.*, 1991).

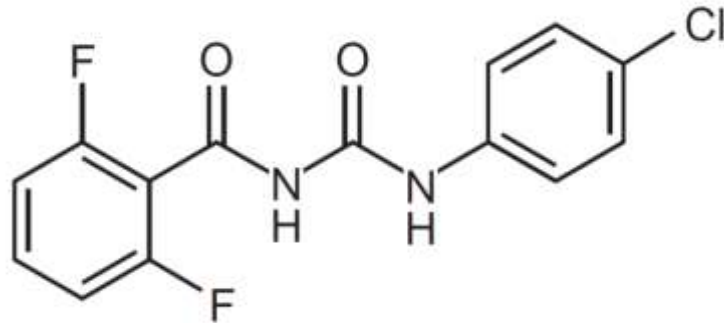


Figura 1: Estrutura do inseticida Diflubenzuron: Philips-Duphar BV 1972

Acreditou-se por muito tempo que o Diflubenzuron atuava inibindo o transporte da quitina sintase, enzima-chave no processo de formação das fibras de quitina (ETO, 1990). Entretanto, atualmente um modelo proposto para *Drosophila* sugere que o inseticida atua promovendo a exportação precoce de vesículas de transporte para o exterior das células epidérmicas antes da completa síntese de quitina, interrompendo o processo (Figura 2).

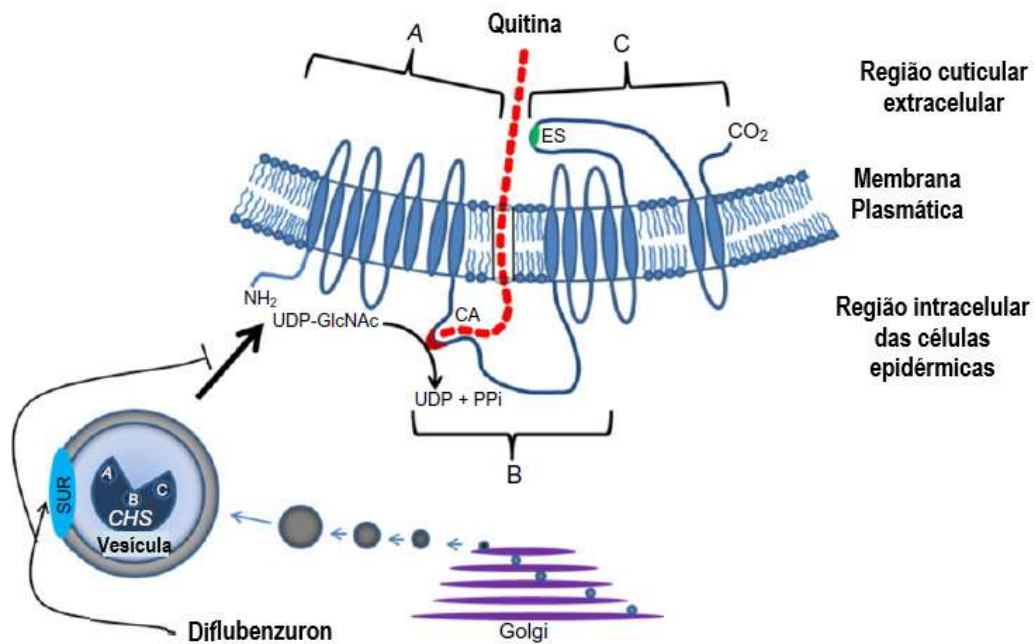


Figura 2: Modo de ação do Diflubenzuron em *Drosophila*: os precursores de quitina provenientes da hemolinfa alcançam a lâmina basal das células epidérmicas por meio do Complexo de Golgi, local de formação da maquinaria necessária para a síntese de quitina. O diflubenzuron atua no transportador ABC, o qual é responsável pela extrusão da enzima quitina sintase para a membrana plasmática, prejudicando a completa síntese da fibra de quitina. A porção SUR representa o receptor sulfonilureia; A, B, C representam domínios da enzima quitina sintase, sendo B o domínio catalítico; CA representa a área catalítica da enzima quitina sintase; ES representa uma sequência consenso da enzima quitina sintase para o sítio de extrusão de quitina (Adaptado de DOUCET & RETNAKARAN, 2012).

Atualmente, o Diflubenzuron (Dimilin®) é o pesticida mais estudado e utilizado contra uma grande diversidade de pragas e insetos, inclusive no controle de *Aedes aegypti*. Estudos evidenciaram que o diflubenzuron apresenta baixa deposição na musculatura dos peixes (WINKALER, 2008), baixa toxicidade para vertebrados (KEGLEY *et al.*, 2010) e ausência de resíduos no leite e na carne, não sendo necessário período de carência para consumo desses produtos, possibilitando maior segurança alimentar na sua utilização. Entretanto, a agência de proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1997) classifica o Dimilin® como um produto de utilização restrita, uma vez que ainda não se tem informações sobre os efeitos letais e subletais que podem causar sobre os invertebrados aquáticos e outros organismos não-alvo.

2.3 Ecotoxicologia

A crescente contaminação por agentes químicos nos ambientes vem aumentando o interesse humano pelas questões ambientais, possibilitando assim surgir uma nova área de estudos, a ecotoxicologia, responsável por estudar os efeitos prejudiciais dos compostos químicos no ambiente. A toxicologia como ciência surgiu por volta do século XIX e tem como fonte de estudo os efeitos provocados pelas substâncias químicas sobre os organismos. Um dos fundadores da toxicologia, o alquimista, médico e físico Paracelso (1493) concluiu que “a diferença entre remédio e veneno é a dose”, frase que é muito conhecida e utilizada em toxicologia (VAZ *et al.*, 2004).

