

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Parcer

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Claudio Martin Jonsson e aprovada pela Comissão Julgadora em 24.06.91.

Campinas, 24 de junho de 1991.

m. Luis de T. Soares

"ESTUDOS DE TOXICIDADE E ACÚMULO DE ENDOSULFAN NOS PEIXES BRACHYDANIO RERIO E HYPHESSOBRYCON BIFASCIATUS"

CLAUDIO MARTIN JONSSON

Farmacêutico

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria

Cecília de Figueiredo Toledo

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências de Alimentos.

- 1991 -

**BANCA EXAMINADORA**

*m. Cecília de F. Toledo*

---

Profa. Dra. Maria Cecília de Figueiredo Toledo  
(Orientadora)

*Venâncio Avancini Ferreira Alves*

---

Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves  
(Membro)

*Lucia Valente Soares*

---

Profa. Dra. Lucia Valente Soares  
(Membro)

*Suplente*

---

Profa. Dra. Lucia Regina Durrant  
(Membro)

Campinas, 24 de Junho de 1991.

Aos meus pais e  
a Márcia

Dedico,

## AGRADECIMENTOS

A Professora Maria Cecília de Figueiredo Toledo, que me orientou e ofereceu sua constante disponibilidade e amizade.

Aos Professores Venâncio Avancini Ferreira Alves e Débora de Queiroz Tavares, pelas oportunas sugestões e dedicada colaboração nos estudos histopatológicos.

As Professoras Lucia Valente Soares e Lucia Regina Durrant, pelas sugestões apresentadas para a redação final da Tese.

Ao ITAL, especialmente à Dra. Yuriko Yokomizo, pela receptividade e pelo treinamento oferecido no laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas.

Aos pesquisadores da EMBRAPA, Lourival Costa Paraíba e Gilberto Nicoletta, pela colaboração nos procedimentos matemáticos e estatísticos.

Ao Professor Walter Barrella, pelo auxílio oferecido na identificação das espécies de peixes estudadas.

À Hoechst do Brasil Química e Farmacêutica S/A, pelo fornecimento dos padrões do pesticida, assim como do endosulfan técnico.

À A.M.M. Industrial Ltda, que concedeu gratuitamente a ração para a alimentação dos peixes.

Ao pessoal do Laboratório de Toxicologia, pela força e amizade; e especialmente à Rosana, pelo apoio técnico na etapa experimental.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos que proporcionou o enriquecimento de meus conhecimentos técnico-científicos, como também a realização deste trabalho de pesquisa.

À CAPES, CNPq e Fundação Atlantic, pela bolsa de estudos concedida. À FAP/UNICAMP e EMBRAPA, pela concessão de auxílio à pesquisa.

À ABIA, pela colaboração na impressão da Tese.

À RAM-TEXT Informática Ltda, pelos serviços prestados na edição do texto.

## ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ANEXOS	xiii
RESUMO	xiv
SUMMARY	xvi
I - INTRODUÇÃO	1
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
II.1. Os Pesticidas no Ambiente Aquático	4
II.2. Considerações sobre a Avaliação Toxicológica de Pesticidas em Organismos Aquáticos	7
II.2.1. Testes de Toxicidade Aguda	9
II.2.2. Estudos de Bioconcentração e Eliminação	11
II.2.3. Efeitos Histopatológicos	14
II.3. Endosulfan	15

II.3.1.	Identidade e Características Físico-Químicas	15
II.3.2.	Formulações e Usos	18
II.3.3.	Estabilidade	20
II.3.4.	Métodos Analíticos	25
II.3.4.1.	Extração	25
II.3.4.2.	Purificação	27
II.3.4.3.	Cromatografia Gas-Líquido (C.G.L.)	29
II.3.5.	Aspectos Toxicológicos	31
II.3.5.1.	Toxicocinética e Metabolismo	31
II.3.5.2.	Toxicidade Aguda	38
II.3.5.3.	Efeitos Citogenéticos e Histopatológicos	47
<b>III - MATERIAIS E MÉTODOS</b>		<b>54</b>
III.1.	Reagentes	54
III.2.	Equipamentos	55
III.3.	Animais Experimentais	55
III.4.	Condições do Ensaio	55
III.5.	Análise e Recuperação do Endosulfan da Água	56
III.6.	Estabilidade do Endosulfan na Água	57
III.7.	Ensaio de Toxicidade Aguda	59
III.8.	Recuperação e Análise do Endosulfan em Tecidos	61
III.9.	Ensaio de Bioacumulação e Eliminação	65
III.10.	Estudos de Acúmulo Através da Dieta	68
III.11.	Estudos Histopatológicos	69

IV	- RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
IV.1.	Estabilidade do Endosulfan na Água	71
IV.2.	Estudos de Toxicidade Aguda	78
IV.2.1.	Determinação da CL50	78
IV.2.2.	Efeitos Comportamentais	85
IV.3.	Recuperação e Análise de Endosulfan em Tecidos	88
IV.4.	Estudos Toxicocinéticos	90
IV.4.1.	Bioacumulação do Endosulfan em <i>B. rerio</i> e <i>H. bifasciatus</i>	90
IV.4.2.	Eliminação do Endosulfan em <i>B. rerio</i> e <i>H. bifasciatus</i>	106
IV.4.3.	Acúmulo de Endosulfan em <i>H. bifasciatus</i> Através da Ingestão de Uma Dieta Contaminada	111
IV.5.	Alterações Histopatológicas	114
IV.5.1.	Exposição Através da Água	114
IV.5.2.	Exposição Através da Dieta	122
IV.5.3.	Considerações Gerais Sobre os Resultados de Avaliação Histopatológica	126
V	- CONCLUSÕES	128
VI	- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Solubilidade do endosulfan técnico em solventes orgânicos	17
Tabela 2: Nomes comerciais do endosulfan segundo o tipo de formulação, a concentração do princípio ativo e o fabricante	18
Tabela 3: Colunas utilizadas na análise de resíduos de endosulfan por C.G.L..	30
Tabela 4: Classificação toxicológica do endosulfan de acordo com o tipo de formulação	39
Tabela 5: Valores de DL50 de endosulfan, e seus metabólitos, administrado oralmente em camundongos fêmeas	41
Tabela 6: Dose letal média do endosulfan (ALFA+BETA,2:1) em peixes.	44

Tabela 7: Concentração de ALFA e BETA endosulfan na água em função do tempo para concentrações nominais iniciais de 3 e 10 ug/l de Thiodan técnico.	72
Tabela 8: Constantes de degradação (k) e meia-vida ( $t_{1/2}$ ) de ALFA e BETA endosulfan na água.	75
Tabela 9: Concentração-teste e mortalidade de peixes <i>B. rerio</i> expostos ao Thiodan técnico em água por 24 horas.	79
Tabela 10: Concentração-teste e mortalidade de peixes <i>H. bifasciatus</i> expostos ao Thiodan técnico por 24 horas.	79
Tabela 11: Concentração-teste e mortalidade de peixes <i>B. rerio</i> (n=16) expostos ao Thiodan técnico em água por 24 horas.	80
Tabela 12: Concentração-teste e mortalidade de peixes <i>H. bifasciatus</i> (n=16) expostos ao Thiodan técnico em água por 24 horas.	80
Tabela 13: Porcentagem de recuperação de endosulfan ALFA, BETA e sulfato de tecidos de peixes.	88

- Tabela 14: Resíduos de endosulfan em *B. rerio* expostos ao Thiodan técnico (0,4 - 0,2 ug/l) durante 21 dias, seguido da fase de eliminação. 92
- Tabela 15: Resíduos de endosulfan em *H. bifasciatus* expostos ao Thiodan técnico (0,4 - 0,2 ug/l) durante 21 dias, seguido da fase de eliminação. 93
- Tabela 16: Fatores de bioconcentração (FBC), tempos de meia-vida ( $t_{1/2b}$ ) e constantes de absorção ( $k_1$ ) e eliminação ( $k_2$ ) de endosulfan em *B. rerio*. 97
- Tabela 17: Fatores de bioconcentração (FBC), tempos de meia-vida ( $t_{1/2b}$ ) e constantes de absorção ( $k_1$ ) e eliminação ( $k_2$ ) de endosulfan em *H. bifasciatus* 98
- Tabela 18: Fatores de bioconcentração (FBC) de pesticidas organoclorados em peixes. 105
- Tabela 19: Meia-vida biológica ( $t_{1/2b}$ ) de alguns pesticidas organoclorados em peixes 109
- Tabela 20: Resíduos de endosulfan em *H. bifasciatus* alimentado com ração NUTRAL básica contendo 8,87 ppm de endosulfan ALFA+BETA (2:1). 112

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmulas estruturais de ALFA e BETA endosulfan	17
Figura 2: Fórmulas estruturais dos produtos de degradação do endosulfan	21
Figura 3: Conversão de ALFA e BETA endosulfan e metabólitos em meio aquoso inoculado com microorganismos do solo e em meio estéril	24
Figura 4: Metabolismo do endosulfan em organismos animais.	33
Figura 5: Esquema de extração e purificação de endosulfan em tecidos de peixes.	64
Figura 6: Degradação do endosulfan em água	73
Figura 7: Curvas concentração - mortalidade para <i>B. rerio</i> e <i>H. bifasciatus</i> expostos ao Thiodan técnico em água por 24 horas.	81

- Figura 8: Resíduos de endosulfan em *B. rerio*. Concentração de exposição ao Thiodan técnico=0,4-0,2ug/l na água. Duração=21 dias, seguido da fase de eliminação. 94
- Figura 9: Resíduos de endosulfan em *H. bifasciatus*. Concentração de exposição ao Thiodan técnico=0,4-0,2 ug/l na água. Duração=21 dias, seguido da fase de depuração. 95
- Figura 10: Relação entre as concentrações de ALFA endosulfan em *H. bifasciatus* e os valores de  $1 - e^{-k_{\alpha}t}$ . 100
- Figura 11: Relação entre as concentrações de BETA endosulfan em *H. bifasciatus* e os valores de  $1 - e^{-k_{\beta}t}$ . 101
- Figura 12: Relação entre as concentrações de endosulfan total (ALFA + BETA + sulfato) em *H. bifasciatus* e os valores de  $1 - e^{-k_{\Sigma}t}$ . 102
- Figura 13: Aspecto histológico de brânquias apresentando padrão histológico normal 117
- Figura 14: Aspecto histológico de brânquias apresentando denso infiltrado linfóide apical 118

- Figura 15: Corte histológico de tecido hepático sem alterações morfológicas consideráveis 119
- Figura 16: Aspecto histológico de fígado com numerosos hepatócitos repletos de vacúolos gordurosos compondo quadro de esteatose micro e macrogoticular intensas 120
- Figura 17: Aspecto histológico de estrutura branquial exibindo considerável fibrose hialina, bem como hipertrofia das fibras musculares 123
- Figura 18: Detalhe microscópico de lóbulo hepático com aumento da relação núcleo: citoplasma e do cromatismo dos hepatócitos, eventualmente correspondendo a "displasia" 125

## LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1 : Composição química de fases líquidas utilizadas em colunas para análise de resíduos de endosulfan por C.G.L... 159
- Anexo 2 : Análise cromatográfica do endosulfan na água. 160
- Anexo 3 : Análise cromatográfica de endosulfan em *S. re-rio*. 161
- Anexo 4 : Análise cromatográfica de endosulfan em *H. bi-fasciatus*. 162

## RESUMO

Embora o endosulfan produza resultados positivos no controle de ácaros e insetos, seus efeitos adversos sobre organismos aquáticos devem ser considerados.

Neste trabalho, foram conduzidos experimentos com o peixe "paulistinha" (*Brachydanio rerio*) e "lambari ou tetra-amarelo" (*Hyphessobrycon bifasciatus*) objetivando o estudo dos efeitos tóxicos e do comportamento toxicocinético do endosulfan.

Nos ensaios de toxicidade aguda, a concentração de endosulfan na água variou entre 0 e 6,5 ug/l, tendo sido determinados valores de CL50-24h iguais a 2,6 (2,3-2,9) e 1,6 (1,3-2,1) ug/l, respectivamente para *H. bifasciatus* e *B. rerio*. Alterações comportamentais incluindo hiperatividade, nado descoordenado e convulsões foram observados nestas exposições.

Nos testes de bioacumulação, que se estenderam por 21 dias, a concentração média do pesticida na água foi de 0,3 ug/l, registrando-se, no final da exposição, níveis residuais de endosulfan de 0,808 +/- 0,116 e 1,703 +/- 0,072 ug/g p.c., para *B. rerio* e *H. bifasciatus*, respectivamente. Os valores de FBC estimados para *H. bifasciatus* e *B. rerio* foram de 11.583 +/- 2.361 e 2.650 +/- 441, sendo os resíduos de endosulfan total, em ambas es-



pécies, eliminados com  $t_{1/2b}$  inferior a 5 dias.

Estudos histopatológicos revelaram predomínio de efeitos agudos sobre as brânquias, observando-se infiltrados inflamatórios, necrose e destacamento do epitélio das lamelas branquiais. Quanto ao fígado, alterações características de efeitos subagudos foram observadas, evidenciando-se degeneração gordurosa e alterações nucleares dos hepatócitos.

Os resultados indicam que o endosulfan é altamente tóxico aos peixes *H. bifasciatus* e *B. rerio*, e que, apesar de sua rápida degradação na água, ocorre o acúmulo nos tecidos após a exposição contínua ao pesticida. Estudos adicionais sobre a toxicidade do endosulfan a longo prazo seriam necessários, uma vez que algumas evidências histológicas identificadas sugerem uma possível evolução para alterações de caráter neoplásico.

## SUMMARY

Endosulfan effectiveness in the control of insects and acarus points the need of evaluating its adverse effects on other forms of life, including aquatic organisms.

In the present work, experiments were conducted with "zebra fish" (*Brachydanio rerio*) and "lambari or yellow-tetra" (*Hyphessobrycon bifasciatus*) to study endosulfan toxic effects and its toxicokinetics behaviour.

In the acute toxicity experiments, endosulfan concentration in water ranged from 0 to 6.5 ug/l, and the LC50-24h values were 2.6 (2.3 - 2.9) and 1.6 (1.3 - 2.1) ug/l for *H. bifasciatus* and *B. rerio*, respectively. Behaviour changes including hiperactivity, erratic swimming and convulsions were observed at these exposure levels.

In the bioaccumulation studies, wich were extended for 21 days, the pesticide mean concentration in water was 0.3 ug/l, and the levels of endosulfan residues at the end of the exposure were 0.808 +/- 0.116 and 1.703 +/- 0.072 ug/g b.w. in *B. rerio* and *H. bifasciatus*, respectively.

The estimated values of bioconcentration factor (BCF) in *H. bifasciatus* and *B. rerio* were 11,583 +/- 2,361 and 2,650

+/-441, the total endosulfan residues being in both species eliminated with biological half-lives ( $t_{1/2b}$ ) lower than 5 days.

Histopathological studies showed predominant acute effects in the gills with inflammatory infiltration, necrosis and separation of respiratory gill epithelium. In the liver, typical damages related to subacute effects were observed, evidencing lipidic degeneration and nuclear alterations in the hepatocytes.

The results indicate that endosulfan is highly toxic to the fish *B. rerio* and *H. bifasciatus*, and that despite its low stability in water, this pesticide accumulates in body tissues after continuous exposure.

Additional long-term toxicological studies seems to be necessary since some histological evidences suggest a possible evolution to neoplasms.

## I - INTRODUÇÃO

O grande desenvolvimento na síntese de novas substâncias químicas nas últimas décadas trouxe uma nítida e importante contribuição para o progresso da humanidade e para a melhoria da qualidade de vida. Entretanto, muitas substâncias químicas não são inócuas nem para o Homem, nem para o meio ambiente, podendo causar problemas que, por vezes, somente são identificados após a ocorrência de casos graves e extremos.

Entre as substâncias introduzidas no meio ambiente, que poluem a água e contaminam a flora e fauna aquática, encontram-se os pesticidas. Aproximadamente 70% das substâncias químicas que tem sido sintetizadas são usadas na agricultura, sendo que os inseticidas, herbicidas e fungicidas correspondem a cerca de 90% desta porcentagem.

Embora os pesticidas produzam resultados positivos no controle das pragas, seus efeitos danosos em animais "não alvo" não devem ser excluídos. Os pesticidas entram no ambiente aquático através da aplicação intencional, descarga aérea, "run off" de aplicações ou liberação acidental, e então se distribuem rapidamente pela ação do vento e da água.

O peixe pode absorver o pesticida diretamente da água, co-

mo também por ingestão do alimento contaminado. Os peixes de água doce, por exemplo, podem metabolizar uma grande variedade de pesticidas, o que representa uma ameaça constante a estes organismos, já que, muitas vezes, os metabólitos dos pesticidas são mais tóxicos que a substância que os origina.

Embora existam na literatura dados sobre toxicidade aguda de pesticidas em diversas espécies de peixes, informações sobre as alterações bioquímicas, histopatológicas e fisiológicas são escassas, assim como estudos do efeito de concentrações subletais destes tóxicos aos peixes.

Entre os vários pesticidas cuja toxicidade a peixes tem sido estudada em condições naturais ou em laboratórios, o endossulfan é um dos mais tóxicos.

O endossulfan, mais conhecido comercialmente como Thiodan, é um inseticida organoclorado do grupo ciclodieno, não sistêmico e de largo espectro. Dados da OMS indicam para este pesticida valores de CL50-96h da ordem de 0,67 ug/l a 4,8 ug/l em várias espécies de teleósteos, sendo que em alguns estudos valores inferiores a 0,1 ug/l têm sido determinados.

Entre as espécies de peixes utilizadas em estudos toxicológicos, alguns peixes ornamentais, incluindo a Medaka (*Oryzias latipes*), Guppy (*Lebistes reticulatus*) e Zebra (*Brachydanio rerio*) têm recebido atenção especial por parte dos pesquisadores, devido não somente ao fato de responderem positivamente a uma série de carcinógenos, como também por apresentarem, entre outros, facilidade de manuseio, rápida proliferação, crescimento rápido e baixo custo de manutenção. Além de peixes ornamentais, várias

espécies selvagens também têm sido utilizadas em ensaios de toxicidade de pesticidas, já que estes peixes são aqueles que sofrem diretamente o efeito agressivo dessas substâncias.

Enquanto objeto de extensivas investigações em países desenvolvidos, a toxicidade de pesticidas para peixes é pouco estudada nos países em desenvolvimento, que é onde se observa um aumento crescente no emprego de pesticidas na agricultura.

Até o presente, não se tem conhecimento de estudos sobre a toxicidade do endosulfan em peixes brasileiros e muito pouco se conhece sobre o acúmulo e eliminação do pesticida após exposição a concentrações subletais, tanto através da água como através da dieta.

No presente trabalho determinou-se a concentração letal média (CL50-24h) do endosulfan para os peixes *Brachydanio rerio* e *Hyphessobrycon bifasciatus*. A primeira espécie tem sido usada em estudos de carcinogênese e como indicador de poluição de sistemas aquáticos. A segunda, encontra-se amplamente distribuída em lagos, rios e córregos do Estado de São Paulo e Sudeste do Brasil. Estudos de acúmulo e eliminação do composto foram realizados com essas duas espécies, de modo a se ter estimativas do fator de bioconcentração e da meia-vida biológica do pesticida nesses organismos aquáticos. Por meio de estudos histopatológicos, foram avaliados os efeitos resultantes da exposição ao endosulfan em concentrações letais e subletais, tanto através da água como através da dieta.

## II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### II.1. Os Pesticidas no Ambiente Aquático

Com a utilização de modernas práticas agrícolas, que resultam em maior produção de alimentos, houve um aumento na oferta de nutrientes, intensificando-se os problemas causados por pragas. Atualmente, além dos ácaros, nematóides, fungos e plantas daninhas, são conhecidas cerca de 68.000 espécies de insetos de ação prejudicial, cuja existência e atividade são contrárias aos interesses da humanidade (MURTY, 1986). O combate a estes organismos através do uso de produtos químicos denominados pesticidas e sua utilização abusiva, gerada a partir da descoberta de novos princípios ativos, tem ocasionado mais problemas ao meio ambiente, especialmente ao meio aquático, do que diminuído a ameaça das pragas em ocasionar prejuízos para a agricultura (HOLDEN, 1972; MURTY, 1986).

Inúmeros trabalhos têm demonstrado, através de análises químicas, a presença de resíduos de pesticidas na água (NIMMO, 1985), sedimento (CHOI & CHEN, 1976), microfauna (MURTY, 1986) e peixes (YOKOMIZO et al., 1982; COCCHIERI & ARNESE, 1988); sendo mais freqüente a presença de compostos organoclorados.

Os pesticidas podem atingir os ecossistemas aquáticos a partir de duas fontes: as pontuais e as não pontuais. A primeira refere-se a fontes simples de contaminação como plantas produtoras e formuladoras do pesticida, que lançam seus efluentes não tratados no ambiente aquático ou que podem acidentalmente descarregar os seus produtos. Tem sido estimado que os efluentes industriais de plantas que manipulam pesticidas constituem a segunda maior fonte de contaminação do ambiente aquático. As fontes não pontuais referem-se a fontes de contaminação de natureza difusa, como os "run off" de aplicação de áreas agrícolas, considerados a maior via de transporte do pesticida e a principal fonte de contaminação de sistemas aquáticos. Grandes quantidades de pesticidas são transportados pelos sedimentos, que também constituem importante fonte não pontual (MURTY, 1986). Outras vias de entrada de pesticidas em sistemas aquáticos incluem: aplicação intencional, visando o controle de determinadas espécies de moluscos, de larvas de insetos e de plantas e algas aquáticas (CHAPMAN, 1987); descarga aérea; volatilização a partir de aplicações no ambiente terrestre ou transporte através dos ventos (NIMMO, 1985, MURTY, 1986).

Ao atingir a hidrosfera, os pesticidas são distribuídos pela ação da água, podendo ou não permanecer em solução por longos períodos de tempo. Dependendo das características físico-químicas do composto, parte dele poderá volatilizar e ser distribuído pela ação dos ventos. O composto em solução poderá também ser adsorvido ao material suspenso e ao sedimento, ou ser absorvido por organismos aquáticos, nos quais poderá se acumular ou



ser metabolizado e eliminado, exercendo eventualmente seu efeito tóxico.

De um modo geral, compostos mais solúveis na água são mais disponíveis para os organismos aquáticos do que compostos hidrofóbicos, os quais são fortemente adsorvidos à matéria orgânica. Esta classe de compostos tende a se acumular em maiores concentrações nos organismos aquáticos e passar através dos diversos níveis tróficos da cadeia alimentar (MURTY, 1986).

Os fatores que determinam a concentração do agente tóxico na água e, portanto, sua disponibilidade para os organismos aquáticos, estão associados às propriedades físicas, químicas e biológicas do ecossistema.

De acordo com RAND & PETROCELLI (1985), entre os fatores físicos e químicos mais importantes relacionados ao composto, destacam-se a estrutura molecular, a solubilidade na água e a pressão de vapor. Estas propriedades determinam a susceptibilidade do composto à degradação hidrolítica e microbiológica, à fotólise, à evaporação e à adsorção ao material particulado (orgânico ou inorgânico). Com relação ao ecossistema aquático, a temperatura, salinidade, concentração hidrogeniônica e quantidade de material suspenso e sedimento são fatores que influenciam nos níveis do composto na água.

Dado ao uso intensivo de pesticidas, é oportuno considerar seus efeitos indesejáveis nos ecossistemas aquáticos. Tais efeitos podem ser causados pela ação tóxica direta em organismos não alvo, que pode resultar em efeitos indiretos, como a falta de alimentos para espécies pertencentes a um nível trófico superior

da cadeia alimentar, ou na eliminação de importantes espécies de predadores que mantêm o equilíbrio ecológico (CHAPMAN, 1987).

O equilíbrio de um ecossistema aquático, portanto, pode ser afetado pelos pesticidas de vários modos, embora o efeito principal seja mais evidente quando a população de peixes é atingida. De acordo com HOLDEN (1972) e KOEMAN (1979), a mortandade de peixes causada pelos efeitos letais dos agentes tóxicos é o mais notável dos prejuízos dos pesticidas sobre a fauna aquática.

A complexidade do ambiente aquático dificulta o conhecimento das interrelações das espécies com o meio, impossibilitando portanto, a identificação de efeitos de agentes tóxicos que interferem nos padrões fisiológicos normais do organismo. Como consequência, possíveis riscos associados à presença de pesticidas no meio aquático devem ser estabelecidos, relacionando-se indiretamente dados sobre seus resíduos nos ecossistemas com observações experimentais realizadas em estudos em laboratórios (HOLDEN, 1972).

## II.2. Considerações sobre a Avaliação Toxicológica de Pesticidas em Organismos Aquáticos

Face à grande utilização de pesticidas como um dos principais meios para controle fitossanitário, tornou-se indispensável verificar suas características toxicológicas visando, principalmente, a obtenção de indicações que possibilitem medidas de proteção à saúde pública, a organismos não alvo e ao meio ambiente.

A avaliação toxicológica de um composto compreende a obtenção de dados toxicológicos através de estudos em animais de laboratório e sua interpretação, com o objetivo de classificá-lo toxicologicamente e estabelecer limites de tolerância, bem como medidas preventivas do seu uso inadequado (LARINI, 1987). Os dados obtidos são também utilizados para se prever a capacidade que o composto tem de causar efeitos nocivos em sistemas biológicos não alvo.

Ensaio de avaliação toxicológica em organismos aquáticos são conhecidos desde 2000 anos atrás. Aristóteles, por exemplo, colocava peixes de água doce em água salgada e observava sua resposta (BUIKEMA, et al. 1982).

Nas décadas seguintes à Segunda Guerra Mundial, o uso intensivo na agricultura de produtos como DDT, compostos ciclodienos (especialmente aldrin e dieldrin) e hexaclorociclohexano (HCH), aliado a sua persistência no meio ambiente, tornou necessário o investimento em pesquisas sobre os efeitos destes compostos em diversas espécies que habitam o ambiente aquático (MURTY, 1986).

Em toxicologia aquática, os protocolos internacionais representam o resultado de uma série de tentativas para padronizar a metodologia a ser seguida na execução de ensaios toxicológicos (BUIKEMA et al. 1982). Estes protocolos visam:

- Facilitar a comparação de dados e resultados obtidos em laboratório;
- Permitir a realização de testes em replicata;
- Aumentar a exatidão dos resultados;

- Permitir o uso dos testes para fins de monitoramento.

Com estes propósitos, uma série de métodos tem sido desenvolvidos por entidades internacionais como American Public Health Association (APHA), U. S. Environmental Protection Agency (USEPA), American Society for Testing and Materials (ASTM) e Organization for Economic Cooperation and Development (OECD).

As recomendações que resultam de processos de avaliação toxicológica de pesticidas têm proporcionado medidas práticas na tomada de decisões por parte da iniciativa privada e entidades governamentais, para o desenvolvimento, fabricação e comercialização do produto, assim como para satisfazer os requerimentos relacionados ao seu registro e estabelecimento de níveis máximos permitidos (RAND & PETROCELLI, 1985).

Com o constante desenvolvimento de novos compostos destinados ao uso na agricultura, as agências reguladoras tem se mostrado cada vez mais exigentes com relação à qualidade metodológica dos testes que avaliam o risco à saúde pública e ao meio ambiente de um determinado composto químico (MAKI & BISHOP, 1985).

### II.2.1. Testes de Toxicidade Aguda

O objetivo principal destes testes é determinar a concentração ou dose do agente tóxico que produz um efeito danoso sobre um grupo de organismos durante uma exposição a curto prazo (normalmente 24 horas), sob condições controladas. Os dados obtidos permitem estabelecer curvas dose-resposta para o cálculo da con-

centração letal 50 e dose letal 50. Estes parâmetros são calculados a partir de modelos gráficos ou matemáticos e representam, respectivamente, a concentração e a dose necessárias para provocar 50% de morte em uma população exposta a um determinado composto, sob condições específicas. Em toxicologia aquática, embora possam ser conduzidos testes em que o pesticida é injetado diretamente no organismo ou administrado através do alimento, os protocolos indicam que a exposição seja através da água. Experimentalmente, como a resposta de 50% é considerada a medida mais reproduzível, determina-se a concentração letal média (CL50). Geralmente, 96 horas é o período de tempo suficiente para que o pesticida exerça sua ação letal (PARRISH, 1985).

Desde a década de 1950, os dados obtidos através de testes de toxicidade aguda em organismos aquáticos têm sido considerados como a ferramenta principal no controle dos efeitos da poluição, tanto por pesticidas como por outros contaminantes. Estes testes proporcionam medidas práticas para:

- Estimar limites máximos de concentração de substâncias tóxicas;
- Avaliar a toxicidade relativa de um grande número de compostos;
- Avaliar a sensibilidade relativa de diferentes organismos aquáticos a um determinado composto;
- Avaliar os efeitos da qualidade da água ( $O_2$  dissolvido, pH, dureza, matéria orgânica, temperatura) sobre a toxicidade do composto;
- Determinar a relação concentração-resposta e a significância do tempo de exposição nesta relação;
- Estabelecer as bases para o delineamento de outros estudos de

toxicidade (BUIKEMA, et al., 1982; RAND & PETROCELLI, 1985).

A manifestação de efeitos agudos e os valores de CL50, calculados em decorrência da exposição de peixes a concentrações letais de inseticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, tem sido relatados pela literatura especializada (PICKERING & HENDERSON, 1966; VERMA et al., 1982; VERMA et al., 1984; HAYA, 1989). Todavia, existe ainda uma carência de dados de toxicidade com relação a espécies internacionalmente recomendadas para avaliação toxicológica, ou a espécies representativamente importantes de ecossistemas aquáticos.

#### II.2.2. Estudos de Bioconcentração e Eliminação

A maioria dos pesticidas são compostos químicos que possuem baixa solubilidade em água e alta afinidade por gorduras sendo, portanto, facilmente absorvidos pelo organismo. Quando a velocidade de absorção do composto, seja por exposição através da água ou do alimento, excede a velocidade de eliminação do mesmo, ocorre o acúmulo do composto, processo este conhecido como bioconcentração ou bioacumulação. Tal fenômeno é considerado de grande importância na manifestação dos efeitos subletais de pesticidas em organismos não alvo, na proteção ao ambiente aquático e na prevenção de contaminação de fontes proteicas de consumo humano (KANAZAWA, 1981).

Como peixes (MURTY, 1986) e moluscos (ROBERTS, 1972) são capazes de concentrar os pesticidas da ordem de centenas a milha-

res de vezes, estes organismos constituem um sério risco para populações para os quais eles representam uma fonte importante de alimentação.

A tendência a que um composto venha a se acumular em organismos aquáticos pode ser prognosticada conhecendo-se as suas características de partição num sistema contendo uma fase polar e outra apolar. Através dos cálculos do coeficiente de partição octanol/água ( $K_{ow}$ ) do composto e sua aplicação em modelos matemáticos, a relação direta existente entre este parâmetro e o acúmulo ou eliminação de pesticidas em peixes tem sido demonstrada (NEELY et al., 1974; MACKAY, 1982; HAWKER & CONNELL, 1986). Porém, a estimativa da bioconcentração de pesticidas por peixes através destes procedimentos é muitas vezes limitada a características particulares de certos compostos, como por exemplo, o processo de biotransformação ao qual estão sujeitos (SOUTHWORTH et al., 1980).

Portanto, a forma mais direta de se avaliar o acúmulo de compostos em organismos aquáticos é através de estudos toxicocinéticos de bioconcentração e eliminação. Estes estudos tem sido realizados com vários pesticidas, em diferentes espécies de peixes e moluscos, através da exposição do organismo ao agente tóxico, sob condições controladas (ROBERTS, 1972; SHANNON, 1977 a,b; ROBERTS & FISHER, 1985; BRADBURY & COATS, 1989). O principal objetivo destes ensaios é determinar o fator de bioconcentração (FBC) quando os organismos são expostos a concentrações subletais do agente tóxico dissolvido na água. Este fator representa a relação existente entre a concentração do composto nos tecidos e a

concentração na água, no estado de equilíbrio (SPACIE & HAMELINK, 1985). Em determinadas circunstâncias, nas quais não é possível a visualização da formação de um "plateau" com relação ao acúmulo do pesticida em função do tempo, a aplicação de modelos matemáticos propostos permitem estimar com grande significância o fator de bioconcentração (BISHOP & MAKI, 1980; OLIVER & NIIMI, 1985).

Os peixes são capazes de eliminar xenobióticos através do processo de metabolização e excreção. O primeiro ocorre principalmente no fígado, onde os compostos são biotransformados por sistemas enzimáticos em moléculas de maior polaridade e, portanto, menos acumuláveis. O processo de excreção do composto original e/ou de seus produtos de biotransformação é realizado através dos rins, fezes, brânquias e pele. Nos estudos de eliminação, os organismos são expostos à água isenta do xenobiótico, depois de ter acumulado uma determinada quantidade do composto. Dados sobre a concentração em função do tempo permitem calcular o tempo de meia-vida biológica ( $t_{1/2b}$ ) que representa o tempo necessário para a eliminação de 50% da concentração inicial do composto (OECD, 1981).

Quando se conhecem as concentrações do composto na água da qual o organismo provém, ambos valores de FBC e  $t_{1/2b}$  são de grande utilidade na comparação do potencial de acúmulo de diversos compostos por uma determinada espécie, assim como na obtenção de estimativas da concentração de resíduos acumulados em organismos provenientes de ecossistemas naturais (BUIKEMA et al., 1982; NIIMI, 1987).

A susceptibilidade de um pesticida ser biotransformado em



compostos de maior polaridade e geralmente de menor toxicidade por diferentes espécies de organismos pode também ser avaliada através destes estudos toxicocinéticos.

### II.2.3. Efeitos Histopatológicos

Sinais de intoxicação são na maioria das vezes precedidos por mudanças morfológicas que acompanham alterações fisiológicas, bioquímicas e comportamentais. A capacidade de se medir quantitativamente e qualitativamente estas mudanças antes da morte do organismo pode frequentemente fornecer indicações antecipadas de toxidez e importantes dados sobre o mecanismo da ação do agente tóxico (MEYERS & HENDRICKS, 1985).

Exames de tecidos dos organismos expostos à ação do pesticida podem auxiliar na identificação da causa da morte, assim como do agente causal. Estas informações, junto com outras de origem bioquímica e fisiológica, proporcionam uma descrição mais completa e precisa da atividade do xenobiótico. Ainda, a combinação de alterações histológicas com mudanças comportamentais, como por exemplo, nos hábitos alimentares, pode fornecer dados importantes a respeito da ação direta ou indireta do agente tóxico (SPRAGUE, 1971).

Alterações histológicas provocadas pela ação de pesticidas sobre tecidos de peixes têm sido estudadas por diversos autores (SASTRY & SHARMA, 1978; DALELA et al. 1979); todavia, os efeitos de algumas destas substâncias químicas sobre importantes espécies

ainda não foram avaliados.

Com relação aos efeitos histopatológicos dos inseticidas organoclorados, os efeitos carcinogênicos parecem ser os mais importantes, tanto sob o aspecto de proteção dos ecossistemas aquáticos, como da saúde pública. A suspeita da ação carcinogênica de alguns inseticidas como dieldrin, aldrin, clordano e heptocloro, tornou problemática a tomada de decisões com relação ao emprego desses produtos (KRAYBILL, 1976).

Face a estes problemas, existe a necessidade de se avaliar a ação danosa de determinados pesticidas em estruturas morfológicas de diversas espécies de organismos, de maneira a ampliar o conhecimento a respeito da sua ação tóxica e fornecer dados que contribuam para decidir ou não a permissão de seu uso.

Do mesmo modo, a combinação de dados histológicos com os de bioconcentração e de metabólitos formados pode proporcionar indicações que relacionem a qualidade e a quantidade de resíduos acumulados com os efeitos observados, permitindo a compreensão da ação tóxica do composto.

## II.3. Endosulfan

### II.3.1. Identidade e Características Físico-Químicas

Os inseticidas organoclorados ciclodienos pertencem a uma classe de compostos caracterizados pela presença de um grupo nor-

borneno contendo uma ponte endometilênica à qual átomos de cloro estão ligados. O inseticida endosulfan, junto com outros organoclorados como aldrin, dieldrin, endrin, clordano e heptocloro; pertence a esta classe de compostos; porém, diferencia-se destes por apresentar um átomo de enxofre na sua estrutura química (MATSUMARA, 1980; NICHOLAS et al. 1976).

O endosulfan foi desenvolvido e produzido na Alemanha em 1954 pela FARBWERKE HOECHST A.G. e registrado sob o nome comercial de THIODAN, com introdução no mercado em 1957 (STUMPF & ABHAUER, 1986; GUPTA & GUPTA, 1979). O endosulfan técnico, o qual é usado na preparação de formulações de ação inseticida e acaricida, contém aproximadamente 95% do composto ativo e encontra-se disponível sob a forma de flóculos cristalinos de cor marrom, com odor terpênico, ponto de fusão na faixa de 79 - 100°C e pressão de vapor de  $15^{-2}$  mm Hg a 25°C.

Como os outros inseticidas organoclorados, o endosulfan apresenta grande afinidade por substância lipofílicas, com um coeficiente de partição em octanol/água (Kow) da ordem de 40.000 - 60.000 (STUMPF & ABHAUER, 1976). Como consequência, sua solubilidade na água é baixa, aproximadamente de 60-320 ug/l (WHO, 1984; STUMPF & ABHAUER, 1986). Os valores de solubilidade de endosulfan em alguns solventes orgânicos são apresentados na Tabela 1.

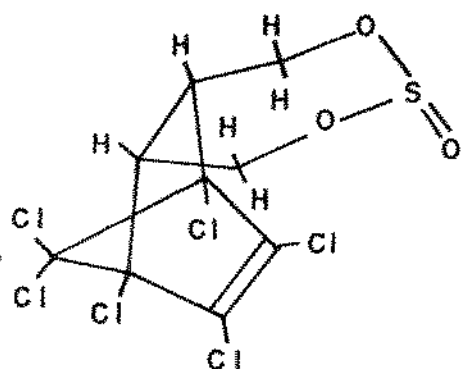
Submetendo-se o endosulfan técnico a uma coluna cromatográfica contendo óxido de alumínio e eluindo-se com tetracloreto de carbono e benzeno, consegue-se a separação de dois compostos com diferentes pontos de fusão e espectros de absorção distintos

no infra-vermelho, porém de semelhante ação inseticida. Os isômeros identificados, denominados ALFA e BETA (Figura 1), encontram-se no composto técnico numa relação aproximada de 2:1, respectivamente (LINDQUIST & DAHM, 1957).

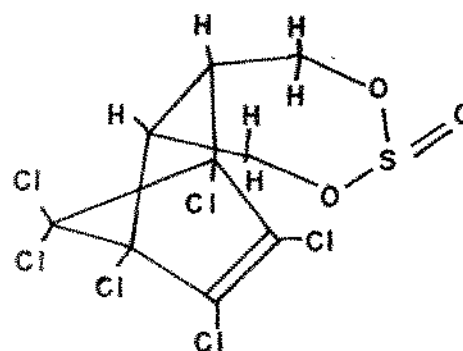
Tabela 1: Solubilidade do endosulfan técnico em solventes orgânicos (segundo GUPTA & GUPTA, 1979 e LARINI, 1987)

SOLVENTE	SOLUBILIDADE (%) <sup>(*)</sup>
Acetona	33
Benzeno	37
Clorofórmio	50
Etanol	5
Metanol	11
Tetracloroeto de carbono	29
Xileno	45

<sup>(\*)</sup> Valores referentes à temperatura de 20°C



ALFA ENDOSULFAN



BETA ENDOSULFAN

Figura 1: Fórmulas estruturais de ALFA e BETA endosulfan

Apesar do isômero ALFA ser aproximadamente duas vezes mais solúvel em água que o isômero BETA (530 e 280 ug/l respectivamente), o seu arraste por solventes orgânicos apolares através da coluna de óxido de alumínio é superior ao do isômero BETA, o que sugere que fatores estereoquímicos devam estar relacionados com sua adsorção a adsorventes polares (LINDQUIST & DAHM, 1957; MC LEESE & METCALFE, 1980).

### II.3.2. Formulações e Usos

O endosulfan é comercializado no Brasil em diversos tipos de formulações, através das quais a sua aplicação é realizada e a sua ação inseticida e acaricida é garantida.

Na Tabela 2, são apresentados os nomes comerciais pelos quais o inseticida é comercializado, assim como o tipo de formulação, concentração de princípio ativo e fabricante (ANDEF, 1989).

Tabela 2: Nomes comerciais do endosulfan segundo o tipo de formulação, a concentração do princípio ativo e o fabricante (ANDEF, 1989).

NOME COMERCIAL	TIPO DE FORMULAÇÃO	CONCENTRAÇÃO	FABRICANTE
THIODAN CE	CONCENTRADO EMULSIONÁVEL	350 g/l	HOECHST
THIODAN 30P	Pó	30 g/kg	HOECHST
THIODAN 20P	Pó	20 g/kg	HOECHST
DISSULFAN CE	CONCENTRADO EMULSIONÁVEL	350 g/l	HERBITECNICA
DISSULFAN UBV	ULTRA BAIXO VOLUME	250 g/l	HERBITECNICA
ENDOFAN 350 CE	CONCENTRADO EMULSIONÁVEL	350 g/l	FERSOL
ENDOSULFAN 350 CE	CONCENTRADO EMULSIONÁVEL	350 g/l	DEFENSA

Segundo a boa prática agrícola, o endosulfan é aplicado na proporção de 0,45 a 1,4 kg/ha, com período de carência, após a última aplicação, de 0 a 42 dias, dependendo do cultivar, tipo de formulação usada, modo de aplicação, tolerância e necessidades agronômicas (WHO, 1984).

A ação não sistêmica do endosulfan tem se mostrado efetiva no controle de pulgões, formigas, tripses, percevejos, vaquinhas, brocas, traças, cigarrinhas, besouros, além de lagartas em geral e alguns ácaros (SALAZAR, 1985).

Devido a sua curta persistência no meio ambiente, quando comparado com outros inseticidas (MATTHIESSEN et al., 1982), o endosulfan é bastante utilizado na agricultura em culturas de algodão e arroz, principalmente nos continentes africano e asiático (GORBACH et al., 1971; VAN DICK & GREEF, 1977).

Além de seu uso na agricultura, o endosulfan também tem sido usado como conservador de madeira (WHO, 1984) e no controle de vetores epidemiológicos, já que desde a década de 1970 este inseticida tem substituído, com bons resultados, o DDT e o diel-drin, no controle da mosca tse-tse na África (MATTHIESSEN, 1982).

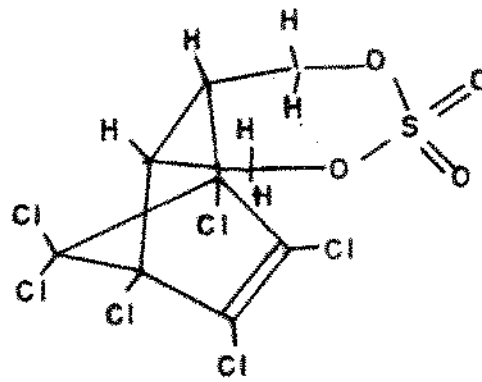
No Brasil, a aplicação de endosulfan em lavouras é regulamentada pela Portaria nº 95, de 21 de Novembro de 1985 da Secretaria Nacional de Defesa da Agricultura, a qual limita o uso deste pesticida a culturas de algodão, soja, café e cacau, somente em situações de carácter emergencial (LIMA & RACCA, 1987). Apesar disto, sua presença em outras culturas, como por exemplo morangos, tem sido constantemente detectada.

### II.3.3. Estabilidade

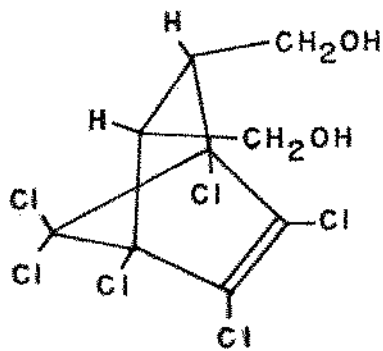
A estrutura química de um composto é o fator determinante da sua estabilidade no meio em que se encontra. Alguns pesticidas são muito estáveis e podem persistir no ambiente por vários anos, como o DDT. Outros são degradados em algumas horas, como os organofosforados e carbamatos.

Diversos fatores físicos, químicos e biológicos influenciam a estabilidade dos pesticidas no meio ambiente, entre os quais podem-se destacar o pH, luz, volatilidade e ação do oxigênio e de microorganismos (RAND & PETROCELLI, 1985).

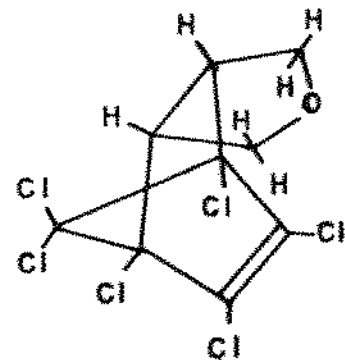
A persistência de um composto químico em um sistema é expressa em termos de sua meia-vida ( $t_{1/2}$ ), definida como o tempo necessário para que a concentração inicial do composto se reduza à metade (RAND & PETROCELLI, 1985). Tanto a ação de agentes físicos e químicos, como a ação de catalizadores biológicos, determinam a meia-vida do endosulfan e produzem um desarranjo estrutural dos isômeros ALFA e BETA, originando compostos de maior polaridade, entre os quais figuram o endosulfan sulfato, endosulfan diol, endosulfan éter, endosulfan hidroxiéter e endosulfan lactona (Figura 2) (STUMPF & ABHAUER, 1986).



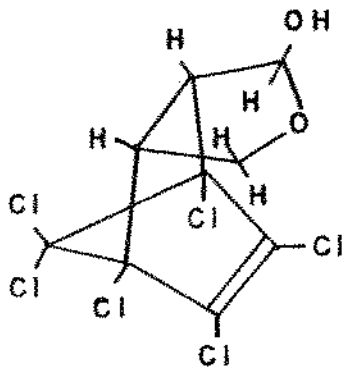
ENDOSULFAN SULFATO



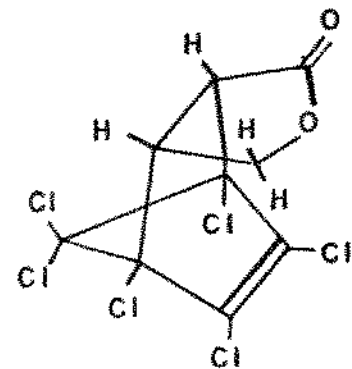
ENDOSULFAN DIOL



ENDOSULFAN ÉTER



ENDOSULFAN HIDROXIÉTER



ENDOSULFAN LACTONA

Figura 2: Fórmulas estruturais dos produtos de degradação do endosulfan



De uma maneira geral, a meia-vida dos isômeros ALFA e BETA pode variar desde algumas horas até várias semanas, dependendo da qualidade da água em que o pesticida encontra-se dissolvido (GREVE & WIT, 1971; GORBACH et al., 1971; MILES & MOY, 1979; STUMPF & ABHAUER, 1986).

Fatores importantes que afetam a meia-vida do endosulfan na água são o pH e a concentração de oxigênio dissolvido, uma vez que a redução dos valores destes parâmetros inibe a degradação do composto. Em águas com pH igual a 7 e contendo uma concentração de  $O_2$  dissolvido correspondente a 95% da saturação pelo ar, o  $t_{1/2}$  calculado é de aproximadamente 3 semanas para ambos os isômeros. Sob condições anaeróbicas, este valor aumenta para 5 semanas e em pH 5,5, sob as mesmas condições anaeróbicas, a meia-vida é de aproximadamente 5 meses (GREVE & WIT, 1971). A influência da concentração hidrogeniônica na estabilidade química do endosulfan pode ser explicada pela hidrólise que ocorre quando o composto é submetido a ação de álcalis, formando endosulfan diol (SCHUPHAN et al. 1972 apud GOEBEL et al., 1982).

Os sistemas enzimáticos presentes em microorganismos favorecem a hidrólise do endosulfan na água, sendo esta consideravelmente aumentada se a água contiver uma concentração alta de algas e bactérias (GOEBEL et al. 1982). Experiências realizadas na presença de *Pseudomonas* mostraram um aumento de 3 a 5 vezes na taxa de degradação do endosulfan, sendo essencial para este processo um alto conteúdo de oxigênio dissolvido e um pH no mínimo igual a 7 (GREVE & WIT, 1971). MILES & MOY, (1979) determinaram os tempos de meia-vida dos isômeros do endosulfan em águas este-

rilizadas e em águas inoculadas com microorganismos do solo. Somente nas amostras inoculadas os autores constataram uma marcante diminuição do tempo de meia-vida dos isômeros ALFA e BETA, além de apreciável formação de endosulfan sulfato, cujo valor de  $t_{1/2}$  foi maior que 10 semanas. A presença deste metabólito merece atenção dada a sua ação tóxica comparável à dos isômeros ALFA e BETA. A via de degradação dos isômeros, proposta pelos mesmos autores, é demonstrada na Figura 3. A interconversão entre os isômeros ALFA e BETA, que ocorre normalmente em águas esterilizadas, parece ser alterada pela ação de microorganismos, que aumentam consideravelmente a passagem da forma ALFA para a BETA (MILES & MOY, 1979).

Diferenças com relação aos  $t_{1/2}$ , foram observadas para os isômeros ALFA e BETA em águas esterilizadas a pH 6,5 e 8,2, sendo constatado um  $t_{1/2}$  para o isômero ALFA de aproximadamente o dobro do valor encontrado para o isômero BETA (MILES & MOY, 1979; CO-THAM & BIDLEMAN, 1989), registrando-se uma situação inversa nas águas inoculadas (MILES & MOY, 1979).

Controvérsias com relação a resultados de trabalhos realizados por diversos autores, referentes à fotodegradação do endosulfan, indicam uma falta de conhecimento profundo sobre a susceptibilidade do composto à ação da luz. Apesar de ambos os isômeros serem apontados como substâncias resistentes à fotodegradação (WHO, 1984; LARINI, 1987), alguns trabalhos demonstraram que ocorre um aumento de aproximadamente 20-35% nas perdas do composto em amostras vegetais expostas durante 7 dias tanto à luz U. V. quanto à luz solar, relativamente a amostras mantidas no escuro

(ARCHER, 1973). ARCHER et al. (1972) relataram perdas de aproximadamente 50% para os dois isômeros, depois de irradiar com lâmpadas U. V., durante 7 dias, lâminas de vidro contendo o pesticida. De acordo com GOEBEL et al. (1982), a ausência de oxigênio em amostras de água contendo endosulfan e irradiadas com lâmpadas de mercúrio-quartzo parece ser fundamental para sua estabilidade.

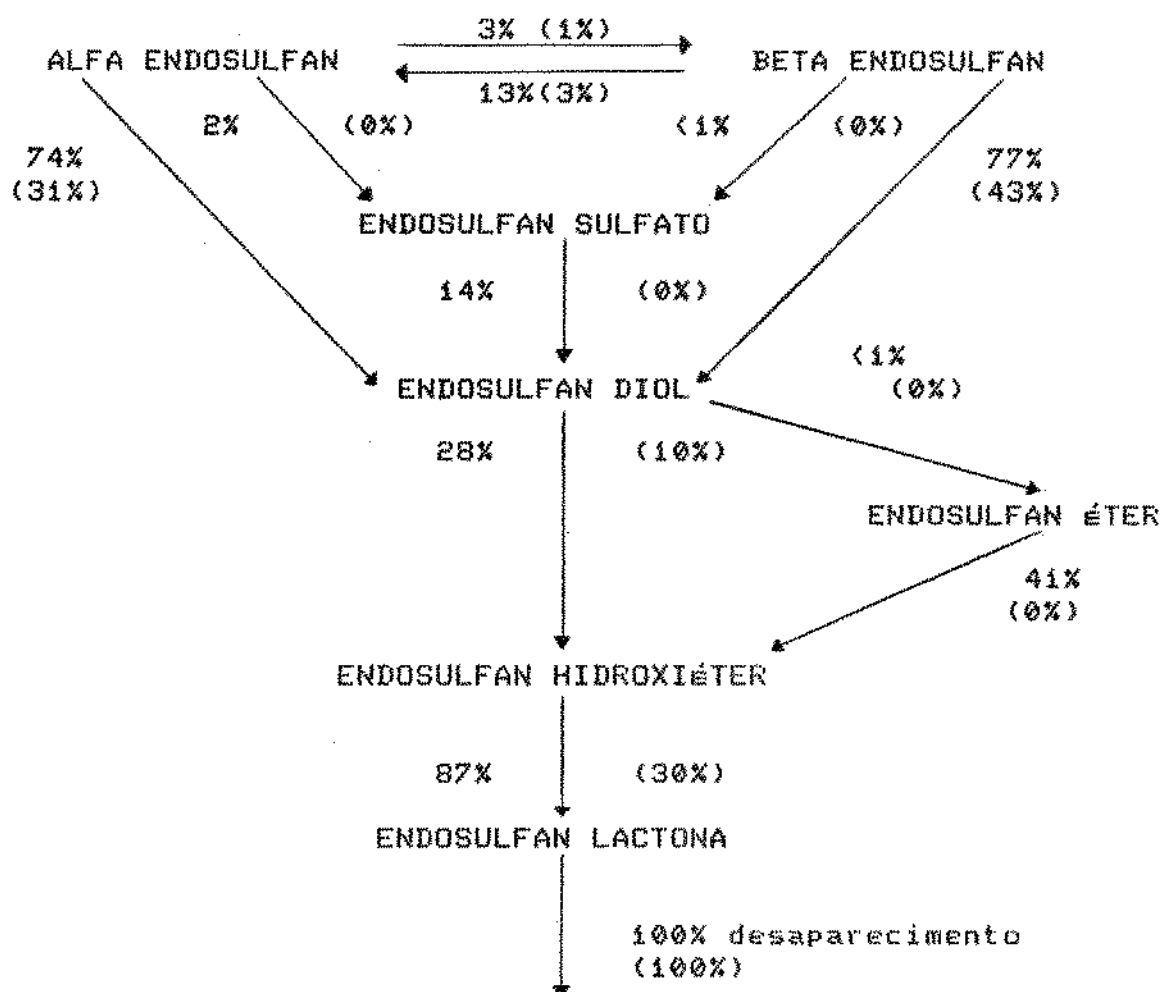


Figura 3: Conversão de ALFA e BETA endosulfan e metabólitos em meio aquoso inoculado com microorganismos do solo e em meio estéril (números entre parênteses).

### II.3.4. Métodos Analíticos

A análise de resíduos de pesticida envolve técnicas de extração, purificação, separação e detecção das moléculas de interesse.

#### II.3.4.1. Extração

Dado o seu carácter lipofílico, tanto o endosulfan ALFA e BETA como seus metabólitos são facilmente extraídos da água e tecidos animais com solventes orgânicos.

Solventes com baixa polaridade, como hexano (GORBACH et al., 1971; VAN DYK & GREEF, 1977; MILES & MOY, 1979; MC LEESE & METCALFE, 1980), éter de petróleo (GREVE & WIT, 1971), ou ainda a mistura éter etílico (15%) em hexano (EICHELBERGER & LICHTENBERG, 1971; APHA, 1975) tem sido utilizados para a extração do endosulfan da água, proporcionando uma fácil e rápida separação das fases aquosa e orgânica, e permitindo, em algumas circunstâncias, a análise direta da fase orgânica, sem necessidade de purificação. Por outro lado, para extração de endosulfan de tecidos animais, existe uma tendência ao uso de solventes de maior polaridade, como acetonitrila (PESTICIDE ANALYTICAL MANUAL, 1972; MITCHELL, 1976; RAD & MURTY, 1980; DEVI et al., 1981; SWARUP et al., 1981; ANSARI et al., 1984), dimetilformamida (RAD et al., 1981) e acetona (DEEMA et al., 1966), embora solventes de menor polaridade, como hexano (RAD, 1981) e éter de petróleo (ROBERTS, 1972), pos-

sam ser também utilizados.

A combinação de solventes de diferente polaridade, como hexano com acetona (3:1) (MATTHIESSEN et al., 1982), tem proporcionado recuperação satisfatória (89-91%) na extração do endosulfan ALFA, BETA e sulfato a partir de tecidos de peixes. De acordo com BEYNON & ELGAR (1966) apud LUKE et al. (1975), a extração de pesticidas de tecidos é mais eficiente na presença de um solvente que seja tanto miscível em solventes apolares como miscível na água. Solventes que apresentam estas características, como a acetona e a acetonitrila, usados em conjunto, permitem a obtenção de extratos com menos interferentes, comparativamente a um solvente apolar (MODDES & COOK, 1959 apud LUKE et al., 1975)

A introdução da acetonitrila como solvente extrator por MILLS et al. (1963) tem tido sucesso na extração de ambos isômeros e de seu principal metabólito, endosulfan sulfato. Conforme já citado, a acetonitrila parece ser o solvente que mais vem sendo utilizado na extração de endosulfan de tecidos de animais nos últimos anos. Em 1975, LUKE et al. propuseram a extração de inseticidas organoclorados com acetona, que requer menor tempo de evaporação e é de menor custo e toxidez, além de não permitir o aparecimento de problemas de ordem técnica encontrados em amostras com alto teor de açúcar. Métodos de extração de inseticidas organoclorados, utilizando este solvente, tem sido propostos para a extração de resíduos de inseticidas de tecidos animais (TAYLOR et al., 1964), proporcionando boa recuperação na extração dos isômeros ALFA e BETA e endosulfan sulfato de tecidos vegetais (LUKE et al., 1975).

#### II.3.4.2. Purificação

Procedimentos que utilizam colunas de silicato de magnésio no "clean up" de inseticidas organoclorados são conhecidos desde os anos 50, quando ORDAS et al. (1956) purificaram extratos de alfafa em colunas de Florisil durante a análise de heptacloro nestes vegetais. Segundo MOATS (1963), entre alguns adsorventes investigados quanto a sua capacidade de separar compostos de material gorduroso, o Florisil foi o que apresentou melhores resultados, além de permitir fluxos maiores de solvente através da coluna, diminuindo assim o tempo de análise. De acordo com BURKE & MILLS (1963), os resíduos de endosulfan, podem ser totalmente eluídos através da coluna de Florisil com misturas de éter etílico (6% e 30%) em éter de petróleo. Segundo MOATS (1963), a substituição da mistura éter etílico / éter de petróleo, pela mistura diclorometano / éter de petróleo, melhora a separação dos inseticidas organoclorados e material gorduroso, que poderia atuar como interferente. Porém, a primeira mistura tem sido recomendada e utilizada (APHA, 1975; GUPTA, 1978) na eluição dos resíduos de endosulfan da coluna de Florisil. Pesquisas realizadas por MOATS (1963) tem mostrado que a total recuperação dos isômeros ALFA e BETA, a partir de colunas de Florisil, é diminuída quando se utiliza mistura de diclorometano em éter de petróleo (15-20%) como eluente. Segundo MITCHEL (1976), MATTHIESSEN et al. (1982) e ADAC. (1984), a total recuperação de ambos os isômeros e do endosulfan sulfato é obtida quando se aumenta a polaridade do eluente através do aumento da concentração de diclorometano. O emprego de

misturas de acetona (1 e 2%) em hexano na etapa de purificação do endosulfan e metabólitos extraídos de tecidos de peixes foi relatada por RAD (1981).

A utilização de colunas de carvão ativo, na purificação de endosulfan de tecidos animais, foi descrita pelo método do "Pesticide Analytical Manual" (1972), e por SWARUP et al. (1981). Segundo MOATS (1963), uma maior recuperação desse composto é obtida após sua eluição nesse tipo de adsorvente, embora haja uma maior possibilidade de eluir substâncias interferentes junto com as moléculas de interesse, comparativamente ao Florisil.

Antes de ser submetido ao "clean up" em coluna de adsorvente, o extrato contendo inseticida exige uma purificação prévia, a qual é realizada através da partição líquido-líquido em solventes com diferentes graus de polaridade. O método de JOHNSON (1962), desenvolvido para separar aldrin e endrin de outros compostos organoclorados, e utilizado por GUPTA (1978) para purificar extratos de tecidos de ratos tratados com endosulfan, utiliza na etapa de partição líquido-líquido sistemas de solventes constituídos por acetonitrila / éter de petróleo / solução de sulfato de sódio. A substituição do éter de petróleo por hexano nesta mistura de solventes tem sido empregada satisfatoriamente por vários autores na purificação de extratos de peixes contendo endosulfan (RAD & MURTY, 1980; RAD, 1981; SWARUP et al., 1981).

O procedimento analítico multiresidual, desenvolvido por LUKE et al. (1975), permite a purificação de extratos contendo pesticidas organoclorados, organofosforados e organonitrogenados de uma maneira rápida, através da partição líquido-líquido, em

sistemas de solventes de acetona / diclorometano / éter de petróleo / solução de NaCl, dispensando portanto o uso da acetonitrila, cujo custo é elevado. Através deste método, pesticidas que são ligeiramente solúveis em água, e que poderiam ser perdidos na fase aquosa, são recuperados através do uso de diclorometano (STORHERR et al., 1971 apud LUKE et al. 1975), permitindo uma recuperação superior a 80% para o endossulfan ALFA, BETA e sulfato.

#### II.3.4.3. Cromatografia Gas-Líquido (C.G.L.)

Devido a sua rapidez, alta sensibilidade e alta eficiência na separação dos componentes da amostras, a C.G.L. tem sido apontada como método de escolha na identificação e quantificação de resíduos de endossulfan, com grandes vantagens sobre a análise colorimétrica (MAITLEN & WESTLAKE, 1963) e a cromatografia em papel (MITCHELL, 1958) e em camada delgada (LINDQUIST & DAHM, 1957; RAO & MURTY, 1982).

O Chromosorb e alguns compostos à base de silicone tem sido amplamente utilizados como fase estacionária na análise de endossulfan por C.G.L.. Os últimos caracterizam-se por possuir diferentes graus de polaridade, além de serem praticamente não voláteis às temperaturas da coluna e de não degradar os compostos de interesse (GOEBEL et al., 1982). Na Tabela 3 são apresentadas alguns tipos de colunas e seus respectivos suportes, utilizados em trabalhos onde os resíduos do endossulfan foram separados e analisados por C.G.L.. A composição química de algumas fases líquidas



utilizadas nessas colunas está especificada no Anexo 1.

Tabela 3: Colunas utilizadas na análise de resíduos de endosulfan por C.G.L..

FASE ESTACIONÁRIA	REFERÊNCIA
3% SE 30 em Chromosorb W	GORBACH et al. (1971)
0,5% SE 30+0,1% Epikote 1001 em Chromosorb G	MATTHIESSEN et al. (1982)
1% OV 11 em Chromosorb Q	VAN DYK & GREEF (1977)
3% OV 17 em Chromosorb Q	STEWART & CAIRNS (1974)
5% OV 17 em Chromosorb Q	EICHELBERGER & LICHTENBERG (1971)
1,5% OV 17 + 1,95% OV 210	GUPTA (1978)
1,5% OV 17 + 1,95% QF1 em Chromosorb Q	APHA (1975)
5% fenil, dimetil polisiloxano (bonded - phase silica column)	COTHAM & BIDLEMAN (1989)

A detecção de inseticidas organoclorados por detectores cujo funcionamento fundamenta-se na captura de elétrons por moléculas com carácter eletronegativo é atualmente a técnica mais utilizada na análise de resíduos destes compostos. Isto se deve à alta sensibilidade demonstrada por esses sistemas de detecção que utilizam o trítio ou  $^{63}\text{Ni}$  como fonte ionizante do gás de arraste. Ainda que a utilização do trítio como fonte ionizante tenha sido empregada na análise de resíduos de endosulfan (GREVE & WIT, 1971); o uso do  $^{63}\text{Ni}$  apresenta vantagens adicionais pela possibilidade de se trabalhar em altas temperaturas (300°C), resultando em menor risco de precipitar impurezas (GOEBEL et al., 1982). Níveis de detecção de 0,003; 0,006 e 0,012 ug/ml de solução padrão podem ser obtidos respectivamente para endosulfan ALFA, BETA e sulfato, utilizando-se este sistema de detecção. Toda-

via, o emprego de detectores de menor sensibilidade que os anteriores, como o detector microcoulométrico (PESTICIDE ANALYTICAL MANUAL, 1972) e o detector fotométrico de chama (KEIL et al., 1972 apud GOEBEL et al., 1982), pode ser de grande utilidade na confirmação da presença do endosulfan (GOEBEL et al., 1982).

### II.3.5. Aspectos Toxicológicos

#### II.3.5.1. Toxicocinética e Metabolismo

##### Estudos em Mamíferos:

A principal via de exposição ao endosulfan para a população e para mamíferos em geral é através do alimento. A inalação e o contato através da pele constituem importantes vias de exposição quando normas adequadas de segurança não são adotadas por pessoas ocupacionalmente expostas ao endosulfan (WHO, 1984).

A absorção de ALFA e BETA endosulfan por via oral é incompleta, sendo que, de uma dose de 1,2 mg/kg de peso corpóreo, administrada em ratos, em óleo de milho, aproximadamente entre 40 a 60% são absorvidos (DOROUGH et al., 1978; STUMPF & ABHAUER, 1986). Após sua incompleta absorção através do trato gastrointestinal, os isômeros sofrem metabolização pela ação de oxidases e enzimas do sistema microsossomal hepático, originando produtos de

hidrólise e de oxidação com características mais polares (DOROUGH et al., 1978).

Os principais produtos do metabolismo do endosulfan em mamíferos incluem endosulfan sulfato, endosulfan diol, endosulfan éter, endosulfan hidroxiéter e endosulfan lactona (Figura 2) (DEEMA et al. 1966, DOROUGH et al., 1978; STUMPF & ABHAUER, 1986), embora a presença de outros produtos de conjugação com sulfatos tenha sido evidenciada (ELZNER, 1973 apud GOEBEL et al., 1982). Entre os metabólitos, somente o endosulfan sulfato é o que apresenta interesse toxicológico, por apresentar valores de DL50 em mamíferos semelhantes aos apresentados pelo isômero ALFA (DOROUGH et al., 1978; GOEBEL et al., 1982).

STUMPF & ABHAUER (1986) propuseram uma via metabólica do endosulfan, em organismos animais, na qual são consideradas duas etapas principais (Figura 4). Em uma delas, ocorre a hidrólise e vários estágios de oxidação, resultando na formação de metabólitos não sulfurados (endosulfan diol, éter, hidroxiéter e lactona), seguida da conjugação destas moléculas em produtos mais hidrofílicos. Na outra etapa, ocorre a oxidação para endosulfan sulfato e hidrólise para formar metabólitos sulfurados, como os ésteres sulfúricos do endosulfan diol e seus produtos de oxidação.

A distribuição dos isômeros ALFA e BETA nos diferentes tecidos de camundongos e ratos indica que os rins e o fígado são os órgãos mais susceptíveis ao acúmulo do pesticida nestes animais (DEEMA et al., 1966; DOROUGH et al., 1978).

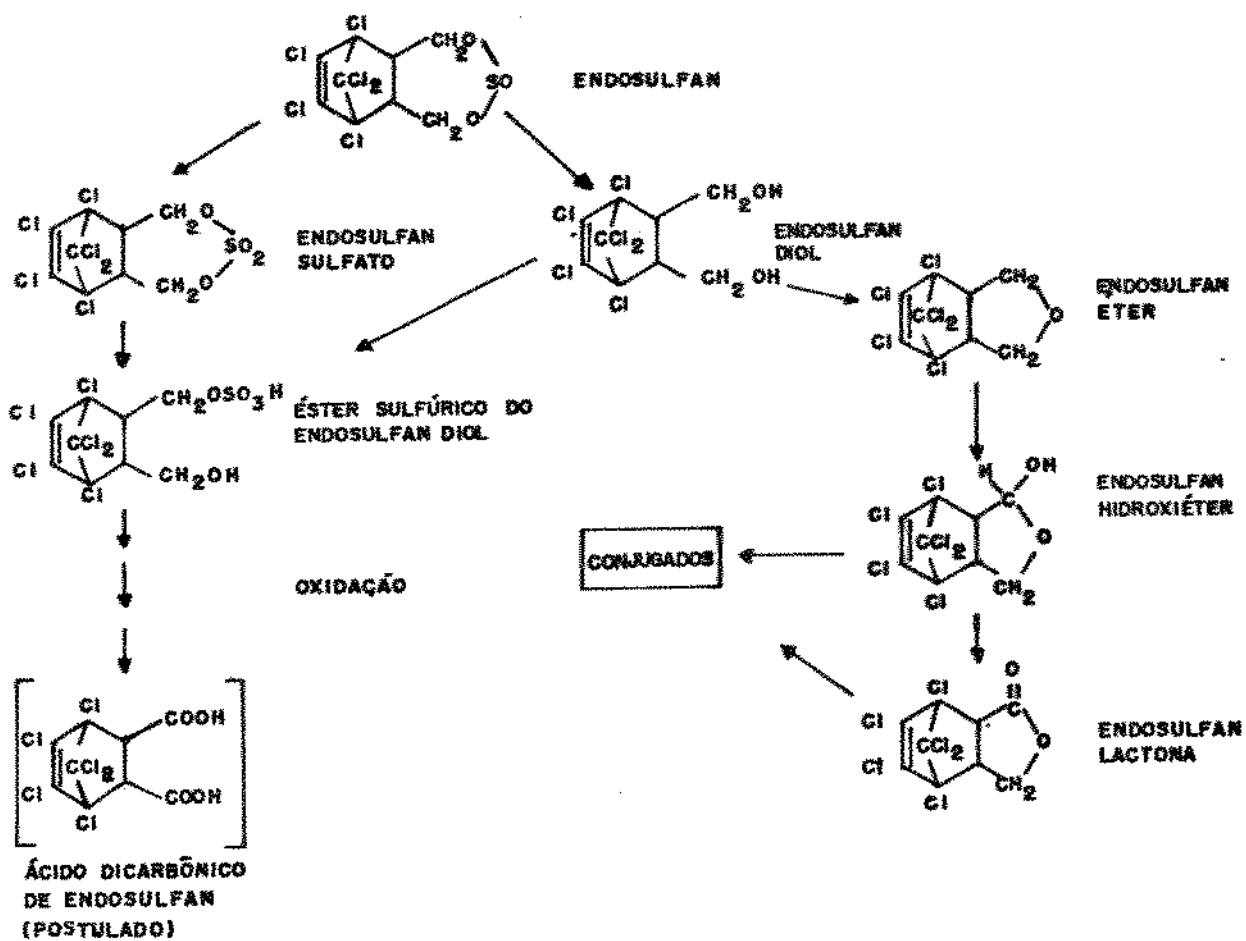


Figura 4: Metabolismo do endosulfan em organismos animais.