Os efeitos provocados pelas substâncias químicas e a sua ação sobre os organismos irá depender de alguns fatores como, tempo, dosagem, espécie, idade e condições de saúde do organismo, ambiente (pH, temperatura, entre outros) e onde ocorre a ação (VAZ *et al.*, 2004). Segundo esses autores, a velocidade com que o grau de severidade e os efeitos tóxicos surgem no organismo vai depender das propriedades fisicoquímicas das substâncias, da via de introdução, frequência da exposição, concentração, dose e solvente. Dessa forma, apenas a análise dos componentes químicos não irá refletir sobre seus reais impactos sobre o ecossistema. Os efeitos tóxicos das substâncias são detectáveis nos sistemas biológicos que compõem o ecossistema (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008).

A realização de testes de ecotoxicidade fornecem um panorama de diversas fontes de contaminantes, bem como da biodisponibilidade dos poluentes e de sua ação conjunta, produzindo efeitos sinérgicos ou antagônicos (LOMBARDI, 2004). Em geral, tais testes são realizados com organismos indicadores, os quais, por apresentarem uma estrita faixa de tolerância ecológica à determinadas substâncias químicas, apresentam alterações de natureza fisiológica, morfológica ou comportamental frente à uma exposição aos contaminante (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008).

A exposição ao agente tóxico pode ocorrer de forma aguda, através da exposição à dose letal em uma única vez, sendo que o agente é prontamente absorvido. A exposição crônica, por outro lado, é feita periodicamente utilizando-se concentrações subletais por um longo período (SCHVARTSMAN, 1991). Em geral busca-se estabelecer uma relação de concentração/efeito fornecendo assim, uma

estimativa dos limites de tolerância. No caso da exposição aguda, geralmente os efeitos avaliados são a letalidade ou o estado de imobilidade, com estimativas das concentrações letais ou efetivas médias (CL₅₀ ou CE₅₀) que atua em 50% dos organismos (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008).

Especificamente nos ambientes aquáticos, os agentes contaminantes passam por processos de transformação, tais como degradação e diluição, e ocorrem frequentemente em concentrações crônicas. Os efeitos dessa exposição muitas vezes não são identificados em ensaios que avaliam a letalidade imediata, mas perturbações importantes podem ocorrer no ecossistema. Tais interferências podem ser observadas em alterações nos padrões de predação, oviposição, reprodução, crescimento, dentre outros (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008). Portanto, estudos ecotoxicológicos em ambientes aquáticos tornam-se complexos e muitas vezes irá requerer múltiplas abordagens.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os impactos do inseticida Dimilin® (diflubenzuron) em organismos aquáticos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a sobrevivência de percevejos aquáticos – *Belostoma anurum* – tratados com o inseticida Dimilin® (diflubenzuron);
- Avaliar a sobrevivência de notonectídeos – *Buenoa amnigenus*– tratados com o inseticida Dimilin® (diflubenzuron);
- Avaliar a sobrevivência de peixes barrigudinhos – *Poecilia reticulata*– tratados com o inseticida Dimilin® (diflubenzuron).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos insetos e peixes

- *Belostoma anurum* – Ninfas de segundos ínstar de percevejos aquáticos *B. anurum* foram obtidas na população mantida no Laboratório de Fisiologia e Neurobiologia de Invertebrados da Universidade Federal de Viçosa.
- *Buenoa amnigenus* – Adultos de notonectídeos *B. amnigenus* foram coletados no setor de piscicultura da Universidade Federal de Viçosa (UFV, Viçosa, MG, Brasil, 20°45´ S, 42°52´ W) e transportados em água para o Laboratório de

Fisiologia e Neurobiologia de Invertebrados da Universidade Federal de Viçosa. Os insetos foram aclimatados durante 24 h em um béquer de vidro contendo 500 mL de água destilada e posteriormente utilizados para a montagem dos ensaios de sobrevivência.

- *Poecilia reticulata* – Peixes jovens de *P. reticulata* foram coletados no setor de piscicultura da Universidade Federal de Viçosa (UFV, Viçosa, MG, Brasil, 20°45' S, 42°52' W), transportados em água para o Laboratório de Fisiologia e Neurobiologia de Invertebrados da Universidade Federal de Viçosa e utilizados imediatamente para a montagem dos ensaios de sobrevivência.

4.2 Inseticida

A partir do inseticida diflubenzuron (Dimilin® 80 WG, Arysta Lifescience, São Paulo, Brasil), foi obtida uma solução aquosa de trabalho na concentração de 100 g x 3000 L⁻¹. A partir da solução de trabalho, foram obtidas soluções na dose de campo de 1 g x 3000 L⁻¹ e soluções correspondentes a 30% e 1% da dose de campo. As soluções utilizadas foram preparadas no momento da montagem dos ensaios por meio da pesagem do inseticida comercial e dissolução em água destilada.

4.3 Ensaios de sobrevivência

Para o ensaio de sobrevivência de percevejos aquáticos e noctonectídeos, foram utilizados potes de vidro com a capacidade de 250 mL contendo 100 mL das seguintes soluções de tratamento: 1%, 30% e 100% da dose de campo; e controle contendo água destilada. Com o objetivo de evitar o canibalismo, as ninfas de *B. anurum* foram adicionadas individualmente nos potes; foram realizadas 3 repetições de 10 insetos cada uma, totalizando 30 ninfas por tratamento. Os potes foram mantidos sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h. A mortalidade foi avaliada a cada 24 h por 4 dias e durante o período os insetos não foram alimentados.

Nos ensaios de notonectídeos, foram adicionados 10 insetos por pote e um total de 5 repetições por tratamento. Os potes foram mantidos sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h. O ensaio foi montado às 8h da manhã e a mortalidade foi avaliada diariamente às 8h e às 17h por 10 dias e durante o período os insetos não foram alimentados.

Para o ensaio de sobrevivência de peixes, foram utilizados aquários de vidro com a capacidade de 10 L contendo 500 mL contendo as mesmas soluções de tratamento citas acima. Foram adicionados 20 peixes por aquário e um total de 3

repetições por tratamento. As soluções de tratamento foram mantidas sob constante aeração e os aquário mantidos a temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h. A avaliação da mortalidade foi realizada diariamente durante 4 dias e os peixes mortos foram retirados e substituídos por peixes vivos em cada avaliação. Os peixes não foram alimentados durante os 4 dias de avaliação.

4.4 Análise estatística

Os dados obtidos nos ensaios de sobrevivência foram submetidos à análise de sobrevivência, utilizando os estimadores de Kaplan-Meier (método Log-rank) com o software SigmaPlot 12.5 (Systat Software, San Jose, Califórnia, EUA).

5 RESULTADOS

Nas análises de sobrevivência de *B. anurum* não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos ($P= 0.307$) (Fig. 3). O TL_{50} de sobrevivência dos *B. anurum* que não sofreram exposição ao inseticida foi de 3.0 (2.03 - 3.97) dias. Já os indivíduos tratados com 1%, 30% e 100% das doses de campo apresentaram TL_{50} de sobrevivência de 3.0 (2.105 - 3.895), 3.467 (3.153 - 3.781) e 4.0 (3.530 - 4.470) dias respectivamente. Similarmente o TL_{50} de sobrevivência nos *B. amnigenus* não diferem entre os tratamentos ($P= 0.212$) (Fig 4); sendo estes de 120 (96.047 - 143.953), 72 (47.684 - 96.316) e 81 (63.041 - 98.959) horas para os tratamentos de 1%, 30% e 100% respectivamente das doses de campo.

No caso do peixe *P. reticulata* não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos ($P= 0.088$) (Fig 5) na análise de sobrevivência. Indivíduos não tratados tiveram um $TL_{50} = 3.81$ (3.70 – 3.91).

Análise de Sobrevivência

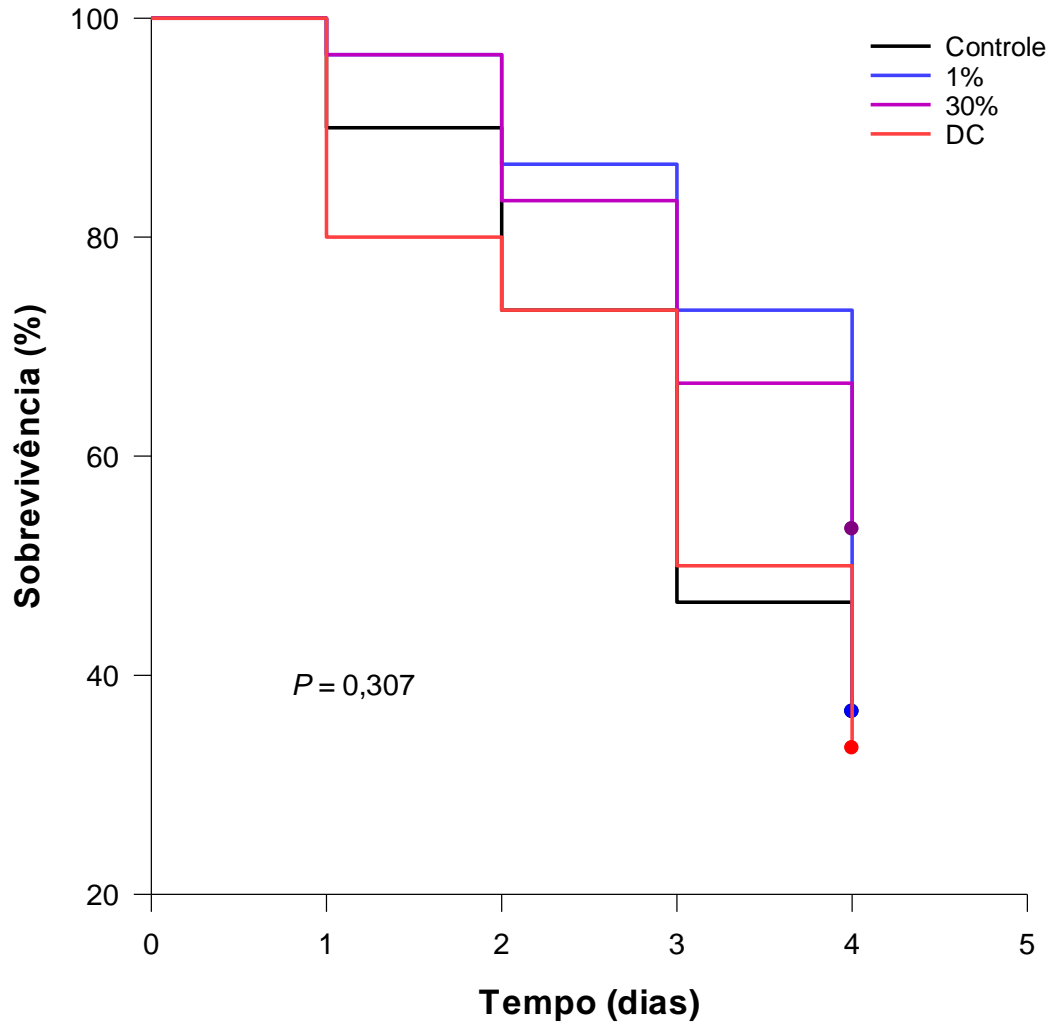


Figura 3: Análise de sobrevivência de percevejos aquáticos *B. anurum* e *Buenaoa amnigenus* em resposta ao inseticida Dimilin®: As porcentagens são em relação à 1%, 30% e 100% da dose de campo ($1\text{g} \times 3000\text{ L}^{-1}$) Os dados foram submetidos à análise de sobrevivência Log-rank, ($P < 0.05$)