Os trabalhos realizados por ANSARI et al. (1984), indicaram diferenças nas características de acúmulo dos isômeros ALFA e BETA em diferentes tecidos de ratos. Os rins apresentaram a maior concentração do isômero ALFA, enquanto que o isômero BETA foi encontrado principalmente na vesícula seminal e epidídimo.

Apesar do pesticida endosulfan se encontrar em tecidos ricos em gordura (MATTHIESSEN et al., 1982), a distribuição deste composto em diferentes partes do cérebro de mamíferos mostrou uma maior afinidade do pesticida por estruturas do cérebro pobres em mielina, cujo conteúdo em lipídeos é menor (GUPTA, 1978; KHANA et al., 1979). Ao que parece, a maior irrigação sanguínea dessas áreas favorece a maior concentração do composto (GUPTA, 1978), independentemente do teor de gordura.

A excreção do endosulfan e de seus metabólitos processa-se através da urina, fezes e leite. DOROUGH et al. (1978) observaram que em ratos os isômeros ALFA e BETA são excretados em maior concentração através das fezes do que através da urina. Uma menor eliminação do endosulfan através desta última via foi também evidenciada por GORBACH et al. (1968) em carneiros, depois da administração de endosulfan com  $^{14}C$ . Aproximadamente 50% de radioatividade foram excretados através de fezes, 41% através da urina e aproximadamente 1% no leite (GORBACH et al., 1968). Segundo DOROUGH et al. (1978), não há evidências de que o endosulfan entre no ciclo enterohepático.

O comportamento farmacocinético de cada um dos isômeros do endosulfan em mamíferos parece ser dependente da espécie. DOROUGH et al. (1978) não observaram, em camundongos, apreciáveis di-

ferenças com relação à meia-vida biológica dos isômeros ALFA e BETA, cujo valor foi de aproximadamente 7 dias. Todavia, GUPTA & EHRNEBO (1979) estimaram em coelhos uma meia-vida biológica plasmática de 10 dias e de 6 horas respectivamente, para os isômeros ALFA e BETA.

#### Estudos em Peixes:

A absorção de pesticidas solúveis em água por peixes se processa principalmente através das brânquias, e é consideravelmente aumentada com a elevação da temperatura e a diminuição do oxigênio dissolvido na água, devido a um aumento da velocidade dos movimentos respiratórios (SINGH & NARAIN, 1982). A absorção através do trato gastrointestinal ocorre quando o pesticida encontra-se presente em material orgânico, que serve como alimento. A biotransformação do endosulfan em peixes origina os mesmos metabólitos encontrados em mamíferos, com a predominância de um determinado produto de biotransformação sobre o outro, conforme a espécie. SWARUP et al., (1981) e RAD & MURTY (1980) encontraram diferenças com respeito à presença de endosulfan éter e endosulfan ALFA e BETA em extratos de cérebro e de músculo de duas espécies de peixes. Diferentes processos de detoxicação do endosulfan foram observados por RAD & MURTY (1982) em três espécies de teleósteos, tendo sido constatado que a formação de endosulfan álcool, lactona, éter e hidroxietér variava de espécie para espécie. O mesmo tem sido observado com relação à presença do produto

de oxidação altamente tóxico do endosulfan, o endosulfan sulfato, o qual foi detectado em quatro, entre seis espécies estudadas (RAO & MURTY, 1980; DEVI et al., 1981; RAO & MURTY, 1982; SWARUP et al., 1981). Segundo alguns autores, (RAO & MURTY, 1980; SWARUP et al., 1981; RAO & MURTY, 1982), esse composto é um produto intermediário do metabolismo do endosulfan antes de sua conversão para endosulfan álcool e não deve ser considerado como um dos produtos finais da biotransformação do endosulfan.

A conjugação de metabólitos do endosulfan com outros compostos, originando produtos mais polares e portanto mais facilmente excretados, é evidente, já que a presença de produtos da conjugação do ácido glucurônico com o endosulfan álcool têm sido relatada (GUPTA & GUPTA, 1979, MATTHIESSEN, 1982).

De modo similar ao que ocorre em mamíferos, o fígado e os rins de peixes são os principais órgãos de acúmulo dos isômeros de endosulfan que, juntamente com seus metabólitos, são excretados através da urina e fezes (DEVI et al., 1981; SWARUP et al., 1981; RAO & MURTY, 1982). A presença destes compostos na excreção biliar sugere que o pesticida é biotransformado no fígado e eliminado junto com a biliar, através das fezes (RAO & MURTY, 1980; RAO et al., 1981, SWARUP et al., 1981).

Vários organismos aquáticos expostos ao endosulfan e a outros pesticidas, em concentrações subletais por um certo período de tempo, acumulam o composto até um estado de equilíbrio caracterizado pelo aparecimento de um "plateau", no qual a concentração nos tecidos se mantém constante (WHO, 1984). SCHOETTGER (1970) apud GOEBEL et al. (1982), evidenciou este estado de

equilíbrio para endosulfan, em *Catostomus commersoni*. O mesmo autor ainda determinou os fatores de bioconcentração relativos a 9 e 12 horas de exposição, tendo determinado um acúmulo maior no fígado, com fator de bioconcentração igual a 695, para 9 horas de exposição.

A estabilidade do "plateau", sob um prolongado período de tempo, pôde ser revelada em ensaios realizados com o peixe *Carassius auratus*, no qual a concentração de endosulfan manteve-se em aproximadamente 2 mg/kg de músculo, do 5º ao 20º dia de exposição (GOEBEL et al., 1982).

Segundo MATTHIESSEN et al. (1982), o fator mais importante que governa o acúmulo de pesticidas em peixes é o seu conteúdo em lipídeos, evidenciando-se uma correlação direta entre a porcentagem de gordura de diversas espécies e a concentração de endosulfan (ALFA+BETA+sulfato) presente.

NOVAK & AHMAD, (1989), verificaram que os resíduos de endosulfan em peixes são mais dependentes da concentração do pesticida na água do que do período de exposição, já que peixes expostos à concentração de 2 ug/l na água, durante uma semana, concentraram menos pesticidas do que quando expostos a concentrações maiores durante 24 horas.

A eliminação do endosulfan por organismos aquáticos é rápida quando cessa a exposição e ocorre a transferência dos organismos para água livre do pesticida. Isto tem sido evidenciado por certas espécies de peixes e moluscos. Por exemplo, DESER et al. (1971) apud GOEBEL et al. (1982) constataram que o endosulfan acumulado pelo *Carassius auratus* é excretado com período de



meia-vida de 2 a 3 dias. NIIMI (1987) relatou valores de  $t_{1/2}$  inferiores a 24 horas em *Nullus barbatus*, que acumularam endosulfan quando expostos à concentração de 0,1 ug/l, durante 28 dias. ROBERTS (1972) expôs moluscos marinhos (*Mytilus edulis*) ao endosulfan em concentrações de 0,1; 0,5 e 1 mg/l, durante 112 dias. A concentração mais alta de pesticida determinada nos tecidos após este período foi cerca de 8 mg/kg, diminuindo pela metade após, aproximadamente, 12 dias de exposição em água isenta do composto.

Apesar de existirem alguns estudos referentes à toxicocinética do endosulfan em diferentes espécies de peixes, não se tem conhecimento de trabalhos que relatem o comportamento de cada um dos seus isômeros, e dos seus produtos de metabolismo, principalmente em relação a espécies brasileiras e a outras internacionalmente recomendadas para estudos toxicológicos.

#### II.3.5.2. Toxicidade Aguda

##### Estudos em Mamíferos:

A dose letal média ou DL50 é o parâmetro utilizado para expressar a toxicidade aguda de um pesticida em mamíferos, e representa a dose do composto administrado, expressa em mg/kg de peso corpóreo (p.c.), que produz a morte de 50% de indivíduos de uma população de animais, em condições específicas.

A intensa estimulação do sistema nervoso central (S.N.C.),

de animais expostos a doses agudas de endosulfan resulta em sintomas que incluem: hiperatividade, aumento da resposta reflexa a estímulos, irritabilidade, tremores e convulsões de natureza crônica, seguidos da morte.

Na Tabela 4 é apresentada a classificação toxicológica do endosulfan segundo o tipo de formulação. Esses dados foram obtidos de acordo com a Portaria nº 04/DISAID de 30 de Abril de 1980, da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Produtos Saneantes e Domissanitários, que classifica os pesticidas em função dos valores de DL50 determinados em ratos (LARINI, 1987).

Tabela 4: Classificação toxicológica do endosulfan de acordo com o tipo de formulação (Segundo LIMA & RACCA, 1987).

CLASSIFICAÇÃO TOXICOLÓGICA	FORMULAÇÃO
I (altamente tóxico)	Produto Técnico
I (altamente tóxico)	Conc. Emulsificável (até 360 g/l)
I (altamente tóxico)	Ultra Baixo Volume (até 250 g/l)
II (medianamente tóxico)	Pó Molhável (até 350 g/kg)
II (medianamente tóxico)	Granulado (até 30 g/kg)
II (medianamente tóxico)	Pó Seco (até 30 g/kg)

De um modo geral, a DL50 oral de endosulfan técnico para ratos varia de 18 a 220 mg/kg p.c. (GUPTA & GUPTA, 1979), e seus valores dependem da via de administração, espécie, veículo, sexo e estado nutricional.

Em ratos, o valor de DL50 do endosulfan técnico veiculado em álcool etílico 95% e administrado oralmente é de 40 a 50 mg/kg p.c., enquanto que, administrado por via intraperitoneal, esse

valor diminui para 8 mg/kg p.c. (GUPTA & GUPTA, 1979). A maior susceptibilidade de uma espécie em relação a outra quanto aos efeitos tóxicos do endosulfan foi demonstrada por GUPTA (1976). Este determinou valores de DL50 notavelmente inferiores para camundongos (6,9 - 7,5 mg/kg p.c.), comparativamente a ratos (22,1 - 46,7 mg/kg p.c.), após administrar em ambas espécies endosulfan técnico intraperitonealmente. Foi também observado que o valor DL50 do endosulfan para ratos é aproximadamente 50% inferior veiculando-se o pesticida em álcool, quando comparado com sua administração em solução oleosa. A sensibilidade das fêmeas (DL50 = 22 mg/kg p.c.) à ação do composto foi de aproximadamente o dobro da dos ratos machos (DL50 = 47 mg/kg p.c.); estas diferenças, porém, não foram observadas em camundongos.

O estado nutricional do organismo é fator fundamental para a manifestação dos efeitos do pesticida. BOYD & DOBOS (1969), estudando a influência do conteúdo protéico da dieta na toxicidade aguda do endosulfan em ratos, verificaram uma diminuição de aproximadamente 1/5 do valor DL50 em animais previamente alimentados com dietas contendo alto valor de caseína. Acredita-se que o aumento do conteúdo protéico do organismo favoreça uma maior metabolização do composto para produtos menos tóxicos.

Apesar de serem poucos os casos de intoxicação humana por endosulfan através da via dérmica (WHO, 1984), sérias precauções devem ser tomadas com pessoas expostas ocupacionalmente a esse inseticida, cujo valor de DL50 dérmica para ratos varia entre 74 e 681 mg/kg p.c. (GUPTA & GUPTA, 1979). Estes dados toxicológicos classificam algumas formulações do endosulfan, como por exemplo o

concentrado emulsionável à 35%, como altamente tóxico com relação a essa via de exposição (LARINI, 1987).

A toxicidade de cada isômero e de seus produtos de metabolismo (endosulfan sulfato, éter, hidroxietér, lactona e diol), parece estar relacionada à presença do átomo de enxofre nestes compostos. DOROUGH et al., (1978), determinaram a DL50 destes compostos em camundongos e verificaram que os menores valores de DL50 correspondiam aos compostos sulfurados, ou seja, ALFA e BETA endosulfan e endosulfan sulfato. Este último apresentou o menor valor de DL50 com uma toxicidade aguda semelhante à do isômero ALFA e de 15 a 250 vezes maior que para os demais metabólitos (Tabela 5).

Tabela 5: Valores de DL50 de endosulfan, e seus metabólitos, administrado oralmente em camundongos fêmeas (Segundo DOROUGH et al., 1978)

COMPOSTO	DL50 (mg/kg p.c.)
ALFA endosulfan	11
BETA endosulfan	36
endosulfan sulfato	8
endosulfan hidroxietér	120
endosulfan lactona	120
endosulfan éter	270
endosulfan diol	> 2000

Dado ao perfil tóxico do endosulfan sulfato, a presença deste composto deve ser seriamente considerada na análise de resíduos de pesticidas, tanto para fins de monitoramento de inseticidas organoclorados, como para a avaliação toxicológica do endo-

sulfan.

#### Estudos em Peixes:

Entre os pesticidas cuja toxicidade em peixes tem sido avaliada, o endosulfan é conhecido como um dos que apresentam maior toxicidade aguda nestes organismos aquáticos (SWARUP et al., 1981).

Em um estudo de toxicidade aguda realizado com 164 substâncias químicas, compreendendo 34 inseticidas, além de fungicidas, herbicidas e outros compostos; e utilizando-se o peixe Harlequin (*Rasbora heteromorpha*) como animal experimental, o endosulfan foi o composto que apresentou a mais baixa concentração letal média em 24 horas, sendo 350 vezes mais tóxico que o inseticida com CL50-24 h imediatamente superior e 250 milhões de vezes mais tóxico que o inseticida que apresentou menor toxicidade (ALABASTER, 1969)

Em outro estudo de toxicidade realizado com 24 substâncias químicas de uso na agricultura e indústrias químicas, e apontadas como poluidoras de sistemas aquáticos, o THIOTOX (endosulfan) foi o que apresentou menor valor de CL50-96h (2,5 ug/l) para o peixe *Cirrhinus mrigala* (VERMA et al., 1984).

Alguns desastres ecológicos provocados pelos efeitos agudos do inseticida endosulfan sobre as populações de peixes em ecossistemas aquáticos têm sido relatados pela literatura. Uma alta mortandade de peixes foi observada em 1969 na República Fe-

deral da Alemanha, quando aproximadamente 30 kg do inseticida foram descarregados no rio Reno (GREVE & WIT, 1971; SIEVERS et al., 1972 apud WHO, 1984). Uma massiva mortandade de peixes, ocorrida na África do Sul, em 1974, foi associada a uma alta concentração de endosulfan na água, provocada pela descarga acidental do pesticida por operadores que pulverizavam lavouras (VAN DYK & GREEF, 1977).

Apesar de não se ter dados que confirmem, tanto no Brasil como em outros países, desastres ecológicos provocados pela entrada do endosulfan em corpos de água, a partir de áreas agrícolas onde o pesticida é aplicado, VAN DYK & GREEF (1977) fazem advertências quanto ao uso deste inseticida que, embora possuindo baixa persistência no solo, é susceptível de atingir a hidrosfera após chuva ou irrigação intensa da área aplicada.

Aumento da frequência respiratória e hipersensibilidade a estímulos, nado rápido e errático, perda de equilíbrio, e paralisia seguida de morte são os sintomas que caracterizam a intoxicação aguda em peixes expostos ao endosulfan (JOSHI & REGE, 1980; DEVI et al., 1981).

Os valores de CL50 (24 e 96 h) de endosulfan calculados para diferentes espécies de teleósteos se situam em geral na faixa de 1 a 10 µg/l (GOEBEL et al., 1982); porém, para algumas espécies, valores de CL50 inferiores a 0,1 µg/l já foram relatados (ALABASTER, 1969). Na Tabela 6 são apresentados alguns valores de CL50 (24 e 96 h) do endosulfan para algumas espécies de teleósteos.

Similarmente aos resultados obtidos por DOROUGH et al.

(1978) em camundongos, os trabalhos realizados por KNAUF & SCHULZE (1973) com três espécies de peixes demonstraram que os metabólitos isentos do átomo de enxofre possuíam menor toxicidade aguda em relação aos isômeros ALFA e BETA e ao endosulfan sulfato, e que seus valores de CL50-48 h eram aproximadamente 100 e 1000 vezes superiores aos valores dos compostos sulfurados. Contrariamente aos resultados encontrados para camundongos, o endosulfan sulfato se mostrou menos tóxico que os 2 isômeros nas 3 espécies estudadas, mas com valores de CL50-48 h muito próximos aos desses compostos.

Tabela 6: Dose letal média do endosulfan (ALFA+BETA,2:1) em peixes.

ESPÉCIE	PERÍODO (h)	CL50 (ug/l)	SISTEMA	REFERÊNCIA
<i>Lepomis macrochirus</i>	24	3,6	ESTÁTICO	PICKERING & HENDERSON (1966)
<i>Lebiste reticulatus</i>	24	4,6	ESTÁTICO	PICKERING & HENDERSON (1966)
<i>Rasbora heteromorpha</i>	24	0,09	CONTÍNUO	ALABASTER (1969)
<i>Channa gachua</i>	96	10,7	----	DALELA et al. (1978)
<i>Gambusia affinis</i>	24	6,0	ESTÁTICO	JOSHI & REGE (1980)
<i>Gambusia affinis</i>	96	1,3	----	NAQVI & HAWKINS (1988)
<i>Claris batrachus</i>	24	22,5	----	GOPAL et al. (1981)
<i>Anabas testudineus</i>	24	3,0	CONTÍNUO	RAO & MURTY (1980)
<i>Mystus vittatus</i>	96	0,67	----	VERMA et al. (1980)
<i>Saccobranchus fossilis</i>	24	11,1	ESTÁTICO	VERMA et al. (1982)
<i>Cirrhinus mrigala</i>	96	1,3	CONTÍNUO	SWARUP et al. (1981)

A toxicidade aguda do isômero ALFA em peixes tem demonstrado ser maior que a do isômero BETA, sendo que diferenças entre os valores de CL50 para ambos isômeros variam conforme a espécie. A toxicidade relativa do endosulfan técnico e dos isômeros ALFA e BETA foi investigada em *Labeo rohita* (RAO et al., 1980) e em

*Channa punctata* (DEVI et al., 1981). Na primeira espécie, a toxicidade de ambos isômeros em relação ao endosulfan técnico foi 30 vezes maior para o isômero ALFA enquanto que o endosulfan BETA apresentou aproximadamente 70% da toxicidade do endosulfan técnico. Em 1981, DEVI et al. constataram que o tipo de formulação em que o pesticida é veiculado altera a toxicidade do composto. Foi verificado que o endosulfan técnico formulado 35 CE (Concentrado Emulsificável à 35%) é aproximadamente 2 vezes mais tóxico do que o mesmo produto técnico veiculado em acetona. A exposição dos peixes a endosulfan, sob a forma de pó, resultou em valores de CL50-96 h maiores em relação à exposição ao produto técnico. Provavelmente, a presença de agentes emulsionantes no endosulfan 35 CE contribua para uma maior absorção do composto. Esta observação, entretanto, parece variar de espécie para espécie, já que RAO et al. (1980) não evidenciaram um aumento significativo de toxicidade do endosulfan, em peixes expostos ao pesticida na formulação 35 CE.

Um outro fator que afeta a toxicidade aguda do endosulfan em peixes é a temperatura da água na qual eles estão expostos ao agente tóxico. SINGH & NARAIN (1982) determinaram os valores de CL50-96 h em várias temperaturas no peixe *Heteropneustes fossilis* e observaram um aumento de aproximadamente 30 a 45% para a toxicidade do endosulfan técnico, quando se aumentou a temperatura de 18°C para 30°C. Uma diminuição do valor de CL50, de 13 µg/l, foi observada em *Salmo gardnieri*, quando houve aumento da temperatura de 1,6 a 12,7°C (MACEK, 1969 apud GOEBEL et al., 1982). Como já citado, o decréscimo da concentração de oxigênio dissolvido na



água com o aumento da temperatura provoca aumento dos movimentos respiratórios para suprir a demanda de oxigênio, e conseqüentemente contribui para um maior ingresso do pesticida no organismo.

Em experiências realizadas para avaliar a toxicidade aguda do endosulfan técnico, em função do comprimento e peso do peixe, verificou-se que quando aumentam estes dois parâmetros, o valor de CL50 aumenta (SINGH & NARAIN, 1982). Como o conteúdo de gordura em tecidos dos peixes aumenta com a idade do animal, supõe-se que peixes de maior tamanho tenham uma maior reserva lipídica que atua como um depósito de pesticidas e protege, de certo modo, os órgãos mais sensíveis (MATTHIESSEN et al., 1982; MURTY, 1986). Existem duas suposições relacionadas à ação tóxica de pesticidas para peixes de menor tamanho. Uma delas considera que devido a uma maior taxa metabólica que intensifica a velocidade respiratória, ocorre um aumento de ventilação a nível branquial e, portanto, uma maior absorção do pesticida. A outra, refere-se a uma maior absorção do pesticida pelo organismo em conseqüência de uma maior área de superfície branquial, em relação à massa corporal total (MURTY, 1986).

Considerando-se que as características de águas em que se conduzem os testes toxicológicos podem diferir quanto à dureza e pH, torna-se interessante conhecer possíveis alterações da toxicidade dos pesticidas em peixes, em função dessas variáveis. De um modo geral, a toxicidade dos pesticidas organoclorados não parece ser influenciada por mudanças de dureza da água, a menos que mudanças bruscas no pH sejam produzidas ao mesmo tempo (NIMMO, 1985). O comportamento tóxico do endosulfan, em relação à dureza

da água, parece seguir esta regra, já que a exposição do peixe *Lepomis macrochirus* ao composto técnico em águas contendo 20 a 360 mg/l de dureza resultou em valores de CL50 semelhantes (PICKERING & HENDERSON, 1966).

Pequenas variações no pH do meio em que o endosulfan se encontra dissolvido podem alterar a toxicidade do composto. Assim, PAUL & RAUT (1987) estudaram a toxicidade aguda do endosulfan em cinco espécies de peixes expostos a diferentes valores de pH. Foi observado que diminuindo-se o pH de 8,2 para 7,5, os valores de CL50 aumentaram mais de 50% na maior parte das espécies testadas. Os autores atribuíram esta observação à intensa hidrólise do pesticida que ocorre em meio alcalino.

#### II.3.5.3. Efeitos Citogenéticos e Histopatológicos

##### Estudos em Mamíferos:

Os rins, tanto anatômica como fisiologicamente, são órgãos extremamente complexos, cuja função principal é a eliminação de excretas e a regulação da homeostase corporal. A ação de agentes tóxicos neste órgão resulta num desequilíbrio no balanço eletrolítico do organismo, acompanhado da eliminação diminuída de produtos de catabolismo, e do próprio agente tóxico. A sua alta capacidade de concentrar fluidos corporais, nos quais o xenobiótico e/ou seu produto de metabolismo estão presentes, implica na gran-

de susceptibilidade deste órgão aos efeitos tóxicos de compostos como pesticidas (HOOK, 1980).

O surgimento de nefropatias, devido a ação tóxica do inseticida endosulfan, foi constatada em ratos alimentados com uma dieta contendo 100ppm de endosulfan durante o período de 104 semanas, após o qual observou-se hipertrofia celular e alta incidência de nefropatias nos túbulos renais (FAO/WHO, 1968; apud WHO, 1984). A presença destas alterações, juntamente com a alta incidência de nefropatias constatadas em ratos, relatada por trabalhos do National Cancer Institute (GUPTA & GUPTA, 1979), e de congestão observado a nível de túbulo renal, (BOYD & DOBOS, 1969), confirmam claramente a nefrotoxicidade do endosulfan em mamíferos.

O fígado é o principal órgão responsável pelos processos de metabolização de xenobióticos, devido ao seu alto conteúdo em enzimas capazes de biotransformá-los em compostos de menor toxicidade e de maior polaridade. A grande vulnerabilidade do fígado a danos provocados por agentes químicos parece ser função da sua proximidade anatômica ao suprimento sanguíneo a partir do trato digestivo, da sua capacidade de biotransformar xenobióticos e do seu envolvimento na concentração e excreção de xenobióticos e/ou de seus produtos de metabolismo para a bile (FLAA & HEWITT, 1982). A congestão dos sinusóides hepáticos observados por BOYD & DOBOS (1969) em ratos tratados com o pesticida demonstraram que uma dose única do inseticida é suficiente para provocar alterações histopatológicas no fígado.

Quanto a efeitos mutagênicos, parece existir uma falta de

concordância entre os resultados de trabalhos obtidos por diversos autores que estudaram a ação do inseticida endosulfan em células de diferentes espécies de mamíferos. Um aumento significativo do número de aberrações cromossômicas em células da medula óssea de Hamsters fêmeas foi evidenciado por DZOWONKOWSKA & HUBNER (1986), depois de tratar esses animais com doses únicas de 8 a 40 mg/kg p.c. de endosulfan, administradas intra-peritonealmente. A indução de aberrações cromossômicas por este pesticida foi também constatada por YODER et al. (1973) apud PEDNEKAR et al. (1987) em células humanas. Segundo DIKSHITH & DATTA (1978), esses efeitos não foram significativos sobre células da medula óssea e células espermatogênicas de ratos machos, tratados com o inseticida por via oral, na dose de 11 a 55 mg/kg p.c., durante 5 dias.

Uma das possíveis consequências da ação de pesticidas sobre o material cromossômico celular é o surgimento de uma descontrolada proliferação celular, originando processos neoplásicos que podem apresentar comportamento biológico e histopatológico benigno ou maligno.

Nos trabalhos realizados no National Cancer Institute (INNES et al., 1969 apud GOEBEL et al., 1982; WHO, 1984), nos quais se alimentaram camundongos com dietas contendo 3 e 6 ppm de endosulfan, durante 78 semanas, não se constatou o desenvolvimento de um número significativo de células tumorais e não foram obtidas conclusões concretas a respeito do potencial carcinogênico do composto. Estudos posteriormente realizados pelo mesmo Instituto, em ratos e camundongos de ambos os sexos, alimentados com uma

dieta contendo o pesticida, evidenciaram o aparecimento de hiperplasia de células da paratireóide, acompanhada da mineralização de vários tecidos em alguns ratos machos. Finalmente, foi concluído que o endosulfan não apresentava ação carcinogênica em ratos e camundongos fêmeas, mas que estudos complementares em relação ao potencial da indução de tumores por parte deste composto deveriam ser realizados (GUPTA & GUPTA, 1979).

Em 1984, a OMS (WHO, 1984) considerou pouco conclusivo os dados relacionados ao potencial carcinogênico do inseticida endosulfan, tendo sido sugerido a realização de estudos visando a obtenção de informações relativas a esses efeitos.

Em 1985, a Reunião do Grupo de Peritos em Resíduos de Pesticidas da OMS (JMPR) requereu uma reavaliação completa do endosulfan, sendo que os dados toxicológicos obtidos foram revistos na Reunião de 1989. Nessa ocasião, novos dados toxicológicos disponíveis foram avaliados, tendo sido estabelecida para o endosulfan uma ingestão diária aceitável (IDA) de 0,006 mg/kg p.c.. Este valor de IDA foi estimado a partir de um nível sem efeito adverso não observado (NOAEL) igual a 0,6 mg/kg p.c./dia, estabelecido em estudos de carcinogênese com ratos alimentados com 15 ppm de endosulfan na dieta, ao qual se aplicou um fator de segurança igual a 100. Nessa reunião foi também sugerida a realização de futuras observações em seres humanos (FAO, 1989).

### Estudos em Peixes:

Similarmente aos mamíferos, a exposição a concentrações agudas do inseticida endosulfan provocou alterações estruturais no fígado do peixe *Labeo rohita*, caracterizados pelo aparecimento de um citoplasma hialino e menos denso, vacuolização do núcleo e perda do limite intercelular (RAD et al., 1980). Outros efeitos histopatológicos em células hepáticas foram descritos por MATTHIESSEN & ROBERTS (1982), em diversas espécies de peixes africanos provenientes de áreas previamente pulverizadas com o inseticida, tendo os autores observado necrose, edema com infiltrados inflamatórios e acúmulo de lipídeos nos hepatócitos.

Devido a sua ação neurotóxica, é de se esperar que os inseticidas organoclorados provoquem alterações histopatológicas no sistema nervoso central, promovendo alterações de comportamento. Estes efeitos, observados em espécies de peixes da África após aplicações realizadas para o controle da mosca tse-tse, se caracterizaram pela hiperatividade e pela incapacidade de coordenação de movimentos em algumas espécies. Cortes histológicos de cérebros destes peixes demonstraram edema subependimal e meningite com infiltrados inflamatórios de eosinófilos (MATTHIESSEN & ROBERTS, 1982). Alterações semelhantes foram também constatadas em cérebros de ratos (BOYD & DOBOS, 1969).

Nos organismos aquáticos, as brânquias são os órgãos onde se produzem as trocas gasosas, necessárias para a manutenção do metabolismo. Danos a estas estruturas altamente vascularizadas, devido à ação de xenobióticos, implicam em alterações nos níveis

de oxigênio absorvido e, portanto, de uma disfunção dos processos oxidativos no organismo. DALELA et al. (1979) descreveram os efeitos do endosulfan sobre estes órgãos no peixe *Channa gachua*, sob condições aguda e subaguda de exposição. Na primeira condição, foi observada a separação do epitélio branquial da membrana basal, seguido de hiperemia e necrose. Na exposição subaguda, os danos provocados nas brânquias foram progressivamente mais severos com o aumento do tempo de exposição, caracterizando-se pelo entumescimento e vacuolização de células dos filamentos branquiais, acompanhados pela descamação de células epiteliais.

Efeitos histopatológicos em glândulas produtoras de hormônios com função reprodutora podem promover uma alteração da síntese destas substâncias, comprometendo a fisiologia normal do sistema reprodutor e, por consequência, a sobrevivência da própria espécie. SHUKLA & PANDEY (1986) constataram a vacuolização de células gonadotrópicas e tireotrópicas na glândula pituitária do peixe *Sarotherodon mossambicus*, exposto a concentrações subletais de endosulfan. Algumas das células demonstraram ausência de citoplasma e alterações na estrutura nuclear. Outras estruturas pertencentes ao complexo hipófise - hipotálamo demonstraram alterações na sua forma e tamanho, assim como deformidades no seu conteúdo citoplasmático e estrutura nuclear. Efeitos prejudiciais sobre ovários foram evidenciados pelos mesmos autores, os quais observaram deformações de células da teca e da camada granulosa. Mudanças morfológicas sobre estes mesmos órgãos, observadas por KULSHRESTHA & ARORA (1984), caracterizaram-se pelo aumento do tecido conjuntivo da túnica albugínea e pela dilatação dos

vasos.

A queda de atividade na síntese de hormônios esteróides, devido à diminuição dos níveis de desidrogenases esteroidais (SHUKLA & PANDEY, 1986), e por conseqüência, a redução do tamanho e número de oócitos, sua deformidade nos diferentes estágios de desenvolvimento, (KULSHRESTHA & ARORA, 1984; SHUKLA & PANDEY, 1986) e o retardo na sua postura (MATTHIESSEN & LOGAN, 1984); provavelmente sejam o resultado da ação do endosulfan sobre as glândulas produtoras de hormônios sexuais em algumas espécies de teleósteos. Em contrapartida, nenhuma alteração fora dos padrões de normalidade foi constatada por MATTHIESSEN & LOGAN (1984), com relação à histologia de ovários e testículos de peixes de espécie *Sarotherodon mossambicus*.



### III - MATERIAIS E MÉTODOS

#### III.1. Reagentes

- Endosulfan: 1,2,3,4,7,7a - hexacloro - biciclo (2,2,1) hepteno, 2,5,6 bis (metileno) sulfito.

O composto foi fornecido pela indústria HOECHST como:

- a) Endosulfan ALFA, 99% de pureza.
- b) Endosulfan BETA, 99% de pureza.
- c) Endosulfan ALFA+BETA(2:1), 99% de pureza.
- d) Endosulfan sulfato, 99% de pureza.
- e) Thiodan técnico, endosulfan ALFA+BETA(2:1) 97,05% de pureza.

- Acetona para análise de resíduos (P.R.) Merck.
- Hexano P.R. Merck.
- Diclorometano P.R. Merck.
- Acetonitrila P.R. Merck.
- Florisil 60 - 90 mesh P.R. Merck, muflado a 650°C por 5 horas, e ativado a 130°C.
- Cloreto de sódio P.R. Merck, muflado a 400°C por 4 horas.
- Sulfato de sódio P.R. Merck, muflado a 400°C por 4 horas.

### III.2. Equipamentos

Além dos equipamentos de uso comum em laboratório, foram também utilizados:

- Homogenizador de tecidos TECNAL modelo TE 102.
- Evaporador rotatório TECNAL modelo TE 120.
- Cromatógrafo a gás VARIAN modelo 3400, equipado com detector de captura de elétrons ( $^{63}\text{Ni}$ ) e coluna Megabore tipo DB1 (30 m comprimento X 0,54mm diâmetro interno, 100% Metil polisiloxano).

### III.3. Animais Experimentais

Foram utilizados peixes ornamentais conhecidos popularmente como "paulistinha" (*Brachydanio rerio*), adquiridos em fornecedor local, e peixes adultos selvagens conhecidos como "lambarí" ou "tetra amarelo" (*Hyphessobrycon bifasciatus*), capturados em pequeno açude não poluído, próximo ao Campus da Universidade. Estudos prévios no nosso laboratório revelaram uma adaptação satisfatória de ambas as espécies.

### III.4. Condições do Ensaio

Uma vez que as condições ambientais podem afetar marcadamente a sensibilidade ao agente tóxico, os testes toxicológicos

foram conduzidos sob condições pré-determinadas, tais como: duração de fotoperíodo, qualidade de luz, temperatura e características definidas de qualidade de água (pH, dureza total, oxigênio dissolvido e consumido, cloro residual) (BUIKEMA et al., 1982).

O fotoperíodo, qualidade e intensidade de luz foram controlados com lâmpadas fluorescentes conectadas a um "timer". O controle da temperatura foi feito pelo uso de termostatos ou pela manutenção de uma temperatura ambiente constante no laboratório.

Os fatores referentes à qualidade da água foram controlados conforme os métodos citados abaixo:

FATOR	FUNDAMENTO	MÉTODO
Dureza Total (mg CaCO <sub>3</sub> /l)	Titulação com EDTA	Normas Analíticas do I. A. LUTZ (1976)
O <sub>2</sub> dissolvido (mg O <sub>2</sub> /l)	Iodometria	APHA (1975)
O <sub>2</sub> consumido (mg O <sub>2</sub> /l)	Permanganometria	APHA (1975)
Cloro Residual (mg/l)	Reação com Ortotolidina	Normas Analíticas do I. A. LUTZ, (1976)

### III.5. Análise e Recuperação do Endosulfan da Água

Nestes estudos, amostras de água com características semelhantes àquela que seria utilizada nos ensaios toxicológicos foram adicionadas de endosulfan ALFA, BETA e sulfato de modo a se obter concentrações de 1, 2 e 10 ug/l, respectivamente.

A extração do pesticida da água foi realizada conforme a metodologia de GORBACH et al. (1971), descrita a seguir:

O inseticida foi extraído de amostras de água (300 a 500ml) com três porções de 50ml de hexano. O extrato foi desidratado em sulfato de sódio (previamente muflado a 400°C durante 4 horas) e concentrado sob vácuo à temperatura de 35 a 38°C. A determinação do pesticida nos extratos foi realizada por cromatografia gasosa sob as seguintes condições operacionais:

temperatura da coluna = 200°C  
temperatura do injetor = 220°C  
temperatura do detector = 300°C  
fluxo de Nitrogênio = 20ml/min.

### III.6. Estabilidade do Endosulfan na Água

Nestes estudos, realizados sob condições controladas, as seguintes características físico-químicas da água foram previamente estabelecidas: temperatura = 25 - 27°C; fotoperíodo = 16 horas/luz, 8 horas/escuro, pH = 7,1; dureza total = 35,0mg/l CaCO<sub>3</sub>; oxigênio dissolvido = 6,5mg/l; oxigênio consumido = 3,2mg/l, cloro residual = 0,05 - 0,1mg/l.

Neste ensaio e nos descritos posteriormente, foi feita uma dechlorinização prévia da água adicionando-se 7mg de tiosulfato de sódio para cada miligrama de cloro livre dissolvido na água, conforme descrito por HENDERSON & PICKERING (1963) apud MURTY (1986).

Amostras de água adicionadas de Thiodan técnico nas concentrações de 3 e 10 ug/l foram analisadas no início do teste e em intervalos de tempo de aproximadamente 24 horas, durante um período de 3 a 4 dias. As determinações foram realizadas em duplicata.

Os valores de meia vida ( $t_{1/2}$ ) na água dos isômeros ALFA e BETA foram calculados segundo a cinética de degradação de primeira ordem, conforme descrito por GETMAN & DANIELS (1947) e PRISTA et al. (1979). Esses valores foram obtidos com base nos dados do logaritmo de concentração do pesticida na água em função do tempo. O valor da inclinação da reta obtida foi multiplicado por 2,303 e deste modo foi determinada a constante de degradação do pesticida na água (K). O valor de  $t_{1/2}$  para cada isômero foi então calculado pela Equação 1.

Equação 1:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{K}$$

Com base nestes estudos, o período de tempo necessário para a renovação das soluções, durante os testes de toxicidade aguda, (item III.7.), foi determinado pela Equação 2: como sendo igual a 8,0 e 7,6 horas, respectivamente para ALFA e BETA endosulfan. Esses períodos garantiriam a manutenção da concentração do pesticida em no mínimo 80% do valor nominal. Considerando-se esses valores, efetuou-se a renovação das soluções em intervalos de 6 horas durante toda a exposição. Esses intervalos represen-

tariam um período seguro para não permitir mais de 20% de degradação do pesticida na água, conforme as normas da OECD (1981).

Equação 2:

$$t = 2,303 \times \log \frac{C_{wr}}{C_{wo}} / K$$

onde:

t = tempo de degradação.

$C_{wo}$  = concentração inicial do composto na água.

$C_{wr}$  = concentração remanescente do composto após t.

K = constante de degradação na água ( $h^{-1}$ ).

Os modelos de regressão linear simples, obtidos das curvas de degradação, foram analisados pelo teste F e teste T de Student.

### III.7. Ensaio de Toxicidade Aguda

Os testes de toxicidade aguda foram conduzidos em meio semi-estático, de acordo com as normas da OECD Guidelines for Testing of Chemicals, procedimento 203 (OECD, 1981).

Foram realizados ensaios preliminares (Range finding test) para a seleção das concentrações a serem utilizadas nos testes definitivos. Nesses estudos, os peixes foram previamente aclimatizados nas condições ambientais a serem utilizadas durante o

teste definitivo ou seja: temperatura =  $25 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ ; fotoperíodo = 16 horas/luz, 8 horas/escuro; pH = 7,1; dureza total =  $35,0\text{mg/l CaCO}_3$ ; oxigênio dissolvido =  $5,1\text{ mg/l}$ ; oxigênio consumido =  $2,4\text{mg/l}$ .

Grupos de 5 peixes (*B. rerio* adultos) medindo em média  $3,5\text{cm}$  e com peso médio de  $0,18\text{g}$  foram expostos em aquários de  $20\text{ l}$  às concentrações de  $0,5$ ;  $1,2$  e  $4,0\text{ ug/l}$  de Thiodan técnico.

O mesmo procedimento foi utilizado para os peixes *H. bifasciatus*, sendo que, neste caso, grupos de 4 peixes adultos, medindo em média  $4,2\text{cm}$  e pesando em média  $0,73\text{g}$  foram expostos às concentrações de  $1$ ,  $4$ ,  $7$  e  $12\text{ ug/l}$  de Thiodan técnico durante 24 horas. Após este período, registrou-se o número de mortes para cada concentração.

Com base nos dados obtidos nestes ensaios preliminares, foi realizado o teste de toxicidade aguda definitivo, em ambas as espécies em estudo.

Os peixes foram transferidos para aquários de  $20\text{ l}$  e aclimatizados durante uma semana em água com as mesmas características físico-químicas da utilizada nos ensaios preliminares. Durante a aclimação, os peixes foram alimentados diariamente com ração "Nutral básica" na proporção de  $1\%$  do peso corpóreo, sendo a alimentação suspensa 24 horas antes do início do teste definitivo.

Grupos de 16 peixes cada foram expostos às concentrações de  $0$ ;  $0,5$ ;  $0,9$ ;  $1,6$ ;  $2,9$  e  $5,2\text{ ug/l}$  de Thiodan técnico, na experiência com *B. rerio* e a  $0$ ;  $1,8$ ;  $2,3$ ;  $3,0$ ;  $3,9$  e  $6,5\text{ ug/l}$  de Thiodan técnico na experiência com *H. bifasciatus*, durante um per-

riodo de 24 horas.

Considerando a instabilidade do endosulfan na água e com base em dados previamente estabelecidos (item III.6.), as soluções do pesticida foram renovadas a cada 6 horas, mantendo-se assim a concentração do pesticida em no mínimo 80% do valor nominal, conforme os requerimentos da OECD (1981).

Durante o período de exposição, observou-se o comportamento dos peixes e, após 24 horas, foi anotado o número de organismos mortos para cada concentração. A CL50-24 horas e seu limite de confiança 95% foram calculados pelo método de regressão de análise de próbitos (ROBERTS & BOYCE, 1972).

### III.8. Recuperação e Análise do Endosulfan em Tecidos

Além de se avaliar a eficiência da metodologia a ser utilizada na análise de resíduos de endosulfan em tecidos de peixes, determinou-se inicialmente a porcentagem de recuperação do pesticida. Alguns peixes foram então triturados e adicionados de quantidades conhecidas do pesticida dissolvido em hexano, obtendo-se concentrações de 0,27 a 0,05; 0,55 a 0,05 e 1,66 a 0,05  $\mu\text{g/g}$  de peixe, para endosulfan ALFA, BETA e sulfato, respectivamente. Para evitar a degradação do pesticida e garantir sua incorporação nos tecidos dos peixes, estes permaneceram sob refrigeração durante aproximadamente 15 horas. Após este período, o pesticida foi extraído e purificado por partição líquido-líquido, de acordo com a metodologia descrita por LUKE et al. (1975) e mo-



dificada pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos. A etapa de "clean up" foi realizada conforme o método descrito pela AOAC (1984), procedimento 29.048. Paralelamente foi analisada uma amostra não fortificada, que serviu como controle.

O procedimento usado nas etapas de extração e purificação de endosulfan ALFA, BETA e sulfato dos tecidos de peixes (corpo todo, de 2 a 5g), está esquematizado na Figura 5 e é descrito a seguir:

- 1- Homogeneizar e extrair as amostras com 150ml de acetona-H<sub>2</sub>O (100:50, v/v). Filtrar o extrato em funil de Buchner, usando papel Whatman tratado.
- 2- Transferir o filtrado para um funil de separação de 500ml contendo 100ml de hexano-diclorometano (50:50, v/v). Agitar vigorosamente por 2 minutos.
- 3- Transferir a camada aquosa para um funil de separação de 250ml contendo aproximadamente 5g de NaCl. Agitar vigorosamente e adicionar 50ml de diclorometano. Misturar cuidadosamente e separar a fase orgânica.
- 4- Juntar as fases orgânicas das etapas 2 e 3 e passar através de um filtro cilíndrico contendo Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Concentrar em evaporador rotatório a 35-38°C até a secagem.
- 5- Redissolver com 3ml de hexano e transferir para uma coluna (DI = 1cm, comp. = 25cm) de Florisil ativado. A coluna é previamente lavada com 20ml de hexano.
- 6- Eluir com 20ml de hexano (eluente I) seguido de 20ml de diclorometano-hexano (20:80, v/v) (eluente II) e 20 ml

de diclorometano-acetonitrila-hexano (50:1,5:48,5 v/v) (eluente III). Os resíduos de endosulfan são normalmente encontrados no eluente III.

7- Concentrar os eluentes II e III individualmente em evaporador rotatório. Lavar com 10 porções de aproximadamente 1ml de hexano sob corrente de Nitrogênio e transferir quantitativamente para um tubo graduado.

8- Diluir o extrato para 3ml e analisar por cromatografia gasosa.

Os extratos limpos foram quantitativamente analisados por cromatografia gasosa.

As condições de operação do aparelho foram:

- Programa de temperatura de coluna = inicial 150°C, aquecimento de 3°C/min. até 200°C
- Temperatura do injetor = 220°C
- Temperatura do detector = 300°C
- Fluxo de Nitrogênio = 20ml/min.

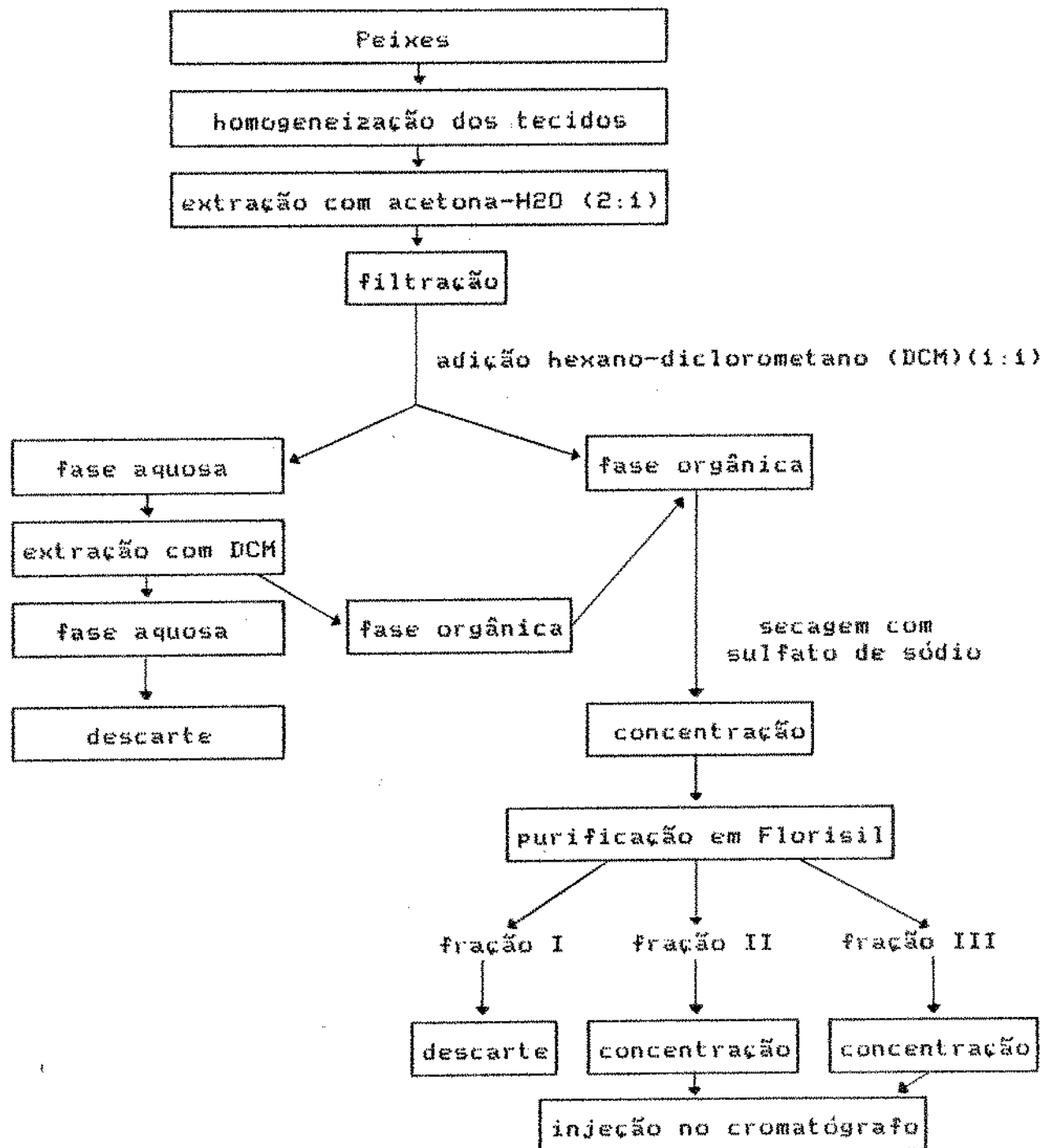


Figura 5: Esquema de extração e purificação de endosulfan em tecidos de peixes.

### III.9. Ensaio de Bioacumulação e Eliminação

Seis grupos de 90 peixes (*B. rerio*), pesando em média 0,27g, e três grupos de 23 peixes (*H. bifasciatus*) com peso médio de 0,78g, foram expostos a 0,4 ug/l de Thiodan técnico em aquários de 20 l, durante um período de 21 dias. A temperatura da água foi mantida em 22 +/- 1,5°C e o fotoperíodo foi de 16 h/luz, 8 h/escuro.

As características químicas da água utilizada foram semelhantes às dos testes de toxicidade aguda. A escolha da concentração do endosulfan baseou-se em testes preliminares nos quais se constatou que 0,4 ug/l de Thiodan técnico representava uma concentração segura para a manutenção de sobrevivência das espécies de peixe escolhidas. Levando-se em conta os valores de meia-vida dos pesticidas, estabelecidos conforme item III.6., a água foi renovada diariamente de modo a se ter uma concentração real de Thiodan técnico não inferior a 0,2 ug/l. Assim, para efeito de cálculo de fator de bioconcentração, considerou-se como concentração do pesticida na água a média entre 0,4 e 0,2 ug/l, ou seja 0,3 ug/l. Após 3, 7, 14 e 21 dias, três grupos de 20 peixes cada (*B. rerio*) e 3 grupos de 4 peixes cada (*H. bifasciatus*) foram analisados quanto à presença de resíduos.

A fase de eliminação se iniciou após o 21º dia de exposição quando os peixes remanescentes foram transferidos para aquários contendo água livre de pesticida, continuamente circulada através de filtro de carvão ativo, conforme procedimento descrito pela OECD Guidelines for Testing of Chemicals (OECD, 1981).

Após 24, 52, 79 e 120 horas, 3 grupos de 20 peixes da espécie *B. rerio* e 3 grupos de 3 a 5 peixes da espécie *M. bifasciatus*, foram examinados quanto à presença de resíduos de endossulfan. O procedimento utilizado foi o descrito no item III.B..

Tanto durante o acúmulo como na fase de eliminação, os peixes foram alimentados com ração Nutral básica na proporção de 1% do peso corpóreo.

O tempo de meia-vida biológica ( $t_{1/2} b$ ) dos isômeros ALFA e BETA e do endossulfan sulfato foi calculado considerando-se a cinética de eliminação de primeira ordem, que assume a presença de um compartimento único no modelo de bioconcentração (O.E.C.D., 1981; SPACIE & HAMELINK, 1985). Assim sendo, confrontando-se dados de logaritmo da concentração do pesticida nos tecidos com o tempo, durante a fase de eliminação, obteve-se uma reta cuja inclinação permitiu calcular a constante de eliminação ( $K_2$ ). Obtido este parâmetro,  $t_{1/2} b$  foi calculado através da Equação 3.

Equação 3:

$$t_{1/2} b = \frac{0,693}{K_2}$$

O fator de bioconcentração (FBC) dos isômeros ALFA e BETA foi determinado pela relação entre a concentração do pesticida no tecido ( $C_f$ ) e a concentração do pesticida na água ( $C_w$ ), quando foi atingido um estado de equilíbrio aparente durante a fase de acúmulo do pesticida. Em situações em que este fenômeno não foi observado, o FBC foi estimado segundo a aproximação descrita por

OLIVER & NIIMI (1985). De acordo com estes autores, em toxicologia aquática a relação que descreve a absorção e a eliminação de um xenobiótico por peixes em função do tempo  $t$  é descrita pela Equação 4.

Equação 4:

$$dC_f/dt = K_1C_w - K_2C_f$$

Onde:

$C_f$  = concentração do pesticida no peixe

$C_w$  = concentração do pesticida na água

$K_1$  = constante de absorção

$K_2$  = constante de eliminação

No estado de equilíbrio,  $dC_f/dt=0$  e o fator de bioconcentração, FBC, é dado pela Equação 5.

Equação 5:

$$FBC = C_f/C_w = K_1/K_2$$

Se  $C_w$  é constante, a Equação 4 pode ser integrada dando a Equação 6.

Equação 6:

$$C_f = (K_1 C_w / K_2) (1 - e^{-K_2 t})$$

Graficamente, a Equação 6 dá uma reta cuja inclinação é  $K_1 C_w / K_2$ . Sendo  $C_w$  e  $K_2$  conhecidos,  $K_1$  é calculado e o FBC estimado através da Equação 5.

Os modelos de regressão linear simples foram analisados pelo teste F e teste T de Student.

### III.10. Estudos de Acúmulo Através da Dieta

Nestes ensaios, o pesticida foi incorporado na ração Nutral básica adicionando-se o Thiodan técnico dissolvido em acetona, a qual foi evaporada sob vácuo à temperatura de 35 - 38°C.

Com base em estudos preliminares de toxicidade aguda de endosulfan administrado através de dietas, foram realizados estudos a médio prazo com o peixe *H. bifasciatus*, a fim de se estimar o acúmulo de endosulfan nos tecidos. O parasitismo por fungos, com conseqüentemente morte de grande número de peixe da espécie *B. rerio*, observado durante a execução destes estudos, impossibilitou a continuação e conclusão dos mesmos.

Um grupo de 44 peixes (*H. bifasciatus*), pesando em média 0,7g, foi alimentado uma vez por dia na proporção de 1% de seu peso corpóreo com ração Nutral básica contendo uma concentração de 8,87 ppm de endosulfan ALFA+BETA (2:1). O teor de pesticida

nesta dieta foi determinado pelo procedimento anteriormente descrito para análise de endosulfan em tecidos (ítem III.8.). A duração do teste foi de 181 dias.

Paralelamente, outro grupo de peixes foi alimentado com a mesma ração isenta de pesticida, servindo como controle.

Após 95 dias e no final do ensaio, amostras de peixes foram separadas para análise de resíduos de endosulfan.

### III.11. Estudos Histopatológicos

Amostras de vísceras abdominais e brânquias de peixes expostos ao endosulfan nos testes de toxicidade aguda, de acúmulo através da água (14 e 21 dias de exposição) e de exposição através da dieta (95 e 181 dias de exposição) foram analisadas quanto a possíveis alterações histopatológicas. Para cada exposição, o número de peixes analisados variou entre 3 e 5 organismos de cada espécie sendo que nas exposições agudas escolheram-se os organismos que apresentavam sinais de convulsão bem evidentes.

Os peixes foram anestesiados com MS222 (tricaina metanosulfonato de sódio) e, a seguir, as vísceras abdominais e brânquiais foram retiradas e imediatamente fixadas no fixador de BEHMER (mistura de formol/alcool/ácido acético/água na proporção de 20:30:10:40ml), durante 72 horas. Após este período os tecidos foram transferidos para o fixador de formol a 10% onde permaneceram até a etapa de desidratação. Esta foi realizada submetendo-se sucessivamente os tecidos fixados em soluções aquosas de eta-



nal a 50, 70, 90 e 99%. Posteriormente, os tecidos foram diafanizados pelo xilol e incluídos em blocos de parafina. Estes foram enviados à Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, aos cuidados do Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves, que se prontificou a colaborar nestes estudos. Ali, foram cortados pelo micrótomo obtendo-se cortes de 4 micrômetros de espessura. Os pequenos fragmentos obtidos foram montados em lâminas de vidro e corados pela hematoxilina/eosina e pelo corante tricrômico de MASSON. Os tecidos foram analisados quanto à presença de alterações histopatológicas através da microscopia óptica.

Como controle dos padrões histológicos de normalidade, tecidos de peixes não expostos ao pesticida foram preliminarmente caracterizados.

## IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### IV.1. Estabilidade do Endosulfan na Água

Os resultados relativos aos estudos de recuperação de resíduos de endosulfan ALFA, BETA e sulfato na água foram satisfatórios, ou seja dentro dos limites de 80 - 120% da concentração nominal, conforme parâmetros estabelecidos internacionalmente para análise de resíduos de pesticidas.

Na Tabela 7 são apresentados os resultados referentes à degradação do endosulfan na água. Para melhor visualização dos dados, estes também são apresentados na Figura 6.

Considerando-se os valores de concentração determinados para ambos isômeros no início das experiências ( $t = 0$ ), a porcentagem de recuperação foi de  $102,3 \pm 16,1\%$  e  $98,8 \pm 9,2\%$ , respectivamente, para os isômeros ALFA e BETA.

Sugere-se que a alta recuperação de endosulfan obtida nestes estudos esteja relacionada com a eficiência do hexano como solvente extrator. A utilização de hexano na extração de resíduos de endosulfan, e assim como de outros inseticidas organoclorados da água, tem sido recomendada por alguns autores (GORBACH et al. 1971 a; MILES & MOY, 1979; LEE et al., 1982). MC LEESE &

METCALFE (1980), porém, conseguiram a extração de somente 72% do pesticida em amostras de água de mar quando utilizaram hexano como solvente extrator. Esses mesmos autores conseguiram boa eficiência na extração de alguns compostos organoclorados como o endrin, DDT e hexaclorobenzeno (BHC) com recuperações de 80, 100 e 100%, respectivamente. Porém, para o dieldrin, clordano e Aroclor 1242, as recuperações foram baixas (63, 53 e 61%, respectivamente).

Tabela 7: Concentração de ALFA e BETA endosulfan na água em função do tempo para concentrações nominais iniciais de 3 e 10 ug/l de Thiodan técnico. <sup>(\*)</sup>

Concentração nominal inicial= 3 ug/l de Thiodan técnico			
tempo (h)	isômero ALFA (ug/l)	isômero BETA (ug/l)	Total ALFA+BETA (ug/l)
0	1,806 (0,026)	0,966 (0,019)	2,773 (0,044)
6	1,320 (0,078)	0,738 (0,005)	2,057 (0,073)
24	0,801 (0,037)	0,458 (0,033)	1,260 (0,069)
30	0,758 (0,013)	0,416 (0,024)	1,174 (0,037)
48	0,454 (0,008)	0,209 (0,009)	0,664 (0,0007)
54	0,411 (0,037)	0,176 (0,005)	0,587 (0,032)
72	0,262 (0,021)	0,090 (0,007)	0,352 (0,027)
Concentração nominal inicial= 10 ug/l de Thiodan técnico			
tempo (h)	isômero ALFA (ug/l)	isômero BETA (ug/l)	Total ALFA+BETA (ug/l)
0	7,205 (1,354)	3,173 (0,509)	10,379 (1,863)
22	3,537 (0,203)	1,710 (0,165)	5,247 (0,369)
46	1,985 (0,426)	0,980 (0,183)	2,966 (0,609)
70	0,739 (0,074)	0,449 (0,009)	1,188 (0,066)
94	0,464 (0,071)	0,284 (0,004)	0,748 (0,067)

<sup>(\*)</sup> Cada valor representa a média (+/- desvio padrão) de duas determinações (n=2).

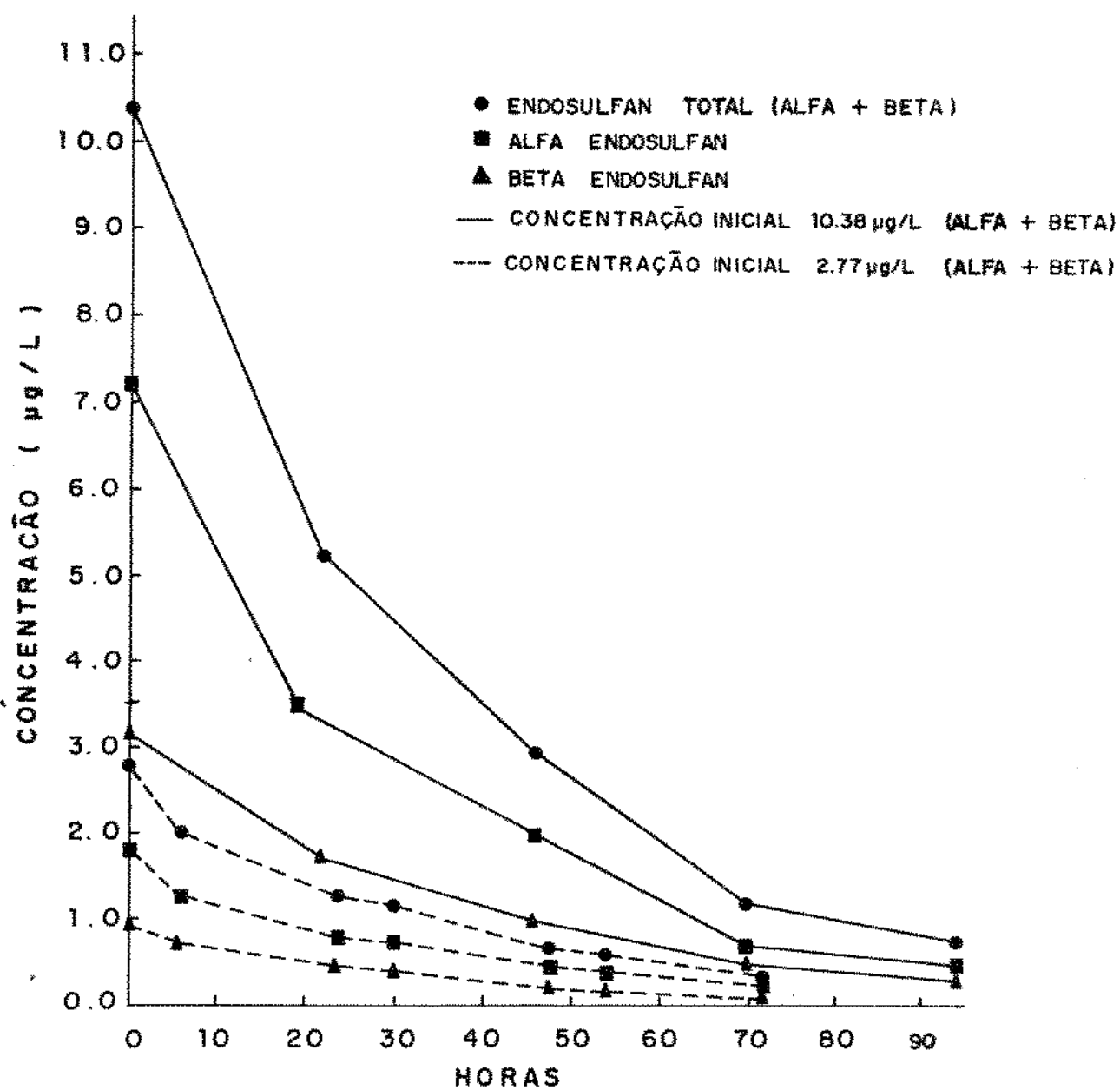


Figura 6: Degradação do endosulfan em água. pH=7,1; oxigênio dissolvido= 6,8 mg/l; temperatura = 25 -27°C. Cada ponto representa a média de duas determinações (n=2).

Provavelmente, a presença de matéria orgânica ou sedimento em águas de qualidades diferentes esteja relacionada a uma maior ou menor eficiência de extração do endosulfan e de outros compostos organoclorados; já que não tem sido observada uma correlação entre a solubilidade desses compostos na água e a sua recuperação.

Durante os estudos de degradação do pesticida na água, não foi constatada a formação de endosulfan sulfato, cuja toxicidade aguda para peixes e mamíferos é semelhante à do isômero ALFA.

Similarmente aos nossos resultados, COTHAM & BIDLEMAN (1989) não evidenciaram a presença de endosulfan sulfato em estudos de degradação de ALFA e BETA endosulfan em amostras de água de mar.

MILES & MOY (1979) estudaram a formação de endosulfan sulfato em amostras de águas inoculadas com microorganismos do solo, contendo ambos isômeros de endosulfan. Os autores constataram a oxidação do isômero ALFA para endosulfan sulfato na taxa de 2%, porém esta oxidação não foi evidenciada com relação ao isômero BETA. A ausência e os baixos níveis de endosulfan sulfato relatados pelos autores devem estar associados à maior tendência dos isômeros em sofrer hidrólise para formar endosulfan diol (MILES & MOY, 1979).

Os dados da Tabela 7 demonstram que durante a degradação do pesticida, a proporção entre os dois isômeros tende a se manter constante, sugerindo, portanto, que a interconversão desses compostos (MILES & MOY, 1979) deve existir em baixíssima intensidade. Segundo os autores, somente 13% de endosulfan ALFA são

formados a partir do isômero BETA, após um período de 20 semanas, em águas inoculadas com microorganismos do solo.

As curvas da Figura 6, se linearizadas, aproximam-se bastante de uma reta cujos parâmetros de regressão são estatisticamente significativos a nível de 1% de probabilidade ( $P < 0,01$ ).

Na Tabela 8 são apresentados os valores das constantes de degradação ( $k$ ) e da meia-vida ( $t_{1/2}$ ) do inseticida endosulfan na água, relacionados às concentrações nominais iniciais de Thiodan técnico iguais a 3 e 10 ug/l.

Tabela 8: Constantes de degradação ( $k$ ) e meia-vida ( $t_{1/2}$ ) de ALFA e BETA endosulfan na água.<sup>(A)</sup>

Concentração nominal inicial = 3 ug/l de Thiodan técnico			
endosulfan	$k (h^{-1})$	$t_{1/2} (h)$	$r^{(B)}$
ALFA	-0,0259 (0,0008) <sup>(C)</sup>	26,78 (0,87)	0,99
BETA	-0,0322 (0,0009)	21,52 (0,60)	0,99
ALFA+BETA	-0,0278 (0,0007)	24,93 (0,60)	0,99
Concentração nominal inicial = 10 ug/l de Thiodan técnico			
endosulfan	$k (h^{-1})$	$t_{1/2} (h)$	$r^{(B)}$
ALFA	-0,0299 (0,0016)	23,14 (1,24)	0,99
BETA	-0,0260 (0,0010)	26,61 (1,11)	0,99
ALFA+BETA	-0,0285 (0,0013)	26,43 (1,23)	0,99

<sup>(A)</sup> Valores de  $k$  e  $t_{1/2}$  calculados com base em dados da Tabela 7.

<sup>(B)</sup> Coeficiente de correlação da reta log concentração vs. tempo.

<sup>(C)</sup> Valores entre parênteses representam um desvio padrão.

Observa-se que, para ambas concentrações, os isômeros apresentam valores de meia-vida próximos de 24 horas.

Semelhanças nos valores  $k$  para os isômeros ALFA e BETA foram também constatadas por GREVE & WIT (1971) que estudaram a degradação do endosulfan na água sob diferentes condições de pH e oxigenação. Porém, para outros autores (MILES & MOY, 1979; COTHAM & BIDLEMAN, 1989) as diferenças entre os valores de  $K$  foram marcantes, sendo as constantes de degradação do isômero BETA aproximadamente o dobro da do isômero ALFA.

Comparativamente a outros estudos de estabilidade do endosulfan na água, os valores de  $t_{1/2}$  calculados no presente trabalho apresentaram-se numericamente inferiores aos relatados pela literatura especializada: 3 dias para ALFA e BETA em água estéril com pH 7,3 - 8,0 (EICHELBERGER & LICHTENBERG, 1971); 1,1 semanas para ALFA e 2,2 semanas para BETA em água não estéril com pH 6,5 (MILES & MOY, 1979); 4,9 dias para ALFA e 2,2 dias para BETA em água não estéril com pH 8,0 (COTHAM & BIDLEMAN, 1989). Porém, foram superiores aos relatados por STUMPF & ABHAUER (1986), que mencionaram valores de meia-vida para endosulfan na água variando entre 10 e 14 horas.