Análise de Sobrevivência

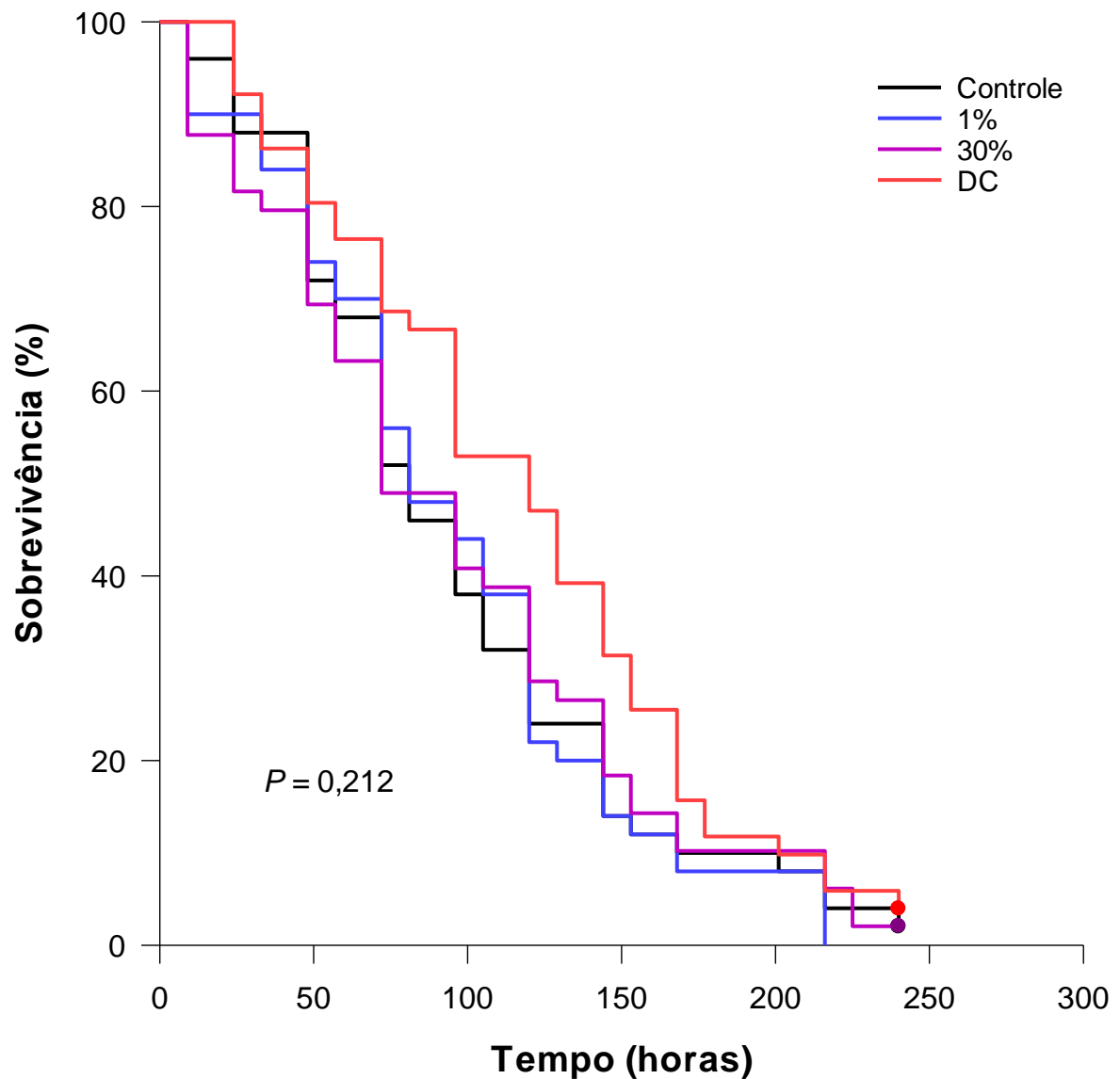


Figura 4: Análise de sobrevivência de notonectídeos *B. amnigenus* em resposta ao inseticida Dimilin®: As porcentagens são em relação à 1%, 30% e 100% da dose de campo ($1\text{g} \times 3000\text{L}^{-1}$). Os dados foram submetidos à análise de sobrevivência Log-rank, não havendo diferença estatística significativa ($P = 0,212$).