Embora o pH seja um fator determinante na estabilidade do endosulfan na água, outros fatores citados anteriormente devem contribuir significativamente para diferentes velocidades de degradação do pesticida na água, conforme constataram diversos autores. Diferentes valores de  $t_{1/2}$  na água tem sido determinados para o endosulfan sob as mesmas condições de pH (EICHELBERGER & LICHTENBERG, 1971; GREVE & WIT, 1971).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o endosulfan foi rapidamente degradado na água. Portanto, os dados in-

dicam que, embora tratando-se de um inseticida organoclorado, o endosulfan apresenta um caráter especial dentro desse grupo de compostos reconhecidamente estáveis no meio ambiente.

A curta persistência no meio aquático apresentada pelo endosulfan também foi observada por EICHELBERGER & LICHTENBERG (1971) que comprovaram uma alta velocidade de degradação do pesticida em relação à grande maioria dos inseticidas organoclorados e a alguns inseticidas organofosforados e carbamatos. Estudando a degradação de pesticidas em água de rio, os autores verificaram que compostos organoclorados altamente persistentes no meio ambiente (BHC, aldrin, heptacloroepóxido, dieldrin, clordano e aldrin) sofriam uma degradação de 0 - 20% após 2 semanas, enquanto que nas mesmas condições, 95% de endosulfan eram degradados. A degradação do endosulfan também foi maior que a dos organofosforados paration, malation, etion, fention, dimetoato e azodrin; e que a dos carbamatos Baygon, monuron, fenuron e propoxur.

Embora o endosulfan seja altamente degradável na água com parativamente a outros inseticidas, é importante que se considere seus níveis residuais na hidrosfera, já que a sua estabilidade varia bastante segundo as características do meio em que está presente.

A importância de se conhecer a estabilidade do endosulfan na água reside em se estabelecer fundamentos para uma maior confiabilidade na interpretação de resultados dos testes toxicológicos realizados. Deve ainda ser considerada possibilidade da presença dos organismos teste terem ocasionado mudanças nas características físico-químicas e microbiológicas da água, com conse-



quente alteração na cinética de degradação do endosulfan. Porém, esses fatores são de difícil controle, sendo portanto, os resultados obtidos nos estudos de estabilidade considerados como meios estimativos da concentração do pesticida durante os testes de avaliação toxicológica.

A razão desses problemas advem da alta instabilidade do pesticida sob as condições de ensaio utilizadas e da ausência de um sistema que permitisse a manutenção de uma concentração constante do endosulfan na água.

## IV.2. Estudos de Toxicidade Aguda

### IV.2.1. Determinação da CL50

Os resultados dos ensaios preliminares (Range finding test) (Tabelas 9 e 10) demonstram que, para ambas espécies, ocorreu 60 - 75% de mortalidade na concentração de 4 ug/l, sendo que para *H. bifasciatus*, ocorreu 100% de mortalidade em concentrações superiores. Esses ensaios permitiram escolher as faixas de concentração de exposição para a realização dos testes definitivos.

O tempo (t), calculado para a renovação das soluções do composto durante o teste de toxicidade aguda definitivo, foi de 8,0 e 7,6 horas, respectivamente, para ALFA e BETA endosulfan. Esses períodos foram determinados de forma a garantir a manutenção da concentração do pesticida em no mínimo 80% do valor nomi-

nal. Considerando-se esses valores, efetuou-se a renovação das soluções em intervalos de 6 horas durante toda a exposição. Esses intervalos representariam um período seguro para não permitir mais de 20% de degradação do pesticida na água, conforme as normas da OECD (1981).

Tabela 9: Concentração-teste e mortalidade de peixes *B. rerio* expostos ao Thiodan técnico em água por 24 horas.

Thiodan técnico (ug/l)	nº mortes (n=5)
0	0
0,5	0
1,0	0
2,0	1
4,0	3

Tabela 10: Concentração-teste e mortalidade de peixes *H. bifasciatus* expostos ao Thiodan técnico por 24 horas.

Thiodan técnico (ug/l)	nº mortes (n=4)
0	0
1,0	0
4,0	3
7,0	4
12,0	4

Os resultados dos testes de toxicidade aguda definitivo para *B. rerio* e *H. bifasciatus* estão apresentados nas Tabelas 11 e 12 e Figura 7.

Tabela 11: Concentração-teste e mortalidade de peixes *B. rerio* (n=16) expostos ao Thiodan técnico em água por 24 horas.

Concentração de Thiodan técnico (ug/l)	% morte
0	0
0,5	0
0,9	12,5
1,6	50,0
2,9	81,2
5,2	100,0

Tabela 12: Concentração-teste e mortalidade de peixes *H. bifasciatus* (n=16) expostos ao Thiodan técnico em água por 24 horas.

Concentração de Thiodan técnico (ug/l)	% morte
0	0
1,8	7,7
2,3	21,4
3,0	78,5
3,9	100,0
6,5	100,0

As equações da regressão que permitiram calcular os valores de CL50 - 24 h foram  $Y = 4,0x + 0,11$  e  $Y = 9,64x + 0,99$ , respectivamente para *B. rerio* e *H. bifasciatus*. O valor de CL50 -24 h de Thiodan técnico e o limite de confiança 95% para a espécie *B. rerio* foi de 1,6 (1,3 - 2,1) ug/l. Para a espécie *H. bifasciatus*, esse valor foi de 2,6 (2,3 - 2,9) ug/l, sugerindo uma maior resistência da espécie selvagem em relação à toxicidade do endosulfan (Figura 7).

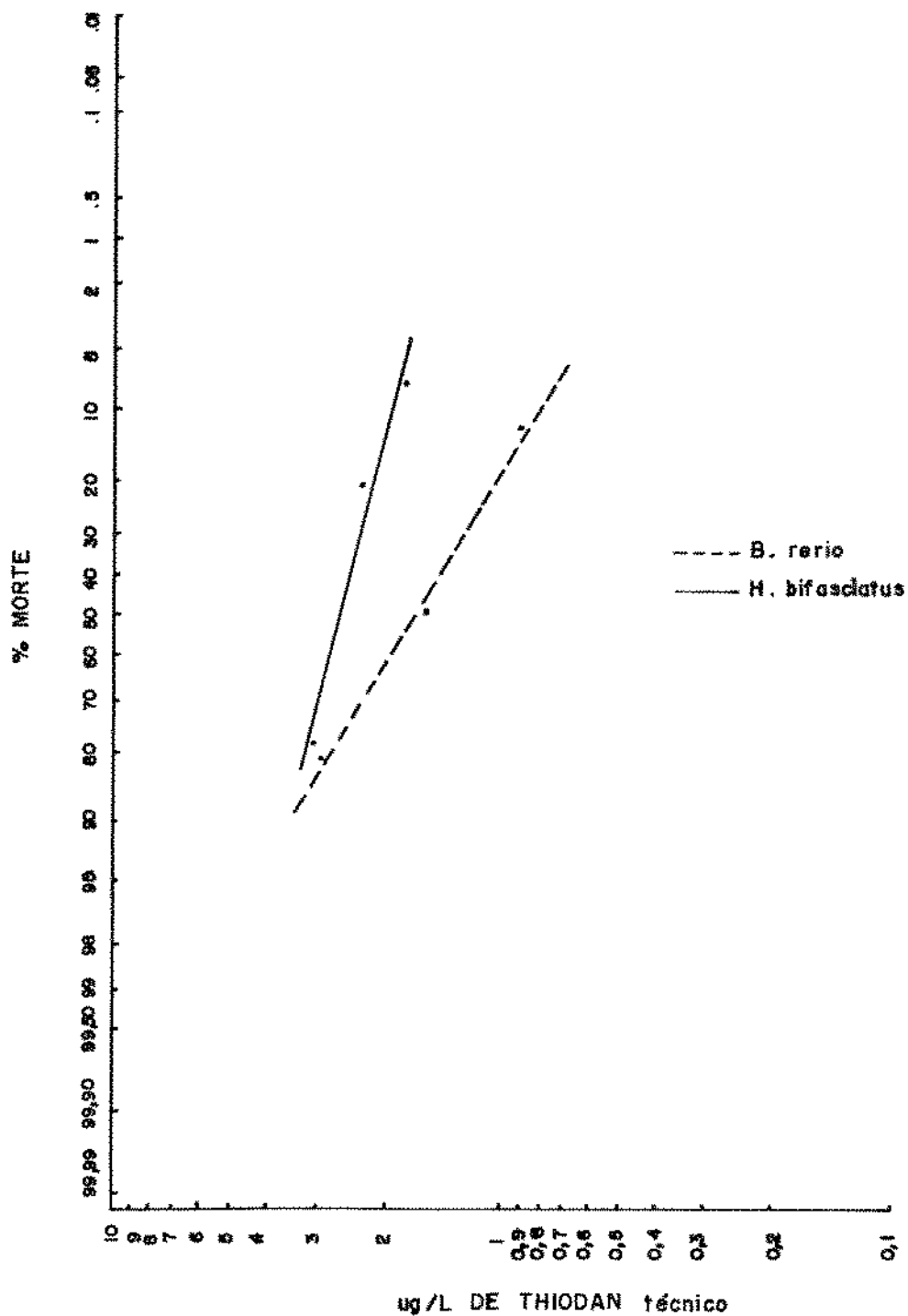


Figura 7: Curvas concentração - mortalidade para *B. rerio* e *H. bifasciatus* expostos ao Thiodan técnico em água por 24 horas.

Provavelmente, o menor tamanho da espécie *B. rerio* contribua para uma maior toxidez do composto, pois geralmente organismos menores possuem maior superfície corporal em relação ao peso corpóreo ou maior taxa respiratória, comparativamente a indivíduos de maior tamanho, (MURTY, 1986). Esses parâmetros contribuem significativamente para o ingresso do agente tóxico no organismo. Por outro lado, diferentes padrões metabólicos entre as duas espécies em estudo podem resultar em diferenças na biodegradação dos isômeros ALFA e BETA para metabólitos de maior ou menor toxicidade. Tem sido constatado que a biotransformação de xenobióticos, associada ao conteúdo de citocromo P450 e indução do sistema microsomal hepático de monoxigenases, pode diferir consideravelmente entre as espécies levando, conseqüentemente, a diferentes padrões de toxicidade. Sabe-se que entre as diversas espécies de peixes, o conteúdo de citocromo P450 pode variar entre 0,009 a 0,69 nmol por mg de proteína microsomal (RAND & PETROCELLI, 1985).

Os dados de toxicidade aguda obtidos no presente estudo situam-se dentro dos padrões de susceptibilidade ao endosulfan apresentada por diversas espécies de teleósteos (Tabela 6). Considerando-se a baixa estabilidade do endosulfan na água, o teste de toxicidade aguda foi realizado durante um período de 24 horas, embora seja recomendado a duração de 96 horas para esse tipo de ensaio. Por este motivo, houve algumas limitações quanto à comparação com dados obtidos em outros estudos, já que os valores de CL50 diminuem com o tempo de exposição.

Os valores de CL50 - 24 horas determinados para *H. bifas-*

*ciatus* foram semelhantes aos calculados por RAO & MURTY (1980) em *Anabas testudineus* (CL50 - 24 horas = 2,8 ug/l). PAUL & RAUT (1987) ainda estudaram a toxicidade do endosulfan nas espécies *Hypophthalmichthys molitrix* (CL50 - 24 horas = 1,3 ug/l), *Labeo rohita* (CL50 -24 horas = 1,4 ug/l) e *Catla catla* (CL50=1,9ug/l), sendo que a susceptibilidade apresentada por essas espécies foi semelhante à de *B. rerio*.

Comparando-se ainda os valores de CL50 obtidos no presente estudo com dados da literatura especializada (Tabela 6), observa-se que tanto *H. bifasciatus* como *B. rerio* encontram-se entre as espécies mais susceptíveis a sofrer os efeitos agudos do endosulfan, embora em algumas poucas espécies como *Mystus vittatus* (VERMA et al. 1980) e *Rasbora heteromorpha* (ALABASTER, 1969) essa susceptibilidade seja bem maior.

Apesar de existir um número apreciável de trabalhos sobre a toxicidade aguda do endosulfan em peixes, poucos são os que levam em consideração a estabilidade do pesticida na água em que o teste é realizado, podendo, portanto, ter ocorrido uma superestimação dos resultados obtidos. Por exemplo, TRIM (1987) fez a renovação de soluções de endosulfan em intervalos de 24 horas quando realizava testes de toxicidade aguda em sistema semi-estático. Durante esse período foi constatada uma alteração de concentração do pesticida não maior que 15% da concentração inicial. No presente estudo, considerando-se a instabilidade do endosulfan nas condições dos ensaios que foram conduzidos, a renovação das soluções em intervalos de 24 horas, ao invés de 06 horas, corresponderia à diminuição da concentração de endosulfan em 50%. Teórica-

mente, isto teria levado a um valor de CL50 superior ao calculado. Observa-se portanto, que a concentração letal média pode variar muito segundo as condições experimentais em que o teste é realizado, de acordo com as características de estabilidade do pesticida na água utilizada no ensaio. Assim, por exemplo, RAO & MURTY (1982), estudando a toxicidade do endosulfan em um sistema de fluxo contínuo, determinaram uma CL50 - 96 h igual a 1,1 ug/l para o peixe *Heteropneustes fossilis*. Sob essas condições, a concentração do endosulfan na água se manteve praticamente constante durante todo o teste. Já em sistema estático, a CL50 - 96 h oscilou entre 7 e 14 ug/l para essa mesma espécie (SINGH & NARAIAN, 1982). A redução da toxicidade aguda em peixes expostos em sistema estático, comparativamente à exposição em sistema de fluxo contínuo, foi também constatada para compostos como pentaclorofenol, PCBs (bifenilaspolicloradas) e piretróides (MURTY, 1986).

Embora os resultados aqui apresentados sugiram que o endosulfan seja susceptível a sofrer rápida degradação na hidrosfera, aliada a uma rápida eliminação pela biota, a literatura demonstra que, dentre os inseticidas organoclorados, é o que apresenta maior toxicidade aguda para peixes. A CL50 - 24 h do endosulfan para *Saccobranhus fossilis*, por exemplo, é de 8,1 ug/l, enquanto que para heptacloro, clordano, aldrin, lindano e BHC é de 116; 560; 605; 667 e 3.020 ug/l respectivamente (VERMA et al., 1982). Segundo VERMA et al. (1984), o valor de CL50 - 96 h de endosulfan é de 2,5 ug/l no peixe *Cirrhina mrigala*. Nesta mesma espécie, valores de CL50 - 96 h iguais a 14; 16,8; 19,5 e 180 ug/l foram determinados para clordano, aldrin, lindano e BHC, respectivamen-

te.

Caracterizando a alta toxicidade de compostos organoclorados sobre as várias espécies de teleósteos, os valores de CL50 de endosulfan são geralmente inferiores aos dos inseticidas organofosforados e carbamatos. Dados da literatura indicam que o endosulfan é 45 vezes mais tóxico que o ethion para *Lebistes reticulatus* (PICKERING & HENDERSON, 1966); 460 vezes mais tóxico que carbofuran para *Mystus vittatus* (VERMA et al., 1980) e 2.280 vezes mais tóxico que o malathion para *Saccobranchnus fossilis* (VERMA et al., 1982).

#### IV.2.2. Efeitos Comportamentais

Os efeitos tóxicos sobre o comportamento das espécies de peixes estudadas começaram a se manifestar aproximadamente 2 horas após a exposição em concentrações mais altas, na seguinte sequência:

- agitação;
- nado descoordenado com aumento da frequência de movimentos operculares;
- procura da superfície em busca de oxigênio;
- morte com convulsões.

Os sintomas de intoxicação observados foram semelhantes aos relatados por outros autores que estudaram a toxicidade aguda do endosulfan em algumas espécies de teleósteos (JOSHI & REGE, 1980; NAQVI & HAWKINS, 1988). Efeitos comportamentais similares



também foram evidenciados na exposição de peixes a outros inseticidas organoclorados como DDT e BHC (JOSHI & REGE, 1980); endrin (MURTY, 1986); inseticidas piretróides (HAYA, 1989) organofosforados e carbamatos (NAQUI & HAWKINS, 1988).

A hiperatividade apresentada pelos peixes quando expostos ao inseticida endosulfan foi também observada por VAN DYK & GREEF (1977), que quantificaram os movimentos de *Saccobranchus mossambicus* na presença de concentrações letais do composto.

De um modo geral, o comportamento dos peixes expostos ao endosulfan apresenta padrões semelhantes aos relatados para mamíferos, pois em ambos animais a hiperatividade e convulsões são sintomas característicos de exposição ao agente tóxico. Sugere-se, portanto, que o mecanismo de ação tóxica relacionado aos efeitos sobre o sistema nervoso central se processe de maneira semelhante nessas duas espécies.

O mecanismo de ação tóxica do endosulfan, assim como de outros inseticidas organoclorados ciclodienos, ainda não está completamente elucidado; porém, sabe-se que estes compostos possuem a capacidade de interferir no acoplamento de alguns neurotransmissores em receptores específicos. Deste modo, a função bioquímica de mediadores de função neurotransmissora como o ácido gama-aminobutírico (GABA) (LAWRENCE & CASIDA, 1984), a serotonina (AGRAWAL et al., 1983) e acetilcolina (ANAND et al. 1986) é interrompida, provocando, conseqüentemente, alterações nos padrões fisiológicos normais do mecanismo de neurotransmissão.

Até o momento, os trabalhos que tentam explicar o mecanismo de ação tóxica do endosulfan em peixes referem-se, na sua

grande maioria, aos efeitos do pesticida sobre as ATPases. A função da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase é regular o transporte ativo de cations sódio e potássio através das membranas de neurônios, para estabelecer o potencial da membrana celular. YAP et al. (1975) e SHARMA (1988) constataram a inibição dessa enzima após a exposição de tecidos de peixes ao endosulfan. É provável que a hiperatividade e convulsões demonstradas pelos peixes expostos ao inseticida sejam consequência de alterações dos níveis intra e extracelulares de sódio e potássio, devido a essa inibição (SWARUP et al., 1981).

A diminuição do consumo de oxigênio (MANDHARAN & SUBBIAH, 1982) e sua relação com o aumento da frequência de movimentos operculares observados em ambas espécies poderiam ser explicados pela ação inibitória inseticida sobre a enzima  $\text{Mg}^{2+}$  ATPase (DALELA et al., 1978; SHARMA, 1988), pois esta participa nos processos de fosforilação oxidativa para produzir ATP na cadeia respiratória.

De acordo com a "Federal Water Pollution Control Administration (FWPCA)", os níveis de endosulfan na hidrosfera não devem exceder 0,05 ug/l. No Brasil, os níveis de tolerância do pesticida na água são regulamentados pela resolução nº 20 de 18 de junho de 1986 do Conselho Nacional do Meio Ambiente. Segundo esta resolução, a concentração máxima permissível do endosulfan na água varia entre 0,034 e 0,054 ug/l para águas destinadas à proteção das comunidades aquáticas. Observa-se, portanto, que os valores de  $\text{CL}_{50} - 24 \text{ h}$  de endosulfan determinados no presente estudo, e aqueles relatados pela literatura especializada, são su-

periores aos limites máximos permissíveis estabelecidos pela legislação vigente. Porém, é conveniente que sejam considerados possíveis riscos que o endosulfan possa representar a médio e longo prazo para as diferentes espécies aquáticas, pois, para algumas destas, os limites máximos de concentração permissíveis são próximos aos valores de CL50 determinados experimentalmente.

#### IV.3. Recuperação e Análise de Endosulfan em Tecidos

A metodologia utilizada nas fases de extração e purificação foi satisfatória quanto à recuperação do pesticida da matriz biológica (Tabela 13), estando dentro dos limites estabelecidos (80 - 120%) para análise de resíduos.

Tabela 13: Porcentagem de recuperação de endosulfan ALFA, BETA e sulfato de tecidos de peixes. <sup>(A)</sup>

endosulfan	recuperação (%)
ALFA	93,6 (10,3)
BETA	93,6 (11,3)
sulfato	95,1 (6,8)

<sup>(A)</sup> Cada valor representa a média (+/- desvio padrão) de 4 determinações (n=4).

A qualidade dos resultados obtidos nestes testes parece estar associada ao desempenho da mistura acetona - água como solvente extrator, embora LUKE et al. (1975) tenham obtido recuperações do pesticida superiores a 80% quando realizaram a extração

somente com acetona.

No presente estudo, a presença de água na mistura extratora foi a única modificação realizada com relação ao processo de extração e purificação líquido - líquido descrito por LUKE e colaboradores. Conforme os resultados obtidos, tal modificação não alterou a eficiência da acetona quanto ao seu poder extrator. Deve ser ressaltado ainda que, além de auxiliar a separação de extractivos hidrossolúveis, a presença de água na mistura extratora oferece vantagem de ordem econômica sobre a utilização de um solvente único ou de uma mistura de solventes orgânicos, diminuindo o custo da análise.

Os dados apresentados na Tabela 13 indicam valores de recuperação semelhantes, ou ainda superiores, aos relatados por NOVAK & AHMAD (1989) e MATTHIESSEN et al. (1982), que obtiveram porcentagens que variaram entre 62,5 e 91%, após fortificar amostras de peixes com ALFA, BETA e endosulfan sulfato. Esses autores utilizaram, respectivamente, misturas de DCM - hexano e acetona-hexano para extrair os resíduos do pesticida, sendo que MATTHIESSEN e colaboradores purificaram os compostos através da cromatografia em coluna de Florisil, tal como foi descrito no presente trabalho.

Durante a fase de purificação do pesticida, constatou-se que a ordem de eluição dos resíduos de endosulfan foi ALFA, BETA e sulfato. Esta característica, juntamente com os dados de tempo de retenção relativo à cromatografia gasosa de cada composto, sugerem a seguinte ordem de polaridade: sulfato > BETA > ALFA. Porém, tudo indica que tal polaridade não estaria associada à solu-

bilidade dos compostos na água, pois o isômero ALFA é bem mais solúvel que o isômero BETA. Sugere-se então que provavelmente fatores estereoquímicos relacionados a essas duas moléculas expliquem essas diferenças.

Apesar do método analítico aqui descrito ter sido recomendado por LUKE et al. (1975) como método multiresidual na análise de pesticidas organoclorados, organofosforados e organonitrogenados em amostras vegetais, alguns laboratórios nacionais o tem utilizado para determinar inseticidas organoclorados em tecidos animais.

#### IV.4. Estudos Toxicocinéticos

##### IV.4.1. Bioacumulação do Endosulfan em *B. rerio* e *H. bifasciatus*

As Tabelas 14 e 15 apresentam os resultados relativos ao acúmulo do endosulfan durante 21 dias de exposição, seguidos pela fase de depuração. Para melhor visualização dos dados, estes também são apresentados nas Figuras 8 e 9. Os dados demonstram que entre o 7º e o 21º dia de exposição houve uma estabilização no teor de endosulfan total (ALFA+BETA+sulfato) acumulado pelo peixe *B. rerio*, sugerindo que um estado de equilíbrio foi atingido. Este estado, caracterizado por um "plateau", foi também evidenciado em *Catostomus commersoni* e *Carassius auratus* após 12 horas (20 ug/l) e 5 dias (7 ug/l) de exposição ao endosulfan, respectiva-

mente (GOEBEL et al. 1982).

A presença do "plateau" não foi, porém, constatada para a espécie *H. bifasciatus*, que continuou concentrando o inseticida após os 7 dias de exposição.

Observa-se ainda que, no final da exposição, o acúmulo de endosulfan total (ALFA+BETA+sulfato) em *B. rerio* foi equivalente a cerca de 50% do acumulado por *H. bifasciatus*. Nesta última espécie, porém, a concentração do metabólito endosulfan sulfato foi marcadamente inferior à observada em *B. rerio*.

Com relação a outros trabalhos relativos ao acúmulo de endosulfan em peixes, verifica-se que para o 7º dia de acúmulo, o teor de endosulfan (ALFA+BETA+sulfato) em *Gambusia affinis*, exposto a 2 ug/l e em *Neosilurus sp.*, exposto a 0,7 ug/l (NOVAK & AHMAD, 1989) representou, respectivamente, cerca de 36 e 17% do valor acumulado por *B. rerio*. OESER et al. (1971) apud GOEBEL et al. (1982) observou que, após 5 dias de exposição a 1 ug/l do pesticida, a espécie *Carassius auratus* acumulou 0,35mg/kg, ou seja, aproximadamente o mesmo valor acumulado por *H. bifasciatus* e *B. rerio* no 3º dia de exposição.

Tabela 14: Resíduos de endosulfan em *B. rerio* expostos ao Thiodan técnico (0,4 - 0,2 ug/l) durante 21 dias, seguido da fase de eliminação.

tempo (dias)	Concentração de endosulfan (ug/g) (*)				
	ALFA	BETA	sulfato	total	
a c ú m u l o	03	0,183 (0,039)	0,099 (0,007)	0,110 (0,012)	0,392 (0,055)
	07	0,320 (0,087)	0,127 (0,016)	0,231 (0,018)	0,679 (0,117)
	14	0,476 (0,050)	0,164 (0,017)	0,256 (0,008)	0,897 (0,073)
	21	0,407 (0,084)	0,127 (0,023)	0,274 (0,026)	0,808 (0,116)
e tempo l (h)					
i m i n a ç ã o	24	0,221 (0,021)	0,098 (0,016)	0,198 (0,016)	0,518 (0,046)
	52	0,165 (0,020)	0,059 (0,009)	0,198 (0,007)	0,422 (0,033)
	79	0,159 (0,016)	0,074 (0,020)	0,175 (0,029)	0,409 (0,057)
	120	0,108 (0,012)	0,062 (0,009)	0,139 (0,036)	0,308 (0,039)

(\*) Cada valor representa a média (+/- desvio padrão) de 3 determinações (n=3).

Comparativamente ao acúmulo do pesticida em moluscos, o teor do pesticida em *H. bifasciatus* no 21º dia foi semelhante ao determinado por ROBERTS (1972) em *Hytilus edulis* expostos 0,1mg/l durante esse mesmo período. Isto indica um acúmulo bem mais lento nesse molusco, já que estes organismos foram expostos a concentrações aproximadamente 330 vezes maiores em relação à utilizada para *H. bifasciatus*.

Tabela 15: Resíduos de endosulfan em *H. bifasciatus* expostos ao Thiodan técnico (0,4 - 0,2 ug/l) durante 21 dias, seguido da fase de eliminação.

tempo (dias)	Concentração de endosulfan (ug/g) <sup>(A)</sup>				
	ALFA	BETA	sulfato	total	
a c ú m u l o	03	0,196 (0,050)	0,130 (0,034)	0,029 (0,003)	0,355 (0,087)
	07	0,565 (0,170)	0,280 (0,093)	0,060 (0,014)	0,905 (0,277)
	14	0,854 (0,310)	0,373 (0,102)	0,069 (0,019)	1,296 (0,424)
	21	1,131 (0,125)	0,516 (0,042)	0,055 (0,017)	1,702 (0,072)
e tempo l (h)					
i m i n a r o	24	0,783 (0,195)	0,299 (0,054)	0,025 (0,019)	1,107 (0,213)
	52	0,519 (0,343)	0,188 (0,105)	0,037 (0,0002)	0,744 (0,448)
	79	0,511 (0,144)	0,153 (0,010)	0,042 (0,020)	0,706 (0,174)
	120	0,237 (0,205) <sup>(B)</sup>	0,079 (0,067) <sup>(B)</sup>	N. D. <sup>(C)</sup>	0,316 (0,273) <sup>(B)</sup>

<sup>(A)</sup> Cada valor representa a média (+/- desvio padrão) de 3 determinações (n=3).

<sup>(B)</sup> n=5.

<sup>(C)</sup> não detectado

Os dados demonstram que durante o período de acúmulo a concentração de endosulfan sulfato, em relação à dos isômeros ALFA e BETA (sulfato / ALFA + BETA), foi consideravelmente maior em *B. rerio*. Para *H. bifasciatus* essa relação variou entre 0,033 a 0,089 durante o período de acúmulo e para *B. rerio*, a variação foi de 0,33 a 0,51, sendo que nesta espécie, o teor de endosulfan sulfato foi superior à do isômero BETA mas inferior ao do isômero ALFA.



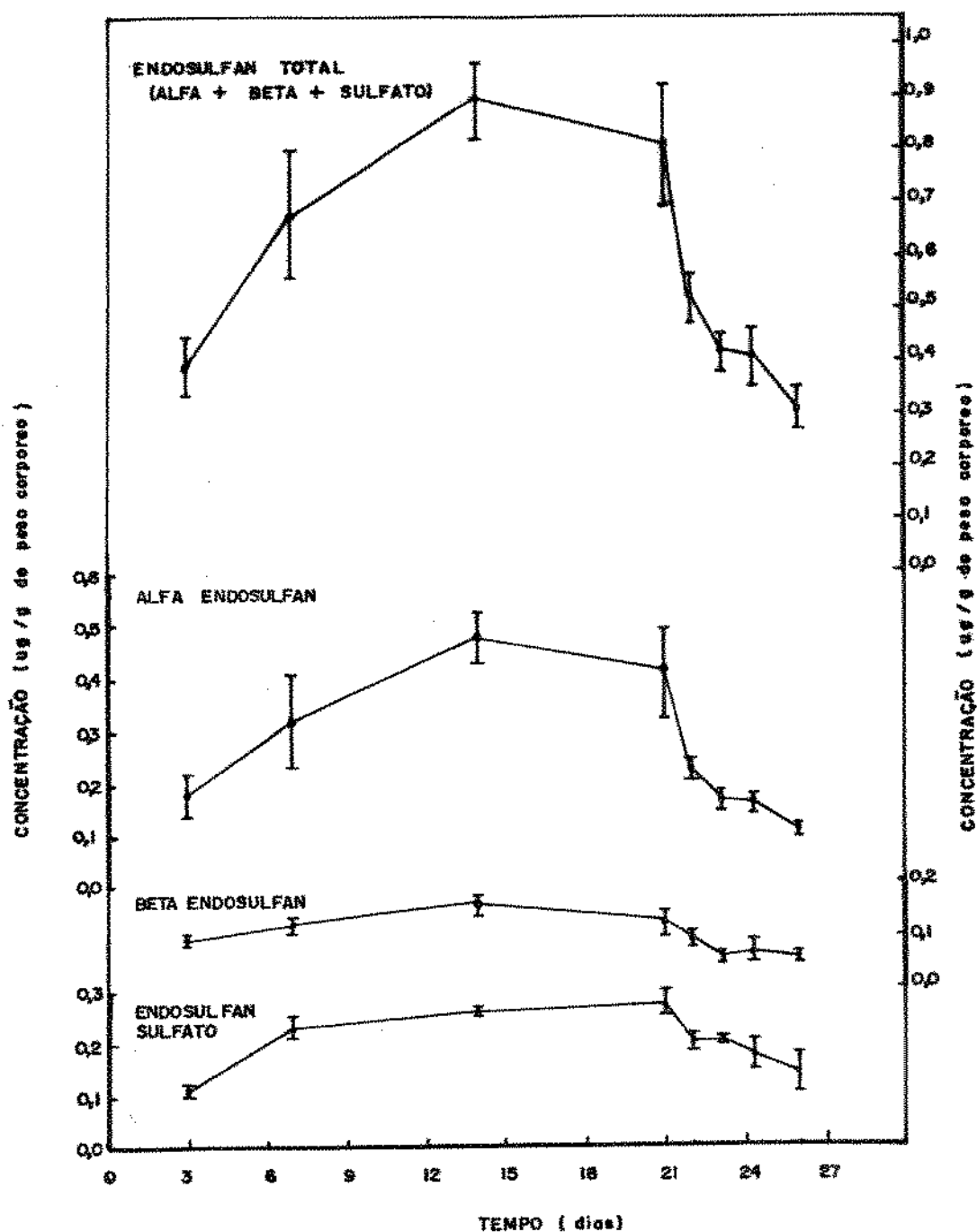


Figura 8: Resíduos de endosulfan em *B. rerio*. Concentração de exposição ao Thiodan técnico =  $0,4-0,2\mu\text{g/l}$  na água. Duração = 21 dias, seguido da fase de eliminação. Cada ponto representa a média de 3 determinações ( $n=3$ ).

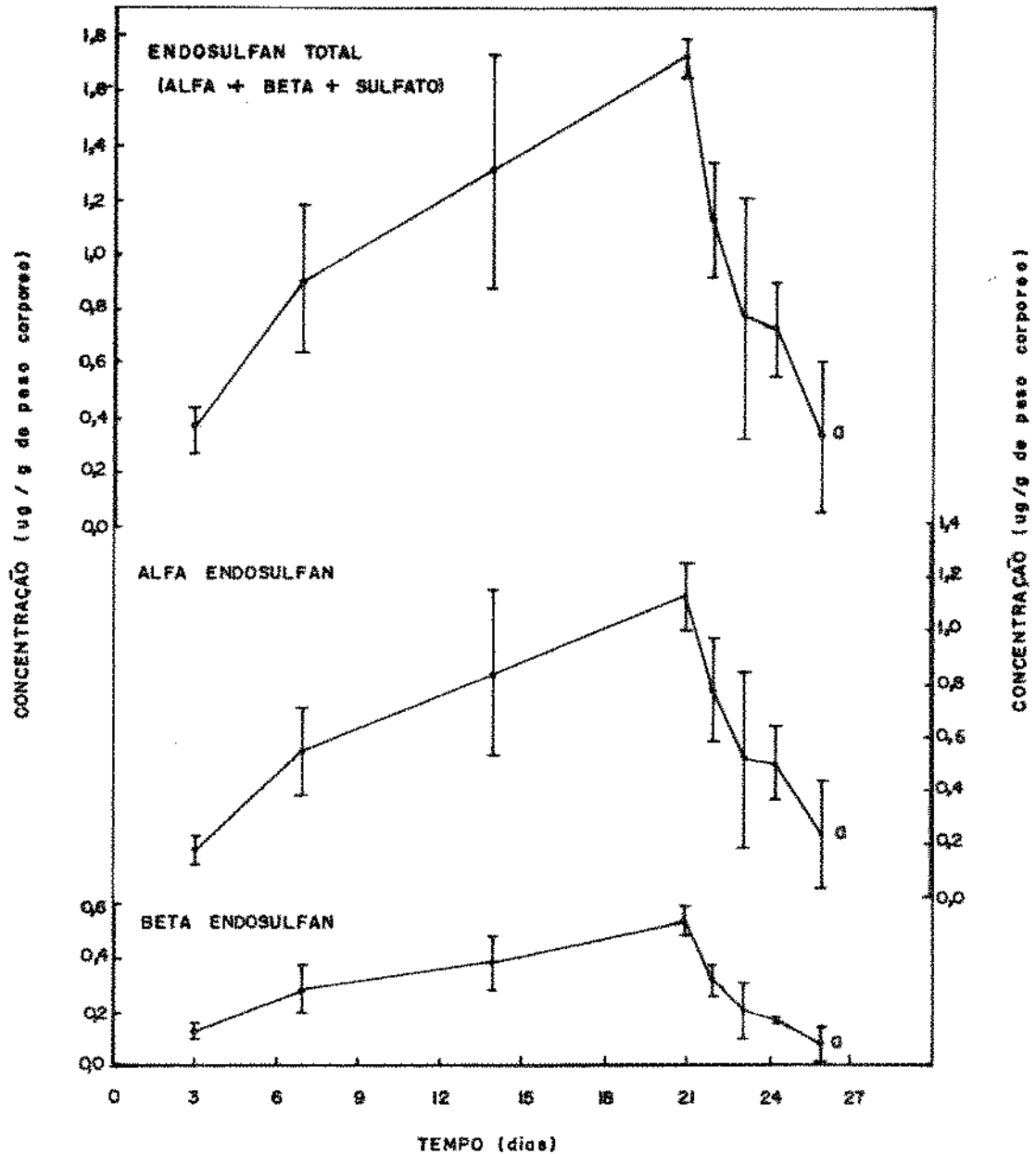


Figura 9: Resíduos de endosulfan em *H. bifasciatus*. Concentração de exposição ao Thiodan técnico=0,4-0,2 ug/l na água. Duração=21 dias, seguido da fase de depuração. Cada ponto representa a média de 3 determinações (n=3) a) n=5.