Análise de Sobrevivência

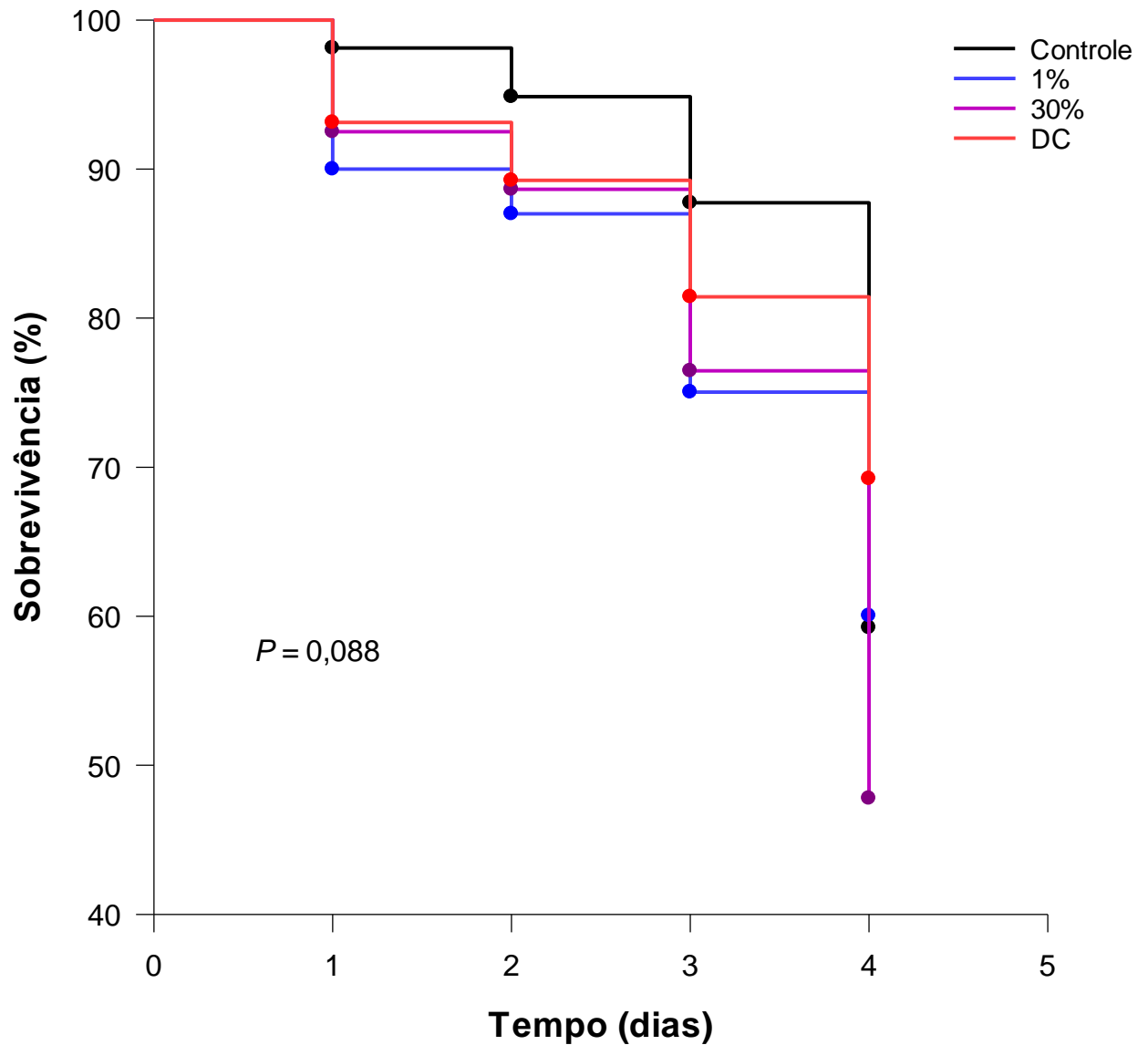


Figura 5: Análise de sobrevivência de peixes barrigudinhos *P. reticulata* resposta ao inseticida Dimilin®: As porcentagens são em relação à 1%, 30% e 100% da dose de campo ($1\text{g} \times 3000\text{ L}^{-1}$). Os dados foram submetidos à análise de sobrevivência Log-rank, não havendo diferença estatística significativa ($P = 0,088$).

6 DISCUSSÃO

Os resultados indicam que o inseticida diflubenzuron não tem impacto na sobrevivência dos organismos avaliados. Este inseticida é utilizado para o controle de pragas agrícolas por inibir a síntese de quitina (MATSUMURA, 2010), o que impede a síntese do exoesqueleto dos insetos. Como consequência, ocorre um impedimento da troca de ínstaes que acarreta a morte dos insetos.

Um outro fator que pode estar associado à sobrevivência dos organismos avaliados no presente estudo é ativação de mecanismos de defesa antioxidantes. Diversos inseticidas causam estresses oxidativos nos organismos por meio da elevação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e da inativação dos mecanismos de remoção dos mesmos, como enzimas antioxidantes (BÜYÜKGÜZEL, 2009; ADAMSKI *et al.*, 2003; PAPADOPOULOS *et al.*, 2004; JAMES & XU, 2012; KAYIS *et al.*, 2015). De fato, o aumento da ativação de enzimas antioxidantes está associado à resistência a diversos pesticidas (HAMINGWAY & KARUNARATNE, 1998; VONTAS; SMALL & HEMINGWAY, 2001; COLEMAN; VONTAS & HEMINGWAY, 2002).

A ativação de respostas antioxidantes já foi observada em alguns estudos sobre os efeitos do inseticida dimilin em peixes. A exposição de indivíduos juvenis do peixe *Prochilodus lineatus* ao inseticida aumentou a atividade das enzimas glutathione-S-transferase e catalase, além da ocorrência de efeitos sub-letais (MADUENHO & MATINEZ, 2008). De maneira semelhante, o tratamento de fêmeas adultas do peixe *G. affinis* com Dimilin® aumentou a atividade da enzima catalase, sem efeitos na mortalidade e crescimento dos peixes (ZAIDI & SOLTANI, 2013).

Avaliados em conjunto, os resultados do presente estudo indicam que os organismos avaliados não apresentam mortalidade mediante o tratamento com Dimilin®. Entretanto, não é possível afirmar que o inseticida é seguro para a entomofauna aquática, tornando-se necessário avaliar os seus efeitos em doses sub-letais.

Apesar de efeitos na sobrevivência dos organismos avaliados não terem sido observados, é possível que o inseticida diflubenzuron (Dimilin®) cause efeitos sub-letais em tais organismos. Os efeitos sub-letais podem ser definidos como alterações fisiológicas, comportamentais, biológicas ou demográficas observadas em indivíduos que sobrevivem à exposição ao pesticida sem mortalidade aparente (DESNEUX,

DECOURTYE & DELPUECH, 2007). Tais efeitos podem ser evidenciados, por exemplo, em alterações nas taxas de desenvolvimento, crescimento populacional, fertilidade, fecundidade, alimentação, mobilidade e oviposição (LEE, 2000; HAYNES, 1988). O tratamento de larvas do *Spodoptera littoralis*, uma praga do algodoeiro, com o regulador de crescimento buprofezina, que age de maneira semelhante ao Dimilin®, acarretou um aumento nas atividades das enzimas glutathiona-S-transferase e catalase e dos níveis de glutathiona reduzida (FAHMY, 2012).