Diferenças na relação sulfato / ALFA + BETA entre as duas espécies claramente sugerem diferentes padrões de metabolismo do endosulfan. Estas diferenças também tem sido constatadas por alguns autores. Embora a presença de endosulfan sulfato tenha sido evidenciada no cérebro, brânquias, intestino, rins, fígado e músculo de alguns teleósteos (RAO & MURTY, 1980; RAO et al., 1980; RAO & MURTY, 1982), outros autores não constataram a presença deste metabólito em nenhum dos tecidos de *Channa punctata* (DEVI et al., 1981) e *Cirrhinus mrigala* (SWARUP et al., 1981).

Segundo NOVAK & AHMAD (1989), a maior parte do processo de biotransformação de ALFA e BETA endosulfan para endosulfan sulfato deve ocorrer no fígado, já que nesse órgão foram constatados valores mais altos na relação sulfato/ALFA+BETA. Embora o tecido hepático seja apontado como sítio principal de metabolização do pesticida (SWARUP et al. 1981; NOVAK & AHMAD, 1989) a ausência de endosulfan sulfato no fígado de *Labeo rohita* (RAO et al., 1980) e sua presença em outros órgãos indicam a capacidade de diversos tecidos em oxidar o endosulfan.

No 3º dia de acúmulo, a concentração de endosulfan sulfato em *B. rerio* foi semelhante à determinada para o isômero BETA; porém, um aumento de até 2,1 vezes de concentração do primeiro em relação ao segundo foi registrado no 21º dia de exposição ao inseticida. A concentração do isômero ALFA, por sua vez, manteve-se praticamente constante com relação à do metabólito oxidado. Estas observações parecem sugerir uma maior contribuição do endosulfan BETA para formar endosulfan sulfato em *B. rerio*, embora dados da literatura indiquem que tanto ALFA como BETA são susceptíveis a

se oxidar para endosulfan sulfato. Em mamíferos, experiências realizadas com endosulfan  $^{35}\text{S}$  demonstraram que o átomo de enxofre é mais facilmente retirado do isômero BETA que do ALFA, pois uma concentração maior de  $^{35}\text{S}$  proveniente de BETA foi detectada na urina de ratos (GOEBEL et al., 1982). Porém, estas observações discordam dos resultados obtidos por RAO & MURTY, (1980) que constataram uma maior velocidade de metabolização do isômero ALFA no fígado do peixe *Anabas testudineus*.

Nas Tabelas 16 e 17 são apresentados os resultados relativos aos fatores de bioconcentração (FBC), juntamente com os valores de meia-vida biológica ( $t_{1/2b}$ ) do endosulfan.

Tabela 16: Fatores de bioconcentração (FBC), tempos de meia-vida ( $t_{1/2b}$ ) e constantes de absorção ( $k_1$ ) e eliminação ( $k_2$ ) de endosulfan em *B. rerio*. <sup>(A)</sup>

endosulfan	concentração média na H <sub>2</sub> O (ug/l)	FBC	$t_{1/2b}$ (dias)	$k_1$ (dias <sup>-1</sup> )	$k_2$ (dias <sup>-1</sup> )
ALFA	0,2	2006(501) <sup>(B)</sup>	2,93 (0,36)	475 (119)	0,236 (0,029)
BETA	0,1	1398(699)	5,12 (1,41)	190 ( 94)	0,135 (0,037)
sulfato	---	-----	5,60 (0,99)	-----	0,123 (0,022)
Total <sup>(D)</sup>	0,3 <sup>(C)</sup>	2650(441)	4,04 (0,58)	455 ( 76)	0,172 (0,025)

<sup>(A)</sup> Valores calculados com base em dados da Tabela 14.

<sup>(B)</sup> Valores entre parênteses representam um desvio padrão.

<sup>(C)</sup> Concentração de ALFA+BETA (2:1)

<sup>(D)</sup> ALFA + BETA + sulfato

Tabela 17: Fatores de bioconcentração (FBC), tempos de meia-vida ( $t_{1/2b}$ ) e constantes de absorção ( $k_1$ ) e eliminação ( $k_2$ ) de endosulfan em *H. bifasciatus*. <sup>(A)</sup>

endosulfan	concentração média na H <sub>2</sub> O (ug/l)	FBC	$t_{1/2b}$ (dias)	$k_1$ (dias <sup>-1</sup> )	$k_2$ (dias <sup>-1</sup> )
ALFA	0,2	10994(2749) <sup>(B)</sup>	2,01 (0,44)	3787 ( 947)	0,344 (0,076)
BETA	0,1	9908(4954)	1,74 (0,30)	3938 (1969)	0,397 (0,067)
Total <sup>(D)</sup>	0,3 <sup>(C)</sup>	11583(2361)	1,81 (0,35)	4436 ( 904)	0,383 (0,075)

- <sup>(A)</sup> Valores calculados com base em dados da Tabela 15.  
<sup>(B)</sup> Valores entre parênteses representam um desvio padrão.  
<sup>(C)</sup> Concentração de ALFA+BETA (2:1)  
<sup>(D)</sup> ALFA + BETA + sulfato

Considerando-se que em *H. bifasciatus* tanto a concentração de endosulfan ALFA como de BETA continuou aumentando até o 21º dia de exposição, o FBC nessa espécie foi calculado pelo método proposto por OLIVER & NIIMI (1985). As Figuras 10, 11, e 12 apresentam as curvas relativas aos parâmetros de regressão utilizados para se obter estimativas dos valores de FBC no estado de equilíbrio, demonstrando lineariedade com significância a nível de 1% ( $P < 0,01$ ). A utilização desses parâmetros na avaliação do acúmulo de pesticida em organismos aquáticos tem sido relatada pela literatura especializada (OLIVER & NIIMI, 1985; NIIMI, 1987; SHAW & CONNELL, 1987). Para efeito de comparação, cabe ressaltar que, embora o FBC de ALFA e BETA endosulfan em *B. rerio* tenha sido calculado pela relação entre a concentração do pesticida no peixe no estado de equilíbrio e sua concentração na água (Tabela 16), valores muito próximos de FBC foram obtidos pelo uso dos

dois métodos. No primeiro caso, os valores de FBC determinados para ALFA e BETA endosulfan foram, respectivamente, 2006 +/- 501 e 1398 +/- 699 (Tabela 16), enquanto que, pelo método de OLIVER & NIIMI, esses valores foram de 3087 +/- 771 e 1265 +/- 632. Estas mesmas observações foram constatadas por OLIVER & NIIMI (1985), quando estudaram a bioconcentração de alguns compostos organohalogenados em *Salmo gairdneri*.

Os resultados das Tabelas 16 e 17 indicam que o FBC dos isômeros ALFA e BETA em *H. bifasciatus* foram, respectivamente, cerca de 5 a 7 vezes maiores que em *B. nerio*. Diferentes valores de FBC foram também observados para o inseticida diazinon, tendo KANAZAWA (1978) constatado um acúmulo do composto, na situação de equilíbrio, 9 e 30 vezes menor em *Lebiste reticulatus* e *Procambarus clarkii*, respectivamente, em relação a *Pseudorasbora parva*. VEITH et al., (1979) apud GIAM et al., (1980) determinaram os seguintes valores de FBC para hexaclorobenzeno em 3 espécies de teleosteos: 16.200 em *Pimephales promelas*, 21.900 em *Lepomis cyanellus* e 5.500 em *Salmo gairdneri*.

No presente trabalho, os resultados de FBC de endosulfan mostraram-se numericamente bem superiores aos relatados por GOEBEL et al. (1982) em *Catostomus commersoni* (FBC= 258-272) e em *Carrassius auratus* (FBC=314). Porém, deve ser ressaltado, que para o cálculo destes valores, GOEBEL não considerou o corpo dos organismos na sua total integridade, como feito no presente estudo.

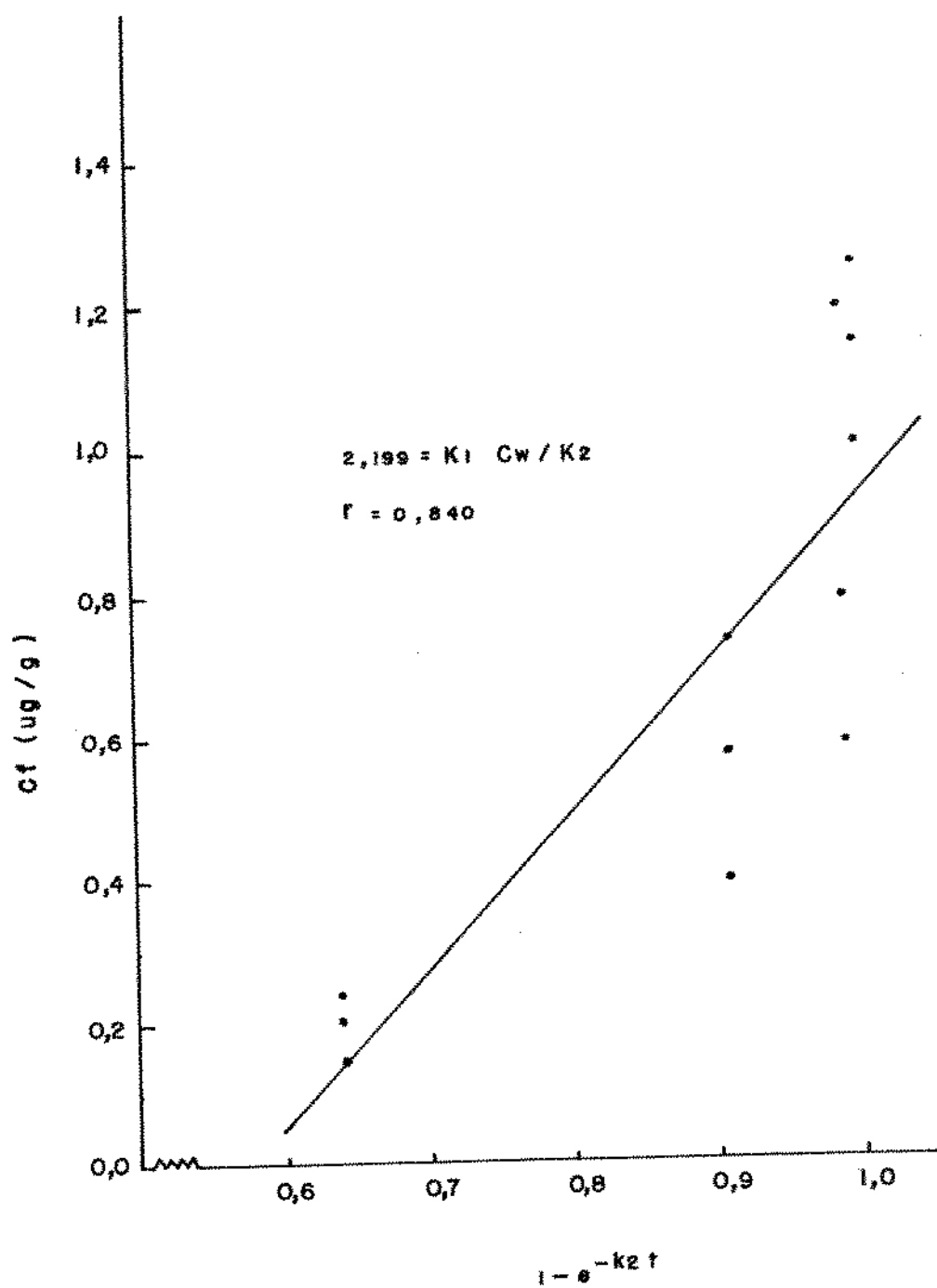


Figura 10: Relação entre as concentrações de ALFA endosulfan em *H. bifasciatus* e os valores de  $1 - e^{-k_2 t}$ .

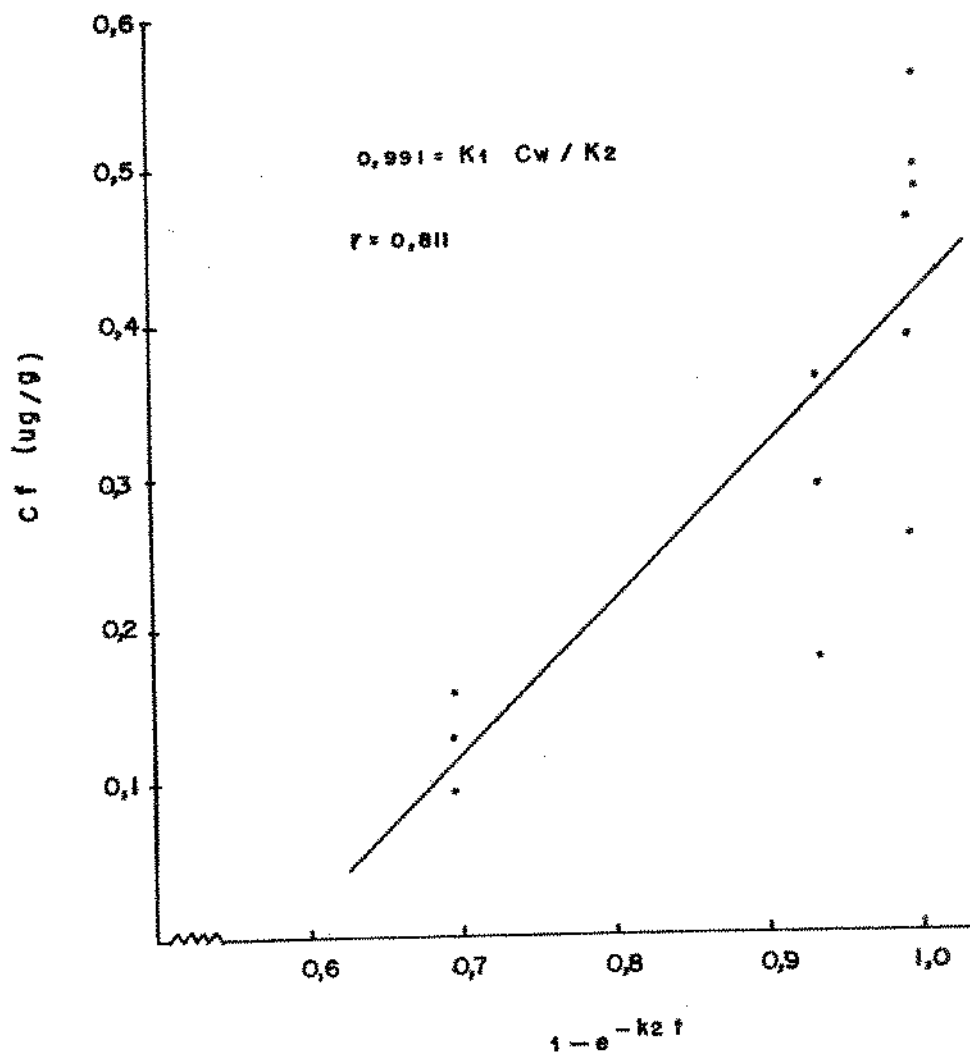


Figura 11: Relação entre as concentrações de BETA endosulfan em *H. bifasciatus* e os valores de  $1 - e^{-k_2 t}$ .



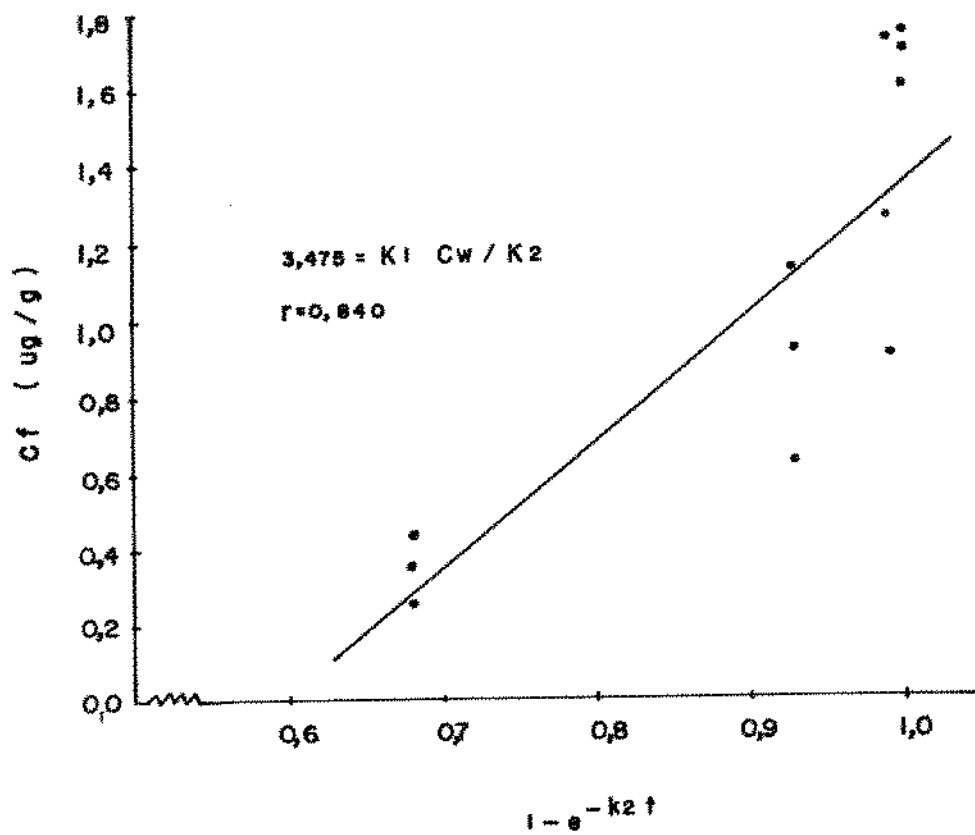


Figura 12: Relação entre as concentrações de endosulfan total (ALFA + BETA + sulfato) em *H. bifasciatus* e os valores de  $1 - e^{-k_2 t}$

Esses diferentes padrões de bioacumulação observados para um determinado xenobiótico são regidos por fatores bióticos característicos de cada espécie, incluindo distintas vias e capacidade de metabolização, diferenças nos processos de absorção e excreção, ou ainda características intrínsecas de cada espécie, tais como estado fisiológico, sexo e idade.

Segundo MATTHIESSEN et al. (1982), a quantidade de lipídeos nos tecidos parece ser o fator mais importante que governa o acúmulo de resíduos de endosulfan em peixes, sendo que espécies com maior porcentagem de gordura tendem a concentrar mais endosulfan no tecido adiposo, sofrendo os efeitos tóxicos agudos do pesticida em menor intensidade. Peixes com alto teor de gordura, como por exemplo *Narcosenius macrolepidotus* (49% de lipídeos), concentraram endosulfan em níveis mais elevados, porém, sobreviveram à ação letal do mesmo (MATTHIESSEN et al., 1982). O tecido adiposo, portanto, poderia atuar como um sítio de proteção aos efeitos tóxicos do inseticida, dificultando sua chegada aos órgãos alvo. As observações realizadas por MATTHIESSEN e colaboradores sugerem alguma relação com os resultados de bioacumulação e toxicidade aguda aqui apresentados, visto que estudos prévios demonstram diferentes teores de gordura para *B. rerio* e *H. bifasciatus* (3,5 e 6,2%, respectivamente).

A afinidade por lipídeos de um inseticida organoclorado ou de qualquer outro xenobiótico lipossolúvel pode ser associada ao seu coeficiente de partição octanol/água ( $K_{ow}$ ). No presente estudo, os valores de FBC calculados para endosulfan (ALFA+BETA) em *B. rerio* se aproximaram bastante dos calculados através de fórmu-

las que correlacionam o acúmulo de xenobióticos em peixes com o coeficiente de partição octanol/água, segundo as equações propostas por VEITH et al. (1979) apud SPACIE & HAMELINK, (1985) e por MACKAY, (1982). Assim por exemplo, utilizando-se a fórmula:  $\log BCF = 0,76 \log K_{ow} - 0,23$ , proposta por VEITH e colaboradores e, considerando-se o valor de 50.000 como coeficiente médio de partição octanol/água do endosulfan técnico (STUMPF & ABHAUR, 1986), o valor de FBC calculado é de 2194. Este é bastante próximo do valor de FBC (1803 +/- 389) de ALFA + BETA endosulfan determinado em *B. rerio*. Porém, constatou-se que para *H. bifasciatus* os valores calculados através dessas equações não correspondem aos obtidos experimentalmente. Deste modo, demonstra-se que a utilização desses procedimentos matemáticos deve ser restrita à comparação do potencial cumulativo de xenobióticos numa determinada espécie, já que os padrões de absorção, metabolismo e eliminação diferem entre os vários organismos.

Embora o peixe *B. rerio* seja recomendado por órgãos internacionais como organismo teste na avaliação de bioacumulação de xenobióticos, a falta de dados sobre o acúmulo de pesticidas nessa espécie, e também em *H. bifasciatus*, não permitiu fazer comparações quanto à toxicocinética do endosulfan em relação a outros pesticidas. Porém, a escolha da espécie *B. rerio* para a realização destes estudos de avaliação toxicológica fundamentou-se não só na recomendação por organismos internacionais, mas também na fácil disponibilidade, boa adaptação às condições laboratoriais e baixo custo desses organismos.

Muitos dos estudos toxicocinéticos de pesticidas organo-

clorados em outros organismos aquáticos não fazem referência quanto ao procedimento de cálculo do FBC, como por exemplo, se este foi ou não determinado nas condições de equilíbrio. Desta forma, tornou-se difícil a comparação dos dados de acúmulo obtidos no presente estudo com os de outros pesticidas, em diversas espécies de teleosteos. Porém, essas comparações puderam ser feitas em relação a dados sobre compostos organoclorados em concentrações próximas às empregadas neste trabalho; ou quando os FBCs foram calculados por modelos matemáticos bem estabelecidos. Para efeito de comparação, os fatores de bioconcentração de alguns compostos organoclorados, calculados sob diferentes condições de exposição, são representados na Tabela 18.

Tabela 18: Fatores de bioconcentração (FBC) de pesticidas organoclorados em peixes.

Composto	Espécie	FBC	Concentração (ug/l)	Referência
DDT	<i>N. crysoleucas</i>	100.000	0,3(15d)	MURTY (1986)
Heptacloro	<i>L. rhomboides</i>	3.800	0,3(4d)	MURTY (1986)
Endrin	<i>I. melas</i>	6.200	0,26(7d)	ANDERSON & DEFOE (1980)
Dieldrin	<i>I. punctatus</i>	2.884	0,013 <sup>(*)</sup>	SHANNON (1977b)
Kepone	<i>L. xanthurus</i>	2.593	0,4 <sup>(*)</sup>	BAHNER & OGLESBY (1979)
BHC	<i>F. similis</i>	375	0,04-0,38 <sup>(*)</sup>	GIAM et al. (1980)
Fotodieldrin	<i>C. auratus</i>	400-600	20 <sup>(*)</sup>	KHAN et al. (1975)
ALFA HCH	<i>P. reticulata</i>	706	1 <sup>(*)</sup>	YAMATO et al. (1983)
BETA HCH	<i>P. reticulata</i>	1.043	2 <sup>(*)</sup>	YAMATO et al. (1983)
GAMA HCH	<i>P. reticulata</i>	697	1 <sup>(*)</sup>	YAMATO et al. (1983)
DELTA HCH	<i>P. reticulata</i>	648	2 <sup>(*)</sup>	YAMATO et al. (1983)

<sup>(\*)</sup> Concentração relativa ao estado de equilíbrio.

Comparativamente aos dados apresentados na Tabela 18, ob-

serva-se que os valores de FBC de endosulfan total determinados no presente estudo para *H. bifasciatus* (11583 +/-2361) e *B. rerio* (2650 +/- 441) são da mesma ordem de grandeza de pesticidas organoclorados aos quais se atribuem propriedades acumulativas, como por exemplo, heptacloro, endrin, dieldrin e kepone. Porém, essas comparações não possibilitam afirmações conclusivas quanto ao potencial acumulativo do endosulfan com relação a outros pesticidas organoclorados. Todavia, os dados indicam que assim como muitos desses compostos, e apesar de ser considerado um produto de baixa persistência no meio ambiente, o inseticida endosulfan acumula-se em organismos aquáticos expostos continuamente a concentrações subletais do composto.

#### IV.4.2. Eliminação do Endosulfan em *B. rerio* e *H. bifasciatus*

As Figuras 8 e 9 demonstram que a transferência dos peixes para água livre do pesticida resultou na eliminação rápida dos isômeros ALFA e BETA, e do principal metabólito endosulfan sulfato. Aproximadamente de 60 a 80% do endosulfan total foram eliminados em 120 horas, sendo que a meia-vida calculada para os três compostos variou de 1,7 a 5,6 dias. (Tabelas 16 e 17). De um modo geral, tais resultados concordam com aqueles encontrados por OESER et al. (1971) apud GOEBEL et al. (1982) que, utilizando o peixe *Carassius auratus* como espécie experimental, determinaram uma meia-vida biológica de 2 a 3 dias para o endosulfan. Porém, os resultados diferem dos relatados por ROBERTS (1972) em *Mytilus*

*edulis*, visto que a concentração inicial de 8,1mg/kg neste molusco diminuiu aproximadamente 50% após 15 dias de manutenção desses animais em água livre do pesticida.

Os valores de  $t_{1/2b}$  encontrados no presente estudo correspondem aos relatados para mamíferos, sendo que nestes, o endosulfan é eliminado muito mais rapidamente que outros inseticidas organoclorados. STUMPF & ABHAUER (1986), por exemplo, relataram valores de  $t_{1/2b}$  de 1,2 a 7 dias para o endosulfan, em ratos. Segundo os mesmos autores, a meia-vida biológica do p-DDT em diversas espécies de mamíferos é de aproximadamente 1 ano.

Convém lembrar que a curta persistência de resíduos de endosulfan no meio ambiente e conseqüentemente em sistemas biológicos tem sido motivo da substituição de inseticidas organoclorados por esse composto (MATTHIESSEN et al., 1982).

O aspecto das curvas relativas à eliminação do pesticida demonstram que, se linearizadas, aproximam-se bastante de uma reta cujos parâmetros de regressão são significativos a nível de 1% de probabilidade ( $P < 0,01$ ). Portanto, considera-se que o processo de eliminação segue a cinética de degradação de primeira ordem, a qual estaria relacionada à presença de um compartimento único. Embora modelos bi ou multicompartimentais possam estar associados à depuração do endosulfan em ambas espécies estudadas, a literatura especializada (OECD, 1981, ROBERTS & FISHER, 1985; NIIMI, 1987) sugere o emprego do método descrito no presente estudo como um bom meio estimativo de meia-vida de xenobióticos em organismos aquáticos.

Durante a fase de depuração do pesticida em *H. bifascia-*

*tus*, assim como na acumulação, foram detectados níveis de endosulfan sulfato muito próximos ao limite de detecção do método (aproximadamente 20 pg), o que resultou em baixa correlação entre a concentração e o tempo. Essas observações impossibilitaram, portanto, o cálculo de parâmetros toxicocinéticos para esse metabólito na espécie selvagem.

Os valores de meia-vida biológica de resíduos de endosulfan em *H. bifasciatus* e *B. rerio*, juntamente com os relatados para outros peixes (OESER et al., 1971 apud GOEBEL et al. (1982); NIIMI, 1987) foram de um modo geral inferiores aos  $t_{1/2b}$  de outros pesticidas organoclorados em diversas espécies de teleósteos (Tabela 19).

Tabela 19: Meia-vida biológica de alguns pesticidas organoclorados em peixes (segundo NIIMI, 1987).

Composto	Espécie	t <sub>1/2b</sub> (dias)
Aldrin	<i>Salmo sp.</i>	7
Clordano	<i>Carassius auratus</i>	31
	<i>Cichlasoma sp.</i>	119
	<i>Moxostoma macrolepidotum</i>	60
DDT	<i>Carassius sp.</i>	41
	<i>Lepomis macrochirus</i>	38-64
Kepono	<i>Ictalurus punctatus</i>	9
Dieldrin	<i>Salmo gairdneri</i>	90
	<i>Carassius sp.</i>	6
	<i>Ictalurus punctatus</i>	10
Endrin	<i>Lepomis sp.</i>	28
Heptacloro	<i>Carassius auratus</i>	32
Lindano	<i>Salmo gairdneri</i>	11
	<i>Carassius sp.</i>	1
	<i>Poecilia reticulata</i>	4
Toxafeno	<i>Salmo sp.</i>	63
Hexaclorociclo- pentadieno	<i>Carassius auratus</i>	9
Metoxicloro	<i>Salmo sp.</i>	9
Mirex	<i>Salmo gairdneri</i>	> 495
	<i>Salmo salar</i>	144

Todavia, esses valores são semelhantes ou muito próximos aos t<sub>1/2b</sub> de outros inseticidas considerados de baixa persistência em sistemas biológicos, tais como os organofosforados fenitrothion (t<sub>1/2b</sub>=1,7 dias) (MC LEESE et al., 1979) e diazinon (t<sub>1/2b</sub> = < 1 dia) (NIIMI, 1987); os carbamatos aminocarb (t<sub>1/2b</sub> =



1 dia) e carbofuran ( $t_{1/2b} < 2$  dias) (NIIMI, 1987) e os piretróides fenvalerato ( $t_{1/2b} < 2$  dias) (BRADBURY & COATS, 1989) e permethrin ( $t_{1/2b} < 2$  dias) (NIIMI, 1987).

A diminuição dos níveis de endosulfan ALFA e BETA e sulfato observada em ambas espécies estudadas resulta da sua biotransformação em metabólitos de maior polaridade, assim como pela excreção do inseticida e seus metabólitos através da urina e fezes. Segundo NOVAK & AHMAD (1989) e SCHOETTGER (1970) apud RAO & MURTY (1982), o endosulfan álcool parece ser o produto final de metabolismo do endosulfan em peixes. Contudo, o endosulfan éter tem sido encontrado como principal produto de degradação nesses organismos, de acordo com RAO & MURTY (1980) e RAO et al. (1980). Outras possíveis vias pelas quais o endosulfan seria eliminado estariam relacionadas à formação de produtos de conjugação com glutathione (YADWAD, 1989), ácido glucurônico (GUPTA & GUPTA, 1979; MATTHIESSEN et al., 1982) e/ou sulfatos (STUMPF & ABHAUER, 1986). Da mesma forma que para endosulfan, tem sido constatada a conjugação desses dois últimos compostos com outros pesticidas organoclorados, como o pentaclorofenol (NIIMI & MC FADDEN, 1982). Embora a eliminação dos isômeros ALFA e BETA e de seu metabólito endosulfan sulfato se processe em peixes com uma velocidade relativamente alta, os dados toxicocinéticos aqui apresentados indicam que a exposição contínua a níveis subletais do agente tóxico na água constitui uma importante via de acumulação de endosulfan. Como constatado em ambas espécies estudadas, esse acúmulo pode atingir níveis tão elevados quanto os de outros inseticidas organoclorados (Tabela 18).

Assumindo-se que o peixe *H. bifasciatus*, no qual o FBC de endosulfan total determinado no presente estudo foi de 11583 +/- 2361, habite corpos de água cuja concentração do pesticida esteja no limite máximo permitido pela legislação, ou seja, 0,056 ug/l (BRASIL, 1986), a concentração do pesticida em seus tecidos seria, teoricamente, igual a 0,65 mg/kg (FBC = Cf/Cw). Assim neste caso, para que um indivíduo adulto (70 kg p.c.) ultrapasse a IDA recomendada para endosulfan (0,006 mg/kg p.c.), é necessário que o mesmo consuma diariamente uma quantidade superior a 650g deste peixe. Esta situação parece pouco provável, uma vez que de acordo com dados da O.M.S., o consumo médio de pescado em termos de porção comestível em diferentes países varia desde 3g até 90g/pessoa/dia, sendo que muito poucos indivíduos consomem mais de 500g por dia (VETTORAZZI, 1988).

#### IV.4.3. Acúmulo de Endosulfan em *H. bifasciatus* Através da Ingestão de Uma Dieta Contaminada

Embora não se tenham constatado sintomas evidentes de intoxicação durante a execução destes ensaios, registraram-se três mortes cuja causa foi desconhecida.

Os resultados relativos a este ensaio estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20: Resíduos de endosulfan em *H. bifasciatus* alimentado com ração NUTRAL básica contendo 8,87 ppm de endosulfan ALFA+BETA (2:1).

endosulfan	Concentração (ug/g) <sup>(*)</sup>	
	Tempo de exposição (dias)	
	95	181
ALFA	0,273 (0,030)	0,523 (0,163)
BETA	0,112 (0,025)	0,244 (0,052)
sulfato	0,505 (0,069)	0,772 (0,164)
Total	0,890 (0,121)	1,539 (0,368)

(\*) Cada valor representa a média (+/- desvio padrão) de 3 determinações (n=3).

Os peixes *H. bifasciatus*, expostos a concentrações subletais do agente tóxico através de uma ração contaminada, apresentaram um acúmulo contínuo durante o experimento, com resíduos totais de endosulfan iguais a 0,890 e 1,539 ug/g, referentes a 95 e 181 dias de exposição, respectivamente. Estes valores se assemelham numericamente aos de resíduos totais encontrados após o 7º e 21º dias de exposição através da água. Os dados da Tabela 20 indicam uma maior concentração de endosulfan ALFA, BETA e sulfato no 181º dia de exposição, sugerindo-se uma acumulação contínua do pesticida.

Nestes estudos, os resíduos de endosulfan sulfato apresentaram-se superiores aos determinados para ambas espécies depois de expostas ao pesticida através da água. O teor de endosulfan sulfato no final da exposição através da dieta foi respectivamente, 3 e 14 vezes maior que o acumulado em *B. rerio* e *H. bifasciatus* após o 21º dia de exposição através da água.

Os dados indicam ainda que, para 95 e 181 dias de exposição, tanto o isômero ALFA como o BETA atingiram concentrações inferiores às de endosulfan sulfato, pois a relação sulfato/ALFA+BETA variou de 1,0 - 1,3. A presença de elevados níveis de endosulfan sulfato nos peixes *H. bifasciatus* tratados com endosulfan através da dieta sugerem processos e/ou velocidades diversas de biotransformação associadas às diferentes vias de exposição. Provavelmente uma maior formação desse metabólito a nível gastrointestinal explicaria a elevada concentração do mesmo, pois tem sido constatada a capacidade da flora intestinal em biotransformar pesticidas organoclorados, como por exemplo o DDT (WEDEMAYER, 1968 apud MURTY, 1986; CHERRINGTON et al., 1969 apud MURTY, 1986).

Após 95 e 181 dias de exposição, os níveis residuais do inseticida representaram, aproximadamente, 10% do endosulfan total administrado. Essa porcentagem foi marcadamente inferior à calculada para o inseticida BHC em *Salmo gairdneri*. Nesta espécie, o BHC foi retido em aproximadamente 100% da quantidade administrada através da ingestão de uma dieta contendo 0,78ppm do pesticida durante um período de 57 dias (NIIMI & CHO, 1980). Comparativamente ao acúmulo de dieldrin em *Ictalurus punctatus*, os resíduos de endosulfan retidos em *H. bifasciatus* apresentaram-se também bastante inferiores. Neste estudo, o acúmulo de dieldrin no 28º dia de exposição a uma dieta contendo 2ppm do inseticida foi de 32 (para peixes de tamanho menor) e 74% (para peixes de tamanho maior) da quantidade total administrada durante esse período (SHANNON, 1977a). Segundo SKEA et al., (1981), o inseticida

mirex foi retido em 15% do total administrado ao peixe *Salvenilus fontanilis* através de uma ração contaminada durante 86 dias. De um modo geral, comparando-se os dados do presente estudo com aqueles obtidos por alguns autores que estudaram o acúmulo de pesticidas em peixes através da dieta, constata-se que o endosulfan, assim como outros inseticidas organoclorados, é passível de sofrer acumulação tanto através da água como através do alimento. A velocidade deste acúmulo, por sua vez, é dependente dos níveis do pesticida e da via de exposição, a qual estaria associada aos diferentes padrões metabólicos a que o xenobiótico está sujeito.

#### IV.5. Alterações Histopatológicas

Considerando-se informações disponíveis na literatura, os estudos histopatológicos se concentraram no fígado e brânquias, já que estes órgãos tem sido alvo freqüente dos efeitos tóxicos de pesticidas em peixes.

##### IV.5.1. Exposição Através da Água

As brânquias de ambas espécies expostas agudamente à ação do agente tóxico manifestaram congestão e acentuada hiperemia dos capilares das lamelas brânquiais, além de infiltrados inflamatórios nos mesmos. Em *H. bifasciatus*, foram ainda observadas áreas com destacamento do epitélio ao lado de lamelas normais e distúr-

bios arquiteturais com alargamento e aplainamento de lamelas ricas em infiltrado inflamatório mononuclear. Focos de necrose e formação de algumas "bolhas" no ápice das lamelas branquiais foram também observados naquela espécie. Alterações semelhantes foram observadas pela exposição de *Cyprinus carpio* ao metoxiclor, constatando-se separação do epitélio branquial e aparecimento de brotos apicais tipo "cauliflower - shaped ending" nas lamelas brânquiais secundárias (LAKOTA et al., 1978). Em *Pantius conchonus*, após exposição ao carbaryl, foram observadas lesões necróticas nas brânquias, juntamente com edema e descamação do epitélio lamelar (GILL et al., 1988).

No presente estudo, as brânquias de *H. bifasciatus* e *B. rerio* apresentaram os padrões descritos nos trabalhos realizados com endosulfan em outras espécies (DALELA et al., 1979), demonstrando que a asfixia parece ser a causa de óbito nos processos de intoxicação aguda, tal como comentam os autores.

Nas exposições subletais, as brânquias apresentaram basicamente as mesmas alterações anteriormente citadas verificando-se predominância de focos necróticos em *B. rerio*, os quais levaram ao desnudamento do eixo branquial em algumas observações. Aparentemente, a acentuada necrose em *B. rerio* não está correlacionada a um maior acúmulo do pesticida, pois para o 14º e 21º dia de exposição, o teor de endosulfan nessa espécie foi menor que em *H. bifasciatus*.

A hiperplasia de condrócitos correspondente ao tecido cartilaginoso foi um dos achados histopatológicos característicos nas estruturas branquiais de *H. bifasciatus* expostos a concentra-

ções subletais do agente tóxico.

Tanto *H. bifasciatus* como *B. rerio* expostos a concentrações agudas de endosulfan manifestaram no fígado necrose zonal e esteatose, sendo estas alterações mais características do tecido hepático. Estas alterações estiveram em alguns peixes acompanhadas por infiltrados inflamatórios com predominância de mononucleares.

Igualmente às exposições agudas, a esteatose microgoticular hepática foi a alteração histopatológica que caracterizou os efeitos tóxicos nos peixes após o 14º e 21º dia de exposição a concentrações subletais do pesticida. Porém, a incidência de focos de necrose para estas exposições foi muito baixa.

Os dados sugerem que a ocorrência da esteatose independe da quantidade de endosulfan presente nos tecidos.

Algumas mudanças histopatológicas no fígado e brânquias de peixes expostos ao pesticida através da água, assim como os padrões histológicos de normalidade, são apresentados nas Figuras 13, 14, 15 e 16.

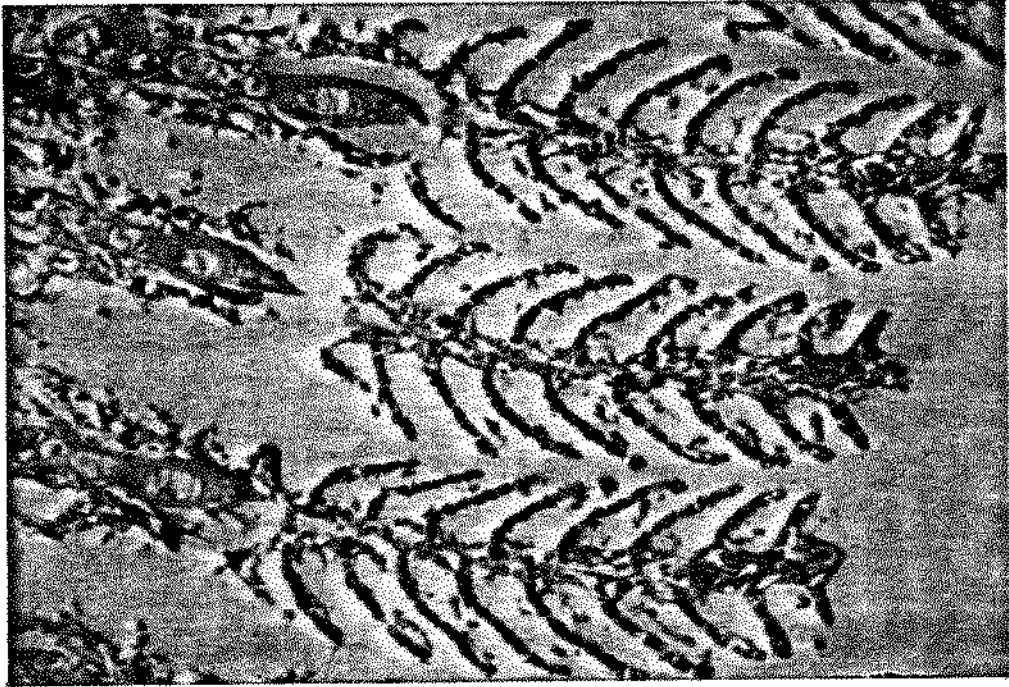


Figura 13: Aspecto histológico de brânquias apresentando padrão histológico normal (*H. bifasciatus*-MASSON, x 100).



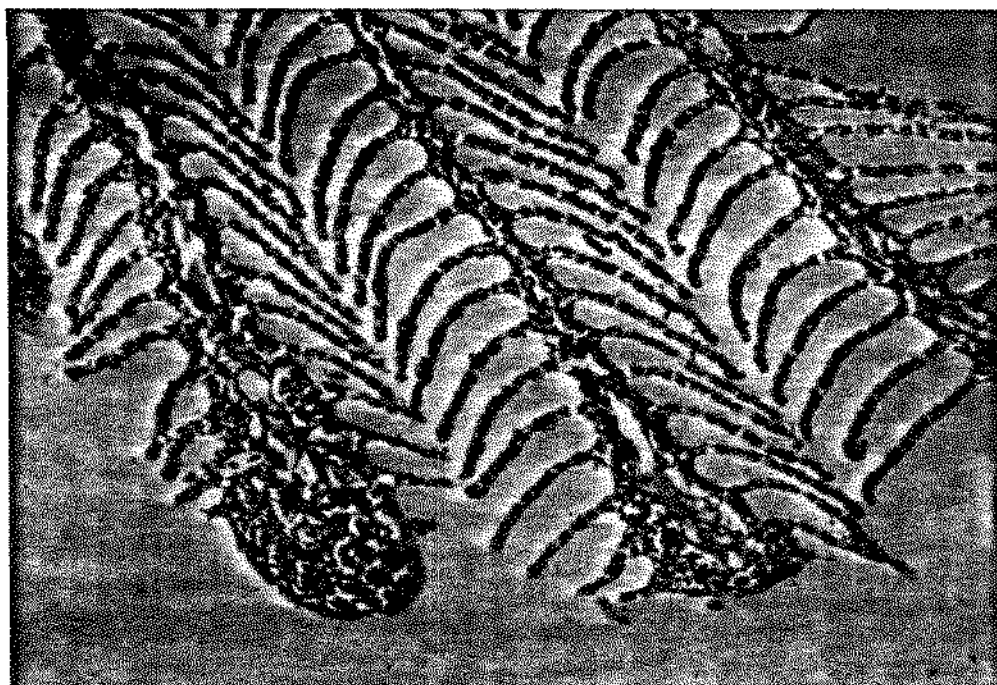


Figura 14: Aspecto histológico de brânquias apresentando denso infiltrado linfóide apical. (*H. bifasciatus* - H.E., x 100).



Figura 15: Corte histológico de tecido hepático sem alterações morfológicas consideráveis (*B. rerio* - H.E., x 200).

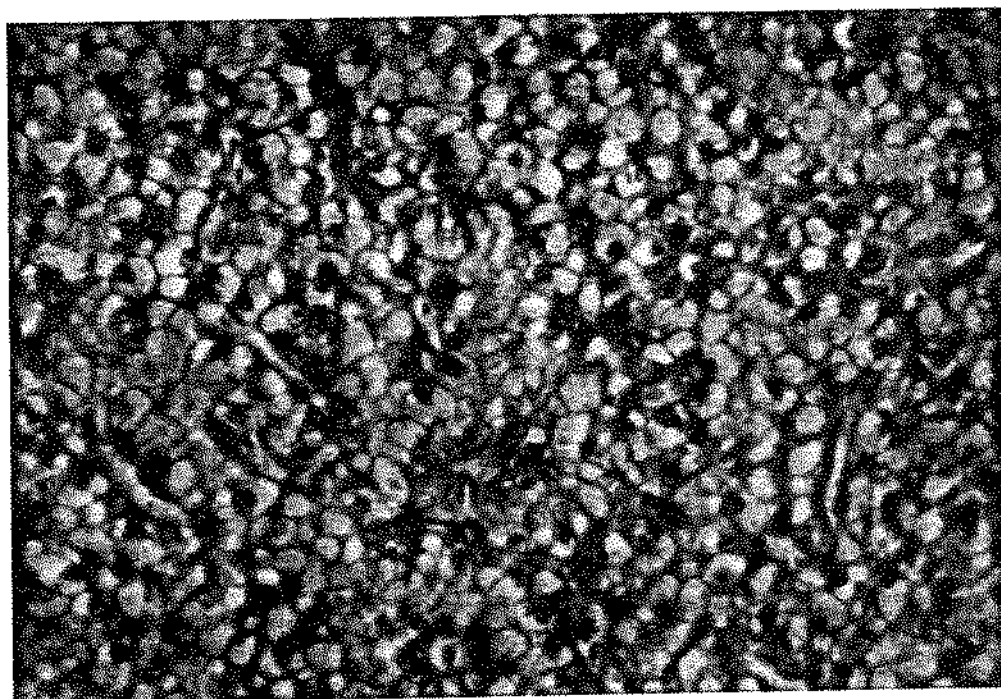


Figura 16: Aspecto histológico de fígado com numerosos hepatócitos repletos de vacúolos gordurosos, compondo quadro de esteatose micro e macrogoticular intensas (B. re-rio - H.E., x 200).

Alterações necróticas do tecido hepático foram também constatadas para outros inseticidas organoclorados em diversas espécies de teleósteos. Assim, por exemplo, a necrose do fígado foi constatada em *Ophiocephalus reticulatus* exposto ao dieldrin e lindano, em *Lebiste reticulatus* exposto ao DDT e em *Channa punctata* exposto ao endrin (KING, 1962; apud BUHLER, 1969; MATHUR, 1975; SASTRY & SHARMA, 1978). Focos inflamatórios no fígado, juntamente com necrose dos hepatócitos em *Salmo clarki* foram observados por ELLER (1971) depois de expor esses organismos ao endrin, tanto através da água como através da dieta.

Padrões semelhantes de alterações histopatológicas observados no fígado de *H. bifasciatus* e *B. rerio* foram constatados por MATTHIESSEN & ROBERTS (1982) na espécie *Clarias gariepinus* durante as aplicações do inseticida endosulfan em Botswana (África). Nestes últimos organismos, a esteatose microgoticular, caracterizada pelo acúmulo de lipídeo no hepatócito, foi também evidente. OWEN & ROSSO (1981) evidenciaram tal tipo de alteração em *Lepomis macrochirus* exposto a 0,1mg/l de pentaclorofenol durante 32 dias. Porém, essa alteração não tem sido relacionada à toxicidade de outros pesticidas organoclorados em peixes e não parece ter concordância com os resultados de MURTY & DEVI, (1982), que observaram uma diminuição do conteúdo lipídico hepático no peixe *Channa punctata* exposto ao endosulfan.

A degeneração lipídica observada no tecido hepático, caracterizada pela esteatose microgoticular, poderia ser associada à inibição da enzima  $Mg^{+2}$  ATPase pelo endosulfan (DALELA et al., 1978; SHARMA, 1988) pois sabe-se que qualquer lesão que prejudi-

que a respiração celular e conduza à diminuição de ATP resulta em uma menor utilização de ácidos graxos levando a um maior acúmulo lipídico intracelular (COTRAN et al., 1989).

#### IV.5.2. Exposição Através da Dieta

Com relação aos achados histológicos relacionados à exposição de *H. bifasciatus* através da ração contaminada, constatou-se que após 95 dias, estes organismos apresentaram um adensamento de tecido fibroso nos eixos brânquiais (Figura 17). Tais alterações sugerem que o pesticida exerceu seu efeito tóxico nas brânquias, seja através da água ou através da dieta. As mudanças estruturais nesses órgãos demonstram uma certa analogia com as que caracterizam o enfisema pulmonar em mamíferos expostos continuamente a agentes tóxicos através da via inalatória.

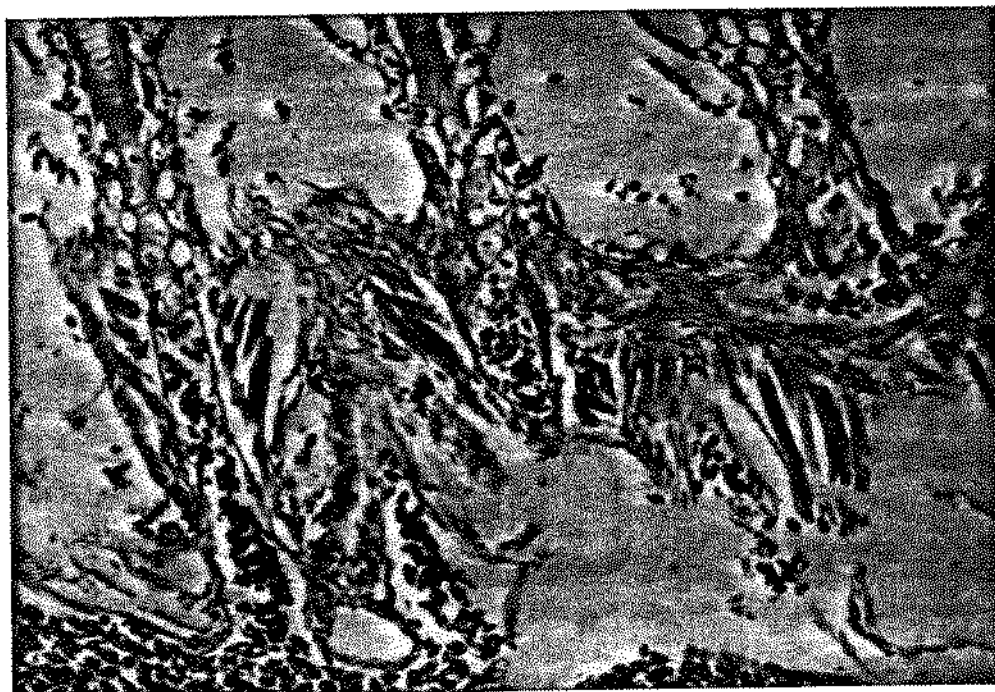


Figura 17: Aspecto histológico de estrutura branquial exibindo considerável fibrose hialina, bem como hipertrofia das fibras musculares (*H. bifasciatus* - MASSON, x 100).

Alterações semelhantes às de 95 dias de exposição, embora menos acentuadas, foram também verificadas nos peixes que ingeriram a mesma dieta durante 181 dias. Apesar da avaliação histopatológica ser qualitativa, poderíamos postular que tenham ocorrido fenômenos adaptativos, os quais explicariam a não constatação de lesões mais severas no final da exposição.

Após o 181º dia de alimentação, o fígado dos peixes apresentou, em alguns dos hepatócitos, alterações nucleares que poderiam corresponder à displasia - alteração pre-neoplásica - com discreta hipercoloração da cromatina, mais de um núcleo por célula e nucleólo mais exuberante que o habitual. Algumas dessas mudanças histopatológicas são apresentadas na Figura 18. Tais alterações, porém, não foram evidenciadas no tecido hepático de peixes alimentados com a ração contaminada durante 95 dias, sendo que o fígado apresentou aspecto próximo da normalidade. Essas constatações sugerem a ocorrência de um processo acumulativo progressivo do pesticida durante toda a exposição, podendo, portanto, ser correlacionado com os resultados de acúmulo através da dieta, descritos no item IV.4.3.. Células hepáticas binucleadas (ELLER, 1971) e núcleos picnóticos (OWEN & ROSSO, 1981) foram mudanças morfológicas nucleares também observadas por outros autores que expuseram peixes ao endrin e pentaclorofenol.

Em virtude da qualidade dos achados histológicos observados nas exposições através da dieta, a realização de estudos semelhantes utilizando-se um número maior de organismos durante um período mais longo, e ainda, acompanhados de análises citogenéticas de distribuição de DNA celular, seriam de grande interesse a

fim de se avaliar o potencial evolutivo de mudanças histopatológicas para alterações de caráter neoplásico.

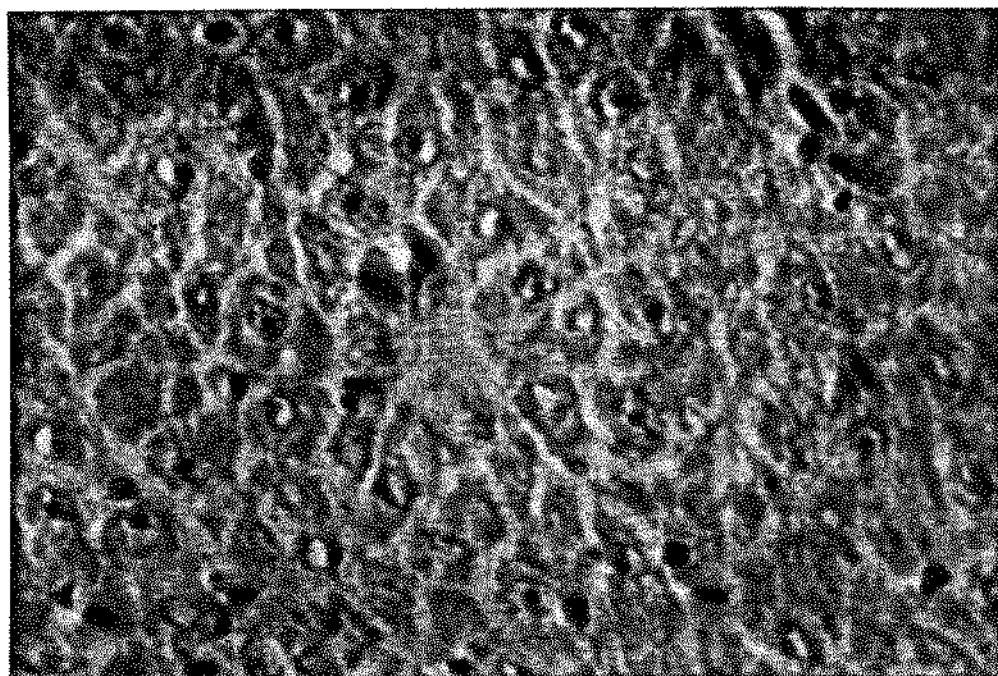


Figura 18: Detalhe microscópico de lóbulo hepático com aumento da relação núcleo: citoplasma e do cromatismo dos hepatócitos, eventualmente correspondendo a "displasia". O significado pré-neoplásico destas alterações só pode ser comprovado em estudos com acompanhamento mais longo (*H. bifasciatus* - H.E., x 400).



#### IV.5.3. Considerações Gerais Sobre os Resultados de Avaliação Histopatológica

De um modo geral, verifica-se que o endosulfan provocou alterações histopatológicas nas brânquias e fígado de ambas espécies estudadas. Nas exposições agudas, houve predominância de alterações sobre o epitélio branquial, sugerindo que a morte tenha ocorrido pela asfixia. Embora nessas exposições tenham surgido focos inflamatórios e necróticos no fígado, estes foram de menor importância que nas brânquias. Nas exposições crônicas, as alterações foram mais evidentes no fígado, onde o efeito acumulativo do pesticida implicaria em degeneração gordurosa e alterações do genoma observadas nos hepatócitos. Porém, mudanças estruturais do tecido branquial de peixes expostos a níveis subletais do pesticida por ambas vias de exposição foram também observadas. A qualidade dos achados histológicos decorrentes da exposição ao pesticida, tanto através da água, como através da dieta, sugere alterações que conduzem a desvios dos processos fisiológicos normais em ambas espécies estudadas. Assim, por exemplo, alterações histopatológicas nas brânquias refletem danos respiratórios que levam a sérias condições de hipoxia afetando o processo oxidativo, assim como complicações nos processos de ion-regulação. Por outro lado, manifestações citopatológicas no fígado claramente sugerem alterações do estado metabólico desse órgão, provocadas pelo efeito tóxico do endosulfan. Algumas dessas alterações foram estudadas por SINGH & SRIVASTAVA (1981); MURTY & DEVI (1982) E VERMA et al. (1983), sendo caracterizadas pela diminuição

do glicogênio hepático com conseqüente elevação da glicemia e diminuição do conteúdo de proteína no fígado.

Como pôde ser constatado em *H. bifasciatus* alimentado com a dieta contaminada, o tempo de exposição necessário para o aparecimento de lesões deve ser um fator determinante no que se refere ao surgimento de prévias alterações de carácter neoplásico. Estas indicam a necessidade de realização de futuros estudos a longo prazo sobre os efeitos histopatológicos do endosulfan em diversas espécies de organismos aquáticos.

Os achados histopatológicos observados em *H. bifasciatus* e *B. rerio* podem fornecer informações adicionais sobre os efeitos deletérios do inseticida endosulfan em organismos aquáticos, alertando assim quanto à moderação do seu uso em função das sérias conseqüências que poderiam ocasionar em organismos "não alvo" para este pesticida.

## V - CONCLUSÕES

Em vista dos resultados obtidos, conclui-se que:

01. Nas condições experimentais utilizadas no presente estudo, o endosulfan mostrou-se bastante instável na água, com meia-vida aproximada de 24 horas.
02. O endosulfan é altamente tóxico aos peixes *B. rerio* e *H. bifasciatus*, apresentando valores de CL50-24h inferiores a 3 ug/l. Os sintomas que caracterizam a intoxicação nestas espécies são semelhantes aos que ocorrem em mamíferos.
03. Apesar da rápida degradação do endosulfan na água, a exposição contínua a concentrações subletais deste pesticida resulta em acúmulo por ambas espécies estudadas.
04. O acúmulo de endosulfan em tecidos de peixes difere de espécie para espécie, sendo que para as mesmas condições de exposição, maiores concentrações do pesticida foram determinadas em *H. bifasciatus*.

05. Os valores de FBC de endosulfan em *D. rerio* e *H. bifasciatus* são da mesma ordem de grandeza dos relatados para outros pesticidas organoclorados em diferentes espécies de teleósteos.
06. O acúmulo de endosulfan sulfato difere em ambas espécies sugerindo que em *D. rerio* predominam os caminhos metabólicos que levam a formação deste composto.
07. O metabolismo e acúmulo de endosulfan em *H. bifasciatus* depende da via de exposição. Em exposições através da dieta, a formação e acúmulo de endosulfan sulfato é bem maior que em exposições através da água.
08. Assim como em mamíferos, a eliminação de endosulfan nas duas espécies de peixes é rápida quando cessa a exposição ao pesticida.
09. Exposições a concentrações letais e subletais do pesticida endosulfan provocam alterações histopatológicas no tecido branquial e hepático de peixes. As brânquias foram o sítio principal de efeitos tóxicos agudos, enquanto que no fígado predominaram mudanças características de exposições a médio e longo prazo. Algumas destas alterações sugerem a necessidade de estudos histopatológicos adicionais após exposições crônicas.

10. O peixe *H. bifasciatus* apresentou uma adaptação satisfatória a condições laboratoriais, possibilitando o seu emprego em estudos de toxicidade relativa de agentes tóxicos, assim como em estudos de toxicidade a curto e longo prazo.
  
11. A alta taxa de metabolismo e eliminação do endosulfan por sistemas biológicos assim como sua baixa persistência no meio ambiente, características que justificam sua permissão para uso na agricultura, foram comprovadas no presente estudo.

## VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, A. K. et al. Involvement of serotonergic receptors in endosulfan neurotoxicity. Biochem Pharmacol., 32 (23): 3591-3593, 1983.
- ALABASTER, J. S. Survival of fish in 164 herbicides, insecticides, fungicides, wetting agents and miscellaneous substances. Int. Pest. Control, 11: 29-35, 1969.
- ANAND, M. et al. Endosulfan and cholinergic (muscarinic) transmission: effect on electroencephalograms and [<sup>3</sup>H] quinuclidinyl benzilate in pigeon brain. Environ. Res., 40 (2): 421-426, 1986.
- ANDEF - Associação Nacional de Defensivos Agrícolas. Inseticidas em linha de comercialização, 1989.
- ANDERSON, R. L. & DE FOE, D. L. Toxicity and bioaccumulation of endrin and methoxychlor in aquatic invertebrates and fish. Environ. Pollut. (Series A), 22: 111-121, 1980.

ANSARI, R. A.; SIDDIQUI, M. K. & GUPTA, P. K. Toxicity of endosulfan: distribution of alpha and beta isomers of racemic endosulfan following oral administration in rats. Toxicol. Lett. , 21(1): 29-33, 1984.

ADAC - Association of the Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 14. ed., Arlington, ADAC Inc., 1984. proced 29.048.

APHA - American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. 14. ed. Washington, 1975. 1193p.

ARCHER, T. E.; NAZER, I. K. & CROSBY, D. G. Photodecomposition of endosulfan and related products in thin films by ultraviolet light irradiation. J. Agr. Food Chem. , 20 (5): 954-956, 1972.

ARCHER, T. E. Endosulfan residues on alfalfa hay exposed to drying by sunlight, ultraviolet light and air. Pest. Sci. , 4: 59-68, 1973.

BAHNER, L. H. & OGLESBY, J. L. Test of a model for predicting kepone accumulation in selected estuarine species. In: MARKING, L. L. & KIMERLE, R. A. Aquatic toxicology. ASTM SIP 667. American Society for Testing and Materials, 1979. p. 221-231.

BEYNON & ELGAR (1966) apud LUKE, M. A; FLOBERG, J. E. & MASUMOTO, H. T. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. J. Assoc. Off. Anal. Chemists, 58(5): 1020-1026, 1975.

BISHOP, W. E. & MAKI, A. W. A critical comparison of two bioconcentration test methods. In: EATON, J. G.; FARRISH, P. R. & HENDRICKS, A. C. Aquatic toxicology ASTM, STP 707. Philadelphia, American Society for Testing and Materials, 1980. p. 61-77.

BOYD, E. M. & DOBOS, I. Protein deficiency and tolerated oral doses of endosulfan. Arch. Int. Pharmacodyn., 178: 152-165, 1969.

BRADBURY, S. P. & COATS, J. R. Toxicokinetics and toxicodynamics of pirethroid insecticides in fish. Environ. Toxicol. Chem., B: 373-380, 1989.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 20, de 18 de Junho de 1986. Diário Oficial da União, Brasília, 30 Jul. 1986.



- BUIKEMA, A. L.; NIEDERLEHNER, B. R. & CAIRNS, J. Biological monitoring. Part IV - Toxicity testing. Water Res., 16: 239-262, 1982.
- BURKE, J. & MILLS, P. A. Microcoulometric gas chromatographic determination of Thiodan and Tedion in green vegetables. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists, 46(2): 177-182, 1963.
- CHAPMAN, D. V. Pesticides in the aquatic environment. NARC Report Number 32, London, Monitoring and Assessment Research Centre, 1987. 61p.
- CHERRINGTON et al. (1969) apud MURTY, A. S. Toxicity of pesticides to fish. Boca Raton, CRC Press, 1986. V.1, p.91.
- CHOI, W. W. & CHEN, K. Y. Association of chlorinated hydrocarbons with fine particles and humic substances in nearshore surficial sediments. Environ Sci. Technol., 10: 782-786, 1976.
- COCCHIERI, R. A. & ARNESE, A. Organochlorine pesticide residues in fish from southern italian rivers. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 40: 233-239, 1988.

- COTHAM, W. E. & BIDLEMAN, T. F. Degradation of malathion, endosulfan and fenvalerate in seawater and seawater / sediment microcosms. J. Agr. Food Chem., 37: 824-828, 1989.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V. & ROBBINS, S. L. Robbins pathologic basis of disease. 4th ed. Philadelphia, W. B. Saunders Co., 1989. 1519p.
- DALELA, R.C. et al. Adenosine triphosphatase activity in few tissues of a freshwater teleost, *Channa gachua*, following in vivo exposure to endosulfan. Toxicology, 11: 361-368, 1978.
- DALELA, R. C. et al. Histological damage of gills in *Channa gachua* after acute and subacute exposure to endosulfan and rogor. Mikroskopie (Wien), 35: 301-307, 1979.
- DEEMA, P.; THOMPSON, E. & WARE, G. W. Metabolism, storage and excretion of <sup>14</sup>C endosulfan in the mouse. J. Econ. Entomol., 59: 546-550, 1966.
- DEVI, A. P. et al. Relative toxicity of the technical grade material, isomers and formulations of endosulfan to the fish *Channa punctata*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 22: 239-243, 1981.

- DEVILLERS, J. & CHAMBON, P. Evaluation of health risks related to consumption of accidentally polluted drinking water. Gas, Wasser, Abwasser, 66 (1): 1-5, 1986.
- DIKSHITH, T. S. S. & DATTA, K. K. Endosulfan: Lack of cytogenetic effects in male rats. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 20: 826-833, 1978.
- DOROUGH, H. W. et al. Fate of endosulfan in rats and toxicological considerations of apolar metabolites. Pest. Biochem. Physiol., 8: 241-252, 1978.
- DZWONKOWSKA, A. & HUBNER, H. Induction of chromosomal aberrations in the Syrian hamster by insecticides tested in vivo. Arch. Toxicol., 58(3): 152-156, 1986.
- EICHELBERGER, J. W. & LICHTENBERG, J. J. Persistence of pesticides in river water. Environ. Sci. Technol., 5: 541-544, 1971.
- ELLER, L. L. Histopathological lesions in cutthroat trout (*Salmo clarki*) exposed chronically to the insecticide endrin. Am. J. Pathol., 64: 321-326, 1971.
- ELZNER (1973) apud GOEBEL, H. et al. Properties, effects, residues and analytics of the insecticide endosulfan. Residue Rev., 83: 1-174, 1982.

FAO. Pesticide residue in food - 1989. Roma, FAO, 1989.  
84p. (FAO Plant Production and Protection Paper, 99)

FAO / WHO (1968) apud WHO. Endosulfan - Environmental Health  
Criteria 40. Geneva, World Health Organization, 1984.  
62p.

GETMAN, F. H. & DANIELS, F. Tratado moderno de físico -  
química. N. York, John Wiley and Sons, Inc, 1947. 697p.

GIAM, C. S. et al. Bioaccumulation of hexachlorobenzene in  
killifish (*Fundulus similis*). Bull. Environ. Contam.  
Toxicol., 25: 891-897, 1980.

GILL, T. S.; PANT, J. C. & PANT, J. Gill, liver, and kidney  
lesions associated with experimental exposures to carbaryl  
and dimethoate in the fish (*Puntius conchonius* Ham). Bull.  
Environ. Contam. Toxicol., 41 : 71-78, 1988.