De fato, o uso de dados de toxicidade tendem a subestimar os efeitos dos inseticidas em situações de campo. Em condições ambientais, os inseticidas apresentam concentrações inferiores devido à decomposição causada por diversos fatores abióticos como chuvas, altas temperaturas e luminosidade. Dessa forma, o estudo de efeitos sub-letais podem fornecer uma estimativa da exposição dos organismos em condições de campo (STARK; JEPSON & MAYER, 1995). Estudos dos efeitos sub-letais são importantes para determinar os reais efeitos dos inseticidas no controle de pragas e sobretudo, a sua seletividade para organismos não alvo, tais como os inimigos naturais (BIONDI *et al.*, 2012; DESNEUX, DECOURTYE & DELPUECH, 2007).

Diversos estudos relatam os efeitos sub-letais do inseticida diflubenzuron (Dimilin®) em insetos não alvo. O tratamento de formigas *Leptothorax acervorum* com o inseticida a 25 % levou a uma alteração nos padrões comportamentais de colônias que receberam alimentos contendo o inseticida (KRUGER & SCHUMANN, 1993). O predador natural das lagartas desfolhadoras do eucalipto *Podisus nigrispinus* apresentou redução da fertilidade e alterações na dinâmica de crescimento populacional, após alimentação com larvas contaminadas com diflubenzuron (Dimilin®) (CASTRO *et al.*, 2012). A exposição de ovos do inseto aquático não alvo *Cheumatopsyche brevilineata* com valores de CL_{50} da ordem de 0,0560 a 5,19 $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ de diflubenzuron (Dimilin®), embora não tenha causado morte dos embriões, inibiu a eclosão após a exposição e induziu anormalidades morfológicas dos filhotes, reduzindo sua sobrevivência (YOKOYAMA, 2019).

De maneira semelhante, efeitos sub-letais foram relatados em diferentes espécies de peixes tratadas com Dimilin®. O tratamento de peixes larvívoros *Gambusia affinis*, utilizados como predadores naturais de mosquitos, com doses sub-letais de Dimilin®, (78 $\text{ng} \text{L}^{-1}$) causou alterações morfométricas nos indivíduos

juvenis, como redução do comprimento, peso e do índice hepatossomático (DRARDJA-BELDI & SOLTANI, 2003). A exposição de fêmeas de *Hyphessobrycon eques* a doses sub-letais causou alterações morfológicas nas guelras como hiperplasia, fusão lamelar, congestão vascular, desordem lamelar secundária, vasodilatação, hemorragia e aumento do epitélio lamelar (MARCON *et al.*, 2016). A exposição prolongada à doses sub-letais de dimilin também levou a uma redução no peso corporal de *H. eques* além de edemas e aneurismas nas brânquias, hipertrofia dos hepatócitos e congestão vascular do fígado em *Oreochromis niloticus* (ABE *et al.*, 2019).

7 CONCLUSÃO

É possível concluir que o inseticida Dimilin®), não causa alterações na sobrevivência de *Belostoma anurum*, *Buenoa amnigenus* e *Poecilia reticulata* nas condições avaliadas no presente estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, F.R., Machado, A.A., Coleone, A.C. *et al.* Toxicity of Diflubenzuron and Temephos on Freshwater Fishes: Ecotoxicological Assays with *Oreochromis niloticus* and *Hyphessobrycon eques*. *Water Air Soil Pollut* 230, 77 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4128-7>
- Adamski, Z., Ziemnicki, K., Fila, K., Zikic, R., Štajn, A., 2003. Effects of long-term exposure to fenitrothion on *Spodoptera exigua* and *Tenebrio molitor* larval development and antioxidant enzyme activity. *Biol. Lett.* 40, 43–52.
- Arias, A. R. L.; Buss, D. F.; Albuquerque, C.; Inácio, A. F.; Freire, M. M.; Egler, M.; Mugnai, R.; Baptista, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência & Saúde Coletiva.* 2007; 12(1): 61-72.
- Biondi A, Mommaerts V, Smagghe G, Viñuela E, Zappalà L, Desneux N. The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods. *Pest Management Science.* 2012; 68: 1523–1536. doi:10.1002/ps.3396
- BORGES, A. Valores hematológicos e bioquímicos séricos, efeitos de doses subletais da cipermetrina e características físico-químicas do sêmem do Jundiá *Rhamdia quelen*. Porto Alegre, 2005. 175 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.
- BUTCHART, S. H., WALPOLE, M., COLLEN, B., VAN STRIEN, A., SCHARLEMANN, J. P., ALMOND, R. E., CARPENTER, K. E. (2010). Global biodiversity: indicators of recent declines. *Science*, 328(5982), 1164-1168.
- BÜYÜKGÜZEL, E., 2009. Evidence of oxidative and antioxidative responses by *Galleria mellonella* larvae to Malathion. *J. Econ. Entomol.* 102, 152–159. doi: 10.1603/029.102.0122
- CASTRO A. A., LACERDA, M. C., ZANUNCIO T. V., RAMALHO F., POLANCZYK R. A., SERRÃO J. E., ZANUNCIO J. C. Effect of the insect growth regulator diflubenzuron on the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Ecotoxicology.* 2012 Jan;21(1):96-103. doi: 10.1007/s10646-011-0769-z. Epub 2011 Aug 21.
- COELHO, R. S. Avaliação da toxicidade de fluidos de Usinagem através da ecotoxicologia aquática. São Carlos, 2006. Tese (Doutorado) - Escola de

- Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- COLEMAN, M., VONTAS, J.G., HEMINGWAY, J., 2002. Molecular characterization of the amplified aldehyde oxidase from insecticide resistant *Culex quinquefasciatus*. Eur. J. Biochem. 269, 768–779. doi: <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02682.x>
- DESNEUX N, DECOURTYE A, DELPUECH JM. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. Annual Review Entomology. 2007; 52: 81–106. doi:10.1146/annurev.ento. 52.110405.091440
- DESNEUX N, DECOURTYE A, DELPUECH JM. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. Annu Rev Entomol. 2007;52:81-106. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>
- DOUCET, D.; RETNAKARAN, A. Insect Chitin: Metabolism, Genomics and Pest Management. Insect Growth Disruptors 2012, 43, 437–511.
- DRARDJA-BELDI H. & SOLTANI N. 2003. Laboratory evaluation of dimilin on growth and glutathion activity in mosquitofsh, a non-target species. Comm. Agric. Appl. Bio. Sci. 68 (4a): 299-305.
- ETO, M., 1990. Biochemical mechanism of insecticidal activities. In: Haug, G., Hoffman, H. (Eds.), Chemistry of Plant Protection, vol. 6. Springer Verlag, Berlin, pp. 65–107.
- FAHMY, N. M., 2012. Impact of two insect growth regulators on the enhancement of oxidative stress and antioxidant efficiency of the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Biosd.). Egypt. Acad. J. Biolog. Sci., 5(1):137-149. doi: 10.21608/eajbsa.2012.14956
- FANSIRI, T., FONTAINE, A., DIANCOURT, L., CARO, V., THAISOMBOONSUK, B., RICHARDSON, J. H., ... & LAMBRECHTS, L. (2013). Genetic mapping of specific interactions between *Aedes aegypti* mosquitoes and dengue viruses. PLoS genetics, 9(8), e10036
- FERNANDES, M. E., ALVES, F. M., PEREIRA, R. C., AQUINO, L. A., FERNANDES, F. L., & ZANUNCIO, J. C. (2016). Lethal and sublethal effects of seven insecticides on three beneficial insects in laboratory assays and field trials. Chemosphere, 156, 45-55.
- GARZÓN, A., MEDINA, P., AMOR, F., VIÑUELA, E., & BUDIA, F. (2015). Toxicity and sublethal effects of six insecticides to last instar larvae and adults of the

- biocontrol agents *Chrysoperla carnea* (Stephens)(Neuroptera: Chrysopidae) and *Adalia bipunctata* (L.)(Coleoptera: Coccinellidae). *Chemosphere*, 132, 87-93.
- GUTIÉRREZ, Y., RAMOS, G. S., TOMÉ, H. V., OLIVEIRA, E. E., & SALARO, A. L. (2017B). Bti-based insecticide enhances the predatory abilities of the backswimmer *Buenoa tarsalis* (Hemiptera: Notonectidae). *Ecotoxicology*, 26(8), 1147-1155.
- GUTIÉRREZ, Y., TOMÉ, H. V., GUEDES, R. N., & OLIVEIRA, E. E. (2017A). Deltamethrin toxicity and impaired swimming behavior of two backswimmer species. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(5), 1235-1242.
- HANLON, S. M., & RELYEA, R. (2013). Sublethal effects of pesticides on predator-prey interactions in amphibians. *Copeia*, 2013(4), 691-698.
- HAYNES KF. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. *Annual Review Entomology*. 1988; 33: 149-168. doi:10.1146/annurev.en.33.010188.001053
- HEMINGWAY, J., KARUNARATNE, S.H.P.P., 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med. Vet. Entomol.* 12, 1-12. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1998.00082.x>
- INVEST, J. F., & LUCAS, J. R. (2008). Pyriproxyfen as a mosquito larvicide. In *Proceedings of the Sixth International Conference on Urban Pests* (pp. 239-245).
- JAMES, R.R., XU, J., 2012. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *J Invertebr Pathol.* 109(2):175-82. doi: 10.1016/j.jip.2011.12.005. Epub 2011 Dec 20.
- JONSSON, C. M.; FERRACINI, V. L.; PARAÍBA, L. C.; RANGEL, M.; AGUIAR, S. R., 2002. Alterações bioquímicas e acúmulo em pacus (*Metynnis argenteus*) expostos ao paclobutrazol. *Scientia Agricola*, 59(3): 441-446.
- KAYIS, T., COSKUN, M., DURSUN, O., EMRE, I., 2015. Alterations in Antioxidant Enzyme Activity, Lipid Peroxidation, and Ion Balance Induced by Dichlorvos in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 108(4):570-574. doi: 10.1093/aesa/sav038
- KEGLEY, S.E.; HILL, B.R.; ORME S.; CHOI A.H. *Pesticide Database*. San Francisco:

- Pesticide Action Network, 2010. Disponível em: <http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC34807>. Acesso em: 20 janeiro 2020.
- KRUCER K; SCHUMANN R. D. Effects of Dimilin, an insect growth regulator, on behaviour, fertility and development of a non-target organism, *Leptothorax acervorum* (Hym., Formicidae). J. Appl. Ent. 115 (1993). 526-531. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1993.tb00423.x>
- KUBITZA, F. (2015). Aquicultura no Brasil. Panorama da Aquicultura, 25, 10-23.
- Lee CY. Sublethal effects of insecticide on longevity, fecundity, and behaviour of insect pests: a review. Bioscience Journal. 2000; 11: 107–112. <http://www.chowyang.com/uploads/2/4/3/5/24359966/034.pdf>
- LOMBARDI, J.V. (2004). Fundamentos de toxicologia aquática. In: Sanidade de organismos aquáticos. Ranzani Paiva, M.J.T.; Takemoto, R.M.; Lizama, M.A.P. ed. Varela. São Paulo. p.263-272.
- MADUENHO, L. P., MARTINEZ, C. B. R., 2008. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. Comp. Biochem. Physiol., Part C 148 (2008) 265–272. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.06.010>
- MADUENHO, L. P., MENDES, J. P., & MARTINEZ, C. B. (2007). Efeitos agudos do inseticida dimilin em parâmetros histológicos do peixe *Prochilodus lineatus*. In Anais do 8º Congresso de Ecologia do Brasil (pp. 23-28).
- MAGALHÃES, DANIELLY DE PAIVA ET AL. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. 2008.
- MARCON L., LOPES D. S., MOUNTEERC A. H., GOULART A. M. A., LEANDRO M. V., BENJAMIN L. A. Pathological and histometric analysis of the gills of female *Hyphessobrycon eques* (Teleostei:Characidae) exposed to different concentrations of the insecticide Dimilin®. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2016, 31,135-142. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.05.016>
- MATSUMURA, F., 2010. Studies on the action mechanism of benzoylurea insecticides to inhibit the process of chitin synthesis in insects: A review on the status of research activities in the past, the present and the future prospects. Pest. Biochem. Physiol. 97(2): 133-139. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.10.001>
- MONTANHA, F.P., ASTRAUSKAS, J.P., KIRNEW, M.D., NAGASHIMA, J.C.,

- PIMPÃO, C.T., 2011. Degradação de ambientes aquáticos por exposição a compostos químicos. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 10(17): 1-12.
- NAKAGAWA, Y., IZUMI, K., OIKAWA, N., KUROZUMI, A., IWAMURA, H., FUJITA, T., 1991. Quantitative structure-activity relationships of benzoylphenylurea larvicides. VII. Separation of effects of substituents in the multisubstituted anilide moiety on the larvicidal activity against *Chilo suppressalis*. *Pest. Biochem. Physiol.* 40, 12–26.
- PAPADOPOULOS, A.I., POLEMITOUA, I., LAIFIA, P., YIANGOUA, A., TANANAKI, C., 2004. Glutathione S-transferase in the insect *Apis mellifera macedonica* kinetic characteristics and effect of stress on the expression of GST isoenzymes in the adult worker bee. *Comput. Biochem. Phys. C* 139, 93–97. doi: 10.1016/j.cca.2004.09.010
- RELYEA, R. A., & EDWARDS, K. (2010). What doesn't kill you makes you sluggish: how sublethal pesticides alter predator–prey interactions. *Copeia*, 2010(4), 558-567
- RELYEA, R., HOVERMAN, J. (2006). Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. *Ecology Letters*, 9(10), 1157-1171.
- RODRIGUES, B. K. Avaliação dos impactos de agrotóxicos na região do Alto MogiGuaçu (MG) por meio de ensaios laboratoriais com *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae). São Carlos, 2007. 138 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2007.
- RUSSO, M. R.; FERREIRA, A.; DIAS, R. M. (2002). Disponibilidade de invertebrados aquáticos para peixes bentófagos de dois riachos da bacia do rio Iguaçu, Estado do Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum*, 24(2): 411-417.
- SCHÖNENBERGER, A. C., WAGNER, S., TUTEN, H. C., SCHAFFNER, F., TORGERSON, P., FURRER, S., ... & SILAGHI, C. (2016). Host preferences in host-seeking and blood-fed mosquitoes in Switzerland. *Medical and veterinary entomology*, 30(1), 39-52.
- SCHVARTSMAN S. Intoxicações agudas. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1991.
- SILVA, J. J. D., & MENDES, J. (2002). Effect of diflubenzuron on immature stages of *Haematobia irritans* (L.)(Diptera: Muscidae) in Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(5), 679-682.

- STARK JD, JEPSON PC, MAYER D. Limitations to the use of topical toxicity data for predictions of pesticide side effects in the field. *Journal of Economic Entomology*. 1995; 88(5):1081–1088. doi:10.1093/jee/88.5.1081
- VAZ, A. J; AZEVEDO, F. D., & CHASIN, A. D. M. (2003). As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Carlos, SP: RiMa, 2004.
- VONTAS, J.G., SMALL, G.J., HEMINGWAY, J., 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defense agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem. J.* 357, 65–72. doi: 10.1042/0264-6021:3570065
- WINKALER, E. U. (2008). Aspectos ecotóxicológicos dos inseticidas diflubenzuron e teflubenzuron para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*).
- YOKOYAMA, A. Assessing Impacts of Insecticides on Different Embryonic Stages of the Nontarget Aquatic Insect *Cheumatopsyche brevilineata* (Trichoptera: Hydropsychidae). *Environ Toxicol Chem* 2019;38:1434–1445. doi: <https://doi.org/10.1002/etc.4405>
- ZAIDI, N., AND N. SOLTANI, N., 2013. Laboratory evaluation of environmental risk assessment of pesticides for mosquito control: toxicity of dimilin on a larvivorous fish, *Gambusia affinis*. *Advances in Environmental Biology*, 7(4): 605-613. Accessed 27 Apr. 2020.
- CHAKRABORTI, S.; CHATTERJEE, M. L. Effect of four benzophenylureas on the chickpea pod borer, *Heliothis armigera* (Hüb.)(Lepidoptera: Noctuidae) in the field¹. *Journal of Entomological Research*, v. 24, n. 2, p. 177-184, 2000.
- ASCHER, KR SIMON; NEMNY, NADIA E. Toxicity of the chitin synthesis inhibitors, diflubenzuron and its dichloro-analogue, to *Spodoptera littoralis* larvae. *Pesticide Science*, v. 7, n. 1, p. 1-9, 1976.