GOEBEL, H. et al. Properties, effects, residues and analytics  
of the insecticide endosulfan. Residue Rev., 83 : 1-174,  
1982.

GOPAL, K. et al. The acute toxicity of endosulfan to  
fresh-water organisms. Toxicol. Lett., 2 : 453-456, 1981.

GORBACH, S. G. et al. Metabolism of endosulfan in milk sheep.

J. Agr. Food Chem., 16 : 950-953, 1968.

GORBACH, S. et al. Residue analyses in the water system of

East-Java (River Brantas, ponds, sea water) after continued large-scale application of Thiodan in rice.

Bull. Environ. Contam. Toxicol., 6 : 40-47, 1971.

GREVE, P. A. & WIT, S. L. Endosulfan in the Rhine River. J.

Water Pollut. Control Fed., 43 : 2338-2348, 1971.

GUPTA, P. K. Endosulfan induced neurotoxicity in rats and

mice. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 15 : 708-713, 1976.

GUPTA, P. K. Distribution of endosulfan in plasma and brain

after repeated oral administration to rats. Toxicology,

2 : 371-377, 1978.

GUPTA, P. K. & EHRNEBO, M. Pharmacokinetics of alpha and beta

isomers of racemic endosulfan following intravenous administration in rabbits. Drug Metab. Disp., 2 : 7-10,

1979.

GUPTA, P. K. & GUPTA, R. C. Pharmacology, toxicology and

degradation of endosulfan. A review. Toxicology, 13 :

115-130., 1979.

- HAWKER, D. W. & CONNELL, D. W. Bioconcentration of lipophilic compounds by some aquatic organisms. Ecotoxicol. Environ. Saf., 11 : 184-197, 1986.
- HAYA, K. Toxicity of pyrethroid insecticides to fish. Environ. Toxicol. Chem., 8 : 381-391, 1989.
- HENDERSON & PICKERING (1963). apud MURTY, A. S. Toxicity of pesticide to fish. Boca Raton, CRC Press Inc., 1986. Vol. 1, p. 120.
- HOLDEN, A. V. The effects of pesticides on life in fresh waters. Proc. R. Soc. Lond. B., 180, 383-394, 1972.
- HOOK, J. B. Toxic responses of kidney. In: DOULL, J.; KLAASEN, C. B. & AMDUR, M. O. Cassarett and Doull's toxicology - The basic science of poisons. 2 ed., N. York, Mac Millan Publishing C. O., 1980. p. 232-245.
- INNES, et al. (1969) apud GOEBEL, H. et al. Properties, effects, residues and analytics of the insecticide endosulfan. Residue Rev., 83 : 1-174, 1982.
- JOHNSON, L. Separation of dieldrin and endrin from other chlorinated pesticide residues. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists, 45 (2) : 363-365, 1962.

JOSHI, A. G. & REGE, M. S. Acute toxicity of some pesticides and a few inorganic salts to the mosquito fish *Gambusia affinis* (Baird and Girard). Indian J. Exp. Biol., **18** : 435-437, 1980.

KANAZAWA, J. Uptake and excretion of organophosphorus and carbamate insecticides by fresh water fish, motusugo, *Pseudorasbora parva*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., **14** (3) : 346-352, 1975.

KANAZAWA, J. Bioconcentration ratio of diazinon by fresh water fish and snail. Bull. Environ. Contam. Toxicol., **20** : 613-617, 1978.

KANAZAWA, J. Measurement of the bioconcentration factors of pesticides by freshwater fish and their correlation with physicochemical properties or acute toxicities. Est. Sci., **12** : 417-424, 1981.

KEIL et al (1972) apud GOEBEL, H. et al. Properties, effects residues and analytics of the insecticide endosulfan. Residue Rev., **83** : 1-174, 1982.

KHAN, H. M.; NEUDORF, S. & KHAN, M. A. Q. Absorption and elimination of photodieldrin by daphnia and gold fish. Bull. Environ. Contam. Toxicol., **13** (5) : 582-587, 1975.

- KHANNA, R. N. et al. Distribution of endosulfan in cat brain. Bull. Environ. Contam. Toxicol., **22** : 72-79, 1979.
- KHUDOLEY, V. Use of aquarium fish, *Danio rerio* and *Faecilia reticulata*, as test species for evaluation of nitrosamine carcinogenicity. Natl. Cancer Inst. Monograph, **65** : 65-70, 1984.
- KING (1962) apud BUHLER, D. R.; RASMUSSEN, M. E. & SHANKS, W. E. Chronic oral DDT toxicity in juvenile coho and chinook salmon. Toxicol. Appl. Pharmacol., **14** : 535-555, 1969.
- KNAUF, W. & SCHULZE, E. F. New findings on the toxicity of endosulfan and its metabolites to aquatic organisms. Meded. Fac. Lanbouwwet. Rijksuniv. Gent., **38** : 717-732, 1973.
- KOEMAN, J. H. Chemicals in the environment and their effects on ecosystems. In: GEISSBUHLER, H. Advance in pesticide science. Oxford, Pergamon Press, 1979, p. 29-31.
- KRAYBILL, H. F. Distribution of chemical carcinogens in aquatic environments. Progress Exp. Tumor Res., **20** : 3-34, 1976.



- KULSHRESTHA, S. K. & ARORA, N. Impairments induced by sublethal doses of two pesticides in the ovaries of a freshwater teleost *Channa striatus* Bloch. Toxicol. Lett., 20 (1) : 93-98, 1984.
- LAKOTA et al. The effect of methoxychlor and propoxur on the health of carp fry (*Cyprinus carpio* L.). Acta Hydrobiol., 20 (3) : 197-205, 1978.
- LARINI, L. Toxicologia. São Paulo, Editora Manole Ltda., 1987, 315p.
- LAWRENCE, L. & CASIDA, J. E. Interactions of lindane, toxaphene and cyclodienes with brain specific t-butylbicyclophosphorothionate receptor. Life Sci., 35 (2) : 171-178, 1984.
- LEE, H. B. et al. Organochlorine pesticides. In: CHAU, A. S. & AFGHAN, B. K. Analysis of pesticides in water. Boca Raton, CRC Press, 1982. V. 2, p. 1-60.
- LIMA, F. K. de & RACCA, F. F. Dicionário de pragas e praguicidas. Aspectos legais, toxicológicos e recomendações técnicas. R. de Janeiro, Edição dos Autores, 1987, 122p.

- LINDQUIST, D. A. & DAHM, P. A. Some chemical and biological experiments with Thiodan. J. Econ. Entomol., 50 : 483-486, 1957.
- LUKE, M. A.; FROBERG, J. E. & MASUMOTO, H. T. Extraction and clean-up of organochlorine, organophosphate, organonitrogen and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists, 58 (5) : 1020-1026, 1975.
- MACEK et al (1969) apud GOEBEL, H. et al. Properties, effects, residues and analytics of the insecticide endosulfan. Residue Rev., 83 : 1-174, 1982.
- MACKAY, D. Correlation of bioconcentration factors. Environ. Sci. Technol., 16 : 274-278, 1982.
- MAITLEN, J. C.; WALKER, K. C. & WESTLAKE, W. E. An improved colorimetric method for determining endosulfan (Thiodan) residues in vegetables and beef fat. J. Agr. Food Chem., 11 : 416-418, 1963.
- MAKI, A. W. & BISHOP, W. E. Chemical safety evaluation. In: RAND, G. M. & PETROCELLI, S. R. Fundamentals of aquatic toxicology. N. York, Hemisphere Publishing Corporation, 1985. p. 619-635.

- MANOHARAN, T. & SUBBIAH, G. Toxic and sublethal effects of endosulfan on *Barbus stigma* (Pisces: Cyprinidae). Proc. Indian Acad. Sci. (Anim. Sci.), 94 (6) : 523-532, 1982.
- MATHUR, D. Histopathological changes in the liver of fishes resulting from exposure to dieldrin and lindane. Toxicol., 13 : 109-110, 1975.
- MATSUMARA, F. Toxicology of insecticides. New York, Plenum Press, 1980. 503p.
- MATTHIESSEN, P. & LOGAM, J. W. M. Low concentration effects of endosulfan insecticide on reproductive behavior in the tropical cichlid fish *Sarotherodon mossambicus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 33 (5) : 575-583, 1984.
- MATTHIESSEN, P. & ROBERTS, R. J. Histopathological changes in the liver and brain of fish exposed to endosulfan insecticide during tsetse fly control operations in Botswana. J. Fish Dis., 5 : 153-159, 1982.
- MATTHIESSEN, P. et al. Accumulation of endosulfan residues in fish and their predators after aerial spraying for the control of tsetse fly in Botswana. Pest. Sci., 12 : 39-48, 1982.

- MC LEESE, D. W. & METCALFE, C. D. Toxicities of eight organochlorine compounds in sediment and seawater to *Crangon septemspinosa*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 25 : 921-928, 1980.
- MC LEESE, D. W.; ZITKO, V. & SERGEANT, D. B. Uptake and excretion of fenitrothion by clams and mussels. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 22 : 800-806, 1979.
- MEYERS, T. R. & HENDRICKS, J.D. Histopathology. In: RAND, G. M. & PETROCELLI, S. R. Fundamentals of aquatic toxicology. N. York, Hemisphere Publishing Corporation, 1985. p. 283-331.
- MILES, J. R. W. & MOY, P. Degradation of endosulfan and its metabolites by a mixed culture of soil microorganisms. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 23: 13-19, 1979.
- MILLS, P. A.; DNLEY, J. H. & GAITHER, R. A. Rapid method for chlorinated pesticide residues in nonfatty foods. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists, 46 (2) : 186-191, 1963.
- MITCHELL, L. C. Separation and identification of chlorinated organic pesticides by paper chromatography. XI. A study of 114 chemicals: technical grades produced in 1957 and reference standards. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists, 41 (4) : 781-816, 1958.

MITCHELL, L. R. Collaborative study of the determination of endosulfan, endosulfan sulfate, tetrasul and tetradifon residues in fresh fruits and vegetables. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists, 52(1): 209-212, 1976.

MOATS, W. A. One step chromatographic clean-up of chlorinated hydrocarbon pesticide residues in butter fat. II. Chromatography on Florisil. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists, 46(2): 172-176, 1963.

MODDES & COOK (1959) apud LUKE, M. A.; FROBERG, J. E. & MASUMOTO, H. T. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists, 58(5): 1020-1026, 1975.

MURTY, A. S. Toxicity of pesticides to fish. Boca Raton, CRC Press Inc., 1986. 2V.

MURTY, A. S. & DEVI, A. P. The effect of endosulfan and its isomers on tissue protein, glycogen and lipids in the fish *Channa punctata*. Pestic. Biochem. Physiol., 12: 280-286, 1982.

- NAQVI, S. M. & HAWKINS, R. Toxicity of selected insecticides (Thiodan, Security, Spartan and Sevin) to mosquitofish, *Gambusia affinis*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 40: 779-784, 1988.
- NEELY, W. B.; BRANSON, D. R. & BLAU, G. E. Partition coefficient to measure bioconcentration potential of organic chemicals in fish. Environ. Sci. Technol., 8(13): 1113-1115, 1974.
- NICHOLAS, M. L. et al. Reference Raman spectra of DDT and five structurally related pesticides and of five pesticides containing the norbornene group. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists, 59(1): 197-208, 1976.
- NIIMI, A. J. Biological half-lives of chemicals in fishes. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 99: 1-46, 1987.
- NIIMI, A. J. & CHO, C.Y. Uptake of hexachlorobenzene (HCB) from feed by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 24: 834-839, 1980.
- NIIMI, A. J. & MC FADDEN, C. A. Uptake of sodium pentachlorophenate (NaPCP) from water by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to concentrations in the ng/L range. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 28: 11-19, 1982.

- NIMMO, D. R. Pesticides. In: RAND, G. M. & PETROCELLI, S. R. Fundamentals of aquatic toxicology. N. York, Hemisphere Publishing Corporation, 1985, p. 335-373.
- NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Coordenadoria dos Serviços Técnicos Especializados. São Paulo, Secretaria do Estado da Saúde, 1976.
- NOVAK, B. & AHMAD, N. Residues in fish exposed to sublethal doses of endosulfan and fish collected from cotton growing area. J. Environ. Sci. Health B, 24(1): 97-109, 1989.
- OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for testing chemicals. Paris, OECD, 1981.
- OESER et al. (1971) apud GOEBEL, H. et al. Properties, effects, residues and analytics of the insecticide endosulfan. Residue Rev. 83: 1-174, 1982.
- OLIVER, B. G. & NIIMI, A. J. Bioconcentration factors of some halogenated organics for rainbow trout: limitations in their use for prediction of environmental residues. Environ. Sci. Technol., 19: 842-849, 1985.
- ORDAS, E. F.; SMITH, V. C. & MEYER, C. F. Spectrophotometric determination of heptachlor and technical chlordan on food and forage crops. J. Agr. Food Chem., 4: 444-451, 1956.

OWEN, J. W. & ROSSO, S. W. Effects of sublethal concentrations of pentachlorophenol on the liver of bluegill sunfish Lepomis macrochirus. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 26: 594-600, 1981.

PARRISH, P. R. Acute toxicity test. In: RAND, G. M. & PETROCELLI, S. R. Fundamentals of aquatic toxicology N. York, Hemisphere Publishing Corporation, 1985. p. 31-57.

PAUL, D. & RAUT, S. K. Comparative studies on the toxicity of endosulfan in some freshwater fishes under different pH and hardness of water. Current Sci., 56: 318-320, 1987.

PESTICIDE ANALYTICAL MANUAL. Methods for individual pesticide residues. Part 3. Rochville, Department of Health Education and Welfare (FDA), 1972. V.2.

PICKERING, G. H. & HENDERSON, C. The acute toxicity of some pesticides to fish. Ohio J. Sci., 66: 508-513, 1966.

PLAA, G. L. & HEWITT, W. R. Detection and evaluation of chemically induced injury. In: HAYES, A. W. Principles and methods in toxicology. N. York, Raven Press, 1982. p.407-445.



- FODOWSKI, A. A. & KHAN, M. A. Q. Fate of hexachlorocyclopentadiene in water and gold fish. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 13: 471-481, 1984.
- PRISTA, N.; ALVES, C. A. MORGADO, R. M. Estabilidade dos medicamentos. In:----- Técnica farmaceutica e farmacia galenica. 2 ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1979. V.2, p. 2465-2510.
- RAND, G. M. & PETROCELLI, S. R. Fundamentals of aquatic toxicology. N. York, Hemisphere Publishing Corporation, 1985. 666p.
- RAO, D. M. R. Improved cleanup technique for estimation of endosulfan residues from fish tissues under tropical conditions. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists, 64(2): 340-342, 1981.
- RAO, D. M. R.; DEVI, A. P. & MURTY, A. S. Relative toxicity of endosulfan, its isomers, and formulated products to the freshwater fish *Labeo rohita*. J. Toxicol. Environ. Health, 6: 825-834, 1980.

RAO, D. M. R., DEVI, A. P. & MURTY, A. S. Toxicity and metabolism of endosulfan and its effect on oxygen consumption and total nitrogen excretion of the fish *Macrogynathus aculeatum*. Est. Biochem. Physiol., **15**: 282-287, 1981.

RAO, D. M. & MURTY, A. S. Toxicity, biotransformation and elimination of endosulfan in *Anabas testudineus* (Bloch) Indian. J. Exp. Biol., **18**: 664-666, 1980.

RAO, D. M. R. & MURTY, A. S. Toxicity and metabolism of endosulfan in three freshwater catfishes. Environ. Pollut. (Series A), **22**: 223-231, 1982.

ROBERTS, D. The assimilation and chronic effects of sub-lethal concentrations of endosulfan on condition and spawning in the common mussel, *Mytilus edulis*. Mar. Biol., **16**: 119-125, 1972.

ROBERTS, M. & BOYCE, C. B. C. Principles of biological assays. In: NORRIS, J. R. & RIBBONS, D. W. Methods in microbiology. London, Academic Press, 1972. V.7A, p. 153-190.

ROBERTS, M. H. & FISHER, D. J. Uptake and clearance rates for Kepone in two marine fish species. Arch. Environ. Contam. Toxicol., **14**: 1-6, 1985.

- SALAZAR, C. E. Inseticidas e acaricidas. Toxicologia -  
receituario aeronômico. Piracicaba, Livroceres, 1985.  
412p.
- SASTRY, K. V. & SHARMA, S. K. The effect of endrin on the  
histopathological changes in the liver of *Channa  
punctatus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 20: 674-677,  
1978.
- SCHOETTGER (1970) apud GOEBEL, H. et al. Properties, effects,  
residues and analytics of the insecticide endosulfan.  
Residue Rev., B3: 1-174, 1982.
- SCHOETTGER (1970) apud RAO, D. M. R. & MURTY, A. S. Toxicity  
and metabolism of endosulfan in three freshwater  
catfishes. Environ. Pollut. (Series A), 22: 223-231, 1982.
- SCHUPHAN et al. (1972) apud GOEBEL, H. et al. Properties,  
effects, residues and analytics of the insecticide  
endosulfan. Residue Rev., B3: 1-174, 1982.
- SHANNON, L. R. Accumulation and elimination of dieldrin in  
muscle tissue of channel catfish. Bull. Environ. Contam.  
Toxicol., 12: 637-644, 1977 a.

- SHANNON, L. R. Equilibrium between uptake and elimination of dieldrin by channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 17(3): 278-284, 1977 b.
- SHARMA, R. M. Effect of endosulfan on adenosine triphosphatase (ATPase) activity in liver, kidney and muscles of *Channa gachua*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 41: 317-323, 1988.
- SHAW, G. R. & CONNELL, D. W. Comparative kinetics for bioaccumulation of polychlorinated biphenyls by the polychaete (*Capitella capitata*) and fish (*Mugil cephalus*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 13: 84-91, 1987.
- SHUKLA, L. & PANDEY, A. K. Effects of endosulfan on the hypothalamo - hypophysical complex and fish reproductive physiology. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 36(1):122-131, 1986.
- SIEVERS et al. (1972) apud WHO. Endosulfan - Environmental Health Criteria 40. Geneva, World Health Organization, 1984. 62p.
- SINGH, B. B. & NARAIN, A. S. Acute toxicity of Thiodan to catfish (*Heteropneustes fossilis*). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 28: 122-127, 1982.

- SINGH, N. N. & SRIVASTAVA, A. K. Effects of endosulfan on fish carbohydrate metabolism. Ecotoxicol. Environ. Saf., 5: 412-417, 1981.
- SKEA, J. C. et al. Accumulation and retention of mirex by brook trout fed a contaminated diet. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 27: 79-83, 1981.
- SOUTHWORTH, G. R.; KEFFER, C. C. & BEAUCHAMP, J. J. Potential and realized bioconcentration. A comparison of observed and predicted bioconcentration of azaarenes in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Environ. Sci. Technol., 14 (12): 1529-1531, 1980.
- SPACIE, A. & HAMELINK, J. L. Bioaccumulation. In: RAND, G. M. & PETROCELLI, S. R. Fundamentals of aquatic toxicology. N. York, Hemisphere Publishing Corporation, 1985 p. 495-525.
- SPRAGUE, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish III. Sublethal effects and safe concentrations. Water Res., 5: 245-266, 1971.
- STEWART, D. K. R. & CAIRNS, K. G. Endosulfan persistence in soil and uptake by potato tubers. J. Agr. Food Chem., 22(6): 984-986, 1974.

VAN DYK, L. F. & GREEF, C. G. Endosulfan pollution of rivers and streams in the Loskop Dam cotton-growing area. Agrochemophysica, 2: 71-76, 1977.

VEITH et al. (1979) apud GIAM, C. S. et al. Bioaccumulation of hexachlorobenzene in killifish (*Fundulus similis*). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 25: 891-897, 1980.

VEITH et al. (1979) apud SPACIE, H. & HAMELINK, J. L. Bioaccumulation In: RAND, G. H. & PETROCELLI, S. R. Fundamentals of aquatic toxicology. N. York, Hemisphere Publishing Corporation, 1985. Cap.17. p.514.

VERMA, S. R. et al. Effects of the pesticides Thiotox, dichlorvos and carbofuran on the test fish *Mystus vittatus*. Water Air Soil Pollut., 13: 229-234, 1980.

VERMA, S. R. et al. Bioassay trials with 23 pesticides to a freshwater teleost *Saccobranchus fossilis*. Water Res., 16: 525-529, 1982.

VERMA, S. R. et al. Pesticide - induced dysfunction in carbohydrate metabolism in three freshwater fishes Environ. Res., 32(1): 127-133, 1983.

VERMA, S. R. et al. Evaluation of an application factor for determining the safe concentration of agricultural and industrial chemicals. Water Res., 18(1): 111-115, 1984.

VETTORAZZI, G. La extrapolación de los datos toxicológicos obtenidos en animales de laboratorio para el hombre y su utilidad en la fijación de niveles de seguridad para las sustancias químicas. Un caso ilustrador: la contaminación biotera y abiótica de los alimentos con especial referencia al caso del mercurio. In: WORKSHOP INTERNACIONAL SOBRE AVALIAÇÃO DO RISCO DE SUBSTANCIAS QUÍMICAS, Campinas, UNICAMP, 1988. (Palestra) p.4.

WEDEMAYER (1968) apud MURTY, A. S. Toxicity of pesticides to fish. Boca Raton, CRC Press, 1986. V.1, p.91.

WHO. Endosulfan - Environmental Health Criteria 40. Geneva, World Health Organization, 1984. 62p.

YADWAD, V. B. Effect of endosulfan on glutathione - S - transferase and glutathione content of the premoult field crab *Paratelephusa hydrodromus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 43: 597-602, 1989.

YAMATO, Y.; KIYONAGA, M. & WATANABE, T. Comparative bioaccumulation and elimination of HCH isomers in short-necked clam (*Venerupis japonica*) and guppy (*Poecilia reticulata*). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 21: 352-359, 1983.

YAP, H. H. et al. In vitro inhibition of fish brain ATPase activity by cyclodiene insecticides and related compounds. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 14: 163-167, 1975.

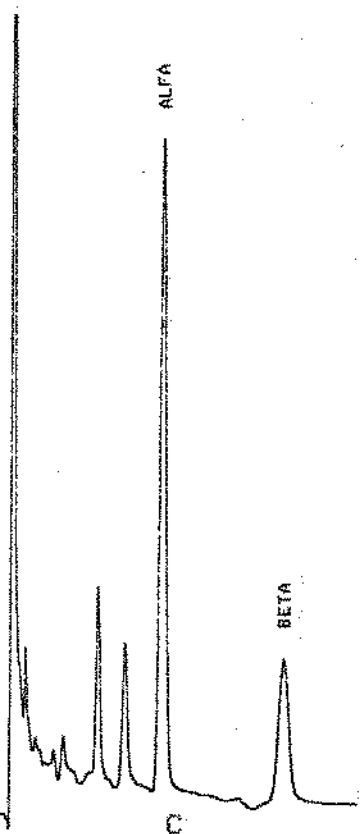
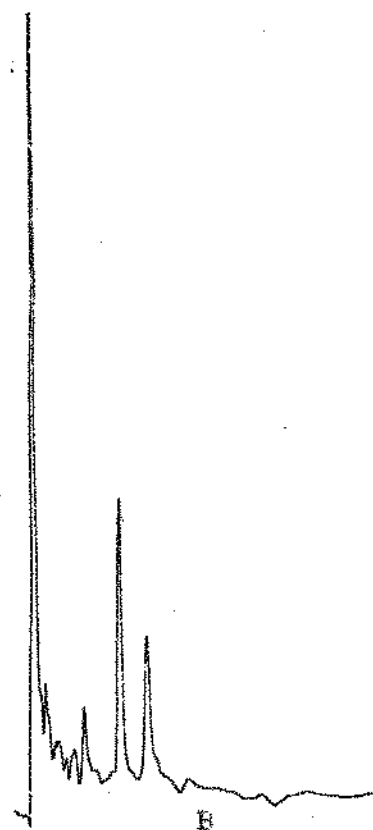
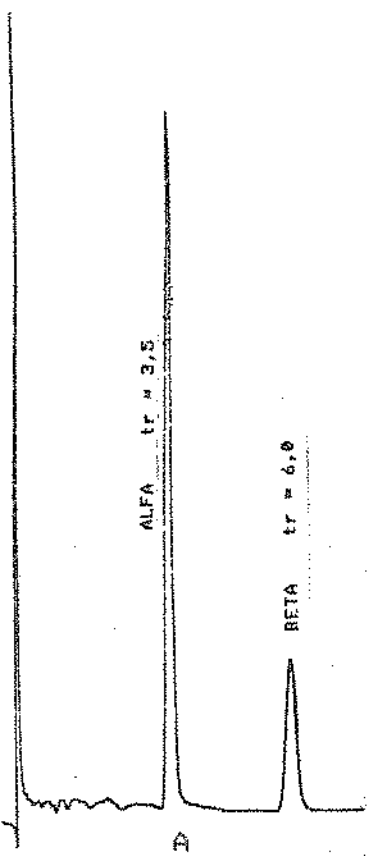
YODER et al. (1973) apud PEDNEKAR, M. D; GANDHI, S. R. & NETRAWALI, M. S. Evaluation of mutagenic activities of endosulfan, phosalone, malathion and permethrin, before and after metabolic activation, in the Ames *Salmonella* test. Bull. Environ. Cont. Toxicol. 38: 925-933, 1987.

YOKOMIZO, Y. et al. Resíduos de pesticidas organoclorados em peixes de água doce no estado de São Paulo. Sintese (Merck), 3: 3-8, 1982.



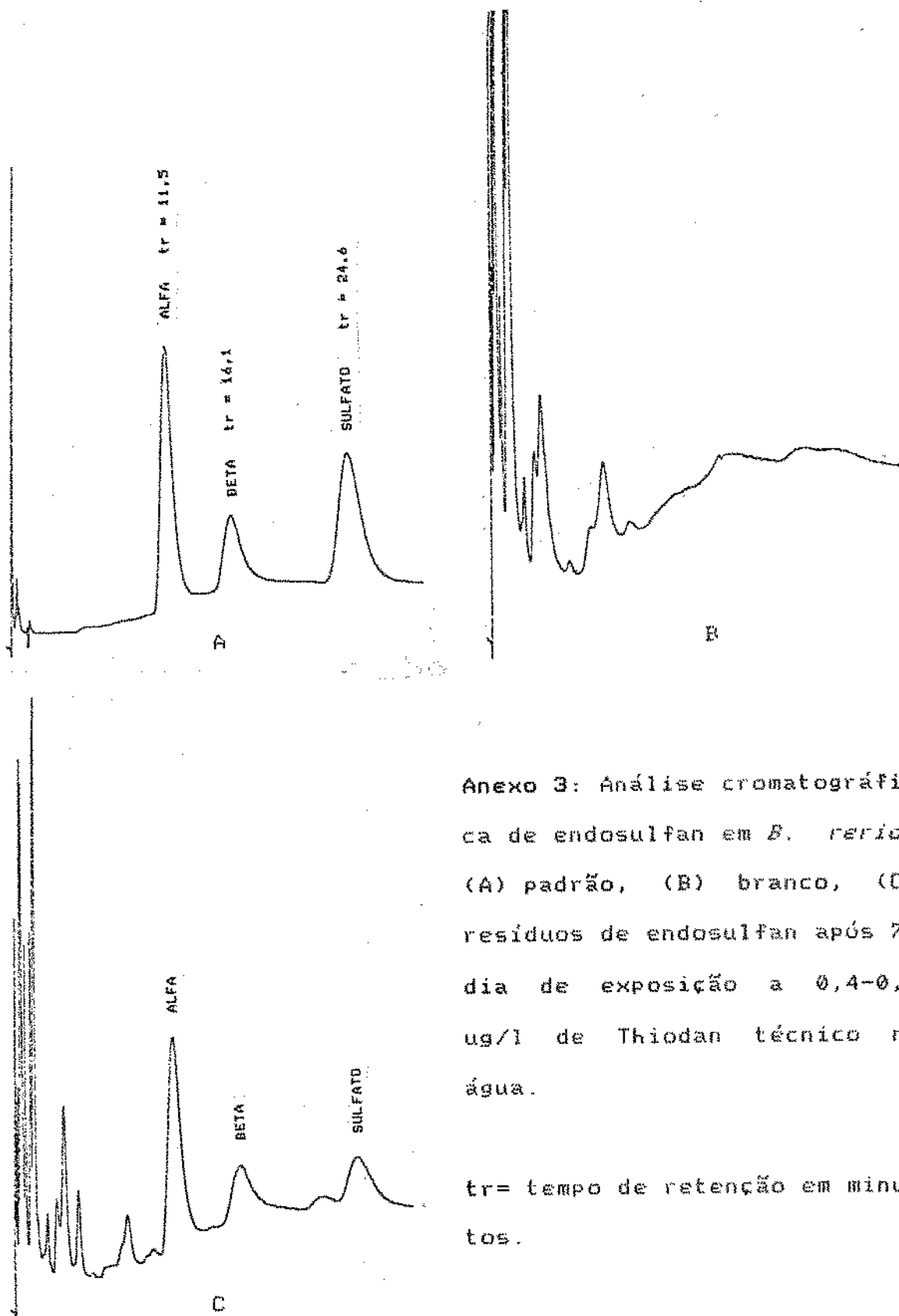
Fase	Composição Química
SE 30	metil silicona
OV 17	metil fenil silicona
OV 11	fenil metil dimetil silicona
OV 212	trifluoro propil metil silicona
QF 1	trifluoro propil metil silicona

Anexo 1: Composição química de fases líquidas utilizadas em colunas para análise de resíduos de endosulfan por C.G.L..



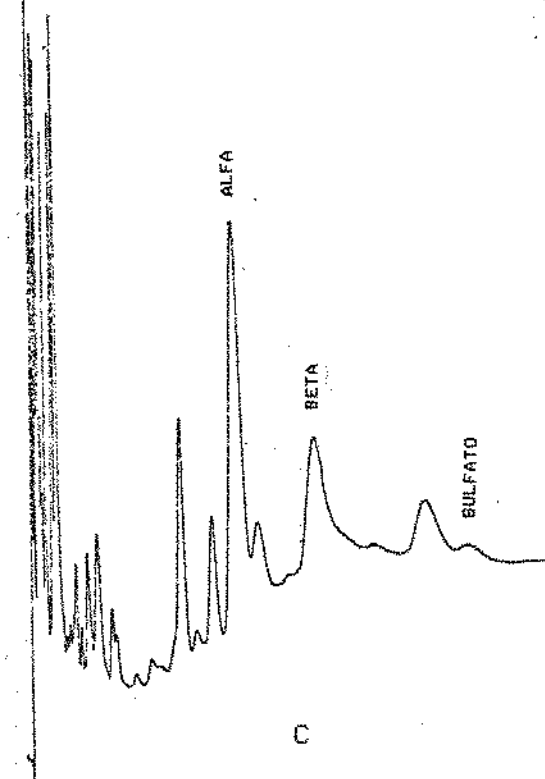
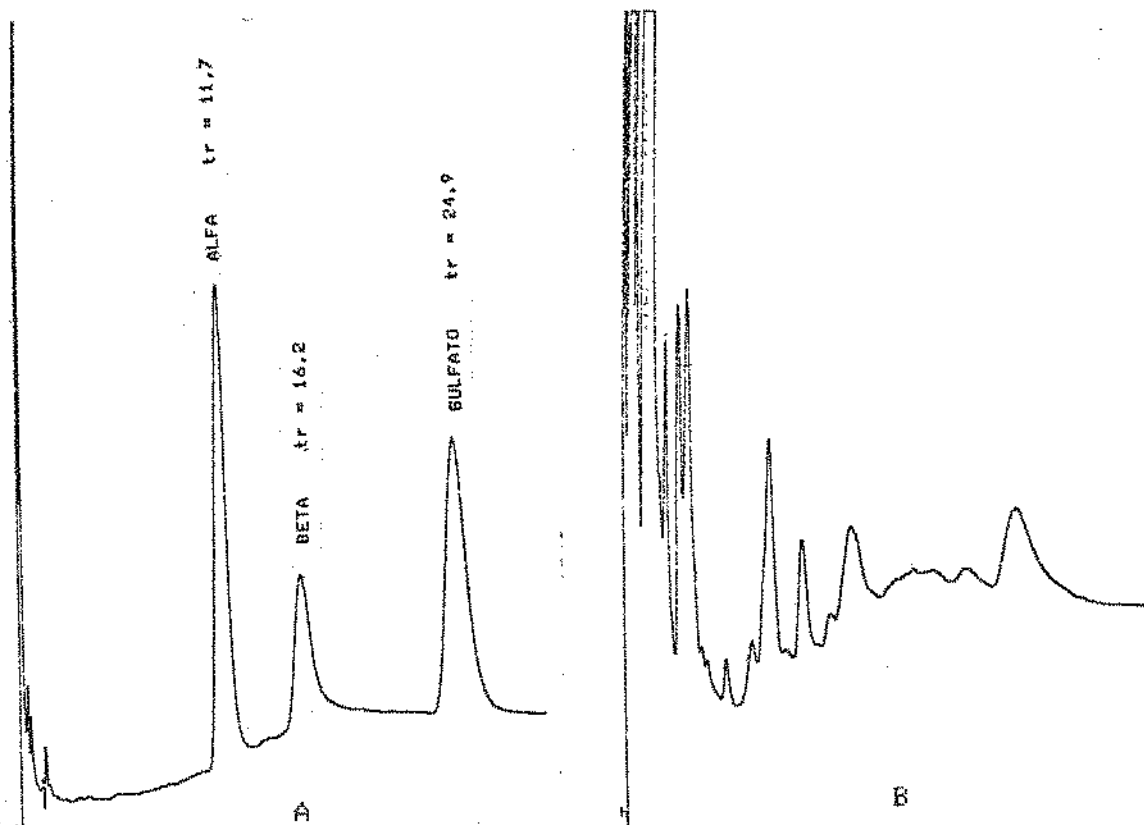
Anexo 2: Análise cromatográfica do endosulfan na água. (A) padrão, (B) branco, (C) água com 3 ug/l de Thiodan técnico.

tr = tempo de retenção em minutos.



Anexo 3: Análise cromatográfica de endosulfan em *B. rerio*. (A) padrão, (B) branco, (C) resíduos de endosulfan após 70 dia de exposição a 0,4-0,2 ug/l de Thiodan técnico na água.

tr= tempo de retenção em minutos.



Anexo 4: Análise cromatográfica de endosulfan em *H. bifasciatus*. (A) padrão, (B) branco, (C) resíduos de endosulfan após 70 dia de exposição a 0,4 - 0,2 ug/l de Thiodan técnico na água.

tr = tempo de retenção em minutos.